

四逆汤对心肌缺血大鼠心肌内皮素影响的实验研究^{*}

吴伟康¹ 周琳² 孙慧兰¹

内容提要 目的 研究四逆汤对心肌缺血大鼠心肌内皮素(ET)影响的分子机制。方法 将SD大鼠随机分为对照组、缺血组和四逆汤组,用垂体后叶素造模,分别测定各组心肌ET浓度并做心肌ET-1的免疫组化及基因表达。结果 四逆汤组心肌ET浓度明显低于缺血组($P < 0.01$)。免疫组化显示ET-1主要定位在心肌细胞和血管内皮细胞,缺血组心肌ET-1染色灰度值明显低于对照组和四逆汤组($P < 0.01$);RT-PCR结果显示缺血组PCR产物条带灰度值显著高于对照组和四逆汤组($P < 0.01$)。结论 四逆汤可显著降低缺血心肌ET浓度,这可能与四逆汤能有效抑制缺血心肌ET-1基因的表达及蛋白合成有关。

关键词 心肌缺血 四逆汤 内皮素 免疫组化 基因表达

Experimental Study on Effect of Sini Decoction on Myocardial Endothelin in Myocardial Ischemic Rats WU Wei-kang, ZHOU Lin, SUN Hui-lan *Institute of Integrative Traditional Chinese and Western Medicine, Sun Yat-Sen University, Guangzhou (510080)*

Objective: To study the molecular mechanism of effect of Sini Decoction (SND) on myocardial endothelin (MET) in myocardial ischemic rats. **Methods:** Sprague-Dawley rats were randomly divided into 3 groups, the normal control group, the ischemia group and the SND group. Myocardial ischemia was produced by pituitrin in the latter two groups. The content, immunohistochemical assay and gene expression of MET-1 were determined in all the three groups and compared. **Results:** The content of MET in the SND group was significantly lower than that in the ischemia group ($P < 0.01$). Immunohistochemical examination showed that MET-1 was mainly located at the cardiac muscle cells and vascular endothelial cells with the grey scale obviously lower in the ischemia group than that in the control group and the SND group ($P < 0.01$). While RT-PCR showed that the grey scale of PCR product band in the ischemia group was significantly higher than that in the other two groups ($P < 0.01$). **Conclusion:** SND could significantly lower MET content, it may be related to the effect of SND in inhibiting MET-1 gene expression and protein synthesis.

Key words myocardial ischemia, Sini Decoction, endothelin, immunohistochemical assay, gene expression

内皮素(endothelin, ET)是迄今所知作用最强、持续最久的缩血管活性多肽。自这种肽发现以来,已有大量的实验研究和临床资料证实了其在冠状动脉粥样硬化及缺血性心脏病发生、发展中的重要作用⁽¹⁻³⁾。以往研究发现四逆汤有很好的扩张冠状动脉、抗心肌缺血的作用^(4,5),为了研究四逆汤扩张冠状动脉作用与内皮素的生成是否有关,我们研究了四逆汤对心肌缺血大鼠心肌内皮素的作用。

材料和方法

1 动物 普通级SD大鼠,体重150~200g,雌雄各半,由中山医科大学实验动物中心提供。

2 药物 垂体后叶素(10U/ml,批号980108,上海天风药厂生产);四逆汤胶囊(即保心胶囊,由附子、干姜、甘草组成,每粒含生药3g,中山医科大学与广东宏远制药厂联合研制)。

3 试剂与仪器 ET放免试剂盒(东亚免疫技术研究所提供);LSAB试剂盒K681(DAKO公司产品);DAB(博士德公司产品);ET-1引物及RT、PCR试剂(上海生物工程研究所提供);Trizole reagent(RNA抽提剂)及DEPC(均为Gibco公司产品)。内切式匀浆机(中山医科大学仪器厂制造);SH-6010 γ 放免计数器仪(中山医科大学同位素检测中心提供)。

4 方法

4.1 造模方法 近十年来本实验室建立的垂体后叶素(Pit)性心肌缺血动物模型已相当成熟,小鼠腹腔内注射Pit(20U/kg),5min后冠脉营养血流量(NBF)已经有显著的下降,至20min时降到最低点,然

^{*} 本课题系国家自然科学基金(No. 39770936)及广东省自然科学基金(No. 960113)资助课题

1. 中山大学中西医结合研究所(广州 510080); 2. 中山大学家庭医生科技开发有限公司

后回升,缺血至少可以维持 50min⁽⁶⁾。

4.2 给药方法 将 SD 大鼠随机分为 3 组:正常对照组(对照组,6 只),单纯缺血组(缺血组,6 只)及缺血加四逆汤组(四逆汤组,6 只),四逆汤组以四逆汤 5.0g/(kg·d)灌胃,对照组和缺血组以等量蒸馏水灌胃,共 5 天,最后一次灌胃后 1h 缺血组与四逆汤组大鼠腹腔注射 Pit(15U/kg),对照组则腹腔注射等量生理盐水,1h 后取材。

