

复方丹参滴丸对急性心肌梗死大鼠基因表达谱的影响

王 刚, 崔佩佩, 宋生有, 李长志, 傅俊曾, 姜 民*, 白 钢, 罗国安
南开大学 药学院, 天津 300071

摘 要 目的: 利用基因芯片技术对复方丹参滴丸对心肌梗死大鼠基因表达的影响进行评价和研究。方法: 使用冠脉结扎法造成大鼠心肌缺血模型, 并提取给药组和模型组大鼠心肌缺血区组织的总 RNA, 用大鼠全基因组芯片分析其基因组表达谱变化。结果: 基因芯片结果显示, 与模型组相比, 给药组表达量发生变化的基因 (Ratio>2 或<0.5) 有 49 条, 其中表达下调的有 39 条, 主要有 Ppp3r1、Rhoa 和 Nppa, 表达上调的有 10 条, 包括 H2-T24、RT1-CE15、Ptprb 和 Hcst 等。结论: 复方丹参滴丸可通过调节 Wnt 信号通路等多个基因和信号途径来减小心肌梗死模型大鼠心脏缺血区的心肌损伤。

关键词 复方丹参滴丸; 心肌梗死; DNA 基因芯片

中图分类号: R542.22 R972 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2010) 02-0098-05

Studies on the Effect of Compound Danshen Dripping Pills on gene expression of acute myocardial infarction model in rats

WANG Gang, CUI Pei-pei, SONG Sheng-you, LI Chang-zhi, FU Jun-zeng, JIANG Min*, BAI Gang, LUO Guo-an
College of Pharmacy, NanKai University, Tianjin 300071, China

Abstract Objective: To investigate the role of traditional Chinese medicine Compound Danshen Dripping Pills in the regulation of immune-related genes expression in acute myocardial infarction. **Methods:** Myocardial infarction was induced by ligation of the left anterior descending artery. Isolated the total RNA from ischemia tissue of Compound Danshen Dripping Pills group and model group, and then screened the differently expressed genes with the gene chip technique. **Results:** There were 49 regulated genes by Compound Danshen Dripping Pills compared with the model, 39 genes were down-regulated, including Ppp3r1, Rhoa and Nppa; 10 genes were up-regulated such as H2-T24, RT1-CE15, Ptprb and Hcst. **Conclusions:** Some genes and signaling pathway such as Wnt signal pathway could be regulated to reduce the myocardial damage of ischemia tissue by Compound Danshen Dripping Pills.

Key words Compound Danshen Dripping Pills; myocardial infarction; DNA microarray

心肌梗死是指冠状动脉急性闭塞、血流中断所引起的局部心肌的缺血性坏死。在发展中国家心肌梗死是最大的死亡原因之一, 是人类健康的主要威胁之一。复方丹参滴丸由丹参、三七、冰片组成, 具有活血化瘀、理气止痛的功效^[1-3]。与西药相比, 它具有毒性低、不良反应小和安全性高等特点, 但其具体作用机制尚需进一步研究。我们使用基因芯片技术研究了应用复方丹参滴丸后表达量发生改变的大鼠基因及信号通路, 探讨复方丹参滴丸在改善大鼠急性心肌梗死方面的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

清洁级雄性 Wistar 大鼠, 体质量 220~250 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司; 复方丹参滴丸由天士力制药股份有限公司提供; 大鼠全基因组 27K cDNA 芯片、晶芯[®]cRNA 扩增标志试剂盒、晶芯[®]基因表达谱外参 1 μL (包括外标 X 体系和 Y 体系) 均由北京博奥生物科技有限责任公司提供; 荧光染料 Cy3-dCTP/Cy5-dCTP (Amersham 公司); Nucleospin[®] RNA Clean-up (MN 公司); Nucleospin[®]

