

- Cell Stem Cell*, 2011, 9(5): 402-411.
- [9] Jiang H, Edgar B A. Intestinal stem cells in the adult *Drosophila* midgut[J]. *Exp Cell Res*, 2011, 317(19): 2780-2788.
- [10] Yiorgos A, Laurence G R. *Drosophila melanogaster* as a model for human intestinal infection and pathology[J]. *Dis Models Mech*, 2011, 4(1): 21-30.
- [11] Brumby A M, Richardson H E. Using *Drosophila melanogaster* to map human cancer pathways[J]. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5(8): 626-639.
- [12] 周洋, 柳宗琳, 陈羽臣, 等. 瓜蒌、红花、川芎和菊花提取物对氧化应激诱导的果蝇肠道免疫的影响[J]. 中草药, 2014, 45(15): 2194-2200.
- [13] 李文佳, 刘强, 金丽华. 刺五加提取物对果蝇免疫功能的影响[J]. 中草药, 2012, 43(10): 1997-2001.
- [14] Amcheslavsky A, Jiang J, Ip Y T. Tissue damage-induced intestinal stem cell division in *Drosophila* [J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 4(1): 49-61.
- [15] Pan J, Jin L H. Rgn gene is required for gut cell homeostasis after ingestion of sodiumdodecyl sulfate in *Drosophila* [J]. *Gene*, 2014, 549(1): 141-148.
- [16] Choi N H, Kim J G, Yang J D, et al. Age-related changes in *Drosophila* midgut are associated with PVF2, a PDGF/VEGF-like growth factor[J]. *Aging Cell*, 2008, 7(3): 318-334.
- [17] Biteau B, Hochmuth C E, Jasper H. JNK activity in somatic stem cells causes loss of tissue homeostasis in the aging *Drosophila* gut[J]. *Cell Stem*, 2008, 3(4): 442-455.
- [18] 刘强, 金丽华. 果蝇肠道干细胞增殖与分化机制及其研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 2015(10): 911-919.
- [19] Lee K A, Kim B, Bhin J, et al. Bacterial uracil modulates *Drosophila* DUOX-dependent gut immunity via Hedgehog-induced signaling endosomes[J]. *Cell Host Microbe*, 2015, 17(2): 191-204.
- [20] 余风华, 高婷婷, 张之慧, 等. 新疆紫草不同部位不同溶剂提取物体外抑菌效果的研究[J]. 食品科技, 2014(2): 202-204.
- [21] Li Z, Guo Y, Han L, et al. Debra-mediated Ci degradation controls tissue homeostasis in *Drosophila* adult midgut [J]. *Stem Cell Reports*, 2014, 2(2): 135-144.

## 六味地黄方及配伍对去势雌性大鼠动脉粥样硬化模型的作用

姚远<sup>1</sup>, 吴艳<sup>1</sup>, 马志<sup>1</sup>, 张亚云<sup>1</sup>, 李育<sup>2\*</sup>, 卞慧敏<sup>1,3\*</sup>

(1. 南京中医药大学药学院, 南京 210023; 2. 南京中医药大学基础医学院, 南京 210023; 3. 江苏省中药药效与安全性评价重点实验室, 南京 210023)

**摘要:** 目的 探讨六味地黄方(熟地黄, 山药, 泽泻等)及其配伍对更年期动脉粥样硬化模型大鼠的影响。方法 用健康雌性大鼠, 假手术组切除双侧卵巢下方少量脂肪, 其余动物切除双侧卵巢, 以高脂饲料喂养并灌胃给予维生素D<sub>3</sub>复制大鼠更年期动脉粥样硬化模型。30 d后, 将总胆固醇>5~10 mmol/L的大鼠随机分为6组: 模型组、苯甲酸雌二醇组、六味地黄方组、熟地/泽泻组、山茱萸/丹皮组、山药/茯苓组, 灌胃给药。油红染色检测血管病变程度, 放免法检测血中6-酮-前列腺素F<sub>1α</sub>(6-keto-PGF<sub>1α</sub>)、血栓烷素B<sub>2</sub>(TXB<sub>2</sub>)、炎症相关因子C反应蛋白(CRP)、肿瘤坏死因子α(TNF-α)、白介素6(IL-6)水平, 免疫组化和Western blot法检测大鼠主动脉雌激素膜受体GPR30的表达。结果 六味地黄方及其配伍能够不同程度地减轻模型大鼠血管病变, 改善血中6-keto-PGF<sub>1α</sub>和TXB<sub>2</sub>平衡, 降低血中炎症因子表达, 升高主动脉雌激素膜受体GPR30表达。结论 六味地黄方具有治疗更年期动脉粥样硬化的作用, 各药对相互配伍协同阻止动脉粥样硬化的形成。

