

· 药理与临床 ·

生川乌对小鼠 Focal adhesion 信号通路毒性影响的实验研究

张仲林^{1,2}, 彭 成¹, 刘宏伟³

(1. 成都中医药大学, 四川 成都 610075; 2. 成都医学院, 四川 成都 610083; 3. 上海生物芯片有限公司, 上海 201203)

摘要:目的 寻找生川乌的毒性基因, 探讨其毒性机制。方法 根据国际 ICH 的要求, 在 SPF 实验条件下采用生川乌水煎液 ig 昆明种小鼠进行毒性实验。采用基因表达谱技术, 就生川乌对小鼠 5 种脏器的毒性进行全基因组描绘, 应用 Cluster、GO 和 Pathway 等生物信息学手段对获取的数据进行综合分析并进行定量 PCR 验证。结果 生川乌明显影响小鼠黏着斑 (Focal adhesion) 通路中的黏附素 (ECM)、局部黏附激酶 (FAK) 和 GTP 结合蛋白 (Cdc42) 等关键基因。结论 生川乌可能是通过影响小鼠 Focal adhesion 信号通路的关键基因而引起毒性, 最终导致毒性的产生。

关键词:生川乌; 毒性; 信号通路; Focal adhesion

中图分类号:R285.53 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2009)01-0075-04

Toxicity of Radix Aconitii on Focal adhesion signal pathway of mice

ZHANG Zhong-lin^{1,2}, PENG Cheng¹, LIU Hong-wei³

(1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China; 2. Chengdu Medical College, Chengdu 610083, China; 3. Shanghai Biochip Co., Ltd., Shanghai 201203, China)

Abstract: **Objective** To study the toxicity and its mechanism of *Radix Aconitii* from genetic and molecular levels. **Methods** According to the requirements of ICH, the acute toxicity experiment was carried out under the condition of SPF by ig administration of the decoction of *Radix Aconitii* to mice. Gene expression profiling was used to describe whole-genome of five organs in mice, the related data were analyzed by using bioinformatics statistics, such as Cluster, GO, and Pathway, and the results were validated through quantitative PCR. **Results** The effects of *Radix Aconitii* on the key genes of the Focal adhesion pathway of mice, such as ECM, FAK, Cdc42, were remarkably. **Conclusion** The reason why *Radix Aconitii* produces the toxicity is probably that *Radix Aconiti* could cause the toxicity of Focal adhesion signal pathway through influencing the key genes.

Key words: *Radix Aconitii*; toxicity; signaling pathway; Focal adhesion

乌头类中药是一类主要含有乌头碱类有毒成分的中药, 包括川乌、草乌、附子、天雄、雪上一枝蒿、铁棒槌等。临床报道和现代药理研究都证实乌头类中药有强烈毒性, 但目前均无从基因层面研究此类中药毒性的报道。川乌对中枢神经、心血管系统和呼吸系统等有明显毒性。本研究以生川乌为模型药物, 从分子生物学角度寻找其毒性基因以及探讨其毒性机制, 为乌头类中药毒性研究提供基因层面的研究基础, 为临床对川乌的毒性认识提供分子生物学依据。

1 材料

1.1 药物: 生川乌购于成都市荷花池中药材市场,

经成都中医药大学学生药学教研室万德光教授鉴定为乌头 *Aconitum carmichaeli* Debx. 的干燥母根。生川乌水煎液 (含生物碱以乌头碱计为 0.274%), 由成都中医药大学药学组实验室提供, 实验前配置成生药 2 g/mL 备用。

1.2 试剂: 与 RNA 提取、纯化、双链 DNA 合成和芯片杂交等相关的试剂, 如 Total RNA Isolation、cDNA Synthesis and Synthesis of Biotin-Labeled cRNA、GeneChip Hybridization & Scanning 和 MES Free Acid Monohydrate Sigma Ultra 等系列, 由上海生物芯片有限公司提供。小鼠 A3.0 全基因组表达谱芯片, 美国 Affymetrix 公司研究制作。

收稿日期: 2008-05-23

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (30230410)

作者简介: 张仲林 (1972—), 男, 博士, 讲师, 2007 年毕业于成都中医药大学, 现在成都医学院药学院药理教研室工作, 研究方向为疾病动物模型与中药复方药理。Tel: (028) 68289191 E-mail: zhizhang2007@163.com

