

补肾复脉液对缺氧内皮细胞 eNOSmRNA 和 ET-1mRNA 影响的研究*

李艳梅 张慧祺 温廷益 鲁 彬 郭利平 杨洪涛

内容提要 目的:探讨中药补肾复脉液对缺氧内皮细胞内皮型一氧化氮合成酶(eNOS)和内皮素(ET-1)mRNA 转录水平的影响及其对缺氧内皮细胞的保护作用。方法:取培养的胎儿脐静脉内皮细胞,随机分为空白组、缺氧组、西药组及中药组,分别给予 10% 的空白兔血清,10% 的空白兔血清,10% 的含维生素 C 兔血清,10% 的含补肾复脉液兔血清,除空白组外,同时通入 95% N_2 加 5% CO_2 混合气孵育(缺氧)4h,采用异硫氰酸胍-酚-氯仿法提取各组细胞总 RNA,以 GAPDH 为内对照,将 RT-PCR 扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳分离,紫外灯下观察各组细胞 eNOSmRNA 和 ET-1mRNA 表达情况,对照凝胶拍照,并对底片条带光密度扫描定量分析。结果:缺氧组 ET-1/GAPDHmRNA 水平最高而 eNOS/GAPDHmRNA 水平最低($P < 0.01$),中药组和西药组均能阻抑其异常表达($P < 0.01$, $P < 0.05$),中药组明显优于西药组($P < 0.05$)。结论:中药补肾复脉液能抑制缺氧内皮细胞 ET-1mRNA 转录,促进 eNOSmRNA 转录,维持 ET-1mRNA/eNOSmRNA 之间的平衡,从而对缺氧内皮细胞有一定的保护作用。

关键词 缺氧 人脐静脉内皮细胞 内皮素 一氧化氮 内皮型一氧化氮合成酶

Effect of Bushen Fumai Liquid on eNOSmRNA and ET-1mRNA in Hypoxic Endothelial Cells LI Yan-mei, ZHANG Hui-qi, WEN Ting-yi, et al *Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital, Tianjin College of TCM, Tianjin (300193)*

Objective: To observe the effect of Bushen Fumai Liquid (BSFML) on nitric oxide synthase endothelial type (eNOS) and endothelin mRNA (ET-1mRNA) in cultured human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) induced by hypoxia. **Methods:** The cultured HUVECs were randomly divided into 4 groups, the blank group (A), the hypoxic group (B), the western medicine group (C) and the BSFML group (D). 10% blank rabbit serum was given to group A and B, 10% rabbit serum containing western medicine vit C and containing BSFML was given to Group C and D respectively. Except for Group A, the other 3 groups were exposed to hypoxia (95% N_2 + 5% CO_2) for 4 hours. The total RNA was extracted from the cultured HUVECs by guanidinium thiocyanate method, then the reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed. The RT-PCR products were fractionated through a 1.0% agarose gel electrophoresis, the eNOSmRNA and ET-1mRNA expression was observed under ultraviolet light and photographed, then bands on film were scanned by densitometer and quantified on computer by the image analysis software. **Results:** The highest ET-1mRNA level and lowest eNOSmRNA was shown in the hypoxic group, both abnormal expressions were inhibited in Group C and D ($P < 0.01$ or $P < 0.05$), and the inhibitory effect of BSFML was superior to that of western medicine ($P < 0.05$). **Conclusion:** BSFML could inhibit the ET-1mRNA transcription and promote eNOSmRNA transcription in hypoxic endothelial cells, so as to keep a balance between them. By this way, it could be effective in protecting hypoxic endothelial cells.

Key words hypoxia, human umbilical vein endothelial cells, endothelin, nitric oxide, endothelial type nitric oxide synthase

血管内皮是重要的内分泌腺,以内皮素(ET-1)为

代表的内皮源血管收缩因子(endothelium-derived contracting factor, EDCF)与以一氧化氮(NO)为代表的内皮源血管舒张因子(endothelium-derived relaxing factor, EDRF)的分泌和调节功能平衡失调,是内皮功

* 国家中医药管理局青年基金课题(No. 97Y003)

天津中医药大学第一附属医院(天津 300193)

