

消瘀片对粥样硬化兔血管壁组织 ET-1 mRNA 和 NOSmRNA 表达的影响[△]

苏州中药研究所 (215007) 谢梅林* 顾振纶 周文轩** 郭次仪**
中国中医研究院 陈可冀

摘 要 采用原位杂交和 RT-PCR 方法,观察消瘀片治疗 16 周动脉粥样硬化兔后对血管壁组织 ET-1mRNA 和 NOSmRNA 表达的影响。结果显示,粥样硬化组的 ET-1 mRNA 和 iNOSmRNA 表达较多,而 cNOSmRNA 表达较少。使用消瘀片后,动脉壁组织中的 ET-1 mRNA 表达明显减少,提示血浆和血管壁组织中的 ET-1 减少是由于 ET-1 mRNA 转录水平降低所致。消瘀片对血管壁组织中 iNOSmRNA 和 cNOSmRNA 表达影响是不同的,它可降低 iNOSmRNA 表达,增加 cNOS mRNA 表达。表明消瘀片可通过调节 NOS 不同亚型基因的表达而消减动脉粥样硬化病变的程度。

关键词 消瘀片 内皮素 一氧化氮合酶 基因表达

Effects of Xiaoyu Tablet on Expression of ET-1 mRNA and NOSmRNA of Vessel Wall in Atherosclerotic Rabbit

Xie Meilin, Chen Keji, Gu Zhenlun, *et al.* (Suzhou Institute of Chinese Materia Medica, Suzhou 215007)

Abstract Techniques of in situ hybridization and RT-PCR as well as image pattern analysis were used in this study. The results indicated that ET-1 mRNA and iNOSmRNA expression in atherosclerotic model group were obviously increased, while cNOS, mRNA expression was decreased. After treatment with Xiaoyu tablet, a drug containing extracts of *Salvia miltiorrhiza* Bunge and *Crataegus pinnatifida* Bunge for the removal of blood stasis, for 16 weeks, ET-1 mRNA expression of vessel wall was reduced, suggesting that reduction of ET-1 in plasma and vessel wall was due to inhibition of ET-1 mRNA transcription. Effects of Xiaoyu tablets on iNOSmRNA and cNOSmRNA expression were very different, the drug might reduce iNOS mRNA expression and enhance cNOSmRNA expression, indicating that Xiaoyu tablet might abate the atherosclerotic degree through regulating the expression of NOS subgroup genes.

Key words Xiaoyu Tablet endothelin nitric oxide synthase gene expression

消瘀片为丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 水提取物和山楂 *Crataegus pinnatifida* Bge. 醇提取物按一定比例混合组成的纯中药制剂。已有研究表明,它通过调节血脂^[1~3],降低血浆内皮素(ET)和增加血清一

氧化氮(NO)含量^[4]等作用而消退动脉粥样斑块^[5]。本文采用组织原位杂交和 RT-PCR 方法,从 ET 和一氧化氮合酶(NOS)基因转录水平观察消瘀片对粥样硬化血管壁组织 ET-1 mRNA、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)

* Address: Xie Meilin, Suzhou Institute of Chinese Materia Medica, Suzhou

谢梅林 男,医学博士,副教授,原为苏州医学院药理学教研室副主任,江苏省药学会理事,1998 年获得江苏省青蓝工程优秀青年骨干教师称号。现为上海中医药大学博士后研究人员。曾获得科技进步奖部级二等奖 1 项,三等奖 3 项,市级三等奖 1 项。在国内外学术刊物上以第一作者发表论文 20 余篇,被美国 SCI 收录 2 篇,参编著作 2 部。主要研究方向为心血管药理学和中药新药的研究与开发。

