

木豆叶对去卵巢大鼠血管内皮细胞功能的影响

刘彦凤 袁捷 全世建 侯少贞 周才杰 郭芳芳 赖小平

中图分类号: R932 ,R361 文献标识码: B 文章编号: 1006-7108(2009)02-0142-05

摘要: 目的 观察木豆叶对卵巢切除大鼠血管内皮细胞功能的影响。方法 采用双侧卵巢摘除法诱导骨质疏松症模型 ,术后 3 d 开始防治性给药 ,于第 9 w 眼球采血 ,放射免疫法检测内皮素 ,硝酸还原酶法检测一氧化氮。结果 血浆 ET 水平升高 ,血清 NO 含量降低 ,与假手术组比较有统计学意义($P < 0.01$);龙牡壮骨颗粒组、木豆叶高、中、低剂组都不同程度降低 ET 水平 ,增加 NO 含量 ,与模型组比较有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。结论 木豆叶通过调节 ET、NO 的含量提高去势大鼠血管内皮功能。

关键词: 木豆叶; 内皮素; 一氧化氮; 血管内皮细胞功能

Effects of *Cajanus Cajan*(L.) Millsp on vascular endothelial function of ovariectomized rats LIU Yangfeng , YUAN Jie , QUAN Shijian , et al . Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine ,Guangzhou 510402 ,China

Abstract : Objective To observe the effects of *Cajanus Cajan*(L.) Millsp on vascular endothelial function of ovariectomized rats. **Methods** Established the rat models with osteoporosis by ovariectomy in the experiments. Treated the experimental rats with drugs for 8 weeks , then managed the rats blood sampling from eye sockets. According to radioimmunoassay(RIA)and the nitrate reductase follows measured ET and NO respectively. **Results** In model group the level of ET in plasma promoted markedly and the content of NO in serum decreased noticeably , compared with normal group. While the level of ET in plasma was low greatly and the content of NO in serum was high enough in *Cajanus Cajan*(L.) Millsp high ,middle ,and low dose groups ,compared with model group. **Conclusion** *Cajanus Cajan*(L.) Millsp can regulate vascular endothelial function of the ovariectomized rats through impacting on ET and NO.

Key words : *Cajanus Cajan*(L.) Millsp ; Nitric oxide ; Endothelin ; Vascular endothelial function

近年来大量的临床资料和实验研究显示 ,骨质疏松症患者存在明显血瘀征象 ,瘀血的存在与骨质疏松的发生发展有着密切的关系。木豆叶为豆科植物木豆的干燥叶及嫩枝 ,长期临床运用发现豆叶具有“活血化瘀 ,补肾健骨 ,消肿止痛”的功效。本实验拟从活血化瘀角度探讨木豆叶对去势大鼠血管内皮细胞功能的调节作用 ,选取血瘀证相关因子血浆内皮素(endothelin , ET) ,血清一氧化氮(nitric oxide , NO)作为考查指标。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

SPF 级 3 月龄 SD 大鼠(180 ~ 220) g60 只 ,由广

州中医药大学实验动物中心提供并饲养 ,动物合格证号 D031640 ,实验室合格证号 D022890。按体重随机分为 6 组 :假手术组、模型组、龙牡壮骨颗粒组、木豆叶高剂组、木豆叶中剂组、木豆叶低剂组 ,每组 10 只。

1.2 复制骨质疏松症模型

假手术组 :即行双侧卵巢摘除术相同的手术过程 ,但不摘除卵巢 ;其余各组动物予 20% 乌来糖麻醉 ,腹部切口摘除双侧卵巢 ,按压止血 ,4 号线缝合 ,碘酊及 75% 酒精消毒 ,皮下注射青霉素 10^5 U/只。

1.3 药品、试剂及仪器

木豆叶水提物(以下简称木豆叶) 产品批号 : 080329)由广州中医药大学新药中心提供 ,实验时以蒸馏水配成所需浓度 ;龙牡壮骨颗粒 ,武汉健民药业生产 ,产品批号 :0802149 ;青霉素 ,购于广州中医药大学附属第一临床医院。NO 试剂盒(批号 :