能异常和内皮细胞损伤的重要特征,也是许多心血管疾病如高血压、动脉粥样硬化、心力衰竭等病理过程中基本的病理表现。生理状态下,NO 和 ET-1 的合成与释放及 eNOSmRNA 和 ET-1mRNA 的表达处于相对平衡状态,以维持心血管系统正常的舒缩功能,但是在缺氧、感染、细胞因子、血流动力学的异常改变等病理条件刺激下,血管内皮细胞 eNOSmRNA 和 ET-1mRNA 表达及 NO 和 ET-1 的合成与释放发生异常或失衡,这可能是内皮功能或内皮细胞功能障碍的早期表现,运用药物抑制这种基因表达的异常,或许是早期恢复内皮细胞生理功能和防治心血管系统常见疾病的一个重要途径。以培养的人脐静脉内皮细胞为研究对象,探讨中药补肾复脉液是否通过阻抑缺氧内皮细胞 ET-1mRNA 和 eNOSmRNA 的异常表达,维持 ET-1mRNA 和 eNOSmRNA 的平衡,从而阻抑 ET-1 和 NO 合成与释放的失衡而发挥对内皮细胞的保护作用,具有重要的意义。

材料与方法

1 主要仪器 CO₂ 恒温培养箱(TC2323 型,美国 Shelolon 公司产品);超净工作台(CH802-2 型,天津医疗净化设备厂产品);相差倒置显微镜(ECLIPSE TE300 型,日本 Nikon 公司产品);DU-530 核酸蛋白仪(美国 Beckman 公司产品);高速离心机(ALL E-GRA-64R,美国 Beckman 公司产品);CO₂ 孵育箱(上海医疗仪器厂出品);pH 计(日本岛津公司出品);24 孔培养板,25cm 细胞培养瓶,8cm 细胞培养皿(日本 Nuco 公司出品);AG-9600 全自动 PCR 扩增仪(产地美国)。

2 主要试剂 胎牛血清(Hyclone 公司产品);培养基(美国 Sigma 公司产品);胶原酶(Sigma 公司产品);维生素 C(和平制药厂出品);Factor VIII Related Ag(八因子相关抗原,北京中山生物有限公司产品);内皮细胞生长因子(Sigma 产品);双抗(由石家庄制药厂生产);肝素(武汉制药厂出品);D-MEM/F12(Gibico 公司提供);PBS 液;Trypsin-EDTA 液;L-谷氨酰胺(中国医学科学院血液病研究所提供)。新生胎儿脐带(天津中心妇产科医院产房提供)。总 RNA 提取盒(RNA-gents Total RNA Isolation system,美国 Promega 产品);逆转录酶 MMLV(Gibico 公司);寡核苷酸引物(大连宝生物合成);dNTP(Promega 公司);DEPC(Promega 公司);TaqDNA 聚合酶(Promega 公司)。

3 含药血清的制备

3.1 万寿补肾复脉液 药物组成:桑寄生 20g 仙灵

脾 6g 泽泻 20g 茯苓 20g 海藻 15g 夏枯草 15g。由天津药物研究院加工制成含生药 2g/ml 的中药浓溶液备用。

3.2 日本大耳白兔(天津实验动物中心提供),体重 2~2.5kg 随机分成 3 组,即中药组、西药组及对照组,每组 2 只,正常饲养 1 周后,按分组分别灌胃给补肾复脉液中药 9g/kg、维生素 C 30mg/kg 及生理盐水 9ml/kg,灌胃 10 天,无菌条件下心脏取血,分离血清,-20℃ 备用。

4 缺氧内皮细胞模型的建立

采用胶原酶脐静脉灌流消化法,培养胎儿脐静脉内皮细胞并传代至第三代,用人Ⅷ因子免疫荧光抗体检查鉴定。将培养的第三代脐静脉内皮细胞随机分为空白组(K 组)、缺氧组(Q 组)、西药组(X 组)及中药组(Z 组),分别依次加入 56℃ 灭活的 10% 的空白兔血清、10% 的空白兔血清、10% 含维生素 C 兔血清及 10% 含中药补肾复脉液兔血清,除空白组外,其余各组通入 95% N₂ 加 5% CO₂ 混合气孵育(缺氧)4h。

5 PCR 引物的合成 参考文献^[1,2,3)]。

引物序列	预期产物片段
GAPDH 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'	452bp
eNOS 5'-GCACAGGAAATGTTCACCTAC-3' 5'-GTATCCAGGTCCATGCAGAC-3'	551bp
ET-1 5'-TTCTCTCTGCTGTTTGTGG-3' 5'-CAATGTGCTCGGTTGTG-3'	614bp