收稿日期: 2010-02-10

作者简介: 王刚, (1985—), 男, 河北唐山人, 硕士在读, 主要研究方向为中药基因组学。

* 通讯作者 姜民, Tel: (022) 23504933, E-mail: drjiangmin@gmail.com

Extract II (MN 公司)。

1.2 心肌梗死模型的建立

40 只 Wistar 大鼠随机分为正常组、假手术组、模型组、阳性药组及复方丹参滴丸组, 每组各 8 只。参照文献^[4,5]制作心肌梗死损伤模型。大鼠称重后用 10% 水合氯醛 (300 mg/kg) ip 麻醉。在胸壁正中剪开皮肤, 然后在胸骨左侧 1 cm 左右钝性分离皮下组织和肌肉, 在心脏搏动最明显处用血管钳撑开胸腔。结扎部位选在左心耳和肺动脉圆锥之间, 距主动脉根部 2~3 mm, 以 0 号无损伤缝合针结扎冠脉, 结扎完后将心脏迅速放回胸腔。为防止大鼠术后感染, 每日 im 青霉素 4×10^5 U/只, 连续 1 周。心电图检查 ST 段明显抬高并持续 30 min 证实结扎成功。

1.3 给药

复方丹参滴丸组按 81 mg/kg ig 给药, 1 次/d, 体积为 1 mL/100 g, 连续 1 周。正常组、假手术组及模型组均 ig 等量生理盐水, 阳性药组 ig 阳性药地尔硫卓。

1.4 取材

ig 给药一周后, 将大鼠处死, 取其梗死区与正常组织之间的病变区域, 分成黄豆粒大小, 放入冻存管并标记后迅速投入液氮中。

1.5 Trizol 法提取总 RNA

取大约 5 mg 组织样本在液氮中充分研磨, 加入 1 mL Trizol 后继续研磨, 室温放置至溶化; 转入 1.5 mL EP 管中, 加入 200 μ L 氯仿 剧烈振荡 20 s, 室温放置 2~15 min; 12 000 r/min 离心 10 min; 取上层水相, 一般 400~450 μ L; 加入 500 μ L 异丙醇 摇匀, -80°C 过夜; 12 000 r/min 离心 10 min; 75% 乙醇 1 mL 洗涤沉淀; 7 500 r/min 离心 10 min; 弃乙醇, 吸干净残余的微量乙醇, 室温干燥 3~5 min; 30 μ L DEPC 水溶解沉淀; 甲醛变性凝胶电泳检测 RNA 是否发生降解。

1.6 基因芯片分析

博奥大鼠全基因组 27 K cDNA 芯片为双通道芯片, 为保证结果的准确性进行了 3 次生物学重复。本实验对照组为模型组, 实验组为复方丹参滴丸组, 首先用 Oligo-dT 引物将总 RNA 中的 mRNA 特异的逆转录成 cDNA, 然后再以 cDNA 第二链为模板体外合成 cRNA, 再以它为模板逆转录后用荧光染料 Cy3-dCTP/Cy5-dCTP 进行

cDNA 标志, 此过程为改良的 cRNA 线性放大标志方法。具体方法见博奥生物科技有限责任公司晶芯[®]cRNA 扩增标志试剂盒说明书。将反应体系滴加到基因芯片上, 盖上盖玻片, 并保证没有气泡, 再将杂交盒放入 BioMixerTM II 芯片杂交仪中, 42°C 杂交 12~14 h。将杂交后的芯片放入 LuxScanTM 10K-A 双通道激光共聚焦扫描仪进行扫描, 扫描得到的结果使用 BoaoAnalyzer 系列软件对芯片结果进行片间校正、片内归一化处理及信号可信度的标志等。

