

疏肝活血方促进缺血组织 HIF-1 α , HGF, VEGF mRNA 的表达研究

刘艳玲*, 郑巧楠, 袁明殿

(辽宁中医药大学附属医院, 沈阳 110032)

[摘要] 目的:探讨疏肝活血方对肢体缺血组织中低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α),肝细胞生长因子(HGF),血管内皮生长因子(VEGF) mRNA 表达的调节作用。方法:BALB/c 裸鼠 64 只,随机分为疏肝活血方组、模型组和正常组,股动脉结扎法建立裸鼠肢体缺血模型,分别于术后 1,2,3,4 周观察各组裸鼠肢体缺血状态的改变,应用苏木素-伊红(HE)染色和 CD34 免疫组化染色观察肌肉组织一般形态学及微血管数的改变,应用反转录多聚酶链反应(RT-PCR)检测 HIF-1 α ,HGF,VEGF 基因在缺血肌肉中表达的动态变化。结果:疏肝活血方能明显改善裸鼠肢体的缺血状态;术后 2~4 周,疏肝活血方组裸鼠缺血肢体肌肉中的微血管数(MVC)明显高于模型组($P < 0.01$);疏肝活血方组裸鼠缺血肢体肌肉中 HIF-1 α ,HGF 和 VEGF 的 mRNA 表达明显强于模型组。结论:疏肝活血方具有明显的促血管生成作用,能够明显上调血管新生相关基因 HIF-1 α ,HGF,VEGF 的 mRNA 表达水平。

[关键词] 疏肝活血方;缺血;mRNA 表达

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)20-0153-04

[DOI] CNKI:11-3495/R.20110823.1118.011 **[网络出版时间]** 2011-08-23 11:18

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110823.1118.011.html>

Promotion of HIF-1 α , HGF, VEGF mRNA Expression in Ischemia Limb Muscle by Shugan Huoxue Recipe

LIU Yan-ling*, ZHENG Qiao-nan, YUAN Ming-dian

(Affiliated Hospital of Liaoning Traditional Chinese Medical University, Shenyang 110032, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the regulation of Shugan Huoxue recipe on hypoxia inducible factor 1 α (HIF-1 α), hepatocyte growth factor (HGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA expression in muscle after limb ischemia. **Method:** Forty-eight BALB/c nude mice, were randomly divided into Shugan Huoxue

[收稿日期] 20110304(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30600843)

[通讯作者] *刘艳玲,学士,副主任药师,从事临床中药学研究, Tel:024-86291337, E-mail: sylidy@yahoo.com.cn

filaments revealed as dynamic and multipurpose scaffolds [J]. Nat Cell Biol, 2004, 6 (8): 699.

[8] Zhao Yan, Yan Quanmei, Long Xing, et al. Vimentin affects the mobility and invasiveness of prostate cancer cells [J]. Cell Bio-chem Funct, 2008, 26 (5): 571.

[9] Singh S, Sadacharan S, Su S, et al. Overexpression of vimentin role in the invasive phenotype in an androgen 2 independent model of prostate cancer [J]. Cancer Res, 2003, 63(9):2306.

[10] Tolstonog G V, Belichenko2 Weitzmann I V, Lu J P, et al. Spontaneously immortalized mouse embryo fibroblasts: growth behavior of wild-type and vimentin deficient cells in relation to mitochondrial structure and activity [J]. DNA Cell Biol, 2005, 24 (11): 680.

[11] Byun Y, Chen F, Chang R, et al. Caspase cleavage of vimentin disrupts intermediate filaments and promotes apoptosis [J]. Cell Death Differ, 2001, 8 (5):443

[责任编辑 聂淑琴]

recipe group, blank control group and normal group. Nude mice limb ischemia model was established by femoral artery ligation method. Nude mice limb ischemic changes were observed at Week 1st, 2nd, 3rd and 4th after limb ischemia respectively. Hematoxylin-Eosine (HE) staining and CD34 immunohistochemical staining was used to observe ischemic morphological changes in muscle tissue. Dynamic changes of gene expression of HIF-1 α , HGF, VEGF were detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) in ischemic muscle. **Result:** Compared with the blank control group, Shugan Huoxue recipe could improve the state of ischemia in the limb of nude mice. In 2-4 weeks after ischemia, the microvascular count (MVC) in the ischemic limb muscle of nude mice in Shugan Huoxue recipe group was significantly higher than that in blank control group ($P < 0.01$). The mRNA expression of HIF-1 α , HGF, VEGF in the ischemic limb muscle of nude mice in Shugan Huoxue recipe group were upregulated compared with those in blank control group. **Conclusion:** Shugan Huoxue recipe could increase HIF-1 α , HGF and VEGF mRNA expression and promote angiogenesis.