作者单位 : 510402 广州 ,广州中医药大学
通讯作者 : 刘彦凤 ,Email liuyf2009@ yahoo . cn

20080517) ,南京建成生物工程研究所生产 ;ET 试剂盒(批号 :080530) 由北京普尔伟业生物科技有限公司提供。CV-600 电热恒温水箱 ,离心机 ,振荡器 ,UV-2100 紫外分光光度计。

1.4 给药

术后 3 d 开始每日给药 ,假手术组和模型组 :20 mL/kg 生理盐水灌胃 ;龙牡壮骨颗粒组 :给服龙牡壮骨颗粒 4 g/kg ,龙牡壮骨颗粒是传统的用于强筋健骨药 ,成份 :党参 ,黄芪 ,麦冬 ,龟甲(醋制) ,白术(炒) ,山药 ,五味子(醋制) ,龙骨 ,牡蛎(煅) ,茯苓 ,大枣 ,甘草 ,乳酸钙 ,鸡内金(炒) ,维生素 D₂ ,葡萄糖酸钙 辅料为蔗糖 ,通过健脾益胃促进骨钙吸收 ,实验采用 7 岁以上儿童临床用药量的 8 倍 ,与木豆叶高剂组临床用药量倍数相同 ;木豆叶高剂组 :按 8 g/kg 给服木豆叶 ;木豆叶中剂组 :4 g/kg 给服木豆叶 ;木豆叶低剂组 :2 g/kg 给服木豆叶。每天灌胃 1 次 ,持续给药 8 w。

1.5 ET、NO 的测定

眼周静脉取血 2 mL ,注入含 7.5% EDTA 二钠 30 μ L 和抑肽酶 20 μ L 的试管中 ,4 $^{\circ}$ C 3000 r/min 离心 ,10 min , - 20 $^{\circ}$ C 保存 ,送广州中医药大学核医学实验室检测。上海日环仪器 TSN-695B 型放免 γ 测量仪 ,北京普尔伟业生科技有限公司 ET 试剂盒(批号 :080530) ,本实验 $r = 0.998$,批内 CV = 1.36%。同时 ,眼周静脉取血 0.5 mL ,常温 3000 r/min 离心 10 min 后移取血清以测 NO。NO 严格按照说明书(硝酸还原酶法) 操作进行检测。

1.6 统计学处理

所有结果进行 t 检验 ,以($\bar{x} \pm s$)表示。

2 结果

全部大鼠经造模手术 ,抗炎处理 ,无死亡。3 d 后伤口基本愈合 ,术后 1 w 可见动物烦躁 ,情绪变化明显 ,倦怠懒动 ,食量减少 ;术后 4 w 骨密度检测见骨量丢失趋势明显。每日给药持续 8 w ,于第 9 w 眼周静脉丛一次性采血 2.5 mL ,碘酊及 75% 酒精消毒后无动物死亡。因所购 NO 试剂盒为 50 管 ,故每组随机取 8 个标本作检测。

各组大鼠血浆 ET ,NO 含量见表 1。由表 1 可知 ①模型组 ET(170.39 $\pm$ 12.71)与假手术组 ET(141.04 $\pm$ 15.75)比较升高明显($P < 0.01$) ;模型组 NO(19.70 $\pm$ 6.19)与假手术组 NO(38.14 $\pm$ 3.51)比较显著降低($P < 0.01$)。②龙牡壮骨组 ,木豆叶高、中、低剂组与模型组比较 ET 降低($P < 0.01$) ,NO 升