** 苏州医学院客座教授

[△]香港保健协会资助项目

mRNA 和构建型一氧化氮合酶(cNOS) mRNA表达的影响,以进一步阐明其消退动脉粥样斑块的作用机制。

1 实验材料

1.1 药物与试剂:消痰片为棕褐色粉末,系太平保健药业(蛇口)有限公司提供,临用时用蒸馏水配至所需浓度。力平脂为法国科尼大药厂产品。胆固醇由南京生物化学制药厂提供。猪油系市售产品。地高辛高效 DNA 标记及检测 Starter Kit I, Titan™ one tube RT-PCR system, 10 mmol/L dNTP 和 4-吗啉-丙磺酸为德国宝灵曼公司产品。Trizol 试剂和蛋白酶 K 为美国 GIBCO/BRL 公司产品。DNase-free RNase, 溴化乙锭, 鲑精 DNA 和甘氨酸为 Sigma 产品。去离子甲酰胺为 Clontch 公司产品。焦碳酸二乙酯(DEPC)为 Fluka 产品。二甲苯靛蓝为 Eastman kodak 公司产品。ET-1 cDNA 和 iNOS cDNA 地高辛标记探针由北京中山生物技术有限公司提供。cNOS 引物,其序列为 5'-GGT GAA TTC ATA CCA GCC TGA TCC ATG GAA CAC-3' (sense), 5'-GGT AAG CTT CTT CTT CCT GTC CGC AAA GCT CAT-3' (anti-sense), 由中科院微生物所合成,扩增片段长度为 661 bp。GAPDH 内参照引物,北京医科大学心血管病研究所汤健教授惠赠。RNasin 和 PCR marker 为华美生物工程公司产品。其它试剂均为国产分析纯。

1.2 实验仪器:Olympus 显微镜,高速冷冻离心机(Sigma 3K30)和图像分析仪(KS-400 型)为德国产品。DNA 扩增仪(PT-200 型)为美国 PE 公司产品。电泳仪(DYY-Ⅲ 12 型)为北京六一仪器厂产品。紫外可见分光光度计(UV-300 型)为美国 Shimadgn 公司产品。紫外反射透射分析仪(2F-1 型)为上海长明光学电子仪器厂产品。

1.3 实验动物:雄性新西兰兔,体重 2 ~ 2.5 kg,由苏州医学院实验动物中心提供。

2 方法

2.1 兔腹主动脉粥样硬化模型复制及实验

分组:取雄性新西兰兔,于基础饮料中加入胆固醇 0.5 g/(kg·d)和猪油 0.5 mL/(kg·d)作高脂喂养,2 周后测得血清总胆固醇已由高脂饲养前的(1.13 ± 0.46) mmol/L 上升至(5.50 ± 1.86) mmol/L。参考 Helin 方法^[6]用 4F. Forgarty 导管进行腹主动脉内皮剥脱约 10 cm,术后继续喂养高脂饮料 6 周,兔血清总胆固醇由正常兔的(0.70 ± 0.24) mmol/L 上升至(16.66 ± 5.99) mmol/L,随机取 3 只兔处死后取出腹主动脉进行光镜和电镜观察,结果表明,腹主动脉内膜明显增厚,有大量泡沫细胞和胆固醇结晶形成,提示动脉粥样硬化模型已经形成。此时将高脂饮料改喂正常饮料,并将已形成腹主动脉粥样硬化兔 24 只随机分为 4 组,即粥样硬化组,消痰片小剂量组(0.16 g/kg·d)和大剂量组(0.32 g/kg·d),力平脂组(15 mg/kg·d),另加一组伪手术对照组,每组 6 只,连续给药 16 周后颈动脉放血处死,迅速取出腹主动脉 5 mm 置 10 %甲醛溶液固定,石蜡包埋,用于 RNA 原位杂交,余下主动脉放入液氮内保存,用于提取总 RNA。

