

黄芪丹参复方提取物对一氧化氮合成阻滞孕鼠 胎盘血管内皮细胞及滋养细胞血管内皮生长 因子 mRNA 表达影响

王若光 尤昭玲 刘小丽 贺福元 陈学东 李杰

摘要 **目的** 研究黄芪丹参复方提取物提高胎盘供血的分子机制,为临床有效防治胎盘供血不足所致妊娠并发症提供思路。**方法** 提取分离中药黄芪、丹参复方成分,运用一氧化氮合酶(NOS)阻滞剂 L-精氨酸甲酯(L-NAME)建立一氧化氮合成阻滞大鼠模型,核酸原位杂交技术检测妊娠 12 日胎盘滋养细胞、始基微血管内皮细胞血管内皮生长因子(VEGF)mRNA 表达变化。**结果** 一氧化氮合成阻滞模型 VEGF mRNA 表达较空白组、中药治疗组及硝酸甘油治疗对照组均明显降低($P < 0.05, P < 0.01$)。**结论** 黄芪丹参复方成分可能对妊娠早期胎盘滋养细胞及血管内皮细胞 VEGF mRNA 表达具有促进作用,从而有利于胎盘血管网络形成及滋养细胞侵入及母胎循环构建,提高胎盘血液供应,达到防治妊娠高血压综合征等胎盘供血不足疾病的目的。

关键词 妊娠;高血压;一氧化氮;胎盘;滋养细胞;血管内皮生长因子;丹参;黄芪

Effect of Ingredients of Astragalus Salvia Compound on Vascular Endothelial Cell in Placenta and Vascular Endothelial Growth Factor mRNA Expression in Trophocyte in Pregnant Rats with Inhibited Nitric Oxide Synthesis WANG Ruo-guang, YOU Zhao-ling, LIU Xiao-li, et al *Department of Integrated Chinese and Western Medicine, Hunan College of TCM, Changsha (410007)*

Abstract Objective To investigate the molecular mechanisms of effective ingredients of Astragalus-Salvia compound (ASC) in increasing placental blood supply, to provide thought for establishing an effective prevention and treatment of insufficient placental blood supply caused complications of pregnancy. **Methods** The effective ingredients of ASC was isolated and abstracted and the rat model of inhibited nitric oxide synthesis was established by using L-Arginine methyl ester (L-NAME), a nitric oxide synthase inhibitor. The mRNA expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in placental trophocyte and primordial micrangial endothelial cell was determined by using in situ hybridization at 12th day of pregnancy. **Results** The VEGF mRNA expression was significantly lower in nitric oxide synthesis inhibited model rats than that in rats non-modeled, or in model rats treated by ASC abstracts or nitroglycerin ($P < 0.05, P < 0.01$). **Conclusion** Effective ingredients of ASC may improve VEGF mRNA expression in placental trophocyte and vascular endothelial cell in early pregnancy, and thus be favorable for placental vascular net formation, trophocyte infiltration and mother-placental circulation constitution for increasing placental blood supply to prevent and treat the insufficient placental blood supply caused diseases such as pregnancy-induced hypertension syndrome.

Key words pregnancy; hypertension; nitric oxide; placenta; trophocyte; vascular endothelial growth factor; Radix Salivae Miltorrhizae; Astragalus

妊娠高血压综合征〔简称妊高征 (pregnancy in-

duced hypertension, PIH)]和胎儿宫内生长迟缓 (intrauterine growth retardation, IUGR)是导致孕产妇和婴儿病死率及死亡率升高的主要原因,严重影响人口质量,但确切病因均尚未明确。我们在前期研究基础上^[1-4],进一步采用核酸原位杂交技术,从胎盘滋养细胞、妊娠早期胎盘微血管内皮细胞血管内皮生长因子(VEGF)mRNA 表达变化角度,探讨中药黄芪丹参复

基金项目:国家自然科学基金(No. C30000225),国家中医药管理局基础研究项目(2000-J-T-17),湖南省教委青年项目(No. 01B014)资助

作者单位:湖南中医药大学中西医结合系(长沙 410007)