高($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。③木豆叶高剂组 NO(42.80 $\pm$ 11.06)含量高于龙牡壮骨组 NO(32.42 $\pm$ 8.42)比较($P < 0.05$) ,木豆叶高剂组 ET(129.93 $\pm$ 14.13)含量与龙牡壮骨组 ET(146.57 $\pm$ 18.58)比较差异不显著 ,龙牡壮骨组 ET 平均值、NO 平均值介于木豆叶中剂组与木豆叶低剂组之间。④木豆叶高、中、低剂组比较结果 ,高剂组与中剂组两项指标均无差异 ;高剂组与低剂组 ET 差异明显($P < 0.01$) ,NO 比较有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠血浆 ET、NO 含量($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	Dose	ET(pg/mL)	NO(μ mol/gprot)
假手术组	8	20 mL/kg	141.04 $\pm$ 15.75**	38.14 $\pm$ 3.51**
模型组	8	20 mL/kg	170.39 $\pm$ 12.71	19.70 $\pm$ 6.19
龙牡壮骨组	8	4 g/kg	146.57 $\pm$ 18.58**	32.42 $\pm$ 8.42**
木豆叶高剂组	8	8 g/kg	129.93 $\pm$ 14.13**	42.80 $\pm$ 11.06**▲
木豆叶中剂组	8	4 g/kg	137.44 $\pm$ 15.65**	38.35 $\pm$ 11.21**
木豆叶低剂组	8	2 g/kg	149.48 $\pm$ 11.36**▲▲	31.36 $\pm$ 9.80*▲

注 :与模型组比较 ,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与木豆叶高剂组比较 ,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$

3 讨论

3.1 雌激素与血瘀证、绝经后骨质疏松症

临床研究表明 ,绝经后骨质疏松症(PMOP)患者存在血瘀征象^[1] ,且与血瘀证微观分子生物学的改变关系密切^[2]。PMOP 主要是因绝经后妇女卵巢功能低下 ,雌激素显著减少 ,骨耦联过程失衡 ,破骨细胞的骨吸收作用超过了成骨细胞的骨形成作用而致 ,它是伴随人体的生理性衰老而发生的疾病 ,血瘀在其发病过程中有着重要作用。雌激素可改变血流状态及血脂浓度 ,影响内皮细胞功能及凝血纤溶系统 ,使血瘀的病机特征贯穿 PMOP 始终^[3]。多数医生只重视 PMOP 肾虚的一面而偏用补肾药 ,忽视活血化瘀药的运用 ,故使临床疗效不很满意^[4]。本实验中木豆叶具有补肾、活血化瘀的双重功效 ,可以从肾虚、血瘀两方面对 PMOP 进行调理 ,不仅重视补肾在防治 PMOP 的主导地位 ,而且重视活血化瘀对防治 PMOP 不可或缺的辅助作用 ;龙牡壮骨颗粒具有补肾健脾 ,强筋健骨的作用 ,配方组成中不含活血化瘀药物 ,以此为对照药作用有二 :一方面展示传统中药合理配方在防治 PMOP 过程中整体调理 ,多途径(如本实验中对 ET、NO 的调节)作用的效果 ,另一方面突出木豆叶的活血化瘀作用。

3.2 血瘀症与血管内皮细胞功能

祖国医学很早就有关于“血”和“脉”关系的论述。《内经》说 :“脉者 ,血之府也。”《灵枢·决气》说 :“壅遏营气 ,令无所避 ,是谓脉。”《灵枢·经脉》说 :“脉

不通则血不流“《灵枢·阴阳二十五人》说：“其络者 脉结血不行，决之乃行”。说明脉是容血和行血的器官，脉道通畅是血液正常运行的重要条件，脉道受损或闭塞不通，会造成血行不畅，血液外溢或瘀阻脉络。可见脉的功能正常是保证血液正常循行的必要条件，脉的功能失常必然会导致血瘀证。

血管内皮细胞(VECs)是机体中惟一直接与血流接触的细胞，是血管壁组织和血液之间的第一道通透性屏障，携有不同激素和血管活性物质的受体。内皮细胞结构和功能的完整，在维持血液流动状态、调节血管张力、调节组织物质交换、防止血小板聚集和血栓形成，稳定微循环等方面有特殊临床意义^[5]。血管内皮广泛分布于全身各处，几乎所有组织都受其调节和影响^[6]。内皮损坏后，使内皮细胞产生和释放舒血管活性物质[前列环素(PGI₂)、内皮依赖性舒张因子(EDRF)即NO、内皮依赖性超级化因子(EDHF)及缩血管活性物质ET、TXA₂、AT II]的平衡失调。一般以血浆NO、ET、血管紧张素II(AT-II)、血栓素B₂(TXB₂)、6-酮-前列腺素F₁(6-K-PGF₁)等来监测血管内皮功能。

