

# 脉炎消口服液对人脐动脉平滑肌细胞增殖的影响及其机制<sup>△</sup>

白晓丹<sup>1\*</sup>, 黄丽军<sup>2</sup>, 柳玉杰<sup>3</sup>, 张琪<sup>2</sup>, 曲福军<sup>2#</sup>(1.哈尔滨市中医医院, 哈尔滨 150076; 2.哈尔滨医科大学附属第二医院, 哈尔滨 150086; 3.哈尔滨市食品药品监督管理局, 哈尔滨 150021)

中图分类号 R285;R97 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)31-2890-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.31.04

**摘要** 目的:探讨脉炎消口服液在体外对人脐动脉平滑肌细胞(HUASMCs)增殖的影响及其作用机制。方法:体外组织贴块培养HUASMCs,并传2~3代,免疫组化法进行鉴定;采用MTT法观察不同体积分数脉炎消口服液(0.4%、4%、40%)对HUASMCs细胞增殖的抑制作用;采用RT-PCR法检测不同体积分数脉炎消口服液(0.4%、4%、40%)对HUASMCs细胞IL-6 mRNA表达水平的影响。结果:组织块贴壁法原代培养HUASMCs,传3代后,阳性细胞率为90%;脉炎消口服液对HUASMCs的增殖具有明显的抑制作用,且体积分数在一定范围内(0.4%~40%)呈浓度依赖性。结论:脉炎消口服液抑制HUASMCs增殖的作用是通过下调细胞IL-6 mRNA的表达水平而实现的。

**关键词** 人脐动脉平滑肌细胞;脉炎消口服液;白细胞介素-6

## Effects and Mechanism of Maiyanxiao Oral Solution on the Proliferation of Human Umbilical Artery Smooth Muscle Cells *in vitro*

BAI Xiao-dan<sup>1</sup>, HUANG Li-jun<sup>2</sup>, LIU Yu-jie<sup>3</sup>, ZHANG Qi<sup>2</sup>, QU Fu-jun<sup>2</sup>(1.Harbin Hospital of TCM, Harbin 150076, China; 2.The Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, China; 3.Harbin Food and Drug Administration, Harbin 150021, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To investigate the effects and mechanisms of Maiyanxiao oral solution on the proliferation of human umbilical artery smooth muscle cells (HUASMCs) *in vitro*. METHODS: HUASMCs were culture with the method of tissue adherent and passed 2-3 generations, then were identified by immunohistochemistry; the inhibitory effects of HUASMCs proliferation on different volume fraction of Maiyanxiao oral solution (0.4%, 4%, 40%) were detected by MTT assay. The effects of different volume fraction of Maiyanxiao oral solution (0.4%, 4%, 40%) on the expression of IL-6 mRNA were detected by RT-PCR. RESULTS: After HUASMCs were culture with the method of tissue adherent and passed 3 generations, 90% positive cells were identified by immunohistochemistry. The proliferation of HUASMCs inhibited by Maiyanxiao oral solution, which showed obvious volume fraction dependence in a certain range (0.4%-40%). CONCLUSIONS: HUASMCs proliferation is suppressed by Maiyanxiao oral solution through down-regulating the expression of IL-6 mRNA.

**KEYWORDS** Human umbilical artery smooth muscle cell; Maiyanxiao oral solution; IL-6

脉炎消口服液是哈尔滨医科大学附属第二医院药学部正在研制的纯中药制剂,由丹参、白花蛇舌草、黄芩、双花、刺五加等6味中药组成,主要功效为清热解毒、活血化痰。研究证实,该药具有扩张血管、改善血液循环、降低纤维蛋白原、抗炎及调节免疫等药理作用,且安全、有效<sup>[1]</sup>。血管平滑肌细胞(VSMCs)异常增殖是高血压、动脉粥样硬化、支架植入术后再狭窄、大动脉炎等相关疾病的一个重要因素。《中国高血压防治指南2010》也将颈动脉内膜中层厚度定位为可独立于血压水平预测心血管事件的重要指标<sup>[2]</sup>。白细胞介素-6(Interleukin-6, IL-6)是一种促炎症细胞因子,循环中的IL-6由多种细胞(包括激活的巨噬细胞和淋巴细胞)分泌,可诱导内皮细胞趋

