

芪黄疽愈方调节 ASO 大鼠炎症细胞因子

孙云朝 郭娜 李德辉 葛建立 马云龙 张欣 苏坤 (河北省中医院 河北 石家庄 050000)

摘要 目的 观察芪黄疽愈方对大鼠肢体动脉硬化闭塞症(ASO)血清炎症因子内皮素(ET)-1、一氧化氮(NO)、白细胞介素(IL)-1 β 及动脉内皮肿瘤坏死因子(TNF)- α 、核因子(NF)- κ B蛋白表达的影响。方法 50只雄性SD大鼠随机分为正常对照组、疾病模型组、芪黄疽愈方高、中、低浓度组,共5组,每组10只,高脂饮食喂饲联合隐动脉内膜损伤的方法建立大鼠ASO模型,造模1w后,予以芪黄疽愈方高、中、低剂量进行干预12w,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测大鼠血清中ET-1、NO、IL-1 β 含量;Western印迹法检测动脉内皮NF- κ B、TNF- α 的蛋白表达水平变化。结果 与疾病模型组比较,芪黄疽愈方各剂量组血清中ET-1、IL-1 β 含量显著降低,NO含量显著升高,动脉内皮NF- κ B、TNF- α 的蛋白表达水平显著下降($P < 0.01$, $P < 0.05$)。结论 芪黄疽愈方可通过抑制炎症反应,保护血管内皮,干预ASO发展的进程。

关键词 肢体动脉硬化闭塞症;芪黄疽愈方;细胞因子

(中图分类号) R285.5; R543.5 (文献标识码) A (文章编号) 1005-9202(2020)09-1945-03; doi: 10.3969/j.issn.1005-9202.2020.09.047

肢体动脉硬化闭塞症(ASO)是外科临床常见病,发病率随年龄增长而逐渐升高,患者早期出现间歇性跛行等下肢缺血的临床表现,病情进一步发展可出现下肢营养障碍,表现为静息痛,直至肢端发生坏死而截肢,降低了患者生活质量。目前ASO治疗有药物治疗、血管介入、手术治疗等,但外科手术移植长期通畅率低,血管介入远期疗效并不肯定,尚缺乏确切理想的治疗方法。中医治疗从病因病机到诊断治疗均有记载,虽疗效尚可,但多不稳定,每易复发,且大多仅为临床经验的总结,尚缺乏系统的科学论证。课题组前期对ASO做了大量临床研究,应用芪黄疽愈方治疗ASO取得满意疗效,并且成功制作了大鼠模型,从实验角度再次证实芪黄疽愈方的治疗作用^[1-3],但其生物学机制仍待进一步明确。芪黄疽愈方治疗ASO可能与调节炎症反应相关细胞因子有关。本研究旨在探讨芪黄疽愈方对ASO大鼠炎症细胞因子的影响。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 清洁级雄性SD大鼠50只(4~6周龄),体重(200 \pm 20)g,由河北医科大学实验动物中心提供。

1.2 饲料制备^[4] 高脂饲料,配比为83.5%基础饲料,5%猪油,1%胆固醇,0.5%胆酸钠及10%蛋黄粉。

1.3 药物及试剂 芪黄疽愈方:黄芪20g、黄精

12g、红花12g、鬼箭羽12g、土鳖虫9g、鸡血藤15g、延胡索12g、牛膝9g、海藻12g,由河北省中医院煎药室煎制,配制成最终浓度分别为0.35g/ml,0.75g/ml,1.5g/ml药液。实验过程中每次中药制剂均按同一标准进行;维生素D₃注射液(江苏吴中苏州制药);大鼠内皮素(ET)-1、白细胞介素(IL)-1 β 试剂盒(欣博盛生物科技有限公司);一氧化氮(NO)试剂盒(武汉华美生物工程有限公司);核因子(NF)- κ B p65抗体、肿瘤坏死因子(TNF)- α 抗体均购自Abcam公司。

1.4 实验分组与造模 50只雄性SD大鼠随机分为正常对照组、疾病模型组、芪黄疽愈方高浓度组、芪黄疽愈方中浓度组、芪黄疽愈方低浓度组,每组10只,正常对照组普通饮食喂养,自由饮水。疾病模型组与芪黄疽愈方各剂量组高脂饲料喂养1w,于清洁动物实验室内用1%戊巴比妥钠(1ml/200g)腹腔注射麻醉;每只大鼠取左后肢消毒,从腹股沟中点向后肢内侧纵行切开皮肤,分离并暴露隐动脉,用动脉夹阻断隐动脉远近端1.5~2.0cm,取胰岛素注射器1支,沿隐动脉血管长轴由远端向近端刺入血管腔,将0.2~0.3ml注射用无菌蒸馏水缓慢注入阻断部位血管,至血管充盈为止,5min后取下针头和动脉夹,压迫止血,缝合切口,内膜损伤模型完成^[4]。后疾病模型组大鼠予以高脂饲料喂养,并在大鼠右下肢肌肉注射维生素D₃针剂(3 \times 10⁵U/kg体重),每隔30d重复1次;造模1w后,给予生理盐水(1ml/100g)灌胃,每日1次,连续12w,自由饮水。芪黄疽愈方各剂量组(高浓度组、中浓度组、低浓度组)大鼠予以高脂饲料喂养,并在大鼠右下肢肌肉注射维生素D₃针剂(3 \times 10⁵U/kg体重),每

