

[21] Xu J, Xiang Q, Lin G, et al. Estrogen improved metabolic syndrome through down-regulation of VEGF and HIF-1 α to inhibit hypoxia of periaortic and intra-abdominal fat in ovariectomized female rats [J]. Molecular Biology Reports, 2012, 39(8): 8177-8185.

[22] 尹金磊, 赵长普, 关素珍. 补肾调脾方对女性更年期综合征糖脂代谢的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(24): 282-286.

(编辑: 修春)

龙生蛭胶囊抑制大鼠动脉粥样硬化形成保护血管内皮功能的分子机制研究

方欢乐¹, 陈衍斌², 张颀乐¹, 马怀芬¹, 贾航欢³, 赵 铭³ (1. 西安培华学院医学院, 陕西 西安 710125; 2. 陕西步长制药有限公司科研部, 陕西 西安 710075; 3. 西安交通大学医学部, 陕西 西安 710061)

摘要: **目的** 研究龙生蛭胶囊对动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)大鼠动脉血管内皮的保护作用, 并对其作用机理进行初步探讨。**方法** 大鼠连续给予高脂饲料 12 周, 同时于实验开始时一次性腹腔注射维生素 D60 万 IU $\cdot$ kg⁻¹ 复制 AS 模型。于开始造模 4 周后各组大鼠分别灌胃龙生蛭胶囊三个剂量(0.72、1.44、2.88 g $\cdot$ kg⁻¹), 辛伐他汀 5.5 mg $\cdot$ kg⁻¹, 对照组给予等量溶媒。采用生物化学法检测大鼠血清中总胆固醇(TC)、甘油三脂(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、及一氧化氮(NO)含量; 敏感肌张力描计技术检测动脉血管收缩/舒张功能; Western blot 检测内皮型一氧化氮合酶(eNOS)及血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)的蛋白活性及表达; ELISA 测定血清白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的水平。**结果** 与模型组比较, 龙生蛭胶囊中、高剂量组均能降低血液中 TC、TG、LDL-C、升高 HDL-C, 降低血清 IL-6、TNF- α 水平, 增加血清 NO 含量并提高血管内皮 eNOS 活性 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 龙生蛭胶囊高剂量组可明显改善高脂饲料诱导的动脉血管环对苯肾上腺素(PE)和 5-羟色氨(5-HT)的收缩反应, 及对内皮依赖性舒张剂乙酰胆碱(ACh)的舒张反应, 并且舒张作用可被 N-硝基-L-精氨酸甲酯(L-NAME)阻断 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。实验结果还发现龙生蛭胶囊中、高剂量组均能降低由高脂诱导的 VCAM-1 表达升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 龙生蛭胶囊可显著性降低 AS 大鼠血脂; 改善大鼠血管内皮依赖性血管舒张功能; 抑制系统炎性反应, 其机制可能与上调 eNOS 活性、抑制 VCAM-1 表达相关。表明龙生蛭胶囊不仅可用于防治脑梗的发生, 还对 AS 早期病变具有良好的治疗作用。

关键词: 龙生蛭胶囊; 动脉粥样硬化; 血管功能; 内皮依赖性舒张; 系统炎性反应

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2017)01-0006-0

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2017.01.002

The protective effects of Longshengzhi capsule on improve vascular dysfunction and inhibit atherosclerosis formation in the high-fat rats

Huan-le Fang¹, Yan-bin Chen², Qi-le Zhang¹, Huai-fen Ma¹, Hang-huan Jia³, Ming Zhao³ (1. Medical College of Xi'an Peihua University, Xi'an, Shaanxi 710125, China; 2. Shanxi Buchang Pharmaceutical, Xi'an, Shaanxi 710075, China; 3. Department of Pharmacology, Xi'an Jiaotong University Health Science Center, Xi'an, Shaanxi 710061, China)

Abstract: **Objective** To research the protective effects of Longshengzhi capsule (LSZ) on inhibition atherosclerosis (AS) formation in high-fat rats, and explore the mechanism of improve vascular dysfunction. **Methods** The rat

收稿日期: 2016-07-18

作者简介: 方欢乐, 女, 硕士, 讲师, 研究方向: 心血管药理学。Email: yezi_1023@163.com。通信作者: 赵铭, 博士, 讲师, 研究方向: 心血管药理学。Email: zhaomingxjtu@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(81402924); 陕西省教育厅科研计划项目(15JK2089); 陕西省重点科技创新人才推进计划(2015KCT-19)。

hyperlipidemia model was set up by injecting vitamin D ($60\ 0000\text{IU}\cdot\text{kg}^{-1}$) and feeding high fat food. Four weeks later, the rats were treated with LSZ ($0.72, 1.44, 2.88\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) or Simvastatin ($5.5\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), sham group was administrated same volume solvent. Biochemical method to detect serum levels of cholesterol (TC), triglyceride (TG), low density lipoprotein (LDL-C), high density lipoprotein (HDL-C). Isometric tension changes of isolated arterial rings were recorded continuously by a myograph system. Nitric oxide synthase (eNOS) and cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) protein expression and activity was detected by Western blot; The level of serum interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were measured by ELASA kit. Results Compared with the AS group, LSZ (1.44 and $2.88\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) decreased the levels of TC, TG, LDL-C, IL-6 and TNF- α , increased the serum HDL-C level and the NO generation, as well as eNOS activity ($P<0.05, P<0.01$). We also found that high fat food increased the maximum contractions induced by phenylephrine (PE) and 5-hydroxytryptamine (5-HT) and inhibited the maximum relaxations by acetylcholine (ACh). These indexes could also be reversed by the LSZ ($2.88\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), whereas the beneficial effects of LSZ could be attenuated by N-nitro-L-arginine methylester (L-NAME) ($P<0.05, P<0.01$). In addition, LSZ inhibited vascular VCAM-1 protein expression significantly of hyperlipidemia rats ($P<0.05, P<0.01$). Conclusion the experimental evidence suggests that LSZ capsule could against atherosclerosis formation induced by high fat food, and its mechanisms might be associated with the inhibition of endothelial cells, the ability of decreasing the level of inflammatory factors and inhibition of VCAM-1 protein expression. This research show that LSZ not only has to used for cerebral infarction, but also show the beneficial effect to against the early AS pathological changes.

