

## 辛通畅络中药复方对血管平滑肌 细胞凋亡影响的体外研究

杨晓琨<sup>1</sup> 王萌<sup>2</sup>

(1. 天津中医药大学第一附属医院急诊部, 天津 300193; 2. 天津中医药大学, 天津 300193)

**【摘要】目的** 观察辛通畅络中药复方对慢性肾脏病(CKD)心血管危险因素的改善作用。**方法** 选择 SD 远交系健康 SPF/VAF 级雄性大鼠, 体质量 250 ~ 300 g。以辛通畅络中药复方(柴胡 12 g, 黄芩 10 g, 生黄芪 30 g, 当归 10 g, 女贞子 15 g, 泽兰 15 g, 水蛭 10 g, 细辛 3 g)连续灌胃大鼠 10 d, 然后处死大鼠取动脉血, 制备含 10%、20%、30% 含药血清培养液, 体外培养血管平滑肌细胞(VSMC), 以正常大鼠血清为空白对照, 每组样本数为 20。采用原位末端缺刻标记试验(TUNEL)和流式细胞仪分别检测各组大鼠 VSMC 凋亡阳性率。**结果** 随着含中药血清浓度的增加, VSMC 凋亡率逐渐增加。TUNEL 法显示: 含 10% 药物血清组 VSMC 凋亡率明显高于空白对照组[(9.20 ± 0.68)% 比 (7.32 ± 0.43)%,  $P < 0.01$ ], 含 20% 药物血清组 VSMC 凋亡率明显高于含 10% 药物血清组[(10.80 ± 0.36)% 比 (9.20 ± 0.68)%,  $P < 0.05$ ], 30% 药物组 VSMC 凋亡率高于 20% 含药血清组, 但差异无统计学意义[(11.92 ± 0.83)% 比 (10.80 ± 0.36)%,  $P > 0.05$ ]。流式细胞仪检测结果显示, 各含药血清组 VSMC 凋亡率均较空白对照组增加, 且以含 30% 药物血清组较含 10% 药物血清组和含 20% 药物血清组增加更显著[(28.31 ± 5.24)% 比 (8.30 ± 0.66)%, (12.04 ± 1.10)%,  $P < 0.05$ ]。**结论** 辛通畅络中药复方可以剂量依赖性地改善 CKD 的心血管功能, 其机制可能与诱导 VSMC 凋亡有关。

**【关键词】** 慢性肾脏病; 辛通畅络中药复方; 血管重构; 细胞凋亡

**A study on effect of sheen unobstructed network compound formula of traditional Chinese medicine on apoptosis of vascular smooth muscular cells in vitro** Yang Xiaokun\*, Wang Meng. \*Department of Emergency, the First Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China  
Corresponding author: Wang Meng, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China; Email: 627645678@qq.com

**【Abstract】Objective** To observe the effect of symplectic unobstructed network compound prescription of traditional Chinese medicine (TCM) on cardiovascular risk factors of chronic kidney disease (CKD). **Methods** Health male Sprague-Dawley (SD) rats in a SPF/VAF grade weighting 250 - 300 g were collected. The TCM decoction of sheen unobstructed network compound formula (ingredients: radix bupleuri 12 g, radix scutellariae 10 g, raw radix astragali 30 g, angelica sinensis 10 g, fructus ligustri lucidi 15 g, eupatorium 15 g, leech 10 g, asari 3 g) was continuously given by lavage to rats for 10 days, then they were sacrificed and their arterial blood was harvested. The serum culture solutions containing the TCM compound 10%, 20% and 30% were prepared, the vascular smooth muscle cells (VSMC) were cultivated in vitro, and the normal rat serum was used as the culture solution in blank control ( $n = 20$ ). The positive rate of rat VSMC apoptosis was detected by terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling (TUNEL) and flow cytometry in different groups, respectively. **Results** With the increase of serum TCM concentration in culture, the VSMC apoptosis rate was increased gradually. TUNEL method showed: The VSMC apoptosis rate in culture solution containing 10% drug serum group was obviously higher than that of blank control group [(9.20 ± 0.68)% vs. (7.32 ± 0.43)%,  $P < 0.01$ ], in 20% drug serum group, the rate was markedly higher than that in 10% drug serum group [(10.8 ± 0.36)% vs. (9.20 ± 0.68)%,  $P < 0.05$ ], and in 30% drug serum group, the rate was higher than 20% drug serum group, but there was no statistically significant difference [(11.92 ± 0.83)% vs. (10.80 ± 0.36)%,  $P > 0.05$ ]. The results of flow cytometry revealed that the VSMC apoptosis rate was higher in the groups with different serum drug concentrations than that in control group, and the elevation in apoptosis rate in 30% drug group was more significant than that in 20% or 10% drug serum group [(28.31 ± 5.24)% vs. (8.30 ± 0.66)%, (12.04 ± 1.10)%,  $P < 0.05$ ]. **Conclusions** The study suggests that the sheen unobstructed network of TCM compound formula induce dose-dependent improvement of cardiac vascular function of patients with chronic kidney disease, and the mechanism is possibly related to the induction of apoptosis of vascular smooth muscular cells.

