

· 药理 ·

桃仁对血液循环障碍大鼠内皮细胞凋亡 及相关蛋白表达的影响

以敏¹, 邓家刚^{1*}, 郝二伟², 张锡流³, 欧海玲³, 崔静珠³

(1. 广西医科大学药学院, 南宁 530021; 2. 广西中医药大学中药药效重点实验室, 南宁 530001;
3. 广西中医药大学第一附属医院病理科, 南宁 530023)

[摘要] 目的:了解桃仁对寒凝血瘀证(寒证)和瘀热互结证(热证)内皮细胞凋亡和相关蛋白表达的影响。方法:80 只大鼠随机分为寒证对照组、模型组、桃仁(8 g·kg⁻¹)组、川芎(8 g·kg⁻¹)阳性对照组,以及热证对照组、模型组、桃仁(8 g·kg⁻¹)组、丹参(14 g·kg⁻¹)阳性对照组,每组 10 只。采用全身低温冷冻和注射角叉菜胶两种方法分别建立寒、热两证模型,造模同时各给药组,每天 ig 给药 1 次,连续给药 7 d,取心、肺、肝、肾、脾,采用 HE 染色、免疫组化和原位末端转移酶标记技术(TUNEL)检测器官血管内皮细胞生长因子(VEGF)、B 淋巴细胞瘤-2 基因蛋白(Bcl-2)、肿瘤基因 p53 蛋白(p53)表达及细胞凋亡情况。结果:①两证模型大鼠均出现寒证和热证相应表征,用药大鼠相应表征均有改善;②桃仁用药后,血管内皮细胞增殖相关蛋白 VEGF 寒证无明显变化,热证表达明显减弱($P < 0.05$);凋亡蛋白 Bcl-2 寒证无明显变化,热证表达明显增强($P < 0.05$);凋亡蛋白 p53 寒热证均无明显变化;③桃仁用药后,两证血管内皮细胞凋亡数量均无明显变化。结论:桃仁改善寒、热两证大鼠血液循环障碍并抑制内皮细胞凋亡,其机制可能与减弱 VEGF 表达、增强 Bcl-2 表达以维持内皮细胞较高凋亡水平有关。

[关键词] 桃仁;寒凝血瘀证;瘀热互结证;血液循环障碍;内皮细胞;凋亡;TUNEL 法

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)14-0178-05

[doi] 10.11653/syfy2013140178

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130514.1003.007.html>

[网络出版时间] 2013-05-14 10:03

Effect of Persicae Semen on Apoptosis and Protein Expression of Endothelial Cell Because in Rats with Blood Circulation Disorders

YI Min¹, DENG Jia-gang^{1*}, HAO Er-wei², ZHANG Xi-liu³, OU Hai-ling³, CUI Jin-zhu³

(1. School of Pharmacy, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China;
2. Key Laboratory of Chinese Medicines, Guangxi University of Traditional Chinese Medicine,
Nanning 530001, China; 3. Department of Pathology, First Affiliated Hospital of
Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530023, China)

[Abstract] **Objective:** To study effects of Persicae Semen on apoptosis and protein expression of endothelial cell in cold stagnation and blood stasis syndrome (HS) and heat stagnation and blood stasis syndrome (RS) rats. **Method:** Eighty rats were randomly divided into 8 groups including normal control group of HS (HN), model group of HS (HM), Persicae Semen treatment group of HS (HT), Chuanxiong Rhizoma control group of HS (HC), normal control group of RS (RN), model group of RS (RM), Persicae Semen treatment group

[收稿日期] 20130115(001)

[基金项目] 国家科技部 973 计划课题(2007CB512602);广西科学基金项目(桂科基 09320005)

