

素长期作用的结果,包括基因突变、接触环境毒物(如鱼藤酮、MPTP、6-OHDA等)、脑内炎症反应和免疫功能失调等。PD具有终生性和渐进性。自20世纪60年代初发现左旋多巴(L-Dopa)以来,使PD的病死率和致残率明显下降,问题在于尚不能阻止黑质内DA能神经元的进行性变性,无法排除L-Dopa使用后的远期不良效应。而且长期替代疗法将抑制残存和尚未受损的正常DA能神经元加强释放DA的代偿能力。因此研制新型的保护神经元型的PD治疗药物有着重要的意义。

小胶质细胞是脑内的免疫细胞,易被激活。关于小胶质细胞的激活与DA能神经元变性的因果关系,已有许多报道^[9]。并且普遍认为激活的小胶质细胞主要通过释放各种免疫因子和神经毒因子影响神经元的存活。在PD患者和PD动物模型中除了黑质致密部大量DA能神经元坏死外,还有大量的小胶质细胞的增殖。这些激活的小胶质细胞可以产生大量的超氧自由基,超氧自由基被认为是造成PD患者脑中DA能神经元坏死的氧化应激的主要原因。PD患者脑中已发现促进小胶质细胞激活的C反应蛋白,表达上调的炎性因子和嗜铬粒蛋白A等。因此在PD持续激活的小胶质细胞释放的大量炎性因子可能造成了DA能神经元的变性过程^[9]。因此降低小胶质细胞的免疫反应活性是阻止PD病程的关键靶点之一。

本课题组前期研究已发现NNAP可降低MPTP处理的PD小鼠脑内小胶质细胞的免疫反应,对DA能神经元损伤有明显保护作用^[5,6]。本研究发现6-OHDA大鼠损毁侧与模型组相比,实验给药组旋转次数明显减少,大鼠中脑DA能神经元的

免疫反应活性明显增高。提示NNAP可以改善PD大鼠的异常旋转行为,对PD大鼠中脑DA能神经元具有保护作用。进一步研究发现与模型组相比,实验给药组大鼠中脑小胶质细胞免疫反应活性明显降低。提示NNAP降低小胶质细胞的免疫反应活性可能参与其保护机制,未来对小胶质细胞表达改变相关的定量研究和深入探讨与小胶质细胞激活相关的机制,将为新型PD治疗药物的研制开发提供重要的理论依据和线索。

参考文献:

- [1] Tansey M G, Frank Cannon T C, McCoy M K, *et al.* Neuroinflammation in Parkinson's disease: is there sufficient evidence for mechanism-based interventional therapy? [J]. *Front Biosci*, 2008, 13(1): 709-717.
- [2] 陈生弟. 老年帕金森病的病因及发病机制 [J]. *实用老年医学*, 2001, 15(6): 284-287.
- [3] Jenner P. Functional models of Parkinson's disease: a valuable tool in the development of novel therapies [J]. *Ann Neurol*, 2008, 64(2): 16-29.
- [4] Schober A. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP [J]. *Cell Tissue Res*, 2004, 318(1): 215-224.
- [5] Yin S M, Yu D Q, Gao X, *et al.* Scorpion venom heat-resistant protein decreases immunoreactivity of OX-42 positive microglia cells in MPTP-treated mice [J]. *Neural Regen Res*, 2008, 3(9): 967-970.
- [6] 殷盛明, 于德钦, 安宁, 等. 蝎毒耐热蛋白对MPTP小鼠脑内小胶质细胞的影响 [J]. *中国应用生理学杂志*, 2009, 25(1): 79-80.
- [7] 于德钦, 殷盛明, 彭岩, 等. 蝎毒耐热蛋白对帕金森病模型小鼠脑内一氧化氮合酶的影响 [J]. *中草药*, 2006, 37(9): 1359-1362.
- [8] 殷盛明, 于德钦, 彭岩, 等. 蝎毒耐热蛋白保护MPTP小鼠空间学习记忆障碍的一氧化氮机制 [J]. *神经解剖学杂志*, 2006, 22(1): 38-44.
- [9] Gao H M, Liu B, Hong J S. Critical role for microglial NADPH oxidase in rotenone-induced degeneration of dopaminergic neurons [J]. *Neurosci*, 2003, 23(15): 6181-6187.

