

香丹注射液对冠心病血瘀证内皮源性血管活性因子基因表达的影响

吴时达¹, 王 静¹, 陈守春², 徐俊波¹, 郑 铿¹, 闫亚非¹, 温天明¹, 汤雁蓉¹

(1. 成都市第一人民医院心内科, 四川 成都 610016; 2. 成都地奥制药集团公司, 四川 成都 610041)

[摘要] 目的: 探讨香丹注射液对冠心病患者血瘀证内皮源性血管活性因子基因表达的影响。方法: 将 56 例冠心病血瘀证患者随机分为冠心病常规治疗对照组和常规治疗加香丹注射液治疗组, 疗程均为 10 d。分别于治疗前、后采血, 用 RT-PCR 方法检测内皮素 1(endothelin-1, ET-1) 和内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric-oxide synthase, eNOS) 的 mRNA 表达。结果: 治疗后, 香丹注射液治疗组 eNOS 的 mRNA 阳性率增加, ET-1 的 mRNA 阳性率下降, 两组比较有显著性差异(P < 0.05)。结论: 香丹注射液能调节 eNOS 和 ET-1 的 mRNA 表达, 改善冠心病血瘀证患者血管内皮功能。

[关键词] 香丹注射液; 血管内皮功能; 内皮型一氧化氮合酶; 内皮素 1; mRNA

[中图分类号] R541.4 [文献标识码] A [文章编号] 1672-1977(2004)02-0094-03

Effect of Xiangdan Injection on mRNA expression of endothelial vaso-active factors of patients with coronary heart disease and blood stasis

WU Shi-Da¹, WANG Jing¹, CHEN Shou-Chun², XU Jun-Bo¹, ZHENG Qiang¹, YAN Ya-Fei¹, WEN Tian-Ming¹, TANG Yan-Rong¹

(1. Department of Cardiology, Chengdu First People's Hospital, Chengdu, Sichuan Province 610016, China; 2. Chengdu Di 'ao Pharmaceutical (Group) Co. Ltd., Chengdu, Sichuan Province 610041, China)

ABSTRACT Objective: To evaluate the effect of Xiangdan Injection on mRNA expression of the endothelial vaso-active factors of patients with coronary heart disease and blood stasis. Methods: Fifty-six patients were randomly divided into two groups: twenty-eight patients were treated according to the therapeutic guide for coronary heart disease as the control group and 28 were given the same treatment plus Xiangdan Injection as the treated group. The expressions of ET-1 and eNOS mRNA were examined with RT-PCR before experiment and ten days later. Results: The positive rate of eNOS mRNA of the treated group increased, while the positive rate of ET-1 mRNA of the treated group decreased after ten day's treatment, with significant differences as compared with that before the experiment. Xiangdan Injection up-regulated the eNOS mRNA expression and suppressed the ET-1 mRNA expression. Changes of expression were not observed in the control group. Conclusion: Xiangdan Injection improves the endothelial function of patients with coronary heart disease and blood stasis by regulating the expressions of ET-1 and eNOS mRNA.

KEY WORDS Xiangdan Injection; vascular endothelial function; endothelial nitric-oxide synthase; endothelin-1; mRNA

J Chin Integr Med, 2004, 2(2): 94-96

血管内皮在调节血液循环、稳定内环境方面起着重要作用。一氧化氮(nitric oxide, NO) 和内皮素 1(endothelin-1, ET-1) 是两种主要的内皮源性血管活性因子, 血管内皮通过调控 NO 和 ET-1 释放的平衡来实现血管和血流变的稳定。有资料显示中医血瘀证的 NO 和 NO/ET-1 比值明显下降^[1], 本试验使用具有活血化瘀作用的香丹注射液, 研究该药是否能够改善血瘀证内皮源性血管因子的失衡状态。

1 资料与方法

1.1 一般资料 研究对象为 2001 年 7 月 ~2002 年 6 月我院心内科住院的冠心病患者, 共 56 例, 全部符合 WHO 对缺血性心脏病的诊断标准以及 1986 年中国中西医结合学会活血化瘀专业委员会血瘀证诊

断标准^[2], 急性心肌梗死和心源性休克者不纳入。入选患者按随机数字表法随机分成两组, 每组 28 例。治疗组男 16 例, 女 12 例; 年龄 56 ~80 岁, 平均 62.4 岁; 病程 5 ~24 年, 平均 12.6 年; 并发高血压病 13 例, 糖尿病 6 例, 高脂血症 8 例, 陈旧性心肌梗死 4 例, 脑梗死后遗症 2 例; 伴心律失常 12 例, 伴稳定劳力型心绞痛 16 例, 不稳定性心绞痛 8 例; 心功能(纽约分级) Ⅰ级 15 例, Ⅱ级 11 例, Ⅲ级 2 例, Ⅳ级 0 例。对照组男 14 例, 女 14 例; 年龄 59 ~79 岁, 平均 64.5 岁; 病程 6 ~22 年, 平均 14.1 年; 并发高血压病 10 例, 糖尿病 5 例, 高脂血症 7 例, 陈旧性

[基金项目] 成都市科技局科技攻关项目(2002 年)
[作者简介] 吴时达(1945-), 男, 主任医师.
Correspondence to: Prof. WU Shi-Da.