化因子和黏附分子的表达和释放。IL-6可以自分泌方式从血管平滑肌中释放,直接作用于VSMCs,也可以通过诱导内源性血小板衍生生长因子(Platelet derived growth factor, PDGF)等其他炎症因子和生长因子产生而促进平滑肌细胞增生<sup>[3]</sup>。本研究采用人脐动脉平滑肌细胞(Human umbilical artery smooth muscle cells, HUASMCs)作为体外研究对象,观察脉炎消口服液对VSMCs异常增殖的干预作用,并初步探讨其机制。

### 1 材料

#### 1.1 仪器

CO<sub>2</sub>恒温培养箱(美国Forma Scientific公司);倒置相差显微镜、光学显微镜(日本Olympus公司);Infinite 200型酶标仪(瑞士Tecan公司);MyCycle™ Thermal Cycler PCR反应仪、SmartSpec™ Plus Spectrophotometer DNA/RNA浓度检测仪、SmartSpec™ Plus Spectrophotometer电泳仪、Uniwersal Hood II凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司);台式高速低温离心机(德国Thermo Fisher公司)。

#### 1.2 试剂

DMEM培养液(美国Gibco公司);胎牛血清(澳大利亚

<sup>△</sup> 基金项目:黑龙江省博士后启动基金资助课题(No.LR-B05-230);黑龙江省卫生厅科研课题(No.2009-135;No.2011-538)

\* 副主任药师,硕士研究生。研究方向:药理学。电话:0451-88029207。E-mail:baixd1@163.com

# 通信作者:教授,博士后。研究方向:分子生物学、药理学。电话:0451-86605262。E-mail:fujunqu88@126.com

NQBB公司);青霉素、链霉素、二甲基亚砷(DMSO)、MTT和0.25%胰蛋白酶消化液(美国Sigma公司);0.01 mol/L磷酸盐缓冲液(PBS,北京Solarbio公司);小鼠抗人平滑肌 $\alpha$ -肌动蛋白单克隆抗体(批号:ZM-0003)、SP法免疫组化试剂盒、二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒(北京中山生物试剂公司);RNA PeRKit(Amv) ver.3.0(批号:DRR019A)、DL2000 DNA Marker(大连宝生物工程有限公司);Trizol(美国Invitrogen公司)。

### 1.3 药品

肺炎消口服液(生药含量0.998 mg/ml,哈尔滨医科大学附属第二医院药学部)。处方:丹参2 100 g,莪术、金银花、白花蛇舌草、黄芩和刺五加各720 g。提取工艺:6倍量的水在偏碱性条件下提取3次,每次2 h,然后浓缩至浸膏,含生药量2.5 g/ml,在80%乙醇条件下放置6 d。制备工艺:醇沉6 d后,4℃冷藏48 h,回收乙醇至无醇味,得1 500 ml药液,加入蒸馏水至5 700 ml,4℃冷藏48 h,减压,滤过,弃去沉淀物,滤液分装,100℃灭菌30 min,得含生药量0.996 g/ml的肺炎消口服液。

## 2 方法

### 2.1 HUASMCs体外原代细胞培养

经产妇及家属同意,取无菌新生儿脐带(约10 cm),置于预先放有D'Hanks液的无菌容器中。在超净工作台上,用无菌的D'Hanks液反复冲洗脐带。从脐带上分离脐动脉,剔除动脉外膜,纵行剪开脐动脉,轻轻刮除血管内膜后,将其剪成约1 mm×1 mm×1 mm的组织块。将组织块按5~6块/cm<sup>2</sup>的密度平放于25 cm<sup>2</sup>培养瓶中,翻转培养瓶,使贴有组织块的瓶壁朝上。在培养瓶内加20%DMEM高糖培养液(20%胎牛血清、100 U/ml青霉素、100 U/ml链霉素)4 ml,然后保持有组织块的瓶壁朝上,拧紧瓶盖,放入37℃、5%CO<sub>2</sub>的培养箱内贴壁培养。3 h后,将培养瓶轻轻翻转,使组织块浸入培养液中,在37℃、5%CO<sub>2</sub>的培养箱内静置培养。3 d后换新鲜培养液,以后每2~3 d更换培养液1次,每次更换2/3的量,保留1/3的原液。培养至组织块周围细胞移出且细胞间融合率在90%以上时,即可传代。

