

养血清脑颗粒对原发性高血压大鼠血压及脑基因表达谱的影响

张艳军,高秀梅,康立源,郭志军,樊官伟

(天津中医学院,天津 300193)

自发性高血压大鼠,又称原发性高血压大鼠(spontaneous hypertension rat, SHR),其发病机制及发展变化接近于人类,血压水平较高且较稳定,是一种遗传性高血压模型。前期研究结果表明,养血清脑颗粒对肾性高血压模型大鼠有明显的降压作用^[1],本实验采用 SHR 模型观察养血清脑颗粒对 SHR 尾动脉收缩压及脑基因表达谱的影响,为阐明养血清脑颗粒作用机制提供新思路。

1 材料

1.1 药物及配制:养血清脑黑褐色浸膏,由天津天士力集团提供,A膏的收膏率为11.01%(浸膏含生药9.083 g/g),批号20020407;B膏收膏率25.62%(浸膏含生药3.903 g/g),批号20020404。临用时A与B按0.86:1(相当于生药2:1)将两种浸膏混合,混合后浸膏含生药6.3 g/g,以蒸馏水将混合浸膏稀释成含生药0.78、1.57、3.15 g/mL的药液。阳性对照药牛黄降压丸:市售,丸剂,每丸重1.6 g,天津中新药业集团股份有限公司达仁堂制药厂生产,批号C484035,以蒸馏水配制成0.0168 g/mL。工具对照药卡托普利片:市售,每片含卡托普利25 mg,天津市华新制药厂生产,批号20010901,以蒸馏水配制成0.788 mg/mL药液。

1.2 动物:选用符合要求的SHR 60只,13周龄,雌雄兼用,体重170~250 g;东京都威斯特大鼠(WKY) 10只,体重170~240 g,作为正常对照;均购自上海市高血压研究所,动物合格证号:医动字第0237-1号。大鼠饲养于恒温(22±2)℃室内通风柜内,每笼5~6只,标准饲料,自由饮水。

1.3 仪器:RBP-1B型大鼠血压心率仪,北京中日友好临床医学研究所。Scanarray-4000扫描仪,General Scanning公司。

2 方法

2.1 SHR尾动脉收缩压测量方法:采用大鼠尾动脉脉搏测压法。测压前,将大鼠放入(37±1)℃电热加温箱内,预热12~13 min,然后选择合适的鼠

笼,固定于测压台上测压。在大鼠安静状态下,连续测收缩血压3次,取平均值作为测压结果。正式实验前,适应性测压2周。待大鼠适应环境,血压稳定后,开始正式实验。

2.2 分组及给药:首先测定每只SHR的基础血压,然后按血压分层,随机分为6组,每组10只,分别为模型对照组,养血清脑颗粒高、中、低剂量(生药31.5、15.7、7.8 g/kg)组,阳性药牛黄降压丸组(0.168 g/kg),工具药卡托普利组(7.88 mg/kg)。另设WKY正常对照组。各组均ig给药,给药体积均为1 mL/100 g。每天ig 1次,连续8周。分别于第2、4、8周测量血压,每周第5、6、7天连续测压3 d,取平均值为该周血压。用SPSS10.0软件包进行统计学处理,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,给药前后比较用配对t检验,组间比较用q检验。

2.3 脑基因表达谱检测

2.3.1 样品制备:实验中仅观察SHR模型组和养血清脑颗粒高剂量组。选取ig养血清脑颗粒8周的SHR及同期饲养的SHR各10只,处死大鼠,迅速取出脑组织,用二乙基焦磷酸胺处理过的生理盐水冲洗,液氮保存。

2.3.2 总RNA提取:将液氮中保存的脑组织在液氮低温环境下分别研碎成粉末状,用Trizol试剂一步法抽提组织总RNA,纯化,电泳分析总RNA质量,等量混合参照Schna等^[2,3]方法逆转录标记cDNA探针并纯化。