*通讯作者 彭 成 Tel: (028) 87789954 E-mail: pengchengcao@126.com

1.3 动物:健康昆明小鼠 20 只,雌雄各半,体质量 18~22 g,合格证号:川实动管字 04-11,由成都中医药大学试验动物中心提供,在 SPF 环境下正常饲养 1 周后供试。

2 方法

2.1 药物制备:生川乌粉碎成粒颗粒,称取 100 g 置于圆底烧瓶中,加 10 倍量水,浸泡 30 min,煮沸后煎煮 2 h,趁热滤过,用适量水洗涤残渣 3 次,合并洗液和滤液,减压浓缩至 50 mL,由成都中医药大学药学组实验室提供。

2.2 动物实验:将健康昆明种小鼠 20 只按性别、体质量随机分为两组,每组 10 只,即对照组、生川乌组。通过预试验,生川乌组 ig 相应水煎液 0.25 mL/20 g 时动物出现明显的中毒症状(神情淡漠、呆滞不动、呼吸频率加快、体温下降、偶见吐涎液),个别动物在 2.5 h 后出现死亡,故选用 0.25 mL/20 g 做为毒性检测剂量。生川乌组 ig 相应水煎液(生药 12.5 g/kg),对照组 ig 等体积的蒸馏水。给药 2 h 后处死小鼠,迅速解剖动物,取出脑、心、肝、肺、肾等脏器,用含 0.1% DEPC 的生理盐水漂洗,切成厚约 2 mm 的组织薄片放入预先装有 RNAlater 的冻存管中,样品在 4℃ 条件下保存,孵育过夜后置于 -20℃ 低温冰箱保存备用。

2.3 芯片实验:取用 RNAlater 冻存的小鼠脑、心、肝、肺及肾组织块,按照《Affymetrix 基因表达谱芯片操作指南》的步骤进行芯片实验。

2.4 PCR 验证实验:任意选取阳性基因 BB703394,设计相应引物,并对 5 个样品进行相应的 RT-PCR 实验,将实验结果与原芯片数据进行比较,考察 Chip 与 PCR 数据的拟合性。

2.5 数据处理:Gene Array Scanner 3000 7G, Affymetrix Fluidics Station 450, Affymetrix Genechip Hybridization Oven 640 Affymetrix, GCOS 数据处理软件(均为 Affymetrix 提供)。应用 Cluster、GO 和 Pathway 等生物信息学工具,对获取的数据进行综合处理与分析。

3 结果

3.1 小鼠组织样品 mRNA 质检和质控结果:对生川乌 ig 小鼠后的 5 种脏器的组织标本,采用 TRIzol 法抽提组织 RNA,得到的 RNA 样品浓度、总量和质控琼脂糖电泳结果;通过判断 28 S 和 18 S 的亮度比例可以初步评价总 RNA,可见 28 S/18 S ≥ 2 ,表明其总 RNA 质量较好,可以用于后期的芯片杂交实验。结果见表 1 和见图 1。

表 1 小鼠 5 个组织样品 RNA 浓度、总量和电泳信息

Table 1 RNA Concentration, total amount, and electrophoresis information of five tissue samples of mice

样品	质量浓度/($\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	总量/ μg	琼脂电泳质检
脑	3.89	389	合格
心	1.11	111	合格
肝	3.70	1480	合格
肺	1.86	186	合格
肾	2.41	241	合格

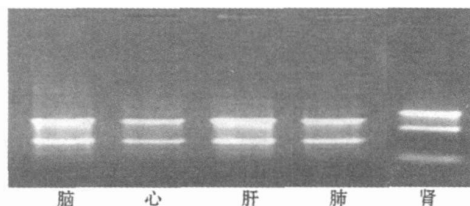


图 1 生川乌处理后小鼠 5 个组织样品琼脂糖电泳图

Fig. 1 Agarose electrophoresis of five tissue samples of mice treated by Radix Aconitii

