

• 实验研究 •

消融稳斑胶囊对动脉粥样硬化大鼠血管内皮细胞 AMPK 蛋白及血清 TNF- α 、IL-6、CRP 表达的影响*

孙晓泽¹, 邵静²

1. 河南省中医院, 河南 郑州 450002; 2. 河南中医学院第一附属医院, 河南 郑州 450000

摘要:目的: 观察消融稳斑胶囊对动脉粥样硬化大鼠血管内皮细胞 AMP 激活蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK) 蛋白表达及血清肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP) 表达的影响, 并探讨消融稳斑胶囊改善不稳定心绞痛的分子机制。方法: 48 只 Wistar 大鼠, 随机分为空白组、模型组、瑞舒伐他汀组及消融稳斑胶囊组。观察大鼠给药前后 IL-6、TNF- α 、CRP 等炎症因子的浓度, 并采用 Western blot 方法测定大鼠血管内皮细胞的 AMPK 蛋白表达量。结果: 消融稳斑胶囊能明显降低血清 TNF- α 、CRP 水平, 并与瑞舒伐他汀组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 消融稳斑胶囊能明显降低血清 IL-6 水平, 并与瑞舒伐他汀效果相当; 模型组 AMPK 表达明显高于空白组($P < 0.01$); 与模型组比较, 瑞舒伐他汀组、消融稳斑胶囊组能明显降低 AMPK 表达($P < 0.01$)。结论: 消融稳斑胶囊可以降低动脉粥样硬化大鼠的血清炎症因子水平, 同时增加血管内皮细胞 AMPK 蛋白表达。

文献引用: 孙晓泽, 邵静. 消融稳斑胶囊对动脉粥样硬化大鼠血管内皮细胞 AMPK 蛋白及血清 TNF- α 、IL-6、CRP 表达的影响[J]. 中医学报, 2015, 30(7): 993-995.

关键词: 消融稳斑胶囊; 动脉粥样硬化; AMP 激活蛋白激酶; 肿瘤坏死因子- α ; 白细胞介素-6; C 反应蛋白; 大鼠

DOI: 10.16368/j.issn.1674-8999.2015.07.343

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-8999(2015)07-0993-03

Effect of Xiaorong Wenban Capsule on Vascular Endothelial Cells AMPK Protein Serum TNF- α ,IL-6 and CRP Expression

SUN Xiaoze¹, SHAO Jing²

1. Henan Traditional Chinese Medicine Hospital Zhengzhou Henan China 450002; 2. The First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine Zhengzhou Henan China 450000

Abstract: Objective: To observe the effect of Xiaorong Wenban Capsule on vascular endothelial cells AMPK protein expression serum TNF- α ,IL-6 and CRP expression and explore its molecular mechanisms in improving unstable angina pectoris. Methods: 48 Wistar rats were randomly divided into blank group ,model group ,rosuvastatin group and Xiaorong Wenban group. Observed the IL-6 ,TNF- α ,CRP , and expression of AMPK protein of rats before and after the administration and detect the vascular endothelial cell AMPK protein by western blot method. Results: Xiaorong Wenban Capsule can significantly decrease the levels of serum TNF- α and CRP ,compared with Rosuvastatin group ,the difference was statistically significant($P < 0.05$) . Xiaorong Wenban Capsule can significantly decrease the serum IL-6 ,correspondent to rosuvastatin group; model group AMPK expression was obviously higher than that of control group ($P < 0.01$) . Compared with model group ,rosuvastatin group ,Xiaorong Wenban capsule group can significantly reduce AMPK expression ($P < 0.01$) . Conclusion: Xiaorong Wenban Capsule can reduce the level of serum inflammatory factors in atherosclerotic rats ,while increasing the expression of AMPK protein in vascular endothelial cells.

Reference citation: SUN Xiaoze ,SHAO Jing. Effect of Xiaorong Wenban Capsule on Vascular Endothelial Cells AMPK Protein Serum

* 基金项目: 河南省科技攻关课题(122102310079)

TNF- α , IL-6 and CRP Expression [J]. China Journal of Chinese Medicine 2015, 30(7):993-995.