[第一作者] 以敏,博士研究生,主治医师,从事中药药效筛选研究,Tel:0771-5848712,E-mail:dolly791111@126.com

[通讯作者] * 邓家刚,Tel:0771-3137555,E-mail:dengjg@tom.com

of RS (RT), *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* control group of RS (RD). To establish the two rat models by freezing and injection of carrageenan solution. Extracts of *Persicae Semen*, *Chuanxiong Rhizoma* and *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* were given to the corresponding group rats. Seven days later, Four hundred organs derived from the eighty rats were detected by histopathology analysis (HE, IHC and TUNEL). The indexes included growth factor VEGF, apoptotic inhibitor Bcl-2, apoptotic induced protein p53 and apoptotic number of vascular endothelial cell (VEC). **Result:** ①The corresponding blood stasis syndromes appeared in HM and RM rats, while improvements of the two syndromes appeared in HT and RT rats. ② Decreased VEGF expression appeared just in RT rats ($P < 0.05$), while it did not change in HT rats. Increased Bcl-2 expression appeared just in RT rats ($P < 0.05$), while it did not change in HT rats. p53 expression did not change in both HT and RT rats. ③ Apoptosis did not change in both HT and RT rats. **Conclusion:** *Persicae Semen* proved the blood circulation and suppressed apoptosis of endothelial cell in blood stasis rats, it might be caused *Persicae Semen* decreased VEGF and increased Bcl-2 expression of endothelial cells

[**Key words**] *Persicae Semen*; cold stagnation and blood stasis syndrome; heat stagnation and blood stasis syndrome; blood circulation disorder; endothelial cell; apoptosis; TUNEL

血液循环障碍(blood circulation disorder, BCD)是各种原因导致的局部或全身循环不足,造成组织器官缺血缺氧等损伤,以及机能、代谢的障碍或衰竭的一种病理生理状态。中医寒凝血瘀证(简称寒证)和瘀热互结证(简称热证)具有BCD的特点。桃仁对寒证和热证中BCD的改善作用可能与血管内皮细胞(VEC)分裂增殖和损伤修复有关^[1-4],但目前的相关研究报道较少。

本研究检测寒证和热证大鼠桃仁干预后,血管内皮生长因子VEGF、凋亡抑制蛋白Bcl-2及诱导蛋白p53(突变型)的表达,TUNEL技术检测血管内皮细胞凋亡,为今后认识桃仁干预寒证和热证BCD的机理提供实验数据。

1 材料

1.1 药材与试剂 桃仁 *Prunus persica* (L.) Batsch (河北,批号07123015)、川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. (四川,批号07091904)、丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. (河北,批号07110814)均由南宁医药股份有限公司采购,经广西药大学中药生药学科辛宁教授、廖月葵实验师鉴别合格;药液由广西中医药大学中药制剂教研室水提、浓缩成浸膏,并加水配制成所需浓度药液^[4-5]。角叉菜胶(Sigma,批号CAS9000-07-1);活性干酵母(安琪股份,批号20091202)。免疫组化一抗(武汉博士德):VEGF兔多抗;Bcl-2小鼠单抗;p53兔多抗。二抗(北京中杉):PV-6001增强型Polink-1兔kit。TUNEL试剂盒JK-8004(美国罗氏)。

1.2 动物 SPF级SD大鼠,质量(210±20)g,湖南斯莱克景达实验动物有限公司,许可证号SCXK

(湘)2009-0004。

1.3 仪器 Leica-RM2135高级组织切片(德国莱卡);Olympus-BX60 PM20显微镜(日本Olympus);DMR+550病理图像分析仪(德国莱卡)。

2 方法

2.1 模型制备

2.1.1 寒证大鼠模型制备 将大鼠置于特制鼠笼内,于每天8:00、下午8:00分别置冰柜于(-18±2)℃连续冷冻2次,每次2h,连续冷冻7d^[6-7]。

2.1.2 热证大鼠模型制备 大鼠在第1,2,3天正常饲养,第4,5,6天ip质量浓度为10g·L⁻¹的角叉菜胶溶液5mL·kg⁻¹,第7天sc20%活性干酵母水悬液10mL·kg⁻¹^[4-5]。

