

疫机制,本试验在此基础上观察了 PL 对荷瘤小鼠 T 淋巴细胞 CD4⁺、CD8⁺亚群的影响。实验结果表明,荷瘤小鼠经 PL 高、中剂量(1.982、0.991 g/kg)灌胃给药干预后,外周血中 T 淋巴细胞及其 CD4⁺亚群、CD4⁺/CD8⁺数量显著提高,并接近正常小鼠水平。结果提示,余甘子叶提取物能提高 T 淋巴细胞及其 CD4⁺亚群相对数量,使 T 淋巴细胞 CD4⁺/CD8⁺比例接近正常值,由此推测,该作用可能是其抗肿瘤的免疫学机制之一。

参考文献

[1] 黄燕,罗雪菲,李舒,等.余甘子叶提取物对荷瘤小鼠抑制及免疫功能影响的研究[J].时珍国医国药,2011,22(9):2204-2206.

[2] 曾春兰,钟振国.余甘子叶提取物体外抗肿瘤作用研究[J].时珍国医国药,2008,19(3):580-583.
 [3] 钟振国,罗雪菲,黄金兰,等.余甘子叶提取物对小鼠免疫功能的影响研究[J].中药材,2013,36(3):441-444.
 [4] 钟振国,曾春兰.余甘子叶提取物体外抗菌实验研究[J].中药材,2008,31(3):428-431.
 [5] 李宗友.余甘子叶提取物的抗炎作用[J].国外医学:中医中药分册,1998,20(4):52.
 [6] 金从国,王熙才,伍治平,等.癌症患者外周血 T 细胞亚群水平及临床意义[J].肿瘤研究与临床,2003,15(1):33-34.

(编辑 陈明伟)

化痰活血益心方对压力负荷性心肌肥厚大鼠 Ang₂、Trx 的影响

覃裕旺¹,王庆高¹,朱智德²,卢健棋¹,王振常¹,凌芸³

(1.广西中医药大学第一附属医院,广西南宁 530023;2.广西中医药大学制药厂,广西南宁 530023;3.广西中医药大学附属护理学院,广西南宁 530023)

摘要 [目的]研究血管紧张素(Ang₂),硫氧还蛋白(Trx)在大鼠压力负荷性心肌肥厚中的表达及化痰活血益心方的干预作用。[方法]采用部分缩窄腹主动脉方法制作大鼠压力负荷性心肌肥厚模型,模型对照组造模不给药,中药组(大、中及常规剂量组)造模2周后给予化痰活血益心方(10倍常规剂量、5倍常规剂量及常规剂量,常规剂量为0.12 g/kg),卡托普利组造模2周后给予卡托普利6.75 mg/kg,每日灌胃1次,共4周。观察各组大鼠心肌Ang₂、Trx的含量。[结果]与模型对照组比较,中药大、中、常规剂量组及卡托普利组均能显著降低压力负荷性大鼠心肌Ang₂含量(P<0.01),中药大剂量组、卡托普利组降低Ang₂与中药常规剂量、中剂量组比较,差异有显著性意义(P<0.01或P<0.05)。各组心肌Trx蛋白表达比较,与模型对照组比较,中药大、中、常规剂量组及卡托普利组Trx蛋白明显增加(P<0.01),中药大剂量组Trx蛋白表达与中药中、常规剂量组比较,差异有显著性意义(P<0.01)。[结论]化痰活血益心方能通过升高Trx及降低Ang₂发挥抗氧化应激损伤作用,且化痰活血益心方大剂量升高Trx及降低Ang₂作用更显著。

关键词 化痰活血益心方;心肌肥厚;Ang₂;Trx;实验研究

中图分类号 R285.5 文献标识码 A 文章编号 2095-4441(2015)02-0006-03

心肌肥厚的发生发展过程与氧化应激有着密切的联系。血管紧张素(Ang₂)是调控心血管系统稳定性的重要神经体液因子,可作为一种内在的氧化剂促使氧化应激的发生,在高血压、糖尿病等疾病的心脏损害中发挥重要作用^[1]。硫氧还蛋白(Trx)是机体重要的小分子蛋白质,与体内细胞氧化还原反应、核酸代谢、细胞生长及肿瘤发生有关,在组织的抗氧化负荷反应中起重要的作用^[2]。笔者采用部分缩窄腹主动脉

