

愈心痛对犬急性缺血心肌 ECE、NOS 基因表达的影响及铜锌-SOD 免疫组织化学研究

雷 燕^{1*} 史大卓¹ 钟 蓓² 陈可冀¹

内容提要 目的:探讨益气活血复方愈心痛胶囊对缺血心肌组织内皮素转换酶(ECE)、一氧化氮合酶(NOS)基因表达和铜锌超氧化物歧化酶(铜锌-SOD)免疫组织化学反应的影响,阐明愈心痛胶囊抗心肌缺血的作用机制。方法:采用结扎麻醉犬冠状动脉左前降支中段的方式,造成实验性犬急性心肌缺血病理模型,以原位杂交技术检测缺血心肌中 ECE 和 NOS mRNA 的表达,用免疫组织化学方法观察缺血心肌中铜锌-SOD 阳性反应程度。结果:在缺血心肌组织中,ECE mRNA 呈高表达,NOS mRNA 呈低表达,愈心痛可提高缺血心肌中 NOS mRNA 表达水平,削弱 ECE mRNA 的异常表达,从而保护缺血心肌;同时,缺血心肌中铜锌-SOD 免疫反应减弱,而愈心痛可显著增强缺血心肌组织中铜锌-SOD 阳性反应程度,提高 SOD 活性。结论:愈心痛胶囊的上述抗心肌缺血的作用,部分说明了益气活血方药的作用机理,提示该方可能对缺血性心脏病的治疗具有潜在的临床应用价值。

关键词 愈心痛胶囊 心肌缺血 内皮素转换酶 一氧化氮合酶 原位杂交 免疫组织化学

Effect of Yuxintong on ECE, NOS Gene Expression and Immunohistochemical Studies on Cooper-Zinc-SOD in Ischemic Myocardium in Experimental Dogs LEI Yan, SHI Da-zhuo, ZHONG Pei, et al Xiyuan Hospital, China Academy of TCM, Beijing (100091)

Objective: To explore the effect of Yuxintong (YXT) on the endothelin converting enzyme (ECE) and the nitric oxide synthase (NOS) gene expression levels and cooper-zinc-superoxide dismutase (SOD) activity. **Methods:** The acute myocardial ischemia models were reproduced in anesthetized dogs by ligating the left coronary artery at the middle of anterior descending branch. The ECE and NOS gene expressions were observed by in situ hybridization and the cooper-zinc-SOD was studied by immunohistochemical and image analysis. **Results:** It was found that the transfer of ECE mRNA was greatly increased, while that of NOS mRNA was greatly decreased in ischemic myocardium, but the YXT could enhance the expression levels of NOS mRNA and inhibit the over expression of ECE mRNA in ischemic myocardium in dog. Meanwhile, the cooper-zinc-SOD immunohistochemistry was significantly weakened in ischemic myocardium, but the YXT could evidently increase SOD activity in experimental ischemic myocardium. **Conclusions:** It suggested that YXT had notable protection on experimental ischemic myocardium and was definitely valuable on prevention and treatment of coronary heart disease.

Key words Yuxintong capsule, myocardial ischemia, endothelin converting enzyme, nitric oxide synthase, in situ hybridization, immunohistochemistry

本实验采用组织原位杂交技术检测了内皮素转化酶(endothelin-converting enzyme, ECE)和一氧化氮合酶(Nitric oxide synthase, NOS)基因在缺血心肌的表达水平及分布,并对缺血心肌进行了铜锌超氧化物歧化

酶(铜锌-SOD)免疫组化染色和图像分析,以探讨 ECE、NOS 和氧自由基在心肌缺血发病机制中的作用以及益气活血复方愈心痛胶囊对其影响。

材料和方法

1 动物分组与标本制备 选用健康成年犬 20 只,雌雄不限,体重(18.85±1.96)kg,由中国中医研究院西苑医院动物室提供,随机分为:空白对照组 5 只, 1. 中国中医研究院西苑医院(北京 100091); 2. 北京建仁医院心内科; * 现在北京中医药大学(100029)

生理盐水 3ml/kg; 阳性对照组 5 只, 硫氮草酮 5mg/kg; 愈心痛小剂量组 5 只, 每公斤体重生药 1g; 愈心痛大剂量组 5 只, 每公斤体重生药 2g。采用结扎麻醉犬冠脉左前降支中段的方式, 复制心肌缺血病理模型, 由心外膜心电图监测心肌缺血情况, 于结扎 15min 后, 各组经十二指肠给予实验药物和生理盐水, 结扎后 3h, 迅速取下心脏, 立即在犬左心室第三片标本上取缺血区与非缺血区心肌组织块 0.5cm × 0.5cm × 0.5cm 大小, 液氮冻存, 用前从液氮中取出, 室温下复温 30min 作 5~6μm 厚连续冰冻切片, 将其贴于涂有 0.1% 多聚赖氨酸的载玻片上, 晾干, 置干燥器里, 4℃ 冰箱保存备用。

