

# 加味四物汤对自发性高血压大鼠心肌基因表达谱的影响

毛秉豫<sup>\*</sup>, 谢东霞

(南阳理工学院国医学院, 河南 南阳 473004)

[摘要] 目的: 观察加味四物汤对自发性高血压大鼠(SHR)的心肌组织基因表达谱的影响。方法: 提取实验组和对照组 SHR 心肌组织 RNA, 用 Cy-5, Cy-3 逆转录荧光标记制作 cDNA 探针与表达谱基因芯片杂交, Scan Array4000 扫描仪扫描杂交信号荧光强度, Ima GENE3.0 软件分析扫描结果, 筛选比率在 0.5 至 2.0 范围之外差异表达的基因。结果: 在阳性基因重叠的 18 条基因中, 高表达的有 4 条, 低表达的有 14 条。结论: 该方作用靶点较多, 可上调或下调 SHR 的某些与生物酶、心肌纤维化、脂肪酸代谢有关基因的表达, 这可能是该方产生药理作用的重要因素。

[关键词] 加味四物汤; 自发性高血压大鼠; 基因表达谱

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)04-0142-03

高血压是心脑血管疾病的重要危险因素。研究显示一些中药复方有一定降压作用, 并在高血压病的治疗中对心、脑、肾等脏器具保护作用。加味四物汤由川芎、当归、熟地黄、白芍、钩藤、夏枯草等多味药组成, 具有养血滋阴、平肝潜阳、活血通络的功能、可用于高血压病及靶器官损伤的治疗, 该方药物中多种成分能调节血管舒缩功能、纠正血液流变性异常、改善心脏、血管的重构<sup>[1-2]</sup>。自发性高血压大鼠(SHR)与人类的原发性高血压非常相似, 是目前国际公认研究原发性高血压的最佳模型之一。本研究利用基因芯片具快速、高通量基因筛选和可平行对比特点, 观察该方对 SHR 心肌组织基因表达谱的影响, 为探讨其作用的机理提供依据。

## 1 材料与方

**1.1 实验动物分组及用药** SPF 级 SHR 大鼠 20 只, 雌雄各半, 上海史莱克实验动物中心提供, 合格证号 SCXK(沪)2003-0003, 14 周龄, 体重(211 ± 39)g 按随机数字表分别分为实验组、对照组各 10 只, 实验组给加味四物汤, 按 31.5 g · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup> ig 给药; 模型组 10 只 ig 等量蒸馏水。

## 1.2 方法

**1.2.1 样品制备** 将 ig 加味四物汤 8 周以及同期饲养的 SHR 各 10 只, 称体重后处死, 速取心脏, 生理盐水冲洗。在心尖部剪取约 100 mg 心肌组织冻

存管中并置液氮中保存。冰上组织剪取, 所用物品均 0.1% DEPC 溶液处理, 高温消毒。各组的心尖组织等量混合分作样品。实验组取 4 个、对照组取 2 个样品分别作总 RNA 提取。

**1.2.2 总 RNA 提取** 按相关方法执行<sup>[3]</sup>, 将超低温保存样品称重后, 移至液氮预冷的碾钵, 研为粉末。移至有 TRIzol 试剂的匀浆管内, 冰浴匀浆至离心管中, 4 °C, 12 000 g 离心 10 min。吸上清液 15 ~ 30 μL 放置 5 min, 离心后加三氯甲烷震荡, 放置 3 min, 4 °C, 12 000 g 离心 15 min。吸上清至另一离心管, 加异丙醇, 充分混匀, 放置 10 min 离心 10 min。弃上清, 加 75% 乙醇 5 mL, 涡旋器中短暂涡旋, 4 °C, 8 000 g 离心 10 min。吸去上清, 干燥沉淀 5 min, 加 Milli-Q 水完全溶解 RNA 沉淀后, -80 °C 保存。

