

络气虚滞大鼠动脉组织血红素加氧酶/一氧化碳系统的变化及人参、双参、通心络的干预

梁俊清¹, 吴以岭^{1*}, 贾振华¹, 徐海波², 丁春华³, 王宏涛¹

(1. 河北医科大学附属以岭医院内科, 石家庄 050017; 2. 承德医学院附属医院综合科, 承德 067000; 3. 河北医科大学病理生理学教研室, 石家庄 050017)

[摘要] **目的:**通过检测络气虚滞大鼠动脉组织中血红素加氧酶/一氧化碳(HO/CO)系统活性的变化,探讨不同通络方药对血管的保护机制。**方法:**健康雄性 Wistar 大鼠随机分为对照组、络气虚滞组、人参组、双参组、通心络组,每组 24 只。透射电镜下观察动脉组织内皮细胞超微结构,免疫组织化学染色方法观察各组动脉组织中 HO-1 的表达,RT-PCR 及 Western 印迹方法检测 HO-1 mRNA 及其蛋白的表达,同时检测动脉组织中 CO 含量的变化。**结果:**超微结果显示,络气虚滞组动物血管内皮细胞游离面微绒毛显著减少,吞饮小泡数量亦显著减少,线粒体大部分嵴和膜融合甚至消失,粗面内质网严重脱颗粒。免疫组织化学染色结果显示:与对照组比较,络气虚滞组动脉组织中 HO-1 蛋白表达阳性信号明显减弱,3 种通络方药可明显增强 HO-1 表达。RT-PCR 及 Western 印迹检测结果显示,与对照组比较络气虚滞组 HO-1 mRNA 及其蛋白表达明显下调($P < 0.01$, $P < 0.001$),3 种通络方药可使 HO-1 mRNA 及其蛋白的表达明显增强($P < 0.001$),其中通心络组优于人参和双参组($P < 0.001$),同时通心络可使 CO 的释放量明显增加。**结论:**通络方药可通过增加内源性 CO 发挥细胞保护作用,该作用可能与其改善或修复 HO 系统、提高 HO-1 表达有关,这可能是通络方药保护血管组织免遭损伤的机制之一。

[关键词] 络气虚滞;血红素加氧酶;一氧化碳;通络方药

[中图分类号] R 256.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)07-0782-04

Changes of HO/CO system in arterial tissues of rats with stagnancy of collateral-*Qi* in deficiency condition and treatment with *Renshen*, *Shuangshen*, and *Tongxinluo*

LIANG Jun-qing¹, WU Yi-ling^{1*}, JIA Zhen-hua¹, XU Hai-bo², DING Chun-hua³, WANG Hong-tao¹ (1. Yiling Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050035, China; 2. Department of Comprehensive Medicine, The Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde 067000; 3. Department of Pathophysiology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the vascular protective mechanism of different levels of herbs through detecting activity of HO-1/CO system in arterial tissues of rats with stagnancy of collateral-*Qi* in deficiency condition. **Methods:** Healthy male Wistar rats of cleanness level were randomly divided into control group, stagnancy of collateral-*Qi* in a deficiency condition group (SCQDC group), *Renshen* group, *Shuangshen* group, and *Tongxinluo* group. The ultrastructure of endothelium cells in the artery was observed. RT-PCR, Western blot, and immunohistochemical approaches were used to detect JNK, c-Jun mRNA and albumen expression in the arterial tissues. Meanwhile, the content of CO in the arterial tissue was also detected. **Results:** In SCQDC group, the counts of pinocytotic cells and microvili on the free surface of vascular endothelial cells were significantly decreased; most crests of mitochondria fused with membrane, some even disappeared; serious degranulation was observed in the rough surfaced endoplasmic reticulum. Immunohistochemistry showed that the HO-1 positive signals in the arterial histiocyte weakened significantly compared with the control group. The HO-1 expression was increased in the 3 treatment groups. Compared with control group, SCQDC group had decreased HO-1 mRNA and albumen expression ($P < 0.01$, $P < 0.001$). The 3 different kinds of Herbs to dredge collaterals increased the HO-1 mRNA and albumen expression to different degrees ($P < 0.001$). The increase of albumen in the *Tongxinluo* group was more than those in the *Shuangshen* group and the *Renshen* group ($P < 0.001$). *Tongxinluo* also significantly increased the CO content. **Conclusion:** Herbs to dredge collaterals can induce CO production by ameliorating or recovering the HO System, which may be one of the mechanisms for protecting the vascular tissues.