通络单味药与复方通心络的通络效果比较研究

蓝涛华^{1,2}, 谭红梅^{1,2}, 吴伟康^{1,2*}, 吴以岭^{3*}, 孙娟^{1,2}, 韩玉莲^{1,2*}

(1 中山大学中山医学院 病理生理教研室, 广东 广州 510080; 2 中山大学中西医结合研究所, 广东 广州 510080; 3 河北以岭医药研究院, 河北 石家庄 050035)

摘要: 目的 探讨具有通络作用的单味代表药的通络效果, 并将其与复方通心络的通络作用进行比较。方法 建立内皮损伤、内皮损伤合并微血栓形成(络脉瘀阻)及内皮损伤合并急性性心肌缺血(络脉细急)大鼠模型, 分别

①收稿日期: 2010-03-15

基金项目: 国家“973”项目资助(2005CB23305)

作者简介: 蓝涛华(1982—), 女, 广东梅州人, 中山大学中西医结合研究所博士生, 主要从事中西医结合防治心脑血管疾病的研究。

Tel: 13760624138 E-mail: luckyblue1982@126.com

* 通讯作者 吴伟康 Tel/Fax: (020) 87332028 E-mail: w2004wk@yahoo.com.cn

吴以岭 Tel/Fax: (0311) 3852240 E-mail: wantry@163.com

检测血管舒张功能、血浆 NO 和血管性假血友病因子 (vWF) 水平;凝血功能和血小板计数 (PLT),镜下观测肠系膜微循环,监测心电图 T 波改变。结果 内皮损伤模型中,各用药组最大舒张率、血浆 NO 值均显著高于模型组,其中通心络组升高更为明显;各用药组血浆 vWF 值显著低于模型组,其中通络组降低更为明显。在络脉瘀阻模型中,各用药组肠系膜微循环血液流态较模型组均有明显改善;各用药组的纤维蛋白原 (FG) 水平与模型组比较显著升高;通心络组和水蛭组血浆 vWF 值显著低于模型组,PLT 显著高于模型组。在络脉绌急模型中,通心络组在 30 s~3 min 各时间点 T 波压低幅度与模型组相比均显著降低;蜈蚣组在注射精氨酸加压素 (AVP) 后 30 s~2 min 时 T 波压低幅度较模型组明显减少;各用药组血浆 NO 值均显著高于模型组,但通心络组升高更为明显。结论 通络单味代表药人参、薤白、蜈蚣、水蛭对血管内皮损伤、络脉瘀阻以及络脉绌急有一定的防治作用,但其作用弱于复方通心络。通心络的通络效应优于各单一的通络药物,证明组方的科学性。

关键词:通络;通心络;内皮损伤;络脉瘀阻;络脉绌急;人参;薤白;蜈蚣;水蛭

中图分类号:R285.5 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2010)11-1842-06

心血管疾病严重危害人类健康,其防治受到当今医学界的广泛关注。高同型半胱氨酸血症 (HHcy) 是心血管疾病的独立危险因素^[1]。近年来许多研究表明^[2],HHcy 能诱导血管内皮损伤和功能障碍,从而促进心血管病的发生和发展。而内皮功能障碍能加速、加重微循环障碍和微血栓形成^[3]。目前研究认为血管内皮功能障碍可能在冠脉痉挛的发病机制或潜在机制中扮演重要角色^[4]。

络气郁滞是“络脉-血管系统病变学说”发生的始动因素;络脉瘀阻和络脉绌急是络病中主要的病理变化。近年来,根据“络脉-血管系统病变学说”理论研制出的治疗心脑血管病的代表方药通心络取得了良好的临床疗效。通心络全方由人参、土鳖虫、水蛭、全蝎、蜈蚣、蝉蜕、降香、冰片等药物组成,集中应用络虚通补药、虫类化瘀通络药、虫类搜风通络药和辛味通络药组方,具有益气活血、搜风通络的作用。本课题组研究已证实通心络对络脉瘀阻和络脉绌急有显著的防治效应^[5-6]。本实验通过建立内皮损伤、内皮损伤合并微血栓形成 (络脉瘀阻) 及内皮损伤合并急性心肌缺血 (络脉绌急) 大鼠模型,探讨具有通络作用的单味代表药的通络效果,并与复方通心络进行比较。

1 材料

1.1 实验动物:雄性 SPF 级 SD 大鼠,体质量 (150±20) g,由中山大学动物实验中心提供。

1.2 药品与试剂:通心络超微粉、人参、薤白、蜈蚣、水蛭均由河北以岭医药集团有限公司提供 (通心络超微粉、人参、薤白、蜈蚣为粉状提取物,用纯水配成相应溶液,水蛭为腹腔注射用针剂;实验中以上药品所用剂量为预实验得到的最佳剂量)。L-蛋氨酸、琥珀酰磺胺噻唑 (SST)、乙酰胆碱 (Ach)、角叉菜胶、脂多糖 (LPS)、精氨酸加压素 (AVP) 购于美国 Sigma 公司,NO 测定试剂盒购于南京建成生物医学工程研究所,血管性假血友病因子 (vWF)