2 药品与试剂 愈心痛胶囊主要成分有红参、三七等, 其提取干粉(每克干粉含 2g 生药)由吉林放东制药厂提供; 硫氮草酮, 30mg/片, 由上海延安制药厂生产, 批号: 9001003; 地高辛-dUTP 标记试剂盒购自德国 Boehringer Mannheim 公司; SDS、蛋白酶 K、去离子甲酰胺、鲑精 DNA 等购自华美生物医学公司; 甘氨酸、Triton-100、多聚甲醛、左旋咪唑均为 Sigma 产品; 其他试剂为国产分析纯; ECE、NOS 基因探针由北京医科大学第三医院中心实验室惠赠, 其片段长度分别为 1.1kb 和 660bp, 按地高辛试剂盒说明书随机引物法标记探针; 铜锌-SOD 免疫组化试剂盒购自军事医学科学院。

3 组织原位杂交⁽¹⁾ (1) 预杂交: 冰冻切片用 4% 多聚甲醛溶液固定 5min, 梯度乙醇脱水, 入 PBS 和 HCl 液作用各 10、20min, 蛋白酶 K (1μg/ml) 37℃ 消化 15min, 2 × SSC 洗涤 5min, 4% 多聚甲醛固定 10min, PBS 洗涤 15min, 每张切片上滴加预杂交液 (50% 去离子甲酰胺; 6 × SSC; 5 × Denhart's 液; 0.5% SDS; 100 μg/ml 变性鲑精 DNA; 100 μg/ml tRNA) 50μl, 42℃ 预杂交 2h; (2) 杂交: 弃去预杂交液, 每片滴加 40μl 杂交液 (预杂交液中探针浓度 1μg/ml) 于湿盒中, 42℃ 温箱杂交过夜。次日取出玻片, 以 6 × SSC (室温)、45% 甲酰胺 42℃、2 × SSC (室温) 各洗片 2 次, 每次 15min, 缓冲液 I (100mmol/L Tris-HCl, 150mmol/L NaCl, pH7.5) 浸泡 1min, 缓冲液 II (缓冲液 I 中加 0.3% Triton-100) 浸泡 30min, 滴加缓冲液 I 稀释的抗体结合物 (1:2500), 室温反应 30min, 缓冲液 I 洗两次, 每次 15min。再用缓冲液 III (100mmol/L Tris-HCl, 100mmol/L NaCl, 50mmol/L MgCl₂, pH9.5) 平衡 2min; (3) 显色反应: 加入显色液 (含缓冲液 III 10ml, 左旋咪唑终浓度 0.24mg/ml, NBT 液 45μl, X-磷酸盐液 35μl) 避光显色 6h, 以 TE 缓冲液终止反应, 脱水, 透明, 封片, 紫蓝色产物为核酸杂交阳性信号。设立 RNaseA 消化及无探针阴性对照

组。

4 免疫组化染色 (1) 冰冻切片以 95% 乙醇固定 1min, 吹干; (2) 1.4% 牛血清封闭, 湿盒中 37℃, 60min, PBS 洗; (3) 滴加 I 抗, 为兔抗人铜锌-SOD 抗血清 (1:500), 湿盒中 37℃, 60min, PBS 洗; (4) 滴加 1:1000 稀释的 II 抗, 湿盒中 37℃, 60min, PBS 洗; (5) DAB 显色 10min, 封片, 镜检。抗原阳性信号为细胞浆内呈棕褐色颗粒, 以正常兔血清代替 I 抗作阴性对照, 正常对照用非缺血区心肌组织切片。

5 图像分析 用联有 NIKON 光学显微镜的 8502 型自动图像分析仪原位定量测量各组心肌组织的铜锌-SOD 阳性反应颗粒面积百分比和光密度值 (OD)。每 1 动物取 1 张切片, 每片随机取 3 个视野, 各组组织块全部测得一均值, 用 F 检验进行统计学处理, 并作直线相关分析。