[KEY WORDS] stagnancy of collateral-*Qi* in deficiency condition; heme oxygenase; carbon monoxide; herbs to dredge collaterals

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(7):782-785]

近年来研究表明,一直被看作代谢废物的内源性一氧化碳(CO)是具有重要生理和病理生理作用的新型气体信号分子。与 NO 相似,CO 可激活鸟苷酸环化酶,调节环磷酸鸟苷的生成,发挥细胞信使作用,表现为舒张血管平滑肌、抑制血管平滑肌细胞增

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973 计划)(2005CB523301). Supported by National Program on Key Basic Research Projects (973 Program)(2005CB523301).

[作者简介] 梁俊清, 博士生, 讲师。

* Corresponding author. E-mail: jiatcm@163.com

殖和血小板聚集、抑制炎症反应、抗脂质过氧化并可能有内皮细胞保护作用等^[1]。机体内源性 CO 主要来源于有机分子的氧化及血红素加氧酶(HO)催化血红素降解的过程中产生,其中后者是最重要的途径。HO 与其催化的产物 CO 对内皮细胞的保护作用越来越受到人们的重视,本实验通过对络气虚滞时动脉组织中 HO/CO 活性的变化及通络方药影响的研究,探讨通络方药作用的可能机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组 健康雄性 Wistar 大鼠 120 只,体质量 220~250 g,随机分为 5 组,每组 24 只。(1)对照组:正常饮食,每日等量 0.5%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)灌胃;(2)络气虚滞组:高蛋白饲料喂养 4 周后,于基础饮食条件下开始强迫负重(自身体质量的 5%)游泳,直至大鼠游泳范围逐渐缩小,动作明显失调、慌张,鼻部在水面上下浮动,头部没入水面下 10 s 不能上浮为止;(3)人参组:于喂饲高蛋白饲料开始即腹腔注射人参(1 ml/100 g),给药浓度为 0.008 g 生药/ml;(4)双参组:于喂饲高蛋白饲料开始即给予双参(1 ml/100 g)腹腔注射,给药浓度为 0.075 g 生药/ml;(5)通心络组:于喂饲高蛋白饲料开始即给予通心络(1 ml/100 g)灌胃,给药浓度为 0.06 g 生药/ml。

1.2 仪器及试剂 PCR 仪(GeneAmp PCR System 9600,Perkin-Elmer Co. USA);U-2000 型紫外分光光度计(日本 Hitachi 公司);凝胶图像成像系统(Image Co. USA);EBA12R 型高速低温离心机(德国 Hettich 公司);DF-C II 型双恒定时电泳仪(北京东方特力科贸中心);DYY-III 型电泳槽、水浴式电转移装置(北京市六一仪器厂)。TRIzol 试剂、逆转录酶(AMV-RT,美国 Promega 公司);核糖核酸酶抑制剂(RNasin,美国 Amresco 公司);Taq DNA 聚合酶(斯麦特生物公司);随机引物(美国 Promega 公司);HO-1 引物(上海生物工程公司);Access RT-PCR system(美国 Promega 公司);兔抗大鼠 HO-1 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司);SP 免疫组织化学检测试剂盒(北京中山公司)。蛋氨酸,河北省农科院提供,由河北省实验动物中心制作成 3%的高蛋白饲料,纯度 99.9%,批号:B7NE-05-0007-MC02。通心络超微粉(批号:20050530)、双参注射液、人参注射液均由石家庄以岭药业股份有限公司提供。

1.3 样品处理及指标检测 各组于实验结束后取 6 只大鼠的胸主动脉,常规留取光镜、电镜标本后,

其余动脉组织用预冷的生理盐水洗去残血,滤纸吸干,分析天平称质量后,4℃下用电动匀浆器制成 10%(W/V)的匀浆。4℃,4 000×g 离心 10 min,吸取上清,分装待检。各组其余动物迅速分离胸主动脉(全段)置于液氮中,然后置于-80℃保存。用 TRIzol 试剂盒提取组织总 RNA。

1.3.1 RNA 鉴定 用 20 μl 焦碳酸二乙酯 DEPC 水溶解 RNA,取总 RNA 提取液 2 μl,用三蒸水稀释 500 倍后,用紫外分光光度计检测其 D_{260} 和 D_{280} 值,以确定 RNA 的纯度和量。另取 2 μl RNA 提取液与 1×上样缓冲液 2 μl 混合,采用 1%琼脂糖凝胶电泳(含 0.5 μg/ml 溴化乙啶),电泳缓冲液为 1×Tris-硼酸(TBE),90 V 电泳 30 min,凝胶图像成像系统观察 RNA 的完整性。

