

丹酚酸 B 对急性心肌缺血大鼠血流动力学的影响及作用分子机制研究

刘 杰,高秀梅,王 怡,张伯礼

(天津中医学院中药学院,天津 300193)

摘 要:目的 探讨丹酚酸 B (Sal B) 对大鼠急性心肌缺血 (acute myocardial ischemia, AMI) 模型血流动力学的影响,并探讨 Sal B 抗心肌缺血的分子机制。方法 建立 Wistar 大鼠 AMI 模型,随机分为假手术组、模型组、Sal B 小剂量组、Sal B 大剂量组。ig 给药 7 d 后,分别测定大鼠左室血流动力学指标,包括左室收缩压 (LVSP)、左室舒张末期压 (LVEDP)、左室内压最大上升及下降速率 ($\pm dp/dt_{max}$)。同时应用寡核苷酸芯片观察大鼠 AMI 后基因表达的变化以及 Sal B 对其影响,提取各组心肌组织总 RNA,与大鼠基因表达谱芯片进行杂交。结果 Sal B 可以降低 LVEDP,升高 $\pm dp/dt_{max}$;大鼠心肌缺血后及 Sal B 治疗后,相关基因表达发生明显变化,主要作用靶点为细胞结构类、炎症反应类等相关基因。结论 Sal B 可以改善 AMI 大鼠心脏功能,大剂量应用对左室收缩和舒张功能均有显著提高作用。运用基因芯片技术能快速检测出缺血心肌及 Sal B 治疗后心肌基因表达谱的改变,对差异表达基因的研究将有助于进一步揭示 Sal B 抗心肌缺血的分子机制。

关键词:丹酚酸 B; 急性心肌缺血; 血流动力学; 基因芯片

中图分类号:R285.5 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2006)03-0409-04

Effect of salvianolic acid B on hemodynamics and its molecular mechanisms in acute myocardial ischemia rats

LIU Jie, GAO Xiu-mei, WANG Yi, ZHANG Bo-li

(Tianjin College of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

Key words: salvianolic acid B (Sal B); acute myocardial ischemia (AMI); hemodynamics; gene chip

丹酚酸 B (Sal B) 是丹参的主要水溶性成分之一,丹参作为常用活血化瘀中药广泛用于心血管疾病的治疗,本研究通过复制大鼠急性心肌缺血 (acute myocardial ischemia, AMI) 模型,探讨 Sal B 如何改善 AMI 过程中心脏功能。此外,目前发现 Sal B 具有抗心肌细胞损伤、保护血管内皮细胞等作用^[1,2],但其作用的分子机制还未见报道。本研究运用基因芯片技术,初步探讨 Sal B 作用靶点及抗心肌缺血的分子机制,为揭示丹参治疗心血管疾病的机制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料:Wistar 大鼠 60 只,雄性,体重 250~300 g,由北京维通利华实验动物中心提供,许可证编号:SCXK (京) 2002-0003。Sal B,分子式 $C_{36}H_{30}O_{15}$,质量分数 80%,由天津中医学院中一制药厂提供。MP-100 多导生理记录仪 (美国 Biopac 公司)、电子分析天平 (上海精科、JA1003)。Affymetrix 大鼠 RAE230A 基因芯片,由上海晶泰生物技术有限公司提供。

1.2 动物模型复制与分组:Wistar 大鼠以 3% 戊巴比妥钠 (30 mg/kg) ip 麻醉,仰位固定于自制鼠板上,胸部剪毛、备皮,将心电图电极针埋在左下肢及右上肢皮下,沿左侧第四肋间剪开皮肤,少量剥离胸肌,剪开心包,将心脏轻轻挤压出胸壁外,分离左冠状动脉前降支 (LAD),在离 LAD 起始部 2 mm 处穿线 (用穿有 5-0 缝合线的 3/8 弯针钩) 后,把心脏迅速放回胸腔,术后稳定 10 min 左右,结扎冠脉,立即做心电图,进行记录并缝合。心电图显示 ST 段显著抬高或异常 Q 波时,即表明 AMI 造模成功。将 AMI 模型大鼠 30 只,随机分为模型组、Sal B 小、大剂量组,共 3 组,另取 10 只未造模的同龄大鼠作为假手术组。假手术组开胸后仅穿线,不做结扎。