ELISA 试剂盒购于上海太阳生物技术有限公司。

2 方法

2.1 大鼠内皮损伤模型

2.1.1 造模、分组与给药:大鼠随机分为对照组、模型组、通心络组、人参组、薤白组、蜈蚣组及水蛭组。除对照组外各组动物均 ig 给予蛋氨酸 1 g/kg, SST 0.5 g/kg 加入饮水,持续 4 周^[4],对照组予以等量纯水处理。通心络组于 ig 蛋氨酸第 4 周开始 ig 给予通心络 0.4 g/kg,持续 7 d,人参组、薤白组、蜈蚣组于 ig 蛋氨酸第 2 周开始分别 ig 给予人参、薤白、蜈蚣 1.2 g/kg,持续 3 周,水蛭组于 ig 蛋氨酸第 2 周开始 ip 给予水蛭 1.6 U/kg,持续 3 周。

2.1.2 检测指标:(1) 4 周后各组大鼠以 4% 戊巴比妥钠 ip 麻醉后心脏采血 0.5 mL,与 3.8% 枸橼酸钠按 9:1 混合均匀,4℃、3 000 r/min 离心 10 min,取血清,分别采用硝酸还原酶法及酶联免疫吸附双抗体夹心法检测 NO 及 vWF 值。(2) 实验结束后取大鼠主动脉,置于连续通含 95% O₂ 和 5% CO₂ 混合气体的改良 Kerbs 溶液^[4] (mmol/L: NaCl 118、KCl 4.7、CaCl₂ 2.6、MgSO₄·7H₂O 1.2、KH₂PO₄ 1.2、NaHCO₃ 25、葡萄糖 5.5, pH 7.4) 中,小心分离周围脂肪和结缔组织,注意勿牵拉,保护内皮,将动脉条剪成 3 mm 左右的环。动脉环置于 37℃ 含 4 mL Kerbs 液的恒温浴槽中,一端固定于浴槽底部,另一端连接于张力换能器 (JZ101)。浴槽中持续通含 95% O₂ 和 5% CO₂ 混合气体,并每隔 20 min 换液 1 次,内槽恒温 37℃,负荷 1.5 g,平衡 1.5 h。收缩张力信号通过 MP-285 Micromanipulatorsys (USA) 的八通道接头传输到与 Powerlab 系统 (AD instruments, USA) 相连的 MacOS Macintosh 计算机上,直接采用 Powerlab 系统及其软件 Chart for Windows 进行数据记录和分析。实验前预先给予 100 mmol/L KCl 收缩血管,在随后的实验过程中,每一步实验完成后,及时

冲洗,待曲线回至基线并稳定 25 min 后再进行下一步实验。血管环高钾预收缩稳定冲洗至基线平衡后,4 mL Krebs 液定容,加入 1×10^{-4} mol/L 苯肾上腺素 40 μ L (终浓度为 1×10^{-6} mol/L),待收缩反应达平台后,①以不同累积浓度 ($1 \times 10^{-10} \sim 1 \times 10^{-6}$ mol/L) 的 Ach 作用于血管环,记录各浓度下血管环的舒张率,观察 Ach 诱导的内皮依赖性血管舒张反应;②以不同累积浓度 ($1 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-5}$ mol/L) 的硝普钠 (SNP) 作用于血管环记录各浓度下血管环的舒张率,观察 SNP 诱导的非内皮依赖性血管舒张反应。

2.2 大鼠内皮损伤合并微血栓形成 (络脉瘀阻) 模型

2.2.1 造模、分组与给药:大鼠随机分为对照组、模型组、通心络组、人参组、薤白组及水蛭组。除对照组外,各组大鼠在内皮损伤模型制备 (2.1.1 项方法) 基础上 ip 角叉菜胶 10 mg/kg,16 h 后 ip LPS 0.2 mg/kg,对照组 ip 等量生理盐水。给药方法同 2.1.1 项。