2.2 组织原位杂交^[7]:石蜡切片置 60 °C 恒温培养箱 30 min 后浸入二甲苯,梯度乙醇水化,蛋白酶 K 消化,4 %多聚甲醛固定,预杂交 42 °C、30 min(预杂交液:6×SSC,45 %去离子甲酰胺,5×Denhardt's 液,100 μg/mL 变性鲑精 DNA),杂交加 1 μg/mL 变性探针的杂交液,42 °C 杂交 20 h,然后分别用 6×SSC-45 %去离子甲酰胺,2×SSC,缓冲液 I (100 mmol/L 马来酸,0.15 mol/L NaCl, pH7.5)和缓冲液 I (缓冲液 I 9 mL 加封闭液 1 mL)洗涤,滴加抗地高辛抗体,反应 30 min 后用 NBT/BCIP 显色 6 h。显微镜下观察血管壁紫蓝色或蓝色阳性杂交信号,直接输入 KS-400 型图像分析仪,定量测量阳性反应颗粒在视野中所占面积和积分光密度(IOD)。设立 RNase 处理及无探针对照组。

2.3 血管壁总 RNA 提取:每兔取液氮保存的腹主动脉血管壁组织 50 mg,同一组中的

每2只兔血管壁组织放入同一匀浆管中,加Trizol液1 mL匀浆,并按Trizol试剂盒说明书操作提取总RNA,最后加20 μ L DEPC水溶解RNA, -70 $^{\circ}$ C冰箱保存备用。

2.4 RNA含量测定及甲醛变性电泳:取4 μ L RNA提取液加DEPC水至1.6 mL,紫外可见分光光度计测 A_{260}/A_{280} 值,计算样品中RNA含量和纯度,用甲醛变性电泳^[7]鉴定。

2.5 RT-PCR:按TitanTM one tube RT-PCR system 试剂盒说明书操作后,将PCR薄壁管置DNA扩增仪中50 $^{\circ}$ C、30 min,进行逆转录,然后94 $^{\circ}$ C预变性5 min, DNA扩增程序^[8]为94 $^{\circ}$ C变性45 s, 58 $^{\circ}$ C退火45 s, 72 $^{\circ}$ C延伸1 min, 周期为33次,最后72 $^{\circ}$ C延伸5 min。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳后紫外灯下观察并摄影。

3 结果

3.1 ET-1 原位杂交:由表1可见,粥样硬化组阳性杂交颗粒的IOD和所占面积均较正常对照组显著增加($P < 0.01$),提示粥样硬化血管壁有较多的ET-1 mRNA表达。给中药消痰片后,可明显减少阳性杂交颗粒的表达,图像分析检测其IOD和面积均减少,尤其大剂量组的作用更为明显($P < 0.01$)。

表1 服用消痰片16周对粥样硬化兔血管壁ET-1 mRNA表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(g/kg·d)	IOD	面积(μm^2)
正常对照	—	38477 $\pm$ 10664	1931 $\pm$ 355
粥样硬化	—	65188 $\pm$ 10114 ^{**}	3028 $\pm$ 352 ^{**}
消痰片	0.16	45788 $\pm$ 10773 $\Delta\Delta$	2384 $\pm$ 699
	0.32	37558 $\pm$ 5170 $\Delta\Delta$	2339 $\pm$ 375 $\Delta\Delta$
力平脂	0.015	49113 $\pm$ 16869	3849 $\pm$ 622

$n=6$,与正常对照组相比较:^{**} $P < 0.01$

与粥样硬化组相比较: $\Delta\Delta P < 0.01$

3.2 iNOS 原位杂交:经图像分析测得粥样硬化组动脉壁组织的IOD和阳性反应颗粒所占的面积均较正常对照组显著增加($P < 0.01$),而消痰片组的IOD值低,所占面积少(表2),提示消痰片可抑制粥样硬化血管壁组织中的iNOSmRNA表达。

