

芪参益气滴丸含药血清抑制血管平滑肌细胞增殖作用的实验研究

张新颖

(天津市第四中心医院中医科,天津 300241)

摘要:目的 以芪参益气滴丸为例,探讨含药血清药理学作用,观察芪参益气滴丸含药血清对血管平滑肌的作用。方法 将雄性SD大鼠11只随机分为含药血清组6只,正常血清组5只。含药血清组给予芪参益气滴丸,按0.135 g/(kg·d)灌胃,正常血清组灌服等体积生理盐水,连续灌胃5 d,末次给药后提取含药血清。将含药血清分成:1%、3%、5%、10%、20%含药血清组,与相同浓度正常血清组同时作用于血管平滑肌,CCK8测定芪参益气滴丸含药血清对血管平滑肌细胞(VSMC)增殖的影响。结果 同步化较非同步化组细胞增殖稳定,误差较小;经24 h含药血清作用,5%含药血清、10%含药血清、20%含药血清均能抑制平滑肌细胞增殖,且10%含药血清抑制更明显,20%含药血清抑制相对较差;1%含药血清组与1%正常血清组不同时间点OD值比较,差异无统计学意义($P>0.05$);作用于VSMC 6、12 h后,不同浓度含药血清组与正常血清组OD值比较,差异无统计学意义($P>0.05$);作用于VSMC 24 h后,5%含药血清组OD值低于5%正常血清组($P<0.01$),10%含药血清组OD值低于10%正常血清组($P<0.001$);作用于VSMC 48 h后,10%、20%含药血清组OD值低于正常血清组($P<0.05$);5%含药血清OD值低于5%正常血清组($P<0.001$);72 h后不同浓度梯度均出现较其他时间点下降趋势,3%、10%含药血清组OD值分别低于同浓度正常血清组($P<0.05$);5%含药血清OD值低于5%正常血清组($P<0.001$)。结论 现代中药含药血清提取多样化,采用连续多次给药能有效保证含药血清的药效浓度。提取后血清经不同浓度实验,选取最佳浓度以利于进一步实验研究。

关键词:芪参益气滴丸含药血清;血管平滑肌;细胞增殖;CCK8

中图分类号:R322.1+2

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2022.11.034

文章编号:1006-1959(2022)11-0130-05

Experimental Study on Inhibition of Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation by Serum Containing Qishen Yiqi Dropping Pill

ZHANG Xin-ying

(Department of Traditional Chinese Medicine,Tianjin Fourth Central Hospital,Tianjin 300241,China)

Abstract: Objective To investigate the pharmacological effect of serum containing Qishen Yiqi Dropping Pills and observe the effect of serum containing Qishen Yiqi Dropping Pills on vascular smooth muscle. **Methods** Eleven male SD rats were randomly divided into drug-containing serum group (6 rats) and normal serum group (5 rats). The drug-containing serum group was given Qishen Yiqi dropping pills by gavage at 0.135 g/(kg·d), and the normal serum group was given the same volume of normal saline by gavage for 5 days. After the last administration, the drug-containing serum was extracted. The drug-containing serum was divided into: 1%, 3%, 5%, 10%, 20% drug-containing serum groups, and the same concentration of normal serum group at the same time on vascular smooth muscle cells, CCK8 determination of Qishen Yiqi dropping pills containing serum on VSMC proliferation. **Results** Compared with the non-synchronization group, the cell proliferation in the synchronization group was stable and the error was small; after 24-hour drug-containing serum treatment, 5% drug-containing serum, 10% drug-containing serum and 20% drug-containing serum groups could inhibit the proliferation of smooth muscle cells, and the inhibition of 10% drug-containing serum group was more obvious, while that of 20% drug-containing serum was relatively poor. There was no significant difference in OD value between 1% drug-containing serum group and 1% normal serum group at different time points ($P>0.05$). After acting on VSMC for 6 and 12 h, there was no significant difference in OD values between drug-containing serum groups with different concentrations and normal serum groups ($P>0.05$). After acting on VSMC for 24 h, the OD value of 5% drug-containing serum group was lower than that of 5% normal serum group ($P<0.01$), and that of 10% drug-containing serum group was lower than that of 10% normal serum group ($P<0.001$). After acting on VSMC for 48 h, OD values of 10% and 20% drug-containing serum groups were lower than those of normal serum groups ($P<0.05$). OD value of 5% drug-containing serum was lower than that of 5% normal serum group ($P<0.001$); after acting on VSMC for 72 h, the OD values at different concentrations showed a downward trend compared with those at other time points. The OD values of 3% and 10% drug-containing serum groups were lower than those of the normal serum group at the same concentration ($P<0.05$), and the OD value of 5% drug-containing serum was lower than that of 5% normal serum group ($P<0.001$). **Conclusion** The extraction of modern Chinese medicine drug-containing serum is diversified, and continuous multiple administration can effectively ensure the effective concentration of drug-containing serum; the serum after extraction was subjected to different concentrations, and the optimal concentration was selected for further experimental study.