Keywords: Longshengzhi capsule; atherosclerosis; vascular function; endothelial dependent diastolic function; systemic inflammation response

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)作为全球主要的致死性疾病—心脑血管疾病,其病理学基础一直以来是国内外研究的热点^[1]。不健康的生活方式(如高脂肪食物的大量摄入、运动减少、生活压力过大等)均可导致体内脂质代谢紊乱,诱发局部炎症反应,继而导致 AS 的形成^[2]。血管内皮主要参与调节血管壁收缩及血栓的形成,而血管内皮功能障碍是 AS 和其他心血管事件发生的早期预测指标之一^[3]。因此以血管内皮为研究对象,探讨减轻高血脂诱导的血管内皮损伤的作用机制,对防止 AS 有着重要意义。龙生蛭胶囊由黄芪、水蛭、川芎、当归等 12 味中药组成,是治疗心脑血管疾病的现代中药制剂,具有补气活血、逐瘀通络的功效。临床研究表明龙生蛭胶囊对于脑血栓治疗有较好的作用^[4-5],但该药物是否通过对抗炎症反应、改善血管内皮功能发挥心脑血管的保护作用尚不清楚。本研究探讨了龙生蛭胶囊对高脂大鼠动脉粥样形成和血管内皮功能的保护作用及机制,为传统中成药开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物 SD 大鼠,雄性,SPF 级,体质量($200\pm$

20) g,第四军医大学实验动物中心提供,生产许可证号:SCXK(军)2012-0007。

1.2 药物及试剂 龙生蛭胶囊由陕西步长制药有限公司提供,批号:150914;辛伐他汀片,涿州东乐制药有限公司,批号:11A141205;维生素 D,上海第九制药厂,生产批号:20151005;胆酸钠,上海蓝季科技发展有限公司,生产批号:20130204;胆固醇:上海新兴化学试剂公司,生产批号:20140208;总胆固醇(TC)、甘油三脂(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、一氧化氮(NO)试剂盒均由南京建成生物工程研究所提供,生产批号:20151215、20151216;白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)ELASA 试剂盒由上海西塘生物科技有限公司提供,生产批号:1512181、1512151;苯肾上腺素(PE)、乙酰胆碱(Ach)、硝普钠(SNP)、5-羟色胺(5-HT)、N-硝基-L-精氨酸甲酯(L-NAME)均为美国 Sigma 公司产品;RIPA 裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒均为碧云天生物技术研究所产品;蛋白 marker($10\sim 170\text{KDa}$),美国 Fermentas;多克隆抗体血管细胞黏附分子-1

(VCAM-1)、一氧化氮合酶(eNOS)、磷酸化一氧化氮合酶(p-eNOS)和 GAPDH 购自 abcam 公司;其他试剂均为国产的分析纯。

1.3 仪器 iMark 全自动酶标仪,美国 Bio-Red 公司;洗板机,美国 Bio-Red 公司;BL-420F 生物信号采集与分析系统,成都泰盟科技有限公司;张力换能器,北京航空医学研究所;StatFax2100 分光光度计,美国 Awareness Technology;电泳仪和垂直电泳槽,美国 AmerSham Biosciences;TE22 湿电转膜仪,美国 Hoefer; Tanon-5200 全自动荧光/化学发光成像系统,上海天能科技有限公司。

1.4 分组、模型复制及给药方法 取 SD 大鼠 60 只,适应性喂养 1 周。正常对照组(sham)给予普通大鼠饲料,其余组动物均按照文献方法^[6]建立动脉粥样硬化大鼠模型,即每日给予大鼠高脂饲料(3 %胆固醇、0.5 %胆酸钠、0.2 %丙基硫氧嘧啶、5 %白糖、10 %猪油、81.3 %基础饲料)并与喂食开始时一次性腹腔注射维生素 D60 万 IU·kg⁻¹。4 周后大鼠根据血液 TC 水平随机分为模型组(AS)、辛伐他汀组(s)、龙生蛭(LSZ)低、中、高剂量组,每组 10 只大鼠。空白对照组大鼠继续给予普通饲料喂养并每天灌胃等体积生理盐水,模型组大鼠给予高脂饲料喂养并每天灌胃等体积生理盐水,辛伐他汀组、龙生蛭低、中、高剂量组,在给予高脂饲料喂养的同时每天灌胃给药 1 次,连续 8 周。给药量根据临床常用剂量,按照人和动物间体表面积折算的等效剂量比值进行换算,分别得到龙生蛭低剂量给药量 0.72 g·kg⁻¹、中剂量 1.44 g·kg⁻¹、高剂量 2.88 g·kg⁻¹。根据临床剂量换算辛伐他汀给药量为 5.5 mg·kg⁻¹。药物制备时称取一定量药粉,临用前用 0.5 % CMC-Na 溶液配制所需浓度的混悬液给药。

1.5 生化指标的测定 于末次给药后各组大鼠禁食(自由饮水)12 h。次日清晨将全部动物称重,用 20%乌拉坦(0.5 mL·100 g⁻¹)溶液麻醉大鼠,腹主动脉采血。3500 r·min⁻¹ 离心 20 min 分离血清,应用全自动酶标仪测定各组大鼠血清 TG、TC、HDL-C、LDL-C 及 NO 含量,具体操作按试剂盒说明书完成。

1.6 大鼠胸主动脉内皮功能的测定^[7] 于实验结束时迅速分离大鼠胸主动脉,置于预冷的氧饱和的 Krebs 液(Mm: NaCl 119.0, KCl 4.7, CaCl₂ 2.5, KH₂PO₄ 1.2, MgCl₂ 1.2, NaHCO₃ 25.0, 葡萄糖 10.0),在冰浴上剥离脂肪后剪成长为 2~3 mm 的血管环。将血管环悬挂于张力换能器所连接的两个“L”型不锈钢