Key words: xiaorong wenban capsule; atherosclerosis; AMP activated protein kinase; tumor necrosis factor- α ; interleukin 6; C reactive protein; rat

近年来研究显示,动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种慢性炎症过程,AMP激活蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)及炎症因子在AS的发生发展过程中起重要作用^[1-2]。因此,有效抑制炎症介质作用途径将是治疗AS的方法之一。消融稳斑胶囊治疗不稳定心绞痛效果较好,但是其机制和信号通路尚不明确。本研究观察消融稳斑胶囊对大鼠炎症损伤内皮细胞AMPK及血清肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、C反应蛋白(C-reactive protein, CRP)等炎症因子的影响,旨在为临床防治AS提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验药物 消融稳斑胶囊组方:黄芪、葛根、半夏、水蛭、佛手、郁金、地龙、甘松等,功能:益气活血、化痰通络。水蛭、郁金、地龙等粉碎成细粉;佛手、甘松分别水蒸汽蒸馏,收集挥发油,各另器存放备用。药渣与黄芪、葛根、半夏加水蒸煮2次,每次1h,合并煎液,过滤,滤液减压浓缩至相对密度1.30~1.35(60℃)的稠膏,加入水蛭、郁金、地龙细粉混匀、干燥,粉碎成细粉,喷入佛手、甘松挥发油,装入胶囊,即得。

瑞舒伐他汀钙片购自美国阿斯利康制药有限公司(批号:H20060406),研磨后用生理盐水配置成悬液。

1.2 主要试剂 TNF- α 、IL-6及CRP测定试剂盒(青岛昊航科贸有限公司);HRP标记的山羊抗兔二抗(cw0103,北京康为世纪);预染的蛋白分子量标准(SM1811 Fermentas), GAP-DH单抗(武汉博士德生物有限公司),电泳仪、电泳槽、转移仪、转移槽(BioRad),UV-2450紫外分光光度计,PVDF膜(德国Merck),96孔板(美国Coring)。

1.3 实验动物 清洁级雄性Wistar大鼠48只,体质量140~160g,河南中医学院第一附属医院中心实验室提供,分笼饲养,每笼5只,自由给水。随机分为空白组10只及造模组36只。空白组给予普通饮食喂养,造模组给予高脂饮食喂养(含21%脂肪、0.15%胆固醇),喂养8周后开始实验,将造模组随机分为模型组、瑞舒伐他汀组及消融稳斑胶囊组,每组12只。

1.4 指标检测

1.4.1 血清IL-6、TNF- α 、CRP分析 采用ELISA法测定大鼠血清TNF- α 、IL-6、CRP的含量,均按照试剂盒说明书进行,采用紫外分光光度计测定其吸光度。

1.4.2 血管内皮细胞收集 大鼠颈椎脱臼处死,无菌条件

下分离主动脉,迅速用生理盐水冲洗干净,纵向剪开管腔,将血管外翻,使内膜暴露出来,剪成直径约0.1cm的小块,放置于体积分数10%胎牛血清培养皿中,放入37℃,体积分数5%CO₂培养箱培养,用体积分数20%FBS的培养液漂洗2次,用胰蛋白酶消化法消化细胞,重新接种于培养瓶中,培养3代后使用。

1.4.3 Western blot法检测各组AMPK表达量 处理后的各组细胞用预冷的PBS冲洗2次,加入细胞裂解液5min,于12000r·min⁻¹低温离心15min(离心半径7cm),蛋白上样量为50 μ g,常规SDS-PAGE电泳,电泳结束后电转移到PVDF膜,在质量浓度5%脱脂奶粉封闭液中封闭1h,加一抗(1:1000稀释),4℃过夜孵育。洗涤后加入二抗(1:2000)室温下孵育1h。加入适量ECL底物反应5min,显影、曝光,采用凝胶成像分析仪对条带进行定量,确定目的条带灰度值。

