

络气郁滞证大鼠主动脉组织葡萄糖调节蛋白78mRNA 表达的研究*

吴相春¹ 来 静² 李爱然¹ 贾振华¹ 王宏涛¹ 张秋艳¹ 王玲玲¹

【摘要】目的 观察络气郁滞证大鼠主动脉组织葡萄糖调节蛋白 78(GRP78)mRNA 表达的变化。方法 20 只 Wistar 大鼠按体重随机分为正常组、络气郁滞组,实验末检测血清同型半胱氨酸(Hcy)、一氧化氮(NO)、血浆内皮素(ET),观察主动脉组织超微结构,以 RT-PCR 方法检测主动脉组织中 GRP78mRNA 的表达。结果 与正常组比较,络气郁滞组血清 Hcy 明显增高,NO 明显下降($P < 0.05$),ET 明显升高($P < 0.05$);主动脉组织超微结构发生明显改变,主动脉组织中 GRP78mRNA 的表达较正常组比较明显增强($P < 0.01$)。结论 络气郁滞证大鼠的主动脉组织 GRP78mRNA 表达增强,其血管内皮功能障碍可能与主动脉组织内质网的应激有关。

【关键词】络气郁滞证;内皮功能障碍;大鼠模型;葡萄糖调节蛋白 78;mRNA;内质网应激

应激是心血管疾病发生的重要因素,高同型半胱氨酸血症是血管内皮功能障碍的危险因素,而应激是高同型半胱氨酸血症的重要原因,同型半胱氨酸(Hcy)的氧化应激反应在很大程度上解释了 Hcy 诱导的内皮功能损害,抗氧化剂如 N-乙酰-L-半胱氨酸、维生素 C、维生素 E 和过氧化氢酶等均不能抑制 Hcy 诱导的内皮细胞凋亡。这提示可能存在另外的机制介导 Hcy 诱导内皮细胞损伤,内质网应激学说日益

受到重视^[1]。葡萄糖调节蛋白 78(GRP78)又名免疫球蛋白重链结合蛋白,是位于内质网上的重要分子伴侣,属热休克蛋白 70 家族的一员,GRP78 在内质网中参与阻止内质网新生肽聚集、调节内质网钙稳态、抗内质网相关性细胞凋亡,以及启动未折叠蛋白反应等细胞生命过程,是内质网应激标志蛋白^[2]。基于络气郁滞、络气虚滞引起的络脉自稳状态功能异常与血管内皮功能障碍具有内在一致性,均为“脉络-血管系统

前胡主要含各种香豆素类化合物,其中 Pra-c 及其消旋体 Pd-Ia 为其主要活性成分^[5],可基本代表前胡的功效。研究^[6]表明,Pd-Ia、Pra-c 对心血管作用尤为显著,均有较强的抗心肌缺血、扩张血管和降低血压等作用。本研究提示,Pd-Ia 和 Pra-c 可促进 CAM 血管增生,具有一定的促血管新生作用,从而从一定程度上佐证了推论。但本结论是否具有普遍性,尚需进一步的实验研究及临床验证。

参考文献

- [1] 陆再英,钟南山,谢毅,等.内科学[M].第 7 版.北京:人民卫生出版社,2008:300-302.
- [2] 冯玲,曹洪欣.温阳益心活血化痰法对鸡胚尿囊膜血管

生产的影响[J].中国中医基础医学杂志,2008,14(5):343-347.

- [3] 方显明,黄红英.冠心病心绞痛从痰论治探讨[J].广西中医药,2001,24(1):42-43.
- [4] 刘晓阳.白花前胡提取成分对心血管作用的研究进展[J].沈阳药科大学学报,2002,19(6):462-465.
- [5] 李意,杨智,姚念环,等.白花前胡根中白花前胡丙素的分离鉴定及其有效成分含量的 HPLC 分析[J].中草药,1999,30(8):575-576.
- [6] 潘九英,吴飞华,金芝贵.白花前胡有效成分药理作用研究进展[J].上海中医药杂志,2006,40(5):64-65.

作者简介:叶勇,女,48 岁,教授,主任医师,硕士生导师。主要研究方向:中医内科心血管疾病的教学、临床以及实验研究。

* 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2005CB523301)

作者单位:1. 050035,河北以岭医药研究院

2. 050017,石家庄市第三医院

通信作者:贾振华,Tel:(0311)85901553,E-mail:jiaatcm@163.com

(收稿日期:2009-11-27)

病”的始动因素并贯穿病变全过程,成为运用络病理研究血管病变的切入点^[3]。本研究观察络气郁滞证大鼠内皮结构和功能的改变以及主动脉组织内质网应激伴侣 GRP78 基因表达的变化。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

健康 Wistar 雄性大鼠 20 只,体重 200~230g,购于北京维通利华实验动物中心,许可证号:SCXK(京)2007-0001。将大鼠按体重随机分为正常组和络气郁滞组,每组 10 只。