方法制作大鼠心肌肥厚模型,观察Ang₂、Trx在大鼠心肌肥厚模型中的表达及化痰活血益心方的干预作用,以进一步阐明氧化应激在心肌肥厚中的作用机制及化痰活血益心方的作用机理。

1 实验材料

1.1 动物 选用清洁级Wistar大鼠,雌雄各半,体重220~

收稿日期 2015-04-25

基金项目 广西自然科学基金(编号 2010GXNSFA013212)

作者简介 覃裕旺(1969-),副主任医师,研究方向:中西医结合防治心血管病的基础与临床研究

通信作者 朱智德

250 g, 由广西医科大学医学实验动物中心提供, 合格证号: SCXK 桂 2003-0003。

1.2 药物 化痰活血益心方(组方: 陈皮 15 g, 法半夏 10 g, 茯苓 15 g, 党参 30 g, 生姜 6 g, 丹参 10 g, 川芎 10 g, 桂枝 10 g, 砂仁 6 g, 炙甘草 10 g 等), 由广西中医药大学第一附属医院药房提供, 经干燥、称重、浸泡、煎煮 3 次, 浓缩留存。

1.3 试剂 Ang 测试盒购自上海拜耳生物科技有限公司; Trx 一抗(CST), BCA 蛋白浓度测定试剂盒(武汉博士德生物技术有限公司), RIPA 裂解液(武汉博士德生物技术有限公司)。

2 方法

2.1 大鼠心肌肥厚造模方法 采用部分缩窄腹主动脉方法造模^{[3]1698}。以 30 mg/kg 的戊巴比妥钠腹腔内注射麻醉, 将大鼠仰卧位固定于鼠板, 剪去术野皮毛, 皮肤消毒后行腹正中切口, 切开皮肤及肌层, 暴露内脏, 将大鼠胃及其肠系膜等推向右侧, 暴露肾脏及脊柱前的腹主动脉, 在肾动脉分支上方分离腹主动脉约 1 cm 长, 用 7 号注射器针头紧贴腹主动脉, 平行放置, 并将两者一起结扎, 然后抽出注射器针头, 即可部分缩窄腹主动脉。术后每天用青霉素(5 万单位/只)腹腔注射, 连续 7 天。3~4 天大鼠心肌即开始肥厚, 2~3 周达稳定高峰。

2.2 分组及给药 取 Wistar 大鼠 50 只进行造模, 另取 10 只大鼠为空白组。造模大鼠随机分为模型对照组, 中药大、中、常规剂量组, 卡托普利组, 每组 10 只。空白组: 正常饲养。模型对照组: 造模 2 周后灌胃等量生理盐水, 每日灌胃 1 次, 共 4 周。中药常规剂量组: 造模 2 周后给予化痰活血益心方, 灌胃量按《药理实验方法学》^{[3]364} 进行换算, 每 100 g 大鼠每日给药量为 12 mg, 每日灌胃 1 次, 共 4 周。中药中剂量组: 造模 2 周后给予化痰活血益心方, 给予 5 倍常规剂量。每日灌胃 1 次, 共 4 周。中药大剂量组: 造模 2 周后给予化痰活血益心方, 给予 10 倍常规剂量。每日灌胃 1 次, 共 4 周。卡托普利组: 造模 2 周后给予卡托普利, 每 100 g 大鼠每日给药量为 0.675 mg, 每日灌胃 1 次, 共 4 周。

2.3 Ang 含量检测(ELISA 法) 按照试剂盒内说明书进行检测。实验结束后, 迅速从大鼠心脏将左心室分离出, 置于在 -80 °C 冰箱保存备用。检测时将心肌组织匀浆, 3 000 g 离心 10 min, 取上清液测定心肌组织 Ang 的含量。

2.4 Trx 及内参 β -actin 蛋白检测(Western blot 法) 取大鼠左心室组织, 置于预先加有蛋白酶抑制剂的细胞裂解液中, 剪碎, 匀浆, 提取总蛋白, 用 BCA 法测总蛋白浓度。每个标本取含有 30 μ g 蛋白的样本进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 转膜, 封闭, 一抗过夜, 洗膜, 二抗孵育, 然后对膜进行化学发光, X 光片显影, 采用 Image J1.48v 图像分析软件对 X 光片中的目的蛋白及 β -actin 的条带进行灰度分析, 用目的蛋白和 β -actin 的灰度值的比值代表目的蛋白的相对表达含量。

2.5 统计学处理 计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 组间比较采用单因素方差分析, 用四川大学华西医学院 PEMS3.1 统计软件进行分析。