### 2.2 HUASMCs的免疫组化鉴定

将培养至第3代的HUASMCs用0.25%胰蛋白酶消化,制成细胞悬液,调整细胞数为1.0×10<sup>5</sup> ml<sup>-1</sup>,接种于含盖玻片(将常规盖玻片经0.1 mol/L的盐酸浸泡过夜,次日双蒸水冲洗,无水乙醇浸泡2 h,擦净后置60 mm玻璃培养皿内高压消毒30 min)的培养皿中,静置于细胞培养箱24 h,使细胞贴在盖玻片上。待细胞增殖到合适密度,倾去培养液,0.01 mol/L PBS(pH=7.4)清洗2次后,在2~10℃甲醇中浸泡5 min固定,自然风干后即可用于分析或置于-70℃冰箱备用。按照SP法免疫组化试剂盒说明书步骤操作,然后以中性树脂封片镜检。

### 2.3 试验药液的制备

分别取肺炎消口服液0.02、0.2、2 ml,加入培养液至终体积5 ml,得肺炎消口服液体积分数分别为0.4%、4%、40%的药液,备用。

### 2.4 MTT法检测肺炎消抑制HUASMCs增殖的作用

收集传至第3代的HUASMCs,经0.25%胰酶消化后,接种于96孔培养板,每孔100  $\mu$ l培养液,含2 000个细胞。培养72 h后弃培养液,每孔加入肺炎消口服液体积分数分别为0.4%、4%、40%的药液100  $\mu$ l,即为肺炎消低、中、高剂量组;阴性对照组加入不含肺炎消口服液的培养液;另设空白对照组,只加

培养液,无细胞。每组设5个复孔,试验重复3次。于培养后24 h加入MTT(5 mg/L)20  $\mu$ l/孔,4 h后加入DMSO 100  $\mu$ l/孔,避光震荡摇匀,以空白孔调零,在酶标仪上检测波长490 nm处的光密度(OD)值,OD小说明抑制率越高。

### 2.5 肺炎消对HUASMCs IL-6 mRNA表达水平的影响

按照“2.4”项下方法设置肺炎消低、中、高剂量组及阴性对照组。提取各组细胞内总RNA 1  $\mu$ g进行逆转录反应,操作按说明书进行。IL-6上、下游引物序列分别为5'-AGCGCCTTCGGTCCAGTTGC-3'和5'-GTGGCTGTCTGTGTGGGGCG-3'(产物长度121 bp),内参照GAPDH上、下游引物序列分别为5'-GCCTCCGTGTCCCCACTGC-3'和5'-GCTCTGTCTGGGGCTGGTGG-3(产物长度345 bp)。引物均由北京三博远志生物技术有限公司合成。反应体系:5×Taq buffer 5  $\mu$ l, dNTP 1  $\mu$ l, H<sub>2</sub>O 15.75  $\mu$ l, Templates 1  $\mu$ l, TaKaRa Taq HS 0.25  $\mu$ l, 上游特异性PCR引物 1  $\mu$ l, 下游特异性PCR引物 1  $\mu$ l。反应条件:95℃预变性5 min;95℃变性30 s,60℃退火30 s,72℃延伸30 s,共32个循环;72℃延伸10 min。应用凝胶成像分析系统拍照并进行电泳条带分析,靶基因与内参照条带的灰度值之比为该基因的相对表达水平。

### 2.6 统计学方法

采用SPSS17.0软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多样本之间差异比较选用单因素方差分析,用Levene检验进行方差一致性检验,方差齐性时选用LSD和Duncan检验。P<0.05为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 HUASMCs的原代培养

原代培养5~10 d后,相差倒置显微镜下观察可见有梭形细胞从组织块边缘萌出(图1)。此后细胞增殖,纵行排列向外生长,延伸3~5周后出现致密的细胞层,可长满瓶壁。传代培养2~3代,未融合时,细胞表现为合成型(未分化型),生长旺盛,核分裂相多见,有时可呈现不规则圆形或多边形;细胞长满瓶壁时,表现为收缩型(分化型),可见平滑肌细胞典型的生长形式,即细胞呈梭形,平行生长,束状排列,密集与稀疏处相互交错呈“峰-谷”状,峰处为多层的细胞,谷处没有细胞或有单层细胞(图2)。

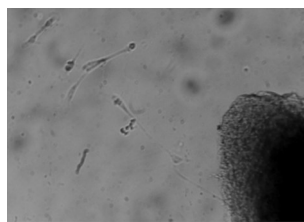


图1 组织块贴壁生长第7天 (100×)

