

通心络对兔缺氧耐受性的影响

吴相春¹, 来静², 吴相锋¹, 贾振华¹, 王洪涛¹, 唐思文¹

(1. 河北以岭医药研究院, 国家中医药管理局重点研究室(心脑血管络病), 河北 石家庄 050035;

2. 石家庄市第三医院, 河北 石家庄 050017)

中国图书分类号: R-332; R 287; R 341; R 845. 220. 23

文献标识码: A 文章编号: 1001-1978(2010)10-1383-04

摘要: 目的 观察通心络对兔急性缺氧耐受性的作用。方法

24只新西兰大白兔随机分为对照组、缺氧组和通心络组,先在11.4%氧环境下低氧实验60min后进行密闭缺氧,观察兔密闭缺氧耐受时间,ELISA法检测血清缺氧诱导因子1- α (HIF-1 α)的含量,Western blot法检测主动脉组织HIF-1 α 和血管内皮生长因子(VEGF)的蛋白表达。结果与缺氧前比较,缺氧组与通心络组血清HIF-1 α 含量明显增加($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。与对照组比较,缺氧组和通心络组主动脉组织HIF-1 α 和VEGF表达明显增强($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。与缺氧组比较,通心络组兔密闭缺氧耐受时间明显增加($P < 0.05$),血清HIF-1 α 含量明显增加($P < 0.01$),主动脉组织HIF-1 α 表达增强,VEGF表达明显增强($P < 0.05$)。结论 HIF-1 α 和VEGF的表达增高可能是缺氧适应的一种机制,通心络能提高兔的缺氧耐受性,其机制可能与上调血清及组织的HIF-1 α 和VEGF有关。

关键词: 通心络; 兔; 低氧; 缺氧耐受; 低氧诱导因子1 α ; 血管内皮生长因子

低氧或缺氧是心、肺、脑血管病等常见病患者的基本病理过程。既往多项研究证实^[1]通心络在心脑血管疾病的防治方面具有明显的疗效,对内皮细胞、神经元具有保护作用,但通心络对机体缺氧耐受性方面的研究较少,本研究观察了通心络对兔的缺氧耐受性的作用并探讨其机制。

1 材料

1.1 药品与试剂 通心络(tongxinluo, TXL)超微粉(由人参、全蝎、蜈蚣、水蛭、蝉蜕、土鳖虫、赤芍、冰片等组成)棕褐色粉末,每克干粉含1.46克生药,由石家庄以岭药业股份有限公司提供,批号:

收稿日期: 2010-04-29, 修回日期: 2010-06-17

项目基金: 国家重点基础研究发展计划(973计划)资助项目(No 2005CB523301)

作者简介: 吴相春(1973-),男,博士生,副主任医师,研究方向: 络病理理论基础及临床, E-mail: wxc2222@163.com;

贾振华(1975-),男,博士,主任医师,研究方向: 络病理理论基础及临床, Tel: 0311-85901553, E-mail: jiatcm@163.com

20090430。血清HIF-1 α ELISA试剂盒由Blue Gene公司提供;缺氧诱导因子1 α (HIF-1 α)抗体由Abcam公司提供;血管内皮生长因子(VEGF)抗体由Santa Cruz公司提供。BCA法蛋白浓度定量试剂盒、ECL发光检测试剂盒由Pierce公司提供。辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠IgG多克隆抗体由中杉金桥公司提供。

1.2 动物 2月龄♂普通级实验用新西兰大白兔24只。体质量范围2.0~2.5kg,购于北京富豪实验动物养殖中心。动物许可证号: SCXK(京)2005-0009。饲养在河北省中西医结合医药研究院新药评价中心。

1.3 实验器材 含氧量10%的氮氧混合气瓶,购于石家庄市西三教制氧厂,氧浓度监测仪(浙江建德市梅城电化分析仪器厂),Y型气管插管, BL-420E⁺生物机能实验系统(成都泰盟科技有限公司)。

2 方法

2.1 分组 新西兰大白兔实验兔按体质量随机分为正常对照组、缺氧组和通心络组,每组8只。

2.2 给药方法、剂量 实验前10d开始灌胃给药,与临床推荐的口服途径相一致,末次给药1h后实验。实验周期为10d。通心络组按照“973”科研本课题组的药物用量规定并参照通心络剂量依赖性稳定易损斑块的作用研究的用量^[2],以通心络0.6g(干粉)·kg⁻¹·d⁻¹,合0.877g(生药)·kg⁻¹·d⁻¹灌胃给药,用0.5%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶液配制成0.292g(生药)·ml⁻¹,折算成干粉浓度0.2g(干粉)·ml⁻¹,按3ml·kg⁻¹动物体质量给药。正常组和缺氧组分别灌胃等量0.5% CMC-Na溶液。