2.3.3 芯片杂交:实验所用芯片为小鼠表达谱芯片,由上海联合基因公司制备,将基因芯片和探针分别在95℃水浴中变性5 min,将探针加在基因芯片上,用盖玻片封片,置于42℃杂交16~18 h。基因芯片杂交所用的双探针分别是以模型组和养血清脑颗粒高剂量组总RNA为模板合成,SHR模型组以Cy3-dCTP标记,而养血清脑颗粒高剂量组以Cy5-dCTP标记。

2.3.4 检测与分析:基因芯片用Scanarray-4000

收稿日期:2005-03-02

基金项目:国家“十五”攻关项目(2001 BA701A07-30)

作者简介:张艳军(1967-),男,医学博士,副教授,主要从事中药药理研究。

扫描仪进行两个波长的激光扫描,再用 ImaGene 3.0 软件分析 cy3、cy5 两种荧光信号强度和比值。将所有数据项的 cy3 标记强度乘上 Normalize 系数,得出调整后的 cy3*。算出所有基因调整后的比值 (cy5/cy3*)。筛选出比值大于 2 或小于 0.5 的数据,比值大于 2 说明此基因在养血清脑颗粒高剂量组中呈高表达,比值小于 0.5 说明此基因在养血清脑颗粒高剂量组中为低表达。

3 结果

表 1 养血清脑颗粒对 SHR 收缩压的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 Effect of Yangxue Qingnao Granule on contractive pressure of SHR ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(g · kg ⁻¹)	基础血压/kPa	给药期收缩压/kPa		
			第 2 周	第 4 周	第 8 周
WKY	—	17.16 ± 0.53	16.49 ± 0.80	17.02 ± 1.46	15.69 ± 0.80
模型	—	24.21 ± 1.86	25.14 ± 1.20	25.54 ± 1.46	26.47 ± 1.60
养血清脑颗粒	31.5	24.21 ± 1.20	23.67 ± 0.93*	23.28 ± 0.93**	23.01 ± 0.80***
	15.7	24.07 ± 1.46	24.74 ± 1.60	24.07 ± 1.86	24.34 ± 1.33*
	7.8	23.81 ± 1.20	24.61 ± 2.26	23.81 ± 1.46*	25.14 ± 1.46
牛黄降压丸	0.168	24.34 ± 1.60	24.21 ± 1.46	23.81 ± 1.06*	24.21 ± 1.46*
卡托普利	7.88 × 10 ⁻³	24.07 ± 1.86	22.74 ± 1.46**	22.61 ± 1.20**	22.74 ± 0.93**

与本组给药前比较: #P<0.05; 与模型组比较: *P<0.05 **P<0.01

#P<0.05 vs pre-administration of same group; *P<0.05 **P<0.01 vs model group

表 2 养血清脑颗粒对 SHR 脑差异表达的已知基因

Table 2 Known differential expression genes in brain of SHR treated by Yangxue Qingnao Granule

