

复方丹参滴丸对冠心病患者循环内皮细胞的 内皮素基因表达的影响

冯培芳¹ 秦南屏¹ 覃宇果¹ 程志刚¹ 冯久贤²

内容提要 目的:探讨复方丹参滴丸(DSP)对外周血循环内皮细胞 ET-1 基因表达的影响。方法:将 70 例稳定型心绞痛患者随机分为治疗组(用复方丹参滴丸治疗)及对照组(用消心痛治疗),采用逆转录—聚合酶链反应(RT-PCR)方法于治疗前后测定外周血循环内皮细胞 ET-1 基因表达,并与 30 名健康人作治疗前比较。结果:70 例心绞痛患者 69 例检出 546bp 阳性条带,健康者中无 1 例阳性。经 DSP 治疗后的 29 例中有 6 例未检出阳性条带,而对照组中无 1 例转阴。经 DSP 治疗后,ET-1 PCR 产物的相对量(吸收光密度)明显减少,与对照组比较,有显著性差异($P < 0.05$)。结论: DSP 能直接抑制外周血内皮细胞 ET-1 基因表达。

关键词 内皮素 基因表达 复方丹参滴丸 循环内皮细胞

Effect of Composite Salviae Dropping Pill on Endothelin Gene Expression in Circulating Endothelial Cells of Patients with Coronary Heart Disease Feng Peifang, Qin Nanping, Qin Yuguo, et al *Affiliated Hospital of Zhejiang College of TCM, Hangzhou (310006)*

Objective: To explore the effect of composite salviae dropping pill (CSDP) on endothelin (ET-1) gene expression in circulating endothelial cells. **Methods:** Seventy cases of stable angina pectoris were randomly divided into 2 groups, the CSDP group and the isosorbide dinitrate (ID) group. They were treated with CSDP and ID respectively, their ET-1 gene expression in endothelial cells of peripheral circulation was measured before and after treatment by reverse transcriptase-Polymerase Chain Reaction and compared between the two groups as well as with that of 30 healthy subjects. **Results:** Electrophoresis banding of 546 bp cDNA procured from 69 cases of 70 patients was positive, while no positive banding was obtained from healthy subjects. Six cases from the 29 patients treated with CSDP had their banding turned to negative, while in the ID group, no one had turned to negative after treatment. And ET-1 PCR product (absorbed optic density) in the CSDP group was markedly lower than that in the ID group, $P < 0.05$. **Conclusion:** DSP could inhibit ET-1 gene expression in endothelial cells of peripheral circulation directly.

Key words endothelin, gene expression, composite salviae dropping pill, circulating endothelial cell

自从 Yanagisawa 等从内皮细胞分离纯化内皮素(endothelin, ET)以来⁽¹⁾, ET 的生物学意义及表达调控日益引起人们的重视。冠状动脉平滑肌分布有丰富的 ET 受体,因而 ET-1 是目前所知作用最强的冠脉收缩剂⁽²⁾。复方丹参滴丸是利用现代药学新技术研制而成的一种纯中药制剂,是防治心绞痛的理想药物。我们应用逆转录—聚合酶链反应(RT-PCR)技术检测了心绞痛患者用复方丹参滴丸治疗前后外周血中循环内皮细胞 ET-1 基因表达情况,试图从内皮细胞分泌 ET-1 途径来阐明其作用机理。

资料与方法

1 临床资料 70 例均为门诊患者,按 WHO“缺血性心脏病的命名和诊断标准”⁽³⁾诊断为稳定型劳累性心绞痛。随机分成两组,治疗组 35 例中,男 28 例,女 7 例;年龄 50~82 岁,平均 57.2 岁;病程 14 天~16 年,其中 1~5 年占 60.4%。对照组 35 例中男 26 例,女 9 例;年龄 54~80 岁,平均 58.3 岁;病程 20 天~14 年,1~5 年占 62.1%。两组临床资料经统计学处理无显著性差异,具有可比性。另择健康对照组 30 名,男 25 名,女 5 名,年龄 50~80 岁,平均 58 岁。

