

• 药理 •

# 芪丹复方对一氧化氮合成阻滞孕鼠胎盘内皮型 一氧化氮合酶信使核糖核酸表达的影响

林 洁<sup>\*</sup>, 王若光, 李春梅, 尤昭玲  
(湖南中医学院第一临床学院, 湖南 长沙 410007)

**[摘要]** 目的: 研究黄芪丹参复方提高胎盘血供分子机制, 为临床防治胎盘血供不足所致妊娠并发症提供思路。方法: 提取中药黄芪、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) 制作一氧化氮合成阻滞大鼠模型, 黄芪丹参复方成分在妊娠期干预。核酸原位杂交技术检测妊娠 18 日胎盘滋养细胞内皮型一氧化氮合酶信使核糖核酸(eNOS mRNA) 表达变化。结果: 黄芪丹参复方成分治疗组、硝酸甘油对照组、空白组 eNOS mRNA 表达明显高于模型组, 比较差异有显著意义( $P < 0.01$ )。结论: 黄芪丹参复方成分可能提高胎盘滋养细胞一氧化氮(NO) 合成与释放入循环, 从而维持妊娠期胎盘循环的高流速、低阻力状态, 达到有效防治妊娠期高血压疾病及胎儿生长受限等胎盘血供不足类疾病的目的。

**[关键词]** 妊娠; 高血压; 合并症; 一氧化氮; 胎盘; 滋养细胞; 黄芪; 丹参

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2006)12-0032-03

妊娠期高血压疾病和胎儿生长受限是导致孕产妇和婴儿病率及死亡率升高的主要原因, 严重影响人口质量。确切病因均尚未明确。我们在前期研究基础上<sup>[1~4]</sup>, 进一步通过一氧化氮(NO) 合成阻滞模型, 从胎盘滋养细胞内皮型一氧化氮合酶(eNOS) mRNA 表达角度, 探讨中药黄芪丹参复方有效成分对妊娠状态下胎盘循环张力维持的作用及影响机制。

## 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 75 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 d, 体重 200~250 g。雌鼠按妊娠顺序随机分为模型组、正常对照组、乙醇溶媒组、硝酸甘油组、黄芪丹参组, 每组 10 只进行实验。

**1.2 药物** 以益气化痰立法黄芪丹参复方组分(黄

芪提取黄芪甲苷、黄酮两类; 丹参提取丹参脂溶部分丹参酮, 水溶部分丹参素等, 按照原药材提取所得, 各部分配比 4:1:2:2, 其中黄芪甲苷作为质控标准, 含量 0.32 mg/mL, 25% 乙醇作溶媒, 离心清液 0.25 μm 微孔滤膜过滤, 由湖南中医学院药学院制成注射液, 每毫升相当于生药量 3 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(产品编号: MK1058; 保存: 4℃; 工作量: 100 张切片; 有效期: 1 年。适用种属: 人和大鼠、小鼠等动物。大鼠、小鼠和人的靶基因序列相同)。

**1.4 仪器** XDS-1B 双目倒置显微镜, 徕卡公司; BTS-20-M 数彩显色图像分析系统, 英国; YO-202 型冰冻切片刀及一次性切片刀(浙江金华益迪医疗设备厂); 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, 美国奥立成(orion)公司等。

## 2 方法

**2.1 动物造模** 模型组雌大鼠于妊娠第 10 d 起皮下注射 L-NAME, 每天 125 mg/kg 体重; 正常对照组 10 只, 于妊娠第 10 d 开始皮下注射双蒸水, 量同模

**[收稿日期]** 2006-01-19

**[基金项目]** 国家自然科学基金(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(01B014)。

**[通讯作者]** \* 林洁, Tel.: (0731) 5600443, E-mail: linjie8919@126.com

型组, 分别至妊娠第 18 d。黄芪丹参组、硝酸甘油组同法造模; 黄芪丹参组同期腹腔注射黄芪丹参复方注射液 3.15 g 生药/kg 体重。硝酸甘油组同期腹腔注射硝酸甘油 1 350 μg/kg 体重, 乙醇溶媒组同法腹腔注射治疗组用 25% 乙醇溶媒, 正常对照、模型组腹腔均同法注射双蒸水。妊娠第 18 d, 25% 乌拉坦麻醉下, 剖腹取胎及胎盘。

