

疏肝活血药方对家兔主动脉平滑肌细胞 脂过氧化物含量和超氧化物歧化酶活性的影响

范英昌 朱 均 陆 融

(天津中医学院病理学教研室, 天津 300193)

Effect of Chinese Drug Recipe, Removing Stagnancy of Vital Energy of Liver and Invigorating Blood Circulation, on Content of Lipid Peroxide and Activity of Superoxide Dismutase in Aortic Smooth Muscle Cell of Rabbits

FAN Ying-Chang, ZHU Jun and LU Rong

(Department of Pathology, Tianjin College of Chinese Traditional Medicine, Tianjin 300193, China)

ABSTRACT The etiology pathology etc of atherosclerosis (As) have been studied widely for many years. From the traditional medicine viewpoint, the mechanism of stasis existed in As. So the Chinese drug recipe of removing stagnancy of vital energy of the liver and invigorating blood circulation was subjected in treatment of As. From the molecular level of cytobiology, the effect of Chinese drugs on content of lipid peroxide (LPO) and activity of superoxide dismutase (SOD) were studied in *in vitro* cultured SMC of rabbit aorta. The results showed that content of LPO in SMC were lower in Chinese drugs group than that in the control group ($P < 0.01$), activity of SOD in SMC were higher in Chinese drugs group than that in the control group ($P < 0.01$). This Chinese drug recipe may obviously reduce the content LPO of SMC, raise the activity of SOD, protect the normal function, metabolism and complete constitution. Thus, the Chinese drug recipe reduce the pathological changes of make it tend to motionless.

KEY WORDS Chinese drug recipe of removing stagnancy of vital energy of the liver and invigorating

blood circulation; Smooth muscle cell; Content of lipid peroxide; Activity of superoxide dismutase; Atherosclerosis

摘要 动脉平滑肌细胞内脂过氧化物含量增加,超氧化物歧化酶活性减弱,与动脉粥样硬化的发生有着重要的关系。本实验通过对家兔主动脉平滑肌细胞进行体外培养,观察到中药疏肝活血方可以显著降低平滑肌细胞内脂过氧化物含量,明显提高超氧化物歧化酶活性。实验结果提示中药疏肝活血方可能有使动脉粥样硬化病变减轻和趋向静止的作用。

关键词 疏肝活血药方; 平滑肌细胞; 脂过氧化物; 超氧化物歧化酶; 动脉粥样硬化

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是当今社会发病率最高、危害最大的疾病之一。多年来,人们对As的病因、病理从诸多方面进行了深入研究,以期提示其病因及发病机理,从而寻找出有效的防治手段。根据多年的临床经验,从中医学的角度,我们认为As的发生存在着“肝郁气滞、瘀血内停”的病理机制,提出用疏肝活血法治疗As疾病。为了探讨疏肝活血药方(暂名)的作用机理,我们对家兔主动脉平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)进行体外培养,观察疏肝活血药方对SMC内脂过氧化物(lipid peroxide, LPO)含量和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性的影响。

1 材料与方法

1.1 主动脉平滑肌细胞的制取

选用3月龄健康日本大耳白家兔,雌性,体重1.2 kg,颈总动脉放血处死后,无菌条件下取胸主动脉,浸

于无钙镁的 Hanks 液中,剥去外膜结缔组织和血块,将动脉纵行剪下,轻轻刮去内膜,用镊子将动脉中膜成条状撕下,置于含 20% 胎牛血清的 DMEM/F-12 培养液中,剪成 1~2 mm³ 小块,接种于 25 ml 培养瓶内,37℃ 恒温箱中孵育 1~2 h,待贴壁后,每个培养瓶内加入 4 ml 含 20% 胎牛血清的 DMEM/F-12 培养液培养,同时调 pH 为 7.0~7.2,约 2~3 日后细胞开始生长,待细胞生长蔓延达 1.5 cm 时,用 0.125% 胰蛋白酶溶液和 0.02% 乙二胺四乙酸 (ethylenediamine tetra-acetic acid, EDTA) 溶液按等毫升数的量配成的消化液消化,再以含 15% 胎牛血清的 DMEM/F-12 培养液制成细胞悬液,按 7×10^4 的量接种入培养瓶内继续培养,此为第 1 代细胞,待细胞铺满瓶底后,再次依上法相继传代。本实验均选用第 4 代生长状态良好的 SMC 进行,查染色体 $2n=44$,均属于 2 倍体细胞,说明所选 SMC 是可靠的。