2.3 缺氧方法 3%戊巴比妥钠(1ml·kg⁻¹)经耳缘静脉麻醉后固定,不使用肌松剂和动物用呼吸机,保留自主呼吸,保持呼吸道通畅,呈现良好的存活状态。仰卧位,连接BL-420生理记录仪,监测心脏电生理,呼吸频率。颈部去毛,外科手术,暴露右侧颈动脉,颈动脉插管并用肝素封闭,气管插管。开放含氧量为10%的氮氧混合气,气体流量控制在1L·

min⁻¹左右,充满约3 500 ml 容量的容量器中(由蒸馏器自行改造),一端连接氧监测仪,氧浓度监测仪达到(11.4 ± 0.2)% 的氧浓度,保持相对稳定状态连接兔 Y 型气管插管的一侧,气管插管的另一侧用胶皮管连接,垂直向下,通于烧杯液面以下,以排出呼出的气体。开始缺氧实验 60 min 后关闭进气,使实验兔在含 11.4% 氧浓度的3 500 ml 气体中密闭缺氧,记录兔从关闭进气后至呼吸停止(呼吸频率监测呈直线)的时间为兔的密闭缺氧耐受时间。按时间点分别在缺氧前、60 min 及缺氧末(呼吸停止时刻),颈动脉取血,分离血清。

2.4 观察指标

2.4.1 缺氧耐受时间

2.4.2 血清 HIF-1α 的检测 ELISA 方法检测(石家庄国际和平医院)。

2.4.3 Western blot 检测 HIF-1α 及 VEGF 蛋白在主动脉组织中的表达 实验末正常对照组、缺氧组、通心络组分别取 3 只兔主动脉组织仔细剥离,放入冻存管,液氮中速冻后,超低温冰箱 -80℃ 存放。Western blot 方法检测:从超低温冰箱中取出主动脉,液氮中迅速研磨,加适量裂解液冰上裂解 30 min,离心 12 000 × g,30 min,取上清液分装。利用 BCA 法进行总蛋白定量。加 2 × 上样缓冲液配制样本,100℃ 加热 10 min 变性,从上述各组样品中分别取 120 μg 的蛋白上样,用 12% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳结束后,用电转印仪将凝胶中的蛋白质转印到硝酸纤维素膜上。将转印后的膜依次与一抗(抗 HIF-1α 单克隆抗体,1:1 000 稀释; VEGF 抗体 1:200 稀释)和二抗(与辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG,1:10 000 稀释)孵育,ECL 发光显色,凝胶成像系统照像,实验结果采用 Quantity One 软件分析,扫描灰度值,以目的蛋白与内参 β-actin 的比值表示。

2.5 统计学处理 所有数据采用 SPSS. 13.0 统计软件包进行统计分析,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用 *t* 检验,组内比较采用配对 *t* 检验。

3 结果

3.1 缺氧耐受时间的比较 密闭缺氧中,通心络组兔的耐受时间为 (22.63 ± 4.75) min,而缺氧组为 (14.33 ± 5.92) min,差异具有统计学意义 (*P* < 0.01) 表明通心络具有明显提高兔缺氧耐受性的作用。

3.2 血清 HIF-1α 的变化比较 缺氧前缺氧组与通心络组之间血清 HIF-1α 含量差异无显著性 (*P* >

0.05),在 60 min 和缺氧末,两组分别与缺氧前比较,血清 HIF-1α 含量明显增加 (*P* < 0.05 或 *P* < 0.01)。通心络组 HIF-1α 含量高于对照组 (*P* < 0.01),见 Tab 1。

Tab 1 The concentration of HIF-1α in serum of rabbits(μg · L⁻¹) ($\bar{x} \pm s$ n=8)

Group	Hypoxia before	60 min	End hypoxia
Hypoxia	0.92 ± 0.43	1.20 ± 0.34 [#]	1.79 ± 0.81 [#]
TXL	0.86 ± 0.18	1.82 ± 0.19 ^{##**}	2.05 ± 0.98 ^{##}

TXL: Tongxinluo (a Chinese medicine). [#]*P* < 0.05, ^{##}*P* < 0.01 vs hypoxia before in same group; ^{**}*P* < 0.01 vs hypoxia group