1.3 观察方法:Sal B 小剂量组按 60 mg/kg、Sal B 大剂量组按 120 mg/kg ig 给药,假手术组及模型组 ig 等量生理盐水,共 7 d。各组末次给药后,再次戊巴比妥钠 ip 麻醉,静脉推注肝素全身抗凝,手术分离股动脉和右颈总动脉。应用十六导生理记录仪检测血流动力学参数,股动脉插管记录动脉收缩压

收稿日期:2005-05-13

基金项目:国家重点基础研究发展规划“973”项目资助 (1999054403)

作者简介:刘 杰 (1974—),男,硕士,讲师,研究方向为心血管药理学。Tel: (022) 23051086 E-mail: liujie@tjutc.edu.cn

(SBP) 和动脉舒张压 (DBP), 右颈总动脉插管至左心室记录压力曲线, 记录心率 (HR)、左室收缩压 (LVSP)、左室舒张末压 (LVEDP)、左室最大收缩 (+) 和舒张 (-) 速率 ($\pm dp/dt_{max}$)。实验结束后迅速处死大鼠, 摘除心脏, 在显微镜下取模型组、Sal B 大剂量组大鼠介于坏死与正常组织之间的缺血区心肌组织, 假手术组取正常心肌组织, 迅速放入液氮备用, 每组取 5 只大鼠。

1.4 基因芯片检测流程: 每组样品取等量的冻存组织混合后, 在液氮中研磨, 提取 RNA, 浓缩, 用分光光度计进行检测, 说明无蛋白和 DNA 混入可用于芯片检测。进行 cDNA 的合成及纯化, 体外转录合成 cRNA 并用生物素标记, cRNA 的片段化。配制杂交液, 取出芯片放置到室温后, 预杂交 10 min, 杂交液离心 5 min, 取上清, 注入适量的杂交液到芯片中, 杂交 16 h。取出芯片, 回收杂交液, 加约 300 μ L Wash A 缓冲液直至将芯片舱充满, 根据芯片类型, 选择相应的洗脱和染色程序。用 G2500A Gene Ar-

ray Scanne 扫描芯片, 观察杂交结果, 用 Microarray Suit Version 5.0、Data Mining Tool Version 2.0 分析数据。计算 SLR (Sigal Log Ratio) 值, 以 n 表示, 则代表两组间差异表达基因信号强度比值为 2^n 倍, 负数是指低表达, 正数为高表达。

1.5 统计学处理: 数据 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 10.0 软件包, 进行方差分析及 q 检验。

2 结果

2.1 对 AMI 模型大鼠心功能的影响: 模型组的 LVEDP 明显高于假手术组 ($P < 0.05$); 各给药组的 LVEDP 低于模型组, Sal B 大剂量组与模型组比较差异显著 ($P < 0.05$)。模型组的 $\pm dp/dt_{max}$ 明显低于假手术组 ($P < 0.05$); Sal B 大剂量组 $\pm dp/dt_{max}$ 明显高于模型组 ($P < 0.05$), Sal B 小剂量组的 $\pm dp/dt_{max}$ 高于模型组 ($P < 0.05$), 提示 Sal B 可提高心室顺应性, 改善心脏功能。SBP、DBP、LVSP 和 HR 等参数各组比较无统计学差异, 见表 1。

2.2 对 AMI 模型大鼠基因表达谱的影响: 模型组

表 1 丹酚酸 B 对急性心肌梗死大鼠血流动力学的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 1 Effect of Sal B on hemodynamics in acute myocardial ischemia rats ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	SBP/mmHg	DBP/mmHg	LVSP/mmHg	LVEDP/mmHg	+dp/dt _{max} / (mmHg · s ⁻¹)	-dp/dt _{max} / (mmHg · s ⁻¹)	HR/(次 · 分 ⁻¹)
假手术组	—	126.92 ± 10.63	84.65 ± 8.35	147.81 ± 14.94	-12.12 ± 2.15	4 495.1 ± 360.4	3 679.0 ± 322.6	523.33 ± 41.03
模型组	—	84.64 ± 12.47	67.03 ± 10.56	108.63 ± 11.63	6.06 ± 1.50*	2 005.5 ± 269.3*	1 617.6 ± 187.9*	439.76 ± 57.16
Sal B	60	109.48 ± 12.77	89.76 ± 14.46	120.60 ± 13.75	5.46 ± 1.89*	2 623.3 ± 376.8*▲	1 761.5 ± 212.3*	477.87 ± 31.78
	120	113.41 ± 14.15	91.84 ± 15.12	121.16 ± 13.12	3.87 ± 1.90*▲	2 868.8 ± 436.9*▲	2 367.9 ± 518.4*▲	498.84 ± 32.98