2.2 分组与给药 将大鼠分成8组:寒证对照组、模型组、桃仁组、川芎组(阳性药)以及热证对照组、模型组、桃仁组、丹参组(阳性药)。桃仁、川芎、丹参组大鼠在造模同时每天ig给予相应药液1次,每次剂量分别为8,8,14g·kg⁻¹,连续给药7d;对照组大鼠自主活动及进水、进食,模型组处理同**2.1.1**和**2.1.2**。整个实验过程严格控制在室温(20±2)℃进行^[5]。依据中医寒证温治、热证寒治的理论,本研究寒证选择川芎(温性)、热证选择丹参(寒性)作为对照药,力求符合中医的用药原则。

2.3 观察指标

2.3.1 大鼠中医表征观察 包括精神行为状态、生命体征、皮肤黏膜。

2.3.2 TUNEL细胞凋亡检测及观察 结合细胞形态特征,确立凋亡内皮细胞,然后以原位末端转移酶标记技术(TdT-mediated dUTP nick end labeling,

TUNEL)按试剂盒步骤,检测其阳性数/高倍视野 (Positive number per high power field, PN/hpf)^[5-6]。TUNEL 阳性细胞核呈棕色颗粒状,常规设立阴性及阳性对照。

2.3.3 免疫组化检测及观察 造模第 8 天,麻醉各组大鼠,取心、肺、肝、肾、脾,脱水、包埋、切片(厚 4~6 μm),观察器官微小血管内皮细胞,按免疫组化常规二步法试剂盒说明,检测其凋亡及增殖相关蛋白 Bcl-2 和 VEGF,测量目标细胞吸光度(A)^[6-7];检测凋亡抑制蛋白 p53,测量其 PN/hpf。Bcl-2、VEGF 阳性部位均为内皮细胞胞质,棕黄色、棕褐色者均视为阳性表达;p53 阳性部位为细胞核,呈棕黄至棕褐色颗粒,常规设立阴性及阳性对照。

2.4 统计学分析 应用 SPSS 17.0 软件,计量资料均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较采用单因素方差分析 *t* 检验,若方差不齐,采用 *t'* 检验或秩和检验。按 $\alpha = 0.05$ 的检验水准,进行双侧检验。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠中医表征的影响 寒证模型组大鼠出现被毛蓬松竖立无光泽、唇周发黑、耳色黯红、爪尾

部紫黯、舌黯红等寒凝血瘀的中医表征,较对照组有明显差异。热证模型组出现舌底脉络增粗增长、尾部明显血栓、体温升高、耳廓边缘、四肢皮肤发红等瘀热互结的中医表征,较对照组有明显差异。寒热两证桃仁给药组血瘀表征均得到明显改善。

3.2 对细胞凋亡的影响 寒证模型组凋亡明显增多($P < 0.05$),桃仁组较模型组仅有增多趋势,川芎组较明显减少($P < 0.05$);热证模型组凋亡明显增多($P < 0.05$),桃仁组和丹参组较模型组仅有降低趋势,见表 1。

3.3 对 Bcl-2 表达的影响 寒证模型组及桃仁组 Bcl-2 表达均有降低趋势($P > 0.05$),川芎组较模型组及对照组均有明显降低($P < 0.05$);热证模型组表达明显降低($P < 0.05$),桃仁组和丹参组均增高($P < 0.05$),且桃仁组增高更显著,见表 1。

3.4 对 p53 表达的影响 寒证模型组 p53 表达明显降低($P < 0.05$),桃仁组较模型组仅有降低趋势,川芎组仅有稍增高趋势;热证模型组仅有降低趋势,桃仁组和丹参组也仅有降低趋势,但较对照组均明显降低($P < 0.05$),丹参组降低更明显,见表 1。