3.3 主动脉血管组织中 HIF-1α 蛋白表达 与对照组比较,缺氧组与通心络组家兔主动脉组织 HIF-1α 表达明显增强 (*P* < 0.05),其中以通心络组增强更加明显,但两组之间差异无显著性 (*P* > 0.05),见 Fig 1。

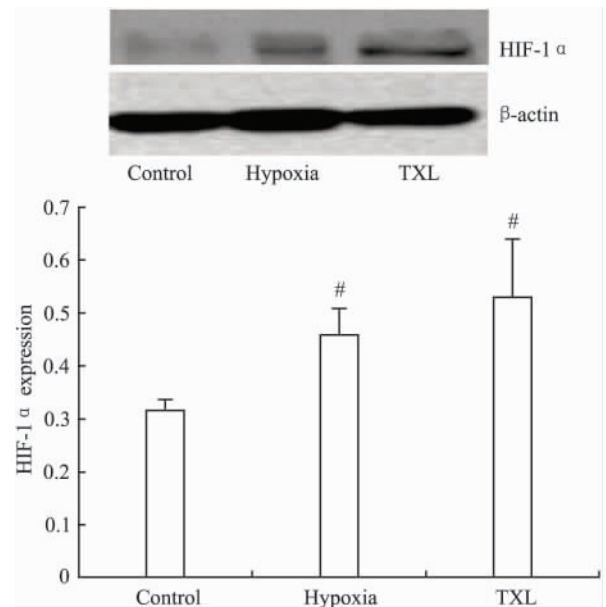


Fig 1 The expression of HIF-1α in aorta tissue of rabbits by Western blot ($\bar{x} \pm s$ n=3)

TXL: Tongxinluo (a Chinese medicine). [#]*P* < 0.05 vs control group

3.4 主动脉血管组织中 VEGF 蛋白表达变化 与对照组比较,缺氧组与通心络组家兔主动脉组织 VEGF 表达均增强 (*P* < 0.05 或 *P* < 0.01); 与缺氧组比较,通心络组 VEGF 表达明显增强 (*P* < 0.05),见 Fig 2。

4 讨论

缺氧时,机体可产生一系列的变化,从而更好的适应缺氧环境,机制极其复杂。体积分数 10% ~

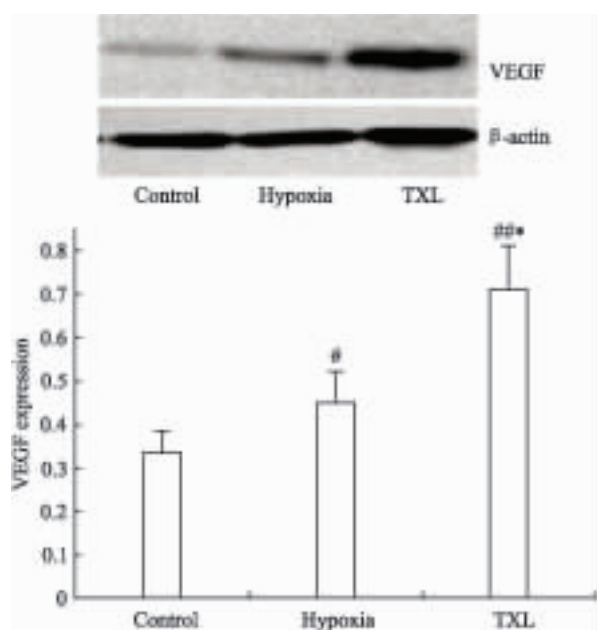


Fig 2 The expression of VEGF in aorta tissue of rabbits by Western blot ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

[#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$ vs control; ^{*} $P < 0.05$ vs hypoxia group

14% 氧浓度被认为是中等程度缺氧,慢性缺氧(10% O_2 , 90% N_2) 提高尚未发育完全兔心脏缺血/再灌注无复流的耐受性,可不增加乳酸盐的释放,明显降低肌酸激酶的释放,使舒张末期压力明显降低^[3],慢性缺氧(12% O_2) 通过增加内皮 15-脂氧合酶的表达来调节兔肠系膜动脉血管舒张功能^[4],14% 氧浓度缺氧可明显增加肺通气量^[5],而严重的低氧或缺氧可造成细胞的功能丧失和结构改变,甚至以不可逆的细胞死亡告终。HIF-1 作为诱导低氧反应基因和修复细胞氧内环境稳定的核心调节因子,可以诱导下游靶基因如 VEGF、促红细胞生成素(EPO)、葡萄糖转运蛋白(Glut)、Bcl-2、血红素加氧酶和诱导型 NOS 等几十种物质的转录,从而产生一系列代偿反应^[6]。HIF-1 是缺氧/缺血诱导血管新生过程中的关键性调节因子^[7]。与缺氧相关的心脏病患者血液中 HIF-1 α 、VEGF、EPO 基因表达明显增强^[8]。在缺氧缺血急性期 HIF-1 α 可促进细胞凋亡,但随后这种损伤作用就被其调节的靶基因如 EPO、VEGF 等的正面作用所取代^[9]。缺氧诱导基因表达系统能明显增加治疗性 VEGF 的基因表达^[10]。内源性 VEGF 在细胞的生存中具有重要作用,明显抑制细胞的死亡,减少增殖^[11]。