**1.2.3 探针标记与杂交** 参照 Piotr Chomczynski 方法<sup>[4]</sup>, 杂交试剂 1 加 Eppendorf 管中, 振荡混匀后加杂交试剂 2 混匀。将配制好的预杂交液放入 95 °C 水浴锅内变性 2 min, 待预杂交的玻片亦入 95 °C 水浴锅内变性 30 sec, 玻片在无水乙醇中 30 sec 后晾干。变性预杂交液加到玻片的点样区域, 放入杂交箱内 42 °C 预杂交 5 ~ 6 h。标记探针: Cy5-dCTP 标记实验组, Cy3-dCTP 标记对照组。在 Eppendorf 管内依次加 ddH<sub>2</sub>O, 23 μL; 逆转录引物, 5 μL; 总 RNA, 50 ~ 100 μg, 振荡混匀, 置于 70 °C 水浴 10 min, 取出速置冰上, 分别加逆转录酶缓冲液, 10 μL; DTT, 5 μL; dNTPs, 4 μL。暗室中加逆转录酶, 2 μL; Cy5-dCTP 或 Cy3-dCTP, 3 μL, 42 °C 水浴 2 h。依次加入标记试剂 I 4 μL, 65 °C 水浴 10 min 后加入标记试剂 II 4 μL。

[收稿日期] 2009-10-15

[通讯作者] \* 毛秉豫, Tel: (0377) 62071305; E-mail: maobingyu2005@126.com

混匀,避光,真空抽干至 50  $\mu\text{L}$ ,纯化柱纯化,并以 3 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 2 min,样品收集在 Eppendorf 管中,加标记试剂 III 8  $\mu\text{L}$ 。杂交:在探针管中加 6.5  $\mu\text{L}$  杂交试剂 I,混匀使探针溶解,再加 6.5  $\mu\text{L}$  杂交试剂 II,混匀备用。将预杂交玻片取出,探针置于 95  $^{\circ}\text{C}$  水浴中变性 2 min;玻片亦置 95  $^{\circ}\text{C}$  水浴中变性 30 sec,取出浸无水乙醇 30 sec 再速置冰上。将探针置于芯片并以玻片覆盖置于杂交舱中,Parafilm 密封,42  $^{\circ}\text{C}$  杂交箱内杂交 16 ~18 h。洗片:用 0.5% 的洗涤液 1 冲洗玻片,再依次浸入 2 个装有洗片剂的染色缸中洗涤 10 min,晾干后扫描。

**1.3 检测与分析** 仪器:ScanArray4000 扫描仪,美国 General Scanning 公司生产。芯片:大鼠 40S 基因表达谱芯片为上海博星基因芯片有限公司产品;芯片由扫描仪进行两个波长的激光扫描,用 ImaGene3.0 软件分析 cy3, cy5 两种荧光信号强度和比值。将所有数据项的 cy3 标记强度乘上 Normalize 系数,得出调整后的 cy3。算出所有基因调整后的比值(cy5/cy3)。筛选出比值 >2 或 <0.5 的数据。比值在 0.5 至 2.0 之间基本属非差异表达;比值在 0.5 到 2.0 范围之外为差异表达,比值 >2 表明此基因在实验中呈高表达,比值 <0.5 表明此基因在实验中呈低表达。

## 2 结果

**2.1 总 RNA 提取** 在分别提取实验组、对照组心肌组织的总 RNA 后,电泳结果显示 18S 和 28S 两个条带的亮度均清晰,28S 约为 18S 的 2 倍,吸光值  $A_{260}/A_{280} > 2.0$ ,表明总 RNA 的提取成功,纯度高。

**2.2 基因芯片的质量** 基因芯片的质量标准应是 22 个管家基因必须阳性,16 个植物基因必须阴性,本结果完全符合上述条件,说明实验无污染而且检测系统正常。

**2.3 基因差异表达** 检测显示实验组及对照组心肌组织差异表达的基因较多,比值 <0.5 或 >2.0 的基因有 82 个,其中低表达的基因有 57 个,高表达的基因 25 个。两组阳性基因重叠的 18 条基因中,实验组较对照组高表达的基因有 4 条,低表达的有 14 条;已知基因 6 条,未知基因 12 条。表 1 列出其中部分差异表达较显著的基因。