**关键词:** 六味地黄方; 更年期动脉粥样硬化; 内皮功能; 炎症因子; 雌激素受体

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2016)10-2111-07

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.10.004

## Effect of Liuwei Dihuang Formula and its compatibility on rats with ovariectomy-induced atherosclerosis

收稿日期: 2016-02-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(81173190); 江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)

作者简介: 姚远(1990—), 男, 硕士生, 研究方向为心血管药理学。Tel: 15298384135, E-mail: 515264779@qq.com

\* 通信作者: 李育(1975—), 女, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为心血管药理学。Tel: 18051986884, E-mail: qqliyu@163.com  
卞慧敏(1958—), 女, 研究员, 博士生导师, 研究方向为心血管药理学。Tel: 13851495212, E-mail: hmbian@sina.com

YAO Yuan<sup>1</sup>, WU Yan<sup>1</sup>, MA Zhi<sup>1</sup>, ZHANG YA-yun<sup>1</sup>, LI Yu<sup>2\*</sup>, BIAN Hui-min<sup>1,3\*</sup>

(1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 2. School of Basic Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 3. Jiangsu Provincial Key Laboratory for Pharmacology and Safety Evaluation of Chinese Materia Medica, Nanjing 210023, China)

**ABSTRACT:** **AIM** To observe the effects of Liuwei Dihuang Formula (*Rehmanniae Radix praeparata*, *Dioscoreae Rhizoma*, *Alismatis Rhizoma*, etc.) and its compatibility on female rats with ovariectomy-induced atherosclerosis. **METHODS** The small amount of fat beneath the ovary was removed in the sham group, the other female rats were ovariectomized and fed with a high-fat diet and VD<sub>3</sub> to induce rats with atherosclerosis. After 30 days, rats of total cholesterol level more than 5 mmol/L were randomly divided into six groups: model, estradiol benzoate, Liuwei Dihuang Formula, Foxglove + Alisma, Dogwood + Dan, Yam + Poria group, administered orally. Oil red staining was used to detect the degree of vascular lesion. The levels of 6-keto-PGF<sub>1α</sub>, TXB<sub>2</sub>, CRP, TNF-α and IL-6 in blood were detected by radioimmunoassay. Immunohistochemical and Western blot analyses were used to detect the expression of GPR30 in aorta. **RESULTS** Liuwei Dihuang Formula and its compatibility reduced vascular disease, improved the balance of 6-keto-PGF<sub>1α</sub> and TXB<sub>2</sub>, reduced the expression of inflammatory factors in the blood, and increased aortic expression of estrogen receptor GPR30 in model rats. **CONCLUSION** Liuwei Dihuang Formula has therapeutic effects on menopause atherosclerosis.

**KEY WORDS:** Liuwei Dihuang Formula; menopause atherosclerosis; endothelial function; inflammatory factor; estrogen receptor

经典名方六味地黄方最早见于《小儿药证直诀》，临床上被广泛的用于骨质疏松，老年痴呆以及心血管疾病等多种女性更年期疾病的治疗<sup>[1-2]</sup>。流行病学研究表明，绝经后女性更年期动脉粥样硬化发病率明显增加<sup>[3]</sup>。前期的实验研究中，我们发现六味地黄方可以明显降低更年期动脉粥样硬化模型大鼠血脂并延缓动脉粥样硬化的发展<sup>[4]</sup>。为进一步的探索六味地黄方对更年期动脉粥样硬化的治疗作用，我们观察了六味地黄方及其配伍对该模型大鼠6-酮-前列腺素F<sub>1α</sub> (6-keto-PGF<sub>1α</sub>)、血栓烷素B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>)、炎症相关因子C反应蛋白(CRP)、肿瘤坏死因子α (TNF-α)、白介素6 (IL-6)以及雌激素受体GPR30的影响。

## 1 实验材料

1.1 动物、药物及试剂 SPF级大鼠，雌性，体质量(210±30)g，由浙江省实验动物中心提供，实验动物生产许可证号：SCXK(浙)2008-0033。药物购自亳州市中西药有限公司，经本校中药鉴定室鉴定为正品，符合实验要求。受试药物的制备：六味地黄方(熟地黄：山萸肉：山药：泽泻：丹皮：茯苓为8：4：4：3：3：3)，熟地/泽泻药对(熟地：泽泻为8：3)，山萸/丹皮药对(山萸：丹皮为4：3)，山药/茯苓药对(山药：茯苓为4：3)，加水煎煮，醇沉，在60℃恒温条件下，浓

缩成1.0g生药/mL的浓缩液，4℃保存备用，用时以0.5%羧甲基纤维素钠将各组浓缩液按在原方中的比例稀释至等容积；苯甲酸雌二醇购自天津金耀氨基酸有限公司(批号1005051)；CRP、TNF-α、IL-6、6-keto-PGF<sub>1α</sub>、TXB<sub>2</sub>放免试剂盒购自北京华英生物技术研究所(批号分别为20110228、20110222、20110223、20110223、20110224)；维生素D<sub>3</sub>购自北京惠康源生物科技有限公司(批号2010072601)；油红O染料购自国药集团化学试剂有限公司(批号LOT.NO.WF20060307SCRC)；异丙醇购自南京化学试剂有限公司(批号09102911057)；甲醛购自上海久亿化学试剂有限公司(批号20060901)；GRP30抗体购自美国Santa cruz公司；β-Actin抗体购自美国Bioworld公司。