Li等^[7]以脂肪乳剂和肾上腺素建立两种血瘀证模型，研究血瘀证与血管内皮细胞功能的关系，实验结果显示两种不同造模方法形成的血瘀证模型，与对照组比较模型组ET明显升高，NO明显降低。本实验中亦选取这两个最能反映血管内皮细胞功能的强有力血管舒缩调节物质ET、NO来考查大鼠去势后血瘀程度。由结果①可知，大鼠去势8w后ET明显升高，NO明显降低，说明去势大鼠血瘀证形成；由结果②可知，龙牡壮骨颗粒和木豆叶二者均能调节去势大鼠血中ET、NO含量，抑制血瘀证的形成；由结果③可知，龙牡壮骨组各项均值介于木豆叶中、低剂组之间，NO含量与木豆叶高剂组比较有统计意义，表明木豆叶具有优于龙牡壮骨颗粒的活血化瘀作用；由结果④可知，木豆叶高剂与木豆叶低剂对去势大鼠ET、NO的调节比较有差异，提示活血化瘀药物的使用要注意剂量的大小。

3.3 ET/NO之间的相互作用

ET是1988年Yanagisawa从内皮细胞分离纯化出的21个氨基酸组成的活性多肽，具有强大的血管收缩作用，以自分泌及旁分泌方式调节局部血管紧张度，参与血压的调节^[8]，促进血管平滑肌细胞的增殖，调节心脏的内分泌和代谢功能^[9]。Lam等^[10]动物实验表明由于雌激素水平下降，微循环中ET升高，导致骨内血脉瘀滞影响骨代谢致骨质疏松。

Hansen等^[11]通过观察卵巢切除兔骨松质骨微循环中ET，发现明显高于假手术组，提出ET水平升高而导致骨内血脉瘀滞影响及骨代谢导致骨质疏松。雌激素是目前治疗PMOP的重要药物，Haenggi等^[12]通过予PMOP患者口服利维爱后发现明显降低血中的ET，改善血液循环，从而提出雌激素治疗绝经后骨质疏松可能是部分通过ET而影响骨代谢的。

NO通过鸟苷酸环化酶使细胞内环磷鸟苷(cGMP)增高，产生系列生物效应：松弛血管平滑肌，维持血管舒张状态；抑制血小板黏附聚集，抑制白细胞的黏附分子(CD11、CD18)的活性或其表达；抑制平滑肌细胞分裂增殖，减少胶原纤维、弹力纤维的产生，清除自由基，抑制脂质过氧化反应^[13]。Lversen等^[14]报告一氧化氮合酶(NOS)抑制剂能提高骨血管阻力，使体循环血压按比例升高。近期研究^[15]发现，17-β雌二醇的抗动脉粥样硬化作用可能与其促进内皮细胞合成和释放NO有关。雌激素促进机体产生NO的机制主要通过升高成骨样细胞和内皮细胞的NOS的活性促进NO生成^[16]。Cuzzocrea等^[17]通过剔除切除卵巢大鼠诱生型一氧化氮合酶(iNOS)的表达基因实验发现卵巢切除大鼠的骨质疏松主要是诱导iNOS途径引起的。白介素1(IL-1)可促进骨吸收，骨代谢亢进，骨吸收大于骨形成，从而导致骨量减少，Vant等^[18]认为其部分机制主要也是经过iNOS通路。PMOP的NO机制及雌激素防治PMOP的NO通路在骨质疏松症生理、病理过程中发挥着重要的影响^[19]。

