

• 临床论著 •

高血压肝阳上亢证的分子机理研究*

金益强 胡随瑜 鄢东红 刘爱平 唐发清 肖 纯 谌兵来 王勇华

内容提要 **目的**:探讨高血压肝阳上亢证的分子机理。**方法**:应用高效液相色谱(HPLC)方法检测健康人、高血压病肝阳上亢证及肝肾阴虚证患者血浆去甲肾上腺素(NE)和肾上腺素(E)含量,并采用 Southern Blot 方法分析上述 3 组间酪氨酸羟化酶(TH)基因多态性;用 PCR-SSCP 方法分析高血压肝阳上亢证 TH 及单胺氧化酶 A 和 B(MAOA, MAOB)基因相关微卫星多态性改变;同时,采用自发性高血压大鼠(SHR)加灌附子汤方法复制高血压肝阳上亢证动物模型,用免疫组织化学方法和原位杂交法分别测定该模型肾上腺组织 TH 蛋白质及 mRNA 表达水平。**结果**:高血压病肝阳上亢证患者血浆 NE、E 含量明显高于健康人组及肝肾阴虚组,其 TH 基因有显著扩增,且 TH 微卫星 D11S4046 中 A₁ 型明显增高;SHR 肝阳上亢证模型肾上腺组织 TH 蛋白质及 mRNA 表达增强。**结论**:高血压肝阳上亢证具有 TH 基因显著扩增、TH mRNA 及蛋白质表达增强的特点。提示 TH 基因的过度表达可能是高血压肝阳上亢证的分子机理。

关键词 高血压 肝阳上亢证 酪氨酸羟化酶 分子机理

Study on Molecular Mechanism of Ganyang Shanghang Syndrome in Hypertension JIN Yiqiang, HU Suiyu, YAN Donghong, et al *Institute of Integrated TCM and Western Medicine, Hunan Medical University, Changsha (410008)*

Objective: To investigate the molecular mechanism of Ganyang Shanghang (Liver Yang ascending, GYSK) syndrome in hypertension. **Methods**: The plasma norepinephrine (NE), epinephrine (E) contents in patients with GYSK syndrome or Ganshen Yinxu (Liver and Kidney Yin Deficiency, GSYX) syndrome who were suffered from hypertension, and normal controls were determined by high performance liquid chromatography-electrochemical detector (HPLC-ECD). The polymorphism of tyrosine hydroxylase (TH) gene in the three groups were analyzed by Southern Blot assay. The polymorphism of TH and MAOA, MAOB gene microsatellite in these groups were analyzed by polymerase chain reaction (PCR)-SSCP; meanwhile, the GYSK model by administration of single TCM preparation, Radix Aconiti preparate (RAP) in spontaneous hypertension rats (SHR). The adrenal gland medulla were examined for their TH expression at the protein level after ABC immunohistochemical staining with the TH monoclonal antibody (McAb). The adrenal TH gene mRNA expression was demonstrated by in situ hybridization with the synthesized TH oligonucleic acid probe. The results of immunohistochemistry and in situ hybridization were analyzed with the image analysis system (IAS). **Results**: The plasma NE, E contents in patients with GYSK were more significantly increased than that in GSYX and normal controls. The TH gene amplified and the type A₁ TH microsatellite D11S4046 was increased more remarkably than other groups. The TH mRNA protein expression in their adrenal tissue of the single TCM preparation RAP induced GYSK model in SHR were elevated. **Conclusions**: The GYSK syndrome of hypertension possesses the character as amplified TH gene and increased TH mRNA and protein. It suggested that the hyperexpression of TH is probably the mechanism of GYSK syndrome in hypertension.

Key words hypertension, Ganyang Shanghang syndrome, tyrosine hydroxylase, molecular mechanism

肝阳上亢证是中医肝病主要证型之一,多见于高

血压病^{〔1〕},其病理生理学基础已有较深入的研究^{〔2,3〕},但未见有关该证分子水平研究的报道。本研究在以往研究基础上探讨高血压肝阳上亢证的分子机理。

* 国家自然科学基金资助项目(No.39670890)

湖南医科大学附属湘雅医院中西医结合研究所(长沙 410008)