1.2 仪器 DT5-3低速自动平衡离心机(北京医用离心机厂)；Q1102电子天平(北京赛多利斯天平有限公司)；DR112电热恒温水浴锅(北京东霞科学仪器厂)；γ-911全自动放免计数仪(安徽中科中佳科学仪器有限公司)；Western电泳仪(美国Bio-Rad公司)；HY-4多用脱色摇床(江苏金坛市正基仪器厂)；微量加样器(德国Eppendorf公司)。

## 2 方法

2.1 大鼠更年期动脉粥样硬化模型的建立 雌性

大鼠以10%水合氯醛(剂量300 mg/kg)腹腔注射麻醉,假手术组切除双侧卵巢下方的部分脂肪,模型组切除双侧卵巢。术后3 d每日一次肌肉注射青霉素20万单位,第4天开始连续5 d阴道涂片观察动情周期,动情周期无变化证明去除卵巢彻底。模型组喂食高脂饲料,高脂饲料按3%胆固醇、0.5%胆酸钠、0.2%丙基硫氧嘧啶、5%白糖、10%猪油、81.3%普通饲料比例加工而成,同时每周加灌维生素D<sub>3</sub>(按15万IU/kg)1次,连续30 d后,取血测总胆固醇(TC),选择TC值5~10 mmol/L的范围内大鼠分组<sup>[4]</sup>。

2.2 分组及给药方法 将TC值5~10 mmol/L的大鼠分为模型组、苯甲酸雌二醇(1.8 × 10<sup>-6</sup> g/kg)

组、六味地黄方(6.75 g/kg)组、熟地/泽泻(2.97 g/kg)组、山茱萸/丹皮(1.89 g/kg)组、山药/茯苓(1.89 g/kg)组。各组在继续喂食高脂饲料的同时灌胃给药,每日1次;苯甲酸雌二醇组肌肉注射每3日一次;假手术组和模型组大鼠灌胃给予等容积的0.5%羧甲基纤维素钠,每日一次,连续给药11周。

2.3 主动脉病变程度检测 (1)将主动脉在配制好的60%异丙醇中浸泡10 min;(2)油红O工作液染色3 h;(3)60%异丙醇分化6~7次,至动脉粥样硬化斑块呈红色;(4)蒸馏水浸洗标本,滤纸小心吸干水分,拍照,并按照表1标准进行评分。

表1 油红O染色动脉评分参照表

Tab.1 Oil red O staining standard score sheets

动脉染色情况	等级	评分/分
内膜表面光滑,无红染	0级	0
有明显的凸起红染斑块,面积小于3 mm <sup>2</sup>	1级	1
斑块面积大于3 mm <sup>2</sup> 的凸起红染斑块	2级	2
斑块融合成片,大部分斑块面积大于3 mm <sup>2</sup>	3级	3
斑块几乎覆盖整个动脉内膜	4级	4
内膜基底有轻度红染	基础级	0.5

2.4 放免法检测6-keto-PGF<sub>1α</sub>、TXB<sub>2</sub>和炎症因子水平 实验大鼠禁食12 h后,用10%水合氯醛(300 mg/kg)腹腔注射麻醉,颈动脉取血1.5 mL放入含有100 μL消炎-EDTA-Na<sub>2</sub>抗凝管中混匀,以4℃、3 500 r/min离心10 min,分离血浆,-20℃保存。同时取血,3 000 r/min离心10 min,分离血清,各标本送北京华英生物技术研究所放射免疫分析检测6-keto-PGF<sub>1α</sub>、TXB<sub>2</sub>、CRP、TNF-α和IL-6水平。

2.5 Western blot法检测雌激素受体GPR30表达 主动脉提取蛋白后,SDS-聚丙烯凝胶恒压电泳,电泳前对样本进行缓慢变性处理,电泳时,浓缩胶恒压80 V,分离胶120 V,电泳后将PAGE凝胶中的蛋白质转移至硝酸纤维素膜上,取出后将膜放在3%牛血清白蛋白(BSA)阻断缓冲液中,4℃封闭过夜。用TBS漂洗后,将膜按0.1 mL/cm<sup>2</sup>加入一抗(抗体1:500稀释)杂交,4℃过夜。TBS冲洗后,加入二抗(1:500稀释),室温下摇床杂交1 h,漂洗后加入显色剂5 min,显影。利用凝胶自动分析成像软件Chemimage 5500,以β-Actin为内参进行分析。

