

补阳还五汤、天麻钩藤饮与高血压病气虚血瘀证、
肝阳上亢证关联性研究

胡小勤^{1*}, 曾学文¹, 唐亚平¹, 钟卫干¹, 王庆高¹, 陈利国², 张竞之³, 韦乃球¹, 杨秀美¹
(1. 广西中医学院, 南宁 530001; 2. 暨南大学医学院, 广州 510632;
3. 广州医学院第二附属医院中医科, 广州 510260)

【摘要】 目的:探讨补阳还五汤、天麻钩藤饮与高血压病气虚血瘀证、肝阳上亢证之间的关联性,以此来验证“方证相关”的客观存在。**方法:**制作高血压病气虚血瘀证和高血压病肝阳上亢证细胞模型,用补阳还五汤和天麻钩藤饮含药血清干预细胞模型,观察内皮细胞活性改变及内皮细胞蛋白 C 受体(EPCR)、血管内假性血友病因子(vWF)、血栓调节蛋白(TM)3 种血管内皮细胞损伤标志物的表达。**结果:**气虚血瘀加补阳还五组与气虚血瘀加空白血清组比较,肝阳上亢加天麻钩藤组与肝阳上亢加空白血清组比较,细胞活性较高,vWF,TM,EPCR 含量较低,差异显著($P < 0.01$);气虚血瘀加天麻钩藤组、肝阳上亢加补阳还五组与气虚血瘀加补阳还五组比较,细胞活性较低,vWF,TM,EPCR 含量较高,差异显著($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);气虚血瘀加天麻钩藤组、肝阳上亢加补阳还五组与肝阳上亢加天麻钩藤组比较,细胞活性较低,vWF,TM,EPCR 含量较高,差异显著($P < 0.01$)。**结论:**补阳还五汤、天麻钩藤饮与高血压病气虚血瘀证和肝阳上亢证具有显著的关联性。
【关键词】 补阳还五汤;天麻钩藤饮;气虚血瘀证;肝阳上亢证;高血压病;方证相关
【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** B **【文章编号】** 1005-9903(2011)18-0203-03

基于临床实际中一方用于多病(证)取得疗效和一病(证)容许多方治疗的事实,方证关系正由原来理解的“一方一证”或所谓的“牢固的对应关系”^[1]转变为方与证之间的适配性和关联性,即“方证相关”^[2]。

气虚血瘀证和肝阳上亢证是高血压病的常见证型,治疗的方剂分别选用补阳还五汤和天麻钩藤饮。我们制作高血压病气虚血瘀证和高血压病肝阳上亢证细胞模型,用补阳还五汤和天麻钩藤饮含药血清干预细胞模型,通过观察内皮细胞活性改变及内皮细胞蛋白 C 受体(EPCR)、血管内假性血友病因子(vWF)、血栓调节蛋白(TM)3 种血管内皮细胞损伤标志物的表达,来探讨补阳还五汤、天麻钩藤饮与高血压病气虚血瘀证、肝阳上亢证之间是否具有关联性,以此来验证“方证相关”的客观存在。

1 材料

1.1 细胞 人脐静脉内皮细胞株(CRL-1730)由武汉大学“中国典型培养物保藏中心”提供。

1.2 动物 SD 大鼠(150 ~ 180 g)18 只,雌雄各半,SPF 级,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供许可证号 SCXK(湘)2009-0004。

1.3 试剂 四甲基偶氮唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)、胰蛋白酶为 Sigma 公司产品;vWF,TM,EPCR 酶联免疫定量检测(ELISA)试剂盒为美国 ADL 公司产品,批号分别为 20100624007,20100629013,20100618002;F12K 培养基、内皮细胞生长因子(EGCS)为北京迈晨科技公司产品,胎牛血清为杭州四季青生物工程材料研究所产品。