1.2 试剂

血清一氧化氮(NO)试剂盒:南京建成生物试剂公司提供。血浆内皮素(ET):北京普尔伟业生物科技有限公司提供。血清 Hcy 试剂盒:北京九强公司提供;Trizol 为 Invitrogen 公司产品;Gold view 为赛百盛公司产品;DNA marker 为上海捷瑞公司产品;RT-PCR 试剂盒为 TaKaRa 公司产品;引物由上海生物工程公司合成。

1.3 造模方法

参照本室的方法^[4],实验开始时即给予束缚法,将大鼠放入束缚盒内,调节前端活动部位到合适的位置,使大鼠不产生强烈反抗的紧张程度。每天 6 h (9:00—15:00),正常饲料饮食,连续 6 周。

1.4 内皮功能及血清 Hcy 的检测

各组于实验结束后,10%水合氯醛腹腔注射麻醉,颈总动脉取血,分离血清、血浆后冻存,硝酸还原酶法检测血清 NO (白求恩国际和平医院完成),放免法检测血浆 ET-1(中国人民解放军总医院完成),用循环酶法测定血清 Hcy。

1.5 光镜、电镜技术

颈动脉取血后仔细分离并截取一段胸主动脉组织,用 4%多聚甲醛固定,脱水,石蜡包埋,切片,经 HE 染色,光镜下观察大体形态。分离并截取一小段胸动脉组织,迅速浸入电镜液中,修成 1mm×1mm×1mm 组织块,置 4%戊二醛固定液中 4℃保存(由河北医科大学基础医学院电镜室协助完成)。

1.6 RT-PCR 法测定 GRP78 的表达

实验结束后每组取 3 只大鼠,无菌取主动脉组织,于-80℃冻存备用。按照 Trizol 试剂说明书进行操作,一步法提取大鼠主动脉组织的总 RNA,紫外分光光度仪测定,纯度要求 A260 nm/A280 nm>1.8,1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定其完整性,28S/18S 约等于

2,置-80℃冰箱保存。按照两步法 RT-PCR 试剂盒说明书进行操作,RT 合成 cDNA,反转产物于-20℃冰箱冻存备用。根据 GRP78 基因(NM013083)序列设计引物。GRP78 上游引物 ACTGGAATCCCTCCTGCTC,下游引物 CAAACTTCTCGGCGTCAT,全长 183bp。 β -actin 上游引物 GAGGGAAATCGTGCCTGAC,下游引物 CTGGAAGGTGGACAGTGAG,全长 445bp。PCR 的循环参数:(1)预变性 94℃,3min;(2)变性 94℃,50s;退火,50s;延伸 72℃,1min;反应进行 30 个循环;(3)末延伸 72℃,10min。PCR 产物用 1.5%琼脂糖凝胶进行电泳,同时用 marker 确定相对分子质量的大小。在电压 100V 下,电泳 30min,电泳结束后,用凝胶成像系统拍照。最后用 Quantity One 图像分析系统检测各组目的基因及 β -actin 基因的灰度值,以两者之比值代表目的基因 mRNA 的表达。

1.7 统计学方法

所有数据用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 SPSS13.0 统计软件包,采用 *t* 检验进行统计分析, $P < 0.05$ 作为判断差异显著性的标准。

2 结果

2.1 内皮功能障碍相关生化指标结果

络气郁滞组大鼠较正常对照组 ET 明显增加,NO 明显下降,两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 两组大鼠内皮功能的变化比较($n=10, \bar{x}\pm s$)

组别	ET($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	NO($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
正常组	142.91±8.72	45.22±12.42
络气郁滞组	163.19±24.74*	25.68±10.92*

与正常组比较,* $P < 0.05$

2.2 形态学观察结果

光镜观察正常组主动脉血管内膜、中膜、外膜 HE 染色形态基本正常,结构完整;络气郁滞组内皮细胞轻微肿胀,平滑肌轻微水肿。主动脉组织内皮细胞超微结构透射电镜观察正常组内皮细胞形态规则,细胞核及细胞器存在,线粒体结构无异常;络气郁滞组内皮细胞线粒体大部分嵴和部分膜融合或消失,粗面内质网扩张,脱颗粒明显,吞饮小泡数量明显减少(20.0K)。

2.3 各组大鼠血清 Hcy 的变化

络气郁滞组血清 Hcy ($12.72 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\pm 1.33$)

$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)较正常组($10.18\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\pm 1.68\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)显著增高,两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.4 RT-PCR 检测各组大鼠主动脉组织 GRP78mRNA 表达的变化

正常组 GRP78mRNA 的相对表达量为 0.59 ± 0.01 , 络气郁滞组 GRP78mRNA 的相对表达量为 1.26 ± 0.25 , 两组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。见图 1。