临 床 研 究

1 临床资料 病例选自湖南医科大学附属湘雅医院,湖南省隆回县、绥宁县、新宁县、双牌县人民医院 1997 年 10 月~1998 年 5 月的门诊和住院患者。采用病证结合方式选择研究对象 100 例。高血压病诊断标准按文献^[4],中医辨证标准参照文献^[5],其中 I 期 22 例,II 期 78 例;肝阳上亢证 70 例,其中男 38 例,女 32 例;年龄 38~75 岁,平均(54.68±12.26)岁;肝肾阴虚证 30 例,其中男 11 例,女 19 例;年龄 40~74 岁,平均(59.67±8.83)岁;健康对照组选自本院职工及长沙市中心血站首次献血者,共 30 名,其中男 14 名,女 16 名;年龄 29~65 岁,平均(51.25±8.61)岁;经病史查询、体检、血象、胸透及心、肝、肾检查未发现异常。

2 方法

2.1 血样采集 受试者于清晨 6:00~8:00 空腹抽取肘静脉血,抽血前先休息 15~30 min,禁服影响单胺类代谢的血管活性药物及食物如香蕉、菠萝等。采血 5 ml,于 4℃ 1000r/min 离心 20 min,收集上清,存于-70℃冰箱中待测血浆去甲肾上腺素(NE)、肾上腺素(E);同时,另取 2 ml 血用肝素抗凝,再用淋巴细胞分离液分离淋巴细胞,留作 DNA 提取。

2.2 NE、E 的测定 采用 Eisenhofer^[6]方法。仪器用高效液相色谱仪(日本岛津公司产,LC-9A 型)及电化学检测器(日本岛津公司产,L-ECD-6A 型)。

2.3 DNA 提取及 Southern Blot 分析 参照文献^[7]。

2.4 高血压病肝阳上亢证酪氨酸羟化酶(TH)及单胺氧化酶(MAO)微卫星多态性分析 采用 PCR-SSCP 方法,参照文献^[8]。

2.5 统计学处理 计量资料结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间比较采用方差分析及 q 检验,所有检验在 SPSS

统计软件包上完成,计数资料比较用 χ^2 检验。

3 结果

3.1 健康人组、肝阳上亢证组及肝肾阴虚证组血浆 NE、E 测定结果比较 见表 1。说明肝阳上亢证组血浆 NE、E 明显高于健康人组和肝肾阴虚证组。

表 1 健康人组、肝阳上亢证组及肝肾阴虚证组血浆 NE、E 测定结果 ($\mu\text{mol/L}$, $\bar{x} \pm s$)

组 别	n	NE	E
健 康 人	30	1997.0±139.1	824.2±61.3
肝阳上亢证	70	3922.4±716.7 [*] △	1365.6±283.8 [*] △
肝肾阴虚证	30	2271.3±360.3	773.1±135.7

注:与健康人组比较,^{*} $P < 0.05$;与肝肾阴虚证组比较,[△] $P < 0.05$

3.2 健康人组、肝阳上亢证组及肝肾阴虚证组 TH 基因 Southern Blot 杂交信号经 MIAS300 图像分析系统分析后结果比较 见表 2。说明肝阳上亢证组 TH 基因扩增信号较其他两组明显增强。

表 2 健康人组、肝阳上亢证组及肝肾阴虚证组 TH 基因杂交信号 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	TH cDNA 杂交信号扫描
健 康 人	10	128.63±17.63
肝阳上亢证	27	310.33±24.55 [*] △
肝肾阴虚证	18	187.77±21.03

注:与健康人组比较,^{*} $P < 0.05$;与肝肾阴虚证组比较,[△] $P < 0.05$

3.3 TH 基因相关微卫星 D11S4046 位点扩增,检测出 3 种微卫星多态性 A_1 、 A_2 、 A_3 ,见图 1。其在肝阳上亢证、肝肾阴虚证和健康人组分布,见表 3。说明肝阳上亢证组 TH 相关微卫星 D11S4046 中 A_1 型明显增加。

表 3 健康人组、肝阳上亢证组及肝肾阴虚证组 D11S4046 多态性分布

组 别	n	A_1	A_2	A_3
健 康 人	23	12(0.522) [*]	8(0.348)	3(0.130)
肝阳上亢证	37	26(0.703)	6(0.162)	5(0.135)
肝肾阴虚证	30	11(0.367) [*]	10(0.333)	9(0.300)