本研究结果显示随着缺氧程度的加重,兔血清 HIF-1 α 、主动脉组织 HIF-1 α 和 VEGF 的表达逐渐增强,表明缺氧本身即可激发机体自身升高 HIF-1 α 和

VEGF 的表达以适应缺氧。通心络可明显延长兔密闭缺氧存活时间,提高缺氧兔血清 HIF-1 α 含量、主动脉组织 HIF-1 α 和 VEGF 的表达,表明通心络具有提高机体缺氧耐受性的作用。其作用机制可能与促进缺氧兔提高血液及主动脉组织中 HIF-1 α 表达,从而调控下游靶分子 VEGF 蛋白表达,抑制神经元和血管内皮细胞凋亡,保护神经、血管结构和功能的完整性有关,详细机制有待于更深入研究。

参考文献:

- [1] 吴以岭. 络病理论科学求证[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 67-372.
- [1] Wu Y L. *Scientific confirmation collateral theory* [M]. Beijing: Science Press 2007: 67-372.
- [2] Zhang L, Liu Y, Lu X T, et al. Traditional Chinese medication Tongxinluo dose-dependently enhances stability of vulnerable plaques: a comparison with a high-dose simvastatin therapy [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009 **297**(6): H2004-14.
- [3] Uy R G, Ross-Ascuitto N T, Ascuitto R J. Recovery of the chronically hypoxic young rabbit heart reperfused following no-flow ischemia [J]. *Pediatr Cardiol* 2006 **27**(1): 37-46.
- [4] Aggarwal N T, Pfister S L, Gauthier K M, et al. Chronic hypoxia enhances 15-lipoxygenase-mediated vasorelaxation in rabbit arteries [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009 **296**(3): H678-88.
- [5] Sokolowska B, Pokorski M. Ventilatory augmentation by acute intermittent hypoxia in the rabbit [J]. *J Physiol Pharmacol* 2006 **57**(4): 341-7.
- [6] Powell F L, Fu Z. HIF-1 and ventilatory acclimatization to chronic hypoxia [J]. *Respir Physiol Neurobiol* 2008 **164**(1-2): 282-7.
- [7] 李玉娟, 刘建勋. HIF-1 活性调节及其在缺血后血管新生中的作用 [J]. 中国药理学通报 2009 **25**(1): 19-20.
- [7] Li Y J, Liu J X. Key regulators of HIF-1 and its action in angiogenesis after ischemia [J]. *Chin Pharmacol Bull* 2009 **25**(1): 19-20.
- [8] Lemus Varela M L, Flores-Soto M E, Cervantes M R, et al. Expression of HIF-1 alpha, VEGF and EPO in peripheral blood from patients with two cardiac abnormalities associated with hypoxia [J]. *Clin Biochem* 2010 **43**(3): 234-9.
- [9] Baranova O, Miranda L F, Pichiule P, et al. Neuron-specific inactivation of the hypoxia inducible factor 1 alpha increases brain injury in a mouse model of transient focal cerebral ischemia [J]. *J Neurosci* 2007 **27**(23): 6320-32.
- [10] Jin H, Liu M L, Kim H A, et al. Role of the oxygen dependent degradation domain in a hypoxia inducible gene expression system in vascular endothelial growth factor gene therapy [J]. *Spine (Phila Pa 1976)* 2009 **34**(26): E952-8.
- [11] Schmid-Brunclik N, Bürgi-Taboada C, Antonioux X, et al. Astrocyte responses to injury: VEGF simultaneously modulates cell death and proliferation [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008 **295**(3): R864-73.