通讯作者:王若光, Tel: 0731 - 5381292, 5381112, E-mail: dplnw@public.cs.hn.cn

方成分对妊娠早期胎盘血管形成及滋养细胞侵入、母胎循环网络构建、胎盘化血管重铸的影响机制。

材料与方 法

1 材 料

1.1 动物 中国科学院上海实验动物中心提供清洁级 SD 系大鼠 110 只(实验动物合格证:中科动管 003 号)。雌雄 2:1 分笼饲养,鼠龄 100~120 天,体重 200~250g。雌鼠按妊娠顺序随机分为模型组、空白组、对照组、治疗组,每组 15 只进行实验。

1.2 药物 以益气化瘀的黄芪丹参复方各组分(黄芪提取黄芪皂甙、黄酮类;丹参提取丹参酮、丹参醌、丹参酸,各成分比例 4:1:2:2:1),以 25% 乙醇作溶剂,离心上清液 0.25 μm 微孔滤膜过滤,由湖南中医药大学药学院制成注射液,每毫升药液相当于生药量 2 g,灭菌冷藏备用。硝酸甘油,批号 20010924,北京明兴制药出品。

1.3 试剂 L-精氨酸甲酯(L-NAME, L-Ornithine, USA Cayman Chemical 公司产品)。原位杂交检测试剂盒(Boster 公司产品,编号:MK1142)。

1.4 仪器 XDS-1B 双目倒置显微镜(徕卡公司);BTS-20-M 数彩显策图像分析系统(英国产);YO-202 型冰冻切片机及一次性切片刀(浙江金华益迪医疗设备厂产);高速离心机(Heraeus Biofuge, 德国);DF-101B 集热式恒温磁力搅拌器(浙江乐清乐成电器厂);828 型 pH/ISE 测试仪(美国 orion 公司)等。

2 方 法

2.1 动物造模 大鼠于妊娠第 10 天起皮下注射 L-NAME,每天 125 mg/kg 体重,空白组 10 只,于妊娠第 10 天开始皮下注射双蒸水,量同模型组,分别至妊娠第 18 天。治疗组、对照组造模方法同模型组,治疗组于造模同时腹腔注射黄芪丹参复方组分 1050 mg/kg 体重。对照组腹腔注射硝酸甘油 1350 μg/kg 体重。妊娠第 18 天,25% 乌拉坦麻醉下,剖腹取胎及胎盘。

2.2 VEGF mRNA 检测 采用原位杂交及染色(采用多相寡核苷酸探针和高敏感标记技术,配合敏感性加强型的原位检测方法,VEGF 的寡核苷酸探针,经地高辛标记。具体操作按文献方法^[5])。

VEGF 寡核苷酸探针序列:(1)5'-TGGGACCACT TGGCA TGGTG GAGGT AGAGC-3';(2)5'-GGGTA CTCCT GGAAG ATGTC CACCA GGGTC-3';(3)5'-CTGCA AGTAC GTTCG TTTAA CTCAA GCTGC-3'。

2.3 原位杂交的阳性等级按以下方法计算 (1)

阳性细胞数:阳性细胞 ≤10%、≤30%、≤70% 和 >70% 分别计 1、2、3 和 4 分;(2)阳性着色强度:杂交信号强度可分为弱、中、强三级分别计 1、2 和 3 分,上述两种计分相加,1~3 分者为阴性,4~5 分者为阳性,6~7 分者为强阳性。每组选 5 个不同个体标本,每个标本随机取 10 张切片,每个切片 400 倍光镜下观察 3 个视野,共计 30 个视野,积分累计进行统计分析。

2.4 统计学方法 采用 SPSS 10.0 软件,进行方差分析。

结 果

各组滋养细胞及内皮细胞 VEGF mRNA 比较见表 1。结果表明:胎盘滋养细胞、内皮细胞均有 VEGF mRNA 表达,已知蜕膜部位也有 VEGF 的表达,是这些部位血管形成的关键因素之一。治疗组(图 1D、1H)VEGF mRNA 表达与空白组(图 1A、1E)比较差异无显著性(P>0.05),治疗组表达明显高于模型组(图 1B、1F),对照组(图 1C、1G)与模型组(图 1B、1F)比较表达明显升高(P<0.05)。说明一氧化氮合成阻滞可能导致胎盘血管形成障碍,从而引发胎盘浅表着床。

