

● 实验研究 ●

引用:郑利珠,张诗意,廖慧玲. 蛭龙活血通瘀胶囊及其拆方对 AS 大鼠 ET-1、NO 的影响[J]. 湖南中医杂志, 2020, 36 (12): 139-141, 146.

蛭龙活血通瘀胶囊及其拆方对 AS 大鼠 ET-1、NO 的影响

郑利珠, 张诗意, 廖慧玲

(西南医科大学中西医结合学院, 四川 泸州, 646000)

[摘要] 目的:观察蛭龙活血通瘀胶囊及其拆方对动脉粥样硬化(AS)大鼠内皮素(ET)-1 和一氧化氮(NO)的影响,并探讨其组方的合理性。方法:随机将 110 只健康雄性 SD 大鼠分为 11 组,分别为空白组、模型组、阿托伐他汀组、全方组和拆方 1~7 组,每组各 10 只,除空白组外其余各组均制备 AS 大鼠模型。阿托伐他汀组大鼠予以阿托伐他汀钙片干预,全方组予以黄芪、桂枝、大血藤、地龙、水蛭干预,拆方 1 组予以黄芪、桂枝、大血藤干预,拆方 2 组予以黄芪、地龙、水蛭干预,拆方 3 组予以黄芪干预,拆方 4 组予以桂枝、地龙干预,拆方 5 组予以桂枝、水蛭干预,拆方 6 组予以大血藤、地龙干预,拆方 7 组予以大血藤、水蛭干预,于实验第 120 天后检测各组大鼠治疗前后的血清 ET-1、NO 水平。结果:蛭龙活血通瘀胶囊全方组较拆方组降低血清 ET-1 浓度和提高血清 NO 浓度的作用更为明显,诸药中影响大鼠血清 ET-1、NO 含量最显著的是黄芪。结论:蛭龙活血通瘀胶囊全方组中多种药味合用后,对降低 AS 大鼠血清 ET-1 和提高 NO 含量有明显的协同作用,方中多种药物均可保护内皮功能,且影响大鼠血清 ET-1、NO 含量最显著的药味是黄芪。

[关键词] 动脉粥样硬化;蛭龙活血通瘀胶囊;拆方;内皮素-1;一氧化氮

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **DOI:** 10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2020.12.056

Effect of Zhilong Huoxue Tongyu capsules and its components on endothelin-1 and nitric oxide in rats with atherosclerosis

ZHENG Lizhu, ZHANG Shiyi, LIAO Huiling

(School of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effect of Zhilong Huoxue Tongyu capsules and its components on endothelin-1 (ET-1) and nitric oxide (NO) in rats with atherosclerosis (AS) and the rationality of such prescription. Methods: A total of 110 healthy male Sprague-Dawley rats were divided into blank group, model group, atorvastatin group, whole prescription group, and component 1-7 groups, with 10 rats in each group, and all rats except those in the blank group were used to establish a rat model of AS. The rats in the atorvastatin group were treated with atorvastatin calcium tablets; the rats in the whole prescription group were treated with Astragalus membranaceus, Ramulus Cinnamomi, Sargentodoxa cuneata, Pheretima, and leech; the rats in the component 1 group were treated with Astragalus membranaceus, Ramulus Cinnamomi, and Sargentodoxa cuneata; the rats in the component 2 group were treated with Astragalus membranaceus, Pheretima, and leech; the rats in the component 3 group were treated with Astragalus membranaceus; the rats in the component 4 group were treated with Ramulus Cinnamomi and Pheretima; the rats in the component 5 group were treated with Ramulus Cinnamomi and leech; the rats in the com-

基金项目:四川省科技应用基础研究计划项目(2019YJ0649)