利用质检合格的样品,按照实验操作指南进行芯片实验。芯片结果采用 Affymetrix 扫描仪进行扫描,GCOS 软件读取、处理数据。差异基因筛选标准:扫描值变化率为 I 或 MI,扫描值变化率取 2 为底的对数值 ≥ 1 ,实验组 Detection 为 P 的为上调基因;扫描值变化率为 D 或 MD,扫描值变化率取 2 为底的对数值 ≤ -1 ,对照组 Detection 为 P 的为下调基因。由此法得到生川乌处理后的组织样品散点图。图中当对照组、实验组的检测值都为 P 时以红色表示,其中一个为 P 时以蓝色表示,两个都为 A 时以黄色表示。结果显示,图像与背景平行线相平行,说明基因芯片信号强度及芯片均一性,结果具有均一性和可信性(图略)。

3.2 生川乌芯片数据基因 GO 分类:根据基因生物学功能描述,以 Gene Ontology Biological Process 为索引,按照国际基因 GO 分类法对生川乌芯片数据检测差异基因进行基因功能的分类统计,由数据可见在 GO 功能分类中,以结合、代谢、凋亡几类基因占优势。具体主要分类的统计结果见图 2。

采用分子功能注释(MAS)系统数据库,对生川乌小鼠芯片的阳性基因中与结合相关的基因进行 GO-terms 统计处理,可以评价该药物的全部功能 GO 基因的显著性,即判断这些 GO 基因在全部功能基因数据库中的权重与可信度(以 P 和 Q 值进行衡量:P 值 < 0.05 且 Q 值 < 0.05)。结果见表 2。

3.3 生川乌的 Focal adhesion 通路的关键基因:以生川乌小鼠芯片阳性表达基因 gene symbol 为目

录,输入京都基因及基因组学数据库 (KEGG) 得到其蛋白 Pathway 通路。以通路中出现的阳性基因

为序,找到其对应的基因 symble 和注释,并对其上调、下调情况进行统计,结果见表 3。

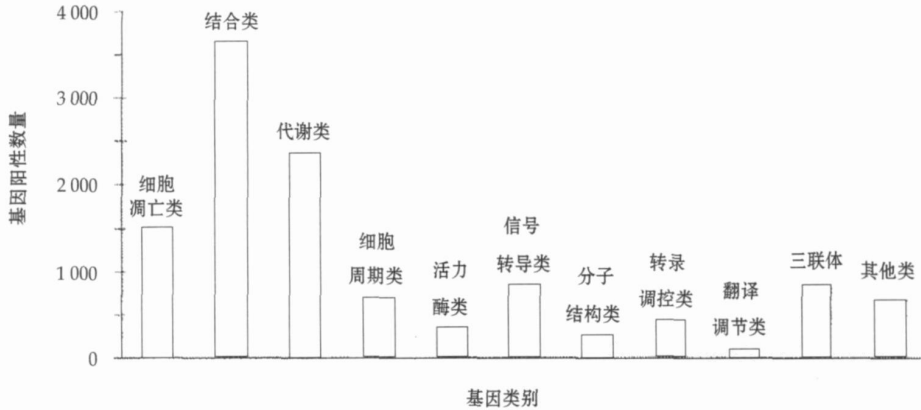


图 2 生川乌对小鼠阳性基因表达分类

Fig. 2 Classification of positive gene expression of mice treated by Radix Aconitii

表 2 生川乌处理小鼠的与 Focal adhesion 相关 GO 分类名称和 P、Q 值表

Table 2 GO-terms, P and Q values related to Focal adhesion pathway of mice treated by Radix Aconitii

GO 分类名称	基因总数	P 值	Q 值
GO: 0020037 铁红素结合	36	0. 0	0. 0
GO: 0005506 铁离子结合	45	0. 0	1. 0E-6
GO: 0005178 整联蛋白结合	10	3. 0E-6	3. 9E-5
GO: 0005507 铜离子结合	16	1. 1E-5	1. 08E-4
GO: 0005525 三磷酸腺苷结合	42	3. 4E-5	2. 84E-4
GO: 0008201 肝磷脂结合	12	4. 8E-5	3. 85E-4
GO: 0005509 钙离子结合	74	3. 47E-4	0. 002 368

表 3 生川乌处理小鼠的 Focal adhesion 通路阳性基因

Table 3 Some positive genes of Focal adhesion pathway of mice treated by Radix Aconitii