1.3.2 RT-PCR 反应及产物分析 在 50 μl 反应体系中进行 RT-PCR 反应:42℃ 45 min,95℃ 5 min;95℃ 3 min,60℃ 30 s,72℃ 30 s,94℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s,28 个循环。94℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 6 min。取 RT-PCR 产物 8 μl,加 5×上样缓冲液 2 μl,在含 0.5 μg/ml 溴化乙啶的 1.5%琼脂糖凝胶上电泳,80 V 45 min,用 GDS 凝胶图像成像系统拍摄实验结果,用凝胶图像分析系统(Gel-Pro Analyzer Version 3.0)分析结果。取其相对密度灰度值代表 HO-1 的相对表达水平。

1.3.3 动脉组织总蛋白的提取 实验结束后留取动脉组织,用 PBS 洗去动脉组织表面残留血液,滤纸吸干后于-80℃冻存。取 100 mg 组织标本,加入组织裂解液(10% W/V)(50 mmol/L Tris,150 mmol/L NaCl,1% Triton X-100,0.5%脱氧胆酸钠,1 mmol/L PMSF,0.1% SDS,10 mmol/L NaF,1 mmol/L 钒酸钠,40 μg/ml 蛋白酶抑制剂混合物)于 4℃下匀浆,4℃ 12 000×g 离心 10 min,吸取上清,以考马斯亮蓝 G250 法进行蛋白定量,将制备好的蛋白样品置-80℃冰箱保存备用。

1.4 统计学处理 所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 11.5 统计软件包,多个样本均数比较用单因素方差分析(One-Way ANOVA),多个样本均数间的两两比较用最小显著差法(least significant difference,LSD),若方差不齐则采用 Satterthwaite-*t* 检验行两两比较。

2 结果

2.1 动脉组织中 CO 含量的变化 络气虚滞组 CO 含量比对照组显著下降[(1.722±0.200) vs (2.344±0.326), $P<0.05$],给予人参、双参、通心

络后,动脉组织中 CO 含量分别为(1.714±0.521)、(1.783±0.404)、(1.897±0.182),与对照组比呈现出不同程度的升高趋势($P<0.05$),且通心络组优于其他两组。

2.2 动脉组织中 HO-1 mRNA 及其蛋白表达的变化 见图 1。

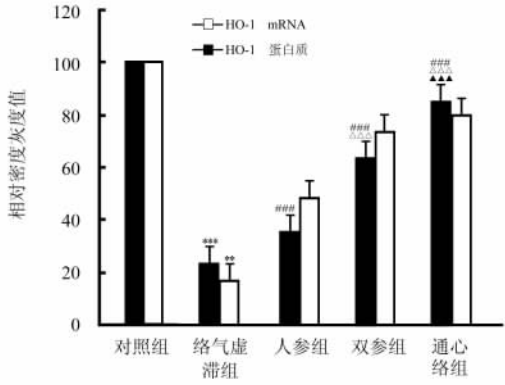


图 1 RT-PCR 及免疫印迹法检测动脉组织中 HO-1 mRNA 及蛋白质表达结果

** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 与对照组比较; ### $P<0.001$ 与络气虚滞组比较; $\Delta\Delta\Delta P<0.001$ 与人参组比较; $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle P<0.001$ 与双参组比较

与对照组相比,络气虚滞组 HO-1 mRNA 阳性信号明显减弱($P<0.01$),3 种通络方药可使络气虚滞条件下 HO-1 mRNA 的阳性信号表达明显增强($P<0.01, P<0.001$);HO-1 的蛋白表达变化趋势与其 mRNA 表达一致。

2.3 动脉组织中 HO-1 免疫组织化学染色结果 结果(图 2)显示,对照组动脉组织中可见 HO-1 蛋白表达的弱阳性棕黄色颗粒,络气虚滞组动脉组织中 HO-1 蛋白表达阳性信号较对照组弱,3 种通络方药可使络气虚滞状态下所诱导的 HO-1 蛋白表达增强。

2.4 动脉组织内皮细胞超微结构 结果(图 3)显示,络气虚滞组血管内皮细胞游离面微绒毛显著减少,吞饮小泡数量亦显著减少,线粒体大部分嵴和膜融合消失,粗面内质网严重脱颗粒。3 种通络方药治疗组上述超微结构的变化较络气虚滞组明显减轻。