## 3 讨论

目前中医药在基因领域的研究多从单个基因、

表 1 加味四物汤对 SHR 心肌组织差异表达的部分基因

基因号	基因名	比值
Rn. 1312	UI-R-CO-if-e-10-0-UI. s1 Rattus norvegicus cDNA, 3 end	0.372
Rn. 11142	Rattus norvegicus Glycine methyltransferase (Gnmt)	0.353
Rn. 15318	UI-A1-dy-c-03-0-UI. r1 Rattus norvegicus cDNA, 5 end	0.446
Rn. 68505	UI-R-BJI-auh-c-11-0-UI. s1 Rattus norvegicus cDNA, 3 end	0.488
Rn. 40921	Rattus norvegicus LTBP-2 like protein (LTBP2)	0.451
Rn. 54567	Rat beta-galactoside-alpha 2, 6-sialyltransferase	0.485
Rn. 12453	UI-R-BO0-ahe-10-0-UI. r1 Rattus norvegicus cDNA, 5 end	0.469
Rn. 29057	EST293261 Rattus norvegicus cDNA, 5 end	0.430
Rn. 8797	UI-CT0-buf-c-07-0-UI. s1 Rattus norvegicus cDNA, 3 end	0.473
Rn. 3091	Rattus norvegicus Extracellular matrixprotein2 (Ecm2)	0.484
Rn. 4603	Rattus norvegicus Calcineurin (CaN)	0.412
Rn. 3790	Rattus norvegicus CD36 antigen (Cd36)	2.251
Rn. 32566	Rattus norvegicus heart fatty acid binding protein (Fabp3)	2.002
Rn. 17606	UI-R-CA1-bjf-e-12-0-UI. s1 Rattus norvegicus cDNA, 3 end	2.119

蛋白质入手,孤立的分析其发病或药物作用机理,而中药复方是以多组分,多靶点发挥效应,其对基因的调控可能是通过群体基因表达实现。基因芯片具有大批量、同时筛选和整体信息处理的性质,本研究利用此特点对给与加味四物汤的自发性高血压大鼠 (SHR) 进行基因表达谱变化的观察,了解该方应用后的一些基因反应模式。结果显示该方可使 SHR 心肌组织的较多基因产生差异性表达,提示方中的药物作用靶点较多,是通过整体调节基因的高/低表达发挥药物的作用。在上调或下调的一些已知基因中,其功能与调节细胞的生长和分化、组织纤维化、脂肪酸代谢有关,多属生物酶、纤维化、脂肪酸代谢相关基因,或是药物作用靶点抑或是药物信号传导通路上的某个环节,这可能是该方调节血压、对抗血管平滑肌增殖、减缓心肌肥大和纤维化作用的基础。举以下几个基因为例讨论:(1)组织内转化生长因子结合蛋白 2(LTBP2)是转化生长因子(TGF 1)复合物中的一成分。TGF 1 刺激心肌成纤维细胞合