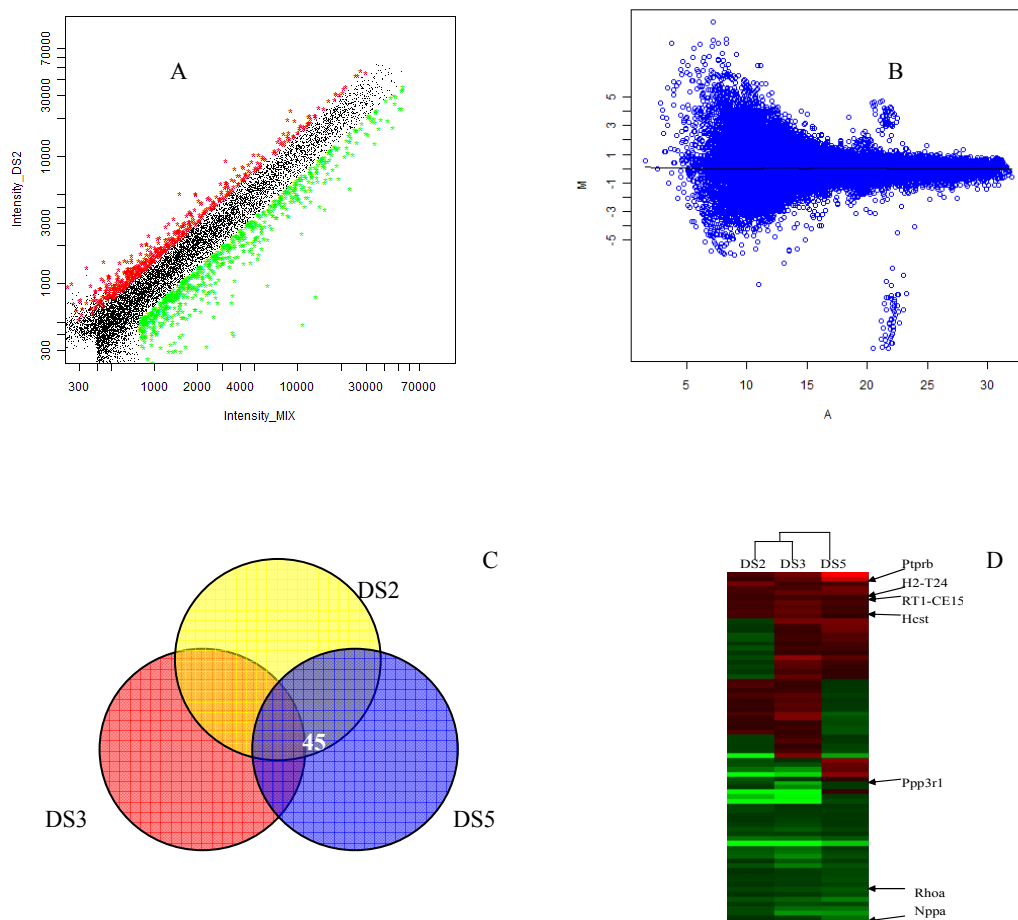
2 结果

选取 3 个模型组样本的 RNA 样品等量混合作为 3 张芯片的共同对照, 再随机选取 3 个复方丹参滴丸组样本分别与模型组对照作为生物学重复, 且在 3 张芯片中基因表达量全部上调或全部下调及 1.5 倍差异作为筛选差异表达基因的标准以保证结果的高可靠性及适度的全面性, 芯片扫描结果如图 1, 2 所示。将大鼠 27K 全基因组 cDNA 芯片筛选出的结果, 输入 MAS (Molecule Annotation System) 系统中进行 Pathway 和 GO 显著性统计分析, 发现复方丹参滴丸组与模型组相比有 44 条基因表达量发生改变, 其中 9 条基因表达上调, 35 条基因表达下调 (详细差异表达基因结果见表 1), 涉及到的信号通路有 35 条。

3 讨论

中医将心肌梗死归属于“胸痛”“胸痹”等范畴, 其实质是心肌缺血, 故中医采取具有活血化瘀功效的丹参来治疗心肌梗死, 效果显著。复方丹参滴丸是以丹参为君药的现代中药制剂, 是我国治疗心肌梗死的常用药。本文使用基因芯片技术初步研究其治疗心肌梗死的作用机制。