4.3 观察项目及其检测方法

4.3.1 四逆汤对心肌缺血大鼠心肌 ET 浓度的影响 用放免法测定心肌 ET 浓度。

4.3.2 四逆汤对缺血心肌 ET-1 影响的免疫组织化学研究 每只动物分别取 6mm³ 的心室肌、心房肌各一块,立即用生理盐水轻轻漂洗,用干净滤纸尽快吸干血迹及水迹,常规固定,石蜡包埋,切片后做免疫组织化学染色。染色后的切片在显微镜下观察并随机选取 5 个视野进行灰度值测定。

4.3.3 四逆汤对缺血心肌 ET-1 基因表达的影响 每只动物均取心肌的相同部位(约 100mg)尽快提取组织总 RNA,提取出的 RNA 经 RT-PCR 后,以 PCR Markers 为分子量标准 PCR 产物进行琼脂糖电泳分析,电泳完毕,在紫外灯下观察,测定各组目的带平均灰度值,同时摄片,最后对每组动物的平均灰度值作统计学分析。

4.4 统计学方法 用完全随机分组的多组均数比较的单因素方差分析(LSD 法)对各组资料进行统计。

结 果

1 四逆汤对心肌缺血大鼠心肌组织 ET 浓度的影响 见表 1。四逆汤组心肌 ET 浓度明显低于缺血组,基本接近对照组。

表 1 四逆汤对心肌缺血大鼠心肌组织 ET 浓度的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ET(pg/mg)
对照	6	1.77 ± 0.42 *
缺血	6	6.87 ± 1.70
四逆汤	6	2.28 ± 0.50 *

注:与缺血组比较,*P<0.01

2 四逆汤对缺血心肌 ET-1 含量影响的免疫组织化学研究结果 见表 2。心肌 ET-1 主要由心肌细胞、血管内皮细胞产生。无论心房肌或心室肌,四逆汤组心肌组织 ET-1 含量的免疫组织化学染色平均灰度值明显高于缺血组,基本接近对照组。

3 四逆汤对缺血心肌内皮素基因表达的影响

表 2 各组心肌 ET-1 含量的免疫组织化学染色平均灰度值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	灰度值	
		心房肌	心室肌
对照	6	182.38 ± 4.96 **	178.57 ± 3.13 **
缺血	6	167.63 ± 4.28	154.38 ± 4.05
四逆汤	6	182.75 ± 7.74 **	182.97 ± 2.14 *

注:与缺血组比较,*P<0.05,**P<0.01

见表 3 及图 1、2。四逆汤组心肌 ET-1 RT-PCR 产物平均灰度值(即计算机扫描 VOLUME 值)明显低于缺血组,基本接近对照组。

表 3 各组心肌 ET-1 RT-PCR 产物平均灰度值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	计算机扫描 VOLUME 值
对照	6	3166.52 ± 474.58 **
缺血	6	17803.48 ± 1854.65
四逆汤	6	3842.96 ± 658.19 **

注:与缺血组比较,**P<0.01

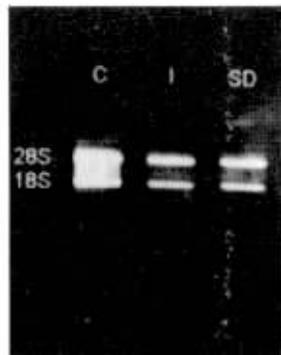


图 1 心肌组织总 RNA 图谱

注:C 为对照组,I 为缺血组,SD 为四逆汤组

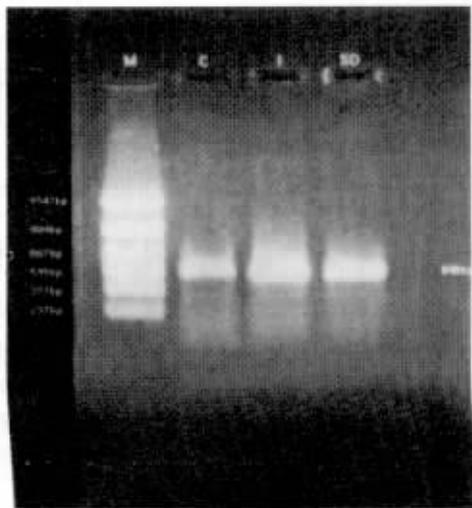


图 2 心肌组织 RT-PCR 产物电泳图谱

注:C 为对照组,I 为缺血组,SD 为四逆汤组

讨 论

上述的实验结果表明,四逆汤抑制缺血心肌 ET 升高的效应是显著的。四逆汤抗心肌缺血、抑制 ET 升高的机制可能为 (1) 根据我们以往的研究,四逆汤能促进 (NO) 等舒血管因子的合成、释放⁽⁴⁾,从而直接抵消 ET 的缩血管作用。(2) 在四逆汤作用下,心肌缺血得到舒缓,从而使刺激 ET 合成分泌的病理因素被解除,使 ET 合成分泌减少。这从另一方面说明四逆汤的抗心肌缺血效应不仅有 NO 途径的存在,同时也有 ET 途径的参与。