**【Key words】** Chronic kidney disease; Sheen unobstructed network compound formula of traditional Chinese medicine; Vascular remodeling; Cell apoptosis

doi: 10.3969/j.issn.1008-9691.2016.01.018

基金项目: 天津市高等学校科技发展基金计划项目(20100220)

通讯作者: 王萌, Email: 627645687@qq.com

心血管疾病(CVD)是慢性肾脏病(CKD)患者最常见的并发症,相关资料显示,30%~50%的CKD患者死于CVD<sup>[1]</sup>。在英国的一项流行病学调查也表明,CKD患者死亡的首位原因是CVD,约46%的CKD患者死于并发的CVD<sup>[2]</sup>,CKD肾功能损害程度与冠心病发生率呈正相关<sup>[3]</sup>。动脉粥样硬化性疾病是CKD患者的主要合并症。近年来人们已经注意到,在CKD早期如果进行适当干预,可以延缓肾功能损害的进展,并可使CKD患者的总体病死率和CVD发生率明显减少<sup>[4]</sup>。

血管平滑肌细胞(VSMC)的增殖、凋亡和迁移是动脉粥样硬化斑块形成的主要病理生理机制。通过抑制VSMC的过度增殖、迁移和诱导凋亡,就可以延缓动脉粥样硬化斑块的形成,从而抑制血管重构。本实验通过观察辛通络中药复方对体外VSMC细胞凋亡的影响,从细胞、分子水平解析辛通络中药复方防治动脉粥样硬化,调节大血管重构,减少心血管并发症的机制,为该复方的临床应用提供更充分的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 辛通络中药复方药物血清的制备

**1.1.1 药物组成:**辛通络中药复方组成为柴胡12g,黄芩10g,生黄芪30g,当归10g,女贞子15g,泽兰15g,水蛭10g,细辛3g,8味药共煎煮3次,浓缩成100mL汁液,含生药4g/mL,无菌瓶装密封,以上各药均经天津市药品检验所核定。

**1.1.2 药物血清制备:**选择SD远交系健康SPF/VAF级雄性大鼠48只,体质量250~300g,由北京华阜康生物科技股份有限公司提供,动物合格证号:SCXK京2009-0007。大鼠按每天15g/kg的剂量灌胃辛通络中药复方,连续灌胃10d。最后一次给药后2~3h股动脉放血,分离血清,即为中药血清,经56℃、30min灭活后分别配成含10%、20%、30%中药血清的培养液备用。对照血清:取正常大鼠血,离心分离血清作为空白对照。

**1.2 实验主要设备和试剂:**胎牛血清、滤膜小室、Dulbecco改良Eagle培养基(DMEM)均由天津子涵生物科技有限公司提供。

**1.3 VSMC的培养和鉴定:**采用组织贴块法培养VSMC细胞,经 $\alpha$ -肌动蛋白( $\alpha$ -actin)免疫组化法鉴定为VSMC细胞,将培养到第3~5代细胞用于实验研究。把载玻片置于24孔板内,细胞接种到载玻片上,每孔 $2 \times 10^4$ 个/mL细胞,待细胞长满到60%时开始实验。