◇小专论◇

活性氧对P-糖蛋白调节作用的研究进展

董宪喆¹ 毕明刚²

(1. 哈尔滨商业大学生命科学与环境科学研究中心药物研究所 黑龙江 哈尔滨 150076;

2. 中国医学科学院药用植物研究所 北京 100193)

中国图书分类号: R-05; R 329. 25; R 341. 32; R 730. 5

文献标识码: A 文章编号: 1001-1978(2010)10-1386-05

摘要: P-糖蛋白是由多药耐药基因(MDR1)编码的跨膜糖蛋白,介导ATP依赖的多药耐药,能把多种亲脂性外源物质排出胞外。P-gp过表达介导的多药耐药是目前多药耐药发生的主要机制。活性氧(reactive oxygen species, ROS)是细胞内的信号分子,能被多种物质调节升高。近有研究显示多种ROS诱导剂可以下调P-gp的表达,推测某些ROS诱导剂有望成为P-gp抑制剂而成为肿瘤多药耐药逆转剂研究的新方向。

关键词: P-糖蛋白; 活性氧; 诱导剂; 多药耐药; 肿瘤; 逆转

恶性肿瘤是人类死亡的重要原因之一,化疗是目前临床治疗恶性肿瘤的主要手段。而肿瘤的化疗被内源性或获得性多药耐药(multidrug resistance, MDR)所限制,其中P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)的过表达及其对底物的外排作用是最主要也是最普遍的耐药机制。P-gp介导的多药耐药表型是以P-gp高表达,使药物外排增加,细胞内药物蓄积减少为特征的。许多体外多药耐药模型的建立就是采用抗癌药物反复处理培养的肿瘤细胞或化疗后复发的肿瘤的方法。在逆转MDR表型的策略中,化学逆转剂被普遍接受,其主要通过逆转剂与MDR转运蛋白结合,竞争性抑制多药耐药相关的转运蛋白对化疗药物的外排而逆转MDR^[1]。另外下调MDR基因的表达,进而抑制其编码的P-gp的过表达也是一个有效的策略^[2]。因此,这些逆转剂特异性较差,往往有不明朗的严重的不良反应。所以,能直接抑制P-gp的表达,

收稿日期: 2010-06-21, 修回日期: 2010-07-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No 30873090)

作者简介: 董宪喆(1986-),女,硕士生,研究方向: 肿瘤药理学, E-mail: dongxianzhe@163.com;

毕明刚(1970-),男,副研究员,研究方向: 肿瘤、神经和免疫药理学,通讯作者, Tel: 010-62899744; E-mail: biming-gang@yahoo.com.cn

Effects of Tongxinluo on hypoxia tolerance of rabbit

WU Xiang-chun¹, LAI Jing², WU Xiang-feng¹, JIA Zhen-hua¹, WANG Hong-tao¹, TANG Si-wen¹

(1. Yiling Medical Research Institute of Hebei Province, State Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine (Cardio-cerebral Vascular Network Disease), Shijiazhuang 050035, China; 2. the Third Hospital of Shijiazhuang, Shijiazhuang 050017, China)

Abstract: Aim To investigate the effects of Tongxinluo (TXL, a Chinese medicine) on the hypoxia tolerance of rabbits with acute hypoxia and to explore the mechanism. **Methods** Twenty-four healthy flap-eared white rabbits were randomly divided into 3 groups: control group, hypoxia group and TXL group. The rabbits were in low oxygen condition of 11.4% O₂ at first. After 60 minutes, air supply was closed. The hypoxia tolerance time of the rabbits was measured. The content of serum hypoxia inducible factor 1α (HIF-1α) was detected with ELISA. The expression of HIF-1α and vascular endothelial growth factor (VEGF) in the aorta of rabbit were detected by Western blot. **Results** Compared with hypoxia before, the serum HIF-1α of hypoxia and TXL groups increased significantly ($P < 0.05$ or $P <$

0.01). Compared with the control group, the HIF-1α and VEGF in the aorta of hypoxia and TXL groups expressed obviously ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with hypoxia group, the hypoxia tolerance time of TXL group increased significantly ($P < 0.01$), the serum HIF-1α content increased significantly at 60 minutes ($P < 0.01$), and the expression of HIF-1α and VEGF in aorta tissue was enhanced obviously ($P < 0.05$). **Conclusions** These results indicate that hypoxia can induce HIF-1α and VEGF by itself to adaptation. TXL can improve the hypoxia tolerance of rabbits. The impossible mechanism may be related to the up-regulation of HIF-1α and VEGF in serum and aorta tissue.

Key words: Tongxinluo; rabbit; hypoxia; hypoxia tolerance; HIF-1α; VEGF