在胚胎发育期, Wnt 信号的失调将会导致夭折或发育缺陷, 在成体中则会导致包括癌症在内的多种疾病的发生^[6,7]。《Science》杂志上的一篇文章发现蝾螈的心脏可以再生, 这种再生能力与 Wnt 信号通路激活有关。Marielle 等^[8]的研究提示 Wnt 信号通路可能是心肌梗死后愈合过程的一个前提条件。Barandon 等^[9]的研究表明抑制 Wnt 信号通路的表达减少了心脏破裂的风险, 改善了心脏功能。Guo 等^[10]发现纤维蛋白原- γ C 末端可以通过 RhoA 依赖的方式诱导微血管出血。在我们的研究中心心肌梗死模型大鼠在给药复方丹参滴



A-复方丹参滴丸组 2 号样本的散点图; B-复方丹参滴丸组 2 号样本的归一化图;
 C-差异基因数示意图; C-3 张芯片的聚类图
 A-Scatter of No.2 Sample of CDDP group; B-Normalized graph of CDDP group;
 C-Schematic diagram of differential gene number; D-Dendrogram of 3 microarray

图 1 基因芯片分析及聚类结果
Fig.1 Microarray analysis and dendrogram.

丸 1 周后, Wnt 信号通路中的 2 个关键基因 Ppp3r1 和 Rhoa 均为表达下调, 这说明复方丹参滴丸对心肌梗死具有明显地改善作用。

Elisabetta Dejana 等^[11]发现血管内皮的渗透性某种程度上是由细胞间黏附结合 (AJS) 的动态开闭调节的。黏附结合通路中的磷酸络氨酸磷酸酶等钙黏蛋白通过与该通路中其他蛋白如 p120, β -catenin 和斑珠蛋白的结合增加血管的渗透性。而且 Bäumer S 等^[12]也发现血管内皮细胞特异性磷酸络氨酸磷酸酶虽然不是血管起始生成所必须的, 但却是血管重塑和维持所必须的。本实验结果显示大鼠心肌磷酸络氨酸磷酸酶基因 Ptprb 表达显著升高, 在给药复方丹参滴丸后大鼠心肌血

管内皮细胞的渗透性大大增强, 从而使受损心肌组织的需氧量和营养物质能够得到保障, 有利于其恢复。这说明复方丹参滴丸能够滋养受损心肌细胞, 有效减小梗死区面积, 达到对心肌梗死的治疗效果。

综上所述, 与模型组比较, 复方丹参滴丸能够显著降低 Ppp3r1, Rhoa 及 Nppa mRNA 表达, 减少心肌缺血缺氧性坏死; 同时可提高 H2-T24, RT1-CE15, Ptprb 及 Hest mRNA 表达量, 促进受损心肌细胞功能恢复, 减少梗死区面积, 降低心肌缺血损伤。可见, 复方丹参滴丸对大鼠急性心肌缺血具有显著的治疗作用, 其作用机制可能与 Wnt 信号通路及钙黏蛋白有关。

表 1 复方丹参滴丸组与模型组相比的差异表达基因

Table 1 Differential express gene between CDDP group and model group.