2.2.2 检测指标:①注射 LPS 后 20 h,心脏采血 1 mL,与 3.8% 枸橼酸钠按 9:1 混合均匀,以 3 000 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 15 min,收集血浆,在 2 h 内记录凝血酶时间 (TT)、凝血酶原时间 (PT)、活化部分凝血活酶时间 (APTT),检测纤维蛋白原 (FG) 水平。另心脏采血 0.5 mL,使用 1.8 mg/mL EDTA 抗凝管收集血液,4 $^{\circ}$ C 离心 15 min,收集血浆,2 h 内检测血小板计数 (PLT)。以上均由中山大学附属第一医院检验医学部检测。②注射 LPS 后 20~24 h,观测大鼠肠系膜微循环:实验前将大鼠禁食 12 h,用 4% 戊巴比妥钠 ip 麻醉后固定,于腹腔一侧做 3~4 cm 的切口,轻轻拉出肠系膜,置于 37.0 $^{\circ}$ C 的恒温水浴槽内,选择适宜观察处并固定,置于三目显微镜下观察肠系膜微循环血流速度、动脉口径及流态,通过 BF 2000 医学图像分析系统录像。并采用微血管流态半定量法,根据血液流动状态,将流速分为 7 个等级,配合使用光点跟踪法,对微循环改变进行量化,计分越大,表示微循环障碍越明显。③注射 LPS 24 h 后采血,采用酶联免疫吸附双抗体夹心法测定血浆 vWF 值。

2.3 大鼠内皮损伤合并急性心肌梗死 (络脉细急) 模型

2.3.1 造模、分组与给药:大鼠随机分为对照组、模型组、通心络组、人参组、薤白组、蜈蚣组及水蛭组。除对照组外,各组大鼠在内皮损伤模型制备 (2.1.1

项方法) 基础上禁食 18 h 后,ip 4% 戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 麻醉,颈静脉 iv AVP 0.1 mL/100 g。给药方法同 2.1.1 项。

2.3.2 检测指标:①记录 AVP 注射后标准肢体 II 导联心电图 (30 min),测量注射 AVP 后 0、15、30 s 和 1、2、3、4、5、10、20、30 min 时 T 波压低幅度。②记录心电图后采血,采用硝酸还原酶法测定血浆 NO 水平。

2.4 统计学处理:结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 11.0 统计软件对资料进行 One Way ANOVA 统计分析。

3 结果

3.1 对内皮损伤的防治作用

3.1.1 血浆 NO、vWF 检测结果:人参组、薤白组、蜈蚣组及水蛭组血浆 NO 水平均显著高于模型组,其中通心络组升高更为明显;人参组、薤白组、蜈蚣组及水蛭组血浆 vWF 水平显著低于模型组,其中通心络组降低更为明显。见表 1。

表 1 通络代表药对内皮损伤大鼠血浆 NO 和 vWF 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	剂量/(g $\cdot$ kg $^{-1}$)	NO/(μ mol $\cdot$ L $^{-1}$)	vWF
对照	-	33.53 $\pm$ 9.82	0.0487 $\pm$ 0.0260
模型	-	10.91 $\pm$ 2.54*	0.1665 $\pm$ 0.0421*
通心络	0.4	27.78 $\pm$ 7.048#	0.0659 $\pm$ 0.0160#
人参	1.2	25.15 $\pm$ 12.32#	0.0620 $\pm$ 0.0615#
薤白	1.2	24.51 $\pm$ 12.31#	0.0520 $\pm$ 0.0538#
蜈蚣	1.2	18.05 $\pm$ 2.86#	0.1161 $\pm$ 0.0460#
水蛭	1.6 (U $\cdot$ kg $^{-1}$)	31.63 $\pm$ 19.19#	0.0942 $\pm$ 0.0465#

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

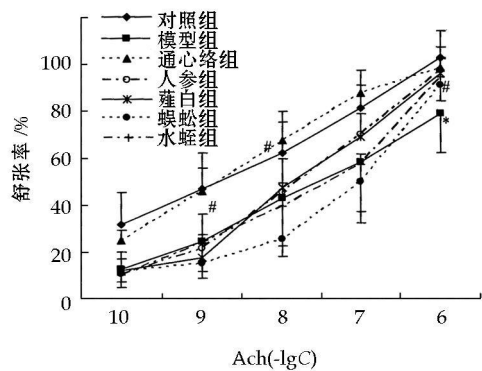
* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group

3.1.2 血管舒张功能的变化:在 Ach 诱导的内皮依赖性血管舒张反应中,人参组、薤白组、蜈蚣组和水蛭组最大舒张率较模型组均有所升高,其中通心络组升高更为明显。在 SNP 诱导的非内皮依赖性血管舒张反应中,各组间舒张率未见统计学差异。见图 1 和 2。