注:与肝阳上亢证组比较,^{*} $P < 0.05$; () 内为基因频率

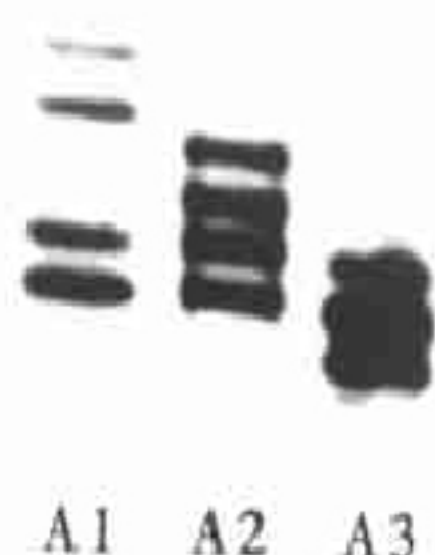


图 1 TH 基因微卫星 D11S4046 多态性分 3 型(A_1 , A_2 , A_3)



图 2 MAOA 基因微卫星 DXS6810 多态性分 3 型(B_1 , B_2 , B_3)

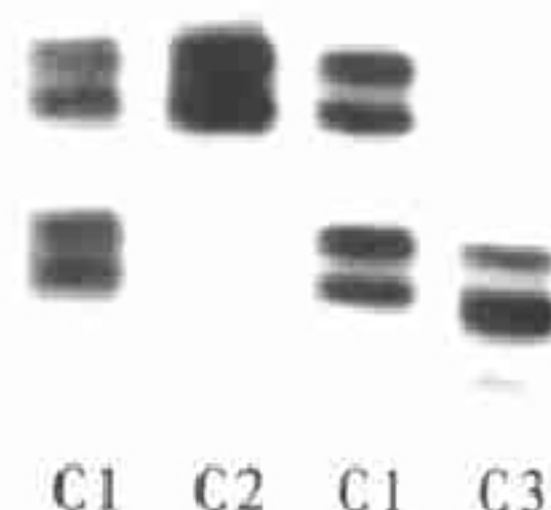


图 3 MAOB 基因微卫星 DXS993 多态性分 3 型(C_1 , C_2 , C_3)

3.4 MAOA 基因相关微卫星 DXS6810 有 3 种多态性改变 B_1 、 B_2 、 B_3 , 见图 2。其分布频率在健康人、肝阳上亢证及肝肾阴虚证 3 组间差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。

3.5 MAOB 基因相关微卫星 DXS993 亦有 3 种基因型, 见图 3。3 组间分布频率差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。

实 验 研 究

1 实验动物 正常 Wistar 大鼠 10 只, 雌雄各半。3 月龄, 体重 180 ~ 210g。由湖南医科大学实验动物中心提供; 自发性高血压大鼠 36 只, 雌雄各半, 3 月龄, 体重 180 ~ 210g, 购自北京中国医学科学院阜外心血管病医院实验动物中心。

2 中药及制备 (1) 附子汤: 由单味制附子 20g 煎两次后, 将药液合并浓缩为每毫升药液含 0.1g 生药。(2) 潜阳方: 由石决明、钩藤、黄芩、桑寄生、葛根、川牛膝等组成。煎两次后将药液合并浓缩为每毫升药液含 1g 生药。

3 主要试剂及仪器 试剂: 酪氨酸羟化酶单克隆抗体(一抗, 鼠抗): 购自德国宝灵曼公司; TH 寡核苷酸探针: 由上海生物工程公司合成, 其序列为: 5'-CCTGCTTGGCATCCTGCTCTGAGA-3'; 即用型 ABC 试剂盒: 购自华美生物工程公司。NE、E、DHBA (内标) 标准品均购自 Sigma 公司; 微卫星引物设计均采用网上查阅: <http://www.gdb.org/gdb-bin/genera>。仪器: 超低温冰箱(SANYO 牌, 日本产); 恒温冷冻切片(SLEE MAINZ 型, 德国产); 高速台式离心机(5415C 型, 德国产); 显微镜(Olympus 型, 日本产); 图像分析系统(MIAS-300 型, 美国产)。

4 方法

4.1 自发性高血压大鼠(SHR)肝阳上亢证模型的复制 选用 SHR 加灌附子汤的方法造模^[9], 每天 20 ml/kg 体重灌胃, 相当每天生药 2g/kg 体重, 共 4 周。

4.2 动物分组与给药方法 (1) 正常对照组(简称正常组, 10 只): 正常 Wistar 大鼠, 普通饲养, 不做处理。(2) 自发性高血压组(简称 SHR, 8 只): SHR 灌蒸馏水 6 周。(3) 附子汤造模组(简称肝阳上亢组, 8 只): SHR 灌服附子汤 4 周, 造模后不予治疗, 从第 5 周开始灌服蒸馏水 2 周。(4) 潜阳方治疗组(简称潜阳方组, 10 只): SHR 大鼠, 灌服附子汤 4 周, 第 5 周开始灌服中药潜阳方 2 周, 每日灌服潜阳方煎剂 20 ml/kg, 相当每天生药 20g/kg 体重, 按动物体表面积系数折