心肌梗死 3 例, 脑梗死后遗症 1 例; 伴心律失常 13 例, 伴稳定劳力型心绞痛 14 例, 不稳定性心绞痛 9 例; 心功能 级 18 例, 级 9 例, 级 1 例, 级 0 例。两组资料经统计学处理, 差异无显著性, 具有可比性。

1.2 治疗方法 对照组给予冠心病常规治疗, 治疗组在对照组基础上加香丹注射液, 主要成分是丹参和降香(四川宜宾五粮液集团宜宾制药有限责任公司提供, 批准文号为国药准字 Z51020170), 40 ml 溶解在生理盐水 100 ml 中静脉滴注, 1 次/d, 治疗前及治疗 10 d 后, 分别采外周血检测内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric-oxide synthase, eNOS) 和 ET-1 的 mRNA 表达。

1.3 外周血 ET-1、eNOS 基因表达的检测

1.3.1 全血总 RNA 抽提 患者治疗前后分别采集外周静脉血各 2 ml, EDTA 抗凝。每份标本各取 1.5 ml, 新鲜抽提总 RNA。采用 Qiagen 公司全血 RNA 抽提试剂盒进行总 RNA 提取(按试剂盒说明操作), 将抽提所得总 RNA 分别溶于 30 μ l 无酶水中, 置 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存, 统一检测(见图 1)。

1.3.2 引物设计 根据 Genbank 中 ET-1、eNOS 基因序列资料, 选取序列保守区域设计引物, 根据实验中所设计的引物序列, ET-1 基因扩增阳性产物为 500 bp 基因片段, eNOS 基因扩增阳性产物为 400 bp 基因片段(上述引物均由上海基康生物技术有限公司合成提供), 引物序列如下:

ET-1: P₁ 5'-GATTATTTGCTCATGATTT-3'

P₂ 5'-TCACCAATGTGCTCGGTTG-3'

eNOS: P₁ 5'-TAGCCAAAGTCACCATCGT-3'

P₂ 5'-GAGCCATACAGGATTGTCG-3'

此外, 另设 β -actin 基因扩增引物为基因扩增阳性对照。

1.3.3 逆转录 每例标本各取总 RNA 5 μ l, 分别以 PCR 扩增下游引物为逆转录特异性引物, 进行逆转录反应(采用 Qiagen 公司逆转录试剂盒, 按说明操作), 逆转录反应体系如下: 全血总 RNA 5 μ l, 序列特异性引物(10 pmol/ μ l) 1 μ l, 5 \times 逆转录 buffer 4 μ l, ReverAid M-MuIV(200 U/ μ l) 0.5 μ l, 4 \times dNTP(2.5 mmol/each) 4 μ l, dd H₂O 5.5 μ l, 总反应体积为 20 μ l。

1.3.4 PCR 反应 37 $^{\circ}$ C 10 min, 42 $^{\circ}$ C 1 h, 最后 65 $^{\circ}$ C 5 min, 离心, 置 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存。每份标本各取逆转录反应产物 5 μ l 为 PCR 反应模板, 分别进行 PCR 反应。反应体系如下: 逆转录产物 5 μ l, PCR 上游引物(10 pmol/ μ l) 1 μ l, PCR 下游引物(10 pmol/ μ l) 1 μ l, 4 \times dNTP(2.5 mmol/each) 4 μ l, 10 \times PCR buffer(含 MgCl₂) 5 μ l, Vent DNA polymerase(1 U/ μ l)

1 μ l, ddH₂O 33 μ l, 总反应体积为 50 μ l。经预试验, PCR 循环最适条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min 后, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 循环 35 次; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min 后, 于 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物各取 5 μ l 经 2% 琼脂糖凝胶电泳 30 min, 于紫外灯下观察。ET-1 基因扩增阳性标本约为 500 bp 电泳条带, eNOS 基因扩增阳性标本约为 400 bp 电泳条带, 而阴性对照(模板为纯水)扩增结果为阴性, 阳性对照(β -actin 基因)约为 600 bp 扩增条带。分别计算治疗前后标本 ET-1 基因及 eNOS 基因 PCR 扩增的阳性率, 以此作为基因表达频率的指标。