成、分泌胶原蛋白、纤维连接素等,使心肌胶原增生沉积。LTBP2 在导向潜性 TGF 复合物结合到靶细胞表面中起重要作用,有研究证明在含有 LTBP2 的 TGF 复合物中, TGF 1 易被激化<sup>[5]</sup>。加味四物汤致 LTBP2 基因表达下调可能减轻心肌肥厚或心肌纤维化。(2) 细胞外基质蛋白 2(Ecm2), 位于细胞外周, 主要由胶原蛋白、糖蛋白及蛋白多糖三大类组成。在纤维化进程中, 器官内的浸润细胞和固有细胞在炎症和损伤因素的刺激下分泌各种体液分子, 刺激组织内其它细胞产生过量的细胞外基质, 如 I、II 型胶原, 纤维连接蛋白和蛋白多糖等。细胞外基质在器官内的过度堆积导致纤维化, 基质的过度表达会使正常心肌组织的结构和功能永久性丧失。加味四物汤使其表达下调, 或有产生改善或抑制心肌重构、血管重构的作用。(3) 钙调神经磷酸酶(CaN) 属丝氨酸-苏氨酸蛋白磷酸家族(又称蛋白磷酸 2B, PP2B), 是一种广泛分布脑、心肌、骨骼肌、血管平滑肌、T 淋巴细胞等组织细胞内, 参与细胞调节的信号酶。Ca<sup>2+</sup>-钙调素-CaN 依赖的信号通路在各种肥大刺激因素介导的心肌肥大中起中心枢纽作用, 研究显示高血压大鼠模型的肥大心肌细胞中 CaN 活性及 mRNA 表达均增高<sup>[6-7]</sup>。血管平滑肌细胞(VSMC) 增殖也与 CaN 信号通路有关, 一些刺激物(如 Ang II、PDGF-BB 等) 可通过 PLC 受体诱导 NF-AT 传递胞外信号而引起 VSMC 核内相关基因转录, 刺激 VSMC 增殖, 但这一过程可被 CaN 特异性抑制剂阻断。CaN 是通过其去磷酸化作用调节 Ca<sup>2+</sup> 通道的关闭, 影响胞内 Ca<sup>2+</sup> 浓度而产生以上作用的。本实验中 CaN 表达下调提示加味四物汤可能对抗负荷性心肌肥大和血管平滑肌细胞增殖。(4) CD36 抗原(Cd36) 则间接与胰岛素抵抗、脂肪酸代谢缺陷和增高血压有关, 研究认为 Cd36 缺失是脂肪酸代谢、糖耐受和胰岛素抵抗异常的因素<sup>[8]</sup>。加

味四物汤使 SHR 心脏 CD36 表达增强, 可能对减缓高血压合并胰岛素抵抗、II 型糖尿病和高脂血症产生影响。本研究中其他一些基因亦有相似或相近作用。但中药复方对基因表达的调控是多部位多层次多方向性, 本研究里还有许多基因表达上调或下调的意义并不清楚, 内中的生物学功能与病理机制之间的联系需待深入阐明。本研究仅从基因表达谱角度探讨了该方的部分作用机理, 希望对其他中药复方治疗高血压病及改善靶器官损伤研究提供参考。

#### [参考文献]

- [1] 毛秉豫, 李宜明. 加味四物汤对高血压血管平滑肌细胞增殖及血管重构作用研究[J]. 中华实用中西医结合杂志, 2003, 3(16): 1528.
- [2] 李琳, 黄力. 中医药治疗原发性高血压病的现代研究进展[J]. 高血压杂志, 2006, 14(6): 429.
- [3] Quesnoy RJ. Chinal significance of humoral allo-sensitization on of HLA antigens[J]. New York: Springer Verlag, 2006, 27: 57.
- [4] Chomczynsk P, Sachi N. Single-step method of Rna isolation by acid guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform extraction[J]. . Anal Biochem 2005; 162: 156.
- [5] Bobik A. Transforming growth factor-betas and vascular disorders[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2006, 26(8): 1712.
- [6] 吕莉, 邱丽颖, 焦洪, 等. 高血压大鼠血管平滑肌钙调神经磷酸酶活性变化[J]. 高血压杂志. 2005, 13(1): 62.
- [7] Takeda Y, Yoneda T, Demura M, et al. Calcineurin inhibition attenuates mineralocorticoid-induced cardiac hypertrophy[J]. Circulation, 2004, 105(6): 677.
- [8] Yamashita S, Hirano KI, Kuwasako T, et al. Physiological and pathological roles of a multi-ligand receptor CD36 in atherogenesis; insights from CD36-deficient patients[J]. Mol Cell Biochem. 2006, (5) 3.