结 果

1 愈心痛对 ECE mRNA 表达的影响 以地高辛标记的 ECE 探针与心肌组织 mRNA 原位杂交, 阳性杂交信号为深蓝色细颗粒状, 均位于胞浆内, 主要分布在胞核周围。生理盐水组缺血心肌组织 ECE 呈高表达, 细胞浆中可见大量细密蓝色颗粒; 而愈心痛大剂量组仅见散在分布的杂交阳性颗粒; 硫氮草酮组和愈心痛小剂量组缺血心肌细胞中可见 ECE mRNA 杂交信号, 其分布同上, ECE mRNA 表达量低于生理盐水组; 非缺血区心肌组织仅出现少量较弱的阳性杂交信号。(图略)

2 愈心痛对 NOS mRNA 表达的影响 在非缺血区心肌细胞可见大量 NOS mRNA 表达的紫蓝色阳性反应颗粒分布于胞浆中, 由于颗粒密集, 常使整个细胞呈蓝色; 愈心痛大剂量组 NOS mRNA 蓝色阳性杂交颗粒密布于心肌胞浆内; 硫氮草酮组和愈心痛小剂量组, 表达也较丰富; 而生理盐水组缺血心肌中 NOS mRNA 表达量较少, 且范围局限。(图略)

杂交前用 RNaseA 处理的心肌组织切片和未加探针的阴性对照组均未获得阳性杂交信号, 说明上述原位杂交是特异的。

3 愈心痛对铜锌-SOD 免疫组化反应的影响 光镜下可见, 非缺血区心肌细胞阳性免疫反应颗粒呈深褐色, 团块状, 位于胞浆内, 背景染色未变, 两者色差十分鲜明, 呈中等阳性反应, 各用药组心肌细胞内也含有程度不等的深褐色抗原阳性反应颗粒, 而生理盐水组缺血心肌细胞内阳性颗粒明显减少, 且染色较浅; 滴加兔血清以代替 I 抗的阴性对照组铜锌-SOD 免疫反应

呈阴性。(图略)

4 各组铜锌-SOD 免疫组化反应图像分析结果见附表。

附表 各组铜锌-SOD 阳性颗粒面积及光密度值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	犬数	阳性颗粒面积(%)	光密度(OD)
非缺血区	-	1.31 ± 0.32	182.67 ± 29.24 ₁₉
生理盐水 3ml/kg	5	0.22 ± 0.18 ^{△△}	28.41 ± 30.15 [*]
硫氮革酮 5mg/kg	5	0.77 ± 0.26 ^{**△}	143.26 ± 25.73 [*]
愈心痛 1g/kg	5	0.72 ± 0.27 ^{*△}	156.22 ± 24.54 ^{**}
愈心痛 2g/kg	5	0.84 ± 0.31 ^{**}	

注:与生理盐水组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与非缺血区比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

生理盐水组缺血心肌组织铜锌-SOD 阳性颗粒面积百分比及光密度值均比非缺血区显著减少 ($P < 0.01$),而各用药组与非缺血区相比,也呈减少趋势(部分 $P < 0.05$),但比生理盐水组程度轻,组间差异明显($P < 0.05$, $P < 0.01$),各用药组之间无明显组间差异。其阳性反应程度愈心痛大剂量组 > 硫氮革酮组 > 愈心痛小剂量组。相关分析表明,缺血心肌铜锌-SOD 阳性程度和阳性颗粒面积百分比相关非常显著 ($r = 0.968$, $P < 0.001$)。

讨 论

内皮素(ET)是目前所知作用最强的内源性缩血管物质,它可引起冠状动脉强烈收缩,造成心肌缺血,甚至坏死。ECE 是 ET 生物合成过程中的关键酶,ET 前体(big ET)只有在 ECE 作用下进一步水解形成由 21 个氨基酸组成的成熟 ET,才能充分发挥其生物学效应⁽²⁾。已知 ECE 存在于细胞膜上,其分布与 ET 及 ET 受体的分布有平行关系,表明 ECE 在体内的分布极为广泛, big ET 的转换可发生在多级水平⁽³⁾。本研究应用 ECEcDNA 探针 for 犬心肌 ECEmRNA 进行组织原位杂交,得到阳性结果,说明心肌亦是 ECE 基因转录和表达的场所之一,与文献报道一致⁽⁴⁾。但有关 ECE mRNA 在心肌缺血状态下的表达情况尚未见报道。本研究发现, ECE mRNA 在缺血心肌细胞中呈高表达,提示 ECE mRNA 表达升高与心肌缺血有密切关系,而愈心痛和硫氮革酮均能削弱 ECE 基因在缺血心肌中的异常表达,致使 ECE mRNA 转录水平下降,且愈心痛大剂量组的作用强于硫氮革酮组。

一氧化氮(NO)是一种作用强大的舒血管因子,具有扩张血管,降低血压,抑制血小板粘附、聚集,维持正常的心输出量,控制侧枝循环开放等作用。NOS 是 NO 合成的关键酶,亦是其生物学效应的唯一的主