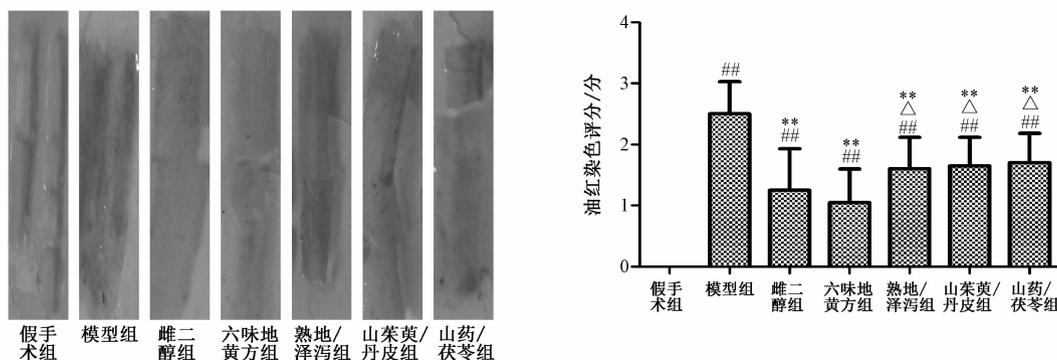
2.6 免疫组化检测雌激素受体GPR30表达 石蜡切片常规脱蜡,乙醇水化,经微波抗原修复20 min

后,在3%过氧化氢内阻断内源性过氧化物酶。正常山羊血清封闭抗原,加入GPR30一抗,4℃过夜。PBS漂洗后,加入二抗37℃孵育30 min,PBS漂洗,以DAB显色10 min。苏木素复染,中性树胶封片,镜检,用Image Pro Plus 5.0.2图像分析软件测定各组阳性细胞平均光密度值(IOD)。

2.7 统计学方法 各组实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以SPSS 12.0统计软件进行统计分析,多组间两两比较采用 $q$ 检验。

### 3 结果

3.1 六味地黄方及配伍对模型大鼠主动脉斑块形成的影响 油红O染色可见模型组主动脉壁有明显的红染斑块,且呈点状分布,血管扩张,基底膜出现大面积红染,与假手术组比较有显著性差异( $P < 0.01$ )。各给药组主动脉与模型组相比,病变均有不同程度的减轻,血管弹性改善,扩张现象减轻,基底膜仅有轻度的红染,与模型组相比有显著性差异( $P < 0.01$ ),但未能恢复到正常水平,与假手术比较也有显著性差异( $P < 0.01$ );六味地黄方组减轻主动脉病变现象明显优于各配伍组( $P < 0.05$ );各配伍组间比较无显著性差异( $P > 0.05$ )。见图1。



注：与假手术组比较，<sup>#</sup> $P < 0.05$ ，<sup>##</sup> $P < 0.01$ ；与模型组比较，<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ，<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ ；与六味地黄方组比较，<sup>△</sup> $P < 0.05$

图1 六味地黄方及配伍对模型大鼠主动脉斑块形成的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

Fig. 1 Effects of Liuwei Dihuang Formula and its compatibility on artery plaque formation in model rats ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

3.2 六味地黄方及配伍对模型大鼠血浆中TXB<sub>2</sub>和6-keto-PGF<sub>1α</sub>质量浓度的影响 实验结果表明，模型组大鼠血浆中6-keto-PGF<sub>1α</sub>水平明显下降，TXB<sub>2</sub>和TXB<sub>2</sub>/6-keto-PGF<sub>1α</sub>的比值明显升高，与假手术组比较有显著性差异 ( $P < 0.01$ )。各给药组均能不同程度地升高6-keto-PGF<sub>1α</sub>水平，与模型组相比，除熟地/泽泻、山茱萸/丹皮药对外，差异均有显著性

( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )；各给药组也能不同程度地降低TXB<sub>2</sub>水平，与模型组比较除熟地/泽泻外，差异亦有显著性 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。各给药组均能明显降低TXB<sub>2</sub>/6-keto-PGF<sub>1α</sub>的比值，与模型组比较有显著性差异 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )，六味地黄方组的作用明显优于熟地/泽泻、山茱萸/丹皮药对，差异均有显著性 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。见表2。

表2 六味地黄方及配伍对模型大鼠血清中6-keto-PGF<sub>1α</sub>、TXB<sub>2</sub>的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