1.4 仪器 680 酶标仪为美国 Bio-Rad 公司产品。

2 方法

2.1 研究对象的选择 高血压病气虚血瘀证和肝阳上亢证患者各 40 例。为 2009 年 5 月至 2010 年 5 月广西中医学院第一附属医院心血管内科确诊者。高血压病诊断符合世界卫生组织/国际高血压学会统一的诊断标准^[3]。气虚血瘀证,诊断符合 1986 年中国中西医结合研究会制定的中医虚证诊断标准及血瘀证诊断标准^[4-5];肝阳上亢证,诊断符合 2002 年中华人民共和国卫生部制定的《中药新药临床研究指导原则》肝阳上亢型标准^[6]。

2.2 患者血清收集 空腹取血,置入无菌带帽干燥试管,自凝后离心(4 ℃,2 000 r·min⁻¹,15 min),取

【收稿日期】 2011-05-09
【基金项目】 广西教育厅科研项目面上项目(200810MS038)
【通讯作者】 * 胡小勤,副教授,博士,从事血瘀证及活血化瘀研究, Tel: 15878766210, E-mail: hxqok6905 @ yahoo. com. cn

上清液置无菌 EP 管,冻存于 -20 ℃,备用。用于体外细胞实验的血清分别为各组患者的混合血清。

2.3 含药血清制备 将 SD 大鼠随机分为补阳还五组、天麻钩藤饮组和空白对照组,每组 6 只。补阳还五汤(含生药 2 g·kg⁻¹)、天麻钩藤饮(含生药 1.4 g·kg⁻¹),均为原方的等效剂量,2 次/d,间隔 12 h,连续 3 d。于末次药后 1 h 后颈动脉放血,自凝后离心(4 ℃,2 000 r·min⁻¹,15 min),取上清,然后将同组大鼠的血清合并,置无菌 EP 管,混匀,灭活,过滤除菌,-20 ℃冻存备用。在同等条件下以等体积的生理盐水 ig,制备空白对照血清。

2.4 分组 分为气虚血瘀+补阳还五组、气虚血瘀+天麻钩藤组、气虚血瘀+空白血清组、肝阳上亢+天麻钩藤组、肝阳上亢+补阳还五组、肝阳上亢+空白血清组,共 6 组。气虚血瘀+补阳还五组:10% 高血压病气虚血瘀血清+10% 补阳还五汤含药血清;气虚血瘀+天麻钩藤组:10% 高血压病气虚血瘀血清+10% 天麻钩藤饮含药血清;气虚血瘀+空白血清组:10% 高血压病气虚血瘀血清+10% 空白血清;肝阳上亢+天麻钩藤组:10% 高血压病肝阳上亢血清+10% 天麻钩藤饮含药血清;肝阳上亢+补阳还五组:10% 高血压病肝阳上亢血清+10% 补阳还五汤含药血清;肝阳上亢+空白血清组:10% 高血压病肝阳上亢血清+10% 的空白血清,各组均+80% F12K 培养基。

2.5 MTT 法检测细胞活性 取生长良好的对数生长期 CRL-1730 细胞,消化、传代后,按 5×10⁴/mL 密度接种于 96 孔培养板中,200 μL/孔。用含 10% FBS 和 0.03 g·L⁻¹ ECGS 的 F12K 培养基培养 24 h 后,换无血清培养液再培养 24 h,按以上实验分组方案分组,每组 9 个复孔,继续培养 24 h 后,每孔加入 20 μL MTT(5 g·L),孵育 4 h,去上清,每孔加 DMSO 150 μL,振荡 10 min,全自动酶标仪 570 nm 处测吸光度(A)。实验中设不加细胞只加培养液的空白对照孔,其他操作与实验组相同。最后比色时,以空白对照孔调零。

2.6 ELISA 法检测细胞上清液 vWF,TM,EPCR 含量 取生长良好的对数生长期 CRL-1730 细胞,消化、传代后,按 1×10⁵/mL⁻¹,接种于 24 孔培养板,1 mL/孔。分组方案及培养同 2.5。再以 PBS 液洗涤 3 次,换无血清培养液再培养 24 h 后,取细胞培养上清液,置于无菌 EP 管,冻存于 -20 ℃。ELISA 检测

vWF,TM,EPCR 含量,按照试剂盒说明书进行操作。

2.7 统计学方法 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

由表 1 可以看出:气虚血瘀加补阳还五组与气虚血瘀+空白血清组比较,肝阳上亢+天麻钩藤组与肝阳上亢+空白血清组比较,细胞活性较高,差异显著($P < 0.01$);气虚血瘀+天麻钩藤组、肝阳上亢+补阳还五组与气虚血瘀+补阳还五组比较,细胞活性较低,差异显著($P < 0.01$);气虚血瘀加天麻钩藤组、肝阳上亢+补阳还五组与肝阳上亢+天麻钩藤组比较,细胞活性较低,差异显著($P < 0.01$)。