1.2 观察疏肝活血药方对平滑肌细胞的影响

将细胞数均匀的 SMC 常规培养 24 h 后随机分为给药组和对照组,给药组为每毫升培养液中加入疏肝活血药方(疏肝活血药方由香附、陈皮、杭芍、泽兰、三棱、海藻、枸杞子等组成,天津中医学院第一附属医院剂研室提纯制成 1:1 的无菌药液)提取液 30 μ g,对照组只加培养液,不附加任何药液。两组细胞均培养 6 天后,分别用硫代巴比妥酸钠比色法测定 SMC 内 LPO 含量,袁氏邻三苯酚自氧化法测定 SMC 内的 SOD 活性。

2 结果

在相差显微镜下可见培养细胞交织生长,排列呈放射状,有“峰”与“谷”现象;透射电子显微镜下,可见胞浆内有丰富的与细胞长轴平行的肌丝及与之相连的致密体等 SMC 特有的结构。因此,供实验用的 SMC 模型基本成立。

2.1 平滑肌细胞内脂过氧化物含量

Table 1 显示体外培养时,在培养液中加入疏肝活血药方培养的 SMC, LPO 的分解产物丙二醛含量为 $1.85 \pm 1.7 \mu\text{mol/L}$,明显低于不加中药的对照组 $5.58 \pm 2.89 \mu\text{mol/L}$,二者比较有非常显著差异($P < 0.01$)。

2.2 平滑肌细胞超氧化物歧化酶活性

Table 2 显示了体外培养的 SMC 内 SOD 活性为 $53.285 \pm 13.015 \text{ u/g}$ 蛋白,给药组的

Table 1. Determination of lipid peroxide content in cultured aortic SMC ($\bar{x} \pm s$).

Group	n	LPO($\mu\text{mol/ml}$)
control	10	5.58 ± 2.98
chinese drugs	10	$1.85 \pm 1.70^*$

* $P < 0.01$, compared with control group.

Table 2. Determination of superoxide dismutase activity in cultured aortic SMC ($\bar{x} \pm s$).

Group	n	SOD(kU/g)
Control	10	53.285 ± 13.015
Chinese drugs	10	$69.763 \pm 14.127^{**}$

** $P < 0.01$, compared with control group.

SMC 内 SOD 活性值为 $69.763 \pm 14.127 \text{ u/g}$ 蛋白,给药组的 SOD 活性明显高于对照组,二者比较有非常显著差异($P < 0.01$)。

3 讨论

现代医学认为^[1,2], As 的发生关键在于动脉壁中 SMC 发生增殖反应, As 斑块中细胞成分大部分是从中膜移行而来并发生表型转变的 SMC,所以近年来,许多学者运用细胞培养技术对血管 SMC 进行体外培养,来研究 SMC 的结构、功能以及它们在 As 发生发展中的作用^[3]。已知 As 的主要危险因素如血脂过高,可伴有体内脂质过氧化作用加强,产生大量的脂过氧化物。血脂升高和过氧化的低密度脂蛋白可对血管内皮细胞和 SMC 有明显的毒性作用,促进 As 的形成。不仅如此,在 As 病变时,脂过氧化物的增多常伴有脂过氧化物清除酶系的活性变化。所以高脂血症时,自由基反应引发脂质过氧化作用损伤抗氧化酶活性造成的恶性循环,可能是 As 发病机理诸重要环节之一。因而在降血脂的同时,中止脂质过氧化恶性循环,亦是防治 As 的积极措施。本实验对 SMC 进行体外培养,证实疏肝活血药方可以显著降低 SMC 内 LPO 含量,明显提高 SOD 活性。在 As 斑块区中 LPO 含量明显高于非斑块区,动物实验亦证实给家兔静脉注射 LPO 可以导致 As