Tab. 2 Effects of Liuwei Dihuang Formula and its compatibility on 6-keto-PGF<sub>1α</sub> and TXB<sub>2</sub> levels in model rats ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	6-keto-PGF <sub>1α</sub> /(pg·mL <sup>-1</sup> )	TXB <sub>2</sub> /(pg·mL <sup>-1</sup> )	TXB <sub>2</sub> /6-keto-PGF <sub>1α</sub>
假手术组	-	86.47 ± 6.37 <sup>**</sup>	75.98 ± 7.11 <sup>**</sup>	0.88 ± 0.11 <sup>**</sup>
模型组	-	62.84 ± 7.28	86.81 ± 7.74	1.40 ± 0.19
雌二醇组	1.8 × 10 <sup>-6</sup>	78.30 ± 7.56 <sup>##</sup>	78.07 ± 4.89 <sup>*</sup>	1.01 ± 0.14 <sup>**</sup>
六味地黄方组	6.75	76.57 ± 9.84 <sup>###</sup>	75.35 ± 4.00 <sup>**</sup>	1.00 ± 0.14 <sup>**</sup>
熟地/泽泻组	2.97	67.18 ± 9.29 <sup>△##</sup>	81.38 ± 6.19 <sup>△</sup>	1.23 ± 0.14 <sup>*##△△</sup>
山茱萸/丹皮组	1.89	69.70 ± 10.65 <sup>###</sup>	79.16 ± 5.50 <sup>*</sup>	1.16 ± 0.18 <sup>*##△</sup>
山药/茯苓组	1.89	72.57 ± 9.09 <sup>*##</sup>	77.26 ± 9.12 <sup>*</sup>	1.08 ± 0.20 <sup>###</sup>

注：与假手术组比较，<sup>#</sup> $P < 0.05$ ，<sup>##</sup> $P < 0.01$ ；与模型组比较，<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ，<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ ；与六味地黄方组比较，<sup>△</sup> $P < 0.05$ ，<sup>△△</sup> $P < 0.01$

3.3 六味地黄方及配伍对模型大鼠血清炎症因子的影响 实验结果表明，模型组大鼠血清中CRP、TNF-α、IL-6水平明显升高，与假手术组比较有显著性差异 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。各给药组均能不同程度的降低CRP、TNF-α、IL-6水平，与模型组

相比(除山药/茯苓组TNF-α、IL-6外)均有显著性差异 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )；六味地黄方降低CRP的作用明显优于各药对组，降低TNF-α的作用明显优于山药/茯苓药对，差异均有显著性 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。见表3。

表3 六味地黄方及配伍对模型大鼠血清中CRP、TNF-α、IL-6的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

Tab. 3 Effects of Liuwei Dihuang Formula and its compatibility on CRP, TNF-α and IL-6 levels in model rats ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

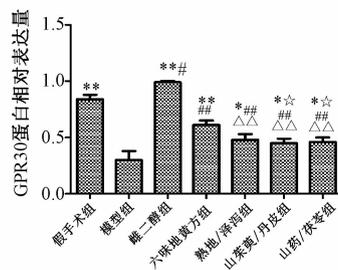
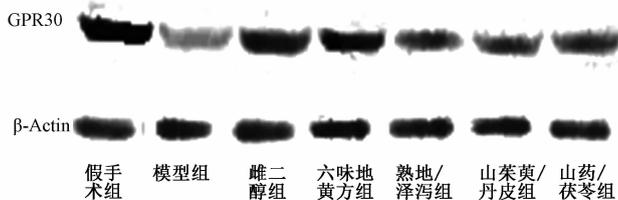
组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	CRP/(mg·L <sup>-1</sup> )	TNF-α/(ng·mL <sup>-1</sup> )	IL-6/(pg·mL <sup>-1</sup> )
假手术组	-	1.40 ± 0.23 <sup>**</sup>	1.08 ± 0.13 <sup>**</sup>	142.92 ± 16.45 <sup>*</sup>
模型组	-	2.57 ± 0.20	1.35 ± 0.25	162.56 ± 14.54
雌二醇组	1.8 × 10 <sup>-6</sup>	1.43 ± 0.32 <sup>**</sup>	1.12 ± 0.08 <sup>*</sup>	139.74 ± 16.30 <sup>**</sup>
六味地黄方组	6.75	1.44 ± 0.31 <sup>**</sup>	1.10 ± 0.19 <sup>*</sup>	140.48 ± 12.50 <sup>**</sup>
熟地/泽泻组	2.97	1.90 ± 0.09 <sup>###△△</sup>	1.04 ± 0.27 <sup>*</sup>	142.30 ± 11.17 <sup>**</sup>
山茱萸/丹皮组	1.89	1.88 ± 0.08 <sup>###△△</sup>	1.12 ± 0.18 <sup>*</sup>	140.53 ± 14.38 <sup>**</sup>
山药/茯苓组	1.89	1.94 ± 0.34 <sup>###△△</sup>	1.31 ± 0.24 <sup>△</sup>	152.18 ± 14.06

注：与假手术组比较，<sup>##</sup> $P < 0.01$ ；与模型组比较，<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ，<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ ；与六味地黄方组比较，<sup>△△</sup> $P < 0.01$

### 3.4 六味地黄方对雌激素膜受体 GPR30 的影响

Western blot 结果显示, 模型组 GPR30 的表达明显下降, 与假手术组比较有显著性差异 ( $P < 0.01$ )。六味地黄方和各配伍可以明显升高 GPR30 的表达, 与模型组比较有显著性差异 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 但水平均明显未达到正常水平, 与假手术组比较差异也有显著性 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。各