第一作者:郑利珠,女,2018级硕士研究生,研究方向:中西医结合临床

通讯作者:廖慧玲,女,教授,研究方向:中西医结合防治心脑血管疾病, E-mail: 157776358@qq.com

ponent 6 group were treated with Sargentodoxa cuneata and Pheretima;the rats in the component 7 group were treated with Sargentodoxa cuneata and leech. The serum levels of ET-1 and NO were measured before treatment and on day 120 of the experiment. Results: Compared with the components of Zhilong Huoxue Tongyu capsules, its whole prescription had a significantly better effect in reducing serum ET-1 and improving serum NO, and among the above drugs, Astragalus membranaceus had the most significant effect on the serum levels of ET-1 and NO. Conclusion: The combination of multiple medicines in the whole prescription of Zhilong Huoxue Tongyu capsules has a marked synergistic effect on reducing serum ET-1 and improving NO in AS rats. Various medicines in this prescription can protect endothelial function, among which Astragalus membranaceus has the most significant effect on the serum levels of ET-1 and NO.

[Keywords] atherosclerosis; Zhilong Huoxue Tongyu capsules; component; endothelin-1; nitric oxide

据报道,动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种慢性的威胁人们生命健康的全身性疾病,是世界范围内血管疾病发生的主要原因^[1]。近年来,由于人们生活方式的改变,AS的发病率也有所升高,且呈年轻化趋势。目前关于AS的发病机制尚未完全阐明。自1976年AS血管内皮损伤反应学说被Ross提出至今,大量有关血管内皮功能障碍与AS发生发展的研究面世,表明二者存在密不可分的关系,其主要原因是血管在各种因素的影响下,由内皮介导的一氧化氮(NO)和内皮素(ET)的动态平衡被破坏,使内皮功能出现障碍,从而导致或加重AS^[2]。因此,在始动环节通过调节NO与ET的平衡,可干预AS的形成从而能有效防治心脑血管疾病的发生。文献资料显示,中医药在防治AS方面具有全方位、多靶点及多环节的独特优势^[3]。西南医科大学附属中医医院结合中医理论及临床经验研制出了蛭龙活血通瘀胶囊,该药由黄芪、水蛭、地龙、大血藤、桂枝组成。前期研究证实,蛭龙活血通瘀胶囊对防治AS方面具有显著的临床特点^[4],但尚未对方中抗AS的主要药物进行深入研究。现为甄选出可抑制AS的主要药味,以进一步探明其组方的合理性。本实验以AS大鼠为模型,比较蛭龙活血通瘀胶囊及其拆分组合对AS大鼠ET-1和NO的影响。

1 实验材料

1.1 动物 选取110只清洁级健康雄性SD大鼠,体质量(200±10)g,由西南医科大学动物实验中心提供。

1.2 药物及试剂 蛭龙活血通瘀胶囊:黄芪1.1g,桂枝0.3g,大血藤0.6g,地龙1.0g,水蛭0.3g。均为免煎颗粒(四川新绿色药业科技公司)。阿托伐他汀钙10mg/片(北京嘉林药业股份有限公司);维生素D₃注射液7.5mg/ml(上海通用药业股份有限公司);丙硫氧嘧啶50mg/片(上海信谊药厂有限公司);牛血清蛋白(北京索莱宝科技有限公司,货号:A8010)。

1.3 主要仪器 ET-1 ELISA试剂盒(上海桥社生物公司,货号:DRE20716);NO硝酸还原酶试剂盒(南京建成生物公司,货号:A012);全自动生化分析仪、高速低温离心机、自动

酶标洗板机、酶标仪、紫外分光光度计等。

2 实验方法

2.1 动物分组 将110只大鼠适应性喂养1周后,随机分为11个组,即空白组、模型组、阿托伐他汀组、全方组、拆方1~7号组,每组各10只,5只一笼。

2.2 模型制备 参考张安邦等^[5]使用的复合方法制备AS大鼠模型。空白组予以普通饲料喂养;模型组和各药物干预组予以高脂饲料喂食及腹腔注射维生素D₃注射液。各组大鼠分别饲养120d后进行取材。