6 逆转录-聚合酶链式反应

采用异硫氰酸胍-酚-氯仿法提取各组细胞总 RNA,测定其纯度和量。每组按 5μg 的量进行逆转录,分别取 2μg 的总 RNA 为模板,对 eNOS 和 ET-1 目的基因及内对照 GAPDH 基因进行 RT-PCR 扩增。三对引物的变性温度和时间均为 94℃ 1min,延伸温度和时间均为 72℃ 1min,退火温度和时间分别为 58℃ 50s、56℃ 50s、60℃ 50s,均为 35 个循环。将 eNOS、ET-1 和 GAPDH 的 PCR 扩增产物在含有溴化乙锭(EB)的 1% 的琼脂糖凝胶上电泳,紫外灯下照相,将底片进行吸光度扫描定量,以 GAPDH 的吸光度为内对照。运用激光扫描仪对底片上电泳条带密度扫描,并输入计算机,使用 VDS 图像分析软件,对各组电泳条带进行定量,得其吸光度(A 值),由下列公式计算出相对单位值,比较空白组、模型组及实验组之间增加表达的倍数。相对单位 = $\frac{\text{目的基因}}{\text{GAPDH(A)}}$

7 统计学分析

采用方差分析和 q 检验。

结 果

1 内皮细胞总 RNA 纯度、完整性的鉴定 用

Promega 试剂盒 RNAGents[®] Total RNA Isolation system 提取的内皮细胞总 RNA 经 1% 的琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, 紫外灯下观察可见两条清晰的 rRNA 纯带 (28s 和 18s), 且 28s:18s \approx 2:1, 经 DU-530 核酸蛋白仪对 RNA 纯度进行鉴定 OD260/OD280 比值范围在 1.8~2.0 之间。总 RNA 电泳鉴定图谱如图 1 所示, 证实 RNA 完整性较好。

2 补肾复脉液对 ET-1mRNA 和 eNOSmRNA 表达的

影响 培养的人脐静脉内皮细胞经缺氧处理 4h 后, 缺氧组 ET-1mRNA 表达最高而 eNOSmRNA 表达最低 ($P<0.01$); 中西药组 ET-1mRNA 表达均下调而 eNOSmRNA 表达均上调 ($P<0.01$, $P<0.05$); 中药组明显优于西药组 ($P<0.05$)。以上结果说明, 缺氧能促进内皮细胞 ET-1mRNA 表达而降低 eNOSmRNA 表达, 抗氧化剂维生素 C 和补肾复脉液能阻抑缺氧内皮细胞 ET-1mRNA 和 eNOSmRNA 的异常表达, 而中药作用优于维生素 C (RT-PCR 结果如图 2, 定量分析结果见表 1)。

表 1 补肾复脉液对缺氧诱导的内皮细胞 eNOSmRNA 和 ET-1mRNA 表达 (GAPDHmRNA 为内对照) 影响的定量分析结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	eNOS/GAPDH	ET-1/GAPDH
空白	5	0.190 ± 0.003	0.411 ± 0.012
缺氧	5	$0.176 \pm 0.002^*$	$0.435 \pm 0.009^*$
西药	5	$0.185 \pm 0.006^{\Delta\Delta}$	$0.418 \pm 0.003^{\Delta}$
中药	5	$0.195 \pm 0.006^{\Delta\Delta\Delta}$	$0.402 \pm 0.003^{\Delta\Delta\Delta\Delta}$

注: 与空白组比较, $^*P<0.01$; 与缺氧组比较, $^{\Delta}P<0.05$, $^{\Delta\Delta}P<0.01$; 与西药组比较, $^{\Delta\Delta\Delta}P<0.05$, $^{\Delta\Delta\Delta\Delta}P<0.01$

讨 论

NO 与 ET-1 是心血管系统中两种重要的生物活性介质, 二者主要由血管内皮细胞合成和释放。生理状态下, 二者的合成与释放以及对应的 eNOSmRNA 和 ET-1mRNA 表达水平均处于相对平衡之中, 以维持心血管系统正常的血管张力和血流动力学稳态, 保证全身脏器的灌流。病理状态下, 体内外各种异常刺激因素, 缺血、缺氧、血流脉冲切应力变化、氧自由基生成增加、氧化型低密度脂蛋白增加等都可使内皮细胞 eNOSmRNA/ET-1mRNA 之间的表达及 NO/ET-1 之间的分泌平衡失调, 并向 ET-1 倾斜, 这是内皮功能障碍的早期表现, 而内皮功能障碍与心血管系统疾病, 尤

