

雪莲通脉丸对冠心病气虚血瘀证小鼠血管内皮细胞功能相关指标 ET-1、NO、ACE 的影响

秦 汉,胡志希*,李 琳,吕 佳,杨 杨,张 易
(湖南中医药大学,湖南 长沙 410208)

[摘要] **目的** 观察雪莲通脉丸对冠心病气虚血瘀证小鼠内皮素-1(ET-1)、一氧化氮(NO)和血管紧张素转换酶(ACE)的调节作用。**方法** 建立冠心病气虚血瘀证小鼠模型,随机分为空白对照组、模型对照组、地奥心血康组和雪莲通脉丸组。给药4周后取小鼠血清,ELISA试剂盒测定 ET-1、NO 和 ACE 浓度。**结果** 与模型组比较,雪莲通脉丸组 NO 浓度显著升高,差异具有统计学意义($P<0.01$);ET-1 浓度降低,差异具有统计学意义($P<0.05$);ACE 浓度显著降低,差异具有统计学意义($P<0.01$)。与地奥心血康组比较,雪莲通脉丸组 NO 浓度显著升高,ACE 浓度显著降低,差异具有统计学意义($P<0.01$)。**结论** 冠心病气虚血瘀证的发生可能与血管内皮细胞的功能指标具有相关性。其中,冠心病气虚血瘀证可能与血清 ET-1、ACE 浓度呈正相关、与血清 NO 浓度呈负相关。雪莲通脉丸对冠心病气虚血瘀证小鼠血管内皮细胞的功能指标具有调节作用,其机制可能与升高血清 NO 浓度、降低 ET-1、ACE 浓度有关,且与地奥心血康组比较在改善血清 NO、ACE 方面具有一定优势。

[关键词] 雪莲通脉丸;气虚血瘀证;冠心病;内皮素-1;一氧化氮;血管紧张素转换酶;天山雪莲;西洋参;肉苁蓉

[中图分类号]R285.5

[文献标识码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2016.02.007

Effects of Xuelian Tongmai Pill on Vascular Endothelial Cell Function-Related Marker ET-1, NO and ACE in Coronary Heart Disease Mice Models with Qi Deficiency and Blood Stasis Syndrome

QIN Han, HU Zhixi*, LI Lin, LV Jia, YANG Yang, ZHANG Yi

(Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] **Objective** To observe the regulatory effects of Xuelian Tongmai Pill (XTP) on endothelin-1 (ET-1), nitric oxide (NO) and angiotensin converting enzyme (ACE) in coronary heart disease mice models with Qi deficiency and blood stasis syndrome. **Methods** Coronary heart disease mice models with Qi deficiency and blood stasis syndrome were established and then distributed to blank control group, model control group, Di'ao Xinxuekang group and XTP group. Serum of each group were picked after four weeks. The concentration of ET-1, NO and ACE were measured by ELISA. **Results** Compared with model group, concentration of NO was highly elevated with statistical significance ($P<0.01$); ET-1 was decreased with statistical significance ($P<0.05$); ACE was prominently decreased with statistical significance ($P<0.01$). Compared with Di'ao Xinxuekang group, the concentration of NO was highly increased, while ACE was significantly decreased, the differences have statistical significance ($P<0.01$). **Conclusion** Morbidity of coronary disease with Qi deficiency and blood stasis syndrome may be related to the indicators of vascular endothelial cell function. Qi deficiency and blood stasis syndrome Serum concentration of showed positive relations with ET-1 and ACE, while negative relation with NO concentration. XTP showed regulatory function on the indicator of vascular endothelial cell function. The mechanism may be related to the increasing of serum concentration of NO and decreasing of ET-1 and ACE. In addition, XTP showed more advantages in

[收稿日期]2015-09-17

[基金项目]国家自然科学基金项目(81373550);湖南省大学生研究性学习和创新性实验项目(2014-201)。

[作者简介]秦 汉,男,中医学七年制在读。

[通讯作者]* 胡志希,教授,博士研究生导师,E-mail:515800272@qq.com。

improving serum NO and ACE concentration.

