

# 通心络改善缺血心肌供血的NO机制研究

赵明奇<sup>1</sup>, 刘艳<sup>2</sup>, 赵丹洋<sup>1</sup>, 吴伟康<sup>1</sup>

(1 中山大学中山医学院中西医结合研究所, 广东 广州 510080; 2 兰州医学院, 甘肃 兰州 730000)

**摘要:**目的: 从NO(一氧化氮)-eNOS(内皮源性一氧化氮合酶)-eNOSmRNA三个层次探讨通心络扩张冠脉, 增加缺血心肌供血的分子机制。方法: 用垂体后叶素(Pituitrin, Pit)复制小鼠心肌缺血模型(Pit模型), 用酶法测定小鼠心肌、血浆中NO浓度; 用免疫组化测定小鼠心肌eNOS活性; 用RT-PCR法测定小鼠心肌eNOS的基因表达情况。结果: 通心络三个剂量组均可显著升高心肌缺血小鼠血浆和心肌组织的NO含量( $P < 0.001$ ), 明显升高心肌细胞内eNOS的活性( $P < 0.05$ ), 提高缺血心肌eNOS的基因表达( $P < 0.05$ )。结论: 通心络可能是通过提高eNOS基因的表达, 增强eNOS的活性, 从而升高NO水平, 达到改善缺血心肌供血的作用。

**关键词:** 通心络; 心肌缺血; 一氧化氮; 内皮源性一氧化氮合酶

**中图分类号:** R285.5    **文献标识码:** B    **文章编号:** 1005-9903(2003)06-0043-03

通心络是根据中医络病理理论研制而成的复方制剂, 具有益气、活血、通络、止痛之功效, 可以增加冠脉流量, 扩张血管, 改善心肌缺血。而通心络对内皮源性一氧化氮合酶影响作用的研究未见报道。本文通过应用垂体后叶素复制小鼠心肌缺血的模型从NO-eNOS-eNOS mRNA三个层次探讨通心络扩张冠脉, 增加缺血心肌供血的分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 动物** 普通级昆明种小鼠, 体重 $22 \pm 2$ g, 雄性, 由中山大学中山医学院实验动物中心提供。

**1.1.2 主要试剂、仪器** 一氧化氮检测试剂盒购于深圳晶美生物工程有限公司; SABC免疫组化染色试剂盒购于武汉博士德生物工程有限公司; RNA提取试剂盒及RT-PCR试剂盒及核酸分子量参照物(Marker)购于上海生物工程研究所; 琼脂糖购于上海

Yito企业有限公司。PCR扩增仪为美国PERKIN ELMER公司产品; 计算机凝胶成像仪为PROGENE公司产品; Kontron图象分析仪为德国IBAS公司产品。

**1.1.3 药物** 通心络胶囊干粉(1.43g生药/g干粉)由人参(*Panax ginseng*)、全蝎(*Buthus martensi* Kar-sch)、水蛭(*Whitmania pigra* Whitman)、土鳖虫(*Eupolyphaga sinensis* Walk)、蜈蚣(*Scolopendra subspinipes mutilans*)、蝉蜕(*Cryptotympana pustulata* Fabr.)、赤芍(*Paeonia lactiflora* Pall)等组成的中药复方制剂, 由河北省石家庄以岭药业有限公司提供。用双蒸水分别配制成30mg/ml, 15mg/ml, 7.5mg/ml的浓度灌胃。垂体后叶注射液(Pit)为上海第一生化药业公司上海生物化学制药厂生产(批号020319)。

## 2 检测指标及方法

**2.1 实验分组** 昆明种小鼠, 随机分为五组: 正常对照组、单纯心肌缺血组(模型组)、心肌缺血+通心络(低剂量组、中剂量组、高剂量组)。通心络剂量按

50kg 成人常规剂量(0.76g × 3/天)折算后作为中剂量组(0.424g 生药/kg 体重),高剂量组为中剂量组放大一倍(0.848g 生药/kg 体重),低剂量组为中剂量组缩小一倍(0.212g 生药/kg 体重)。各剂量组每天灌胃1次,正常对照组及单纯心肌缺血组每日给予相同体积蒸馏水,连续5d。模型及各用药组小鼠在第5d灌胃30min后腹腔注射Pit(剂量30u/kg 体重),正常对照组第5d腹腔注射等体积生理盐水,30min后五组动物处死取血浆及心肌组织检测以下指标:用酶法检测心肌组织及血浆NO含量<sup>[1]</sup>,使用免疫组化的方法检测心肌组织eNOS活性,使用RT-PCR方法检测心肌组织eNOS基因表达情况。