要限速因子, NOS mRNA 表达下降,可致 NOS 减少或 NO 生成不足,这可能是心肌缺血性损伤发生发展的又一重要因素。本研究表明,在缺血心肌中 NOS 表达减少或消失,而愈心痛胶囊和硫氮革酮均可提高缺血心肌 NOS mRNA 的表达水平,促进其转录合成,愈心痛大剂量组作用优于硫氮革酮组。

上述研究表明,在缺血心肌中, ECE 和 NOS mRNA 在基因表达水平上可能具有相互抑制作用⁽⁵⁾,二者的平衡失调可能参与了心肌缺血性损伤的发生和发展过程,而愈心痛胶囊对 NOS 基因表达的促进作用和对 ECE 基因表达的抑制作用可能是其抗心肌缺血的主要机制之一。本实验从基因表达水平的一个方面初步揭示了益气活血复方愈心痛抗心肌缺血作用的分子机理,其具体机制尚待进一步探讨,推测可能与愈心痛益气活血作用及调节内源性血管活性物质平衡、促进内源性心肌保护物质的产生等功能⁽⁶⁾有关。

近年来,随着对心肌缺血性损伤机制研究的深入,发现大量氧自由基生成及脂质过氧化反应是心肌缺血性损伤的主要机制之一^(7,8)。SOD 是氧自由基的特异性降解酶, SOD 活性及含量的变化直接反映氧自由基的消长情况。本研究应用免疫组化技术及图像分析显示,心肌缺血时铜锌-SOD 明显减少,可能与缺血反应产生大量氧自由基而致铜锌-SOD 超量消耗有关,故铜锌-SOD 减少间接证明了氧自由基增多在心肌缺血发病机制中有着重要的作用。而愈心痛胶囊可以显著提高缺血心肌组织中铜锌-SOD 活性,该方中红参温阳益气,三七活血散瘀,据现代药理研究证明^(9,10),红参中的麦芽醇和三七的主要化学成分三七总皂甙均有较强的抗氧化和增加 SOD 活性的作用,提示该方抗脂质过氧化作用是其保护缺血心肌的一个重要方面。由于免疫组化法可以使铜锌-SOD 的变化定位和定量,因此它较血液和组织匀浆中检测 SOD 的活性更能说明问题。

本研究证实,愈心痛可通过影响 ECE mRNA 和 NOS mRNA 表达水平及抑制体内脂质过氧化反应而达到减轻心肌缺血损伤的作用,从而为愈心痛胶囊的临床应用提供进一步的理论依据。

参 考 文 献

1. 林万明,杨瑞霞,王 津,等.核酸探针杂交实用技术.北京:中国科学技术出版社,1991:80—84.
2. 汤 键,唐朝枢,杨 军,等.内皮素.第 1 版.北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1994:35—37.
3. O'Pgenorth TJ, Wu-Wong JR, Shiosaki K. Endothelin-converting enzymes. FASEB J. 1992;6:2653—2659.
4. Ikura T, Sawamura T, Shiraki T, et al. cDNA cloning and ex-

- pression of bovine endothelin converting enzyme. BBRC 1994; 203:1417-1422.
5. 李倩虹, 田青, 官长宁, 等. ET 和 IL-1 对 VSMC 中 NOS 基因表达的调控及其生物学意义. 北京医科大学学报 1994; 26(增刊): 9-14.
6. 王洁, 李儒汉. 冠心病患者血液脂质过氧化物及有关酶变化的临床意义. 中华心血管病杂志 1992; 2: 104-106.
7. Hammond B, Hess ML. The oxygen free radical system: potential mediator of myocardial injury. J Am Coll Cardiol 1986; 6: 215-220.

8. 雷燕, 刘建勋, 周亚伟, 等. 愈心痛胶囊对急性心肌梗死犬血浆内皮素和血清一氧化氮的影响. 中国中西医结合杂志 1996; 16(5): 289-291.
9. 王本祥, 王铁生, 徐东铭. 人参研究进展. 第 1 版. 天津: 天津科学技术出版社, 1991: 281-282.
10. 李杏, 陈俊秀, 孙家均. 三七皂甙对大鼠实验性心肌梗死再灌注损伤心肌的保护作用. 中国药理学报 1990; 11(1): 26-29.