表 1 各组滋养细胞及内皮细胞 VEGF mRNA ISH 染色比较 (x̄ ± s)

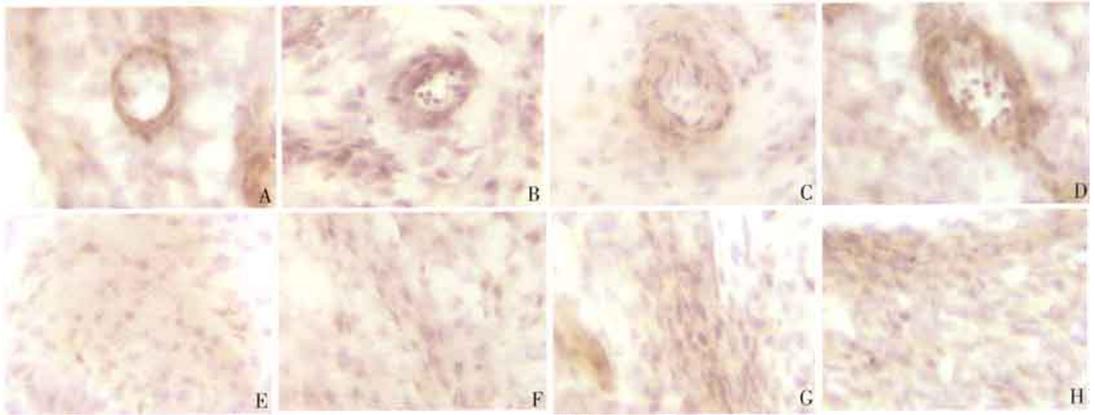
组别	n	VEGF mRNA	
		滋养细胞	内皮细胞
空白	30	46.73333 ± 10.24841 *	54.36667 ± 9.47352 **
模型	30	14.66667 ± 4.83759	16.66667 ± 5.65703
对照	30	26.36667 ± 4.30303 *	25.03333 ± 3.78432 *
治疗	30	48.33333 ± 9.47349 **	56.73333 ± 7.23651 **

注:与模型组比较,* P<0.05,** P<0.01

讨 论

胎盘 VEGF mRNA 表达与该部位的血管形成有关,胎盘血管在妊娠期中不断形成,并与绒毛一起植入子宫蜕膜层,建立胎盘/蜕膜血管网络和维持母胎循环,对于妊娠成功具有重要意义。妊娠 12 天,即运用 L-NAME 阻滞 NOS 造模的第 3 天,大鼠受精卵为受精后第 5 天着床,第 12 天为着床后 1 周时间,仍处于胎盘与蜕膜结构重建时期,此期观察 NO 合成阻滞 VEGF mRNA 表达,能够更直接明确 NO 与 VEGF 之间互动关系,NO 和 VEGF 与胎盘重铸障碍、浅表着床之间关系;NO、VEGF 与 PIH 病理变化之间的关系等。

血管发生和血管化是胎盘构建蜕膜毛细胞血管网络以及胚胎生长发育的基础。蜕膜、胎盘滋养层细胞、血管平滑肌细胞及内皮细胞都有 VEGF 的高度表达,



注:采用 DBA 染色 $\times 400$;A.空白组内皮细胞;B.模型组内皮细胞;C.对照组内皮细胞;D.治疗组内皮细胞;E.空白组滋养细胞;F.模型组滋养细胞;G.对照组滋养细胞;H.治疗组滋养细胞