[**Keywords**] Xuelian Tongmai Pill; Qi deficiency and blood stasis syndrome; coronary heart disease; endothelin-1; nitric oxide; angiotensin converting enzyme; *Saussurea involucre*; American ginseng; *Cistanche salsa*

冠心病是严重危害人类健康的常见病,其发病率、病死率、住院率呈迅速上升趋势^[1]。冠心病始于冠状动脉粥样硬化,继而产生管腔狭窄或闭塞,导致心肌缺血缺氧。研究证实:气虚血瘀型冠心病存在血管内皮功能异常,并贯穿其发生发展过程的始终^[2]。内皮素-1(ET-1)和一氧化氮(NO)是由血管内皮细胞合成的一对具有拮抗效应的活性物质,是反映血管内皮细胞功能的常用指标。两者的比例失衡加剧了冠心病的病情发展。血管紧张素转换酶(ACE)活性的异常增强,使其产物血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)水平升高,导致血管内皮细胞功能障碍、冠状动脉痉挛等病理过程的发生。

雪莲通脉丸系名老中医验方,由天山雪莲等20余味中草药组成,临床应用多年,可改善心肌供血状态^[3]。本研究从病证结合的角度入手,通过观察雪莲通脉丸对冠心病气虚血瘀证小鼠血清ET-1、NO和ACE水平的干预作用,探究其防治冠心病的作用机制,为临床应用提供实验佐证。

1 材料与方

1.1 实验材料

1.1.1 受试药物 雪莲通脉丸由天山雪莲、西洋参、首乌、槐米、牛膝等20余味中草药组成,由乌鲁木齐市中医院及国药集团新疆制药有限公司联合配制而成。批号:140112,规格:每丸重约0.2 g、60 g/瓶,用时以蒸馏水溶散为质量分数200 mg/mL的悬浊液;地奥心血康胶囊,成都地奥制药有限公司产品,批号:1407011,规格:每粒含地奥心血康100 mg、20粒/盒,用时以蒸馏水配制成6 mg/mL的悬浊液。

1.1.2 动物 昆明小鼠60只,雄性,5~8周龄,体重18~20 g,SPF级,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,许可证号:SCXK(湘)2013-0004。

1.1.3 主要试剂、仪器 NO试剂盒,南京建成生物工程研究所提供,批号:20141230。ET-1、ACE试剂盒,武汉华美生物工程有限公司提供,批号:G05031688,E24031686。KDC-2044低速冷冻离心机,科大创新股份有限公司中佳分公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 造模第一阶段(气虚血瘀证模型) 参照文献^[4-6],采用“游泳+饥饿+高脂饮食”的复合方法诱导小

鼠气虚血瘀证模型。空白对照组给予正常饮食,模型对照组和2个治疗组运用游泳法使小鼠达到力竭状态,给予饥饿喂养,食量为正常小鼠每日摄食量的60%,饲料为高脂饲料,造模周期为6周。

1.2.2 造模第二阶段(心肌缺血模型) 气虚血瘀证造模周期结束后,进行心肌缺血模型的复制^[7]。3个造模组按20单位/kg剂量腹腔注射垂体后叶素,空白对照组注射等体积的蒸馏水,每日注射一次。2周后,从四组中分别随机抓取小鼠,乌拉坦1 μg/g麻醉后用心电图机记录小鼠的心电图,通过软件记录数据,观察心率和T波高度变化来判断心肌缺血造模是否成功。

1.2.3 验证模型 (1)行为学特征:造模组小鼠表现出倦怠少动,活动无力,毛发枯槁、稀疏脱落等。对照组小鼠则活动自如,毛色洁白光泽,未见其他异常表现;(2)血液流变学:造模组小鼠高、中、低切变率的全血粘度均显著高于或低于对照组,造模组的血浆粘度高于对照组;(3)心肌缺血模型验证:造模组小鼠心率增快,心电图示T波低平或倒置。综上所述,以心电图的表现定位在心,血液流变学指标的改变定性为血瘀,结合行为特征的改变定性为气虚,则冠心病气虚血瘀证小鼠模型复制成功。

1.2.4 动物分组 60只小鼠根据随机数字表法随机抽取15只作为空白对照组,对其余45只小鼠进行冠心病气虚血瘀证模型的制作。造模成功后,根据随机数字表法将其随机分为模型对照组、地奥心血康组和雪莲通脉丸组。