基因号	名称	比值	基因号	名称	比值
NM_002965	S100 Calcium-binding protein A9 (calgranulin B) (S100a9)	0.039	XM_573407	Postsynaptic density protein (citron) (Cit)	0.450
L22655	Rat anti-acetylcholine receptor antibody gene, kappa-chain, VJC region	0.147	NM_012564	Group-specific component (vitamin D-binding protein) (Gc)	0.452
M28671	Rearranged IgG-2b gene, last 4 exons	0.151	NM_031817	Osteomodulin (osteoaderin) (Omd)	0.459
J02585	Rat liver stearyl-CoA desaturase	0.174	BC087008	Flavin-containing monooxygenase 3 (Fmo3)	0.462
M17084	Beta-globin	0.211	NM_019144	Acid phosphatase 5, tartrate resistant (Acp5), mRNA	0.476
NM_036135	Fucosyltransferase 2 (Fut2)	0.238	L09752	Rat cyclin D2 (VIN1)	0.476
NM_013096	Hemoglobin, alpha 1 (Hba1)	0.243	U90725	Lipoprotein-binding protein	0.483
NM_017329	Surfactant-associated protein 1 (pulmonary surfactant protein, SP-A) (Sftpa1)	0.299	NM_013013	Prosaposin (sulfated glycoprotein, sphingolipid hydrolase activator) (Pasp)	0.492
NM_019140	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, D (Ptrpd)	0.314	AJ131563	Metalloprotease/disintegrin	2.143
NM_133412	Testis specific protein 1 (Tpx1)	0.322	NM_022183	Topoisomerase (DNA) II alpha (Top2a)	2.262
NM_012904	Annexin 1 (p35) (Lipocortin 1) (Anxa1)	0.333	NM_0173096	Myxovirus (influenza) resistance, homolog of murine Mx (also interferon-inducible protein IFI78) (Mx1)	2.325
NM_017293	Kinase interacting with leukemia-associated gene (stathmin)	0.351	NM_023025	CYP2J4 (Cyp2j4), mRNA	2.438
NM_013197	Rattus norvegicus aminolevulinatase synthase 2, delta (Alas2)	0.401	X52711	Rat mRNA for Mx1 protein	4.778
X73371	Fc Gamma receptor	0.423			

4 讨论

养血清脑颗粒以传统中医理论为指导进行组方,具有养血活血、平肝潜阳的功能。方中生地滋阴养血、补益肝肾,白芍柔肝熄风止痛,当归补血活血,川芎活血行气止痛,4 味药滋阴养血、活血柔肝,善

3.1 养血清脑颗粒对 SHR 收缩压的影响:养血清脑颗粒各给药组均有抑制 SHR 进行性血压增高的趋势。给药 4 周、8 周养血清脑颗粒各剂量组均表现出降压效果,牛黄降压丸组降压趋势与养血清脑颗粒组相似。卡托普利降压作用最为明显。结果见表 1。
3.2 脑差异表达基因:两种荧光信号的比值小于 0.5 或大于 2.0 的基因有 121 个,其中低表达的基因有 94 个,高表达的基因 27 个,养血清脑颗粒对 SHR 脑差异表达的已知基因见表 2。

治高血压肝肾阴虚之本;又以珍珠母、草决明、夏枯草、双钩藤清肝平肝、通络止痛,治疗肝阳上亢之标。本方将养血滋阴、活血柔肝之法寓于平肝潜阳之中,从而达到了标本同治目的。

本研究结果显示,连续 ig 养血清脑颗粒,各给

药组均有抑制 SHR 进行性血压增高的趋势。给药 4 周、8 周养血清脑颗粒各剂量组均表现出降压效果；基因谱表达结果表明，两种荧光信号的比值小于 0.5 或大于 2 的基因有 121 个，其中低表达的基因有 94 个，高表达的基因 27 个，养血清脑颗粒对 SHR 脑差异表达的已知基因 27 个，其中表达上调 5 个，下调 22 个。其中炎症相关基因 4 个，包括 NM_002965、AJ131563、NM_012904、X73371；与免疫相关基因 2 个，包括 L22655、M28671；与细胞内信号转导相关基因 4 个，包括 NM_019140、NM_013197、NM_012564、NM_017293；与药物代谢相关基因 2 个，包括 NM_023025、BC087008；与增殖相关基因 3 个，包括 NM_173096、X52711、L09752；与细胞发育和功能相关基因 3 个，包括 NM_019140、NM_013013、NM_031635；与细胞功能相关基因 2 个，包括 M17084、NM_013096；DNA