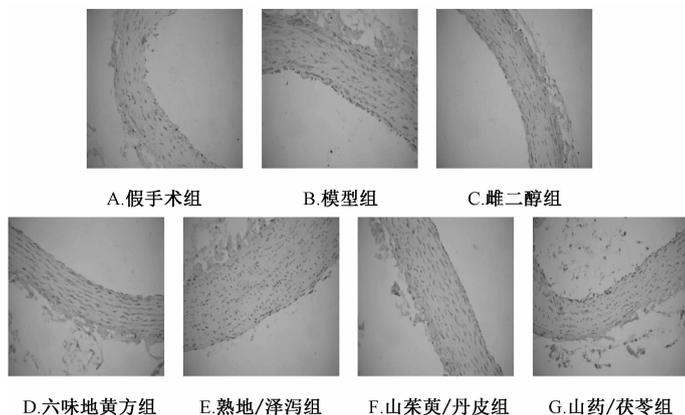
配伍组雌激素受体表达明显低于六味地黄方组, 差异亦具有显著性 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。熟地/泽泻可以显著升高雌激素受体表达, 与山茱萸/丹皮、山药/茯苓组比较有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 见图 2。免疫组化实验也验证了相似结果, 但各配伍组之间没有显著性差异 ( $P > 0.05$ ), 见图 3。



注: 与假手术组比较,  $^{\#}P < 0.05$ ,  $^{\#\#}P < 0.01$ ; 与模型组比较,  $^*P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$ ; 与六味地黄方组比较,  $^{\Delta\Delta}P < 0.01$ , 与熟地/泽泻组比较,  $^{\star}P < 0.05$

图 2 六味地黄方及配伍对模型大鼠主动脉 GPR30 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Fig. 2 Effect of Liuwei Dihuang Formula and its compatibility on the expression of estrogen receptor GPR30 in model rats artery ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )



注: 与假手术组比较,  $^{\#\#}P < 0.01$ ; 与模型组比较,  $^{**}P < 0.01$ ; 与六味地黄方组比较,  $^{\Delta\Delta}P < 0.01$

图 3 六味地黄方及配伍对模型大鼠主动脉 GPR30 表达的影响 (免疫组化,  $\times 400$ ,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

Fig. 3 Effects of Liuwei Dihuang Formula and its compatibility on the expression of estrogen receptor GPR30 in model rats artery (immunohistochemistry,  $\times 400$ ,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

## 4 讨论

女性更年期后由于雌激素水平及其表达下降, 导致心血管疾病的发生率明显上升, 大量的临床和流行病学调查表明, 围绝经期女性冠心病和动脉粥样硬化的发病危险性明显增加, 说明内源性雌激素及其受体对绝经后女性心血管系统的病理生理产生了重要的影响, 而建立具备更年期动脉粥样硬化发病特点的动物模型, 对评价相关药物具有重要意义。我们采用双侧卵巢切除加高脂饲料和维生素

D<sub>3</sub> 的方法, 较好的模拟了更年期动脉粥样硬化的特点, 表现为血脂明显升高, 血管内皮损伤、功能紊乱, 趋化炎症因子的分泌, 加速主动脉脂质沉积。六味地黄方及其配伍则可以逆转上述现象, 调节脂质代谢紊乱, 保护内皮细胞<sup>[5]</sup>, 抑制慢性炎症, 缓解动脉粥样硬化的进程。

内皮细胞的损伤是动脉粥样硬化发生的始动环节, 内皮细胞具有产生舒缩血管活性物质、调节血管张力的功能。主要的内皮源性舒张因子有前列环

素(PGI<sub>2</sub>)、一氧化氮(NO)等,收缩因子有血栓素(TXA<sub>2</sub>)等。PGI<sub>2</sub>有抑制血小板粘附和扩张血管的功能,TXA<sub>2</sub>可以促血小板聚集并且收缩血管<sup>[6]</sup>,内皮细胞可以利用细胞膜和周围环境中的花生四烯酸合成并分泌PGI<sub>2</sub>及TXA<sub>2</sub>。而PGI<sub>2</sub>和TXA<sub>2</sub>在体内不稳定,很快代谢为6-keto-PGF<sub>1α</sub>和TXB<sub>2</sub>,在正常生理状态下两者的浓度处于动态平衡。病理状态下PGI<sub>2</sub>和TXA<sub>2</sub>平衡被打破,会造成血小板聚集、血管痉挛收缩或血栓形成,从而促进动脉粥样硬化的发生。本研究发现模型大鼠血浆中6-keto-PGF<sub>1α</sub>明显下降,TXB<sub>2</sub>和TXB<sub>2</sub>/6-keto-PGF<sub>1α</sub>明显升高,说明更年期动脉粥样硬化大鼠PGI<sub>2</sub>和TXA<sub>2</sub>的平衡被破坏。六味地黄方可以通过改善PGI<sub>2</sub>和TXA<sub>2</sub>的平衡,保护血管内皮细胞,延缓更年期动脉粥样硬化的发生发展,并且这一作用主要是由山茱萸/丹皮和山药/茯苓药对实现的。

