

动脉粥样硬化家兔蛋白质硝基化修饰及补肾抗衰片干预研究

张光银, 李明, 许颖智, 彭立, 杨萃, 周亚男, 李南南, 张军平*
(天津中医药大学第一附属医院, 天津 300193)

[摘要] 目的:研究补肾抗衰片对家兔动脉粥样硬化(AS)病变后血管组织蛋白质硝基化修饰的影响。方法:56 只日本大耳白兔随机分为正常组(NOR)、模型组(CHOL)、补肾抗衰片组(BSKS,1 g·kg⁻¹·d⁻¹)、辛伐他汀组(SIMVA,5 mg·kg⁻¹·d⁻¹);各组分别于给药前、给药后 8,12,16 周采血,最后 1 次采血后处死动物,无菌条件下取主动脉,检测血清环氧合酶-2(COX-2)活性以及一氧化氮(NO)、3-硝基酪氨酸(3-NT)水平,检测主动脉诱导型一氧化氮合酶(iNOS)mRNA、p38 MAPK mRNA 的表达,p38 MAPK 阳性面积以及 eNOS 蛋白水平。结果:与正常组比较,动脉粥样硬化造模的不同时期都可检测到 iNOS 表达和蛋白质酪氨酸的硝基化,模型组内膜明显增厚、纤维帽较薄,斑块内有大量脂质沉积,血清 3-NT 水平明显升高,补肾抗衰片干预后,血清 3-NT 水平下降,NO 水平明显升高,而 COX-2 活性没有明显变化;免疫组化染色发现,主动脉 p38 MAPK mRNA,iNOS mRNA 基因在正常组仅有少量表达,AS 病变组 p38 MAPK mRNA,iNOS mRNA 表达增加;与模型组比较,补肾抗衰片也明显降低了家兔 p38 MAPK 水平;p38 MAPK mRNA,iNOS mRNA 基因表达明显下降,辛伐他汀也有类似的抑制硝基化效应。结论:动脉粥样硬化时,组织蛋白质酪氨酸发生硝基化损伤,中药复方制剂补肾抗衰片在 AS 病变中具有重要的抗硝基化作用,其保护机制可能是通过调控 p38 MAPK mRNA,iNOS mRNA 基因的表达以及影响 iNOS/NO-COX-2 通路中相关酶的活性,同时补肾抗衰片可能通过对抗硝基化反应稳定动脉粥样硬化斑块。

[关键词] 补肾抗衰片;蛋白质酪氨酸硝基化;动脉粥样硬化
[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)09-0179-06
[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014090179
[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13422/j.cnki.syfjx.000052.html>
[网络出版时间] 2014-02-25 13:30

Effect of Bushen Kangshuai Tablet on Protein Nitrative Modification
in Atherosclerotic Rabbits

ZHANG Guang-yin, LI Ming, XU Ying-zhi, PENG Li, YANG Cui,
ZHOU Ya-nan, LI Nan-nan, ZHANG Jun-ping*
(First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

[Abstract] Objective: This study was to determine the effect of the Bushen Kangshuai tablet on nitric xidesynthase (NOS)/nitric oxide (NO)-cyclooxygenase-2 (COX-2) pathway and its associated protein nitrative modification influence in atherosclerotic rabbits. Method: Fifty-six rabbits were randomly divided into normal group, model group, Bushen Kangshuai tablet therapeutic group (1 g·kg⁻¹·d⁻¹) and simvastatin therapeutic group (5 mg·kg⁻¹·d⁻¹). The blood sample of all animals were collected before administration, after supplementing with the 8 weeks, 12 weeks and 16 weeks, the animals were sacrificed under aseptic conditions. Aortic iNOS mRNA, p38-mitogen activated protein kinase (p38 MAPK) mRNA expression was measured by Q-PCR method, the serum COX-2 activity and NO, 3-nitrotyrosine (3-NT) levels were measured by ELISA, and

[收稿日期] 20130806(015)
[基金项目] 国家自然科学基金项目(30901905/H2708)
[第一作者] 张光银,医学博士,从事心脑血管疾病的临床与科研工作,E-mail:tj_zhang120@163.com
[通讯作者] *张军平,教授,博士生导师,从事中西医结合治疗心脑血管疾病的临床与科研工作,Tel:022-27432016,E-mail:tjzhtcm@163.com

eNOS protein level was detected by western blot analysis. **Result:** iNOS expression and protein tyrosine nitration could be detected in different periods of atherosclerosis, model group showed intimal thickening, thin fibrous cap, a large lipid plaque deposition. Significant ieduction of serum 3-NT levels was found when atherosclerosis occurred, but Bushen Kangshuai tablets could decreased the expression of serum 3-NT levels, NO levels were significantly increased, while COX-2 activity did not change significantly. Bushen Kangshuai tablets significantly reduced the rabbit p38 MAPK levels. The model group showed a significant increase in iNOS and p38 MAPK gene expression. The simvastatin had a similar inhibitory effect of nitration. **Conclusion:** Bushen Kangshuai tablets in atherosclerotic lesions plays an important role in anti-nitration, the protective mechanism may regulate p38 MAPK mRNA, iNOS mRNA gene expression and iNOS/NO-COX-2 pathway related enzymes possibly through anti-nitration reaction to stabilize of the atherosclerotic plaques.