丝上,浴槽内盛有 37 ℃的 Krebs 液,并持续通入由 95 % O₂ 和 5 % CO₂ 组成的混合气体。泰盟 BL-420F 生物信号采集分析系统记录血管的张力变化。每组血管环给予 1.5~2.0 g 的前负荷,在平衡期间不断调整张力,使之维持稳定,每隔 15 min 更换一次 Krebs 液。平衡 90 分钟。待血管环稳定后用 60 Mm K⁺-Krebs 试血管活性 2 次,选用两次收缩最大差值在 10 %以内的血管为研究对象。

1.7 Western blot 检测蛋白的表达 取各组胸主动脉血管约 50 mg 加入预冷 RIPA 裂解液 200 mL,冰浴匀浆并充分裂解 30 min。然后用 4℃离心机,12000 r·min⁻¹ 离心 15 min,收集上清液。加入 loadingbuffer 在 100 ℃使蛋白变性 10 min。分装,-80 ℃保存备用。应用 8 % PAGE 胶分离上样蛋白,并转移至相同大小的 PVDF 膜上。用 5 % 脱脂牛奶室温封闭膜 1 h。分别加入特异性抗体 VCAM-1(1:1000)、eNOS(1:500)、p-eNOS(1:500)或 GAPDH(1:5000),室温孵育 1 h 然后 4℃过夜。每次每次加“条带”二抗,室温孵育 45 min, TBST 洗膜 5 次。用增强化学发光(ECL)试剂(Millipore)发光得到并用 Gel-Pro Analyzer 4.0 software 分析。

1.8 ELISA 测定 TNF-α、IL-6 浓度 大鼠麻醉后,腹主动脉取血,3500 r·min⁻¹ 离心 20 min,收集上清液。采用双抗体夹心 ABC-ELISA 法测定 TNF-α、IL-6 的浓度,检测 450 nm 处 OD 值,实验操作步骤按试剂盒说明书方法进行。

1.9 统计学处理方法 采用 SPSS 16.0 统计软件,计量资料结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异应用单因素方差分析(one-way ANOVA),显著性差异进一步应用 Tukeys post hoc 检验比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。应用 GraphPad 加“AS”绘制图表。

2 结果

2.1 龙生蛭胶囊对大鼠血脂的影响 从表 1 可见与正常对照组比较,模型组大鼠血清 TC、TG、LDL-C 水平显著增加,HDL-C 水平降低,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。给予辛伐他汀、龙生蛭中和高剂量干预可显著改善由高脂诱导的大鼠血清 TC、TG、LDL-C 水平增高和 HDL-C 降低,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$),结果表明龙生蛭胶囊具有明显降血脂作用。

2.2 龙生蛭胶囊对 AS 大鼠血管环 PE 和 5-HT 的收缩反应性变化 应用血管张力测定系统检测大鼠主

-1需上标

表 1 龙生蛭胶囊对各组大鼠血清 TG、TC、LDL-C 和 HDL-C 含量的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

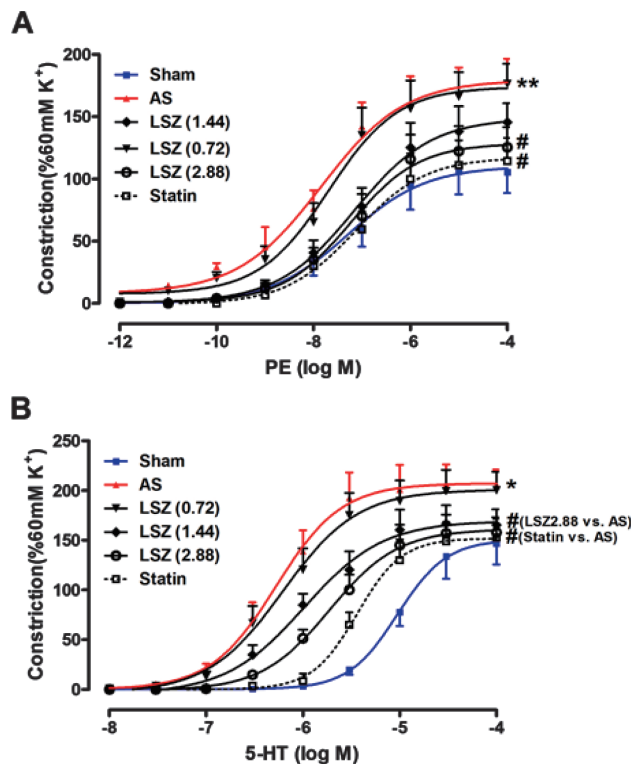
Table 1 Effect of Longshengzhi capsule on serum TG, TC, LDL-C and HDL-C

Group	TG/mm $\cdot$ L $^{-1}$	TC/mm $\cdot$ L $^{-1}$	LDL-C/mm $\cdot$ L $^{-1}$	HDL-C/mm $\cdot$ L $^{-1}$
Sham	0.45 $\pm$ 0.13	1.06 $\pm$ 0.31	0.61 $\pm$ 0.20	0.75 $\pm$ 0.15
AS	0.72 $\pm$ 0.10 ^{**}	2.01 $\pm$ 0.20 ^{**}	0.88 $\pm$ 0.18 [*]	0.55 $\pm$ 0.12 [*]
LSZ(0.72)	0.66 $\pm$ 0.11	1.67 $\pm$ 0.24	0.86 $\pm$ 0.13	0.70 $\pm$ 0.11
LSZ(1.44)	0.53 $\pm$ 0.08 [#]	1.14 $\pm$ 0.25 ^{##}	0.69 $\pm$ 0.17 [#]	0.78 $\pm$ 0.16 [#]
LSZ(2.88)	0.51 $\pm$ 0.04 [#]	1.02 $\pm$ 0.11 ^{##}	0.52 $\pm$ 0.15 ^{##}	0.97 $\pm$ 0.15 ^{##}
Statin	0.46 $\pm$ 0.11 ^{##}	0.88 $\pm$ 0.12 ^{##}	0.54 $\pm$ 0.11 ^{##}	1.04 $\pm$ 0.13 ^{##}