1.2.5 给药方法 小鼠每日在同一时间段以药液或蒸馏水灌胃,给药剂量按小鼠体表面积折算法计算^[8]。雪莲通脉丸组按2.7 g/(kg·d)剂量灌胃,地奥心血康组按0.09 g/(kg·d)剂量灌胃,模型组和空白对照组小鼠予蒸馏水灌胃,均为1次/d,连续给药4周。

1.3 指标检测 给药4周后,立即行小鼠眶周静脉取血,血液不经任何处理,于室温放置。低温下3 000 r/min离心15 min,取上层血清检测ET-1、NO和ACE含量。NO测定采用硝酸还原酶法,ET-1、ACE测定均采用酶联免疫吸附实验(ELISA法),操作严格按照试剂盒说明进行。

1.4 统计学分析

数据采用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,运用 SPSS 22.0 软件包进行统计分析,两组比较用两独立样本 T 检验法,多组比较采用方差分析,方差齐时,组间比较采用 S-N-K 法(即 q 检验法);方差不齐时,选择 Tamhane's T_2 法进行组间比较。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 动物存亡情况

按照造模方法“1.2.1”“1.2.2”,截止至第 8 周,死亡 8 只,死亡率 18%,造模小鼠达到冠心病气虚血瘀证模型标准的共 27 只,造模成功率 73%。将造模成功的小鼠随机分为模型组、地奥心血康组和雪莲通脉丸组,共 3 组,每组 9 只。各组分别灌胃 4 周后,模型组死亡 2 只,地奥心血康组和雪莲通脉丸组各死亡 1 只。

2.2 冠心病气虚血瘀证小鼠模型验证

2.2.1 行为学特征 造模 8 周后,与空白组比较,模型组小鼠倦怠少动,对抗性减弱,毛发稀疏脱落。

2.2.2 血液流变学 造模 8 周后,与空白组比较,模型组小鼠全血粘度(高、中、低切变率)值显著升高($P<0.01$);血浆粘度值升高($P<0.05$)。以上说明模型组小鼠血液呈浓、黏的异常状态,结合行为学特征表明模型组小鼠已经达到气虚血瘀证的病理状态。见表 1。

表 1 两组小鼠血液流变学指标比较 ($\bar{x}\pm s$,mpa/s)

组别	n	全血粘度			血浆粘度
		高切	中切	低切	
空白组	15	4.55±0.06	6.04±0.42	18.09±1.95	2.23±0.10
模型组	27	9.15±0.16 ^{##}	10.94±0.17 ^{##}	28.00±0.28 ^{##}	3.11±0.10 [#]
F 值		1948.39	341.17	38.97	197.49
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与空白组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

2.2.3 心肌缺血模型 造模 8 周后,与空白组比较,模型组小鼠心率增快($P<0.05$)、心电图示 T 波高度明显降低($P<0.01$)。说明模型组小鼠已经达到心肌缺血的病理状态。见表 2。

表 2 两组小鼠心电图 T 波高度和心率对比 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	心率(次/min)	T 波幅度(mV)
空白组	15	375.38±37.74	0.278±0.089
模型组	27	402.89±38.32 [#]	0.138±0.118 ^{##}
F 值		35.93	53.41
P 值		<0.001	<0.001

注:与空白组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

2.3 各组小鼠血清血管内皮细胞功能相关指标 ET-1、NO、ACE 对比

2.3.1 ET-1 含量比较 与模型组比较,地奥心血康组、雪莲通脉丸组小鼠血清 ET-1 浓度均降低,差异具有统计学意义($P<0.05$)。与地奥心血康组比较,雪莲通脉丸组差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 3。

2.3.2 NO 含量比较 与模型组比较,雪莲通脉丸组浓度显著升高,差异具有统计学意义($P<0.01$),而地奥心血康组无显著差异($P>0.05$)。见表 3。

2.3.3 ACE 含量比较 与模型组比较,雪莲通脉丸组浓度显著降低,差异具有统计学意义($P<0.01$),而地奥心血康组无显著差异($P>0.05$)。见表 3。

表 3 各组血管内皮细胞功能相关指标 ET-1、NO、ACE 浓度比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	ET-1(pg/mL)	NO(μ mol/L)	ACE(ng/mL)
空白对照组	9	182.5±1.8	48.51±3.09	309.5±1.3
模型对照组	7	200.4±3.2	31.57±4.75	422.9±15.9
地奥心血康组	8	185.6±3.1 [△]	31.19±1.14	408.3±22.7
雪莲通脉丸组	8	190.2±3.0 [△]	45.39±6.10 ^{△△**}	311.3±13.9 ^{△△**}
F 值		76.4	46.70	154.6
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注:与模型组比较 $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$;与地奥心血康组比较,** $P<0.01$ 。