Name	Description	Ratio 平均
Oas1k	2'-5' oligoadenylate synthetase 1K	2.97
Oasl2	2'-5' oligoadenylate synthetase-like 2	2.12
Slc2a4	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4	2.05
Ptprb	protein tyrosine phosphatase, receptor type, B	2.04
RT1-CE15	RT1 class I, CE15	1.94
Psmb8	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 8 (large multifunctional peptidase 7)	1.94
Egr1	early growth response 1	1.80
Hcst	hematopoietic cell signal transducer	1.77
H2-T24	histocompatibility 2, T region locus 24	1.69
Gdi2	GDP dissociation inhibitor 2	0.63
Lxn	latexin	0.63
Dcps	decapping enzyme, scavenger	0.63
Rab5a	RAB5A, member RAS oncogene family	0.61
Shisa4	shisa homolog 4 (<i>Xenopus laevis</i>)	0.61
Ywhaz	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide	0.61
Oxct1	3-oxoacid CoA transferase 1	0.60
Heatr7b2	HEAT repeat family member 7B2	0.60
Fbxl22	F-box and leucine-rich repeat protein 22	0.60
Akr1c11	aldo-keto reductase family 1, member C-like 1	0.59
Oxr1	oxidation resistance 1	0.59
Gpr180	G protein-coupled receptor 180	0.58
Rhoa	ras homolog gene family, member A	0.53
Rab18	RAB18, member RAS oncogene family	0.53
Mt2A	metallothionein 2A	0.52
Ssr3	signal sequence receptor, gamma	0.52
Eraf	erythroid associated factor	0.52
Rab3d	RAB3D, member RAS oncogene family	0.50
Gpnmb	glycoprotein (transmembrane) nmb	0.49
Syap1	synapse associated protein 1	0.47
Ppp3r1	protein phosphatase 3, regulatory subunit B, alpha isoform (calcineurin B, type I)	0.47
RGD1562101	similar to very large G-protein coupled receptor 1	0.46
H1f0	H1 histone family, member 0	0.45
Slc3a1	solute carrier family 3, member 1	0.43
Stx7	syntaxin 7	0.43
Aspn	asporin	0.40
Mllt3	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, <i>Drosophila</i>) translocated to, 3	0.38
Ogn	osteoglycin	0.38
Hnrnpa3	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	0.37
Emp1	epithelial membrane protein 1	0.32
Maml1	mastermind like 1 (<i>Drosophila</i>)	0.23
Nppa	natriuretic peptide precursor A	0.22
LOC679886	similar to Charged multivesicular body protein 4b (Chromatin-modifying protein 4b) (CHMP4b)	0.11

参考文献:

- [1] 钟远, 唐燕. 复方丹参滴丸联合小剂量阿斯匹林对老年糖尿病患者血液高凝状态的影响[J]. 中草药, 2004, 35(9):1037-1038.
- [2] 王乃山, 李永忠, 李彦琴, 等. 复方丹参滴丸治疗脑梗死 120 例临床观察[J]. 中草药, 2004, 35(10):1165.
- [3] 王浩. 复方丹参滴丸治疗冠心病心绞痛的临床观察[J]. 中草药, 2003, 34(9):838-840.
- [4] 王维亭, 徐向伟, 张专友, 等. 大清醒比格犬心肌梗死超急性期缺血模型研究[J]. 现代药物与临床, 2010, 25(1):33-35.
- [5] 陈昭拮, 宋亚辉, 谢秀乐. 大鼠心肌梗死模型建立方法若干探讨[J]. 中国实用医药, 2009, 30(4):33-35.
- [6] Johnson M L, Rajamannan N. Diseases of Wnt signaling[J]. *Rev Endocr Metab Disord*, 2006, 7(1-2): 41-49.
- [7] Polakis P. The many ways of Wnt in cancer [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2007, 17(1):45-51.
- [8] Van Gijn M E, Daemen M J, Smits J F, *et al.* The wnt-frizzled cascade in cardiovascular disease[J]. *Cardiovasc Res*, 2002, 55 (1):16-24.
- [9] Barandon L, Couffinhal T, Ezan J, *et al.* Reduction of infarct size and prevention of cardiac rupture in transgenic mice overexpressing FrzA[J]. *Circulation*, 2003, 108(18):2282-2289.
- [10] Guo M, Daines D, Tang J, *et al.* Fibrinogen- γ C-Terminal fragments induce endothelial barrier dysfunction and microvascular leak via integrin-mediated and RhoA-dependent mechanism[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol March*, 2009, 29(3):394-400.
- [11] Dejana E, Orsenigo F, Lampugnani MG. The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability[J]. *J Cell Sci*, 2008, 121(13):2115-2122.
- [12] Bäumer S, Keller L, Holtmann A, *et al.* Vascular endothelial cell-specific phosphotyrosine phosphatase (VE-PTP) activity is required for blood vessel development[J]. *Blood*, 2006, 107(12):4754-4762.