表 1 桃仁对寒证和热证内皮细胞凋亡及 Bcl-2, p53 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TUNEL PN/hpf/number·μm ⁻²	Bcl-2/A	p53 PN/hpf/number·μm ⁻²
寒证对照	-	69.00 ± 0.00	0.32 ± 0.02	277.00 ± 123.77
寒证模型	-	125.40 ± 59.07 ¹⁾	0.29 ± 0.03	32.30 ± 16.23 ¹⁾
寒证桃仁	8	150.20 ± 85.63 ¹⁾	0.27 ± 0.03 ¹⁾	30.33 ± 23.79 ¹⁾
寒证川芎	8	122.30 ± 91.52 ^{1,2)}	0.26 ± 0.03 ^{1,2)}	54.33 ± 40.73 ¹⁾
热证对照	-	69.00 ± 0.00	0.32 ± 0.02	277.00 ± 123.77
热证模型	-	162.40 ± 60.74 ³⁾	0.24 ± 0.02 ³⁾	124.33 ± 163.26
热证桃仁	8	119.00 ± 67.46	0.35 ± 0.02 ⁴⁾	88.00 ± 0.01 ³⁾
丹参	14	178.00 ± 0.00 ³⁾	0.30 ± 0.08 ⁴⁾	12.60 ± 3.20 ³⁾

注:与寒证对照组比较¹⁾ $P < 0.05$;与寒证模型组比较²⁾ $P < 0.05$;与热证对照组比较³⁾ $P < 0.05$;与热证模型组比较⁴⁾ $P < 0.05$ (表 2 同)。

3.5 对 VEGF 表达的影响 寒证模型组、桃仁组和川芎组 VEGF 表达均无明显改变;热证模型组表达仅有增高趋势,桃仁组有明显降低($P < 0.05$),而丹参组无明显变化,见表 2。

4 讨论

细胞凋亡可见于 BCD 性或炎性损伤等,其最终环节是细胞核染色质 DNA 双链断裂^[7]。中药能降低细胞凋亡^[8]。本研究寒证内皮细胞凋亡数量无明显改变,桃仁干预后,凋亡数量亦无明显改变,提示桃仁对寒证血管内皮凋亡无明显影响;而川芎可明显减少细胞凋亡,说明其作用较桃仁明显。热证

细胞凋亡数量明显增多,但桃仁或丹参干预对其均无明显影响,说明热证时 DNA 损伤明显,血管内皮凋亡增多,提示这可能涉及第二信使(如炎症因子、氧自由基等)增多,导致凋亡信号通路激活,而桃仁和丹参对该信号通路可能无明显作用。

该结果与一些报道中药对心、脑缺血缺氧性损伤的保护^[9]不一致,提示桃仁对凋亡信号通路的影响途径可能不同于其他中药,又或者两证内皮细胞损伤后凋亡过多,不能及时修复血管壁的损伤,致药物不能通过血管到达局部,故保护作用尚不明显。因此桃仁治疗血瘀证的临床应用价值有待深入

研究。

表 2 桃仁对寒证和热证大鼠 VEGF 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	A
寒证对照	—	0.33 ± 0.04
寒证模型	—	0.34 ± 0.02
寒证桃仁	8	0.32 ± 0.04
川芎	8	0.35 ± 0.02
热证对照	—	0.33 ± 0.04
热证模型	—	0.39 ± 0.01
热证桃仁	8	0.23 ± 0.08 ^{3,4)}
丹参	14	0.39 ± 0.08

实验研究表明中药可促进血瘀证 Bcl-2 表达^[10],以改善微循环缺血缺氧。本研究寒证模型组及桃仁组 Bcl-2 表达仅有降低趋势,但桃仁组较对照组明显降低,而川芎组较模型组及对照组均有明显降低,说明桃仁对寒证内皮细胞 Bcl-2 凋亡信号通路无明显影响,川芎的作用则可能与该通路有关。

本研究热证模型 Bcl-2 表达明显降低,桃仁和丹参组均明显增高,且桃仁增高更显著。说明热证细胞凋亡抑制减弱,凋亡增多,桃仁和丹参均可明显促进该信号通路,抑制凋亡,且桃仁作用更显著。该结果与 TUNEL 检测结果一致,也与多数学者的研究结果一致。