1.5 统计学方法 数据采用SPSS 20.0软件包进行分析,结果以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用单因素方差分析进行组间比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

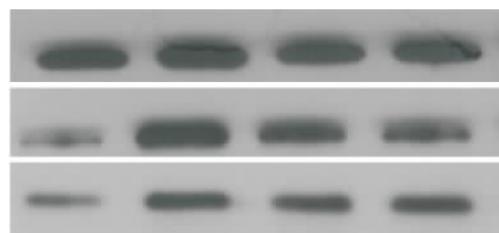
2.1 各组大鼠血清TNF- α 、IL-6、CRP水平比较 见表1。

表1 各组大鼠血清TNF- α 、IL-6、CRP水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TNF- α (ρ /ng·L ⁻¹)	IL-6(ρ /ng·L ⁻¹)	CRP(ρ /mg·L ⁻¹)
模型组	12	128.38 \pm 7.38 \blacktriangle^*	29.120 \pm 2.543 \blacktriangle^*	4386.78 \pm 208.61 \blacktriangle^*
空白组	10	50.42 \pm 7.14 \triangle	12.679 \pm 2.518 \triangle^*	732.45 \pm 211.43 \triangle^*
瑞舒伐他汀组	12	64.43 \pm 9.14 \triangle	20.159 \pm 1.657 \triangle^*	2157.18 \pm 217.05 \triangle^*
消融稳斑胶囊组	12	122.38 \pm 4.15 $\triangle^*\blacktriangle^*$	21.568 \pm 2.115 $\triangle^*\blacktriangle^*$	2595.90 \pm 196.58 $\triangle^*\blacktriangle^*$

注:与模型组比较, $\triangle P < 0.01$;与空白组比较, $\blacktriangle P < 0.01$;与瑞舒伐他汀组比较,* $P < 0.05$,# $P > 0.05$

2.2 各组大鼠AMPK蛋白表达的比较 见图1,表2。



注:条带自左向右为模型组,空白组,瑞舒伐他汀组,消融稳斑胶囊组

图1 各组大鼠AMPK蛋白表达电泳图

表2 各组大鼠 AMPK 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	蛋白条度灰度比值
模型组	12	4.880 6 ± 0.167 6 ^{☆ #}
空白组	10	1.577 7 ± 0.168 2 [*]
瑞舒伐他汀组	12	1.756 5 ± 0.087 2 [*]
消融稳斑胶囊组	12	2.337 3 ± 0.221 2 ^{☆ ** #}

注:与模型组比较,☆ $P < 0.01$;与空白组比较,* $P < 0.01$;与瑞舒伐他汀组比较,# $P < 0.01$

3 讨论

冠心病心绞痛是中老年人的常见病^[3],多因冠状动脉粥样硬化、冠状动脉功能性改变以及冠状动脉狭窄导致心肌短暂性缺血缺氧而引起的临床综合征^[4],属于中医学“胸痹”“真心痛”范畴^[5]。中医学认为,本病病位在心,气虚血瘀痰阻是冠心病发病的主要病机之一^[6]。《罗氏会约医镜》有“气不虚不阻”之说,气虚率血无力亦致血液运行受阻,从而形成痰瘀交阻,亦即现代医学所说的脂质斑块沉积。因此,益气活血化痰法是临床治疗冠心病的重要方法之一^[7]。