1.4 统计学方法 统计分析采用 PEMS 3.0 统计软件进行, 基因表达的阳性率采用 χ^2 检验。

2 结果

治疗组治疗 10 d 后, ET-1 mRNA 表达阳性率由 82.14% 降至 57.14%; 而 eNOS mRNA 表达阳性率由 50% 上升至 78.57%, 治疗前后相比均有显著性差异(P < 0.05)。对照组治疗 10 d 后, 虽然 ET-1 mRNA 表达阳性率由 85.71% 下降至 82.14%, eNOS mRNA 表达阳性率仍为 53.57%, 治疗前后的变化经统计学处理, 无显著性差异(P > 0.05)。治疗组两种血管活性因子基因表达的改变明显大于对照组(P < 0.05)。见表 1, 图 1 ~ 图 3。

表 1 治疗前后 ET-1 和 eNOS 的 mRNA 基因表达阳性率比较

Tab 1 Positive cases of ET-1 and eNOS mRNA expression in 2 groups

Group	n	ET-1 mRNA positive cases	eNOS mRNA positive cases
Control group			
Before treatment	28	24	15
After treatment	28	23	15
Treated group			
Before treatment	28	23	14
After treatment	28	16*	22*

* P < 0.05, vs control group; P < 0.05, vs before treatment of the same group

3 讨论

NO 和 ET-1 是两种最重要的内皮源性血管活性因子, 两者作用相反。前者为强效舒血管因子, 而后者是迄今发现的最强的缩血管因子, NO 对 ET-1 的缩血管作用有较强的拮抗作用。ET-1/NO 的平衡对全身和局部血流调节起着十分重要的作用。该比值的失衡和冠心病等多种心血管疾病的发生有关^[3]。NO 和 NO/ET-1 比值下降也是血瘀证的重要病理机制^[4-7]。

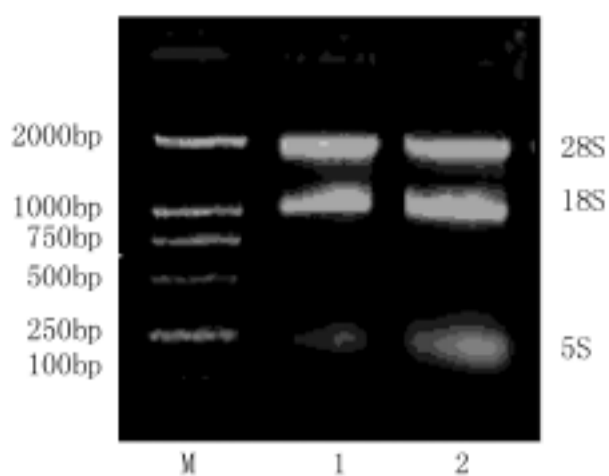


图 1 总 RNA 琼脂糖凝胶电泳

Fig 1 Agarose gel electrophoresis of total RNA

M: Marker; 1: Total RNA of whole blood sample 1;
2: Total RNA of whole blood sample 2

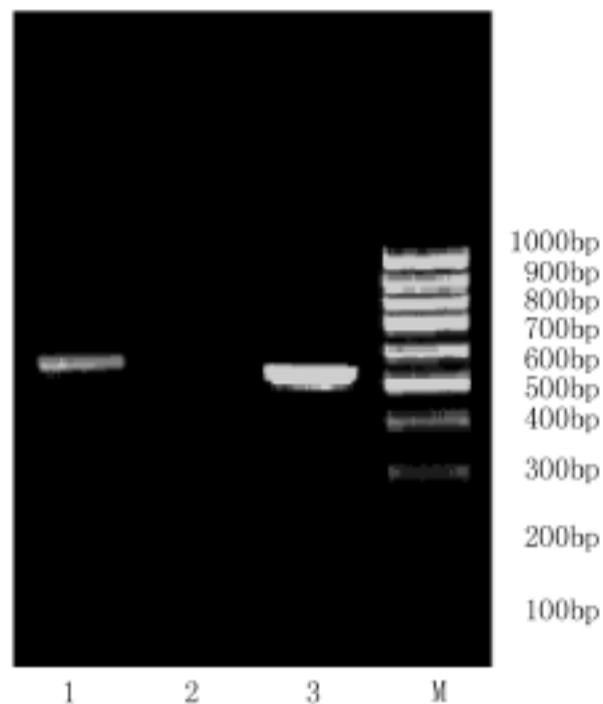


图 2 ET-1 基因琼脂糖凝胶电泳

Fig 2 Agarose gel electrophoresis of ET-1 gene

M: Marker; 1: Positive control, 600 bp; 2: Negative sample;
3: Positive sample, 500 bp