注: 与对照组比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$; 与模型组比较, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$ 。

动脉血管环对 PE 和 5-HT 的反应性, 用浓度梯度累积加入 PE ($1 \times 10^{-12} \sim 1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 5-HT ($1 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 记录浓度梯度量效曲线。图 1A 可见, PE 诱导收缩曲线 $E_{\max}$ 分别为 Sham: $105.50\% \pm 17.01\%$, AS: $179.24\% \pm 17.21\%$, Statin: $114.44\% \pm 18.50\%$, LSZ(0.72): $176.30\% \pm 16.22\%$, LSZ(1.44): $145.50\% \pm 15.11\%$ 以及 LSZ(2.88): $125.37\% \pm 16.08\%$, 高脂饲料模型组 $E_{\max}$ 显著性高于正常对照组大鼠 ($P < 0.01$), 阳性对照药辛伐他汀和龙生蛭高剂量均可明显降低由高脂饲料诱导的大鼠胸主动脉血管环对 PE 的反应性增高 ($P < 0.05$)。但是各组血管环的 pD_2 值并未见明显变化。图 1B 可见, 5-HT 诱导收缩曲线 $E_{\max}$ 分别为 Sham: $147.06\% \pm 21.45\%$, AS: $205.61\% \pm 15.67\%$, Statin: $152.90\% \pm 18.66\%$, LSZ(0.72): $200.12\% \pm 18.88\%$, LSZ(1.44): $165.20\% \pm 15.80\%$ 以及 LSZ(2.88): $157.87\% \pm 15.31\%$, 高脂饲料模型组 $E_{\max}$ 显著性高于对照组大鼠 ($P < 0.01$), 辛伐他汀和龙生蛭高剂量均可明显降低由高脂饲料诱导的大鼠胸主动脉血管环对 5-HT 的反应性增高 ($P < 0.05$)。并且模型组收缩曲线 (pD_2 : 6.28 ± 0.13) 与对照组 (pD_2 : 5.02 ± 0.10) 比较明显左移 ($P < 0.01$)。辛伐他汀 (pD_2 : 5.44 ± 0.10) 和龙生蛭高剂量组 (pD_2 : 5.71 ± 0.10) 的收缩曲线与模型组比较明显均有右移 ($P < 0.05$)。

2.3 龙生蛭胶囊对 AS 大鼠血管环 ACh 和 SNP 的舒张反应性变化 为了观察龙生蛭胶囊是否影响血管舒张功能, 在 PE ($1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 预收缩引起最大收缩张力后, 浓度累积法分别用内皮依赖性血管舒张剂 ACh ($1 \times 10^{-10} \sim 1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和非内皮依赖性血管舒张剂 SNP ($1 \times 10^{-12} \sim 1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 诱导血管舒张曲线。结果显示, 模型组和对照组血管环对 ACh



注: 图 A: 苯肾上腺素(PE, $1 \times 10^{-12} \sim 1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)诱导的血管收缩曲线, 图 B: 5-羟色胺(5-HT, $1 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)诱导的血管收缩曲线。与对照组比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$; 与模型组比较, [#] $P < 0.05$ 。

图 1 龙生蛭胶囊对血管收缩剂 PE 和 5-HT 诱导的血管收缩曲线的影响

Figure 1 Effect of Longshengzhi capsule on contraction responses of rat mesenteric arterial rings to cumulative doses of vascular contraction drugs

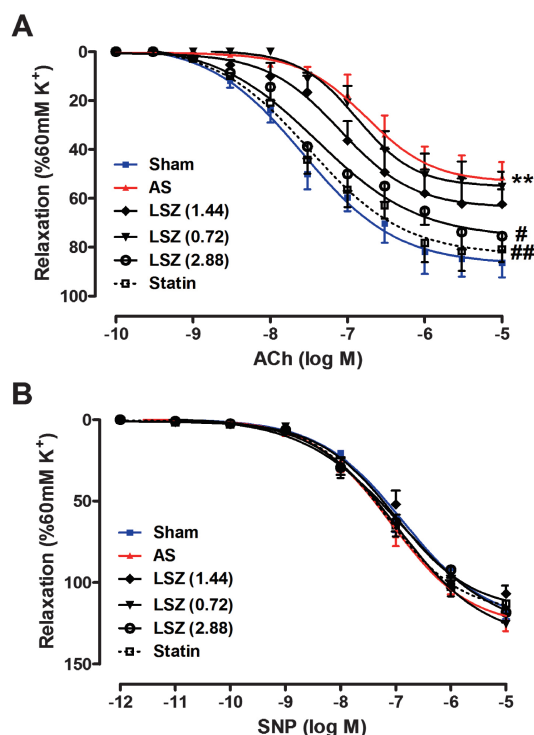
诱导的最大舒张分别是 $51.37\% \pm 6.16\%$ 和 $85.33\% \pm 6.08\%$, 模型组诱导的内皮依赖性血管舒张明显低于对照组 ($P < 0.01$); 而 SNP 诱导的非内皮依赖性血管舒张未见明显变化。模型组: $122.63\% \pm 5.79\%$, $P > 0.05$ 。

龙生蛭高剂量组均可剂量依赖性的改善 ACh 诱导的内皮依赖性舒张, 最大舒张值分别为 $80.96\% \pm 5.22\%$ 和 $75.52\% \pm 5.91\%$ ($P < 0.01$, $P > 0.05$) (见图 2), 而 SNP 诱导的非内皮依赖性舒张未见明显变化。