3.2 对内皮损伤合并微血栓形成 (络脉瘀阻) 的防治作用

3.2.1 凝血 4 项及 PLT 结果:各用药组的 FG 水平与模型组比较显著升高;通心络组和水蛭组 PLT 显著高于模型组。见表 2。

3.2.2 血浆 vWF 检测结果:通心络组和水蛭组血浆 vWF 水平显著低于模型组 ($P < 0.05$)。对照



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group

图 1 ACh 诱导的内皮依赖性舒张反应曲线

Fig. 1 Dose response curves of ACh induced endothelium dependent relaxation

表 2 通络代表药对内皮损伤合并微血栓形成大鼠凝血指标的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Table 2 Effect of dredging collaterals drugs on coagulation index of endothelium injured rats with micro thrombosis ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	剂量/(g · kg ⁻¹)	PT/s	APTT/s	TT/s	FG/(g · L ⁻¹)	PLT
对照	-	8.56 ± 0.298	21.300 ± 1.576	54.413 ± 5.859	2.373 ± 0.265	804.0 ± 41.0
模型	-	9.23 ± 0.73*	24.129 ± 1.775*	51.943 ± 6.245	1.869 ± 0.243*	442.0 ± 67.2*
通心络	0.4	8.50 ± 1.91	22.800 ± 2.164	55.400 ± 5.815	3.008 ± 0.556#	648.0 ± 75.1#
人参	1.2	8.62 ± 0.85	24.700 ± 4.522	37.600 ± 8.135	3.204 ± 0.959#	195.0 ± 227.0#
薤白	1.2	8.08 ± 0.48#	24.800 ± 3.546	46.400 ± 5.416#	3.878 ± 1.090#	251.0 ± 231.0#
水蛭	1.6 (U · kg ⁻¹)	8.68 ± 0.89	18.400 ± 2.008#	44.900 ± 5.098#	4.530 ± 0.503#	531.0 ± 140.3#

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group

组、模型组、通心络组、人参组、薤白组、水蛭组血浆 vWF 水平 ($n = 8$) 分别为 0.0514 ± 0.0267 、 0.1750 ± 0.0760 、 0.1013 ± 0.0253 、 0.1131 ± 0.0775 、 0.1254 ± 0.0623 、 0.0814 ± 0.0752 。

3.2.3 肠系膜微循环观测: 镜下可见模型组毛细血管甚至小血管阻塞, 血管边缘模糊, 血管周围弥漫性、片状渗血或大片瘀血, 血液流变异常, 颗粒感明显, 呈粒缓流或粒摆流, 红细胞呈中、重度聚集。各用药组肠系膜微循环血流速度明显加快, 偶见瘀血, 无渗血, 基本无红细胞聚集现象。见表 3。

表 3 肠系膜微循环等级和评分

Table 3 Microcirculation scale and score of mesentery

组别	剂量/(g · kg ⁻¹)	动物数/只	不同等级			评分 ($\bar{x} \pm s$)
			1~3 级	3~5 级	5~7 级	
对照	-	10	10	0	0	1.540 ± 0.398
模型	-	10	0	3	7	5.290 ± 0.709*
通心络	0.4	10	6	4	0	3.020 ± 0.503*
人参	1.2	6	4	1	1	3.833 ± 1.602*
薤白	1.2	6	4	1	1	3.833 ± 0.726*
水蛭	1.6 (U · kg ⁻¹)	8	6	2	0	3.250 ± 1.430*

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group

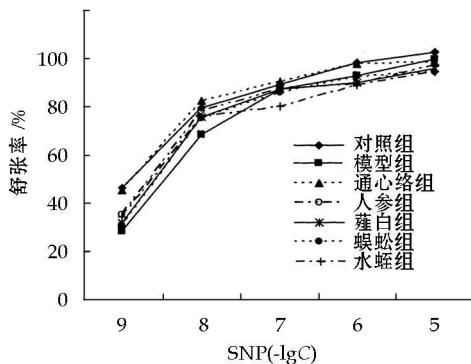


图 2 SNP 诱导的非内皮依赖性舒张反应曲线

Fig. 2 Dose response curves of SNP induced endothelium dependent relaxation

3.3 对内皮损伤合并急性心肌缺血 (络脉瘀阻) 的防治作用

3.3.1 T 波压低的变化: 通心络组在注射 AVP 后 30 s ~ 3 min 各时间点 T 波压低幅度与模型组相比均显著降低; 蜈蚣组注射 AVP 后 30 s 及 2 min T 波压低幅度较模型组明显降低, 见表 4。

3.3.2 血浆 NO 检测结果: 各用药组血浆 NO 值均显著高于内皮损伤合并急性心肌缺血组 ($P < 0.05$), 其中通心络组升高更为明显。对照组、模型组、通心络组、人参组、薤白组、蜈蚣组、水蛭组血浆 NO 水平 ($n = 8$) 分别为 (33.53 ± 9.819)、(9.127 ± 5.449)、(27.78 ± 7.048)、(25.38 ± 6.997)、(17.31 ± 5.038)、(18.05 ± 2.863)、(26.42 ± 6.76) $\mu\text{mol/L}$ 。