基金项目:河北省中医药管理局科研计划项目(2017036)

通信作者:郭娜(1983-),女,硕士,副主任医师,主要从事肿瘤学研究。

第一作者:孙云朝(1981-),男,硕士,主治医师,主要从事周围血管病研究。

隔 30 d 重复 1 次;造模 1 w 后,芪黄疽愈方相应浓度中药灌胃(1 ml/100 g),每日 1 次,连续 12 w,自由饮水。

1.5 检测指标

1.5.1 血清 ET-1、NO、IL-1 β 含量检测 末次给药前禁食 12 h,给药 1 h 后,用 1% 戊巴比妥钠(1 ml/200 g)腹腔注射麻醉,下腔静脉采血约 8 ml,2 500 r/min 离心 5 min 后,分离出血清,用于 ET-1、NO、IL-1 β 检测。检测方法按试剂盒说明书。

1.5.2 动脉内皮 TNF- α 、NF- κ B 蛋白表达水平检测

切取大鼠左后肢隐动脉放入 1.5 ml 的 EP 管中,加裂解液匀浆,离心后吸取上清,4 $^{\circ}$ C 保存备用;配制牛血清白蛋白(BSA)浓度梯度标准液及二喹啉甲酸(BCA)工作液,进行蛋白质定量分析;将提取的蛋白电泳、转膜后,一抗与靶蛋白结合,辣根过氧化物酶标记的二抗与一抗结合;将聚偏氟乙烯(PVDF)膜平铺于保鲜膜上,加入电化学发光(ECL)液避光反应 2 min。采用 Quantity One 成像系统对 PVDF 膜进行灰度扫描,运用 Image Lab 分析软件对各组条带进行分析。

1.6 统计分析 采用 SPSS20.0 软件进行单因素方差分析、*t* 检验。

2 结果

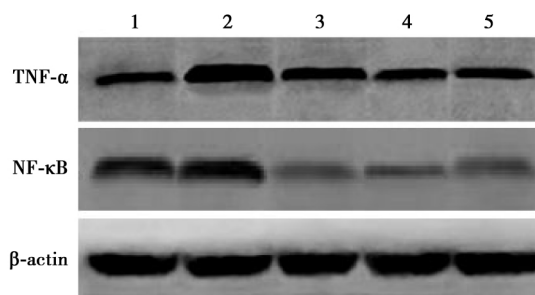
2.1 血清 ET-1、NO、IL-1 β 含量水平变化 与正常对照组比较,疾病模型组血清 ET-1、IL-1 β 含量水平显著升高,NO 水平显著降低(均 $P < 0.01$)。与疾病模型组比较,芪黄疽愈方各剂量组血清 ET-1、IL-1 β 含量水平均显著下降,NO 水平显著升高(均 $P < 0.01$, $P < 0.05$),见表 1。

2.2 动脉内皮 TNF- α 、NF- κ B 蛋白表达水平检测 与正常对照组比较,疾病模型组动脉内皮 TNF- α 、NF- κ B 蛋白表达水平明显升高(均 $P < 0.01$);与疾病模型组比较,芪黄疽愈方各剂量组动脉内皮 TNF- α 、NF- κ B 蛋白表达水平均显著下降($P < 0.01$, $P < 0.05$)。见图 1 及表 2。

表 1 各组血清 ET-1、IL-1 β 含量($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	ET-1 (ng/ml)	NO (mmol/L)	IL-1 β (ng/ml)
正常对照组	32.43 \pm 3.21	30.45 \pm 4.01	12.04 \pm 0.68
疾病模型组	48.26 \pm 3.85 ¹⁾	19.36 \pm 3.78 ¹⁾	45.61 \pm 3.92 ¹⁾
芪黄疽愈方低浓度组	45.12 \pm 3.97 ²⁾	23.45 \pm 3.24 ³⁾	38.47 \pm 3.94 ³⁾
芪黄疽愈方中浓度组	41.03 \pm 3.82 ³⁾	24.97 \pm 3.86 ³⁾	30.53 \pm 3.16 ³⁾
芪黄疽愈方高浓度组	36.83 \pm 3.65 ³⁾	29.64 \pm 4.15 ³⁾	25.84 \pm 2.73 ³⁾