3 讨论

中医学认为,冠心病属“胸痹”“心痛”“真心痛”的范畴。东汉著名医家张仲景在《金匮要略·胸痹心痛短气病脉证治第九》中认为冠心病的基本病机为“阳微阴弦”,证属本虚标实,虚实夹杂。研究表明:气虚血瘀是冠心病中医证型中较为常见的类型,气虚是本虚中最常见的证候要素,血瘀是标实中最常见的证候要素^[9]。

血管内皮细胞功能失调不仅被认为是冠状动脉粥样硬化的起始环节,而且与冠心病的发生、发展相关。血管内皮细胞功能障碍可用血浆标志物来评价,其血浆标志物的高低与冠心病病情变化相关^[10]。其中,ET-1 和 NO 是一对反映血管内皮细胞功能的常用指标。在冠心病的领域中,目前的研究证实内皮素可致冠状动脉强烈痉挛,具有心肌细胞毒性作用和致心律失常作用^[11-12]。故有理由认为,内皮素活性的异常升高对于心肌缺血甚至心肌梗塞的发生有重要意义。NO 为血管舒张因子,是由 L-精氨酸(L-Arg)和分子氧在 NO 合成酶(NOS)催化下生成的^[13]。ET-1 和 NO 两者的比例失衡导致冠脉管腔变窄,加重心肌缺血缺氧,使冠心病的病情趋于恶化。肾素—血管紧张素系统(RAS)是冠心病发生发展的主要机制

之一,ACE是该系统的重要生物活性肽,通过其产物AngII发挥重要的生物学效应^[14]。RAS系统的过度激活,ACE活性增强,使其产物Ang II水平升高,充分发挥AngII的生物学效应^[15],诱发冠脉痉挛等病理过程。因此,改善血管内皮细胞功能目前已成为冠心病治疗研究中的一个重要靶点。本次研究通过复制冠心病气虚血瘀证小鼠模型,观察了雪莲通脉丸对其血清ET-1、NO和ACE的调控作用,结果显示:与模型组比较,雪莲通脉丸组NO浓度显著升高、ET-1浓度降低、ACE浓度显著降低;与地奥心血康组比较,雪莲通脉丸组NO浓度显著升高、ACE浓度显著降低。由此推测冠心病气虚血瘀证的发生可能与血管内皮细胞的功能状态具有相关性。其中,冠心病气虚血瘀证可能与血清ET-1、ACE浓度呈正相关、与血清NO浓度呈负相关。即血管内皮细胞功能相关指标ET-1、NO、ACE浓度的改变可能会使冠心病气虚血瘀证的病理状态向顺或向逆发展。同时,雪莲通脉丸在改善冠心病气虚血瘀证小鼠血清ET/NO的失衡、一定程度抑制ACE的生成方面起到了作用,证明其可能通过逆转小鼠血管内皮细胞的损伤、抑制冠脉收缩、改善心肌供血供氧等途径来达到治疗效果;并且较地奥心血康组在改善血清NO、ACE方面存在一定的优势,显示了中医药辨证论治的优势。