阳性基因位置	阳性基因	描述	表达情况
受体或配体基因	EMC	黏附素	上调
	ITGB	整联蛋白 $\alpha 9$	下调
	GF	表皮生长因子	上调
调节点基因	PTK	蛋白酪氨酸激酶	上调
	c-jun	原癌基因	上调
	PKC	蛋白激酶 C	下调
	FAK	蛋白酪氨酸激酶	上调
	PTEN	磷酸酯酶	下调
	PBK	磷脂酰肌醇 (3)-激酶	上调
	Yinculin	纽蛋白	下调
	ILK	整合素连接激酶	下调
	Crk	肉瘤病毒致癌基因同系物	下调
	PDK1	3-磷酸肌醇依赖蛋白激酶 1	下调
	c-jun	胸腺瘤病毒原癌基因 1	上调
	Akt/ PKB	胸腺瘤病毒原癌基因 1	下调
	B-Raf	环吡酮胺转化基因	下调
	Vav	致癌基因	上调
	PAK	P21 基因 (抑癌基因) 激活激酶	下调
效应基因	GSK-3 β	糖原合成酶激酶 3 β	下调
	β -catenin	B-1 连环蛋白	下调
	Bcl-2	B-淋巴瘤细胞	上调
	Actin	胞质肌动蛋白	下调
	CycD	细胞周期蛋白 D1	下调
	cIAPs	颗粒症病毒免疫黏连重复-封闭蛋白	下调

3. 4 阳性基因的 PCR 验证:任意选取阳性基因 BB703394 进行对心、肝、脾、肺和肾中相应的 5 组样品进行 PCR 验证,并通过比较定量 PCR 数据和芯片数据之间的关系,考察两者数据的拟合度。实验结果显示,该基因芯片变化值与定量 PCR 所得出的结果非常一致,主体变化趋势大致相符 (图 3)。说明实验数据真实可信。

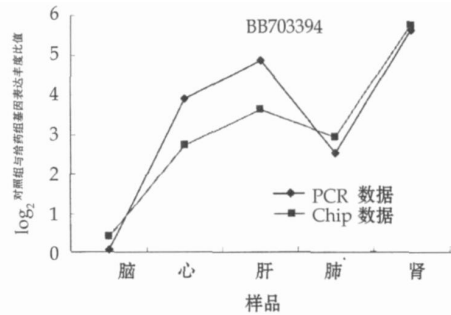


图 3 基因 BB703394 芯片与 PCR 数据的拟合度示意图

Fig. 3 Curve of fitting degree between PCR data and array data of BB703394

4 讨论

细胞骨架 (cytoskeleton) 是指真核细胞中的蛋白质之间搭建起来的纤维骨架网络结构。目前认为,细胞骨架主要功能是:(1)维持细胞整体形态和内部空间有序分布;(2)与细胞运动、物质运输、能量转换、信息传递、细胞分裂、基因表达、细胞分化等生命活动密切相关。在细胞骨架中有一重要的结构——黏着斑,黏着斑由细胞膜外的黏附素 (ECM)、细胞膜上的整联蛋白 (integrins) 和细胞内的细胞骨架蛋白等相互连接集聚而成。黏着斑又是以黏附分子凭借其黏附作用为动力而形成的,黏

附斑的功能有机械结构功能和信号传递功能。细胞正是依靠“黏着斑”这种特殊结构将细胞嵌合在体内正确位置,从而保持细胞的正常结构和发挥其正常功能^[1,2]。本实验中,观察到动物出现四肢发冷、鼠尾颜色苍白等能量不足的反应;另外,生川乌水煎液的长期毒性实验结果显示,动物胃壁内分泌细胞线粒体肿胀,胃平滑肌细胞的线粒体嵴减少、肿胀明显,肠上皮细胞线粒体嵴部分消失,线粒体轻度肿胀。可见,生川乌可能是通过影响细胞骨架来影响细胞的正常结构和功能,出现细胞功能紊乱而产生毒性反应。

ECM-整合素-细胞骨架蛋白所构成的黏着斑是整合素信号传导的结构基础,许多信号蛋白通过与黏附斑结合,在整合素介导的信号传导中发挥作用,如局部黏附激酶(FAK),3-磷脂酰肌醇激酶(PI3K)等^[3,4]。在芯片结果中,FAK、PI3K均出现了阳性表达,可见二者的变化将直接影响黏附斑正常的生理结构和功能,这可能就是毒性产生分子基础。芯片结果中大量与细胞的锚定、骨架、运动、增殖和存活的基因(如Actin、CycD、CIPs等)出现阳性表达。此外,与局部黏附相关的GTP结合蛋白Cdc42、Rac和Rho亦出现阳性表达。对与结合相关的GO进行统计结果也显示,药物对小鼠组织中多数与结合相关的基因有影响。可见,乌头类中药可能就是通过影响局部黏附作用来影响黏附斑进而导致黏附斑通路的异常而出现毒性。