**2.2 eNOS mRNA 检测** 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。eNOS 的寡核苷酸探针, 经地高辛标记。新鲜胎盘标本修整 0.2~ 0.5 cm<sup>2</sup> 放入 4% 多聚甲醛中固定 10 min, 取出, 30% 蔗糖液脱水至沉, 取出, OCT( 甲基纤维素) 包裹, 异戊烷液氮法速冻。YO-202 型冰冻切片及一次性切片刀( 浙江金华益迪医疗设备厂) 分别 5 μm 20 μm 切片; 载玻片清洗、硅化、多聚赖氨酸包被; 切片纯丙酮固定 15 min, 0.5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ 甲醇溶液浸泡 30 min, 灭活内源性过氧化物酶。切片上滴加 3% 柠檬酸新鲜稀释的胃蛋白酶, 37 °C 消化 30~ 120 s, 暴露 mRNA 片段。0.5 mol/L PBS 洗 3 次 × 5 min。蒸馏水洗 1 次。预杂交, 湿盒准备, 干的杂交盒底部加 20% 甘油 20 mL 以保持湿度。按每张切片 20 μL 加预杂交液。恒温箱 37~ 40 °C 2~ 4 h。吸取多余液体, 不洗。杂交, 按每张片 20 μL 杂交液, 加在切片上。将 ISH 专用盖玻片的保护膜揭开后, 盖在切片上。恒温箱 40~ 42 °C 杂交过夜。杂交后洗涤, 揭掉盖玻片, 30~ 37 °C 左右水温的 2 × SSC 洗涤 5 min × 2 次; 0.5 × SSC 洗涤 15 min × 1 次; 0.2 × SSC 洗涤 15 min × 1 次。滴加封闭液, 37 °C 30 min。甩去多余液体, 不洗。滴加生物素化地高辛, 37 °C 60 min 或 20 °C 左右 120 min。0.5 mol/L PBS 洗 5 min × 4 次。滴加 SABC, 37 °C 20 min 或 20 °C 左右 30 min。0.5 mol/L PBS 洗 5 min × 3 次。勿用其它缓冲液和蒸馏水洗涤。滴加生物素化过氧化物酶, 37 °C 20 min。0.5 mol/L PBS 洗 5 min × 4 次。DAB 显色 20~ 30 min。蒸馏水充分洗涤。酒精脱水, 二甲苯透明, 封片。结果观察, eNOS mRNA 的细胞胞浆着色呈棕黄色。统计方法: 数据输入 SPSS10.0 方差分析统计。

eNOS 寡核苷酸探针序列:

(1) 5'-AGGGC CCATC CTGCT GCGCC TGGCC GCTGA-3'

(2) 5'-GGACA GGAAA TAGTT AGCCA TCTCC TGATG-3'

(3) 5'-CTCTG GGTGC GTATG CGGCT TGTCA CCTCC-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, 积分累计进行统计分析。

### 3 结果

#### 3.1 各组孕鼠胎仔数量及发育情况( 表 1)

表 1 各组孕鼠胚胎情况比较

分组	孕鼠数目	总仔数	活仔数	胚胎吸收与死亡数	活仔率 (%)	胚胎死亡率 (%)
正常对照组	9	99	97	2 <sup>1)</sup>	98	2 <sup>1)</sup>
乙醇溶媒组	10	119	113	6 <sup>1)</sup>	95	5 <sup>1)</sup>
模型组	8	115	87	28	75.7	24.3
硝酸甘油组	8	109	85	24	78	22
黄芪丹参组	10	115	112	3 <sup>1)</sup>	97.4	2.6 <sup>1)</sup>

注: 与模型组比较<sup>1)</sup> P < 0.01。(下同)

#### 3.2 核酸原位杂交 eNOS mRNA 表达 结果见表 2, 图 1~ 5。

表 2 胎盘滋养细胞 eNOS mRNA 表达强度

分组	给药剂量	滋养细胞 eNOS mRNA 表达强度
正常对照组	同体积 ddH <sub>2</sub> O	61.27 ± 14.75 <sup>1)</sup>
乙醇溶媒组	同体积溶媒	13.87 ± 3.80
模型组	同体积 ddH <sub>2</sub> O	5.40 ± 2.09
硝酸甘油组	1.35 mg/kg	26.43 ± 3.09 <sup>1)</sup>
黄芪丹参组	3.15 g 生药/kg	64.57 ± 13.90 <sup>1)</sup>

注: 各组均为妊娠 10~ 18 d 给药。

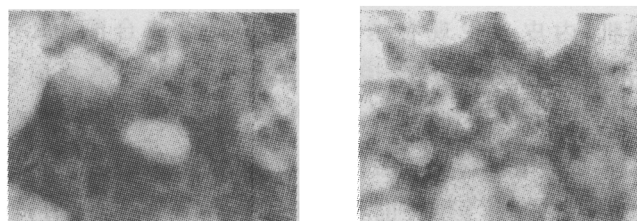


图 1 正常对照组

图 2 模型组

胎盘部位内皮型一氧化氮合酶信使核糖核酸(eNOS mRNA)来自血管内皮及胎盘滋养细胞, 表达丰富。对于保证妊娠母胎循环张力具有重要作用。

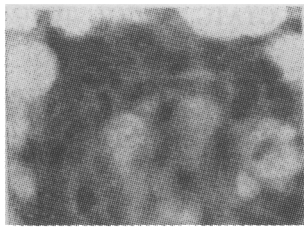


图 3 硝酸甘油组

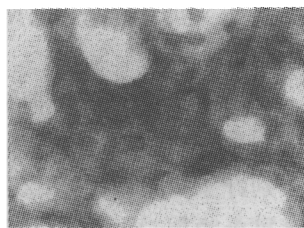


图 4 乙醇溶媒组

模型组 eNOS mRNA 表达明显低于空白组,可能是 L-精氨酸甲酯阻滞 NO 合成,导致 NOS 活力下降, eNOS mRNA 表达降低,最终表现为 NO 合成与释放