2 给药方法 治疗组用复方丹参滴丸(天津天使力制药公司生产,批号 960526,主要由丹参、三七、冰

1. 浙江中医学院附属医院(杭州 310006); 2. 上海胸科医院分子生物研究室

片组成,每粒滴丸含生药 0.1092g),每次 10 粒,每日 3 次。对照组服二硝酸异山梨醇酯(消心痛片,山东博山制药厂生产,批号 9603041)10mg,每日 3 次。两组均于用药前及用药 1 个月后做有关检查,然后追踪观察心绞痛症状及心电图变化 3 个月。

3 实验室测定方法

3.1 模板 RNA 提取 取全血 1ml 加入溶血试剂(NH_4Cl 3.5g, NH_4HCO_3 35mg, 二蒸或三蒸水 500ml 混匀即成),然后采用异硫氰酸胍(Serva 产品)一酚一氯仿一步法提取 RNA^[4],其吸收光密度(OD)260nm/280nm 比例在 1.8~2.0 之间。同时以血管内皮细胞株的培养细胞(上海胸科医院肿瘤研究室提供)作为对照组。

3.2 RT-PCR 检测 (1)cDNA 合成(RT):取模板 RNA 1 μg 加入寡聚脱氧胸苷酸(Oligo-dt, Sigma 公司产品),脱氧核三磷酸(dNTP, Promega 公司),鸟髓母细胞增生病毒(AMV),逆转录酶和第一链互补 DNA(cDNA)缓冲液,总反应体积 20 μl ,在 42℃ 保温 30min,95℃ 变性 3min。(2)PCR 反应:ET-1 基因引物^[5]由美国 Cybesyn 公司合成,序列如下:Primer-1(引物 1),5' CGTTGCTCC TGC TOC TOC TTG ATG G-3'。Primer-2 5' AAG ATC CCA GGC AGC ATG GAG AGC G-3'。反应体系 cDNA 4 μl ,dNTP, Primer 1,2, 10 $\times$ Taq 缓冲液, Taq DNA 聚合酶(耐热的 DNA 聚合酶,华美公司),总体积 25 μl 。并按以下参数在 PCR 扩增仪(MJ. Research, INC, USA)上进行:94℃ 变性 1min,60℃ 退火 1min,72℃ 延伸 1min,循环 35 次,循环终末 72℃ 加热 10min,终止反应。同时 β -actin 引物取代 ET-1 引物进行 PCR 反应。(3)PCR 产物分析:取 PCR 产物 10ml,加溴酚蓝指示剂进行 2% 琼脂糖凝胶(含 0.5mg/L 溴化乙锭)电泳,在电压 100V 通电 30min。电泳结束后,紫外灯光下观察到 546bp 的条带即为阳性。本组监测以 β -actin 为内参照,以血管内皮细胞株为对照组。对阳性条带照相后用图像分析仪(VDS Image Sepstem)检测 ET-PCR 产物吸收光密度(OD)。

4 统计学方法 计量资料用均数土标准差($\bar{x} \pm s$)表示,治疗前后,各组间比较用 t 检验。计数资料用 χ^2 检验。

结 果

1 心绞痛的疗效观察 疗效评定按文献^[6]标准。心绞痛症状共有 IV 级(轻、中、较重、重)。疗效分级:显效为症状消失或减轻 2 级;有效为症状减轻 1 级或 <2 级,无效为症状减轻 <1 级或无改善。治疗组(30 例)心绞痛显效 12 例(40%),有效 16 例(50%),总有效率