2.3 给药方法 根据正交实验表(见表1),将蛭龙活血通瘀胶囊中的5味中药(黄芪、桂枝、大血藤、地龙、水蛭)标记为√(有)或×(无)2个水平,进行8种拆方设计,并按试验号1~8号的中药进行干预(见表2),干预时间为实验第60~120天。

表1 正交实验表

试验号	黄芪	桂枝	大血藤	地龙	水蛭
全方	√	√	√	√	√
拆方1号	√	√	√	×	×
拆方2号	√	×	×	√	√
拆方3号	√	×	×	×	×
拆方4号	×	√	×	√	×
拆方5号	×	√	×	×	√
拆方6号	×	×	√	√	×
拆方7号	×	×	√	×	√

注:各因素分别以“√”和“×”表示用药、不用药水平。

2.4 观察指标 于实验第120天经大鼠腹主动脉取血制备血清后冷冻保存,采用酶联免疫法(ELISA)和硝酸还原法分别检测大鼠血清中ET-1的浓度和血清NO的浓度,其测定步骤均按试剂盒操作指示进行。

2.5 统计学方法 应用SPSS 21.0软件进行统计学分析,所有计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,不同组之间采用单因素方差分析法(One Way-ANOVA)进行比较。正交试验结果采用直观分析法和方差分析法。检验标准为 $\alpha=0.05$ 。

表 2 各组大鼠的干预因素

分组	因素水平
全方组	黄芪 12 g、桂枝 5 g、大血藤 9 g、地龙 9 g、水蛭 2 g
拆方 1 号组	黄芪 12 g、桂枝 5 g、大血藤 9 g
拆方 2 号组	黄芪 12 g、地龙 9 g、水蛭 2 g
拆方 3 号组	黄芪 12 g
拆方 4 号组	桂枝 5 g、地龙 9 g
拆方 5 号组	桂枝 5 g、水蛭 2 g
拆方 6 号组	大血藤 9 g、地龙 9 g
拆方 7 号组	大血藤 9 g、水蛭 2 g
阿托伐他汀组	阿托伐他汀钙片
模型组	无
空白组	无

3 实验结果

3.1 各组大鼠血清 ET-1、NO 比较 1)ET-1 水平。与空白组比较,模型组血清 ET-1 明显升高,差异有统计学意义;除拆方 6、7 号组之外,各药物干预组的血清 ET-1 均较模型组明显降低,差异有统计学意义;阿托伐他汀组和全方组血清 ET-1 较各拆方组明显降低,差异有统计学意义;而各拆方组间比较,拆方 1 号组较拆方 3、6、7 号组血清 ET-1 明显降低,拆方 2 号组较其余各拆方组血清 ET-1 明显降低,拆方 3 号组较拆方 6、7 号组血清 ET-1 明显降低,差异均有统计学意义。2)NO 水平。与空白组比较,模型组的血清 NO 明显降低,差异有统计学意义;除拆方 6、7 号组外,各药物干预组、全方组较各拆方组的血清 NO 均明显升高,差异有统计学意义;拆方 1 号组血清 NO 较拆方 3~7 号组明显升高;拆方 2 号组血清 NO 较其余各拆方组明显升高;拆方 3 号组血清 NO 较拆方 6、7 号组明显升高;拆方 4 号组血清 NO 较拆方 3、6、7 号组明显升高,差异均有统计学意义。(见表 3)