[**Key words**] Shugan Huoxue recipe; ischemia; mRNA expression

随着年龄的增长,肢体缺血性疾病的发病率呈上升趋势,70 岁以上人群的发病率在 15% ~ 20%,其中 20% 的患者会出现包括间歇性跛行、静息痛、缺血性溃疡及末端肢体坏疽在内的典型症状。患者多合并全身心脑血管疾病或相关危险因素^[1],约 60% ~ 80% 的下肢动脉动脉硬化闭塞症病人至少有一支冠状动脉病变,约 12% ~ 28.4% 合并颈动脉狭窄,此类患者 5 年及 10 年死于心脑血管疾病的比例分别为 30% 及 40%。因此,努力改善高危人群不良生活习惯的同时,对肢体缺血性疾病进行病因及相关危险因素的控制,应用各种改善血管功能药物,对稳定或延缓下肢症状及预防心脑血管事件均有积极的作用。在本研究中,我们通过裸鼠肢体缺血模型,观察了疏肝活血方促进缺血肢体的血管新生,以及对低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)、肝细胞生长因子 (HGF) 和血管内皮生长因子 (VEGF) mRNA 表达的调节作用。

1 材料

1.1 动物 4 周龄 BALB/c 裸鼠 64 只,体重(20 \pm 2)g,雌雄各半,购于大连医科大学实验动物中心,动物合格证号:SCXK(辽)2004-0017。

1.2 仪器及试剂 PCR 扩增仪 (PE9700, 美国),低温高速离心机 (MR1812, 14 000 r \cdot min⁻¹, 法国),紫外-可见光分光光度计 (RV300, Unican 公司)。CD34 一抗和二抗分别为武汉博士德公司和北京中杉公司的产品,Trizol 为美国 Invitrogen 公司产品,HIF-1 α , HGF, VEGF 和内参照 GAPDH 的引物由大连宝生物公司合成。

1.3 药物 疏肝活血方(柴胡 20 g, 香附 20 g, 当归

15 g, 赤芍 15 g) 饮片购自辽宁中医药大学附属医院调剂中心,经辽宁中医药大学中药教研室王淑清教授鉴定,折算出该方水煎剂的质量浓度按生药量计为 3.4 g \cdot mL⁻¹ (相当于成人用药量的 10 倍),采用传统的水提法进行制剂。

2 方法

2.1 分组 48 只裸鼠于清洁环境中,按本课题组既往方法进行股动脉结扎制成右后肢缺血模型^[2],再按随机数字表分为疏肝活血方组和模型组,每组 24 只裸鼠,自术后次日开始,分别给予相应的中药或生理盐水,每日 1 次,每次 0.5 mL。根据标本采集的时间,每个大组再次随机分为 4 个亚组:术后 1, 2, 3, 4 周,每组 6 只。余 16 只裸鼠作为正常对照,分 4 次收集标本。

2.2 标本采集 观察期末颈椎脱臼处死裸鼠,快速剪下右后肢内收肌群,分成两块,其中一块置于液氮中冷却 20 min, -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存,用于提取组织中的蛋白质;另一块于中性甲醛溶液中固定 24 h 后,常规方法制成蜡块备用。

2.3 肌肉组织形态学的检测 通过苏木素-伊红 (HE) 染色观察肌肉组织一般形态的变化。用 CD34 免疫组织化学染色的阳性表达来标记血管内皮,一抗工作浓度为 1:100,免疫组化染色采用链霉素抗生物素-过氧化物酶 (S-P 法),凡是染成棕黄色的内皮细胞簇作为一个血管计数,每张切片随机计数 3 个视野 (200 \times) 内的阳性细胞簇,计算平均数,作为该片的微血管数 (MVC)。

2.4 反转录多聚酶链反应 (RT-PCR) 采用 Trizol 试剂一步法提取组织总 RNA,紫外分光光度计测定

纯度并定量。根据 GenBank 提供的 HIF-1 α 、HGF、VEGF 和内参照 GAPDH 的 mRNA 序列,应用软件 Primer Premier 5.0 自行设计引物,序列见表 1。反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min,1 个循环;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,59 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min 后结束扩增反应。取 5 μL PCR 产物与 2 μL Lodding Buffer 混合,进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,100 V 1.5 h,电泳结束后,凝胶自动成像系统分析。记录每条 DNA 扩增带的灰度值,将每一个目的 DNA 扩增片段的灰度值与相应的内对照 GAPDH 扩增片段灰度值的比值作为每一个目的基因 mRNA 的半定量指标。