**1.4 VSMC分组:**将细胞分为空白对照组和含10%、20%、30%药物血清组,各组药物均用含8%胎牛血清的DMEM培养液配置后给予。

### 1.5 检测指标及方法

**1.5.1 原位末端缺刻标记法(TUNEL)检测凋亡细胞阳性率:**VSMC培养48h后,采用TUNEL检测细胞凋亡情况,细胞核内出现棕黄色或棕褐色颗粒为凋亡阳性细胞。随机观察4张细胞爬片上的5个固定大小相互垂直高倍镜视野下的500个细胞,计数单位视野阳性细胞数占相邻切片染色平均总细胞数的百分比,计算凋亡细胞阳性率。

**1.5.2 流式细胞术分析细胞凋亡率:**各组VSMC培养48h后,用流式细胞仪检测细胞凋亡率,用膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素(Annexin-V FITC)作为免疫荧光探针,使DNA链的连结之间以原子结合方式被打开,形成与荧光染料分子的共价结合,以反映细胞凋亡情况。

**1.6 统计学分析:**使用SPSS 13.0统计软件处理数据,计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用单因素方差分析(One-Way ANOV), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 TUNEL法测定VSMC的细胞凋亡率(表1):**随着药物浓度的增加,VSMC的细胞凋亡率逐渐增加,30%药物血清组细胞凋亡率最高。提示辛通络中药复方可以诱导VSMC细胞凋亡,防治CKD早期动脉粥样硬化所致的血管重构,减少CKD心血管并发症。

**2.2 流式细胞仪检测VSMC的细胞凋亡率(表1;图1):**随着药物血清浓度的增加,VSMC细胞凋亡率均逐渐增加,且含30%药物血清组VSMC细胞凋亡率明显高于空白对照组、含10%药物血清组和含20%药物血清组(均 $P < 0.05$ )。

表1 TUNEL法和流式细胞术检测各组VSMC细胞凋亡率的变化( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本数(孔)	VSMC细胞凋亡率(%)	
		TUNEL法检测	流式细胞仪检测
空白对照组	20	7.32 $\pm$ 0.43	5.74 $\pm$ 0.42
含10%药物血清组	20	9.20 $\pm$ 0.68 <sup>a</sup>	8.30 $\pm$ 0.66
含20%药物血清组	20	10.80 $\pm$ 0.36 <sup>ab</sup>	12.04 $\pm$ 1.10 <sup>ab</sup>
含30%药物血清组	20	11.92 $\pm$ 0.83 <sup>ab</sup>	28.31 $\pm$ 5.24 <sup>abc</sup>

注:与空白对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与含10%药物血清组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与含20%药物血清组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$