心主血脉,“心气”支配心脏发生规律性变化,从而完成心脏推动血液循环的功能,故冠心病多用活血化瘀和芳香温通法治疗。然而,单用活血化瘀药易伤正气,应配合使用温阳补气的治法,能体现“补气不壅塞,化瘀不伤正”的治疗理念^[16]。基于这一临证思路,乌鲁木齐市中医医院根据本院名老中医蒋贤达先生的有效验方研制出了雪莲通脉丸这一自创方药。该方由天山雪莲、西洋参、肉苁蓉、何首乌、槐米、红花等20余味中草药组成,方中西洋参大补元气,首乌、肉苁蓉补肝肾、益精血以治本;天山雪莲配伍川芎、葛根、益母草、水蛭、血竭等活血化瘀以治标。诸药合用,标本兼治,补气而不壅滞,化瘀而不伤正,从而改善气虚血瘀这一病理状态。临床上主要用于改善冠心病患者的临床症状,改善心肌供血状态,获得了较好的疗效^[3]。现代药理研究已证实,雪莲通脉丸组成药物如川芎、西洋参等对血管内皮细胞的增殖具有明显促进作用^[17],说明其可能通过促进内皮细胞的增殖来改善冠脉的收缩/舒张状态,进而改善心肌缺血状态。同时,本方所用活血化瘀类药物如益母草、红花、土鳖虫、水蛭、血竭等具有扩张

冠状动脉、增加冠状动脉血流量和保护冠状动脉血管内皮细胞等作用^[16]。因此,改善血管内皮细胞功能、抑制冠脉收缩、增加冠脉血流量、改善心肌供血供氧等综合效应很可能是雪莲通脉丸治疗冠心病气虚血瘀证的机制所在。

参考文献:

- [1] He J, Gu D, Wu X, et al. Major cause of death among men and women in China[J]. *N Engl J Med*, 2005,353:1 124-1 134.
- [2] 王师菡,王阶,李霁.冠心病血瘀证的Gensini积分与血管内皮因子的关系[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2010,12(13):355-357.
- [3] 邓红,杨春军,王北江.雪莲通脉丸治疗老年及老年前期冠心病51例临床疗效观察[J]. *安徽中医学院学报*, 1992,11(3):15-17.
- [4] 李净,王键.益气活血法改善气虚血瘀证局灶性脑缺血再灌注模型鼠生物学特征的有效性评价[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2003,9(4):22-25.
- [5] 王键,胡建鹏.缺血性中风气虚血瘀证动物模型的初步研究[J]. *安徽中医学院学报*, 1999,18(2):46-49.
- [6] 李萍,黄启福,杨丽彩,等.气虚血瘀大鼠慢性伤口模型的研究-阿霉素对大鼠伤口的影响[J]. *中国中西医结合外科杂志*, 1999,2(5):110-113.
- [7] 刘洁,白鹤,刘喜平.参参康心胶囊对冠心病气虚血瘀证模型小鼠TXB₂、6-keto-PGF₁的影响[J]. *中医研究*, 2014,27(1):62-64.
- [8] 贺石林,王键,王净净,等.中医科研设计与统计学[M].长沙:湖南科学技术出版社,2001:49.
- [9] 毛静远,牛子长,张伯礼.近40年冠心病中医证候特征研究文献分析[J]. *中医杂志*, 2011,52(11):958-959.
- [10] 武云涛,高迎春,姚依群,等.冠心病患者血管内皮细胞功能的变化[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2003,5(2):83.
- [11] Juhasz-Nagy S. Pathological action of endothelin-1 on the heart: coronary spasm and arrhythmia [J]. *Orv Hetil*, 1999,140(25):1 395-1 401.
- [12] Alvarez D, Briassouli P, Clancy RM, et al. A novel role of endothelin-1 in linking Toll-like receptor 7-mediated inflammation to fibrosis in congenital heart block [J]. *J Biol Chem*, 2011,286(35):30 444-30 454.
- [13] Capettini LS, Cortes SF, Silva JF, et al. Decreased production of neuronal NOS-derived hydrogen peroxide contributes to endothelial dysfunction in atherosclerosis [J]. *Br J Pharmacol*, 2011,164(6):1 738-1 748.
- [14] 任亚丽.苯那普利与厄贝沙坦对心衰大鼠心室重构的影响及其机制的探讨[J]. *中国药理学通报*, 2008,24(12):9.
- [15] Joyce CW, Amar MJ, Lambert G, et al. The ATP binding cassette transporter AI (ABCA1) modulates the development of aortic atherosclerosis in C57 BL/6 and apoE-knockout mice[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002,112(99):407-412.
- [16] 赵亚春.温阳补气化瘀法治疗冠心病心绞痛临床观察[J]. *中国实用医药*, 2009,4(7):130-131.
- [17] 李冰冰,唐德才,臧文华.补气活血类中药对血管内皮细胞增殖的影响[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2014,16(3):572-577.