本实验用 RT-PCR 方法检测了三种不同状态下 ET-1 mRNA 在心肌的表达,如图所示,对照组、缺血组、四逆汤组心肌中,均可见一条 546bp 的特异带,经计算机图像分析检测表明(正如表 3 所示),缺血组 ET-1 RT-PCR 产物平均灰度值较对照组显著升高 ($P < 0.01$)。灰度值与 RT-PCR 产物的量是成正比的。上述结果表明,正常大鼠心脏有 ET-1 mRNA 的表达;心肌缺血时,心肌 ET-1 mRNA 表达明显增强,这与诸多学者的文献报道一致。Tennessee T 等⁽⁵⁾就曾从细胞水平上用 Northern Blot 的方法证实了遭受急性缺血的猪的心肌细胞 ET-1 mRNA 的表达较非缺血心肌增加 2 倍。已有资料表明,儿茶酚胺、钙离子载体 A23187、凝血酶、转化生长因子- β 、血管紧张素 II、精氨酸血管加压素和血管切变刺激等理化因素对内皮素 mRNA 和其肽的合成具有诱导作用⁽⁷⁾。急性心肌缺血时,机体产生应激反应,导致儿茶酚胺等的分泌,故上述因素参与、促使内皮素 mRNA 的表达增强。从表 3 的结果还可以看出,四逆汤组的 ET-1 RT-PCR 产物平均灰度值较缺血组明显降低 ($P < 0.01$),而与对照组则差异无显著性,这表明,四逆汤的确能使缺血心肌 ET-1 mRNA 水平下降,提示 ET₁ 基因的转录表达受

到抑制,从而使 ET₁ 的蛋白合成减少,使 ET-1 的水平基本接近正常,同时也提示四逆汤对缺血心肌的保护作用是抑制了 ET-1 的“从头合成”机制。缺血、缺氧是诱发心肌 ET-1 mRNA 表达增强的重要因素之一。根据四逆汤已有的研究工作,四逆汤具有扩张冠脉、改善心肌营养血流的作用,同时四逆汤能促进 (NOS) 基因的表达,促进内源性 NO 的合成,很可能这些因素都参与了四逆汤抑制缺血心肌 ET-1 mRNA 表达增强的过程。至于四逆汤中起抑制缺血心肌 ET-1 mRNA 表达作用的具体成分及其对 ET-1 基因的具体调控机制还有待进一步探讨。

参 考 文 献

1. Yanagisawa M, Kimura S, Tomobe Y, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1998; 332(31):411—415.
2. Cesari M, Pavan E, Sacchetto A, et al. Endothelin-1: A scientist's curiosity, or a real player in ischemic heart disease? *American Heart Journal* 1996; 132:1236—1243.
3. Tennessee T, Giaid A, Saleh D, et al. Increased in vivo expression and production of endothelin-1 by porcine cardiomyocytes subjected to ischemia. *Circulation Research* 1995; 76(5):767—772.
4. 吴伟康, 苏建文, 林曙光, 等. 四逆汤防治 PTCA 术后再灌注损伤的作用机制及中医辨证分型的临床研究. *中国中西医结合杂志* 1999; 19(1):23—26.
5. Tennessee T, Christensen G, Oie E, et al. Increased cardiac expression of endothelin-1 mRNA in ischemic heart failure in rats. *Cardiovascular Research* 1997; 33:601—610.
6. 吴伟康, 侯 灿, 罗汉川, 等. 垂体内叶素性心肌缺血模型再探. *中国病理生理杂志* 1993; 9(2):124—127.
7. 陈金明. 内皮素在冠心病方面的研究进展. *心血管病学进展* 1995; 16(5):284—287.

(收稿 2001-07-11 修回 2001-12-21)

中西经
典巨著

四十余年研究成果大总结 数十位学科带头人大手笔

《中国中西医结合临床全书》

6折特
别优惠

顾 问 崔月犁 董建华 陈可冀 名誉主编 陈敏章 唐由之 尚天裕 高辉远 主 编 李 恩

全书包括临床十一个学科(内、外、妇、儿、骨、皮肤、眼、耳鼻喉、口腔、针灸推拿及诊断)近千种病症,每病按概述、病因病理、临床表现、实验室及其他检查、并发症、诊断与鉴别诊断、中医辨证、西医治疗、中医治疗、中西医结合治疗、预防护理等项详述,有的还专列中西医结合研究一项,内容丰富、资料翔实、兼收并蓄、实事求是,是目前比较系统、全面、权威的中西医结合临床专著。该书问世后,好评如潮。出版社再次重印,现货供应,款到发书。汇款地址(免邮资)北京 39 支局解放军医学图书馆内三想医药书店,邮编:100039;联系人:张 岩;电话:(010) 68234503、68234504、66931860(门市近万种医药图书常年展销,备有详细书目,函索即寄)。定价:480.00 元 优惠价 288.00 元。