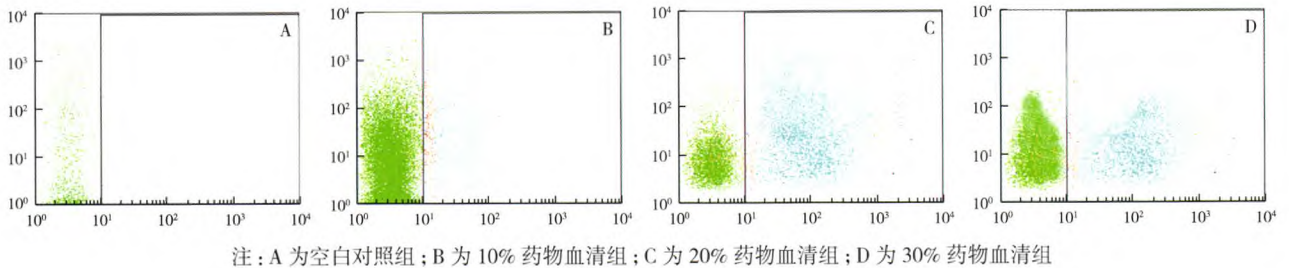


图 1 流式细胞术检测各组 VSMC 凋亡率

### 3 讨论

CKD 患病率很高,已成为当今全球关注的重大公共健康卫生问题,目前 CKD 的患病率在我国的增长速度较快,据文献报道,我国 20 岁以上的成年人中患病率为 10%<sup>[5]</sup>。CKD 是 CVD 的独立危险因素,轻度肾功能异常即可导致 CVD 发病率增高<sup>[6]</sup>。侯凡凡等<sup>[7]</sup>对全国 5 个地区 7 所三级甲等医院收治的 1239 例 CKD 患者调查结果显示,冠状动脉粥样硬化性心脏病(冠心病)患病率为 16.5%,慢性心力衰竭(心衰)为 27.7%,左心室肥厚(LVH)为 58.5%,脑卒中为 5.6%;非糖尿病 CKD 患者与糖尿病 CKD 患者冠心病的患病率分别为 13.1% 和 40.4%,脑卒中的患病率为 3.4% 和 21.1%,差异均非常显著。近年来的临床研究显示,如果在 CKD 早期加以适当干预,就可延缓肾功能损害的进展,并可减少心血管合并症的发生和 CKD 患者的总体病死率<sup>[4]</sup>。

CKD 患者并发的 CVD 包括冠状动脉(冠脉)疾病、心脏瓣膜病、脑血管疾病、心肌病和外周血管疾病等,主要分为心血管灌注障碍(如动脉粥样硬化性心血管病)和心功能障碍(如心衰、左室重构和 LVH)两类<sup>[8]</sup>。早期评估并及时干预 CVD 的危险因素,对 CKD 患者减少并发症,提高生活质量,以及改善预后均具有重要意义。CKD 肾功能损害程度与冠心病发生率呈正相关<sup>[3]</sup>。CKD 患者血脂、糖代谢、内皮功能异常,且伴有高血压、贫血、钙磷代谢紊乱和长期微炎症状态等一系列心血管危险因素,使 CVD 成为 CKD 患者的主要死亡原因,而心血管危险的重要标志之一是动脉弹性功能减退,而动脉弹性功能减退是发生 CVD 的重要预测因素<sup>[9]</sup>。

CKD 患者往往同时存在高血压、高血脂、蛋白尿、低蛋白血症、血尿、贫血、钙磷失调等,故在 CKD 的早期出现动脉粥样硬化和动脉硬化,从而导致血管病变即血管重构。动脉粥样硬化性疾病是 CKD 患者的主要合并症,是 CKD 患者 CVD 发病率及病死率异常升高的主要的原因<sup>[10]</sup>。动脉粥样硬化的

主要表现为血管内膜和血管钙化、斑块形成和闭塞<sup>[11]</sup>,属于中医学中的“瘀阻”“癥瘕”等范畴。

Roger 等<sup>[12]</sup>发现动脉粥样硬化及其相关心脑血管疾病是西方发达国家患者死亡和致残的首位原因。动脉粥样硬化可导致心肌缺血和动脉壁基质增厚,单纯收缩压升高、冠脉灌注降低和 LVH,这也是 CKD 患者 CVD 发病率及病死率异常升高的主要原因<sup>[13]</sup>。在 CKD 患者中,缺血性心脏病如心绞痛、心肌梗死和心衰,以及猝死等比较常见<sup>[9]</sup>。动脉粥样硬化主要以斑块形成和闭塞为主,可导致动脉壁基质增厚和心肌缺血,弥漫的粥样硬化可明显增加 CVD 的病死率,并加速肾功能恶化。

VSMC 是构成血管壁结构的重要组成部分,位于血管壁的中膜,是维持血管张力和功能的主要细胞成分,其结构和功能的改变,是多种 CVD 的病理生理学基础。随研究的深入,大家已认识到 VSMC 成为心血管等疾病药物治疗作用中的干细胞之一<sup>[14]</sup>。近年来研究认为 VSMC 凋亡在血管重构、动脉硬化中起着重要作用,在血管重构过程中, VSMC 出现过度增殖,增殖大于凋亡,增殖和凋亡之间的内在平衡关系消失,进而加重血管重构。血管重构、弹性丧失、顺应性降低为动脉硬化的病变形式<sup>[8,15]</sup>。

