

固本化痰通络方对大鼠血管平滑肌 细胞粘附分子表达的影响※

□ 张丽君¹ 王 平² 邱幸凡² 田代志² 邹小娟³ 刘松林³ 程方平³

(1. 湖北中医学院 2003 级硕士研究生 湖北 武汉 430061

2. 湖北中医学院老年医学研究所 湖北 武汉 430061

3. 湖北中医学院基础医学部 湖北 武汉 430061)

摘 要 目的：观察固本化痰通络方含药血清对血管平滑肌细胞（VSMC）表达血管细胞粘附分子 1（VCAM-1）的影响。方法：在建立血管紧张素Ⅱ（AngⅡ）诱导的 VSMC 表达粘附分子模型的基础上，将培养的细胞分为 4 组：正常组、AngⅡ刺激组、固本化痰通络方高剂量组、低剂量组。镜下观察细胞生长状况，流式细胞术和免疫组化检测 VCAM-1 的表面表达及蛋白的表达。结果：与正常组比较，AngⅡ能够明显诱导 VCAM-1 的表达，GBHTTLF 能降低 VCAM-1 的表达及蛋白的表达。结论：AngⅡ能够明显诱导 VSMC 中 VCAM-1 的表达，而 GBHTTLF 能够通过抑制 VSMC 中 VCAM-1 的表达从而延缓早期动脉粥样硬化的病变进程。

关键词 固本化痰通络方（GBHTTLF） 血管平滑肌细胞 血管细胞粘附分子-1

高脂血症是临床常见病、多发病，与动脉粥样硬化（Atherosclerosis, As）的形成和发展有密切的关系。及时降低过高的血脂对防治冠心病、脑血管等病的发生有重要意义。固本化痰通络方（GBHTTLF）由何首乌、党参、枸杞、橘红、决明子、苍术、薏苡仁、山楂、荷叶等药组成，具有补肾健脾、化痰通络等功效，临床实验证明其治疗高脂血症等有一定的疗效^[1]。本实验拟采用血管紧张素Ⅱ（AngiotensinⅡ, AngⅡ）诱导 As 的细胞模型^[2]，观察 GBHTTLF 对 VSMC 中 VCAM-1 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 **动物** 健康 Wistar 雄性大鼠 30 只，体重 200 ± 20g，购自湖北省预防医学院实验动物中心。

1.2 **药物** GBHTTLF 由湖北中医学院老年医学研究所提供，是临床和实验有效验方。由何首乌、党参、枸杞、橘红、决明子、苍术、薏苡仁、山楂、荷叶等药组成，购于湖北中医学院附属门诊部中药房。经水煎成含生药 2g/mL、1g/mL 的浓缩液。

1.3 **仪器和试剂** 恒温 CO₂ 培养箱（SHELDON 公司）、倒置相差显微镜（日本 OLYMPUS, CK₂）、流式细胞仪（美国 BD 公司，FACSCalibur 型）。AngⅡ、DMEM 培养液、胰蛋白酶（Sigma 公司）；胎牛血清

※基金项目 国家自然科学基金项目（No: 30271566）

(FBS) 由武汉三利生物技术有限公司提供; FITC-小鼠抗大鼠 CD106 (VCAM-1) 单克隆抗体 (美国 BD 公司)、兔抗大鼠 α -actin 单抗、即用型 SABC 试剂盒 (武汉博士德公司), 其他常用试剂均为国产分析纯。

1.4 方法

1.4.1 大鼠 VSMC 的培养 参照文献^[3]的方法, 稍加改进。取体重约 200g 的健康 Wistar 大鼠, 用 10% 水合氯醛 3mL/kg 腹腔麻醉, 无菌条件下迅速打开胸腔, 取出胸主动脉, 小心剥去外膜, 刮下内膜, 贴块法培养 VSMC。倒置相差显微镜下观察细胞呈梭形, 生长至融合状态时呈现特有的“峰”与“谷”特点, 同时运用免疫组化特异性抗 α -actin 单抗鉴定 VSMC。细胞纯度达 95% 以上, 第 3~8 代细胞用于实验。

1.4.2 含药血清的制备^[4] 大鼠随机分为三组, 每组 10 只。大剂量组: 每日灌服 25g/kg 的 GBHTLP 药液; 小剂量组: 每日灌服 12.5 g/kg 的 GBHTLP 药液; 空白组: 每日灌服 0.9% 等容积的生理盐水; 每日 2 次, 连续 7 次, 末次灌胃 1h 后, 颈动脉插管采血, 收集血液 4℃ 过夜, 3000rpm 离心 15min, 收集血清, 56℃、30min 灭活, 并用 0.22 μ m 过滤除菌, -20℃ 冰箱保存备用。