Key words: Serum containing Qishen Yiqi dropping pill; Vascular smooth muscle; Cell proliferation; CCK8

中药复方研究注重中药作用整体性,往往局限于临床研究及动物实验研究^[1]。有研究显示,直接应

用中药复方作用于实验细胞后,细胞出现大量死亡现象。另有学者认为,中药在临床应用过程中常以复方形式治疗疾病,复方经过人体的消化与吸收后发挥药效可能不同于中药单一的作用效果。目前,中药血清药理学与血清药理化学的研究^[2]及两者的相结合成为最新的研究热点,为中药复方研究及发展提

基金项目:天津市卫生健康委员会、天津市中医药管理局中医中西医结合科研课题(编号:2021060)

作者简介:张新颖(1986.4-),女,天津人,博士,住院医师,主要从事中医中药治疗心血管疾病的研究及临床工作

供了新的研究方向^[3]。本实验中提取中药复方含药血清作用于细胞实验中,探索细胞研究中的方法及应用,旨在为研究者开展血清药理学研究提供相应的理论与方法支持。

1 材料与方法

1.1 实验动物 雄性SD大鼠11只,体重180~220 g,6~8周龄,由北京军事医学科学院实验动物中心提供,符合动物伦理要求。

1.2 试剂及仪器 芪参益气滴丸(天津天士力制药集团股份有限公司生产)、生理盐水、CCK8(日本同仁)、DMEM培养基(Gibco公司)、胎牛血清(FBS兰州百灵优级血清)、倒置相差显微镜、二氧化碳恒温培养箱(IL-161HI)、酶标仪(flexstation3)、离心机(LD5-2A)。

1.3 大鼠血管平滑肌细胞(VSMC)体外培养 SD大鼠提取原代细胞:3%的水合氯醛腹腔麻醉,打开胸腔,用眼科剪及眼科镊迅速分离出胸主动脉,放入无菌加入1%双抗的PBS中。采用高糖DMEM培养基培养,其中含有20%的FBS,1%双抗,细胞在37℃、5%CO₂、饱和湿度条件下培养,1周后观察细胞生长情况;若贴壁良好,观察到细胞已经从组织块爬出,可更换细胞培养液,待细胞生长至80%~90%融合时,进行首次传代^[4];每3天传代1次,传至第3代更换为含10%胎牛血清DMEM培养基培养,并经血管平滑肌肌动蛋白(α -actin)免疫组织化学鉴定^[5,6]。倒置显微镜直接观察细胞形态并拍照。

1.4 芪参益气滴丸含药血清制备 首先将大鼠进行标号,应用随机数字表法进行分组,分为含药血清组6只,正常血清组5只,含药血清组给予大鼠芪参益气滴丸,按0.135 g/(kg·d)灌胃(按照鼠与人体每千克体重剂量折算系数6.25计算)^[7],每只大鼠2 ml/(次·d)灌胃,正常血清组灌服等体积生理盐水,连续灌胃5 d,末次给药2次,中间间隔1 h。最后给药后1 h,10%水合氯醛(0.3 ml/100 g)腹腔麻醉、固定、消毒^[8],无菌手术剪打开腹腔,分离腹主动脉。使用0.2 mm血样采集针迎血流方向插入腹主动脉,将血接入不抗凝管中。室温下静置3~4 h,3000 r/min,离心15 min,无菌分离血清,同组血清混合,用0.22 μ m微孔滤膜过滤,置于无菌离心管中,-20℃保存备用,使用之前经56℃水浴灭活30 min^[9]。

1.5 CCK8测定芪参益气滴丸含药血清对VSMC增殖的影响

1.5.1 芪参益气滴丸含药血清对VSMC影响 取3~8代对数生长期细胞,按照3000个/孔密度种板。分为1%双抗的DMEM培养液同步化组和非同步化组,每组分别再分为5%正常血清组、10%正常血清组、20%正常血清组、5%含药血清组、10%含药血清组、