4 讨论

根据络病学说, 脉与络是以运行血液为主要功能的组织结构部分, 脉络与中小血管及微循环概念有高度的一致性, 在此基础上把传统中医络病理论与现代医学中小血管及微循环病变结合起来提出了“脉络—血管系统病变学说”。病理上络气郁滞引起的络脉自稳状态功能异常与血管内皮功能障碍具有

表 4 注射 AVP 后 T 波压低改变
Table 4 Change of T wave depression of ECG induced by injection of AVP

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	注射 AVP 后 T 波压低改变/mV					
		0 s	15 s	30 s	1 min	2 min	3 min
对照	-	- 0.001 8±0.004 0	- 0.063 8±0.042 0	- 0.075 9±0.032 0	- 0.048 9±0.016 0	- 0.042 6±0.018 8	- 0.054 4±0.038 0
模型	-	- 0.003 5±0.006 1	- 0.046 0±0.036 0	- 0.766 0±0.038 1	- 0.070 4±0.033 0	- 0.072 0±0.032 0	- 0.071 8±0.028 0
人参	1.2	0.038 2±0.148 0	0.045 0±0.145 0	- 0.011 0±0.123 0	0.019 2±0.190 0	0.044 1±0.233 0	0.020 1±0.191 0
薤白	1.2	0.072 1±0.156 0	0.066 3±0.016 7	0.040 7±0.154 0	0.034 0±0.183 0	0.088 5±0.126 0 [#]	0.088 0±0.107 0
蜈蚣	1.2	0.012 8±0.039 0	- 0.080 5±0.058 0	- 0.002 0±0.140 0 [#]	- 0.065 9±0.187 0	- 0.021 7±0.130 0 [#]	- 0.034 0±0.141 0
水蛭	1.6 U·kg ⁻¹	0.006 8±0.039 0	0.014 2±0.058 0	- 0.115 3±0.143 0	- 0.080 0±0.187 0	- 0.027 7±0.137 0	- 0.050 9±0.141 0
通心络	0.4	0.001 0±0.012 5	- 0.011 0±0.011 4	- 0.012 9±0.017 0 [#]	- 0.015 5±0.023 0 [#]	- 0.020 0±0.022 0 [#]	- 0.028 8±0.021 0 [#]

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	注射 AVP 后 T 波压低改变/mV				
		4 min	5 min	10 min	20 min	30 min
对照	-	- 0.039 0±0.013 0	- 0.035 4±0.020 0	0.025 5±0.182 0	0.016 0±0.135 0	0.011 9±0.022 0
模型	-	- 0.048 1±0.026 0	- 0.021 9±0.162 0	0.009 1±0.009 0	0.006 1±0.143 0	0.007 6±0.009 0
人参	1.2	0.058 1±0.182 0	0.080 8±0.202 0	0.005 4±0.189 0	- 0.038 0±0.019 0	0.065 3±0.123 0
薤白	1.2	0.018 9±0.176 0	0.103 7±0.095 0	0.038 2±0.158 0	0.014 6±0.110 0 [#] *	0.048 8±0.157 0
蜈蚣	1.2	- 0.062 3±0.145 0	- 0.026 8±0.161 0	- 0.115 7±0.138 0	- 0.024 9±0.138 0	0.018 5±0.124 0
水蛭	1.6 U·kg ⁻¹	- 0.035 9±0.145 0	- 0.060 6±0.161 0	- 0.036 0±0.138 0	- 0.062 7±0.138 0	- 0.063 7±0.124 0
通心络	0.4	- 0.030 0±0.026 0	- 0.012 8±0.014 0	0.012 6±0.019 0	0.008 4±0.157 0	0.002 1±0.012 0

与对照组比较: * P<0.05; 与模型组比较: # P<0.05
* P<0.05 vs control group; # P<0.05 vs model group