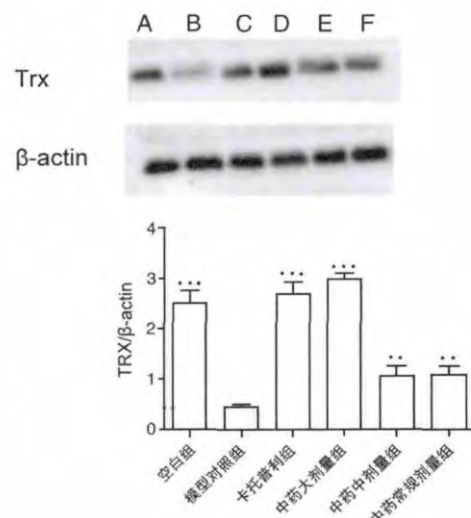
3 结果

3.1 各组心肌 Ang 含量比较 与模型对照组比较, 中药大、中、常规剂量组及卡托普利组均能显著降低压力负荷性大鼠心肌 Ang 含量($P<0.01$), 中药大剂量组、卡托普利组降低 Ang 与中药常规剂量、中剂量组比较, 差异有显著性意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。中药大剂量组与卡托普利组在降低 Ang 含量差异无显著性意义($P>0.05$)。见表 1。

组别	n	Ang
空白组	10	37.68 \pm 10.04 ^①
模型对照组	10	124.38 \pm 23.09
卡托普利组	10	61.24 \pm 17.61 ^{②②}
中药常规剂量组	10	84.55 \pm 20.32 ^{③④}
中药中剂量组	10	79.28 \pm 13.64 ^{③④⑥}
中药大剂量组	10	54.79 \pm 18.03 ^{①②⑤⑦⑧}

注: 与模型对照组比较, ① $P<0.01$; 与空白组比较, ② $P<0.05$, ③ $P<0.01$; 与卡托普利组比较, ④ $P<0.05$, ⑤ $P>0.05$; 与中药常规剂量组比较, ⑥ $P>0.05$, ⑦ $P<0.01$; 与中药中剂量组比较, ⑧ $P<0.01$

3.2 各组心肌 Trx 蛋白表达比较 与模型对照组比较, 中药大、中、常规剂量组及卡托普利组 Trx 蛋白明显增加($P<0.01$), 中药大剂量组 Trx 蛋白表达与中、常规剂量组比较, 差异有显著性意义($P<0.01$)。见图 1。



注: 与模型对照组比较, $***P<0.01$; 与卡托普利、中药大剂量组比较, $**P<0.01$

A 空白组 B 模型对照组 C 卡托普利组 D 中药大剂量组
E 中药中剂量组 F 中药常规剂量组

图 1 各组心肌 Trx 蛋白表达

4 讨论

Ang 一方面能通过氧化应激途径引起心肌肥大, 另一方面 Ang 又可促进 ROS 生成, 进而活化相应信号转导通路, 调控心肌细胞肥大及凋亡^[4-5]。Nakagami 等^[6]用 Ang 诱导新生鼠心肌细胞肥大, 研究发现肥厚反应由 $O_2^{\cdot-}$ 介导, 抗氧

化剂能减轻氧化应激,所有反应可被血管紧张素 1 型受体(AT1R)阻断剂所阻断。提示 Ang 与 AT1R 结合后,可激活 NADPH 氧化酶产生 $O_2^{\cdot-}$ 。

Trx 蛋白是机体抗氧化防御系统的主要部分,是维持细胞内氧化还原稳态的第一线还原系统。其抗氧化作用表现在两个方面^[7]:①直接或作为某些过氧化物酶的电子供体清除氧自由基;②作为细胞内巯基还原酶,还原多种蛋白质的二硫键,使其恢复生理功能。Trx 蛋白对细胞功能具有广泛的调节作用,其中之一便是抑制心肌肥大,因此被认为是治疗心肌肥大的理想靶点。Yanfei Yang 等^[8]实验发现 Ang 可上调 Trx1, Trx1 的高表达又上调了 miR-98 的转录,而 miR-98 能显著抑制心肌肥大,说明 Trx 蛋白能够逆转 Ang 诱导的心肌肥大。在原发性高血压患者中,GSH(谷胱甘肽过氧化物酶)系统无论在血浆还是单核细胞中均降低,相反 Trx 呈增高趋势。Trx 过度表达可削弱 Ang 诱导超氧阴离子和 H_2O_2 产生,显著减少 Nox2(NADPH 氧化酶胞膜相关亚单位)、p47 phox(Nox 胞浆亚单位)和 Rac(三磷酸鸟嘌呤核苷结合蛋白)的表达^[9]。