90%;对照组(30 例)心绞痛显效 12 例(40%),有效 15 例(50%),总有效率 90%, $P > 0.05$ 。

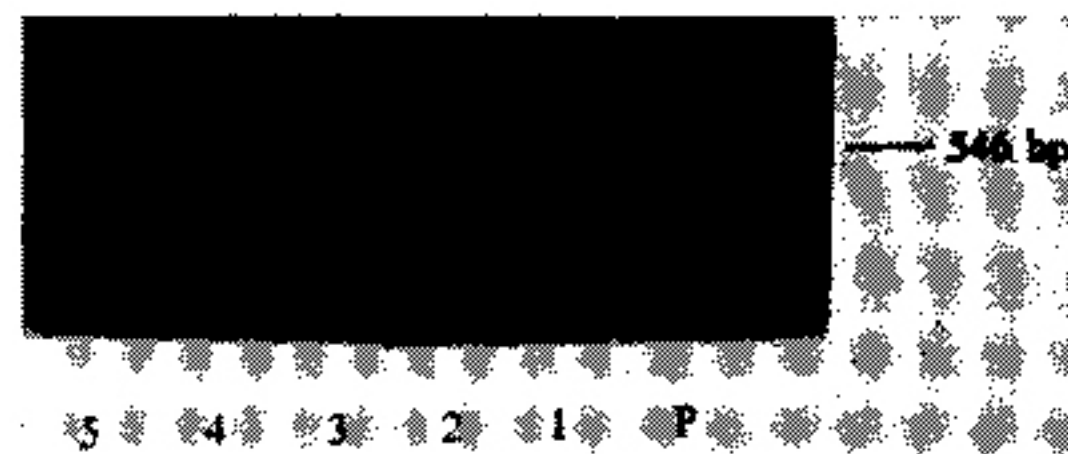
2 治疗前后心电图的改变 治疗组心电图显效 9 例(30%),有效 9 例(30%),总有效率 60%;对照组心电图显效 8 例(27%),有效 8 例(27%),总有效率 54%, $P > 0.05$ 。

3 冠心病心绞痛患者内皮细胞 ET-1 mRNA 的表达 70 例患者予治疗前从内皮细胞 mRNA 反转录后经 35 次循环扩增后,测得 ET-1 基因表达,其中有 59 例出现 546 bp 的阳性条带(见图 1)。69 例中,治疗组为 29 例,对照组 30 例,经统计学处理, $P > 0.05$ 。而健康者 30 名中,无 1 名阳性(见图 2),与治疗组及对照组比较有显著性差异。

4 丹参滴丸对内皮细胞 ET-1 mRNA 表达的影响 经两种药物治疗后,分别对两组中出现阳性条带的患者重复测定 ET-1 基因。丹参滴丸治疗组 29 例中有 6 例未检测到阳性条带(见图 3)。而对照组无 1 例变化(见图 4),与治疗组比较, $P < 0.05$ 。



M 系 PCR 等距离 Marker, 下图同;1、2、3、4、6、7 为阳性结果,5 为阴性
图 1 治疗前冠心病患者扩增产物在琼脂凝胶中电泳结果



1、2、3、5 为阳性结果,P 为阳性对照
图 2 健康者 ET-1 扩增产物在琼脂凝胶中电泳结果



1 为阳性结果,其余均为阴性
图 3 复方丹参滴丸治疗后,有阳性结果的冠心病患者其 ET-1 扩增产物在琼脂凝胶电泳结果



1、2、3、4、5、6、7 均为阳性结果

图 4 硝酸甘油治疗后有阳性结果的冠心病患者其 ET-1 扩增产物在琼脂凝胶电泳结果

5 两组治疗前后 ET-1 PCR 产物的相对量(吸收光密度值, IOD)比较 见表 1。经复方丹参滴丸治疗后, ET-1 PCR 产物的吸收光密度与治疗前及经消心痛治疗后比较, 明显减少($P < 0.05$), 说明复方丹参滴丸能抑制血管内皮细胞表达 ET-1 mRNA。

表 1 两组治疗前后 ET-1 PCR 产物的相对量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	ET-1 PCR 产物的相对量(吸收光度 IOD _{nm})
治疗	29	治前 294.49 ± 12.05
		治后 $69.55 \pm 80.88^{* \Delta}$
对照	30	治前 290.68 ± 10.12
		治后 288.09 ± 11.32

