

高脂血清对体外培养大鼠主动脉平滑肌细胞一氧化氮及钙离子含量的影响与中药的调控作用

□ 孙连胜¹ 陆一竹² 刘俊荣² 范英昌²

(1. 天津市东沽卫生院 天津 300450 2. 天津中医学院 天津 300193)

摘要 目的: 观察高脂血清对体外培养大鼠主动脉平滑肌细胞一氧化氮及钙离子含量的影响与中药调控作用。方法: 运用体外培养技术, 培养大鼠主动脉平滑肌细胞, 以加高脂血清和加中药等不同培养基进行分组培养, 取细胞及培养液进行指标检测。结果: 调肝导浊中药可降低胞内钙离子含量, 可增加细胞培养液中一氧化氮含量。结论: 调肝导浊中药制剂具有良好防治动脉粥样硬化的作用。

关键词 动脉粥样硬化 平滑肌细胞 一氧化氮 钙离子 调肝导浊中药制剂 实验研究

动脉粥样硬化 (AS) 属“血瘀痰浊”范畴。张伯礼教授根据其气滞痰浊、瘀血阻滞的主要病因病机, 提出以调肝导浊为大法的中药复方, 在临床取得良好的治疗效果。我们用体外培养大鼠主动脉平滑肌细胞 (SMC) 对调肝导浊中药对培养液中 NO 及胞内 Ca^{2+} 含量的影响进行研究。

1 材料

1.1 实验药品与试剂 细胞培养试剂: 胰蛋白酶 (天象人生物工程公司产品), 兔高脂血清, 胎牛血清 (中国医学科学院血液病研究所产品), DMEM-F12 (Gibco 产品), 调肝导浊中药制剂 (由天津中医学院提供, 为 100% 无菌溶液)。Fura-2/AM 购自中国医学科学院药物研究所。NO 试剂盒为南京建成生物工程研究所产品。

1.2 仪器 960 型荧光分光光度计和 THZ-C 恒温振荡器。

2 方法

2.1 主动脉 SMC 培养 选用 1 至 1 个半月龄健康 Wistar 雄性大鼠体重 150 ~ 200g, 按赵三妹等人的方法, 进行组织块贴壁培养。14 ~ 15 天后, 长成“峰”“谷”交错的致密细胞层, 消化传代。

2.2 培养细胞分组 培养的第 4 代 SMC 按 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 培养液接种于内放有盖玻片的培养瓶中, 48h 后将培养瓶随即分为 4 组: ①正常培养组: 依然采用正常培养基。②高脂血清组: 换用高脂血清培养基。③正常加药组: 换用加中药制剂的正常培养基。④高脂加药组: 换用加中药制剂的高脂血清培养基 (中药按每 100ml 培养液 30ul 药液比例加入)

2.3 NO 含量测定 细胞分组培养 72h 后, 吸取培养液, 用 NO 试剂盒检测 NO 含量。

2.4 胞内 Ca^{2+} 浓度测定 细胞分组采用不同培养基, 72h 后倒去培养液, 加 0.25 % 胰蛋白酶 (Difcol:

250) 消化液, 镜下观察到细胞成片的收缩, 立即加培养液终止消化, 用弯头吸管将细胞自瓶壁上吹打下来, 悬液以 1000rpm 离心 5min, 去上清, 以 D-Hanks 液洗 2 次, 用含 20% 胎牛血清的 DMEM-F12 培养基制备成 2×10^6 个/ml 细胞悬液, 37°C 预温 5min, 弃上清。D-Hanks 液洗涤, 悬浮调整负载有 Fura-2 的细胞悬液为 2×10^6 个细胞/ml。测定用激光光栅 5nm, 发射光光栅 10nm, 以 300~400nm 扫描发光谱, 固定激光波长在高峰波长, 观察不同实验条件下荧光强度的变化, 由下式计算 $[\text{Ca}^{2+}]$: $[\text{Ca}^{2+}]_i = Kd (F - F_{\min}) / (F_{\max} - F)$