与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: ▲ $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs Sham-operation group; ▲ $P < 0.05$ vs model group

与假手术组相比, 高表达基因有 1 780 条, 低表达基因有 1 771 条; Sal B 组与模型组相比, 高表达基因有 407 条, 低表达基因有 505 条。差异表达基因共涉及免疫与炎症反应类、细胞结构骨架类、代谢类等多方面相关基因, 部分 2 倍以上差异表达的已知基因结果见表 2 和表 3。

3 讨论

近年研究表明, Sal B 具有很强的抗氧化作用^[3], 并可提高心脏微血管内皮细胞 (CMEC) 活力, 降低 LDH 释放^[4]。本实验采用 AMI 大鼠模型, 以 Sal B 对该模型作用为研究重点。结果提示, 给药组对该模型大鼠心脏功能各项指标均有一定改善作用。其中, 血流动力学方面, $\pm dp/dt_{max}$ 和 LVDP 是 3 项重要指标。急性心肌梗死后, 左心室功能状态是一项影响近期及远期预后的重要因素, 其中 $+dp/dt_{max}$ 反映左室收缩功能, LVEDP 和 $-dp/dt_{max}$ 反映左室舒张功能。AMI 发生较早、程度较严重的病生

理变化是左心室舒张功能的损伤, 即 $-dp/dt_{max}$ 降低、LVEDP 升高。本实验显示, 模型组与假手术组相比, $\pm dp/dt_{max}$ 降低、LVEDP 升高, 这与心梗后心脏前负荷增加有关。同时 Sal B 组均能在一定程度上改善左室收缩及舒张功能, 其中 Sal B 大剂量组作用明显。探究其机制, 一方面 Sal B 能够调整心肌细胞缺血性损害时形态和功能的改变, 在细胞水平保护心肌。另一方面在基因水平 Sal B 也引起缺血心肌的显著改变, 其作用靶点集中在细胞骨架结构类、细胞防御与炎症反应类等基因上。

影响心室重构差异表达基因主要包括胶原蛋白 (NM_134452)、赖氨酰氧化酶 (NM_017061)、基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs, NM_053963) 等相关基因。实验表明, 在心梗早期, Sal B 一方面可上调胶原蛋白、赖氨酰氧化酶, 同时上调 MMPs 表达, 其中赖氨酰氧化酶参与了胶原合成过程, 可使胶原纤维具有很高的抗张强度, 并且不

表 2 急性心肌梗死大鼠(模型组)差异表达 2 倍以上的基因

Table 2 Difference expression genes beyond doubleness in acute myocardial ischemia rats (model group)

基因分类	GenBank ID	基因名称	SLR
细胞防御与炎症反应类	NM_133306	oxidised low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1	5.3
	NM_013037	Interleukin 1 receptor-like 1 (Fos-responsive gene 1) (Il1rl1)	3.6
	NM_016994	Complement component 3 (C3)	2.9
	U22520.1	interferon inducible protein 10 (IP-10)	2.2
	U03389.1	cyclooxygenase 2 mRNA	2.0
	NM_012580	Heme oxygenase (Hmox1)	1.6
细胞骨架结构类	Z78279.1	mRNA for collagen alpha 1 type I	2.5
	BI285575	procollagen, type I, alpha 1	2.2
	NM_134452	collagen, type V, alpha 1 (Col5a1)	2.1
	NM_012775	transforming growth factor, beta receptor 1 (Tgfr1)	1.2
	NM_017239	myosin heavy chain, polypeptide 6, cardiac muscle, alpha (Myh6)	-2.3
	NM_017083	myosin Vb	-1.4
代谢类	NM_017239	myosin heavy chain, polypeptide 6, cardiacmuscle, alpha	-1.3
	NM_012505	ATPase, Na ⁺ K ⁺ transporting, alpha 2 polypeptide (Atp1a2)	-1.8
	NM_012751	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter) member 4 (Glut4)	-1.4
	NM_130739	fatty acid Coenzyme A ligase, long chain 6 (Fad16)	-1.4
蛋白表达类	NM_019187	Rattus norvegicus Coenzyme Q (ubiquinone) (Coq3)	-1.3
	NM_053299	ubiquitin D (Ubd)	1.6
血管及血液系统类	X89963.1	thrombospondin-4	2.2
	NM_012532	Ceruloplasmin (ferroxidase) (Cp)	1.7
	AF323608.2	prothrombinase FGL2 mRNA	1.4
	AY032728.1	VEGF-D mRNA	1.3
	AF201331.1	strain F334N angiotensin-converting enzyme (Ace)	1.2