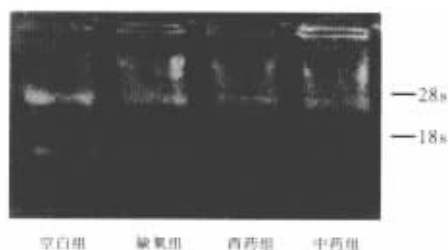


图 1 总 RNA 电泳鉴定图谱

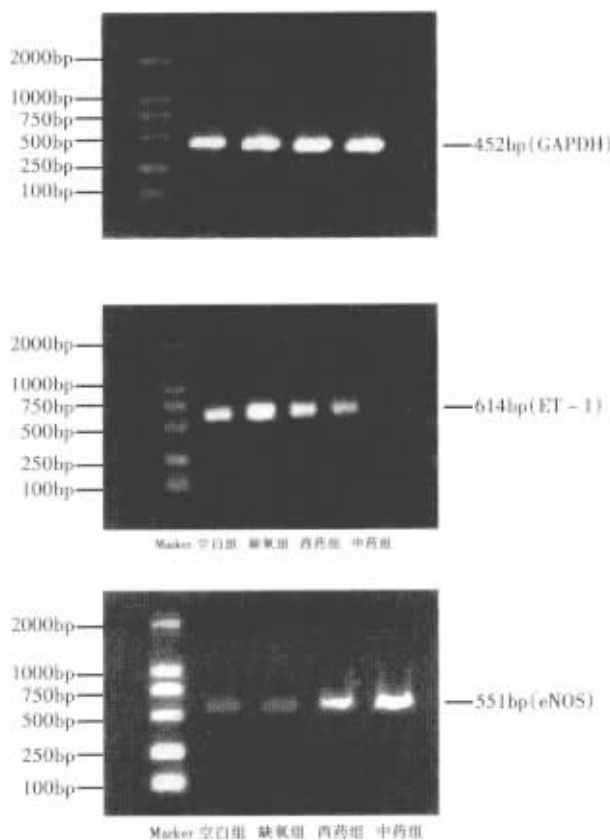


图 2 RT-PCR 扩增结果

其是动脉粥样硬化、高脂血症等的形成是密切相关的。

低氧 (缺氧) 对机体是一种异常的刺激, 是常见的心脑血管疾病中的一个病理性刺激因素, 可引发一系列病理反应。近年来 NO、ET 与低氧的关系倍受关注。低氧时血管内皮细胞是组织中受攻击的第一道靶器官, 内皮受损后, 其释放的重要血管内皮衍生舒张因子 NO 严重减少, 而 ET-1 释放增加, 从而使内皮依赖性舒张功能受限。

一些研究资料表明, 缺氧能降低脐静脉内皮细胞 eNOSmRNA 的转录效率, 降低 eNOSmRNA 的稳定性

和半衰期^(4,5) ,同时提高内皮细胞 ET-1mRNA 转录效率⁽⁶⁻⁸⁾。eNOSmRNA 和 ET-1mRNA 的异常表达与缺氧的严重程度和缺氧持续时间长短密切相关。严重或长期缺氧 ,能显著降低内皮细胞 eNOSmRNA 水平 ,同时促进 ET-1mRNA 表达 ,NO 释放减少 ,而 ET-1 释放增加 ,引起血管平滑肌细胞增殖和纤维化 ,最终使血管结构重塑⁽⁹⁾。另外缺氧能促进内皮细胞产生细胞因子 TNF- α ^(10,11) ,而 TNF- α 则下调内皮细胞 eNOSmRNA 的表达⁽¹²⁾。在我们本次实验研究中发现 ,缺氧能显著降低脐静脉内皮细胞 eNOSmRNA 表达 ,提高 ET-1mRNA 的表达 ,这和国外的研究是一致的。