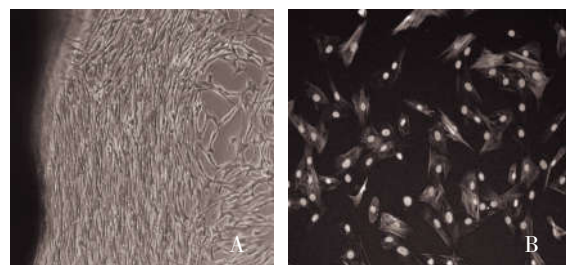
20%含药血清组,每组4个复孔。细胞于37℃、5%CO₂、饱和湿度条件下分别培养为24 h后,加入预混均匀的100 μ l新鲜无血清培养基和10 μ l的CCK8溶液,将培养板在培养箱内孵育2 h,450 nm处酶标仪检测其吸光度(OD值)^[10]。

1.5.2 芪参益气滴丸对VSMC增殖的影响 取3~8代对数生长期细胞,按照3000个/孔密度种板。用含有1%的FBS,1%双抗的DMEM培养液同步化24 h,设定5个浓度,即正常血清组:1%正常血清组、3%正常血清组、5%正常血清组、10%正常血清组、20%正常血清组。含药血清组:1%含药血清组、3%含药血清组、5%含药血清组、10%含药血清组、20%含药血清组,每组4个复孔。细胞于37℃、5%CO₂、饱和湿度条件培养,分别在血清作用6、12、24、48、72 h取样,用酶标仪在450 nm波长处测定各组细胞的吸光度。检测时,用移液器吸弃待测孔培养基,并加入预混均匀的100 μ l新鲜无血清培养基和10 μ l的CCK8溶液,将培养板在培养箱内孵育2 h,450 nm处酶标仪检测其吸光度^[10]。

1.6 统计学方法 数据采用SPSS 19.0统计软件进行分析,对所测结果进行正态性及方差齐性检验,所有符合正态分布的计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,若方差齐用LSD检验,方差不齐采用Dunnett'T3检验, $P \leq 0.05$ 认为差异有统计学意义, $P < 0.01$ 表示统计学意义显著, $P < 0.001$ 表示统计学意义极显著。

2 结果

2.1 细胞鉴定结果 细胞培养2周后呈放射性生长,细胞已经融合,部分地区高低起伏呈“峰-谷”生长,细胞形态多样,可见细胞呈梭形、多角形、不规则形等(图1A),符合平滑肌细胞峰-谷生长特点;经高内涵检测细胞形态多为梭形和菱形,符合VSMC形态。同时细胞浆中 α -actin蛋白高度表达,呈阳性,显示所得细胞为纯度较高的VSMC(图1B)。



注:A:显微镜下VSMC;B:高内涵检测平滑肌细胞,荧光染色细胞呈绿色,应用 α -actin单克隆抗体标记细胞含有 α -actin蛋白呈蓝色

图1 细胞鉴定结果

2.2 同步化组与非同步化组对平滑肌细胞增殖影响 同步化组与未经同步化组比较,同步化组细胞增殖

稳定,误差较小;经24 h含药血清作用,5%含药血清、10%含药血清、20%含药血清均能抑制平滑肌细胞增殖,且10%含药血清抑制更明显,20%含药血清抑制相对较差,见表1、图2。