1.4.3 As 细胞模型的建立及分组 本实验取第四代正常生长的 VSMC 接种于 100mL 培养瓶, 加 5mL 含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。待细胞完全贴壁后 24h 加入终浓度为 10⁻⁶mmol/L 的 Ang II 诱导 24h, 在倒置相差显微镜下观察细胞的形态, 可看到细胞的形状明显变宽, 变短, 细胞边界不清晰, 细胞膜肿胀, 符合痰症 As 细胞模型^[2]。实验分 4 组: 正常组、模型组、含药血清高剂量组和低剂量组。血清组分别以含 10% 空白血清、10% 含药血清的培养液更换原培养液。除正常组外, 其余各组均预先加入 Ang II 建立 As 细胞模型。各组进行相应处理 24h 后, 倒置相差显微镜下观察细胞生长状态。

1.4.4 流式细胞术检测 VCAM-1 的表达 实验分组同上, 按上述条件对 VSMC 进行处理后, 用 0.25% 胰酶消化、PBS 收集细胞, 调整细胞数为 1 $\times$ 10⁶/mL, PBS 洗 2 次, 加 2 μ L 带有 FITC (荧光抗体) 的小鼠抗大鼠的 VCAM-1 单克隆抗体, 充分摇匀, 避光放置

15min, 细胞过 300 目尼龙网后用流式细胞仪检测 VSMC 表面荧光强度, 每份样品计数 10000 个细胞。用平均荧光强度代表细胞表面 VCAM-1 表达水平。

1.4.5 SABC 免疫组化法检测 VCAM-1 蛋白的表达 计算 VCAM-1 的阳性细胞数: 在高倍镜 (10 $\times$ 40) 下随机取 5 个视野计数阳性细胞表达数, 与模型组相比较。

1.5 统计方法 使用 SPSS11.5 软件进行统计处理。

2 结果

2.1 原代细胞生长的形态及鉴定 组织块在贴壁 5 天后均可见细胞从不同的组织块边缘爬出, 细胞多呈梭形或长梭形, VSMC 胞核多为卵圆形, 有一个或多个核仁, 胞浆丰富, 有时有暗色颗粒, 细胞间常有突起相连。原代培养 VSMC 胞体较小, 胞质折光性强, 7~10 天后细胞已爬满瓶底, 即可进行消化传代。传代后 VSMC 突起增多, 胞质伸展, 较多分支状突起, 部分区域细胞重叠堆积生长形成典型的“峰”与“谷”的特点。通过抗 α -actin 免疫组织化学染色: 镜下观察细胞爬片, 可见细胞浆中大量平行丝条状阳性染色胞核不着色, 所有细胞染色, 结果均为阳性。

2.2 固本化痰通络方对 VSMC 中 VCAM-1 表达的影响 流式细胞术结果如表 1 所示, AngII 可使 VSMC 表面 VCAM-1 表达明显增加, 与正常组比较有显著性差异 ($P < 0.01$)。GBHTLP 可明显抑制 AngII 诱导的 VSMC 表达 VCAM-1, 与模型组有显著性差异 ($P < 0.01$)。

表 1 GBHTLP 对 VSMC 中 VCAM-1 阳性表达值的比较
($\bar{x} \pm s, \%$)

组 别	阳性表达值
正常组	28.2 $\pm$ 3.3
模型组	57.2 $\pm$ 5.5 $\Delta\Delta$
含药血清高剂量组	35.4 $\pm$ 2.1 $\Delta\Delta\Delta\Delta$
含药血清低剂量组	37.8 $\pm$ 2.6 $\Delta\Delta\Delta\Delta$

注: 与正常组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$; 与模型组比较: $\Delta\Delta\Delta P < 0.01$

2.3 固本化痰通络方对 VCAM-1 蛋白表达的影响 各组 VSMC 均有 VCAM-1 蛋白表达, 免疫阳性染色信号定位于细胞膜和细胞质的棕黄色粗细不均匀的颗粒。与正常对照组相比, 模型组表达明显增强, 表现为细胞着色明显加深。同模型组组比较, 固本化痰通络方含药血清高剂量组 VCAM-1 蛋白表达则是明显受