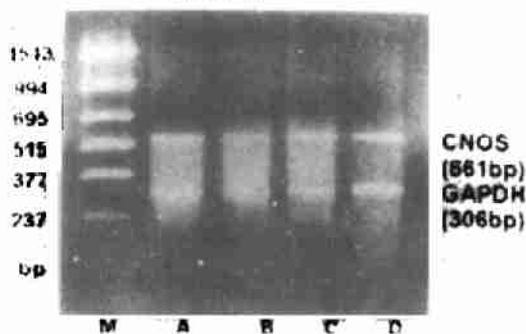
表2 服用消痰片16周对粥样硬化兔血管壁中iNOSmRNA表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(g/kg·d)	IOD	面积(μm^2)
正常对照	—	3180 $\pm$ 1014	22 $\pm$ 4
粥样硬化	—	9701 $\pm$ 287 ^{**}	92 $\pm$ 12 ^{**}
消痰片	0.16	6342 $\pm$ 2437 $\Delta\Delta$	69 $\pm$ 17 Δ
	0.32	5867 $\pm$ 1851 $\Delta\Delta$	38 $\pm$ 11 $\Delta\Delta$
力平脂	0.015	7227 $\pm$ 1868 $\Delta\Delta$	43 $\pm$ 4 $\Delta\Delta$

$n=6$,与正常对照组相比较:^{**} $P < 0.01$

与粥样硬化组相比较: $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$

3.3 总RNA鉴定及cNOS RT-PCR:本实验提取的RNA经紫外测得 A_{260}/A_{280} 比值在1.75 ~ 1.9之间,表明所提的总RNA纯度高,污染低。从甲醛变性凝胶电泳上可清晰地看到28 s和18 s两条带,其亮度之比为2:1,弥散的条带为mRNA,有拖尾现象,表明RNA带完整,没有降解。以此为模板,进行cNOS RT-PCR扩增,产物经琼脂糖凝胶电泳后,可见粥样硬化组cNOS条带暗淡,而给消痰片16周后,cNOS条带明显较粥样硬化组为亮(图1)。提示粥样硬化血管壁中的cNOSmRNA表达减少,而消痰片可增加cNOSmRNA的表达。



M-PCR marker A-正常对照组 B-粥样硬化组

C-消痰片0.16 g/kg组 D-消痰片0.32 g/kg组

图1 服用消痰片16周对粥样硬化兔血管壁中cNOSmRNA表达的影响

4 讨论

我们的研究已观察到,消痰片可降低粥样硬化兔血清和血管壁组织中的ET-1含量^[4]。本文通过组织原位杂交方法,发现在粥样硬化血管壁组织中,ET-1 mRNA的表达明显增加,而给消痰片后,这种表达明显降

低,证明消痰片是在转录水平上通过降低 ET-1 mRNA 表达而使 ET-1 含量下降。ET 是一种强烈长效促生长因子,它可促进血管平滑肌细胞的迁移和增生,由此推则消痰片通过降低粥样硬化血管壁组织中 ET-1 mRNA 的转录而抑制血管平滑肌细胞的迁移和增生,从而消减动脉粥样硬化。

本实验通过对粥样硬化血管壁组织中 iNOSmRNA 和 cNOSmRNA 表达研究发现, 在去内皮新西兰兔喂养高脂饮料形成动脉粥样斑块组织中, iNOSmRNA 表达明显增强, 而 cNOSmRNA 表达减少, 这与 Norbert 等报道 LPS/IFN- γ 刺激人单核细胞或巨噬细胞后使 iNOSmRNA 和 cNOSmRNA 表达的结果相一致^[8], 提示下调 cNOSmRNA 和上调 iNOSmRNA 表达可独立出现^[9]。这是因为高脂饮食后, 内皮细胞和血管平滑肌细胞质膜脂质双分子层出现明显的重构, 使膜中胆固醇含量大大地增加^[10], 内皮细胞膜掺入大量胆固醇后可使之与膜联结的 cNOS 活性下调^[11], 而胆固醇在血管平滑肌细胞中可增强细胞因子诱导 iNOS 活性^[12]。也有文献报道高胆固醇喂养兔的肺组织钙依赖型 NOS 活性下降, 而钙非依赖型 NOS 活性明显增加^[13]。但在本实验条件下, 也可能是由于去内皮后内皮细胞数明显减少而使 cNOS mRNA 表达减少所致。然而, 这些结果均提示, iNOS 活性增加或 cNOS 活性降低均可加重动脉粥样硬化, 相反, 抑制 iNOS 活性或增