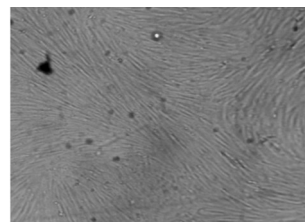


图2 原代培养第30天 (100×)

Fig 1 The growth of issue adherent for 7 days (100×) Fig 2 Primary culture on 30th day (100×)

### 3.2 HUASMCs的免疫组化鉴定

细胞经 $\alpha$ -肌动蛋白单克隆抗体免疫组化鉴定,显微镜下观察可见,细胞的胞质显示为棕黄色(图3),为预期的阳性结果,说明培养细胞为HUASMCs。

### 3.3 肺炎消抑制HUASMCs增殖的MTT法检测结果

肺炎消低、中、高剂量组的OD分别为0.483±0.047、0.421±0.031、0.262±0.048,与阴性对照组的0.549±0.031相

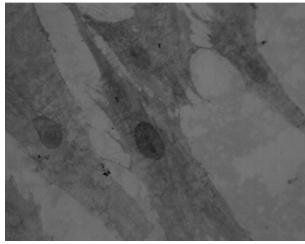


图3 HUASMCs的 $\alpha$ -肌动蛋白免疫组化鉴定(400 $\times$ )

Fig 3  $\alpha$ -actin immunohistochemical identification of HUASMCs(400 $\times$ )

比,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),且随着剂量的增加,OD逐渐减小( $P < 0.05$ ),说明脉炎消对HUAMCs的增殖有抑制作用,且呈剂量依赖性,结果见图4。

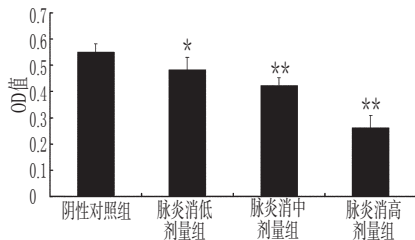


图4 不同剂量的脉炎消对HUAMCs增殖的抑制作用比较  
与阴性对照组比较: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

Fig 4 Comparison of inhibitory effects of different doses of Maiyanxiao on the proliferation of HUAMCs  
vs. negative control group: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

### 3.4 脉炎消对HUAMCs IL-6 mRNA表达水平的影响

3种剂量的脉炎消对HUASMCs IL-6 mRNA表达均有抑制作用,其相对表达量均低于阴性对照组( $P < 0.05$ ),且随着剂量的增加,其抑制作用增强,相对表达量逐渐降低( $P < 0.05$ ),呈剂量依赖性,结果见图5和图6。

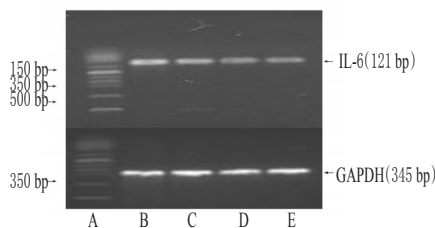


图5 HUASMCs IL-6 mRNA RT-PCR产物电泳图

A.PCR Marker; B.阴性对照组; C.脉炎消低剂量组; D.脉炎消中剂量组; E.脉炎消高剂量组

Fig 5 Electrophoresis map of RT-PCR produce of IL-6 mRNA in HUASMCs

A.PCR Marker; B.negative control group; C.Maiyanxiao low-dose group; D.Maiyanxiao medium-dose group; E.Maiyanxiao high-dose group

## 4 讨论

心脑血管疾病是目前全世界公认的威胁人类生命和健康最严重的三大疾病之一。据统计,缺血性脑血管病在全部脑血管病中占60%~70%<sup>[4]</sup>。VSMCs是构成血管中膜的主要细胞成分,与保持血管张力和功能有关。在病理过程中,通过其自身增殖、迁移及合成细胞外基质参与血管壁损伤后的修复。其结构与功能的改变是导致高血压、动脉粥样硬化、移植血管病和血管成形术后再次狭窄等多种血管疾病的细胞病理学基础。血管平滑肌按分化程度不同可分为两种表型:分化不