算, 相当 70kg 成人临床剂量的 1.9 倍。

4.3 观测项目及检测方法

4.3.1 实验动物肾上腺组织 TH 蛋白质测定 采用免疫组织化学方法, 参照文献^[10]。

4.3.2 实验动物肾上腺组织 TH mRNA 表达 采用原位杂交方法, 参照文献^[11]。以上 Southern Blot 与 TH mRNA 及蛋白质表达结果均用 MIAS-300 型图像分析系统进行分析。

4.4 统计学处理 计量资料结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间比较采用方差分析及 q 检验, 所有检验在 SPSS 统计软件包上完成, 计数资料比较用 χ^2 检验。

5 结果

5.1 各组大鼠 TH 免疫组化阳性产物灰度扫描结果 见表 4。灰度值是图像分析系统中用来表示图像透光率的参数。细胞内阳性产物浓度(或杂交信号)越高(深), 则透光率越低, 灰度值亦低, 反之则越大。肝阳上亢组灰度值最低, 明显低于正常组及潜阳方组, 均具有显著性差异 ($P < 0.05$)。表明肝阳上亢组 TH 免疫组化阳性产物最浓, 即抗 TH 强阳性, 说明 TH 蛋白水平明显增高; 而经潜阳方治疗后, TH 免疫组化阳性产物降低, TH 蛋白水平下降。

表 4 各组 TH 免疫组化阳性产物浓度灰度值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	TH 免疫组化阳性产物浓度灰度值
正 常	5	63.67 ± 6.48
SHR	5	35.27 ± 4.88**
肝阳上亢	5	24.96 ± 8.34**
潜阳方	5	50.96 ± 5.29* ^A

注: 与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与肝阳上亢组比较, ^A $P < 0.01$

5.2 各组大鼠 TH 原位杂交信号灰度扫描结果 见表 5。肝阳上亢组 TH 基因原位杂交信号灰度值最低, 明显低于正常组、SHR 组及潜阳方组, 均有显著性差异 ($P < 0.05$); 说明肝阳上亢组 TH 基因 mRNA 表达最强, TH 基因 mRNA 明显上升, 经中药潜阳方治疗后, TH mRNA 下降。

表 5 各组大鼠 TH 原位杂交信号灰度值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	TH 原位杂交信号灰度值
正 常	5	72.85 ± 6.17
SHR	5	35.98 ± 6.21**
肝阳上亢	5	22.16 ± 1.48**
潜阳方	5	48.89 ± 6.03* ^A

注: 与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与肝阳上亢组比较, ^A $P < 0.05$

讨 论

肝阳上亢证是中医肝病的主要证型之一, 历代医

家论理精详,平肝潜阳治法,方、药广泛应用于临床;本证的现代研究近 10 余年已取得很大进展,发现其病理生理学基础为外周交感-肾上腺髓质功能亢进,主要病理环节为外周血浆 NE、E 含量的增高⁽²⁾。儿茶酚胺(CA)包括 NE、E、DA,在 CA 合成过程中,TH 是起决定作用的限速酶,调节 NE、E 的合成。NE、E 的含量间接反应 TH 活性,TH 是高血压病因学的候选基因⁽¹²⁾。儿茶酚胺的分解则主要在 MAOA 和 MAOB 的作用下完成。本研究结果进一步验证了肝阳上亢证患者血浆 NE、E 含量明显高于健康人及肝肾阴虚证患者($P < 0.05$);同时,经采用 Southern Blot 分析高血压病患者 TH 基因多态性,结果显示高血压病肝阳上亢证患者 TH 基因有明显扩增($P < 0.05$)。