3 讨论

既往研究表明,HO-1 及其催化产物 CO 通过抗

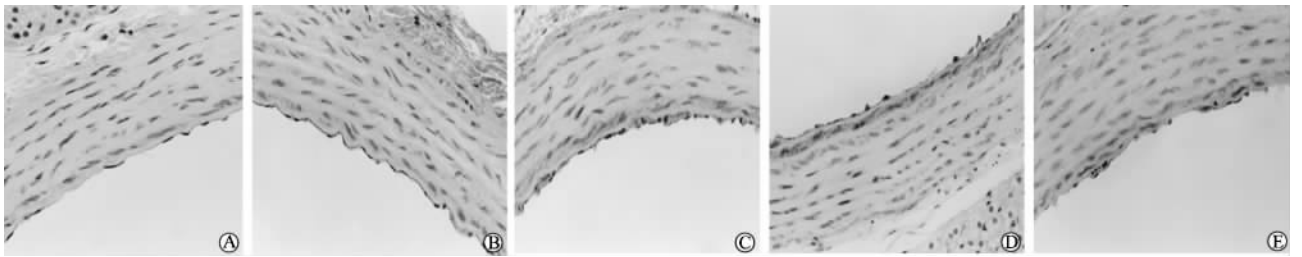


图 2 动脉组织 HO-1 免疫组织化学检测结果

A: 对照组; B: 络气虚滞组; C: 人参组; D: 双参组; E: 通心络组

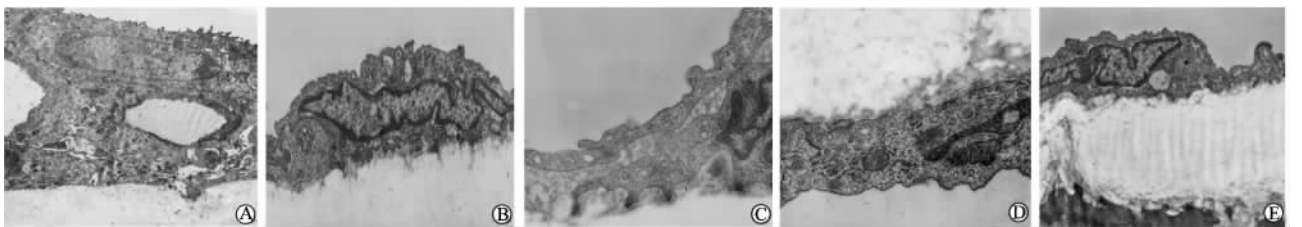


图 3 大鼠动脉组织超微结构比较

A: 对照组; B: 络气虚滞组; C: 人参组; D: 双参组; E: 通心络组

脂质过氧化、抑制炎症反应而发挥细胞保护作用,本研究表明,3 种通络方药可不同程度地提高络气虚滞模型 HO-1 的表达和 CO 的释放,提示通络

方药细胞保护作用的发挥可能与此有关。

HO-1 又称为热休克蛋白 32(HSP32),属微粒体酶类,在许多病理情况(如内毒素血症、炎症、低

氧)下,可作为保护性蛋白被诱导,保护组织免受氧化应激损伤。它除受血红素调节外,还有许多因素均可诱导其产生,如溶血、炎症因子、氧化应激、热应激、重金属、内毒素等。有研究发现培养的内皮细胞中的 HO-1 通过释放 CO 激活 p38 有丝分裂原激活蛋白激酶途径来介导抗凋亡发挥细胞保护作用^[2],提示 HO-1 可通过抑制内皮细胞凋亡,进而实现对内皮细胞的保护作用;将 HO-1 基因导入母体子宫的微血管内皮细胞,可促进细胞增殖和毛细血管样物形成,HO-1 过表达可增强 EC 细胞对抗各种氧化应激的能力^[3]。