2.4 L-NAME 对龙生蛭胶囊保护血管内皮功能的影响 为了进一步评价龙生蛭胶囊对血管内皮功能的影响, 用非特异性 NOS 阻断剂 L-NAME ($100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 孵育各组血管 45 min, 用 PE ($1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 预收缩血管环后做 ACh 浓度梯度舒张曲线。结果显示: L-NAME 阻断各组血管环后, 模型组血管 ACh 舒张曲线的最大舒张值平均值降低了 9.07% (由 $51.37\% \pm 6.16\%$ 减少至 $42.30\% \pm 5.07\%$, 见图 3B), 对照组

$P > 0.05$ 修改为 $P < 0.05$

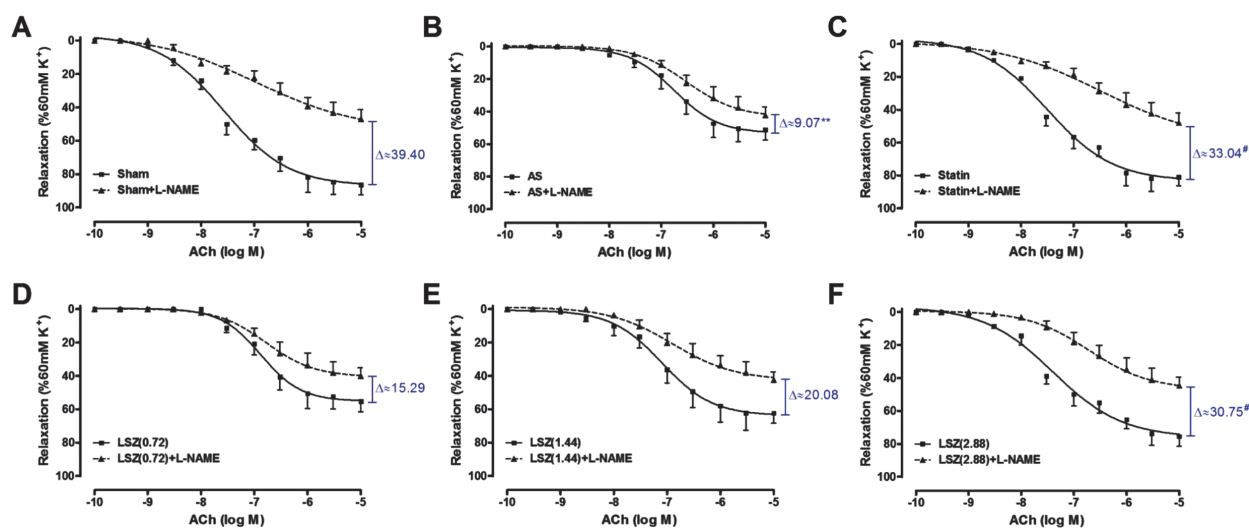
$P > 0.01$ 修改为 $P < 0.01$



注: 图 A: 乙酰胆碱(ACh, $1 \times 10^{-10} \sim 1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)诱导的血管舒张曲线, 图 B: 硝普钠(SNP, $1 \times 10^{-12} \sim 1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)诱导的血管舒张曲线。与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图2 龙生蛭胶囊对血管舒张剂 ACh 和 SNP 的舒张反应性曲线的影响

Figure 2 Effect of Longshengzhi capsule on relaxation responses of rat mesenteric arterial rings to cumulative doses of ACh and sodium nitroprusside(SNP)



注: 图 A: L-NAME 对照组血管的影响, 图 B: L-NAME 对模型组血管的影响, 图 C: L-NAME 对阳性对照组 (Statin) 的影响, 图 D: L-NAME 对龙生蛭胶囊小剂量组 (0.72) 的影响, 图 E: L-NAME 对龙生蛭胶囊中剂量组 (1.44) 的影响, 图 F: L-NAME 对龙生蛭胶囊大剂量组 (2.88) 的影响。与对照组相比较, ** $P < 0.01$; 与 AS 模型组比较 # $P < 0.05$ 。

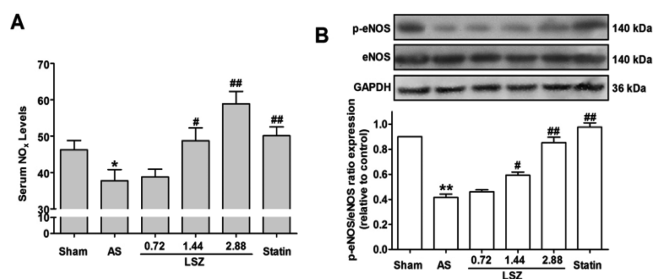
图3 L-NAME 对龙生蛭胶囊保护大鼠血管内皮依赖性舒张功能的影响

Figure 3 The protective effects of Longshengzhi capsule were reduced on endothelium-dependent cumulative relaxations to ACh ($1 \times 10^{-11} \sim 1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) in the presence of L-NAME($100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

动脉血管环的最大舒张值平均值约降低了 39.40 % (由 $86.33\% \pm 6.08\%$ 减少至 $46.93\% \pm 5.55\%$, 见图 3A), 明显高于模型组 ($P < 0.01$)。龙生蛭胶囊高剂量组和阳性对照药组的最大舒张值平均值与模型组比较也明显增加 (龙生蛭胶囊高剂量组增加约 30.75 %, 见图 3F; statin 组增加约 33.04 %, 见图 3C; vs. AS, $P < 0.05$)。结果表明龙生蛭胶囊保护血管内皮的作用可能与 eNOS 相关。

2.5 龙生蛭胶囊对大鼠血清 NO 和 eNOS 的影响 本研究继续考察了大鼠血清 NO 水平和胸主动脉 eNOS 蛋白的活化水平, 结果显示, 与对照组比较, 模型组大鼠血清中 NO 水平下调 ($P < 0.05$)。而阳性药辛伐他汀与龙生蛭胶囊中高剂量组增加了 NO 水平 (与模型组比较 $P < 0.05$, $P < 0.01$, 见图 4A)。同时, western blot 实验结果显示与对照组比较, 模型组主动脉的 p-eNOS 活化水平明显降低 ($P < 0.01$), 辛伐他汀及龙生蛭中、高剂量均可以显著性增加 p-eNOS 活化水平 ($P < 0.05$, $P < 0.01$) 见图 4B。结果进一步证实 eNOS 磷酸化水平下调可能是高脂饮食使得 NO 介导的血管舒张功能受损的原因之一, 而龙生蛭胶囊能通过上调磷酸化 eNOS 活力发挥内皮保护作用。