入循环的量不足,子宫-胎盘-胎儿血供减少,胎盘源血管内皮细胞毒性因子增加,产生妊娠高血压、蛋白尿等一系列症状。

#### 4 讨论

生理状态下,胎儿-胎盘循环具有血流量大、低血流阻力、缺少自主神经支配的特点,主要靠血管活性物质来维持其低张状态。子宫、胎盘、脐血管是产生 NO 的主要部位,NO 对保持子宫-胎盘-胎儿足够的血供有着重要作用<sup>[5,6]</sup>。在体内,L-精氨酸(L-Arg)在 NOS 的作用下,代谢成瓜氨酸时产生 NO,NOS 是 NO 生成的唯一限速酶;L-Arg 作为 NO 生成的底物,主要来源于血液,通过特异转运载体[Y<sup>+</sup>]跨膜进入细胞内,L-Arg 的载体转运是 NO 产生的限速步骤之一。已经证实,胎盘合体滋养细胞及干绒毛血管平滑肌细胞及内皮细胞有 eNOS mRNA 的表达,且染色强度高于胎儿血管平滑肌细胞及内皮细胞,是妊娠基础状态下内皮源性 NO 合成的主要来源;妊娠蜕膜组织也有 eNOS 活性。合体细胞滋养层及血管平滑肌、内皮也发现有诱导型一氧化氮合酶 mRNA (iNOS mRNA) 的表达,说明其参与对母体免疫损害或病原体入侵的监视活动<sup>[7,8]</sup>。但有人发现,滋养层细胞所产生的释放入绒毛间隙的 NO 对胎儿-胎盘血管张力不产生影响,也不影响该部位血管渗透压。因此,滋养层细胞所产生的 NO 是具有重塑子宫螺旋动脉的作用,还是具有类似某些自分泌或旁分泌

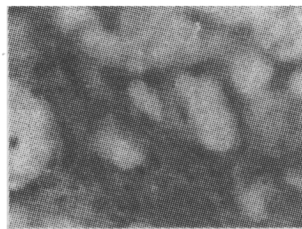


图 5 黄芪丹参组

因子调节滋养层细胞生长和功能的作用,尚有待研究。不少临床或基础研究报告表明,活血化瘀中药对循环 NO 水平,血管内皮细胞 NOS 表达等具有很好的调节作用。本研究结果表明:治疗组与模型组比较差异有显著性( $P < 0.01$ ),与空白组比较无差异。说明黄芪丹参复方成分制成的注射液能够刺激胎盘源 NO 的合成与释放,从而有利于维持胎盘供血的高流速、低阻力状态。对照药物组与模型组比较虽有差异,但对照药物组表达水平不高,刺激 NO 的合成与释放可能是硝酸甘油舒张血管的机制之一。制剂溶媒组与模型组比较差异无意义,但二者均明显低于治疗组,说明乙醇溶媒对 L-NAME 所致的 NO 合成阻滞作用不明显。中药黄芪丹参复方成分可能对 L-NAME 所致的 NO 合成阻滞具有对抗作用,并可能是通过刺激 eNOS mRNA 表达实现的。

#### [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[J].中国中西医结合杂志,2002,22(7):545-546.
- [2] 王若光,尤昭玲,刘小丽,等.黄芪丹参复方成分对一氧化氮合成阻滞孕鼠胎盘微血管内皮细胞及滋养细胞血管内皮生长因子 mRNA 表达影响研究[J].中国中西医结合杂志,2005,25(6):517-520.
- [3] 王若光,尤昭玲,刘小丽,等.黄芪丹参复方成分对一氧化氮合成阻滞孕鼠胎盘滋养细胞单核细胞趋化蛋白 mRNA 表达影响研究[J].中草药,2005,36.
- [4] 王若光,尤昭玲,陈学东,等.黄芪丹参复方成分对一氧化氮合成阻滞孕鼠胎盘细胞凋亡调控基因(bcl-2/Bax)蛋白影响研究[J].中国实验方剂学杂志,2005,11(4):44-46.
- [5] 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[J].国外医学,1998,25(6):326.
- [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长长发育的调控[J].中华妇产科杂志,1999,34(1):50.
- [7] 庞战军,邢福祺.先兆子痫患者胎盘组织中细胞因子相关基因的表达[J].中华妇产科杂志,2003,38(1):29.
- [8] 郭玉娜,张为远.正常妊娠及妊高征孕胎盘组织中细胞凋亡及增殖基因表达的研究[J].中华妇产科杂志,2001,10(4):267.