作为 HO 催化产物之一的 CO,是继 NO 之后发现的又一重要的细胞间信号分子。它能够活化鸟苷酸环化酶(GC),使细胞内 cGMP 增高,通过 HO-CO-cGMP 系统,发挥舒张血管、降低血压和减少缺血/再灌注对心脏的损伤等多种病理生理作用^[4]。大量的研究^[5-7]表明,HO-1 的诱导是机体抵抗氧化性损伤和产生适应性变化的重要环节,HO-1 的保护作用无疑与其代谢产物有关,在其代谢产物中,胆红素本身即具有抗氧化作用,而另一产物 CO 作为细胞信使和神经递质正引起人们浓厚的兴趣。Otterbein 等^[8]用低浓度 CO+高浓度氧刺激大鼠,未出现气道和实质性肺组织炎症、纤维蛋白沉积及肺水肿现象,并且气道中性粒细胞浸润及全肺凋亡指数减少,提示 HO-1 代谢产物 CO 在抗氧化应激损伤中可能发挥重要作用。但 Otterbein 等用的是外源性 CO,这并不能完全类同于内源性 CO,故还需对内源性 CO 作进一步研究以证明其参与体内 HO-1 的细胞保护效应。

本研究结果显示,络气虚滞状态下可伴有 HO-1 mRNA 及其蛋白表达下调,而通络干预可明显上调二者的表达。但此时 HO-1 和通络方药的细胞保护机制尚不清楚,从对动脉组织 HO-1 的免疫组织化学染色和动脉组织的超微结构检测结果可以看出,HO-1 和通络方药的保护作用主要与抗氧化作用有关。HO-1 在血管内皮功能损伤中的保护作用虽然不能排除 HO 主要代谢产物——胆绿素和胆红素的抗氧化作用,但是目前的研究^[9-10]表明 CO 的作用更为广泛,主要有下列几个方面:(1)CO 可以通过激活可溶性鸟苷酸环化酶(soluble guanylyl cyclase,sGC)产生 cGMP 从而发挥舒张血管的作用。(2)CO 可以通过激活 sGC 产生 cGMP 而抑制血小

板的聚集。CO 的上述两种作用对于在病理生理情况下维持机体组织的充分血供、降低血管的通透性具有重要意义。(3)CO 还具有调节中性粒细胞(PMN)黏附的作用。本实验研究结果表明,络气虚滞时可伴有 CO 生成的减少,同时通络干预可通过增加 CO 的生成来发挥抗氧化作用,从而改善络气虚滞条件下血管内皮功能障碍。结果提示,通络方药对内皮细胞的保护作用的发挥可能与改善或修复 HO 系统进而诱导内源性 CO 的产生有关,尝试性应用外源性 CO 等手段可能为防治络气虚滞血管内皮功能障碍及由此引发的各种急性心脑血管病突发事件的发生提供新的思路。

[参考文献]

- [1] 郭钰珍,陈汉平. 氯血红素诱导人脐静脉内皮细胞血红素氧合酶表达及其对血管保护作用[J]. 中国医师杂志,2006,8:173-175.
- [2] Brouard S,Berberat P O,Tobiasch E,et al. Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide requires the activation of transcription factor NF-kappa B to protect endothelial cells from tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis[J]. J Biol Chem, 2002,277:17950-17961.
- [3] Kushida T,Quan S,Yang L,et al. A significant role for the heme oxygenase-1 gene in endothelial cell cycle progression[J]. Biochem Biophys Res Commun,2002,291:68-75.
- [4] Motterlini R,Conzaiez A,Foreste R,et al. Heme oxygenase-1 derived carbon monoxide to the suppression of acute hypertensive responses *in vivo*[J]. Circ Res,1998,83:568-577.
- [5] Zampetaki A,Minamino T,Mitsialis S A,et al. Effect of heme oxygenase-1 overexpression in two models of lung inflammation[J]. Exp Biol Med (Maywood),2003,5:442-446.
- [6] Henningsson R,Alm P,Lundquist I. Evaluation of islet heme oxygenase-CO and nitric oxide synthase-NO pathways during acute endotoxemia[J]. Am J Physiol Cell Physiol,2001,5:1242-1254.
- [7] Otterbein L,Choi A M. Heme oxygenase:colors and defense against cellular stress[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000,279:1029-1037.
- [8] Otterbein L E,Mantell L L,Choi A M. Carbon monoxide provides protection against hyperoxic lung injury[J]. J Physiol, 1999,276:L688-L694.
- [9] Steiner A A,Branco L G. Carbon monoxide is the heme oxygenase product with a pyretic action:evidence for a cGMP signaling pathway[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2001,280:448-457.
- [10] Andersson J A,Uddman R,Cardell L O. Hemin,a heme oxygenase substrate analog,both inhibits and enhances neutrophil random migration and chemotaxis[J]. Allergy,2002,57:1008-1012.

[收稿日期] 2007-05-20

[修回日期] 2007-06-20

[本文编辑] 尹 荼