表 3 丹酚酸 B (120 mg/kg) 治疗后急性心肌梗死大鼠差异表达 2 倍以上的基因

Table 3 Difference expression genes beyond doubleness in acute myocardial ischemia rats after treated with Sal B (120 mg/kg)

基因分类	GenBank ID	基因名称	SLR
细胞防御与炎症反应类	NM_031971	Heat shock protein 70-1 (Hsp70)	1.4
	NM_012880	Superoxide dismutase 3 (Sod3)	1.3
	NM_016994	Complement component (C3)	-1.6
	U22520.1	interferon inducible protein 10 (IP-10)	-1.4
	NM_031512	Interleukin 1 beta (Il1b)	-1.2
	M34097.1	killer (NK) cell protease 1 (RNKP-1)	-1.0
细胞骨架结构类	NM_053963	matrix metalloproteinase 12 (Mmp12)	1.7
	NM_134452	collagen, type V, alpha 1 (Col5a1)	1.6
	NM_138850	fibroblast activation protein (Fap)	1.6
	NM_017061	Lysyl oxidase (Lox)	1.6
	NM_053606	Matrix metalloproteinase 23 (Mmp23)	1.5
	NM_031005	actinin alpha 1 (Actn1)	1.4
	NM_031675	Actinin, alpha 4 (Actn4)	1.4
	J04035.1	Rat tropoelastin mRNA, 3 end	1.3
	U57361.1	collagen XII alpha 1 (Col12a1)	1.2
	NM_053986	myosin IB (Myo1b)	1.2
代谢类	NM_021760	procollagen, type V, alpha 3 (Col5a3)	1.1
	NM_057107	fatty acid Coenzyme A ligase, long chain 3 (Fad13)	1.1
蛋白表达类	NM_053299	ubiquitin D (Ubd)	-3.4
血管及血液系统类	NM_013151	Plasminogen activator, tissue (Plat)	1.6
	AY032728	VEGF-D mRNA	1.5

易水解变性,其活性能促进成熟的胶原纤维的生成,使缺血区胶原明显增加,这与其加强梗死区的强度,避免在压力负荷下室壁进一步变薄有关,是一种保护调节机制。梗死后早期心肌在增加胶原合成的同时,胶原的分解就在进行,胶原酶活性显著增高,胶

原等基质成分的降解主要通过胶原酶等 MMPs 来完成^[5]。这两方面与 Sal B 维持胶原的合成及代谢平衡关系密切,从而促进坏死心肌细胞的尽快修复,同时防止过度纤维化,维持心脏的正常功能,其对心梗早期胶原的动态调节机制还有待深入研究。另一

方面,心肌收缩蛋白表达异常同样参与了心脏重塑,心室重塑是心力衰竭发生、发展的基础。肌球蛋白、肌动蛋白表达异常是心力衰竭的病生理标志之一。Sal B 可明显上调 α_1 -辅肌动蛋白(NM_031005)、肌球蛋白(NM_053986)的表达,对维持 AMI 大鼠的心功能也是非常有利的。

大鼠 AMI 后还表现为参与免疫与炎症反应的基因表达上调,包括氧化型低密度脂蛋白受体(NM_133306)、白介素 1 受体(NM_013037)、干扰素诱导蛋白 10(U22520.1)、补体(NM_016994)等。Sal B 可保护 AMI 大鼠心肌功能,同时上调热休克蛋白(HSPs, NM_031971)、超氧化物歧化酶(SOD, NM_012880)的表达。心肌细胞或组织高表达 HSP70 后,可明显耐受严重的缺血性损伤,心肌损伤后的功能恢复明显加快。SOD 作为抗氧化酶,能催化超氧阴离子自由基的歧化反应,对机体起保护作用。