现在认为ET/NO是一对重要的血管收缩/舒张因子，ET和NO相互作用保持动态平衡，有利于维持血管的正常张力^[20]。血管内皮功能障碍反映在血管舒张物质与血管收缩物质的不平衡，ET和NO在调节血管紧张度的过程中相互作用。肥胖症患者内源性ET的增加会使生物必须的NO合成减少^[21]。跑台试验得出内源性ET通过阻止NO合成抑制血管舒张^[22]。阻断ETAR，维护ET-1/NO平衡可以保护肝脏微循环，降低肝癌的损害^[23]。NO可抑制血管平滑肌细胞增殖，调节包括ET在内的各种生长因子基因的表达^[24]。NO和ET^[25]间平衡关系的破坏，必然导致微循环血管舒缩功能紊乱，血管内皮受损及通透性改变，同时还会引发血流变特性的变化而表现为血瘀证的特征，所以，血管内皮细胞内分泌NO和ET的功能异常是血瘀证发病的病理基础。近年来国内外研究^[26]认为，绝经后骨质疏松症患者雌激素水平下降，可通过血管内皮细胞分泌NO和

ET 异常,直接影响到骨代谢而致骨质疏松,而且影响骨微循环血液流变的异常使营养成分不能正常地参与骨代谢也可导致骨质疏松。

3.4 总结

生理状态下,血管内皮细胞既有 NO 也有 ET 的基础释放,内、外源性 NO 均可拮抗 ET 的缩血管效应,而应用 ET 亦可拮抗 NO 介导的内皮依赖性血管舒张。ET、NO 这一对作用于血管平滑肌的相互拮抗的血管活性物质对调节生理状态下血管的舒缩状态和血流动力学有重要意义^[27]。血管内皮细胞内分泌功能异常,特别是 NO 和 ET 间平衡关系的破坏,必然导致微循环血管舒缩功能紊乱、血管内皮受损及通透性改变,引发血液成分、血流变特性的变化而表现为血瘀证的特征^[28]。实验中去势大鼠血浆 ET 明显升高,NO 显著降低,推测去势大鼠雌激素减少——血瘀证形成——绝经后骨质疏松症形成是同步且逐渐加重的过程,绝经后骨质疏松症的形成以雌激素减少为根本原因,以血瘀证的形成成为机要。木豆叶可以很好地调节 ET、NO 含量,调节血管内皮细胞功能,具有防治 PMOP 开发前景。