炎症反应与冠心病的发生和发展密不可分,多种炎症因子参与了冠状动脉粥样硬化病变过程,在炎症反应过程中,AMPK起了重要作用。AMPK广泛存在于生物体内,对细胞能量代谢、生长分化等发挥关键作用,是一种极其重要的蛋白激酶,可明显抑制核因子 κB 的活性及炎症因子的表达^[8]。而中医学将这些症状归纳得出的“气虚血瘀痰阻”证候。因此,益气活血化痰法的治疗效果与这些炎症因子的表达强弱密切相关。消融稳斑胶囊全方由黄芪、葛根、半夏、水蛭、甘松、佛手、郁金、地龙等药物组成。方中以黄芪、葛根为君,黄芪为补气要药,有补益心气、扶正固本之功;现代药理研究认为黄芪可改善微循环^[9]。葛根味甘、辛,性平,归脾胃经,《本草拾遗》云:“生者破血。”取其祛瘀和脉之功,二者合用能补气行血,祛瘀通络,使气旺血行,经络通畅。臣以水蛭、郁金、地龙活血化痰通络;郁金具活血通脉之功,地龙有行经通络之功;水蛭“性迟缓善入,迟缓则生血不伤,善入则坚积易破”活血而不耗血;另以半夏化痰浊。佐佛手、甘松行气以助化痰消瘀,佛手性阴柔,行气而不伤阴;甘松甘温,入脾胃,理气醒脾和胃;一则调理气机,疏解壅滞,使气血调畅,补而不滞;二则甘松有活络通经止痛作用,佐主辅药以疏理气血。诸药相伍,使心气得补,瘀血痰浊得化。本研究中,模型组较空白组TNF- α 、IL-6、CRP水平明显升高,说明局部炎症细胞大量聚集可能是产生血瘀证候的物质基础。消融稳斑胶囊组的TNF- α 、IL-6、CRP水平表达较模型组降低,提示益气活血化痰的作用效果确与减轻炎性细胞聚集、延缓局部炎性反应相关,其机制可能与调节AMPK蛋白表达有关。

参考文献:

- [1] O' Neill LA, Hardie DG. Metabolism of inflammation limited by AMPK and pseudo-starvation [J]. Nature, 2013, 493 (7432): 346 - 355.
- [2] Hawley SA, Fullerton MD, Ross FA, et al. The ancient drug salicylate directly activates AMP-activated protein kinase [J]. Science, 2012, 336 (6083): 918 - 922.
- [3] 杨健, 胡运军. 胸痹病因病机探析 [J]. 河南中医, 2013, 33 (7): 1062 - 1063.
- [4] 杜来福. 中西医结合治疗胸痹心痛 20 例 [J]. 河南中医, 2012, 32 (6): 748 - 749.
- [5] 刘静, 李创业. 活血养心汤治疗胸痹临床研究 [J]. 中医学报, 2012, 27 (7): 901 - 902.
- [6] 常建保. 川芎嗪注射液治疗冠心病心绞痛 21 例 [J]. 河南中医, 2009, 29 (8): 817.
- [7] 胡燕明, 蔡海坚, 毛小琼. 麝香保心丸治疗冠心病心绞痛伴高血脂血症临床研究 [J]. 中医学报, 2013, 28 (12): 1637 - 1638.
- [8] Yang Z, Kahn BB, Shi H, et al. Macrophage $\alpha 1$ AMP-activated protein kinase ($\alpha 1$ AMPK) antagonizes fatty acid-induced inflammation through SIRT1 [J]. J Biol Chem, 2010, 285 (25): 19051 - 19059.
- [9] 黄天军. 血府逐瘀汤加减治疗胸痹心痛临床研究 [J]. 中医学报, 2013, 28 (2): 253 - 254.

收稿日期: 2015 - 03 - 11

作者简介: 孙晓泽 (1981 -), 女, 河南洛阳人, 医学博士, 主治医师, 研究方向: 糖尿病及其并发症。

通信作者: 邵静 (1963 -), 女, 河南郑州人, 医学学士, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向: 中医药防治老年病。

Email: shaojing1390@163.com

编辑: 秦小川

郑重声明

本刊对所有来稿有审查、校正、删改权及数字化文献版权, 凡向本刊投稿, 即视为自动出让上述权力; 此外, 来稿在本刊发表后将被相关数据库全文收录, 如不同意删改和被其他数据库收录, 请在来稿时注明, 我们将做适当处理。

特此声明

《中医学报》编辑部 敬启