表 1 各组细胞活性比较($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	A
气虚血瘀+补阳还五	0.94 ± 0.05 ²⁾
气虚血瘀+天麻钩藤	0.66 ± 0.03 ^{6,8)}
气虚血瘀+空白血清	0.65 ± 0.03
肝阳上亢+补阳还五	0.69 ± 0.05 ^{6,8)}
肝阳上亢+天麻钩藤	1.04 ± 0.14 ⁴⁾
肝阳上亢+空白血清	0.72 ± 0.04

注:与气虚血瘀+空白血清组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与肝阳上亢+空白血清组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$;与气虚血瘀+补阳还五组比较⁵⁾ $P < 0.05$,⁶⁾ $P < 0.01$;与肝阳上亢+天麻钩藤组比较⁷⁾ $P < 0.05$,⁸⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

表 2 各组细胞释放的 vWF,TM,EPCR 比较($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	vWF/%	TM/ng·mL ⁻¹	EPCR/mg·L ⁻¹
气虚血瘀+补阳还五	60.29 ± 2.66 ²⁾	80.04 ± 4.40 ²⁾	135.26 ± 4.36 ^{2,7)}
气虚血瘀+天麻钩藤	82.76 ± 4.78 ^{6,8)}	103.86 ± 6.27 ^{6,8)}	155.54 ± 5.97 ^{6,8)}
气虚血瘀+空白血清	85.56 ± 3.39	106.55 ± 8.76	152.46 ± 11.34
肝阳上亢+补阳还五	78.03 ± 2.58 ^{6,8)}	91.15 ± 6.81 ^{5,8)}	148.75 ± 8.09 ^{5,8)}
肝阳上亢+天麻钩藤	58.05 ± 2.69 ⁴⁾	71.22 ± 6.14 ⁴⁾	120.78 ± 8.56 ⁴⁾
肝阳上亢+空白血清	80.48 ± 2.84 ¹⁾	99.41 ± 6.39	149.84 ± 12.96

由表 2 可以看出:气虚血瘀加补阳还五组与气虚血瘀+空白血清组比较,肝阳上亢+天麻钩藤组与肝阳上亢+空白血清组比较,vWF,TM,EPCR 含量较低,差异显著($P < 0.01$);气虚血瘀+天麻钩藤组、肝阳上亢+补阳还五组与气虚血瘀+补阳还五组比较,vWF,TM,EPCR 含量较高,差异显著($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);气虚血瘀+天麻钩藤组、肝阳上亢+补阳还五组与肝阳上亢+天麻钩藤组比较,vWF,TM,EPCR 含量较高,差异显著($P < 0.01$)。

4 讨论

“方证相关”是中医学辨证论治的核心问题。中医学辨证论治体系应该是从宏观到微观、从抽象到具体、从定性到定量、从模糊到精确的方证论治

体系^[3]。

血管内皮细胞活性的高低可以反映细胞的代谢与增殖。通过 MTT 法研究血管内皮细胞的活性,有诸多文献报道。张继江等^[4]通过 MTT 法发现黄芪含药血清可促进 H_2O_2 损伤的人脐静脉内皮细胞的增殖。 vWF 水平的升高被认为是血管损伤或功能紊乱的标志^[5-6]。TM 由血管内皮细胞合成分泌^[7],其血浆浓度升高可敏感反映各种疾病的血管内皮细胞的损伤,尤其是微血管病变。EPCR 是近年发现的蛋白系统的一个新成员,主要表达于大血管内皮细胞。血浆 EPCR 水平的变化可作为大血管疾病进展和评价干预治疗有效性的标志物^[8]。三者都是血管内皮细胞损伤的标志物。