与空白对照组比较: 1) $P < 0.01$; 与疾病模型组比较: 2) $P < 0.05$, 3) $P < 0.01$; 下表同



1: 正常对照组; 2: 疾病模型组; 3: 芪黄疽愈方低浓度组; 4: 芪黄疽愈方中浓度组; 5: 芪黄疽愈方高浓度组

图 1 各组 TNF- α 、NF- κ B 蛋白表达

表 2 各组动脉内皮 TNF- α 、NF- κ B 蛋白表达($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	TNF- α / β -actin	NF- κ B/ β -actin
正常对照组	0.53 \pm 0.18	0.65 \pm 0.17
疾病模型组	0.94 \pm 0.32 ¹⁾	0.97 \pm 0.28 ¹⁾
芪黄疽愈方低浓度组	0.86 \pm 0.30 ²⁾	0.68 \pm 0.21 ²⁾
芪黄疽愈方中浓度组	0.77 \pm 0.24 ²⁾	0.59 \pm 0.15 ³⁾
芪黄疽愈方高浓度组	0.55 \pm 0.21 ³⁾	0.52 \pm 0.13 ³⁾

3 讨论

ASO 是指由于动脉粥样硬化导致下肢供血动脉内膜增厚、管腔狭窄或闭塞,病变肢体血流供应不足,从而使肢体出现一系列缺血症状的慢性进展性疾病,其临床表现包括下肢间歇性跛行、皮温降低、疼痛,乃至发生溃疡或坏死等^[5]。ASO 的发病机制尚不明确,主要有脂质渗透、内膜损伤、血栓形成和平滑肌反应学说,但大多数学者认为内膜损伤对 ASO 的形成作用更为突出^[6]。当血管内皮结构受到损伤时,会出现血管内皮细胞(VEC)内分泌功能的障碍,VEC 分泌的活性物质平衡破坏。病理情况下 VEC 损伤表现为 ET-1 合成和释放增加,具有强烈的缩血管和促细胞增殖作用;而内皮保护因子 NO 分泌水平降低,从而使血管平滑肌处于持续收缩状态。IL-1 又名淋巴细胞刺激因子,主要由活化的单核-巨噬细胞产生,是机体炎症反应的重要介质。IL-1 能够诱发血管内皮细胞活化并分泌 IL-1 β ,使其表达血管细胞黏附分子(VCAM)-1,介导免疫细胞和脂质浸润血管壁形成斑块,在动脉硬化闭塞症形成过程中发挥重要作用。TNF- α 被认为是炎症的关键因子,可通过抑制 VEC 一氧化氮合酶(NOS)活性进而减弱 NO 血管的舒张作用,加速 ASO 发生和进程,在 ASO 的形成机制中也起着关键作用^[7]。NF- κ B 的活化是 ASO 发生的始动机制之一,通过调控炎症细胞因子(TNF- α 、IL-1、IL-6 等)、炎性酶(诱导型 NOS(iNOS)、环氧化酶(COX)-2)、黏附分子

(细胞间黏附分子(ICAM)-1、VCAM-1)、人单核细胞趋化蛋白(MCP)-1等基因表达,在ASO的进程中有着关键性作用。炎症因子不但能导致血管内皮损伤,使NF- κ B活化,而且随着NF- κ B的活化,释放更多的炎症因子,对炎症反应级联放大,进而促使ASO形成^[8]。随着炎症的不断进展,激活白细胞和内皮细胞,使之释放纤维生长因子等生长因子,促进平滑肌细胞变为合成表型,促使其增殖并进入血管内膜,促使动脉粥样硬化形成。

ASO属祖国传统医学“脱疽”范畴。初起肢冷麻木,后期趾节坏死脱落,黑腐溃烂,疮口经久不愈为主要表现。根据中医“营卫气血”、“久病入络”、“久病多瘀”、“久病多虚”等理论,脱疽患者年老体衰,素体气阴不足,气虚无力推动,气血津液不能输布,津凝为痰,血滞为瘀,痰瘀互结为癥,日久最终导致痰瘀阻络,经脉不通而发病。可见,脱疽是气阴两虚为本,经络瘀积瘀结为标,其病位在血脉,为本虚标实之证。因此治疗需以益气养阴、消癥散结、通经活络为主,基于此法自拟芪黄疽愈方,应用于ASO患者的治疗。经过大量的临床观察,芪黄疽愈方使ASO患者循环评分、跛行指数及踝肱比明显改善,近期疗效与西药组无明显差异,但远期疗效明显高于西药组。通过动物实验,初步证实,芪黄疽愈方具