补肾复脉方以桑寄生、仙灵脾益肾温阳 ,培补先天之本 ,茯苓、泽泻健脾利湿 ,以助水谷津液之转化 ,减少水湿痰浊形成 ,海藻、夏枯草化痰软坚散结 ,以祛除体内痰瘀之邪 ,诸药同用益肾健脾 ,软坚散结 ,以达扶正祛邪之作用 ,临床适应于老年脾肾虚弱 ,痰瘀内停之头晕目眩 ,记忆力减退 ,胸闷憋气 ,下肢无力诸证。该方能够抑制家兔实验性动脉粥样硬化斑块形成 ,抑制体外平滑肌细胞增生、提高高密度脂蛋白、降低低密度脂蛋白。提高动脉粥样硬化患者垂体—性腺轴功能 ,降低血栓素 B₂/6-酮前列环素比值 ,改善临床症状⁽¹³⁾。在我们本次研究中发现 ,补肾复脉液能显著阻抑缺氧内皮细胞 NOS 活性降低和 NO 释放减少 ,而抑制 ET 的释放 ,且中药的作用优于西药。说明补肾复脉液通过上述途径对内皮细胞的保护作用 ,可能是其抗动脉粥样硬化作用的机制之一。

维生素 C 是一种水溶性的有很强抗氧化能力的小分子物质 ,能直接进入细胞 ,直接或间接清除氧自由基 ,阻断脂质过氧化反应 ,有效地保护细胞的结构和功能。

中药补肾复脉液能抑制缺氧诱导的 ET-1mRNA 和 eNOSmRNA 异常表达 ,但中药作用明显优于维生素 C ,中药是否含有多种抗氧化成分或通过其他途径作用于 eNOS 和 ET-1 基因调控区的多个靶位点而发挥调控作用 ,尚有待于进一步研究。

参 考 文 献

1. Woods M , Bailey DB. Cytokine and lipopolysaccharide stimulation of endothelin-1 release from human internal mammary

- artery and saphenous vein smooth muscle cells. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 1998 ;31(Suppl 31):5348—5350.
2. Maria Esterlita T , Villanueva Fadim , Zaher Davidm , et al. Decreased gene expression of endothelial nitric oxide synthase in newborns with persistent pulmonary hypertension. *Pediatric Research* 1998 ;44(3):338—341.
3. Oliver Zolk , Jessika Puattek , Gerhard Sitzler , et al. Expression of endothelin-1 , endothelin-converting-enzyme and endothelin receptors in chronic heart failure. *Circulation* 1999 ;99:2118—2123.
4. Phelan MW , Faller DV. Hypoxia decrease constitutive nitric oxide synthase transcription and protein in cultured endothelial cell. *J Cell Physiol* 1996 ;167:469—476.
5. Mcquillan LP , Leunh GK , Marsden PA , et al. Hypoxia inhibits expression of eNOS via transcriptional and post-transcriptional mechanism. *Am J Physiol* 1994 ;267:H1921—1927.
6. Kourembanas S , Marsden PA , Mcquillan LP , et al. Hypoxia induces endothelin gene expression and secretion in cultured human endothelium. *J Clin Invest* 1991 ;88:1024—1057.
7. Li H , Chen SJ , Chen YF , et al. Enhanced endothelin-1 and endothelin receptor gene expression in chronic hypoxia. *J Appl Physiol* 1994 ;77:1451—1459.
8. Hu J , Discher DJ , Bishopric NH , et al. Hypoxia regulates expression of the endothelin-1 gene through a proximal hypoxia-inducible factor-1 binding site on the antisense strand. *Biochem Biophys Res Commun* 1998 ;245(3):894—899.
9. Faller DV. Endothelial cell responses to hypoxic stress. *Clin Experi Pharmacol Physio* 1999 ;26(1):74—84.
10. Ghezzi PCA , Dinarello S , Bianchi , MF , et al. Hypoxia increases production of interleukin-1 and tumor necrosis factor by human mononuclear cells. *Cytokines* 1991 ;3:189—194.
11. Karakurum MR , Shreeniwas J , Chen D , et al. Hypoxic induction of interleukin-8 gene expression in human endothelial cells. *J Clin Invest* 1994 ;93:1564—1570.
12. Yoshizumi M , Perrella MA , Burnett JC , et al. Tumor necrosis factor (TNF) down-regulated endothelial nitric oxide synthase mRNA by shorting its half-life. *Circ Res* 1993 ;73:205—209.
13. 李艳梅 ,王化良 ,王竹英. 益肾健脾、软坚散结法对动脉硬化患者血栓素 ,前列环素及性腺素影响的研究. *天津中医* 1995 ;2:25—26.

(收稿 2001-07-29 修回 2002-04-08)