细胞凋亡由 Kerr 教授在 1972 年根据形态学特征首先提出<sup>[16]</sup>,细胞凋亡是一种主动的、程序性的、细胞固有的生物学过程,是一种由基因控制的细胞自主性死亡方式,又称细胞程序性死亡<sup>[17]</sup>。细胞凋亡是细胞为维持机体自身稳定性而启动的保护性反应。凋亡不同于主要功能性概念的死亡,而是形态学的概念,是细胞程序性死亡的形式之一,与机体正常生理活动的维持、组织器官的发育、某些疾病的发生以及细胞恶变等过程均有密切关系<sup>[18-19]</sup>。近年的研究显示,细胞凋亡始终存在于动脉粥样硬化过程中,凋亡细胞的主要来源是巨噬细胞和 VSMC,凋亡始动因子从线粒体中释放,可直接激活天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3(caspase-3)前

体,引起细胞凋亡<sup>[20]</sup>。其他研究显示,Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 交换器-1(NHE-1)可能通过引起细胞内Ca<sup>2+</sup>浓度增加、bel-2表达降低及bax表达增加而诱导肺动脉平滑肌细胞(PASMCs)凋亡<sup>[21]</sup>。大量凋亡后的VSMC不能被及时清除掉,而发生继发性坏死,使细胞内的脂质释放且堆积形成脂质池,加剧动脉粥样硬化发展的重要因素可能是平滑肌细胞凋亡失调和凋亡小体的清除不足。因此,调节VSMC的增殖、迁移和凋亡就可有效防治动脉粥样硬化等疾病的发生<sup>[16]</sup>。

过去认为瘀血是CKD及慢性肾衰竭(CRF)的基本病机之一,活血化瘀是治疗本病的常用法则。如《素问》治疗水肿大法归纳为:“去菟陈莖,……开鬼门,洁净府”。现代研究运用活血化瘀法治疗,能抑制并延缓肾小球硬化和肾间质纤维化。其药物多用丹参、当归、红花、鸡血藤等,可改善肾脏微循环和肾实质内瘀滞,增加肾血流量,延缓肾衰竭恶化速度,从而改善肾功能<sup>[22]</sup>。朱辟疆等<sup>[23]</sup>以活血化瘀为治则,运用肾衰康治疗5/6肾切除大鼠,结果显示肾衰康可以明显减轻大鼠肾损害,抑制肾间质纤维化,从而延缓CRF进展。傅秀兰等<sup>[24]</sup>在临床中用灯盏花注射液治疗老年CRF患者,结果显示灯盏花注射液在降低血黏度的同时可以改善肾功能。阿达成来提等<sup>[25]</sup>采用复方丹参注射液治疗CRF患者,显示复方丹参注射液通过其活血化瘀、改善微循环的作用,降低尿中白蛋白,对清除血肌酐(SCr)、尿素氮(BUN)有一定的作用。

辛通畅络中药复方是天津中医药大学第一附属医院肾内科依据多年临床经验的积累,结合肾脏疾病的临床表现及其病因病机和传统中医“少阳主枢”、“三焦者决渎之官,水道出焉”等理论建立的以疏利少阳法为主,融益气养阴,清热利湿,辛通畅络、活血化瘀为一体的中药复方制剂。在以往多项研究证实了辛通畅络中药复方对CKD患者心血管疾病病理形态学损害有改善作用<sup>[26-27]</sup>。

本研究显示,随药物浓度增加,VSMC的细胞凋亡率显著增加,提示辛通畅络中药复方能诱导VSMC细胞凋亡,证明该药具有抑制动脉粥样硬化以及血管重构的作用,可以保护心血管、预防CKD患者心血管并发症的发生,减慢CKD患者疾病的进展速度,最终提高CKD患者生存率和生活质量。

## 参考文献

[1] Bleumink GS, Schut AF, Sturkenboom MC, et al. Genetic polymorphisms and heart failure [J]. *Genet Med*, 2004, 6(6): 465-474.  
[2] Drey N, Roderick P, Mullee M, et al. A population-based study