有调节脂质代谢,降低血液黏稠度的作用^[1-3]。

本研究表明芪黄疽愈方可通过抑制炎症反应,保护血管内皮,干预ASO发展的进程。

4 参考文献

- 葛建立,李晓东,张欣,等.芪黄疽愈方对糖尿病肢体动脉闭塞症踝肱指数及跛行指数的影响[J].山东中医杂志,2017;36(5):385-6.
- 张欣,刘远,葛建立,等.芪黄疽愈方对大鼠肢体动脉硬化闭塞症血流变的影响[J].陕西中医,2016;37(3):370-2.
- 张欣,刘远,葛建立,等.芪黄疽愈方对肢体动脉硬化闭塞症大鼠血脂水平的影响[J].河北中医,2016;38(5):725-8.
- 张欣,刘远,葛建立,等.芪黄疽愈方对大鼠肢体动脉硬化闭塞症的实验研究[J].首都医科大学学报,2016;37(3):352-5.
- 常援建,刘秀琴,王宏伟.肢体闭塞性动脉硬化症十例误诊分析[J].中国全科医学,2010;13(13):1475-6.
- 李鑫,李大勇,陈文娜,等.ASO血瘀证血清对血管内皮细胞损伤的影响及桃红四物汤的调节作用[J].中国中西医结合杂志,2015;35(11):1373-7.
- 李广平,李大勇.动脉硬化闭塞症中医证候与血清hsCRP、TNF- α 表达的研究[J].中华中医药学刊,2013;31(8):1619-20.
- 曲畅,吴云红,穆靖洲,等.核转录因子 κ B在缺氧导致的炎症中的作用[J].生理科学进展,2018;49(1):39-43.

(2019-04-05 修回)

(编辑 王一涵)

培哌普利和螺内酯对大鼠糖尿病肾病水通道蛋白表达的影响

莫娜 王正义 童丽灵 (海口市人民医院内科,海南 海口 571100)

(摘要) 目的 探讨培哌普利和螺内酯对糖尿病肾病水通道蛋白(AQP)表达的影响。方法 雄性SD大鼠72只,建立由链脲佐菌素(STZ)所诱导的糖尿病肾病大鼠模型。将造模成功的48只随机分为模型组、培哌普利组、螺内酯组、培哌普利联合螺内酯组,每组大鼠12只,正常组大鼠12只。模型组和正常组腹腔注射等剂量生理盐水灌胃;培哌普利组给予2 mg/(kg·d)培哌普利灌胃;螺内酯组给予50 mg/(kg·d)螺内酯灌胃;培哌普利联合螺内酯组给予2 mg/(kg·d)培哌普利+50 mg/(kg·d)螺内酯灌胃。连续8 w。结果 模型组、培哌普利组、螺内酯组和培哌普利联合螺内酯组空腹血糖(FPG)、血肌酐、24 h尿蛋白量、尿液AQP1、AQP2、AQP3、AQP4含量及AQP1、AQP2、AQP3、AQP4表达灰度值明显高于正常组($P < 0.05$);培哌普利组、螺内酯组和培哌普利联合螺内酯组FPG、血肌酐、24 h尿蛋白量、尿液AQP1、AQP2、AQP3、AQP4含量及AQP1、AQP2、AQP3、AQP4表达灰度值明显低于模型组($P < 0.05$);培哌普利联合螺内酯组FPG、血肌酐、24 h尿蛋白量、尿液AQP1、AQP2、AQP3、AQP4含量及AQP1、AQP2、AQP3、AQP4表达灰度值明显低于培哌普利组、螺内酯组($P < 0.05$)。结论 培哌普利和螺内酯对糖尿病肾病大鼠肾脏具有一定保护作用,且机制可能与降低尿液AQP水平及抑制肾组织AQP表达有关。

(关键词) 培哌普利;螺内酯;糖尿病肾病;水通道蛋白

(中图分类号) R587.2 (文献标识码) A (文章编号) 1005-9202(2020)09-1947-04; doi: 10.3969/j.issn.1005-9202.2020.09.048

基金项目:2016年海南省卫生计生行业科研项目(1601320114A2003)

通信作者:王正义(1963-),男,副主任医师,主要从事临床研究。

第一作者:莫娜(1985-),女,主治医师,主要从事内、全科研究。

糖尿病肾病是常见的慢性肾脏疾病之一,会逐渐导致肾功能障碍^[1]。糖尿病肾病常见特征是肾小球滤过屏障受损导致持续蛋白尿。临床上糖尿病