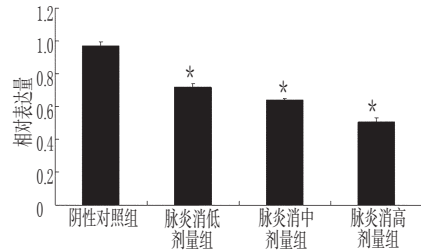


图6 3种浓度的脉炎消对HUASMCs IL-6 mRNA表达水平的影响

与阴性对照组比较: \* $P < 0.01$

Fig 6 Effects of 3 kinds of concentrations of Maiyanxiao on the levels of IL-6 mRNA in HUASMCs  
vs. negative control group: \* $P < 0.01$

完全的称为合成表型,分化完全的称为收缩表型。其分化呈可逆状态,处于高分化状态的VSMCs可返回未分化状态,并再进行增殖<sup>[5]</sup>。高分化型的VSMCs称为收缩型VSMCs,其主要功能是通过收缩来调节血管张力。相反,未分化的VSMCs称为合成型VSMCs,具有增殖和迁移的能力。研究表明,进入血管壁内层的平滑肌细胞由收缩表型退化为合成表型<sup>[6]</sup>。

在VSMCs增殖调控机制的研究中,最重要的方法就是对体外分离培养的VSMCs进行研究。贴块法为VSMCs培养的常用方法。脐动脉中为静脉血,但脐动脉具有动脉血管的结构特点,且脐动脉来自人体,其特征更接近人主动脉VSMCs。因此,体外培养HUASMCs用于血管疾病的体外试验是一种经济、方便的方法。本研究采用贴块法进行了HUASMCs的体外原代及传代培养。取材时,要特别小心地去除血管外膜及基层的成纤维细胞和内膜的内皮细胞;进行外膜和中膜剥离时,应掌握好力度和方向,使动脉呈袖套状剥下。用 $\alpha$ -肌动蛋白免疫组化法,在试验前对VSMCs进行鉴定,以确保无内皮细胞污染,并获得高纯度的VSMCs。此外,取材时间应不超过剖宫产术后3h,且越短越好。在整个剥离内、外膜的操作过程中,均需在培养液和低温环境中进行,从而最大限度地保障VSMCs离体后的活性。

IL-6是一种多功能的促炎性细胞因子<sup>[7]</sup>,具有多种生物学效应。它能刺激B细胞产生抗体,诱导淋巴细胞激活,调节肝脏产生急性期蛋白,还可促平滑肌细胞增殖和血小板释放。在人类和动物动脉硬化病变部位的单核巨噬细胞、内皮细胞和VSMCs中均可检测到IL-6的mRNA和蛋白质表达,其中VSMCs被认为是血管壁该细胞因子最主要的来源。

脉炎消口服液是哈尔滨医科大学附属第二医院药学部在医院制剂——脉炎消注射液的基础上正在研制的口服液剂型。脉炎消注射液作为医院制剂在临床应用多年,主要用于治疗多发性大动脉炎,其有效率为98%,显效率为86%<sup>[1,8]</sup>。研究证实,该药具有扩张血管、改善血液循环、降低纤维蛋白原等药理作用,为安全、有效的中药复方制剂<sup>[9]</sup>。近年来发生的关于中药注射剂致死的案例较多。临床常用的“鱼腥草注射液”“刺五加注射液”“复方蒲公英注射液”“双黄连注射液”等中药注射剂均发生过较严重不良反应,主要涉及澄明度、刺激性、过敏性等问题。基于目前临床上尚缺少治疗多发性大动脉炎的安全、有效的药物,且中药注射剂存在制备技术要求高、不良反应发生率高等因素,笔者将脉炎消注射液开发为脉炎消口服液,以期在保证脉炎消注射液临床疗效的基础上增

# 参芪益元颗粒对戊巴比妥钠所致小鼠学习记忆障碍的影响

刘 喆\*(山东中医药大学附属医院, 济南 250011)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)31-2893-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.31.05

**摘要** 目的:研究参芪益元颗粒对戊巴比妥钠所致小鼠学习记忆障碍的影响。方法:腹腔注射戊巴比妥钠(15 mg/kg)以复制小鼠学习记忆障碍模型。50只KM小鼠随机均分为正常对照(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组、健脑补肾丸(2.00 g/kg)组与参芪益元颗粒高、低剂量(1.76、0.88 g/kg)组。采用Y型迷宫法测定小鼠正确反应次数;测定小鼠血清超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)含量。结果:与正常对照组比较,模型组小鼠正确反应次数减少,SOD活性减弱,MDA含量增加,差异有统计学意义( $P<0.01$ );与模型组比较,参芪益元颗粒高、低剂量组小鼠正确反应次数增加,SOD活性增强,MDA含量减少,差异有统计学意义( $P<0.01$ )。结论:参芪益元颗粒对戊巴比妥钠所致小鼠学习记忆障碍具有改善作用。