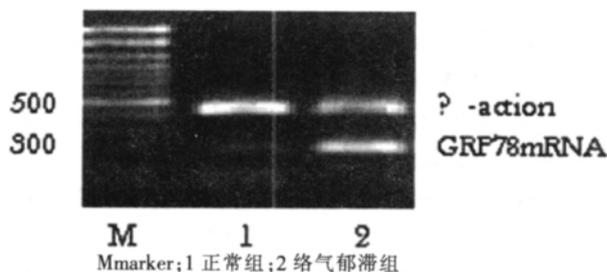


图 1 各组大鼠主动脉组织 GRP78mRNA 的表达比较

3 讨论

应激损伤发生时,机体交感神经和 HPA 轴过度活化,促肾上腺皮质激素和糖皮质激素分泌明显增多,二者在调整机体代谢水平方面起着重要的作用,慢性束缚心理应激可诱导大鼠高同型半胱氨酸血症的发生^[5]。高同型半胱氨酸血症是冠状动脉疾病、脑血管疾病及外周血管疾病独立的危险因素。高同型半胱氨酸血症能够引起内皮细胞凋亡,血管平滑肌细胞增殖,凝血功能紊乱^[6]。NO 和 ET 是血管内皮合成、分泌的两种重要物质。近年研究^[7]表明,当患者存在高血压及高血脂等危险因素时,内皮功能受损,NO 的生成与分泌下降。ET 被认为是目前所知的最强烈的缩血管物质,在与血管平滑肌有关的血管张力和结构的长期调节中起作用。ET 是心脏的高度“毒性肽”,其浓度升高是病情恶化标志之一,临床上可用 ET 升高的幅度判断病情,估计预后。本研究结果显示络气郁滞证候因素可引起大鼠血清 Hcy 增高,NO 降低,血浆 ET 增高,内皮结构和功能受损。

在心血管系统中,内质网应激作为多种应激过程的共同通路,广泛地参与多种心血管疾病的发生^[8]。有研究发现,在培养的血管内皮和动脉平滑肌细胞中,高同型半胱氨酸诱导的内质网应激激活,在高

同型半胱氨酸血症参与形成的动脉粥样硬化中,内质网应激发挥了重要的作用,诱导特定分子的表达,参与细胞凋亡,促进病变的发展。GRP78 是一重要的内质网分子伴侣,当内质网应激发生时,GRP78 作为一种代偿而增多,促进蛋白质的折叠。在发生应激时,GRP78 增多和内质网应激发生^[9]。本研究结果显示,络气郁滞大鼠模型主动脉组织 GRP78mRNA 表达明显增强,表明络气郁滞证候可引起大鼠内质网过度应激,从而推测络气郁滞造成的血管内皮功能障碍可能是通过慢性束缚应激导致的同型半胱氨酸水平的上升而引起了内质网应激。说明内皮细胞、平滑肌细胞内质网应激可能与内皮功能障碍的发病过程有关,确切机制有待更广泛更深入的研究。

参考文献

- [1] 严江涛,汪道文. 同型半胱氨酸与血管内皮功能失调的关系及其分子机制的研究进展 [J]. 临床心血管病杂志, 2004, 20(4):254-256.
- [2] 吴逸园,杨业鹏,李载权. 葡萄糖调节蛋白 78 研究进展 [J]. 生命科学进展, 2009, 40(2):135-141.
- [3] 吴以岭.“脉络—血管系统病”新概念及其治疗探讨[J]. 疑难病杂志, 2005, 4(5):285-287.
- [4] 吴相春,贾振华,吴以岭,等. 络气郁滞内皮功能障碍大鼠动物模型的建立和评价 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2008, 14(1):30-32.
- [5] 吴淑庆,钱令嘉. 应激对同型半胱氨酸代谢的负性调节 [J]. 生理学报, 2004, 56(4):521-524.
- [6] 郭晓静,王淑秀,杨瑞. 高同型半胱氨酸血症与血管性疾病[J]. 新乡医学院学报, 2007, 24(1):102-105.
- [7] CHIEN W Y, YANG K D, ENG H L, et al. Increased plasma concentration of nitric oxide in type 2 diabetes but not in non diabetic individual I with insulin resistance [J]. Diabetes Metab, 2005, 31(1):63-68.
- [8] 娄利霞,唐朝枢. 内质网应激与心血管疾病 [J]. 中国分子心脏病学杂志, 2005, 5(2):496-499.
- [9] 王晓红,张卫光,林胜利,等. 四氯化碳诱导性肝硬化大鼠肝组织葡萄糖调节蛋白 78 表达的研究[J]. 解剖学报, 2006, 37(13):290-293.

作者简介:吴相春,男,37岁,在读博士研究生,副主任医师。主要研究方向:络病理论基础及临床研究。

(收稿日期:2009-11-26)