功能性促凋亡蛋白 p53 可负向调节 Bcl-2 而促进凋亡,但突变的 p53 则无此功能^[11-12]。本研究寒证模型突变型 p53 表达明显降低,则功能性 p53 将正常发挥诱导凋亡的功能,该结果也与 TUNEL 凋亡检测结果一致;桃仁组表达仅有降低趋势,川芎组仅有稍增高趋势,提示桃仁和川芎对寒证 p53 介导的凋亡信号通路作用相反,但影响不大。热证模型突变型 p53 表达仅有降低趋势,桃仁和丹参组也仅有降低趋势,但较对照组均明显降低,且丹参降低更明显,说明桃仁和丹参对 p53 凋亡通路作用相近,但影响甚微。我们推测,桃仁对寒、热两证突变型 p53 信号通路均无直接作用。

血管内皮生长因子 VEGF 可增加血管通透性、促内皮细胞分裂增殖和促血管生成,缺血缺氧可诱导其表达,保护器官毛细血管,从而改善血液循环^[13-14]。中草药可能促进该因子表达^[15-16]。本研究寒证模型、桃仁和川芎组 VEGF 表达均无明显改变,提示寒证血管内皮细胞再生能力低下,可能与损伤过重有关;桃仁和川芎均未能增强其表达,对内皮细胞增殖无明显改善,其作用可能与细胞增殖信号

调节无关系。热证模型 VEGF 表达仅有增高趋势,桃仁明显降低其表达,而丹参无明显变化,提示桃仁可抑制热证内皮细胞增殖,但这对血管内皮修复是否有利尚未明了。寒、热两证相比,桃仁在热证时更能改变细胞的增殖状态,其机制须待深入研究。

虽然桃仁改变血管内皮细胞凋亡的机制尚待深入研究,但随着其药效物质基础的深入研究,必将为其临床应用价值提供基础借鉴。

[参考文献]

[1] Tsai M, Kita A, Leach J, et al. *In vitro* modeling of the microvascular occlusion and thrombosis that occur in hematologic diseases using microfluidic technology [J]. J Clin Invest, 2012, 122(1) :408.

[2] Lee R D, Barcel D A, Williams, et al. Pre-analytical and analytical variables affecting the measurement of plasma-derived microparticle tissue factor activity [J]. Thromb Res, 2012, 129(1) :80.

[3] 裴瑾,颜永刚,万德光,等. 桃仁油对寒凝血瘀模型大鼠血液流变学及小鼠耳廓微循环的影响 [C]. 呼和浩特:第八届全国药用植物及植物药学术研讨会, 2009:22.

[4] 郝二伟,邓家刚,杜正彩,等. 平性药桃仁双向适用药性特征的研究 [J]. 中药药理与临床, 2011, 27(1) :56.

[5] 郝二伟. 平性药双向适用药性本质特征的研究 [D]. 济南:山东中医药大学,2011.

[6] Eriksson L, Erdogdu O, Nyström T, et al. Effects of some anti-diabetic and cardio protective agents on proliferation and apoptosis of human coronary artery endothelial cells [J]. Cardiovasc Diabetol, 2012, 11(1) :11.

[7] Zhu X, Fu A, Luo K Q. A high-throughput fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based endothelial cell apoptosis assay and its application for screening vascular disrupting agents [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 418(4) :641.

[8] 李鑫辉,黄政德,葛金文. 加味丹参饮对血瘀证心肌缺血再灌注损伤家兔内皮细胞保护作用研究 [J]. 中国药师, 2011, 14(1) :3.

[9] 李丽君. 定心方及丹参酮 II_A 防治心肌缺血-再灌注损伤的作用及机制研究 [D]. 广州:南方医科大学, 2010.

[10] 荣晓凤,李荣亨,王维. 气虚血瘀证大鼠血管平滑肌细胞 bcl-2 及 bax 相关凋亡因子的表达 [J]. 中国老年学杂志, 2010, 30(5) :648.