本课题组前期研究结果表明,化痰活血益心方具有显著降低压力负荷性大鼠全心重量指数、左心室重量指数,说明化痰活血益心方具有抗心肌肥厚的作用^[10]。本次研究结果显示,与模型对照组比较,中药大、中、常规剂量组及卡托普利组均能显著降低压力负荷性大鼠心肌 Ang 含量($P<0.01$),中药大剂量组、卡托普利组降低 Ang 的含量与中药常规剂量、中剂量组比较,差异有显著性意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。中药大剂量组与卡托普利组在降低 Ang 含量方面差异无显著性意义($P>0.05$)。说明化痰活血益心方具有抗 Ang 的作用,且与剂量有一定关系。模型对照组 Trx 蛋白表达低,中药大、中、常规剂量组及卡托普利组 Trx 蛋白明显增加($P<0.01$),大剂量组 Trx 蛋白表达高于中、常规剂量组($P<0.01$)。说明化痰活血益心方能通过升高 Trx 及降低 Ang 发挥抗氧化应激损伤作用,从而抑制氧化应激途径引起的心肌肥大。化痰活血益心方抗氧化应激损伤作用与剂量有一定关系,其机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] 顾玉梅. 氧化应激在心肌肥厚中的作用及其机制 [J]. 南通大学学报:医学版, 2005, 25(3): 233-封3.
- [2] Powis G, Montfort W R. Properties and biological activities of thioredoxins [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2001, 41: 261-295.
- [3] 魏伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学[M]. 4版. 北京: 人民卫生出版社, 2010.
- [4] Hingtgen S D, Tian X, Yang J, et al. Nox2-containing NADPH oxidase and Akt activation play a key role in angiotensin induced cardiomyocyte hypertrophy [J]. Physiol Genomics, 2006, 26(3): 180-191.
- [5] Cheng T H, Shi N L, Chen C H, et al. Role of mitogen activated protein kinase pathway in reactive oxygen species mediated endothelin-1-induced beta-myosin heavy chain gene expression and cardiomyocyte hypertrophy [J]. J Biomed Sci, 2005, 12(1): 123-133.
- [6] Nakagami I H, Takemoto M, Liao J K. NADPH oxidase derived superoxide anion mediates angiotensin induced cardiac hypertrophy [J]. J Mol Cell Cardiol, 2003, 35(7): 851.
- [7] Koharvova M, Kolarova M. Oxidative stress and thioredoxin system [J]. Gen Physiol Biophys, 2008, 27(2): 71-74.
- [8] Yanfei Yang, Tetsuro Ago, Peiyong Zhai, et al. Thioredoxin 1 Negatively Regulates Angiotensin-Induced Cardiac Hypertrophy through Upregulation of miR-98/let-7 [J]. Circ Res, 2011, 108(3): 305-313.
- [9] 杨峥, 姚超永. 氧化应激与高血压 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2011, 19(5): 455-458.
- [10] 覃裕旺, 朱智德, 王庆高, 等. 化痰活血益心方对大鼠压力负荷性心肌肥厚氧化应激的影响 [J]. 广西中医药大学学报, 2015, 18(1): 6-8.

(编辑 陈明伟)

小鼠骨质疏松合并骨性关节炎模型的建立及评价

彭冰¹, 胡正国², 宋才渊¹, 王刚¹

(1. 浙江中医药大学第一临床医学院, 浙江 杭州 310053; 2. 浙江中医药大学第二临床医学院 浙江 杭州 310053)

摘要 [目的] 探讨骨质疏松合并骨性关节炎的小鼠动物模型的制备方法。[方法] ICR 雌性小鼠 20 只, 随机分成对照组和模型组各 10 只。模型组采取切除双侧卵巢 4 周后膝关节注射碘乙酸制备模型, 对照组不作任何处理。碘乙酸注射 8 周后对小鼠进行 X-ray 活体成像观察, 并测定骨密度; 取膝关节及腰椎做病理切片行 HE 染色观察。[结果] 模型组小鼠骨密度明显下降,

收稿日期 2015-01-19

作者简介 彭冰(1990-), 男, 湖南湘潭人, 医学硕士, 主要从事骨性关节炎及代谢性骨骼疾病研究