成都中医药大学彭成教授在国家自然科学基金重点项目“乌头类有毒中药毒安全性研究”课题过程中,提出有毒中药的“毒性物质基础—毒作用机制—抗毒方法”的安全性评价模式。本研究正是在彭教授的“有毒中药安全性评价模式”思路指导下,运用基因芯片技术研究乌头类有毒中药的生川乌的毒性基因、毒性机制,为乌头类有毒中药毒性提供分子生物学依据。通过研究,寻找到了川乌对动物 Focal adhesion 通路影响的毒性效应基因,并对其毒作用机制进行了简单探讨。当然这些基因是否就是最终的毒性靶基因,更深入和细微的毒性机制又是什么,这些问题的解决一方面需要与本课题的其他研究结果互参;另一方面,需要对筛选出的毒性基因进行进一步锁定,对最感兴趣的基因进行原位杂交,进而对RNA和蛋白进行定位,并采用Western blotting进行蛋白水平层面的验证。

参考文献:

- [1] Blanchard A, Ohanian V, Critchley D. The structure and function of alpha-actinin [J]. *Muscle Res Cell Motil*, 1989, 10(4): 280-289.
- [2] DjinoVIC-Carugo K, Gautel M, Yanne J, et al. The spectrin repeat: A structural platform for cytoskeletal protein assemblies [J]. *FEBS Lett*, 2002, 513(1): 119-123.
- [3] Faulkner G, Pallavicini A, Comelli A, et al. A filamin, actinin, and telethonin-binding protein of the Z-disc of skeletal muscle [J]. *Biol Chem*, 2000, 275(52): 41234-41242.
- [4] Sorimachi H, Freiburg A, Kolmerer B, et al. Tissue-specific expression and alpha-actinin binding properties of the Z-disc-titin: implications for the nature of vertebrate Z-discs [J]. *Mol Biol*, 1997, 270(5): 688-695.

槲寄生黄酮苷对大鼠心肌缺血的保护作用及其机制

李 晶,刘清梅,王志勇,乔国芬,吕延杰,初文峰*

(哈尔滨医科大学 药理学教研室,黑龙江省生物医药重点实验室,黑龙江 哈尔滨 150081)

摘要:目的 观察槲寄生黄酮苷对心肌缺血大鼠的保护作用,并进一步明确其对血小板激活因子(PAF)的调控作用。方法 结扎大鼠冠状动脉左前降支造成急性心肌梗死模型,通过观察不同剂量槲寄生黄酮苷(15、75 mg/kg)及PAF受体特异性阻断剂BN52021(10 mg/kg)对梗死范围的影响,对比评价槲寄生黄酮苷对缺血心肌的保护作用;分离正常大鼠心肌细胞,Fluo-3/AM荧光染色,采用共聚焦显微镜技术研究,预先给予不同剂量槲寄生黄酮苷30 min后对PAF(1×10^{-11} mol/L)诱导心肌细胞钙超载的拮抗作用。结果 与模型组比较,槲寄生黄酮苷和BN52021均可缩小大鼠梗死心机范围,降低心肌梗死大鼠血清乳酸脱氢酶(LDH),丙二醛(MDA)水平,提高血清超氧化物歧化酶(SOD)水平,并成剂量效应关系。PAF可直接诱导心肌细胞钙超载,而槲寄生黄酮苷和BN52021可直接对抗这种钙超载作用。结论 槲寄生黄酮苷对心肌缺血具有保护作用,作用机制与其抑制PAF

收稿日期:2008-05-08

基金项目:黑龙江省自然科学基金重点项目(ZJ Y0501);中国博士后基金资助项目(20070410915);

黑龙江省青年科学基金资助项目(QC06C070)

作者简介:李 晶(1976—),女,黑龙江省哈尔滨市人,药理学硕士研究生。Tel: (0451) 55986019 E-mail: lij1325@163.com

*通讯作者 初文峰 E-mail: cwf76928@163.com