合成相关基因 1 个，即 NM_022183；与血管扩张相关基因 1 个，NM_013096。养血清脑颗粒对高血压的调控可能是多方面的，尽管目前尚不能完全解释这些基因的生物学功能与生理病理机制及基因群之间的相互作用，但是本研究表明，养血清脑颗粒可影响模型组大鼠基因表达，从基因水平上阐释了养血清脑颗粒的药理作用，同时为利用基因芯片技术探索药物作用的机制和作用靶点提供了思路与借鉴。

References:

- [1] Hu L M, Li J, Gao X M, *et al.* Effect of Yangxue Qingnao Granule on renal hypertension in rats and its mechanism [J]. *Shanghai J Tradit Chin Med* (上海中医药杂志), 2005, 39 (4): 47-49.
- [2] Schena M, Shalon D, Davis R W, *et al.* Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray [J]. *Science*, 1995, 270(5235): 467-470.
- [3] Schena M, Shalon D, Heller R, *et al.* Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 93(20): 10614-10619.

大豆异黄酮对 α -葡萄糖苷酶抑制作用的研究

全吉淑¹, 尹学哲², 柳明珠¹, 沈明花¹, 朴春梅¹

(1. 延边大学医学院 生物化学教研室, 吉林 延吉 133000; 2. 延边大学医学院附属医院, 吉林 延吉 133000)

良好地控制血糖是糖尿病治疗的基本目标。英国糖尿病前瞻性研究(UKPDS)证明严格的血糖控制可以减少Ⅱ型糖尿病患者慢性血管并发症的发生^[1]。在糖尿病降糖药物家族里 α -葡萄糖苷酶抑制剂是一组通过延缓碳水化合物的消化和吸收达到降低餐后高血糖目的口服降糖药,其作用特点是在碳水化合物的消化最后一步抑制双糖降解为单糖^[2]。由于其独特的优势,目前在临床上已广泛应用。最近笔者在动物实验中发现富含异黄酮的大豆胚轴提取物具有抑制糖尿病大鼠血糖增高和改善糖耐量的功效^[3]。在此基础上,本研究从大豆胚轴分离纯化大豆异黄酮单体,研究其对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用,并对其抑制作用的性质进行分析。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器: 酵母 α -葡萄糖苷酶 (source: *Saccharomyces sp.*) 和牛血清白蛋白为日本 Wako 产品。Yamato GA32 型喷雾干燥机、Iwaki REN—1

型旋转蒸发器、Eyela FDU—830 型冷冻干燥仪、Hitachi U—2010 型紫外分光光度仪和 Hitachi 高效液相色谱仪均为日本产。

1.2 大豆异黄酮的分离: 大豆冷冻干燥后剥离胚轴。将 3 kg 大豆胚轴用 12 L 50% 甲醇溶液提取后喷雾干燥得干粉 652 g。干粉用 10% 甲醇溶液溶解,上 C₁₈ 反相色谱柱 (YMC, ODS-A60-S150, 5 cm × 74 cm), 依次用 10%~100% 甲醇溶液梯度洗脱并收集各流出部分。大豆异黄酮单体的分离采用高效液相色谱法^[4], 色谱柱为 YMC ODS-AM-303 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μ m), 流动相为含 1 mL 三氟乙酸的乙腈, 采用 15%~35% 乙腈线性梯度洗脱 50 min 和 35% 乙腈洗脱 5 min, 检测波长为 260 nm。所得大豆异黄酮组分为: 大豆苷 26 mg、黄豆苷 20 mg、染料木苷 12 mg、丙二酰大豆苷 122 mg、丙二酰黄豆苷 64 mg、丙二酰染料木苷 36 mg、大豆素 15 mg、黄豆苷元 10 mg、金雀异黄素 4 mg。

收稿日期: 2005-01-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30360113)

作者简介: 全吉淑 (1968—), 女 (朝鲜族), 吉林省延吉市人, 硕士, 副教授, 主要研究方向为中草药中生物活性物质的分离及其药理作用研究。Tel: (0433) 2660588 E-mail: quanjs@public.yj.jl.cn