**2.2 免疫组织化学染色** 实验终止时,取心肌放入4%多聚甲醛中固定,常规脱水,石蜡包埋,切片,然后按SABC免疫组化试剂盒进行操作,最后封片于光镜下观察,并随机选取5个视野进行灰度测定。

**2.3 eNOS 基因表达检测** 实验终止时,每组随机取6只动物,迅速取出心脏置入液氮中速冻,然后剪取约100mg心肌组织,用RNA提取试剂盒提取心肌总RNA<sup>[2]</sup>,在波长260与280测样品光吸收度,两者比值在1.7~2.0之间为RNA的样品纯度符合要求。随后按RT-PCR试剂盒进行扩增。引物是根据美国引物设计软件,利用鼠GENEBANK设计,由上海生物工程研究所合成。eNOS引物序列为:P1:5'-AAG

AGT CCA GCG AAC AGC AG-3', P2: 5'-AAG GCA CAG CAC ACG GTG AA-3', 扩增片段为674bp。β-actin引物序列为:P1: 5'-AAG GTC TCA CAC ATG ATC TG-3', P2: 5'-GCT TCT TFG CAG CTC CTT-3', 扩增片段为410bp。反应完毕,PCR产物用1.9%的琼脂糖凝胶进行电泳,电泳缓冲液为1 × TBE,溴化乙锭用量50ug/100ml电泳缓冲液。样品10ul,上样缓冲液2ul,电泳电压5V/cm,电泳时间约1h,电泳完毕,在紫外灯下观察,测定各组目的带平均灰度值,计算各扩增产物灰度积分值(产物的面积 × 产物的平均灰度),结果以目的产物的灰度积分值/β-actin灰度积分值的比值表示。

**3 统计方法**

计量资料以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。多组计量资料均数差别的比较运用单因素方差分析LSD法进行双侧检验,显著性水平P值界限定为0.05。各统计资料均用SPSS8.0统计软件处理。

**4 实验结果**

**4.1 通心络对心肌缺血小鼠血浆、心肌组织NO水平的影响** 与正常组相比,心肌缺血模型组血浆、心肌组织NO水平显著下降( $P < 0.001$ ),通心络低、中、高三个剂量组均可以显著提高血浆及心肌组织中NO水平( $P < 0.001$ )。

表1 各组小鼠血浆、心肌组织NO水平( $\bar{x} \pm s$ ; n = 10)

分组	剂量 (g 生药/kg)	血 浆		心 肌 组 织	
		NO(μmol/L)	显著性检验	NO(μmol/L)	显著性检验
正常组	—	48.0000 ± 5.8914		58.4286 ± 16.7474	
模型组	—	32.7619 ± 6.7074 <sup>#</sup>		45.7143 ± 13.5023 <sup>#</sup>	
低剂量组	0.212	48.7619 ± 5.1150 <sup>**</sup>	F = 65.838 P < 0.001	62.4286 ± 9.7602 <sup>*</sup>	F = 17.656 P < 0.001
中剂量组	0.424	60.6667 ± 5.3509 <sup>**</sup>		71.1429 ± 9.8469 <sup>**</sup>	
高剂量组	0.848	78.4762 ± 9.2359 <sup>**</sup>		95.8571 ± 18.2754 <sup>**</sup>	

注:与正常组相比<sup>#</sup> P < 0.05, <sup>##</sup> P < 0.01; 与模型组相比<sup>\*</sup> P < 0.05, <sup>\*\*</sup> P < 0.01

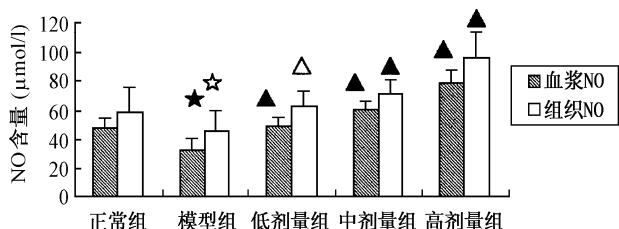


图1 通心络对心肌缺血小鼠血浆、心肌组织NO含量的影响  
注:与正常组相比<sup>\*</sup> P < 0.001, <sup>\*</sup> P < 0.05; 与模型组相比<sup>▲</sup> P < 0.001, <sup>△</sup> P < 0.05

**4.2 通心络对小鼠心肌组织eNOS影响的免疫组化染色结果** 表2结果显示,模型组小鼠在腹腔注射

Pit 30min后,心肌细胞中eNOS的阳性单位有所下降,通心络随着剂量的升高,可明显升高心肌细胞中eNOS的阳性单位。说明通心络可以升高心肌细胞中的eNOS的活性。

**4.3 通心络对小鼠心肌组织eNOS基因表达的改变**

模型组小鼠在腹腔注射Pit 30min后,心肌细胞中eNOS的mRNA转录明显下降( $P < 0.05$ ),通心络各组均可明显升高心肌细胞中eNOS mRNA的转录( $P < 0.05$ )。说明通心络可以增强eNOS的mRNA转录。