内在一致性,均为“脉络-血管系统”病变的始动因素。络脉瘀阻和络脉绌急是络病中主要的病理变化。“络以通为用”是中医治疗络病的原则,益气通络(人参),辛温通络(薤白、降香),活血通络(水蛭)为主要通络治法。各通络药物有不同的通络特异性,人参补气容络,生津固脱;薤白辛温通阳,畅通络气;降香辛香通络,理气化瘀;水蛭化瘀通络,破血逐瘀^[7]。通络复方通心络是近年应用络病学说与通络药物治疗心血管病的代表性方药,各通络药物按君、臣、佐、使原则组合,益心气扶正以固本虚,使气旺血行、脉络畅通。

血管内皮损伤或(和)功能障碍是血管病变始动及发展加重的首要因素,内皮功能障碍能加速、加重微循环障碍和微血栓形成。目前研究认为血管内皮功能障碍可能在冠脉痉挛的发病机制或潜在机制中扮演重要角色。内皮依赖性舒张反应的降低或消失是国际公认的评价血管内皮功能障碍的金标准^[3],NO是血管内皮所合成分泌的最重要的血管活性物质。NO具有扩张血管、抗血小板黏附聚集、抗血管平滑肌细胞增生等作用^[8],血浆NO水平可作为血管内皮损伤程度的评价标准。vWF可促进血小板的黏附与聚集^[9],如血浆vWF水平也间接表明血管内皮损伤程度。

本实验通过建立内皮损伤、内皮损伤合并微血栓形成(络脉瘀阻)及内皮损伤合并急性心肌缺血(络脉绌急)大鼠模型,探讨通络代表药的通络效

果,并将其与复方通心络进行比较。实验结果显示通络代表药对饮食诱导的HHcy所致的内皮损伤有防治作用,可以改善内皮依赖性血管舒张功能,升高血浆NO水平,降低血浆vWF水平,起到保护血管内皮的作用,而通心络的作用更为明显;通络代表药干预内皮损伤合并微血栓形成模型,可以显著降低血浆vWF值、改善血液流变,还可显著升高PLT和FG水平,而通心络的作用更为明显;通络代表药干预内皮损伤合并急性心肌缺血模型,可以显著升高血浆NO水平,改善络脉绌急大鼠T波压低幅度,减轻心肌缺血程度,而通心络的作用更为明显。以上实验结果表明通络代表药人参、薤白、蜈蚣、水蛭对血管内皮损伤、络脉瘀阻以及络脉绌急有一定的防治作用,但其作用弱于复方通心络。通心络的通络效应优于单一的通络药,通心络可能同时针对络病多种病机起效,在治疗络病方面有更广的适应症范围,同时也反映出中药复方君、臣、佐、使组方原则的科学性。

参考文献:

[1] Wilcken D E, Wilcken B. The pathogenesis of coronary artery disease. A possible role for methionine metabolism [J]. *J Clin Invest*, 1976, 6: 1079-1082
[2] Ling Q, Hajjar K A. Inhibition of endothelial cell thromboresistance by homocysteine [J]. *J Nutr*, 2000, 130(2): 373S-376S
[3] 孙娟,谭红梅,吴伟康,等. 高同型半胱氨酸诱导血管内皮功能障碍促进微循环障碍和微血栓形成[J]. 中国病理生理杂志, 2007, 23(12): 2336-2340
[4] Miwa K, Fujita M, Sasayama S. Recent insights into the mechanisms, predisposing factors, and racial differences of

- coronary vasospasm [J]. *Heart Vessels*, 2005, 20(1): 1-7.
- [5] 孙娟, 谭红梅, 吴伟康, 等. 通心络超微粉对大鼠络脉瘀阻的防治效应研究 [J]. 新中医, 2007, 39(9): 103-105.
- [6] 韩玉莲, 程超, 谭红梅, 等. 通心络超微粉对大鼠络脉急性模型的通络效应及其作用机制 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(22): 2404-2408.
- [7] 吴以岭. 络病学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2006.
- [8] Moncada S. Nitric Oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology [J]. *Pharmacol Rev*, 1997, 43: 109-114.
- [9] Galati S S, Wroblewski H, Vibeke B S, et al. Endothelin and Von Willebrand factor as parameters of endothelial function in idiopathic dilated cardiomyopathy: different stimuli for release before and after heart transplantation [J]. *Am Heart J*, 1999, 137: 549-555.