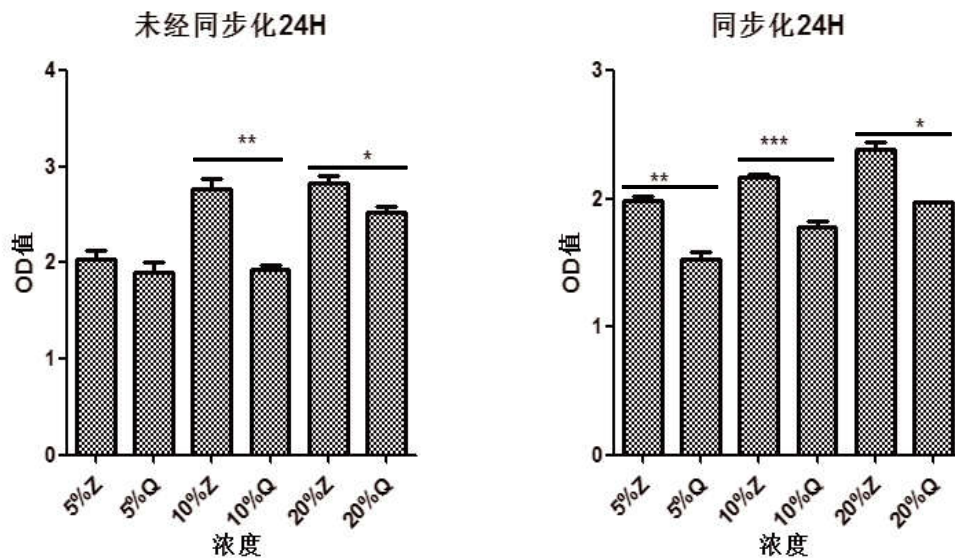
2.3 不同浓度梯度及作用时间对VSMC抑制作用
1%含药血清组与1%正常血清组不同时间点OD值比较,差异无统计学意义($P>0.05$);作用于VSMC 6、12 h后,不同浓度含药血清组与正常血清组OD值比较,差异无统计学意义($P>0.05$);作用于VSMC 24 h后,5%含药血清组OD值低于与5%正常血清组($P<0.01$),10%含药血清组OD值低于10%正常血清组($P<0.001$);作用于VSMC 48 h后,10%、20%含药血清组OD值低于正常血清组($P<0.05$);5%含药血清OD值低于5%正常血清组($P<0.001$);72 h后不同

浓度梯度均出现较其他时间点下降趋势,3%、10%含药血清组OD值分别低于同浓度正常血清组($P<0.05$),5%含药血清OD值低于5%正常血清组($P<0.001$),见表2、图3。

表1 同步化与未同步化组含药血清OD值比较($\bar{x}\pm s$)

组别	同步化组	非同步化组
5%Z	1.9790±0.7277	2.0366±0.1566
5%Q	1.5237±0.1131**	1.8999±0.1428
10%Z	2.1669±0.0315	2.7651±0.1492
10%Q	1.7824±0.0718***	1.9229±0.7884**
20%Z	2.3841±0.8824	2.8255±0.1388
20%Q	1.9700±0.0013*	2.5186±0.1242*

注:Z表示正常血清组,Q表示含药血清组;* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$



注:Z表示正常血清组,Q表示含药血清组;* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$

图2 两组不同浓度含药血清对细胞增殖作用比较

表2 不同浓度含药血清在不同时间OD值比较($\bar{x}\pm s$)

组别	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
1%Z	0.6567±0.3657	0.7291±0.0618	1.3952±0.0283	1.6572±0.0868	1.2682±0.0840
1%Q	0.8545±0.1762	0.8424±0.1099	1.4080±0.0508	1.6902±0.1051	2.1505±0.4239
3%Z	0.8239±0.1114	0.8405±0.1564	1.5030±0.1090	1.8450±0.1466	1.7623±0.0441
3%Q	0.8417±0.0334	1.0395±0.0217	1.5840±0.0629	1.9604±0.0738	1.5362±0.0230
5%Z	0.7303±0.1256	0.8709±0.0897	1.9791±0.0727	2.4571±0.0790	2.2906±0.1466
5%Q	0.7359±0.0711	0.8571±0.0487	1.5237±0.1131	2.0395±0.0453	1.6864±0.0934
10%Z	1.1167±0.0820	1.0200±0.0214	2.1669±0.0315	2.8163±0.0545	2.6828±0.1825
10%Q	0.9886±0.1913	1.0050±0.0537	1.7824±0.0718	2.3777±0.1560	2.2162±0.0287
20%Z	0.8678±0.0538	1.1291±0.0385	2.3841±0.0882	2.9644±0.0615	2.5317±0.1677
20%Q	0.7519±0.2159	1.0935±0.0880	1.9700±0.0013	2.7594±0.0371	2.8569±0.0975

注:Z表示正常血清组,Q表示含药血清组;24 h,5%Q与5%Z比较, $P<0.01$,10%Q与10%Z比较, $P<0.001$;48 h,10%Q与10%Z比较,20%Q与20%Z比较, $P<0.05$,5%Q与5%Z比较, $P<0.001$;72 h,3%Q与3%Z比较、10%Q与10%Z比较, $P<0.05$,5%Q与5%Z比较, $P<0.01$