目前的许多研究表明,动脉粥样硬化发生是一个慢性炎症病理过程,CRP是人体受到感染和组织损伤时,在急性期浓度明显升高的蛋白,在机体的天然免疫过程中发挥重要作用;同时还是动脉粥样硬化发展过程中的重要炎症反应标志物,可以通过多种机制促进动脉粥样硬化的炎症反应,加快动脉粥样硬化进程。CRP通过激发相关炎症因子如TNF-α和IL-6的表达,导致内皮的功能障碍。CRP也可由粥样斑块内的巨噬细胞产生后激活补体、诱导黏附分子和多种细胞因子的表达、促进单核细胞聚集;同时促进诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的分泌,抑制内皮型一氧化氮合酶(eNOS)的活性,造成内皮细胞的进一步损伤和凋亡。更年期女性由于体内内源性雌激素水平下降,伴随CRP水平升高,心血管疾病发生率增加<sup>[7]</sup>。TNF-α可以刺激内皮细胞产生IL-6,IL-6在动脉粥样硬化发生时表达增加,会刺激细胞进一步产生CRP,因此TNF-α在炎症发展过程中起重要作用。动物实验证明雌激素缺失的大鼠TNF-α的表达增加,血管内皮细胞损伤严重,如果补充雌激素则可以缓解这一现象<sup>[8]</sup>。在更年期动脉粥样硬化发生过程中,血管内皮的损伤可使TNF-α释放增加,TNF-α又进一步促进IL-6的释放增加,二者共同促使血管内血栓形成<sup>[9]</sup>。在本研究中发现,模型大鼠血清中CRP、TNF-α和IL-6明显升高,说明有炎症反应发生。六味地黄方组大鼠血清中三者水平明显降低,说明六味地黄方可以通过抑制炎症减缓更年期动脉粥样硬化病变的发展。各药对都有降低CRP的作

用,熟地/泽泻和山茱萸/丹皮药对则能明显降低TNF-α、IL-6水平,这一结果提示全方抗炎作用主要是熟地/泽泻和山茱萸/丹皮贡献的。

更年期动脉粥样硬化的发生,除了雌激素水平下降外,还与雌激素受体表达的下调关系密切,因此改善受体表达也可减缓更年期动脉粥样硬化的进展<sup>[10]</sup>。雌激素受体分为核受体和膜受体。GPR30是膜受体,其与更年期动脉粥样硬化的关系越来越受到关注,有研究发现在GPR30敲除的动脉粥样硬化小鼠模型中,与普通小鼠相比其血管的损伤程度更严重<sup>[11]</sup>。雌激素可以通过GPR30激活PI3K/AKT通路,提高eNOS的活力<sup>[12]</sup>,增加NO的释放量,保护内皮细胞,从而减轻动脉粥样硬化。雌激素还可以通过该受体增加环氧合酶(COX)的表达<sup>[13]</sup>,增加PGI<sub>2</sub>的分泌,调节PGI<sub>2</sub>和TXA<sub>2</sub>平衡;在炎症反应中,雌激素通过GPR30激活MAPK通路,从而降低TNF-α的表达<sup>[14]</sup>,进一步抑制下游炎症的发生,减轻炎症反应,缓解动脉粥样硬化的进程。本实验发现模型组主动脉GPR30表达明显下降,用雌二醇治疗后模型大鼠雌激素水平和GPR30的表达均明显升高,且远高于正常组,同时子宫增生明显<sup>[4]</sup>,这可能是更年期应用雌激素替代疗法导致女性性器官肿瘤高发的原因之一<sup>[15]</sup>。六味地黄方治疗后受体表达上调,但未超出正常水平,子宫也未出现明显增生,因此用六味地黄方替代雌激素预防更年期动脉粥样硬化疗效良好,安全性更高。六味地黄的3个药对配伍也有增加GPR30表达的作用,说明六味地黄方上调该受体表达的作用是通过3个药对协同完成的。

综上所述,本实验我们发现六味地黄方对更年期动脉粥样硬化具有良好的治疗作用,其改善PGI<sub>2</sub>和TXA<sub>2</sub>的作用主要通过山茱萸/丹皮和山药/茯苓药对实现;抗炎作用主要是由熟地/泽泻和山茱萸/丹皮药对实现;而对GPR30的影响,则由3个药对配伍协同完成。

#### 参考文献:

- [1] 段芙蓉,鲁晓亮.六味地黄丸和奥氮平对老年痴呆精神行为症状改善作用的比较[J].中国处方药,2014,12(10):58-59.
- [2] 周萍,魏群.六味地黄丸治疗老年男性骨质疏松疗效观察[J].陕西中医,2014,35(10):1327-1328.
- [3] Pamela O, Dhananjay V, Adrian D, et al. Sex hormone levels and subclinical atherosclerosis in postmenopausal women: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis [J]. *Atherosclerosis*,