发生^[4],研究表明脂质过氧化是细胞损伤的重要机制,可以促进 SMC 的增殖从而加速 As 的发生。SOD 广泛存在于生物体内,是机体清除氧自由基的重要酶,自由基及其引发的脂质过氧化链式反应可以造成生物膜损伤并导致多种细胞的形态和功能改变,这种改变与 As 的发生发展密切相关,SOD 可以清除自由基、抗脂质过氧化。

祖国医学认为 As 的发生存在着“肝郁气滞、瘀血内停”的病理机制,治疗当“疏肝理气,活血化瘀”。肝主疏泄,性喜条达,若肝气失于正常的疏泄,日久则会导致肝郁气滞,气失通畅则不能行血而致瘀血内停。气滞血瘀长期蕴积不散,往往就会导致局部组织的病理变化,瘀血停滞于经脉,则出现 As 斑块,所以我们运用疏肝活血药方疏畅郁滞之肝气,祛除停滞于经脉的瘀血,从而达到治疗 As 的目的。方用香附疏肝理气;三棱破血祛瘀,行气止,配杭芍、泽兰活血祛瘀,取其散滞之功;陈皮乃理气之要药,借陈皮之理气而共奏行血之效;加海藻辅以消散软坚而散结;血瘀日久,瘀血不去,新血不生,方

中补以枸杞子滋补肝肾、充盈阴血。实验显示疏肝活血药方通过降低 SMC 内 LPO 含量,提高 SOD 活性来抑制 As 的发生发展。

以上提示抑制脂质过氧化,是从现代医学病因学角度防治 As 的重要措施。中药疏肝活血药方则从中医学辨证施治角度针对 As 中的“肝郁气滞、瘀血内停”病型进行治疗,本实验证实该药方可降低 SMC 内 LPO 含量,提高 SOD 活性,从而防治 As 的发生发展。

参考文献

- 1 Yaichiro Gotoy. Lipid peroxides as a course of vascular disease. In: Kunio Yaji, et al. *Lipid peroxide in biology and medicine*. New York: Academic Press, 1982, 295~304.
- 2 孙小宣,胡毅煌,包晓峰,等. 通脉降脂口服液对体外培养兔主动脉壁平滑肌细胞生长周期的实验研究. 中国中西医结合杂志, 1995, 15(3): 168.
- 3 邱红明,邓仲端. 平滑肌细胞的表型转变与动脉粥样硬化发生的关系. 中华病理学杂志, 1988, 17(2): 115.
- 4 朱田秀辉. 动脉硬化, 1980, 8(2): 295.

(1995-09-05 收到, 1996-02-05 修回)

名词术语的汉英对照及缩写(IV)

心血管病	angiocardopathy
心源性脑缺血	cardiac anencephalohemia
心肌梗塞前综合征	premyocardial infarction syndrome, pre-MIS
心肌梗塞后综合征	postmyocardial infarction syndrome, post-MIS
去纤维蛋白血	defibrinated blood, dFB
甘油一酯	monoglyceride, MG
甘油二酯	diglyceride, DG
甘油培养基	glycerin culture-medium, GCM
白细胞趋化因子	leukocyte chemotactic factor, LCF
包膜抗原	envelope antigen, EAg
鸟苷酸环化酶	guanylate cyclase, GCase
鸟氨酸氨基甲酰转移酶	ornithine carbamyl transferase, OCTase
主动脉狭窄	aortostenosis, AS
主动脉缩窄	coarctation of aorta, CA
动脉硬化	aortosclerosis, AS

(胡必利编写)