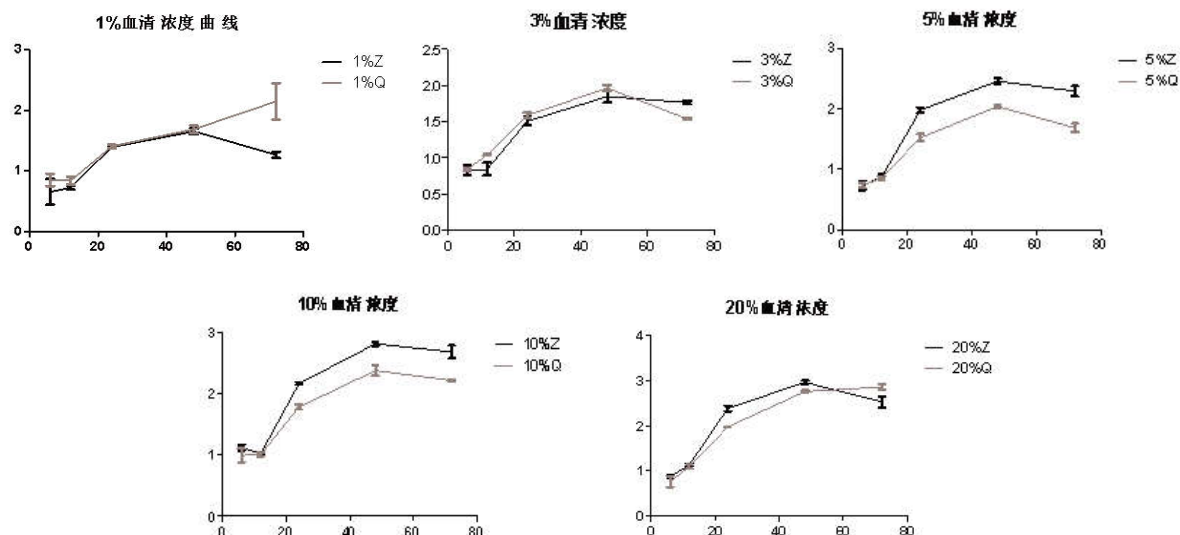


图3 不同浓度含药血清在不同时间对细胞增殖作用曲线

3 讨论

中药成分复杂多样,药物进入人体,经代谢后产生的新的化合物更是复杂多样,且难以探究^[1]。血清药理学通过给动物灌胃药物,取其血清作为药物源进行药理学观察,并进行药理实验,比较接近药物体内环境中产生药理作用的真实过程,能够很好的进行中草药效观察与研究^[12]。提取的含药血清进行体外实验,能够防止中药粗制剂理化性质干扰,同时能够反映出中药经胃肠道消化吸收后,经生物转化,产生的药理效应^[13]。现随着科学技术提高和新技术的应用,中药的单体成分成功分离,导致中药整体性被割裂^[14];传统口服给药形式,使中药只有被消化道吸收进入体内,才能发挥中药活性,一部分是中药本身活性,一部分是中药进入人体产生代谢产物发挥的活性^[15]。本实验通过灌胃芪参益气滴丸提取动物血清,并将其作用同源动物的平滑肌细胞,通过对血管平滑肌的作用,观察不同浓度的芪参益气滴丸含药血清对VSMC的作用。

本研究结果显示,经同步化后正常血清组及含药血清组随浓度升高,细胞增殖及药效作用较未同步化稳定;经同步化更有利于结果可靠性;同步化的对照组与含药血清组比较,含药血清抑制能够对平滑肌细胞增殖,但不随浓度增加而增强;24 h后10%含药血清组较10%正常血清组药效作用最强,48 h后5%含药血清较5%正常血清组药效作用最强,说明在进行含药血清对平滑肌增殖实验时,并不是含药血清浓度越高,药效作用越大;芪参益气滴丸含药血清抑制血管平滑肌作用较短时间与正常血清组无明显差异,低浓度作用时间越长,药效作用越明显;高浓度同样短时间与正常血清组无差异,而作用

时间越长,其药效的抑制作用并不会增强,考虑可能与除药物经代谢后产生的化合物外,血清本身含有的生长因子有关。目前研究制备含药血清给药方法多样化,为使药物能够达到稳态需要浓度,现在主要采用每天灌胃1次,连续给药7~10 d^[8]及连续3次给药法^[16],最后1次灌胃后间隔1~2 h取血的方法。本实验采用连续给药5 d,最后1 d为保证药物浓度稳态加强给药,能够达到实验要求,提取后经体外实验药效作用验证,芪参益气含药血清能够抑制血管平滑肌增殖,并与含药血清浓度及作用时间密切相关,与既往研究一致^[17]。