2.6 龙生蛭胶囊对大鼠血清炎症因子的影响 炎症因子表达增加是动脉粥样硬化形成的最直接因子。ELISA 结果表明, 与对照组比较 AS 模型组大鼠血清 TNF- α 、IL-6 含量明显增高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 辛



注：图 A：血清 NO 水平，图 B：动脉血管 eNOS 和 p-eNOS 蛋白表达。与对照组相比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；与 AS 模型组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ 。

图 4 龙生蛭胶囊对大鼠血清 NO 和 eNOS 的影响

Figure 4 Effect of Longshengzhi capsule on serum total NO level and eNOS protein expression

伐他汀及龙生蛭中、高剂量均可以显著性改善由高脂饲料诱导的炎症因子增高的现象($P < 0.05$, $P < 0.01$ ，见图 5A)，表明龙生蛭胶囊具有抗炎效应。

2.7 龙生蛭胶囊对大鼠血管 VCAM-1 表达的影响

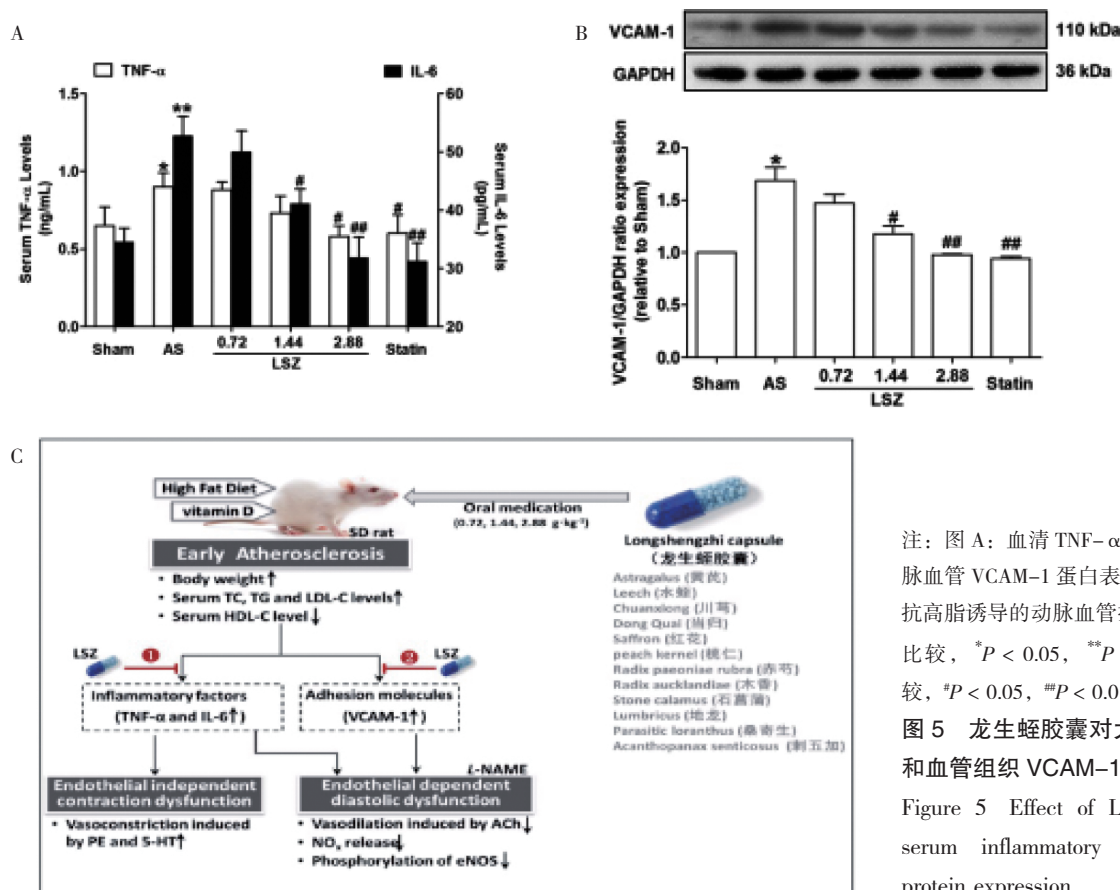
炎性细胞能否与血管内皮黏附进而损伤内皮功能，VCAM-1 在其中发挥了重要的作用。本实验进一步检测了龙生蛭胶囊对 VCAM-1 表达的影响。结果如图 5B 所示。与对照组比较，模型组 VCAM-1 表达提

高($P < 0.05$)。辛伐他汀、龙生蛭中高剂量组能使 VCAM-1 表达显著性下调($P < 0.05$, $P < 0.01$)。表明龙生蛭胶囊可抑制 AS 血管的炎症反应可能与下调 VCAM-1 表达相关。

3 讨论

动脉粥样硬化是脑血栓、脑梗塞、冠心病、心肌梗死等多种临床心血管疾病的始动因素，是血管壁对多种不良刺激的一种异常反应^[9]，本研究应用高脂饲料加腹腔注射维生素 D 复制 AS 模型，结果显示在 AS 建立初期模型组大鼠血脂升高、胸主动脉血管收缩功能增强，内皮依赖性舒张功能降低；血清炎症因子 TNF- α 、IL-6 含量显著升高。实验首次发现龙生蛭胶囊不仅可以降低高脂 AS 大鼠血清中的 TC、TG、LDL 含量，升高 HDL 含量发挥降脂作用同时可显著性改善 AS 诱导的血管收缩、舒张功能异常，降低血清中 TNF- α 、IL-6 的含量。表明龙生蛭胶囊可有效降脂、抗炎改善血管功能，具有对抗早期 AS 病变的作用。