本研究通过检测细胞活性及观察 vWF , TM, EPCR 3 种血管内皮细胞损伤标志物的表达,进行了补阳还五汤、天麻钩藤饮与其相对应的“证”的相关性研究。结果表明:气虚血瘀证经补阳还五汤治疗后及肝阳上亢证经天麻钩藤饮治疗后,细胞损伤明显减轻,而气虚血瘀证经天麻钩藤饮治疗及肝阳上亢证经补阳还五汤治疗后,均没有疗效。通过“同方异证”(补阳还五汤治疗气虚血瘀证和肝阳上亢证、天麻钩藤饮治疗气虚血瘀证和肝阳上亢证)及“异方同证”(补阳还五汤和天麻钩藤饮治疗气虚血瘀证、补阳还五汤和天麻钩藤饮治疗肝阳上亢证)的比较,发现补阳还五汤、天麻钩藤饮与高血压病气虚血瘀证和肝阳上亢证具有显著的关联性。这与以往的“方证相关”研究结果类似。陈艳芬等^[9]通过黄连-吴茱萸药对“方证相关”的研究,表明左金丸与反左金不同效应体现了不同的“方”治疗对应不同的“证”。

众所周知,疗效高低是判断方证之间关联性大小的唯一依据。疗效高低的评价,通常涉及到中医临床和实验研究两个方面。其中临床疗效的评价主要是以证候改善为依据的,而证候具有一定的主观和模糊性,其疗效的客观评价有一定困难。同时,出于伦理上的考虑,临床上不太可能因研究需要而安排与证无甚关联的方药进行实验。因此,本研究采用了实验研究的方法来评价方剂的疗效。

本研究将进一步阐明辨证论治的科学原理,为临床据证选方或组方提供实验依据,同时,为开展“方证相关”的“同方异证”(一方作用于几种不同病证)、“异方同证”(不同方剂作用于同一种病证)研究,提供方法学上的借鉴,也为开展“病证结合”的“方证相关”研究提供范例。

致谢:本实验得到广西中医学院第一附属医院心血管内科的大力支持。

[参考文献]

- [1] 王阶,张兰凤,王永炎.方证对应理论源流及临床研究[J].世界科学技术——中医药现代化,2004,6(4):13.
- [2] 王洪海,谢鸣.关于同方异证与异方同证的思考[J].中医杂志,2006,47(4):253.
- [3] 范颖.方证相关的系统论探讨[J].中医杂志,2005,46(4):249.
- [4] 张继江,刘影哲,周亚滨.黄芪含药血清对 H_2O_2 诱导人脐静脉内皮细胞氧化损伤模型细胞活性的影响[J].中医药信息,2011,28(2):19.
- [5] Kaeng W Lee, Andrew D Blann, Gregory Y H Lip. Interrelationships of indices of endothelial damage/dysfunction [circulating endothelial cells, von Willebrand factor and flow-mediated dilatation] to tissue factor and interleukin-6 in acute coronary syndromes[J]. Int J Cardiol, 2006, 111(2):302.
- [6] Aun Yeong Chong, Gregory Y H Lip, Bethan Freestone, et al. Increased circulating endothelial cells in acute heart failure: Comparison with von Willebrand factor and soluble E-selectin[J]. Eur J Heart Failure, 2006, 8(2):167.
- [7] K Wojtkielewicz, M Urban, M. Kowaleski, et al. Tu-P7: 121 Soluble thrombomodulin (STM)-a molecular marker of endothelial cell injury in children and adolescents with type 1 diabetes[J]. Atherosclerosis Supplements, 2006, 7(3):211.
- [8] Esmon C T, Xn J, Gu J M, et al. Endothelial protein C receptor[J]. Thromb Haemostasis, 1999, 82(2):251.
- [9] 陈艳芬,陈蔚文,李茹柳.“左金丸”与“反左金”的药效学反应比较研究[J].中国中医基础医学杂志,1995,1(4):50.

[责任编辑 何伟]