江浙蝮蛇毒对体外培养人滑膜细胞凋亡的影响

胡珏^{1,2}, 许东航^{1,3*}, 吕庆华³

(1. 浙江大学药学院, 浙江 杭州 310031; 2. 浙江医学高等专科学校 药理教研室, 浙江 杭州 310053;

3. 浙江大学医学院附属第二医院, 浙江 杭州 310009)

摘要:目的 探讨江浙蝮蛇毒(AHV)诱导类风湿性关节炎(RA)患者滑膜细胞凋亡的作用及对相关蛋白Caspase 3 表达的影响。方法 AHV 处理培养的滑膜细胞后, 采用 MTT 比色法检测 AHV 对滑膜细胞增殖的抑制作用, 并采用流式细胞仪(FCM)检测细胞凋亡率, 以免疫组织化学法检测 Caspase 3 蛋白的表达。结果 MTT 的检测结果显示 5 μ g/mL AHV 处理组滑膜细胞增殖抑制率达 67.2%, 且与时间、剂量具有正相关关系 ($P < 0.05$), AHV 体外作用滑膜细胞 24 h 的 IC_{50} 为 3 508 μ g/mL。流式细胞仪结果显示, 与对照组相比, AHV 各剂量组凋亡率明显增加 ($P < 0.05$), 并与剂量呈正相关。AHV 体外作用滑膜细胞 24 h 时出现了明显的 Caspase 3 蛋白表达, 其蛋白表达率明显高于对照组。结论 AHV 对滑膜细胞具有较强的增殖抑制作用, 细胞凋亡率明显增加可能与 AHV 诱导滑膜细胞 Caspase 3 活化相关。

关键词:江浙蝮蛇毒; 类风湿性关节炎; 滑膜细胞; 细胞凋亡; Caspase 3

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)11-1847-04

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种常见的严重危害人类身心健康的多因素导致的系统性自身免疫性疾病, 表现为关节反复的炎症、滑膜细胞“肿瘤样”增生以及由此引起的软骨和骨的破坏, 其发病机制主要与滑膜细胞凋亡减少所导致的滑膜组织内细胞的增殖和死亡之间的平衡失调有关^[1]。因而, 促进滑膜细胞的凋亡可能是未来治疗 RA 的重要方向。蛇毒是毒蛇分泌出来的一种毒液, 其中含有多种具有不同生理与药理活性的酶与肽类物质。近年来国内外从蛇毒中分离出多种抗肿瘤成分, 它们对肿瘤细胞有杀伤和抑制生长的作用^[2-3]。江浙蝮蛇毒(*Agkistrodon halys* Pallas venom, AHV)的主要活性成分蛇毒蛋白有诱导凋亡和抗肿瘤作用, 临床上已被用于治疗 RA 等慢性疾病所致的炎症和疼痛。然而, AHV 对 RA 患者的治疗作用机制仍不是很清楚。本实验以此为出发点, 初步研究了 AHV 对 RA 患者成纤维样滑膜细胞增殖与凋亡的影响, 并分析其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 病例来源: 2007 年 2~7 月浙江大学附属第二医院骨科行膝关节置换术的 RA 患者 6 例。其中女性 3 例, 男性 3 例, 年龄 34~62 岁, 平均 (50 $\pm$ 10) 岁; 病程 6~30 年, 平均 (14 $\pm$ 10) 年。所有患者皆符合 1987 年美国风湿病学会(ACR)修订的 RA 诊断标准。

1.2 主要试剂与仪器: DMEM 培养基、II 型胶原酶、胎牛血清、胰蛋白酶, 美国 Gibco 公司; MTT 和 DMSO, 美国 Sigma 公司; 兔抗人 Caspase 3 抗体, 美国 Santa Cruz 公司; PI 储存液, 美国 Sigma 公司, RNase 试剂用时现配。AHV 由浙江龙图蛇业集团有限公司提供, -20 $^{\circ}$ C 保存。酶标检测仪(BioRAD Model 550 型); FACS Calibur 型流式细胞仪, 美国 Becton Dickinson 公司。

1.3 滑膜细胞的分离和培养^[4]: 无菌条件下, 将关节置换术获得的滑膜组织切成 3~5 mm 的碎片, 用 II 型胶原酶和等体积的 DMEM 培养基, 在 37 $^{\circ}$ C、

①收稿日期: 2010-03-28

基金项目: 浙江省中医药科研基金项目 (2006C024)

作者简介: 胡珏 (1972—), 女, 浙江金华人, 硕士, 副教授, 研究方向为类风湿性关节炎的基础与临床研究。

Tel: (0571) 87692678 E-mail: hjmice@zjmc.net.cn

* 通讯作者 许东航 Tel: (0571) 87784529 E-mail: xudonghang@zju.edu.cn