目前认为动脉粥样硬化斑块形成及其血管重塑的机制主要有 3 种：炎症反应、机械力学和理化因素^[9-10]。期间大量炎性细胞因子释放是诱导血管内皮



注：图 A：血清 TNF- α 和 IL-6 水平，图 B：动脉血管 VCAM-1 蛋白表达。图 C：龙生蛭胶囊对抗高脂诱导的动脉血管损伤机制图。与对照组相比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；与 AS 模型组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ 。

图 5 龙生蛭胶囊对大鼠血清炎症因子水平和血管组织 VCAM-1 蛋白表达的影响

Figure 5 Effect of Longshengzhi capsule on serum inflammatory factors and VCAM-1 protein expression

损伤的启动因子。血管内皮损伤、内皮炎症反应是其病变发展的关键环节^[11]。生理条件下,血管内皮细胞合成释放 NO 和 ET。两者相互调节,共同维持血管功能。其中内皮 NO 是内皮细胞产生的最重要舒血管因子,血管内皮细胞可通过 eNOS 催化 L-精氨酸生成 NO^[12]。临床研究表明,当 eNOS 的表达下调时,会使 NO 生成减少,加重内皮损伤,导致内皮细胞功能异常,引起 AS 发生^[13]。本研究结果也证实 AS 组大鼠血清 NO 水平明显降低、磷酸化 eNOS 的活性也降低,同时伴随有血管对 ACh 诱导的内皮依赖性舒张功能的降低。

然而 VCAM-1 是动脉粥样硬化这一慢性炎症反应过程启动的关键因素^[14]。在血管血管内皮损伤后,活化的内皮细胞分泌一些黏附分子 (cell adhesion molecule, CAM),如细胞间黏附分子-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)、VCAM-1 等,在炎症细胞与血管内皮的黏附中起到重要作用,组织在受到炎症因子刺激后其表达水平明显上升,高脂病变的血管中 VCAM-1 的表达大量增多^[15]。我们的研究结果也表明高脂大鼠血管 VCAM-1 的表达明显高于对照组。另有研究表明,VCAM-1 可以作为一个独立的标志物来预测心脑血管疾病的死亡率^[16]。因此保护内皮细胞,升高 eNOS 的活性,降低 VCAM-1 表达,对早期 AS 的发生有重要意义。

我国中医将 AS 的发病机制归结为气、血、津液紊乱,脏腑功能失调而形成痰证、瘀证等^[17]。近年来中医药治疗 AS 已显示出独特的优势,尤其是中成药的应用,呈现出副作用小且疗效确切的特点^[18]。龙生蛭胶囊具有补气活血,逐瘀通络之作用,其方中黄芪、水蛭为君药,黄芪补气以治本、水蛭逐瘀以治标,可收标本同治之功。方中以桃仁、红花、赤芍、川芎、当归为臣,此五药皆为活血祛瘀之品,以助水蛭逐瘀通经之力。方中佐以刺五加、桑寄生取其补肝肾、壮筋骨作用,诸药合用补气活血,逐瘀通络的功效。临床主要用于动脉硬化性脑梗塞恢复期中医辨证为气虚血瘀型中风中经络患者,但是由于中成药复杂的药物成分使得其药理作用机制尚难阐明。本实验研究从现代药理学研究方法入手,从整体、离体器官以及分子水平多个层面探讨了龙生蛭胶囊对抗 AS 的作用机制。结果显示龙生蛭胶囊可以剂量依赖性的调节脂质代谢,降低高脂大鼠血清 TC、TG、LDL 水平,升高血清 HDL 水平;并且高剂量龙生蛭胶囊可有效改善高脂大鼠动脉血管的收缩、舒

张功能,且这种保护作用可以被 L-NAME 所消除。同时研究显示龙生蛭胶囊对血管的保护作用主要是通过活化 eNOS,提高 NO 含量来实现的。然而炎症反应对血管内皮的侵蚀也是不可忽略的损伤,结果发现龙生蛭胶囊也可以有效降低高脂大鼠血清炎症因子的水平,并且下调血管 VCAM-1 蛋白表达,表明龙生蛭胶囊对血管的保护机制可能涉及抑制炎症反应和减少炎症因子对血管内皮的黏附发挥作用 (见图 5C)。以上结果均表明龙生蛭胶囊是一种具有良好应用前景的心脑血管保护药物。

参考文献:

- [1] Khan R, Spagnoli V, Tardif JC, et al. Novel anti-inflammatory therapies for the treatment of atherosclerosis [J]. *Atherosclerosis*, 2015, 240(2): 497-509.
- [2] Nahrendorf M, Swirski FK. Lifestyle effects on hematopoiesis and atherosclerosis[J]. *Circulation research*, 2015, 116(5): 884-894.
- [3] Daiber A, Steven S, Weber A, et al. Targeting vascular (endothelial) dysfunction[J]. *British journal of pharmacology*.2016.
- [4] 从学, 李学军, 张学中. 丹红注射液合并龙生蛭胶囊治疗脑梗塞临床观察[J]. *辽宁中医杂志*, 2011, 38(12): 2398-2399.
- [5] 付清伟. 步长龙生蛭胶囊联合西药治疗缺血性脑卒中随机平行对照研究[J]. *实用中医内科杂志*, 2014, 28(2): 92-94.
- [6] 杨鹏远, 芮耀成, 焦亚斌. 动脉粥样硬化大鼠实验模型的建立[J]. *第二军医大学学报*, 2003, 24(7): 802-804.
- [7] 赵铭, 于晓江, 张宏丽, 等. 缺血/缺氧对自发性高血压大鼠肠系膜动脉血管舒缩功能的影响及其可能机制[J]. *生理学报*, 2011, 63(6): 540-548.
- [8] Pejkov H, Kedev S, Panov S, et al. Atherosclerosis of coronary blood vessels - local or systemic inflammation[J]. *Pril (Makedon Akad Nauk Umet Odd Med Nauki)*, 2013, 34(3): 5-11.
- [9] Mohamied Y, Rowland EM, Bailey EL, et al. Change of direction in the biomechanics of atherosclerosis [J]. *Annals of biomedical engineering*, 2015, 43(1): 16-25.
- [10] Spinass E, Kritas SK, Saggini A, et al. Role of mast cells in atherosclerosis: a classical inflammatory disease [J]. *International journal of immunopathology and pharmacology*, 2014, 27(4): 517-521.
- [11] Gimbrone MA, Jr., Garcia-Cardena G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis [J]. *Circulation research*, 2016, 118(4): 620-636.
- [12] Stepp DW, Merkus D. No limits coronary vasoconstriction by a Shear stress dependant mechanism [J]. *Am J Physiol*, 2001, 281(4): 796-803.
- [13] Yang B, Rizzo V. TNF- α potentiates protein-tyrosine nitration through activation of NADPH oxidase and eNOS localized in membrane rafts and caveolae of bovine aortic endothelial cells[J]. *American journal of physiology*, 2007, 292(2): 954-962.
- [14] Zheng S, Qian Z, Tang F, et al. Suppression of vascular cell