**关键词** 参芪益元颗粒;戊巴比妥钠;学习记忆障碍;Y型迷宫法

## Effect of Shenqi Yiyuan Granules on Learning and Memory Impairment in Mice Induced by Sodium Pentobarbital

LIU Zhe(The Affiliated Hospital of Shandong University of TCM, Jinan 250011, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE:** To study the effects of Shenqi yiyuan granules on learning and memory impairment in mice induced by sodium pentobarbital. **METHODS:** Learning and memory impairment model was induced by intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (15 mg/kg). 50 KM mice were randomly divided into normal control group (constant volume of normal saline), model group (constant volume of normal saline), Jiannao bushen pills group (2.00 g/kg) and Shenqi yiyuan granules high-dose and low-dose groups (1.76, 0.88 g/kg). The average achievement of correct response was observed by the method of the Y-maze test, the activities of SOD and content of MDA in serum were detected. **RESULTS:** Compared with normal control group, average achievement of correct response were decreased in model group, meanwhile, the activities of SOD was decreased, and content of MDA was increased; there was statistical significance( $P<0.01$ ). Compared with model group, average achievement of correct response were increased in Shenqi yiyuan granules high-dose and low-dose groups; meanwhile, the activities of SOD was increased, and content of MDA was decreased; there was statistical significance( $P<0.01$ ). **CONCLUSIONS:** The learning and memory impairment of mice induced by sodium pentobarbital can be improved by Shenqi yiyuan granules.

**KEYWORDS** Shenqi yiyuan granules; Sodium pentobarbital; Learning and memory impairment; Y-maze test

加其安全性。本研究结果证实,脉炎消口服液可下调IL-6,因此具有调节免疫的作用,可用于治疗大动脉炎等相关免疫疾病;同时,它也可抑制VSMCs的增殖,故可用于预防及治疗高血压、冠心病、移植血管病和血管成形术后再狭窄等多种心脑血管疾病。

本研究虽然证明脉炎消口服液通过抑制IL-6抑制HUASMCs的异常增殖,但该抑制作用是通过哪些通路发挥作用还探讨得不够深入,将在以后的研究中加强对通路的探讨并进行体内试验验证。

### 参考文献

- [1] 曲福军,王宏,胡克杰,等.脉炎消注射液药理作用的实验研究[J].中国中医药科技,1998,5(2):88.
- [2] 中国高血压防治指南修订委员会.中国高血压防治指南2010[J].中华高血压杂志,2011,19(8):701.
- [3] Tsirlis TD, Papastratis G, Masselou K, et al. Circulating lymphangiogenic growth factors in gastrointestinal solid tumors, could they be of any clinical significance[J].

*World J Gastroenterol*, 2008, 14(17): 2 691.

- [4] 杜春芸,汤晓军,张涛,等.Noggin对脑缺血大鼠自主神经系统活动的影响[J].生物物理学报,2008,24(1):15.
- [5] 温进坤,石纓.血管平滑肌细胞增殖调控机理的研究进展[J].生理科学进展,1996,27(2):149.
- [6] Hossain MZ, Ao P, Boynton AL. Rapid disruption of gap junctional communication and phosphorylation of connexin 43 by platelet-derived growth factor in T51B rat liver epithelial cells expressing platelet-derived growth factor receptor[J]. *J Cell Physiol*, 1998, 174(1): 66.
- [7] 何婷,汤奇,曾南,等.荆芥挥发油及其主要成分抗流感病毒作用与机制研究[J].中国中药杂志,2013,38(11):1 772.
- [8] 初洁秋,韩莉,李春雯,等.脉炎消注射液治疗周围血管病的临床疗效观察[J].中国中西医结合外科杂志,1996,2(3):141.
- [9] 高继平,王书桂,黄平平,等.脉炎消治疗多发性大动脉炎39例临床分析[J].中国中西医结合外科杂志,1996,2(3):144.

\*副教授。研究方向:中药新药与中药炮制原理。电话:0531-82602964。E-mail:liuzhe1166@163.com

(收稿日期:2013-09-16 修回日期:2013-11-15)