- 2009, 204(1): 255-261.
- [4] 吴艳, 李育, 张启春, 等. 六味地黄方对去卵巢雌性大鼠动脉粥样硬化模型的影响[J]. 中成药, 2012, 34(34): 553-556.
- [5] 殷秋忆, 郭静, 孟庆海, 等. 六味地黄方含药血清对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>致HUVECs损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2013, 29(12): 1753-1757.
- [6] Bashir S O, Suekit H, Elkarib A O, et al. The effect of high altitude on endothelial and vascular dysfunction markers in pre-eclamptic patients [J]. *Acta Physiologica Hungarica*, 2015, 102(4): 391-399.
- [7] Ridker P M. High-sensitivity C-reactive protein and cardiovascular risk: rationale for screening and primary prevention [J]. *Am J Cardiol*, 2003, 92(4): 17-22.
- [8] Yu J, Eto M, Akishita M, et al. A selective estrogen receptor modulator inhibits TNF-alpha-induced apoptosis by activating ERK1/2 signaling pathway in vascular endothelial cells [J]. *Vascul Pharmacol*, 2009, 51(1): 21-28.
- [9] Zhou Y, Tian F, Wang J, et al. Efficacy study of olmesartan medoxomil on coronary atherosclerosis progression and epicardial adipose tissue volume reduction in patients with coronary atherosclerosis detected by coronary computed tomography angiography: study protocol for a randomized controlled trial [J]. *Trials*, 2016, 17(1): 10.
- [10] Register T C, Appt S E, Clarkson T B. Atherosclerosis and vascular biologic responses to estrogens: histologic, immunohistochemical, biochemical, and molecular methods [J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1366: 517-532.
- [11] Meyer M R, Fredette N C, Barton M, et al. G protein-coupled estrogen receptor inhibits vascular prostanoid production and activity [J]. *J Endocrinol*, 2015, 227(1): 61-69.
- [12] Fredette N, Meyer M, Prossnitz E. The G protein-coupled receptor (GPER/GPR30) activates endothelial nitric oxide synthase (1075.5) [J]. *FASEB J*, 2014, 28: 1075.5.
- [13] Popli P, Sirohi V K, Manohar M, et al. Regulation of cyclooxygenase-2 expression in rat oviductal epithelial cells: Evidence for involvement of GPR30/Src kinase-mediated EGFR signaling [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2015, 154: 130-141.
- [14] Weil B R, Manukyan M C, Herrmann J L, et al. Signaling via GPR30 protects the myocardium from ischemia/reperfusion injury [J]. *Surgery*, 2010, 148(2): 436-443.
- [15] Molly L, Dains J E, Madsen L T. Hormone replacement therapy: an increased risk of recurrence and mortality for breast cancer patients? [J]. *J Adv Pract Oncol*, 2015, 6(4): 322-330.

## 食用土当归总有机酸的抗炎镇痛作用

杨菁<sup>1</sup>, 彭腾<sup>2\*</sup>, 禹亚杰<sup>3</sup>

(1. 贵阳中医学院, 贵州 贵阳 550002; 2. 成都中医药大学药学院, 中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地, 中药材标准化教育部重点实验室, 四川 成都 611137; 3. 四川护理职业学院, 四川 成都 611137)

**摘要:** 目的 比较食用土当归 *Aralia cordata* Thunb. 的总有机酸与醇提取物的抗炎和镇痛作用。方法 采用二甲苯致小鼠耳廓肿胀法、鸡蛋清致大鼠足跖肿胀法观察抗炎作用; 采用热刺激致小鼠疼痛法、醋酸致小鼠扭体法观察镇痛作用。结果 食用土当归总有机酸对二甲苯致小鼠耳廓肿胀、鸡蛋清致大鼠足跖肿胀具有良好的抑制作用; 并能减少醋酸致小鼠扭体的次数, 提高热致痛小鼠的痛阈; 与醇提取物相比无显著性差异。结论 食用土当归总有机酸也是抗炎镇痛的有效部位。

**关键词:** 食用土当归; 总有机酸; 醇提取物; 抗炎; 镇痛

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2016)10-2117-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.10.005

## Anti-inflammatory and analgesic effects of total organic acids from roots of *Aralia cordata* Thunb.

收稿日期: 2015-12-14

基金项目: 四川省科技支撑计划项目 (2011SC0235)

作者简介: 杨菁 (1988—), 女, 硕士, 助理实验师, 从事中药药效物质基础及质量标准研究。E-mail: 814948460@qq.com

\* 通信作者: 彭腾 (1973—), 男, 教授, 从事中药药效物质基础及质量标准研究。Tel: (028) 61800231, E-mail: 56649923@qq.com