表 1 RT-PCR 引物序列

基因名称	引物序列	片段长度/bp
VEGF	F: 5'-CAC CAC CAC GCC ATC A -3'	452
	R: 5'-GCC TTT CAT CCC ATT GTC-3'	
HGF	F: 5'-TGC CAA CAG GTG TAT CAG-3'	395
	R: 5'-CAC AGA CTT CGT AGC GTA -3'	
HIF-1 α	F: 5'-CCT GGC AAT GTC TCC-3'	662
	R: 5'-CCT TAG CAG TGG TCG T-3'	
GAPDH	F: 5'-TCA ACG GCA CAG TCA AGG-3'	452
	R: 5'-ACC AGT GGA TGC AGG GAT-3'	

2.5 统计学分析 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SAS 6.12 统计软件进行统计分析,组间差异性比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 裸鼠肢体缺血状态的观察 所有裸鼠均存活至观察期末。模型裸鼠的右后肢术后即刻均出现明显缺血改变,颜色苍白,行动时呈拖拉步态。术后 2~3 d 时,各组均有多只裸鼠的右后肢出现了不同程度的肢体坏疽。术后 1 周末时,各组均有部分裸鼠肢体的坏疽程度进一步加重,同时伴有切口的缺血、感染及部分哆开。术后 2 周末时,模型组裸鼠肢体缺血处于最严重的状态;疏肝活血方组裸鼠坏疽的肢体已脱落,残肢逐渐自愈。术后 3~4 周末时,模型组裸鼠坏疽肢体开始脱落,残肢逐渐愈合,但裸鼠行动时,右后肢仍呈拖拉步态;疏肝活血方组裸鼠残肢及切口均完全愈合,右后肢行动灵活。

3.2 缺血肌肉组织形态学的观察 HE 染色显示,正常裸鼠的肌纤维排列整齐,形态饱满,未见有异常细胞出现。术后 1~2 周时,模型组裸鼠右后肢的肌纤维萎缩变形且排列紊乱,有大量的炎性细胞浸润于肌肉组织中,至术后 4 周时,肌纤维营养状况有所

改善,炎性细胞浸润减轻。疏肝活血方组裸鼠右后肢的肌纤维营养状况及炎性细胞浸润的程度均明显好于模型组。CD34 免疫组织化学染色显示,正常裸鼠肌肉中可见微血管呈散在分布。术后 2~4 周,疏肝活血方组右后肢肌肉中的 MVC 明显高于模型组(表 2)。

表 2 各组裸鼠缺血肢体肌肉中微血管数量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	n	微血管数/条	
			1 周	2 周
正常	-	16	2.1 \pm 0.4	1.8 \pm 0.4
模型	-	24	10.5 \pm 2.3 ¹⁾	15.2 \pm 3.8 ¹⁾
疏肝活血方	85	24	13.1 \pm 3.4	29.2 \pm 5.6 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$ 。

3.3 RT-PCR 检测 正常裸鼠及模型裸鼠左后肢肌肉中均未见明显的 HIF-1 α ,HGF,VEGF 的 mRNA 表达。术后 1 周末时,模型组缺血肢体肌肉中 HIF-1 α ,HGF,VEGF 的 mRNA 表达增强,至术后 3~4 周时,仅有微弱的表达甚至未见有表达。术后 2~4 周,疏肝活血方组右后肢肌肉中 HIF-1 α ,HGF,VEGF 的 mRNA 表达明显强于模型组(表 3)。

表 3 各组裸鼠缺血肢体肌肉中 HIF-1 α ,HGF,VEGF 的 mRNA 表达灰度比值(目的 DNA/GAPDH)

组别	术后 /周	n	HIF-1 α	HGF	VEGF
正常	-	16	-	-	-
模型	1	6	0.43 \pm 0.11	0.71 \pm 0.20	0.73 \pm 0.18
	2	6	-	0.61 \pm 0.16	0.32 \pm 0.15
	3	6	-	-	0.21 \pm 0.07
	4	6	-	-	-
疏肝活血方	1	6	0.52 \pm 0.17	0.76 \pm 0.21	0.81 \pm 0.25
	2	6	0.49 \pm 0.13 ²⁾	0.78 \pm 0.32	0.52 \pm 0.16 ¹⁾
	3	6	0.25 \pm 0.08 ²⁾	0.45 \pm 0.19 ²⁾	0.31 \pm 0.12 ¹⁾
	4	6	-	0.21 \pm 0.05 ²⁾	-

注:与模型组的同时段比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

在缺血、缺氧的状态下,肢体的血管系统将发生重塑以增加供血、改善缺氧^[3-4],血管新生是其中的一个重要的病理过程。当血管新生的过程不足以代偿肢体缺血的病理状态时,肢体缺血将进一步加重,甚至导致缺血性坏疽的发生。中医的“肝”是一个范围广泛的功能活动系统,肝主疏泄,是调畅全身气机,推动血液运行的关键环节,有学者通过“从肝治