图 1 各组 VEGF mRNA 表达

说明其参与这些部位血管的形成过程,滋养细胞源的 VEGF 在调控胎盘、蜕膜血管网络生长发育中发挥重要作用^[6-15]。VEGF 是一种有效的多功能多肽,最初被认为是特异的促内皮细胞有丝分裂的多肽,但它具有许多内皮及非内皮效应:(1)它具有促进有丝分裂和趋化作用,在体外促进内皮细胞增长,在体内可诱导血管发生;(2)还可提高血管通透性,致体液及蛋白渗出血管;(3)介导钙离子内流的作用,引起细胞浆内暂时性钙离子聚集,激活细胞上的磷脂酶 D、C;(4)VEGF 与磷酸酪受体 Flt-1 和 KDR 有很高的亲和力,通过作用细胞表面受体 Flt-1,可激活滋养层细胞内钙依赖型 NOS(cNOS),从而可能介导 NO 释放入局部或循环。(5)改变细胞外基质,以利于血管的生长;早期妊娠绒毛及蜕膜组织中 NOS 活性最高,而 VEGF 的免疫组化染色也表明妊娠早期较正常足月妊娠时明显增强。在缺氧刺激下,内皮细胞可产生 VEGF,并通过 NO 影响胎盘循环。滋养细胞内还存在 VEGF 的自分泌环(尽管在缺氧刺激下内皮细胞也可产生 VEGF,但它却没有自分泌环),VEGF 以自分泌方式介导 NO 释放,过多的合成 NO 进入局部,具有细胞毒性作用,可抑制细胞 DNA 的合成,控制胎盘增长,这可能与 IUGR 发生时常伴发小胎盘有关。VEGF 通过介导 NO 释放在胎盘生长、胎盘血管形成以及维持胎盘循环张力方面具有重要作用。

目前,PIH 时 NO 水平的检测结果存在矛盾^[7-15],胎盘绒毛 eNOS 或 eNOS mRNA 检测结果,支持因 NO 减少导致血管痉挛或舒张不良的认识,结合 PIH 及 IUGR 时存在胎盘血管床发育受阻的病理,似乎可以推测 VEGF 下降导致血管浸润受阻,VEGF 下降→

eNOS 下降→NO 下降→循环 NO 不足、子宫旋动脉急性粥样硬化,血管痉挛或舒张不良,缺氧及免疫异常→iNOS 上升→NO 上升→释放入局部 NO 上升→细胞凋亡增加。本研究提示,黄芪丹参复方提取物可能是通过对互动环节的影响,即抑制胎盘局部母胎反应,降低 MCP-1 mRNA 表达水平,促进 VEGF mRNA、eNOS mRNA 表达增加等综合因素提高胎盘血液供应。

参 考 文 献

- 1 尤昭玲,王若光.妊娠高血压综合征中医药研究思路.中国中西医结合杂志 2002;22(7):545—546.
You ZL, Wang RG. Thought on TCM study of pregnant hypertension syndrome. Chin J Integr Tradit West Med 2002; 22(7):545—546.
- 2 刘正刚,王若光,尤昭玲,等.一氧化氮合成阻滞模型大鼠血浆一氧化氮变化及益气化痰法干预作用.实用预防医学 2002;9(6):650—652.
Liu ZG, Wang RG, You ZL, et al. Nitrogen oxide synthesis to blood change of plasma nitrogen oxide of rat model and intervention of Yiqi Huayu principle. Pract Preve Med 2002;9 (5):650—652.
- 3 刘正刚,王若光,尤昭玲,等.益气化痰法对大鼠肿瘤坏死因子 α 的干预作用.实用预防医学 2002;9(5):478—479.
Liu ZG, Wang RG, You ZL, et al. The mechanism of composition of Huangqi-danshen on TNF α of rat blocked by nitric oxide synthesis. Pract Prev Med 2002;9(5):478—479.
- 4 王若光,尤昭玲,李克湘,等.益气化痰法对胎萎不长大鼠胎盘形态学影响研究.中国中医药科技 1997;4(1):41—43.
Wang RG, You ZL, Li KX, et al. Experimental study on the