强 cNOS 活性则可阻止动脉粥样硬化的进展。消痰片可使粥样硬化血管壁组织中的 iNOSmRNA 表达明显减少, cNOSmRNA 表达增加, 表明消痰片可通过影响 NOS 不同亚型基因的表达来调节 NOS 活性而发挥抗动脉粥样硬化作用。

总之, 血管平滑肌细胞从动脉中膜迁移至内膜并增殖是促细胞增生因子作用增强和抗细胞增生因子作用减弱所致。消痰片可从转录水平干扰动脉粥样硬化血管壁组织中 ET-1 mRNA 和 NOSmRNA 表达, 从而恢复 ET 和 NO 平衡的失调, 这可能是其消退动脉粥样硬化的作用机制之一。

致谢: 苏州中药研究所陆群和朱路佳同志参加部分实验操作。

参考文献

- 1 谢梅林, 等. 中草药, 1998, 29(3): 138
- 2 谢梅林, 等. 中国现代应用药学, 1998, 15(6): 15
- 3 谢梅林, 等. 中国中药杂志, 1999, 24(4): 229
- 4 谢梅林, 等. 海峡医药化学报, 1999, 2(1): 29
- 5 谢梅林, 等. 中成药, 1999, 21(10): 515
- 6 Helin P, *et al.* Atherosclerosis, 1971, 13: 319
- 7 姜泊, 等. 分子生物学常用实验方法. 北京: 人民军医出版社, 1996: 62, 128
- 8 Norbert R, *et al.* Eur J Immunol, 1994, 24: 1941
- 9 Forstermann V, *et al.* Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 1993, 347 (suppl): R61
- 10 Chen M, *et al.* Biochem Biophys Acta, 1995, 1272: 101
- 11 钟慈声, 等. 一氧化氮的生物医学. 上海: 上海医科大学出版社, 1997: 179
- 12 刘景生, 等. 基础医学与临床, 1996, 16: 401
- 13 Lang D, *et al.* Br J Pharmacol, 1993, 108: 290

(1999-03-20 收稿)

《中国中西医结合杂志》由中国中西医结合学会和中国中医研究院主办, 国内外公开发行。本刊主要宣传报道党的中医政策和中西医结合方针, 我国中西医结合在临床、科研、教学等方面的经验和成果。探讨中西医结合思路的方法, 介绍国内外中西医结合新进展, 开展学术探讨。为提高与普及相结合刊物。本刊的读者对象为中医、西医、中西医结合工作者, 医学院校学生, 基层医务工作者等。

本刊为月刊, 2000 年为大 16 开 80 页, 每册定价 6.90 元, 全年 82.80 元。国内代号 2-52, 各地邮局均可订阅。国外代理: 中国国际图书贸易总公司, 国外代号 M-640。

本社 1995 年开始出版《中国中西医结合杂志》英文版(CHINESE JOURNAL OF INTEGRATED TRADITIONAL AND WESTERN MEDICINE), 英文版为季刊, 大 16 开本, 国内外公开发行, 国内定价每册 25.00 元人民币, 全年 100.00 元人民币。国内代号 82-825, 各地邮局均可订阅。国外代理: 中国图书进出口总公司, 国外定价每册 15.00 美元(不含邮费)。

地址: 北京西苑操场 1 号(西苑医院内), 邮政编码: 100091, 亦可直接汇款至本社购买。