- adhesion molecule-1 expression by crocetin contributes to attenuation of atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits [J]. *Biochemical pharmacology*, 2005, 70(8): 1192-1199.
- [15] Fotis L, Agogiannis G, Vlachos IS, et al. Intercellular adhesion molecule(ICAM)-1 and vascular cell adhesion molecule(VCAM)-1 at the early stages of atherosclerosis in a rat model[J]. *In vivo*(Athens, Greece), 2012, 26 (2): 243-250.
- [16] Denys A, Clavel G, Lemeiter D, et al. Aortic VCAM-1: an early marker of vascular inflammation in collagen-induced arthritis [J]. *Journal of cellular and molecular medicine*, 2016, 20(5): 855-863.
- [17] Jiang CY, Yang KM, Yang L, et al. A ¹H NMR based metabolomics approach to progression of coronary atherosclerosis in a hamster model[J]. *Acta pharmaceutica Sinica*(药学学报), 2013, 48 (4): 495-502.
- [18] 吴天敏, 杜建. 中医药抗动脉粥样硬化的研究概况[J]. *福建中医学院学报*, 2006, 16(3): 67-69.

(编辑: 修春)

溃结灵对溃疡性结肠炎大鼠肠道 Treg 相关因子的调控作用

甘丽萍, 王 凤, 龙 宇, 李燕舞, 巫燕莉, 杜 群(广州中医药大学脾胃研究所, 广东 广州 510405)

摘要: **目的** 观察溃疡性结肠炎(UC)大鼠模型结肠黏膜调节性 T 细胞(Treg)相关因子白细胞介素 2(IL-2)、白细胞介素 10(IL-10)表达, 叉头样转录因子 p3(Foxp3)、信号转导子与激活子 5(STAT5)蛋白原位表达以及基因表达的变化, 以及溃结灵(KD)对其的调控作用, 探讨溃结灵防治 UC 的作用机理。**方法** 采用三硝基苯磺酸(TNBS)法复制 UC 大鼠模型并进行中药复方溃结灵药物干预治疗。采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测结肠黏膜 IL-2、IL-10 的表达, 免疫组化方法检测结肠黏膜 Foxp3、STAT5 蛋白原位表达, 实时荧光定量 PCR(RT-PCR)方法检测 Foxp3、STAT5 基因表达。**结果** 模型组结肠黏膜 IL-2、IL-10 表达量均低于正常组($P < 0.01$, $P < 0.05$), 溃结灵高剂量组及阳性药物组黏膜 IL-2 表达量高于模型组($P < 0.01$), 溃结灵高、中剂量组及阳性药物组黏膜 IL-10 表达量均高于模型组($P < 0.01$, $P < 0.05$); 免疫组化检测模型组结肠黏膜 Foxp3、STAT5 的原位蛋白表达低于正常组($P < 0.01$), 溃结灵高、中、低剂量组及阳性药物组结肠黏膜 Foxp3、STAT5 的原位蛋白表达均高于模型组($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 模型组结肠黏膜 Foxp3、STAT5 mRNA 表达量低于正常组($P < 0.01$, $P < 0.05$); 溃结灵高、中剂量组及阳性药物组 Foxp3 mRNA 表达高于模型组 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 溃结灵高剂量组及阳性药物组 STAT5 mRNA 高于模型组($P < 0.01$, $P < 0.05$)。**结论** 溃结灵对 UC 大鼠模型结肠黏膜 IL-2、IL-10 含量以及 Foxp3、STAT5 原位蛋白及基因表达的上调作用, 可能是其促进 Treg 细胞的分化, 发挥治疗 UC 作用的机制之一。

关键词: 溃结灵; 溃疡性结肠炎; IL-2; IL-10; Foxp3; STAT5; 调节性 T 细胞

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2017)01-0013-0

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2017.003

Effects of Kujieling on Treg related factors in Experimental Ulcerative Colitis Rats

Gan LiPing, Wang Feng, Long Yu, Li YanWu, Du Qun (Pi-Wei Institute, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

Abstract: **Objective** To observe the effect of Kujieling Decoction (KD) on Treg regulated factors including Interleukin-2, Interleukin-10, Foxp3 and STAT5 in colonic mucosa of rats with ulcerative colitis (UC), and explore

收稿日期: 2016-09-01

作者简介: 甘丽萍, 女, 硕士研究生, 研究方向: 中西医结合基础。Email: 947114556@qq.com。通信作者: 杜群, 研究员, 研究方向: 中医药治疗炎症性肠病的机制研究。Email: duqun@gzucm.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金(81373798); 广州中医药大学“中医药防治脾胃病、脑病创新研究团队项目(2016KYTD07)。