肾脾阳虚大鼠模型及桂附理中丸
对大鼠海马衰老变化的影响

郭煜晖¹, 周安方², 陈涛^{1*}, 胡卫¹, 梅志刚¹

(1. 三峡大学, 湖北 宜昌 443002; 2. 湖北中医药大学, 武汉 430065)

[摘要] **目的:** 本实验首次采用 im 氢化可的松和 ig 大黄水煎液复合方法复制肾脾阳虚模型, 观察桂附理中丸对肾脾阳虚大鼠大脑海马组织的影响以及温补脾肾方药的调节作用。**方法:** 8 周龄 SD 大鼠 40 只, 雄性, 随机分为正常对照组、模型组、维生素 E 组和桂附理中丸组 4 组。正常对照组大鼠每天上午 8:00 im 生理盐水 5 mL·kg⁻¹, 同时 ig 生理盐水 10 mL·kg⁻¹, 下午 14:00 ig 生理盐水 10 mL·kg⁻¹; 其余组大鼠上午 8:00 im 氢化可的松 25 mg·kg⁻¹, 同时 ig 大黄水煎液 4 g·kg⁻¹, 下午 14:00 模型组 ig 生理盐水 10 mL·kg⁻¹, 维生素 E 组 ig 维生素 E 混悬液 18 × 10⁻³ g·kg⁻¹, 桂附理中丸组 ig 桂附理中丸混悬液 1.62 g·kg⁻¹, 共 30 d。电镜下观察海马组织超微结构改变; 流式细胞仪检测细胞周期。**结果:** 肾脾阳虚模型可使大脑海马 CA1 区细胞器及神经元出现衰老表现, 细胞老化率明显升高 ($P < 0.05$), 与模型组比较, 维生素 E 组及桂附理中丸组大脑海马细胞器增多, 脂褐素沉积减少, 细胞老化率明显下降 ($P < 0.05$), 桂附理中丸组大鼠海马 CA1 区细胞轮廓清晰, 无细胞器及神经元细胞衰老征象。**结论:** 实验大鼠海马组织的衰老变化是肾脾阳虚模型的明显病理改变, 桂附理中丸具有调节海马神经细胞、恢复细胞周期的功效。

[关键词] 肾脾阳虚; 桂附理中丸; 大脑海马

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)14-0182-04

[doi] 10.11653/syfy2013140182

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130514.1002.005.html>

[网络出版时间] 2013-05-14 10:02

Effects of Guifu Lizhong Wan on Hippocampus Aging
in Mice Deficiency of Kidney and Spleen Model

GUO Yu-hui¹, ZHOU An-fang², CHEN Tao^{1*}, HU Wei¹, MEI Zhi-gang¹

(1. China Three Gorges University, Yichang 443002, China;

2. Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

[收稿日期] 20121129(021)

[基金项目] 国家自然科学基金青年项目(81102529)

[第一作者] 郭煜晖, 博士, 从事藏象理论及其应用研究, Tel: 18642907592, E-mail: guoyuhui320@yeah.net

[通讯作者] * 陈涛, 博士, 教授, 从事中医脏象理论研究、中西医结合抗肿瘤研究, Tel: 0717-6397378, E-mail: chentao@ctgu.edu.cn

[11] 孔祥训. 大肠癌中医辨证分型与外周血 VEGF 及 P53 基因表达水平的相关性研究[D]. 福州: 福建中医药大学, 2011.

[12] 刘永惠, 郭少贤, 常靖, 等. 丹参酮对血瘀证乳腺癌 P53 基因、mdm2 基因表达的影响[J]. 陕西中医, 2011, 32(12): 1666.

[13] Patil A S, Sable R B, Kothari R M. Occurrence, biochemical profile of vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms and their functions in endochondral ossification[J]. J Cell Physiol, 2012, 227(4): 1298.

[14] Mackenzie F, Ruhrberg C. Diverse roles for VEGF-A in the nervous system[J]. Development, 2012, 139(8): 1371.

[15] 王轩, 李引刚. 桃仁、木香、黄芪分别与红花配伍对大鼠早期桡骨骨折愈合及 VEGF 表达的影响[J]. 山西中医学院学报, 2009, 10(3): 18.

[16] 卢正华, 张雨, 宫丽鸿, 等. 桃核承气改良方对家兔血管内皮损伤后 STAT3 和 VEGF 影响的实验研究[J]. 中华中医药学刊, 2009, 27(5): 1022.

[责任编辑 聂淑琴]