【参 考 文 献】

- [1] Xie L, Guo ZQ, Yao GH. Analyze Postmenopausal osteoporosis by syndrome differentiation. *Acta Chinese Medicine and Pharmacology*, 1997, 14(3): 35.
- [2] Liu ZK, Mu CZ. Postmenopausal osteoporosis and blood stasis relationship between the molecular biology-related research. *The Journal of Traditional Chinese Orthopedics and Traumatology*, 2004, 16(5): 57.
- [3] Guo XF, Zhang JY. Explore mechanism of postmenopausal osteoporosis with the syndrome of the blood stasis. *Sanxi College of Traditional Chinese Medicine Journal* 2007, 8(2): 61-62.
- [4] Liu QS. Traditional Chinese and western medicine diagnosis and treatment of osteoporosis. Beijing: China Traditional Chinese Medicine Press, 2001: 73.
- [5] Pasyk KA, Jakobczak BA. Vascular endothelium: recent advances. *Eur J Dermatol* 2004, 14(4): 209-213.
- [6] Lverman A, Edward BS, Hallett JW, et al. Circulating and tissue endothelial immunoreactivity in advanced atherosclerosis. *N Eng J Med*, 1991, 325: 997-1005.
- [7] Li XQ, Zhang JG, He N, et al. Comparison of endothelial function and blood rheology about two Stasis animal models. *Chinese Journal of Comparative Medicine* 2007, 17(8): 478-480.
- [8] Tang J, Tang CS, Yang J, et al. ET. Beijing: China, Beijing Medical University and Peking Union Medical College United Press, 1993: 15-18.
- [9] Ihling C, Bohrmann B, Schaefer HE, et al. Endothelin-1 and endothelin converting enzyme-1 in human atherosclerosis novel targets for pharmacotherapy in atherosclerosis. *Curr Vasc Pharmacol* 2004, 2(3): 249-258.
- [10] Lam HC, Lee JK, Lai KH. Detection and characterization of endothelin in transformed human osteoblast cell culture medium. *Endocrine*, 2000, 13(1): 77.
- [11] Hansen VB, Forman A, Lundgaard A, et al. Effects of oophorectomy on functional properties of resistance arteries isolated from the cancellous bone of the rabbit femur. *J Orthop Res* 2001, 19(3): 391.
- [12] Haenggi W, Bersinger NA, Mueller MD, et al. Decrease of rerum endothelin levels with postmenopausal hormone replacement therapy or tibolone. *Cynecol Endocrinol*, 1999, 13(3): 202.
- [13] Vaabdrager AB, Jonge HR. Signalling by cGMP-dependent protein kinase. *Mol Cell Biochem*, 1996, 157(1-2): 23-30.
- [14] Lversen PO, Nicolaysen G, Benestad HB. Endogenous nitric oxide causes vasodilation in rat bone marrow, bone and spleen during - accelerated hematopoiesis. *Exp Hematol*, 1994, 22: 1297-1302.
- [15] Honisett SY, Stojanovska L, Sudhir K, et al. Hormone therapy impairs endothelial function in postmenopausal women with type 2 diabetes mellitus treated with rosiglitazone. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89(9): 4615-4619.
- [16] Armour KE, Ralston SH. Estrogen upregulates endothelial constitutive nitric oxide synthase expression in human osteoblast-like cells. *Endocrinology*, 1998, 139(2): 799.
- [17] Cuzzocrea S, Mazzone E, Dugo L, et al. Inducible nitric oxide synthase mediates bone loss ovariectomized mice. *Endocrinology*, 2003, 144(3): 1098.
- [18] Vant Hof RJ, Armour KJ, Smith LM, et al. Requirement of the inducible nitric oxide synthase pathway for IL-1-induced osteoclastic bone resorption. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, 97(14): 7993.
- [19] Li A, Qing MS, Xue Y. Osteoporosis occurred nitric oxide mechanism and the role of estrogen regulation and control research. *Chin J Osteoporos* 2003, 9(2): 19.
- [20] Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, 1988, 332: 411.
- [21] Kieren JM, Amale L, Helmut OS, et al. Interactions Between Endothelin and Nitric Oxide in the Regulation of Vascular Tone in Obesity and Diabetes. *Diabetes* 2004, 53: 2060-2066.
- [22] Birgit H, Daphne M, Marjolein D, et al. Nitric oxide blunts the endothelin-mediated pulmonary vasoconstriction in exercising swine. *Shouxi* 2006, 12: 21.
- [23] Palmes D, Minin E, Budny T, et al. The endothelin/nitric oxide balance determines small-for-size liver injury after reduced-size rat liver transplantation. *Virchows Archiv* 2005, 447: 731-741.
- [24] Kourembana S, Mc Quillan LP, Leung GK, et al. Nitric oxide regulates the expression of vasoconstrictors and growth factors by vascular endothelium under both normoxia and hypoxia. *J Clin Invest*, 1993, 92: 99.
- [25] Zhuang H, Liang ZJ. Analyze the research trend to treat primary osteoporosis on stasis. *The Journal of Traditional Chinese Orthopedics and Traumatology* 2006, 18(2): 69-71.

(上接第 145 页)

- [26] Mu CZ , Liu ZK , Wang YW ,et al. The change and meaning of NO , ET in serum of Patients with Postmenopausal osteoporosis. Traditional Chinese Medicine Journal , 2004 , 36 (6) :13-15.
- [27] Liu QX , Jin HM. Interaction between Nitric oxide and endothelin-1 and its meaning in cardiovascular disease. Chinese Journal of

Microcirculation ,1997 ,7 (1) :42.

- [28] Cai QC , Wang QH , Wu YZ. Observation of vascular endothelial secretion of patients with Stasis. Anhui College of Traditional Chinese Medicine Journal ,1998 ,17 (2) :61.

(收稿日期 : 2008-11-05)