表2 各组小鼠心肌组织 eNOS 免疫组化染色结果灰度分析( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

分组	药物剂量 (g 生药/kg)	阳性单位	显著性检验
正常组	—	5.0531 ± 5.5619	F = 3.467 P < 0.05
模型组	—	4.3230 ± 5.2601	
低剂量组	0.212	6.0996 ± 1.9002	
中剂量组	0.424	8.0875 ± 2.0362*	
高剂量组	0.848	9.7013 ± 2.1120*	

注:与模型组比较\* P < 0.05

## 5 讨论

过量的垂体后叶素可引起冠脉强烈痉挛,从而引起急性心肌缺血,多年来,垂体后叶素被广泛应用于急性心肌缺血模型的研究<sup>[3]</sup>。良好的血液循环是心肌组织细胞获得充足的氧和营养物质供应并排出代谢产物的基本保证,各种原因造成的心肌组织血液灌流量减少,可使心肌细胞发生缺血性损伤。但是其改善心肌缺血的分子机制尚不清楚,本实验从一氧化氮(NO)-一氧化氮合酶(NOS)-NOS mRNA三个层次探讨通心络扩张冠脉,增加缺血心肌供血的分子机制。

表3 各组小鼠心肌 eNOS mRNA RT-PCR 产物灰度分析( $\bar{x} \pm s; n=6$ )

分组	药物剂量 (g 生药/kg)	eNOS/ $\beta$ -actin	显著性检验
正常组	—	5.8907 ± 1.2917	F = 3.263 P < 0.05
模型组	—	3.4320 ± 1.8526#	
低剂量组	0.212	5.8148 ± 1.7503*	
中剂量组	0.424	6.0638 ± 0.6041*	
高剂量组	0.848	5.3380 ± 1.6815*	

注:与正常组比较# P < 0.05;与模型组比较\* P < 0.05

NO是由血管内皮细胞合成的一种酶催化的生物活性物质,其前体是L-精氨酸具有强有力的扩张血管作用,并抑制血小板的黏附和聚集,是机体内重要的信息分子和效应分子<sup>[4]</sup>。NO具两大功能:1)是细胞与细胞间信息传递重要调节因子,作为第二信使,调节血管张力、压力传递、神经信息、抑制血小板聚集,2)介导细胞免疫和炎症毒性<sup>[5]</sup>。NOS有三种

类型,包括分别为由内皮细胞,神经细胞及诱导后产生的eNOS、iNOS、nNOS。由内皮细胞产生的eNOS被激活,产生NO,NO可通过cGMP依赖和非依赖2种途径激活K<sub>Ca</sub>通道,引起血管平滑肌细胞膜电位超极化,主要影响血管平滑肌细胞内肌球蛋白的磷酸化,从而引起血管的扩张<sup>[6]</sup>,有利于整体血流动力学改善,改善微血管灌流状况,防止血管通透性升高。本实验结果提示注射Pit后造成了急性心肌缺血,伴有缺血缺氧,抑制NO的产生。心肌缺血时NO合成和释放减少的原因可能是:心肌缺血时伴有缺氧抑制NO产生并从转录与翻译水平抑制NOS的表达<sup>[7]</sup>。随着剂量的升高通心络可明显升高血浆和组织中NO的水平,并增强eNOS活性及基因表达,说明通心络可能是通过提高心肌组织eNOS基因表达从而升高血浆和组织中的NO水平来改善缺血损伤引起的内皮细胞功能不良,从而起到改善微血管灌流,促进冠脉流量恢复的作用。

## 参考文献:

- [1] Bories PN, Bories C. Nitrate determination in biological fluids by an enzymatic one step assay with nitrate reductase[J]. Clin Chem, 1995, 41: 904-907.
- [2] Chomezynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction [J]. Anal Biochem, 1987, 162(1): 156-159.
- [3] 吴伟康, 侯灿, 罗汉川, 等. 垂体后叶素性心肌缺血模型再探[J]. 中国病理生理杂志, 1993, 9(2): 124-126.
- [4] Feelisch M. The Biochemical Pathways of NO formation from nitrovasdilators[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 1991, 17(Suppl 3): S25-S33.
- [5] Palmer RMJ, Ferrige AG, Mocada S. Nitric Oxide release accounts for the biological activity of endothelium releasing factor [J]. Nature, 1987, 327: 524-530.
- [6] Simonet S, Lewis MJ, Smith JA. Nitric oxide release accounts for biological activity of endothelium-derived relaxing factor [J]. Am J Physiology, 1995, 24: 506-509.
- [7] Donald W, Landry MD, Juan A. et al. The Pathogenesis of vasodilatory shock [J]. N-Engl J Med, 2001, 345(8): 588-595.