表 3 各组大鼠血清 ET-1、NO 水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	ET-1 (pg/ml)	NO(μ mol/L)
空白组	10	163.62 $\pm$ 14.52	62.64 $\pm$ 2.70
模型组	10	313.78 $\pm$ 19.99 ^a	24.66 $\pm$ 2.01 ^a
阿托伐他汀组	10	197.40 $\pm$ 9.48 ^b	53.29 $\pm$ 3.53 ^b
全方组	10	201.11 $\pm$ 6.81 ^b	51.39 $\pm$ 2.03 ^b
拆方 1 号组	10	260.09 $\pm$ 9.31 ^{bcdf}	39.25 $\pm$ 2.65 ^{bcdf}
拆方 2 号组	10	213.50 $\pm$ 4.56 ^{bcde}	43.46 $\pm$ 2.45 ^{bcd}
拆方 3 号组	10	280.00 $\pm$ 2.04 ^{bcdef}	30.60 $\pm$ 1.94 ^{bcdefh}
拆方 4 号组	10	270.05 $\pm$ 3.90 ^{bcdf}	34.58 $\pm$ 2.31 ^{bcdef}
拆方 5 号组	10	272.74 $\pm$ 4.42 ^{bcdf}	35.20 $\pm$ 1.84 ^{bcdef}
拆方 6 号组	10	300.42 $\pm$ 13.33 ^{defg}	25.06 $\pm$ 2.20 ^{cdefgh}
拆方 7 号组	10	300.83 $\pm$ 8.65 ^{cdefg}	26.21 $\pm$ 0.81 ^{cdefgh}

注:与空白组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与阿托伐他汀组比较,^c $P<0.05$;与全方组比较,^d $P<0.05$;与拆方 1 号组比较,^e $P<0.05$;与拆方 2 号组比较,^f $P<0.05$;与拆方 3 号组比较,^g $P<0.05$;与拆方 4 号组比较,^h $P<0.05$ 。

3.2 大鼠血清 ET-1 和 NO 受药物影响的正交试验结果 取各组大鼠血清 ET-1、NO 的平均值,分别求出各列的 K 值和 R 值。其中各药物对 ET-1、NO 影响的主次顺序由 R 值决定。从 ET-1 直观结果分析看出,R 黄芪=47.33,R 桂枝=22.69,R 大血藤=6.53,R 地龙=32.15,R 水蛭=30.59,即血清 ET-1 受各味药影响的主次顺序是黄芪>地龙>水蛭>桂枝>大血藤,其中含有黄芪、地龙、水蛭、桂枝的拆方可降低血清 ET-1 水平。方差分析显示,黄芪、地龙、水蛭、桂枝对血清 ET-1 具有显著影响($P<0.05$),对血清 ET-1 无显著影响的药味是大血藤($P>0.05$)。NO 的直观结果分析显示,R 黄芪=10.85,R 桂枝=8.78,R 大血藤=0.48,R 地龙=5.8,R 水蛭=6.7,血清 NO 受各味药影响的主次顺序是黄芪>桂枝>水蛭>地龙>大血藤,其中含有黄芪、水蛭、地龙、桂枝的拆方可升高大鼠血清 NO 水平。方差分析显示,血清 NO 主要受黄芪、地龙、水蛭、桂枝的影响($P<0.01$),而大血藤对血清 NO 的影响则不显著($P>0.05$)。

4 讨 论

动脉粥样硬化是一种常见的代谢疾病,以脂质代谢紊乱为特征,内皮功能障碍是其发生的启动环节^[6],在 AS 发病全过程中起至关重要的作用^[7]。内皮损伤反应学说作为目前较为公认的 AS 机制学说之一,是当前的研究热点^[8]。NO 和 ET-1 是内皮细胞产生的具有调节血管舒缩作用的因子。NO 作为动脉壁产生的最有效的血管舒张分子,是由 L-精氨酸通过 NO 合成酶作用合成而来的^[9],能抑制缩血管物质的分泌,对维持血管内稳态最为重要,与 AS 的发生呈负相关。而 ET-1 作为 NO 的反向调节物,会因血管内皮损伤而增加释放,使血管收缩增强,从而引起粥样硬化形成及扩大。并且 ET-1 可调节精氨酸酶-2 的表达和活性以及精氨酸酶-2 衍生物的产生,从而降低 NO 的生物利用度,进一步加重 AS^[10-11]。因此,协调 NO/ET-1 的平衡是防治 AS 的一个重要环节。