注: 与本组治疗前比较, $* P < 0.05$; 与对照组治疗后比较, $\Delta P < 0.05$

讨 论

内皮素是迄今所知作用最强、持续最久的缩血管活性多肽, 冠状动脉对内皮素的反应最为敏感。人体内的内皮素有 3 种异形肽, 其中 ET-1 主要在内皮细胞内表达, 通过旁分泌方式调节局部血管紧张度。局部 ET 释放的增加, 并不一定反应血浆水平的变化。因此, 检测血管内皮细胞 ET-1 mRNA 表达才有意义。在正常生理状态下血液中存在少量自然更替的脱落细胞即循环内皮细胞, 它是目前在活体内唯一可以特异而直接地反映血管内皮损伤的指示物, 具有重要的临床实用价值。我们运用 PT-PCR 法来检测循环内皮细胞的 ET-1 基因表达情况^[5], 并通过图像分析仪测定吸收光密度 (IOD) 半定量地反映 ET-1 基因的转录水平。研究结果显示, 与健康人比较, 冠心病心绞痛患者其内皮细胞表达 ET-1 mRNA 明显增加, 可见血管内皮细胞局部 ET-1 的大量释放直接参与了心绞痛的发病。复方丹参滴丸是采用现代药学新技术研制而成的一种高效、速效的新型纯中药制剂。该药主要由丹参、三七、冰片组成, 具活血化瘀、理气止痛功效。本组 29 例稳定型心绞痛患者经复方丹参滴丸治疗后, 在心绞痛

症状缓解及心电图心肌缺血改善同时, 血管内皮细胞 ET-1 mRNA 表达也明显减少, 与消心痛治疗组 ($n = 30$) 比较, 有显著性差异。两组治疗前后 ET-1 PCR 产物的相对量比较也证实了这一点。结果表明, 复方丹参滴丸也可直接通过调节血管内皮细胞 ET-1 mRNA 的表达水平来缓解心绞痛的发作。多年来的研究证明, 丹参具有降低血小板聚集性、抗凝血、钙拮抗作用^[7], 三七也有同样作用^[8,9]。复方丹参滴丸是否通过这些作用抑制了内皮细胞的前内皮素原的转录, 这点有待进一步研究。内皮素表达水平的升高可作为危重疾病时循环和呼吸衰竭的一个重要指征^[10], 运用复方丹参滴丸来控制内皮素的产生与分泌、对抗内皮素的作用将可为危重疾病的抢救寻找一条新的有效的途径。

参 考 文 献

1. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988;332:411—415.
2. Kurihara H. Endothelin: A potent vasoconstrictor associated with coronary vasospasm. *Life Sci* 1989;44 (25):1937—1941.
3. 陈灏珠, 李宗明. 内科学. 第 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 1984:274—276.
4. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of DNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156—159.
5. Pekonem F, Nyman T, Rutanen E. Differential expression of mRNAs for endothelin-related proteins in human endometrium myometrium and leiomyoma. *Molecular and Cellular Endocrinology* 1994;103:165—169.
6. 冠心病心绞痛及心电图疗效评定标准. 防治肺心病、冠心病、高血压病座谈会资料选编. 北京: 人民卫生出版社, 1979:82—84.
7. 周小明, 陆再炎, 江道义. 丹参防治实验性动脉再狭窄及其机制的初步研究. *中国中西医结合杂志* 1996;16(5):480—482.
8. 张子照, 李永伟. 三七提取物对心肌的药理作用. *药学学报* 1980;15(7):385—390.
9. 王作祥, 楚新民. 三七冠心宁对血小板聚集、血粘度的影响. *中草药* 1983;14(3):29—30.
10. 汤 健, 唐朝枢, 杨 军, 等. 内皮素——基础临床. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1994:310—312.

(收稿:1998-05-29 修回:1998-12-25)