在蛋白质合成与降解方面,心肌缺血后泛素(NM_053299)表达明显上调,而泛素-蛋白酶体蛋白降解途径可加速蛋白质的分解代谢,Sal B 可明显下调泛素表达,抑制蛋白质的过度分解代谢。在血管及血液系统方面,Sal B 还可上调血管内皮生长因子(AY032728),同时促进纤溶酶原激活剂(NM_

013151)表达上调,这些相关基因在 Sal B 治疗 AMI 中的作用有待于进一步探讨。总之,应用基因芯片可快速找到药物作用的靶基因,Sal B 对心脏的影响就是多环节、多层次、多靶点综合作用的结果,这与中医理论的整体观是一致的,其更深层次的作用机制尚需采用其他分子生物学技术进一步研究证实。

References:

- [1] Zhang M, Zhang B L, Gao X M, *et al.* Effect of different proportions of salvianolic acid B and tanshinone I_A on rat cardiomyocyte injured by tumor necrosis factor α *in vitro* [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2003, 19(9): 992-994.
- [2] Guo L P, Zhang M, Gao X M, *et al.* Research on the delayed function cinnabar phenic acid B pretreatment cardiac microvessel endothelial cell [J]. *Tianjin J Tradit Chin Med* (天津中医药), 2002, 19(1): 41-42.
- [3] Liu G T, Zhang T M, Wang B E, *et al.* Protective action of seven natural phenolic compounds against peroxidative damage to biomembranes [J]. *Biochem Pharmacol*, 1992, 43(2): 147-152.
- [4] Zhang M, Zhang B L, Gao X M, *et al.* Effect of different proportions of salvianolic acid B and tanshinone I_A on rat cardiac microvascular endothelial cells injured by tumor necrosis factor α *in vitro* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(1): 63-65.
- [5] Li Y Y, McTiernan C F, Feldman A M. Interplay of matrix metallo-proteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and their regulators in cardiac remodeling [J]. *Cardiovasc Res*, 2000, 46(2): 214-217.

野罂粟总生物碱镇痛作用与中枢去甲肾上腺素能系统的关系

杨宇杰¹, 刘豫安¹, 王春民^{2*}, 袁亚非¹, 佟继铭¹

(1. 承德医学院, 河北 承德 067000; 2. 承德颈复康药业集团有限公司, 河北 承德 067000)

野罂粟总生物碱(total alkaloids of *Papaver nudicaule*, TAPN)是从罂粟科植物野罂粟中提取出来的总生物碱,作为一种新型镇痛药具有良好的开发前景。前期研究工作表明 TAPN 的镇痛作用与阿片受体无关^[1], TAPN 抑制 PGs 的合成可能是其发挥外周镇痛作用的主要机制^[1],且其镇痛作用与减少脑组织 NO 生成有关,同时被 Ca²⁺ 所影响^[2]。本实验着重探讨 TAPN 的镇痛作用与去甲肾上腺素能系统的关系,以求深入了解 TAPN 的镇痛作用机制。

1 材料

1.1 药品与试剂: TAPN (质量分数为 59.3%), 承

德医学院中药研究所提供; 吗啡, 东北第六制药厂生产, 批号 001009; 利血平, 上海第十制药厂生产, 批号 010519; 去甲肾上腺素(NE), Sigma 公司出品。

1.2 动物: 昆明种小鼠, 18~22 g, 河北省实验动物中心提供, 合格证号: 医动字第 04056 号。Wistar 大鼠, 180~220 g, 中国医学科学院实验动物中心提供, 合格证号: 医动字 2002-048 号。

1.3 仪器: DT-100A 分析天平, 北京光学仪器厂; WQ-9E 痛阈测定仪, 北京海淀电子医疗仪器厂; 江湾 I 型立体定位仪, 贝克曼公司; 冰冻切片机, 上海新华元件厂; WS2-261-79 恒温箱, 上海医疗器

收稿日期: 2005-06-16

作者简介: 杨宇杰(1969—), 女, 医学硕士, 副教授, 研究方向为中药新药开发与研究。

* 通讯作者 王春民 Tel: (0314) 2154520