“动脉粥样硬化”在中医学中无确切命名。依据其相关疾病的发病特点及临床表现,可将其归于“胸痹”“中风”“脉痹”“头痛”“眩晕”等范畴。多数学者认为“气虚、痰凝、瘀阻”是 AS 的关键病机,补气兼以祛痰化瘀为其主要治疗原则。蛭龙活血通瘀胶囊由黄芪、桂枝、地龙、大血藤及水蛭组成。其中,黄芪用量极大,为君药,可鼓舞阳气以行滞化浊;地龙、水蛭共为臣药,二者均为虫药,性咸,善走窜,能消痰软坚、破血通瘀;桂枝为佐药,其味薄气轻,可通畅三焦气机,与益气、通络之品同用,能起到增效的作用,更好地发挥全方补气、搜剔、化瘀、除痰的功效;大血藤为使药,有活血、通络、祛风之效。多药合用,共奏疏通经络、破瘀生新、缓中补虚之功,达到标本兼治。

此实验研究结果表明,与各拆方组相比,蛭龙活血通瘀胶囊全方组降低血清 ET-1 浓度和升高血清(下转第 146 页)

巴胺受体的敏感性,起到类似于多巴胺受体拮抗剂的作用,为临床运用提供理论依据。本研究发现 IDPN 可能通过影响 DA 受体的敏感度而诱发大鼠的抽动症状,健脾柔肝息风汤及氟哌啶醇均能降低大鼠脑组织 DRD1、DRD2 mRNA 含量,提示二者对于 TD 病变的治疗机制可能与削弱纹状体多巴胺受体敏感性有关,但是否有其他系统参与调节,仍需要今后进一步研究。

参考文献

- [1] 中华医学会儿科学分会神经学组. 儿童抽动障碍的诊断与治疗建议[J]. 中华儿科杂志, 2013, 51(1): 72-75.
- [2] YANG C, ZHANG L, ZHU P. The prevalence of tic disorders for children in China: A systematic review and meta-analysis[J]. Medicine, 2016, 95(30): e4354.
- [3] 张燕, 邱秀娟. 儿童抽动症病因及治疗研究进展[J]. 山东医药, 2015, 55(42): 103-105.
- [4] 车立纯, 刘秀梅, 陈琅, 等. 抽动障碍大鼠模型的行为学特征及机制研究[J]. 中国儿童保健杂志, 2016, 24(12): 1274-1277, 1286.
- [5] 刘鹏妹. 张仲景辨治志病规律探析[J]. 中医药导报, 2014, 20(13): 5-6, 11.
- [6] 谭锋. 关于 Tourette 综合征研究中三个问题的探讨[J]. 中医药导报, 2005, 11(5): 1-2, 22.
- [7] 袁叶, 张焱, 刘宁. 中医药治疗儿童抽动障碍研究进展[J]. 山西中医学院学报, 2016, 17(6): 74-76.

- [8] 张海华, 汤琛, 李知行, 等. 儿童抽动障碍的中医药治疗研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2018, 31(11): 5061-5064.
- [9] DIAMOND BI, REYES MG, BORISON R. A new animal model for tourette syndrome[J]. Adv Neurol, 1982, 5(35): 221.
- [10] KADASAH SA, MUTAIRY A, SIDDIQUEI M, et al. Pentoxifylline attenuates iminodipropionitrile-induced behavioral abnormalities in rats[J]. Behavioural Pharmacology, 2009, 20(4): 356-360.
- [11] 向上. 抽动障碍合并注意力缺陷多动症的多巴胺相关假设与治疗[J]. 中国儿童保健杂志, 2014, 22(9): 946-948.
- [12] 李燕, 王新征, 王俊宏, 等. 熄风静宁颗粒对 Tourette 综合征模型大鼠脑纹状体多巴胺 D2 受体和多巴胺转运蛋白 mRNA 表达的影响[J]. 中国中医急症, 2017, 26(1): 23-25.
- [13] 纪小艺, 吴敏. 抽动障碍患儿治疗前后多巴胺 D2 受体与转运体 mRNA 的表达[J]. 中国当代儿科杂志, 2016, 18(4): 297-300.
- [14] 李小萍, 李杏色, 李进华, 等. 抽动障碍儿童单胺类神经递质和血锌、钙水平分析[J]. 河北医科大学学报, 2014(6): 704-706.
- [15] 小儿抽动障碍诊治的临床研究[J]. 中国科技成果, 2018, 19(16): 66-67.
- [16] 赵欣, 吴敏, 张欣, 等. 抽动障碍药物治疗现状分析[J]. 国际精神病学杂志, 2016, 43(4): 617-619.
- [17] 刘微艳, 朱沁泉, 陈盼, 等. 健脾柔肝息风汤对抽动障碍模型大鼠脑组织中多巴胺和高香草酸的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2018, 38(12): 1384-1387.