of the incidence and outcomes of diagnosed chronic kidney disease [J]. *Am J Kidney Dis*, 2003, 42(4): 677-684.  
[3] Pasternak RC, Criqui MH, Benjamin EJ, et al. Atherosclerotic Vascular Disease Conference: Writing Group I: epidemiology [J]. *Circulation*, 2004, 109(21): 2605-2612.  
[4] 张路霞,王梅,王海燕.慢性肾脏病的流行病学研究[J].*中华肾脏病杂志*, 2005, 21(7): 425-428.  
[5] 李元,龚文辉.血管重建及影响因素[J].*滁州学院学报*, 2005, 7(1): 117-120.  
[6] Culleton BF, Larson MG, Wilson PW, et al. Cardiovascular disease and mortality in a community-based cohort with mild renal insufficiency [J]. *Kidney Int*, 1999, 56(6): 2214-2219.  
[7] 侯凡凡,马志刚,梅长林,等.中国五省市自治区慢性肾脏病患者心血管疾病的患病率调查[J].*中华医学杂志*, 2005, 85(7): 458-463.  
[8] 张春,邓安国.慢性肾脏病心血管并发症的危险因素与防治[J].*临床内科杂志*, 2008, 25(7): 439-442.  
[9] Cochran BH, Reffel AC, Stiles CD. Molecular cloning of gene sequences regulated by platelet-derived growth factor [J]. *Cell*, 1983, 33(3): 939-947.  
[10] 蔡建芳,李学旺.营养不良-炎症-动脉粥样硬化综合征与慢性肾功能衰竭[J].*国外医学泌尿系统分册*, 2003, 23(2): 198-201.  
[11] 杨保林,王阶,姜燕.冠心病血瘀证研究概况[J].*中国中医药信息杂志*, 2003, 10(7): 86-87.  
[12] Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, et al. Heart disease and stroke statistics--2011 update: a report from the American Heart Association [J]. *Circulation*, 2011, 123(4): e18-209.  
[13] Machado DB, Crow RS, Boland LL, et al. Electrocardiographic findings and incident coronary heart disease among participants in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study [J]. *Am J Cardiol*, 2006, 97(8): 1176-1181.  
[14] 张保亭.抗动脉粥样硬化中药的研究进展[J].*中国中西医结合杂志*, 2003, 23(5): 394-398.  
[15] 张丽,戴勇.慢性肾功能不全患者心血管病变的研究[J].*医学综述*, 2008, 14(2): 243-245.  
[16] Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics [J]. *Br J Cancer*, 1972, 26(4): 239-257.  
[17] 张晓晖,姚天明,黄高昇,等.细胞凋亡的最新研究进展[J].*医学争鸣*, 2002, 23(S1): 42-44.  
[18] 龚非力,沈关心,李卓娅,等.医学免疫学[M].北京:科学出版社, 2001, 261-272.  
[19] Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease [J]. *Science*, 1995, 267(5203): 1456-1462.  
[20] 董月青,黄军华,姚咏明.脓毒症中T淋巴细胞凋亡及其调控研究进展[J].*中国危重病急救医学*, 2004, 16(6): 381-384.  
[21] 陆俊羽,姚伟,钱桂生,等. bel-2、bax 在 NHE-1 核酶基因转染所致缺氧大鼠肺动脉平滑肌细胞凋亡中的作用[J].*中国危重病急救医学*, 2004, 16(7): 394-398.  
[22] 李志军,李银平,王今达.中西合璧蠲短举长——浅析中西医结合治疗慢性肾衰竭的优势与误区[J].*中国中西医结合急救杂志*, 2004, 11(1): 10-12.  
[23] 朱辟疆,韦先进,周逊,等.肾衰康抗肾间质纤维化的实验研究[J].*中国中西医结合急救杂志*, 2003, 10(6): 346-349.  
[24] 傅秀兰,吴建明,陈晓农,等.灯盏花注射液对老年慢性肾功能衰竭患者血液流变性及肾功能影响的观察[J].*中华危重病急救医学*, 1998, 10(5): 21-23.  
[25] 阿达成来提,阿斯亚.复方丹参注射液治疗慢性肾功能衰竭17例[J].*中国中西医结合急救杂志*, 2007, 14(5): 305.  
[26] 杨晓琨.辛通畅络法对FSGS肾病大鼠心血管的重构作用及机制研究[D].天津:天津中医药大学, 2010.  
[27] 支勇.肾苏II对局灶节段性肾小球硬化病理形态及血管活性物质变化的影响[D].天津:天津中医药大学, 2009.

(收稿日期:2015-04-24)(本文编辑:邸美仙 李银平)