2.5 统计学方法 采用组间对照, t 检验。

3 结 果

3.1 细胞培养液中 NO 含量的变化 分组培养 72h 后, 取培养液作 NO 含量检测。结果显示, 高脂血清组 NO 含量明显低于正常组 ($P < 0.01$)。正常加药组和高脂加药组 NO 含量明显高于高脂血清培养组, 且正常加药组 NO 含量也高于正常培养不给中药组 ($P < 0.01$)。提示调肝导浊中药可升高细胞培养液中 NO 浓度, 对高脂血清培养引起的 NO 含量降低反应具有抑制作用。见表 1。

表 1 细胞培养液中 NO 含量比较 (umol/L, $\bar{x} \pm s$)

	n	NO 含量
正常培养组	12	110.97 ± 11.1
高脂血清组	12	$67.50 \pm 12.2 \Delta$
正常加药组	12	$148.55 \pm 13.38 \Delta$
高脂加药组	12	$116.10 \pm 16.7 * \#$

注: 与正常培养组相比 $\Delta P < 0.01$, 与高脂血清组相比

* $P < 0.01$, 与正常加药组相比 $\# P < 0.01$ 。

表 2 SMC Ca^{2+} 浓度的比较 (umol/L, $\bar{x} \pm s$)

	n	SMC Ca^{2+}
正常培养组	10	75.32 ± 7.88
高脂血清组	11	$97.35 \pm 15.15 \Delta$
正常加药组	12	$71.30 \pm 7.39 *$
高脂加药组	11	$78.89 \pm * \#$

注: 与正常培养组相比 $\Delta P < 0.01$, 与高脂血清组相比

* $P < 0.01$, 与正常加药组相比 $\# P < 0.05$ 。

3.2 体外培养 SMC 胞内游离钙浓度的变化 结果显示, 高脂血清培养组 SMC 内游离钙浓度明显高于正常培养组 ($P < 0.01$)。正常加药组, 高脂加药组

Ca^{2+} 浓度明显低于高脂血清组 ($P < 0.01$)。提示调肝导浊中药可降低胞内游离钙浓度。见表 2。

4 讨 论

NO 作为一个新近发现的信使分子, 其生理及病理作用, 尤其是抗 AS 损伤作为受到极大重视并得到实验证实。血管中, EC 和 SMC 内均存在 NOS。SMC 内 NOS 为诱导型 (iNOS), 可由细胞因子如 r-IFN、TNF- α 等诱导产生。NOS 是产生 NO 唯一的限速酶, 它作用于 L-精氨酸产生 NO。NO 具有多种抗 AS 及血管损伤再狭窄的特性。它可舒张血管; 抑制血小板聚集并抑制血小板粘附于纤维蛋白、内皮细胞基质及单核细胞上, 抑制动脉 SMC 增殖。在本实验研究中, 我们对不同条件细胞培养液中的 NO 含量进行测定, 由于 NO 半衰期很短, 给直接测定造成很大困难。因此, 以测定其代谢产物亚硝酸盐来间接反应 NO 的量。实验结果提示调肝导浊中药可以通过诱导动脉 SMC 表达 iNOS 产生 NO, 使 iNOS 的表达增加, NO 含量升高, 而达到抑制 SMC 增殖、抗 AS 的作用。

研究表明, 许多因素刺激血管 SMC 增殖, 它们的共同途径是细胞内钙动员。 Ca^{2+} 在细胞功能的调节中起一种信使作用, 负责将激动剂的刺激信号传给细胞内各种酶反应系统或功能性蛋白。细胞内 Ca^{2+} 的稳定是细胞钙动力学的中心环节, 它对动脉 SMC 增殖的调控可能与下列环节有关, 如 C-myc, C-fos 的表达受细胞内 Ca^{2+} 的影响; 有 Ca^{2+} 存在时, CaM 可激活一系列蛋白激酶, 促使蛋白质磷酸化, 间接调控 DNA 合成等。