(收稿: 1996-09-16 修回: 1997-06-28)

排石合剂对肾结石体外冲击波碎石术后 α_1 -微球蛋白的影响

易望丰 王魁亮 朱鹏程 张炳文 陈如兰 刘冰

1995 年 10 月~1996 年 10 月, 我们观察了 50 例肾结石患者体外冲击波碎石术(ESWL)前后血、尿 α_1 -微球蛋白(α_1 -mG)的变化以及排石合剂对其影响, 现报告如下。

临床资料 本组 50 例均符合肾结石诊断参考标准(于德春, 郑启云. 临床疾病的诊断标准与国家体检标准. 第 1 版. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1992: 61), 其纳入标准是: (1) 首次接受 ESWL 治疗者, (2) 单纯性肾结石, 结石直径 $< 2.5\text{cm}$, 治疗前肾功能正常者。将患者随机分为 2 组, 每组 25 例。治疗组男 17 例, 女 8 例; 年龄 20~64 岁, 平均 42.35 岁; 结石最大者 $2.5\text{cm} \times 1.5\text{cm}$, 最小者 $0.5\text{cm} \times 0.6\text{cm}$; 病程 3 个月~20 年, 平均 6.12 年。对照组男 16 例, 女 9 例; 年龄 20~62 岁, 平均 41.28 岁; 结石最大者 $2.5\text{cm} \times 1.2\text{cm}$, 最小者 $0.5\text{cm} \times 0.5\text{cm}$; 病程 5 个月~18 年, 平均 5.96 年。

治疗方法 (1) 药物治疗: 排石合剂的组成: 金钱草 30g 益母草 15g 海金沙 15g 车前子 15g 台乌药 10g 生大黄 10g 田三七 5g。由我院药剂科配制成药液浓缩剂(批号: 950918), 每升含生药 525g。用法: 100ml/次, 口服, 每日 2 次, 从 ESWL 治疗前 1 天开始服用连服 5 天。除治疗组服用排石合剂外, 两组均不用其他药物。(2) ESWL 治疗: 采用上海产 JDPN II 型水槽式碎石机, 碎石时工作电压 120V, 频率 80 次/min, 冲击次数 500~2000 次, 平均 1680 次。治疗前后观察指标: 于碎石前 24h 及碎石后 24h、72h 各收集 3 次血清及尿样本, 置于 -25°C 冰箱中保存, 待样本收齐后统一检测。 ^{125}I - α_1 -微球蛋白放射免疫测定药盒由中国原子能科学研究院提供。检测数据用 t 检验法

统计处理。

结果 两组患者 ESWL 前后血、尿 α_1 -mG 变化比较见附表。与 ESWL 前比较, ESWL 24h, 两组尿 α_1 -mG 均有明显升高($P < 0.01$), 72h 时, 治疗组尿 α_1 -mG 与治疗前比较, 无显著性差异, 但对照组尿 α_1 -mG 仍有显著性差异; 与对照组同期比较, 均有明显差异($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

附表 两组 ESWL 前后血、尿 α_1 -mG 变化比较 (mg/L, $\bar{x} \pm s$)

组别		血 α_1 -mG	尿 α_1 -mG
治疗 (25)	前 24h	23.61 $\pm$ 2.72	5.50 $\pm$ 1.58
	后 24h	24.41 $\pm$ 2.55	8.23 $\pm$ 1.85 ^{*△}
	后 72h	24.14 $\pm$ 2.64	5.75 $\pm$ 1.38 ^{**}
对照 (25)	前 24h	23.95 $\pm$ 2.46	5.42 $\pm$ 1.63
	后 24h	24.85 $\pm$ 2.63	9.62 $\pm$ 1.84 [△]
	后 72h	23.63 $\pm$ 2.78	8.92 $\pm$ 1.69 [△]

注: 与对照组同期比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与本组 ESWL 前 24h 比较, Δ $P < 0.01$; () 内为例数

讨论 用放射免疫法测定血、尿 α_1 -mG 的浓度可为肾功能损害的早期诊断提供较为可靠和灵敏的指标。ESWL 治疗肾结石时, 由于高能冲击波的作用导致肾小球和肾小管不同程度的损伤, 肾小球损伤则滤过率增加而使血液中 α_1 -mG 排出量增多; 肾小管损伤则其重吸收功能障碍而难以将 α_1 -mG 重新吸收进入血液循环, 故尿 α_1 -mG 增加。从本组结果看, 两组在 ESWL 后血、尿 α_1 -mG 均有不同程度升高, 表明 ESWL 对肾脏确有一定损伤; ESWL 后 24h 及 72h 两组比较均有统计学意义($P < 0.01$; $P < 0.05$), 从而提示, 以消炎、止痛、排石为主的中药排石合剂, 有修复 ESWL 所致肾损伤的作用, 为其临床运用提从了参考依据。