综上所述,在血清药理研究中,对于含药血清的提取必须经过合理的灌胃方法,以保证其含药物质的有效性,并通过细胞实验来明确其作用效果。在血清药理学研究中,含药血清中本身含有细胞增殖所需要的营养物质,对于研究药物抑制增殖相关实验时须经过细胞同步化过程,以更加准确的判断含药血清对细胞增殖的抑制作用。同时,含药血清抑制作用并不依赖含药血清的浓度,并非浓度越高抑制作用越强,其主要原因是由于增加含药血清浓度的同时增加血清中营养物质导致,故在研究含药血清抑制相关细胞增殖的细胞实验时,须探索出最佳作用浓度,以确保含药血清抑制作用最强。因此,在血清药理学实验中,含药血清提取、同步化过程、含药血清浓度均是决定细胞实验成功与否的条件。

参考文献:

- [1]周跃华,路金才,周娟,等.关于中药新药复方制剂“整体鉴别”新模式的思考[J].中草药,2021,52(8):2199-2204.
- [2]向军,徐莉莉,杨峰,等.续命汤含药血清对氧糖剥夺模型大鼠星形胶质细胞的保护作用研究[J].中国药房,2021,32(1):34-39.

(下转第137页)

(上接第 133 页)

- [3]吴沅峰,刘维,赵文甲,等.血清药理学方法对药理、药效学和新药研发的贡献[J].中国组织工程研究,2018,22(24):3914-3920.
- [4]金朝霞,徐成胜.肌肽对血管平滑肌细胞钙化的影响及机制研究[J].河北医学,2022,28(3):358-362.
- [5]胡明亮,黄莺,雷艳,等.三种血管平滑肌细胞的体外培养[J].现代医院,2015,15(8):22-23.
- [6]刘姿麟,林慕之,况春燕,等.大鼠主动脉血管平滑肌细胞原代培养与鉴定[J].贵州医科大学学报,2017,42(2):125-129.
- [7]吴磊,陆超,居文政.大鼠灌胃清热养心颗粒后血浆中咖啡酸、绿原酸药代动力学研究[J].江苏中医药,2015,47(5):74-76.
- [8]薄华本,王辉,沈晗,等.当归补血汤含药血清制备方案[J].广东药学院学报,2015,31(4):486-489.
- [9]魏雪晨.血栓通胶囊的制备及抗血栓作用研究[D].长春:吉林大学,2020.
- [10]郭春兰,钟秉知,王青,等.补阳还五汤含药鼠血清对 Rho 激酶介导的血管平滑肌细胞增殖的影响[J].中华中医药学刊,2019,37(11):2625-2628,2823.
- [11]王珊,刘亚倩,侯敏娜,等.龙生蛭胶囊中“黄芪-当归-刺五

- 加”药组治疗 PSCI 的动物实验研究及其作用机制的整合药理学发掘与预测[J].中南药学,2021,19(2):191-197.
- [12]唐锋,梁少瑜,陈飞龙,等.血清药物化学和血清药理学相结合的方法探讨麻黄附子细辛汤抗炎和免疫抑制的物质基础[J].中国中药杂志,2015,40(10):1971-1976.
- [13]李翠华.系统药理学方法解析 Q 方对冠心病的干预作用及其机制研究[D].西安:西北大学,2020.
- [14]李学林,高晓洁,刘瑞新,等.试论中药药性理论的整体性[J].中华中医药杂志,2016,31(6):2038-2041.
- [15]沙子珺,黎彩凤,唐仕欢,等.新资源药材辣木叶抗高脂血症的药效与作用机制探析[J].中国中药杂志,2021,46(14):3465-3477.
- [16]刘林.中药含药血浆与血清有效成分比较及血浆药理学方法研究[D].长沙:湖南中医药大学,2016.
- [17]窦志华,罗琳,侯金燕,等.基于方剂配伍含药血清“谱-效关系”的茵陈蒿汤保肝作用药效物质研究[J].中国医院药学杂志,2016,36(22):1968-1972.

收稿日期:2021-07-17;修回日期:2021-07-21

编辑/肖婷婷