- effects of tonifying Qi and activating blood circulation to remove stasis on rats' IUGR. *Chin J Tradit Med Sci Technol* 1997;4(1):41—43.
- 5 谷志远主编. 现代医学分子生物学. 北京:人民军医出版社, 1998:424—433.
Gu ZY editor. *Modern medical molecular biology*. Beijing: People's Military Medical Press, 1998:424—433.
- 6 潘石蕾, 余艳红. 一氧化氮和血管内皮生长因子对胎盘功能及胎儿生长发育的调控. *中华妇产科杂志* 1999;34(1):50—52.
Pan SL, Yu YH. Modulation of nitrogen oxide and vascular endothelial growth factor on placental function and fetus growth. *Chin J Obstet Gynecol* 1999;34(1):50—52.
- 7 石芳鑫, 尚涛, 殷秀凤. 一氧化氮合酶与妊高征发病关系的研究进展. *国外医学妇产科分册* 1998;25(6):326—329.
Shi FX, Shang T, Yin XF. Studying development on the relation between nitrogen oxide synthesis enzyme and pregnancy-induced hypertension syndrome. *Foreign Med Sci: Obstet Gynecol* 1998;25(6):326—329.
- 8 刘霞, 李力, 周元国, 等. 妊娠高血压综合征患者胎盘血管内皮生长因子的表达及其意义. *中华妇产科杂志* 2002;37(1):22—24.
Liu X, Li L, Zhou YG, et al. Expression and role of placental vascular endothelial growth factor in patient with pregnancy-induced hypertension syndrome. *Chin J Obstet Gynecol* 2002;37(1):22—24.
- 9 程淑, 杨池菽. VEGF 及其在妊娠中的作用. *国外医学妇产科分册* 2001;28(6):328—331.
Cheng S, Yang CS. Vascular endothelial growth factor and its effect on pregnancy. *Foreign Med Sci: Obstet Gynecol* 2001;28(6):328—331.
- 10 程忠平, 林其德, 沈仲毅, 等. 血管内皮生长因子与妊娠高血压综合征发病的相关性研究. *中华妇产科杂志* 2001;36(2):72—75.
Cheng ZP, Lin QD, Shen ZY, et al. Study on association of vascular endothelial growth factor with the pathogenesis of pregnancy-induced hypertension. *Chin J Obstet Gynecol* 2001;36(2):72—75.
- 11 辛志敏, 谢青贞, 曹路敏. 血管内皮生长因子与子宫内膜. *国外医学计划生育分册* 2002;21(3):163—166.
Xin ZM, Xie QZ, Cao LM. Vascular endothelial growth factor and endometrium. *Foreign Med Sci: Fam Plann* 2002;21(3):163—166.
- 12 Sugino N, Kashida S, Karube-Harada A, et al. Expression of vascular endothelial growth factor(VEGF) and its receptors in human endometrium throughout the menstrual cycle and in early pregnancy. *Reproduction* 2002;123(3):379—387.
- 13 Gargett CE, Rogers PA. Human endometrial angiogenesis. *Reproduction* 2001;121(2):181—186.
- 14 Li XF, Charnock-Jones DS, Zhang E, et al. Angiogenic growth factor messenger ribonucleic acids in uterine natural killer cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(4):1823—1834.
- 15 Shardey AM, Day K, Mcpherson A, et al. Vascular endothelial growth factor expression in human endometrium is regulated by hypoxia. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85(1):402—409.

(收稿:2004-10-25 修回:2005-03-20)

第五次全国中西医结合泌尿外科学术会议征文及举办学习班通知

第五次全国中西医结合泌尿外科学术会议拟于 2005 年 9 月在江苏省南京市召开,同时举办泌尿外科学习班,现就有关事宜通知如下。

学术会议 征文内容:尿石症、泌尿系肿瘤、前列腺疾病、性传播疾病、腔内泌尿外科技术、男性生殖技术等泌尿外科男科疾病的中西医临床和实验研究。

学习班 授课内容:泌尿外科男科疾病的中西医治疗研究进展、腔内泌尿外科技术及演示。聘请国内著名泌尿外科专家授课。该班属于国家继续教育项目,学习期满,授予国家继续教育学分。

征文及报名方式 论文请打印,字数在 3 000 字以内,附 800 字论文摘要(加盖公章,并附 Word 格式软盘)。截稿时间为 2005 年 8 月 15 日。参加学习班者请来信或电话索取招生简章;报名截止时间为 2005 年 9 月 10 日。报名及会议论文寄至江苏省南京市汉中路 155 号(邮编 210029)南京中医药大学附属医院泌尿外科卢子杰医师、顾晓箭主任收,信封注明“征文”;电话:025-6617141 转 70908;E-mail:guxj1961@sina.com。会议召开及学习班举办具体时间、地点另行通知。