心”立法,运用治肝为主的方药能明显促进缺血心肌新生血管的形成^[5],现代药理学亦证实多数疏肝药物和复方对心血管系统均有改善作用。本实验通过裸鼠肢体缺血模型的研究发现,疏肝活血方具有明显的“促血管生成”作用,而且能够明显上调 VEGF, HIF-1 α , HGF 的 mRNA 表达。

VEGF 是血管新生的主要调控因子。本研究发现,正常裸鼠肢体肌肉中未见明显的 VEGF 基因表达,模型组裸鼠肢体缺血后 1 周,缺血肌肉中 VEGF 的表达水平达到高峰,微血管数量于术后 2 周时达到峰值,2 周时模型组裸鼠中多条肢体发生严重坏疽,提示肢体缺血的刺激诱发了血管新生的病理反应,内源性 VEGF 的产生促进新生血管网络的形成;但由于内源性 VEGF 表达的绝对量不足,微血管的生成仍不足以代偿肢体缺血性坏疽的发生。应用疏肝活血方治疗后,VEGF 基因能长时间保持较强的表达,提示 VEGF 基因是本方的一个重要作用靶点,促进 VEGF 的基因表达或增强 VEGF 基因的“旁分泌效应”是本方的作用机制之一。

HIF-1 α 是缺血缺氧发生与 VEGF 基因表达增强之间的一种重要的核转录调节因子^[6]。当局部应用反义 HIF-1 α 寡核苷酸时,VEGF 的表达亦被阻断^[7],提示了组织缺血缺氧诱导 HIF-1 α 在缺血组织中过表达,是血管新生的始动因素之一。本研究发现,肢体缺血发生后 1 周,HIF-1 α 的核酸表达明显增强,但过表达持续时间较短,新生血管尚不足以代偿缺血缺氧的病理状况,肢体出现了一定程度的坏疽。给予疏肝活血方药后,明显增强了内源性 HIF-1 α 基因表达的表达强度,虽然给药后 3~4 周,该基因的表达亦逐渐减弱,但已经足够诱导一系列的级联反应,比如可能通过增强 VEGF 表达、调节血管内皮细胞凋亡等作用,使肢体的缺血状态得以明显改善。

HGF 也是近年来被深入研究的功能强大的血管生成因子。目前,携带 HGF 质粒 DNA 转移至缺血组织,促进局部新血管生成的研究已进入临床试验,并可能成为治疗周围动脉闭塞性疾病的一种新

手段。本研究中,肢体缺血的早期,缺血组织中 HGF 的基因表达上调,但内源性 HGF 基因短暂的峰值表达依然无法有效改善肢体缺血的状态。经用疏肝活血方药后,均明显增强了缺血组织中 HGF 基因表达的程度,提示疏肝理气方药的作用机制之一是调控局部组织 HGF 基因的表达。

本研究表明 HIF-1 α , HGF 作为血管新生的早期应答基因,介导了局部 VEGF 的表达,但缺血组织中微血管的生成数量有限,不足以代偿肢体缺血缺氧的状态,难免出现肢体的缺血性坏死。疏肝活血方能明显增加缺血肢体中的微血管数,改善肢体的缺血状态,其主要的的作用机制为促进 HIF-1 α , HGF, VEGF 的 mRNA 表达,这也可能是“气能生血、气能行血”中医理论的物质基础之一。

[参考文献]

- [1] Aronow W S. Office management of peripheral arterial disease[J]. *Am J Med*, 2010, 123(9):790.
- [2] 李大勇,谷峰,陈文娜,等. 肢体缺血后代偿性血管新生及相关基因表达的动态变化和意义研究[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009, 17(12):961.
- [3] Tritsarlis K, Myren M, Ditlev S B, et al. IL-20 is an arteriogenic cytokine that remodels collateral networks and improves functions of ischemic hind limbs[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104:15364.
- [4] Pascotto M, Leong-Poi H, Kaufmann B, et al. Assessment of ischemia-induced microvascular remodeling using contrast-enhanced ultrasound vascular anatomic mapping[J]. *J Am Soc Echocardiogr*, 2007, 20:1100.
- [5] 刘小雨,王行宽,杨孝芳. 从肝治心组方对急性心肌梗死大鼠心肌毛细血管密度的影响[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2004, 11(1):17.
- [6] Jiang M, Wang B, Wang C, et al. Angiogenesis by transplantation of HIF-1 alpha modified EPCs into ischemic limbs[J]. *J Cell Biochem*, 2008, 103:321.
- [7] 周健,黄岚,晋军,等. 低氧诱导因子 1 α 抑制大鼠缺血下肢血管生成及内皮祖细胞的动员[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2006, 8(7):474.

[责任编辑 聂淑琴]