到抑制，表现为着色明显变浅。各组 VSMC 中 VCAM-1 蛋白表达阳性细胞数见表 2。

表 2 GBHTTLp 对 VSMC 中 VCAM-1 蛋白表达的影响
($\bar{x} \pm s, \%$)

组 别	阳性细胞数
正常组	16.36 $\pm$ 3.21
模型组	32.36 $\pm$ 3.41 ^{▲▲}
含药血清高剂量组	19.65 $\pm$ 2.11 ^{▲▲▲}
含药血清低剂量组	21.75 $\pm$ 2.41 ^{▲▲▲}

注：与正常组比较：▲ $P < 0.05$ 、▲▲ $P < 0.01$ ；与模型组比较：▲▲ $P < 0.01$

3 讨 论

As 的炎症学说越来越受到重视，许多研究表明，As 的发生、发展由许多粘附分子、细胞因子介导。在以往的许多研究中已经提到粘附分子在 As 斑块中的表达水平和 As 的发生发展过程相一致，并认为 VCAM-1 在 As 的发病机制中起重要作用。高血脂是 As 的主要危险因素之一，已有研究表明它能促进单核细胞-血管平滑肌细胞的粘附，其机制可能与粘附分子表达有关^[5]。

中医许多学者认为 As 与痰浊的关系密切相关，是一个综合性复杂病症，病变涉及多个脏腑。痰浊是 As 发生、发展的病理关键，脾肾亏虚是其发生、发展的病理基础^[6]。水谷精微必须通过脾胃的运化及转输才能进入血中，如嗜食肥甘厚味，脂膏摄入过多，可致脾气虚弱，脾失健运，痰浊内生。如此久之则可形成脾虚与痰浊互为因果的恶性循环，导致痰浊脂质不断凝聚，血脂增高。肾主水，若肾气不足，气化不利，水不得化，停聚为痰，亦可致痰浊内生。脾肾亏虚致脏腑功能失调，则气血运行不畅，酿生痰浊。可见本病实为本虚标实之属，本虚在于脾肾亏虚，标实在于痰浊内停，故以健脾肾、化痰浊之“固本化痰通络方”

治疗甚为得当。近年临床实践证明，固本化痰通络方治疗高脂血症等有确切疗效，其方中何首乌、枸杞滋补肝肾，补益精血，现代药理研究证明，何首乌有明显抑制血清胆固醇升高的作用，可延缓 As 的形成和发展^[7]。党参有补益气血、健脾益肺等功效，橘红、苍术、薏苡仁健脾燥湿祛痰，决明子、山楂、荷叶祛湿化浊。诸药合用共奏补益脾肾、化痰通络之功效。

本实验采用 Ang II 诱导 As 的细胞模型，采用血清药理学方法，流式细胞仪检测，免疫组化等手段，探讨含固本化痰通络方大鼠含药血清对 VSMC 中 VCAM-1 表达的影响。结果表明，固本化痰通络方对 Ang II 诱导的 VCAM-1 的高表达有一定抑制作用，高剂量中药的抑制作用明显优于低剂量中药的抑制作用，其机制可能与阻断 Ang II 的作用及 VCAM-1 表达下调有关。

参考文献

[1] 张 馨, 王 平, 陈 刚, 等. 固本化痰延衰方对亚急性衰老胰岛素抵抗模型大鼠血清瘦素水平影响的实验研究 [J]. 湖北中医学院学报, 2005, 2 (7): 10-12.

[2] 聂 磊, 韩 梅, 温进坤. 血管收缩肽在血管平滑肌细胞中的表达及调控 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2005, 21 (2): 94-96.

[3] Naka mura A, Isoyama S, Watanabe T, et al. Heterogenous smooth muscle cell population derived from small and larger arteries [J]. Microvasc Res, 1998, 55: 14-28.

[4] 李仪奎, 吴健宇. 中药血清药理实验方法给药的通法方案 [J]. 中国药理学通报 1999; (6): 569-570.

[5] Sakai A, Kume N, Nishi E, et al. P-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 are focally expressed in aortas of hypercholesterolemic rabbits before intimal accumulation of macrophages and T lymphocytes [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997, 17 (2): 310.

[6] 刘松林, 王 平, 张茂林, 等. 痰邪致病机理的现代研究思路与方法探讨 [J]. 中医杂志, 2003, 44 (1): 5-7.

[7] 罗瑞芝, 贾 伟, 赵利斌, 等. 何首乌研究进展 [J]. 中草药, 2005, 36 (7): 1097-1100.

欢迎订阅 《 中 医 药 通 报 》