我们采用不同条件培养基对 SMC 进行体外培养, 观察 Ca^{2+} 浓度的变化, 实验结果表明, 调肝导浊中药具有降低胞内 Ca^{2+} 含量的作用, 其机制有待进一步研究。

高脂血症、AS 属于中医血瘀证范畴。张伯礼教授根据中医基础理论及大量临床病例的总结, 认为在 AS 病人中, 或由于嗜食肥甘, 聚湿生痰, 阻滞气机, 阻碍气血, 造成痰浊凝聚, 气血瘀滞; 或由于七情过激, 肝失疏泄, 条达失畅而致气滞血瘀, 或两者相杂为患。瘀血日久阻滞, 影响全身或局部血液的运行, 失去正常血液的濡养作用, 可并见阴血亏虚之证, 所

中西医结合抢救眼镜王蛇咬伤中毒 32 例

□ 梁 平 (梧州市中西医结合医院 广西 梧州 543002)

关键词 眼镜王蛇咬伤 中毒 中西医结合治疗

眼镜王蛇分布于我国 10 个省(区),以广东、广西、湖南等多见。眼镜王蛇体积大,排毒量大,含混合毒,以神经毒为主^[1]。眼镜王蛇咬伤一次排毒量(干毒)约 101.9 mg^[2],其致死量约为 12mg,因其性情凶猛,毒性剧烈,被咬者一般多在 1-2 小时内死亡^[3]。曾有在伤后 3 分钟内致死的报道^[4]。1980 年以前的文献报道眼镜王蛇咬伤中毒死亡率几乎为 100%,1987 年后国内始有抢救成功的病例报道,据国内最新报道,其死亡率仍高达 90% 以上。笔者自 1986 年至 2002 年共收治眼镜王蛇咬伤病人 32 例,经中西医结合

抢救成功 30 例,死亡 2 例,现报道如下。

1 临床资料

1.1 一般资料 本组 32 例病人全部为住院病人,均为男性,年龄 19~69 岁,平均年龄 41 岁。咬伤部位:右手背 7 例,右食指 7 例,右拇指 5 例,左手背 5 例,左手指 4 例,左中指 3 例,左臀部 1 例。咬伤原因均系抓蛇、捕蛇而被咬。24 例为蛇商,8 例系农民捕蛇者。伤后有 24 例直接到本院就诊,8 例经当地处理后转送本院进一步治疗。伤后就诊时间,最快 11 分钟,最长 3 小时,平均 72 分钟;到本

院就诊时间,最快 11 分钟,最长 26 小时,平均 7.8 小时。

1.2 临床表现 被咬伤后伤口即渗血,见 2-4 个牙痕,牙距 15-25mm,局部轻度肿胀疼痛,继而肿胀迅速向肢体近端蔓延,疼痛加剧。32 例病人全部于伤后 1 小时内出现胸闷、咽部不适、头晕、头痛、困倦等全身中毒症状。按内科急症治疗学分型标准^[2],轻型 7 例,重型 14 例,危型 11 例。其中并发患肢溃疡 9 例;全部病例并发呼吸衰竭,有 4 例同时并发急性肾功能衰竭,5 例同时并发急性心衰。

1.3 诊断标准 ①有明确的被蛇

以提出在 AS 病变中存在着“气机壅滞、瘀浊阻滞,阴血亏虚”的病机,治以“调肝导浊”之中药复方。

方中用制首乌补益精血,柴胡疏肝理气,草决明、泽泻利水渗湿,蒲黄、茺蔚子、姜黄、丹参活血

祛瘀,姜黄破血行气。肝体阴而用阳,全方滋养阴血以养肝体之阴,且固护血脉;疏肝行气、活血祛瘀以助血行,以使肝阴血充盈,疏泄调节有度;辅以利湿导浊,祛湿浊之阻滞,共同通畅气机,通利血脉。