微卫星(Microsatellite)即短串联重复序列(short tandem repeat, STR),在人类基因组中广泛存在,约占真核生物基因组的 5%,其基本单位是 1~8bp 的串联重复,多在基因编码区、内含子及非翻译区附近。人基因组中 STR 有 (GT) $_n$ 、(CA) $_n$ 、(GA) $_n$ 、(AA) $_n$ 、(GG) $_n$ 、(CAA) $_n$ 和 (CGG) $_n$ 等,其中以 (CA) $_n$ 、(GT) $_n$ 重复序列最多,大约分布着 5~10 万个散在的具有高度多态杂合性并符合孟德尔遗传的 STR,即每 30~60kb DNA 就存在一个 (CA) 或 (GT) 重复序列,STR 的产生一般认为是由于 DNA 复制和修复过程中 DNA 滑移及细胞分裂过程中染色体不等交换的结果。本研究选用 (gdb) 基因标准库中微卫星标志,DI1S4046 为酪氨酸羟化酶基因内含的微卫星标志,DXS6810 及 DXS993 为单胺氧化酶内含的微卫星标志。DI1S4046 位于 11pter-11qter 为二核苷酸重复序列,扩增片段最小长度为 187bp;DXS6810 为四核苷酸重复,杂合度暂时不清楚,扩增最小片段为 209bp;DXS993 位于 Xp11.4~Xp11.3 之间,为 (CT) $_n$ 重复,杂合度为 0.7921,扩增最长片段为 312bp 及 292bp。本研究发现肝阳上亢证 TH 基因内含的微卫星 DI1S4046 中 A₁ 型明显高于肝肾阴虚证组及健康人组;而 MAOA 与 MAOB 基因内含的微卫星标志在上述 3 组间无显著性差异,说明肝阳上亢证与 TH 有关,与 MAOA 及 MAOB 则关系不大。

本研究所复制的 SHR 肝阳上亢证模型具有血压稳定升高,易激惹程度增加,饮水量增加,旋转时间缩短,痛阈降低,肾小动脉硬化等近似人类高血压病肝阳上亢证的特征⁽⁹⁾;取不同组动物的肾上腺组织用免疫组织化学方法和原位杂交法进行 TH 基因表达研究,

结果显示肝阳上亢组大鼠 TH 免疫组化阳性产物增高;TH 基因原位杂交信号明显增强,说明该模型肾上腺组织 TH mRNA 及蛋白质水平均明显增加,进一步验证了肝阳上亢证与 TH 的关系。

因此,依据上述各点,笔者认为高血压肝阳上亢证的形成是因 TH 基因扩增导致 TH 基因 mRNA 及蛋白质过度表达,引起 TH 活性增加,使血浆 NE、E 增加所致,TH 基因的过度表达可能是肝阳上亢证形成的分子机理,今后拟采取异病同证方式选择研究对象,进一步深入研究。

参 考 文 献

1. 陈国林,李 炜,胡随瑜,等.通过肝阳上亢证的辨证标准探讨证的研究方法.中国医药学报 1988;3(5):67-68.
2. 金益强,黎杏群,陈国林,等.肝阳上亢证本质研究.中西医结合杂志 1988;8(3):136-140.
3. 胡随瑜,刘湘华,刘尚明.经颅多普勒超声扫描术对肝阳上亢证患者辨证诊断的初步评价.湖南医科大学学报 1997;22(2):131-133.
4. 戴自英主编.实用内科学.第 9 版.北京:人民卫生出版社,1993:1176-1177.
5. 陈国林,潘其明,赵玉秋,等.中医肝病证候临床辨证标准的研究.中国医药学报 1990;5(1):66-73.
6. Eisenhofer G, Goldstein DS, Stult R, et al. Simultaneous Liquid Chromatographic determination of 3,4-dihydroxyphenylglycol, catecholamines, and 3,4-dihydroxyphenylamine in plasma, and their response to inhibition of monoamine oxidase. Clin Chem 1986;32(11):2030-2033.
7. 姜 泊,张亚历,周殿元主编.分子生物学常用实验方法.北京:人民军医出版社,1996:137-139.
8. 刘爱平,胡立宪.微卫星多态性检测时银染色和同位素技术比较.湖南医科大学学报 1996;21(2):169-171.
9. 鄢东红,金益强,肖 纯,等.自发性高血压大鼠肝阳上亢证模型的复制.湖南中医学院学报 1999;19(4):37-39.
10. 王 键,鞠 躬.大鼠垂体前叶中的 TH、ChAT-免疫阳性神经纤维.中国组织化学与细胞化学杂志 1997;6(2):129-132.
11. Dumas S, Pequignot JM, Ghilini G, et al. Plasticity of tyrosine hydroxylase gene expression in the rat nucleus tractus solitarius after ventilatory acclimatization to hypoxia. Mol Brain Res 1996;40:188-194.
12. Sharma P, Hingorani A, Jia H, et al. Positive association of tyrosine hydroxylase microsatellite marker to essential hypertension. Hypertension 1998;32(4):676-682.

(收稿:1999-10-20 修回:1999-11-02)