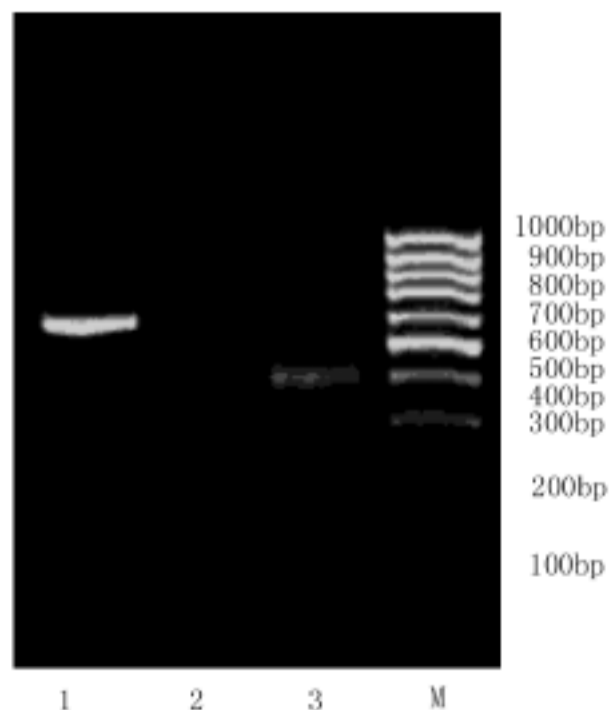


图 3 eNOS 基因琼脂糖凝胶电泳

Fig 3 Agarose gel electrophoresis of eNOS gene

M: Marker; 1: Positive control, 600 bp; 2: Negative sample;
3: Positive sample, 400 bp

香丹注射液的成分丹参、降香是目前应用较广泛的活血化瘀药, 特别是对冠心病血瘀症患者有良好效果。活血化瘀的疗效是否是通过纠正 NO/ET-1 的失衡来实现的, 这是本研究的目的。

一氧化氮合酶 (NOS) 是 NO 生成的唯一限速酶。NOS 有三种同工酶即 eNOS、神经型 NOS (neural nitric-oxide synthase, nNOS) 和诱导型 NOS (induced nitric-oxide synthase, iNOS), 其中只有 eNOS 能反映内皮功能。目前许多中药 (包括活血化瘀药) 药理研究只反映 NO 代谢产物的水平, 很难真实反映血管内皮细胞释放 NO 的水平, 为了避免这一缺陷, 我们根据循环系统内皮细胞的 eNOS mRNA 表达水平来反映香丹注射液对血管内皮功能的影响; 同样也通过血管内皮细胞 ET-1 基因的转录水平测定来反映香丹注射液的作用机制。试验结果表明香丹注射液可使 ET-1 mRNA 阳性表达率减少、而 eNOS mRNA 阳性表达率增多, 由此可见其纠正冠心病血瘀证的机制和血管内皮细胞功能改善有关。

由于氧自由基、脂质过氧化物的形成可以下调 eNOS mRNA 的表达而增加 ET-1 mRNA 表达, 缩短 eNOS 的半衰期, 而凝血酶激活的蛋白酶激活受体-1 能增加 ET-1 mRNA 的表达; 另外肿瘤坏死因子等细胞因子可促进人脐静脉内皮细胞、ET-1 和内皮缩血管肽转换酶-1 mRNA 的表达。因此我们推测香丹注射液改善血瘀证 eNOS 和 ET-1 基因转录表达水平可能和其具有抗氧化、抗凝和抑制肿瘤坏死因子等细胞因子有关。

[参考文献]

- 1 王 奇, 陈云波, 赖世隆, 等. 血府逐瘀汤对血瘀证兔模型血清损伤的血管内皮细胞内分泌功能的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2002, 8(2): 12-14.
- 2 陈可冀. 关于瘀血证的国内外进展 [J]. 临床荟萃, 1987, 2(2): 16-18.
- 3 Fukuchi M, Giaid A. Endothelial expression of endothelial nitric oxide synthase and endothelin-1 in human coronary artery disease. Specific reference to underlying lesion [J]. Lab Invest, 1999, 79(6): 659-670.
- 4 陈 颂, 葛金文. 血瘀证实质与血管内皮细胞关系的研究概况 [J]. 湖南中医学院学报, 2001, 21(1): 67-69.
- 5 巫 刚, 邹才华, 毛 兵, 等. 急性胰腺炎患者血浆内皮素和一氧化氮变化与血瘀证关系的探讨 [J]. 中国中西医结合杂志, 1999, 19(12): 715-717.
- 6 王春喜, 齐清会, 吴咸中, 等. 内皮素、一氧化氮等内皮细胞活性因子与动脉硬化闭塞症血瘀证关系的研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 1999, 19(8): 463-465.
- 7 王 阶, 李建生, 姚魁武, 等. 血瘀证量化诊断及病证结合研究 [J]. 中西医结合学报, 2003, 1(1): 21-24.

[收稿日期] 2003-06-10 [本文编辑] 周庆辉