(收稿日期: 2020-07-16)

(上接第 141 页) NO 浓度的作用更为明显, 这提示全方中各药物合用后对防治 AS 可产生一定的协同作用, 但其相关机制亟待进一步研究。同时可以发现, 蛭龙活血通瘀胶囊可能通过调节 NO/ET-1 平衡从而达到抗 AS 的作用。并且, 各药物中对大鼠血清 ET-1、NO 含量影响最明显的是黄芪, 其次是桂枝、地龙、水蛭, 而大血藤对血清 ET-1、NO 无显著影响, 由此得出蛭龙活血通瘀胶囊中黄芪、桂枝、地龙、水蛭四药可发挥保护内皮功能以抑制 AS 的作用; 其中作用显著的是黄芪, 这恰好切中了全方重用黄芪, 取其补气温阳通络之效的原则, 进一步体现了蛭龙活血通瘀胶囊组方的有效性及合理性, 也再次证实了中医药在防治 AS 研究领域具有广阔前景, 值得深入研究及推广应用。

参考文献

- [1] HERRINGTON W, LACEY B, SHERLIKER P, et al. Epidemiology of atherosclerosis and the potential to reduce the global burden of atherothrombotic disease[J]. Circulation Research, 2016, 118(4): 535-546.
- [2] 潘亮, 邱春光. 血管内皮功能障碍在冠心病发生发展中的作用[J]. 中国分子心脏病学杂志, 2014, 14(5): 1106-1108.
- [3] 李杰. 中医药治疗动脉粥样硬化研究进展[J]. 内蒙古中医

- 药, 2019, 38(12): 167-168.
- [4] 王承刚. 益气祛风通络法干预高血压颈动脉粥样硬化炎性反应的实验及临床研究[D]. 泸州: 泸州医学院, 2012.
- [5] 张安邦, 黄昕, 李令根, 等. 复合方法制备 SD 大鼠动脉粥样硬化模型[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2015, 21(3): 282-285.
- [6] XIE X, MA X, ZENG S, et al. Mechanisms of berberine for the treatment of atherosclerosis based on network Pharmacology[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2020, 119(3): 1-11.
- [7] LEE DY, CHIU JJ. Atherosclerosis and flow: roles of epigenetic modulation in vascular endothelium[J]. J Biomed Sci, 2019, 26(1): 56.
- [8] KOSTA T, BOON RA. Endothelial cell metabolism in atherosclerosis[J]. Frontiers in Cell & Developmental Biology, 2018(6): 82.
- [9] 李丹, 李玉洁, 杨庆, 等. 血管内皮功能障碍与动脉粥样硬化研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(8): 272-276.
- [10] GUPTA RM, LIBBY P, BARTON M. Linking regulation of nitric oxide to endothelin-1: The Yin and Yang of vascular tone in the atherosclerotic plaque[J]. Atherosclerosis, 2020, 292(1): 201-203.
- [11] 陈静宜, 叶子芯, 崔姝雅, 等. 一氧化氮生物利用度失调与动脉粥样硬化[J]. 基础医学与临床, 2017, 37(2): 251-255.

(收稿日期: 2020-05-28)