[**Key words**] Bushen Kangshuai tablets; protein nitrative modification; atherosclerosis

动脉粥样硬化(AS)的发病机制复杂,最新研究发现,在 AS 复合异生细胞斑块、无细胞纤维斑块和内膜斑块中均发现有 3-硝基酪氨酸(3-NT)的存在,而蛋白质中的酪氨酸硝基化生成 3-NT 正是蛋白质硝基化的重要标志^[1-2],也是斑块易损的机制之一。蛋白质硝基化现象在心血管疾病中普遍存在,是一种典型的氧化还原依赖的蛋白质翻译后修饰,也是一氧化氮发挥其广泛信号转导作用的新的的重要途径。越来越多的证据表明,蛋白质络氨酸硝基化参与并促进 AS 的发生、发展,在 AS 病程中发挥重要作用。补肾抗衰片立法于“健脾益肾、涤痰散结”,对 AS 病变疗效明确,对实验性 AS 也具有较好的治疗作用。本实验观察补肾抗衰片对 AS 家兔硝化反应的抑制作用,从对丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)、诱导型一氧化氮合成酶(iNOS)、内皮型一氧化氮合成酶(eNOS)及其对 iNOS/NO-COX-2 调控角度入手,探讨其干预 AS 的机制。

1 材料

1.1 动物 普通级雄性日本大耳白兔 56 只,体重(2.2±0.2) kg,许可证编号 SCXK(京)2007-0001,购自北京市维通利华实验动物技术有限公司。

1.2 药物 补肾抗衰片(由丹参、何首乌、夏枯草、茯苓、海藻、龟甲、石菖蒲、砂仁、淫羊藿、桑寄生等组成),0.5 g/片,每片含生药 3 g,天津中医药大学第一附属医院提供(批号 071105);辛伐他汀(Meck sharp&Dohme Ltd. U. K 生产,杭州默沙东制药有限公司分装,批号 07283)。

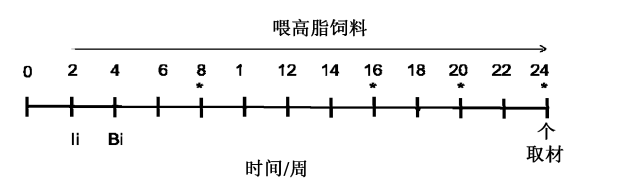
1.3 试剂 实时荧光定量(Q-PCR)试剂盒(Invitrogen,批号 100008919),3-NT、环氧合酶-2(COX-2)、一氧化氮(NO)ELISA 试剂盒(R&D systems),p38 MAPK、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)免疫组化试剂盒(CHEMICON,批号 ECM494),组织蛋

白裂解液(批号 PL028),BCA 法蛋白质浓度测定试剂盒(批号 SK3021,生工生物工程(上海)股份有限公司);ECL 化学发光试剂盒(批号 E002-050,购自上海七海复泰生物科技有限公司);羊 eNOS 多克隆抗体(批号 sc-7695,SANTA CRUZ 公司),羊抗兔 IgG(批号 BA-1039)购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.4 仪器 Rotor-Gene RG-3000 型实时定量 PCR 仪(德国 QIA GEN),HW-8C 型微量恒温器(绍兴市卫星医疗设备制造有限公司),2BX40 型生物显微镜(Olympus,日本奥林巴斯公司),HMIAS-2000 型高清晰度彩色病理图像分析系统(武汉同济医科大学千屏影像工程公司)。

2 方法

2.1 造模及分组、给药 雄性家兔 56 只,按体重随机分为 4 组,即正常组、模型组、补肾抗衰片组(1 g·kg⁻¹·d⁻¹)、辛伐他汀组(5 mg·kg⁻¹·d⁻¹),正常组 8 只,其余各组 16 只。采用高脂饮食加免疫损伤和球囊拉伤方法建立兔 AS 模型^[3]。于第 8 周时,各给药组按剂量开始灌胃给药,辛伐他汀 1 次/d,补肾抗衰片 2 次/d,每克以蒸馏水 5 mL 溶解饲喂,正常组同时喂等剂量蒸馏水,第 24 周(即给药后 16 周)取材,见图 1。



I:免疫损伤时间点;Bi:球囊拉伤时间点;*采血时间点。
图 1 动脉粥样硬化家兔模型建立示意图

2.2 血清 NO,3-NT,COX-2 检测 家兔分别于各组分别于 0 周(给药前)、给药后 8,12,16 周采血。

每次采血前禁食 12 h,经耳缘静脉采血 3 mL,静置 1 h后 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,提取血清置于 -80 ℃ 冰箱冻存备用。采用酶联免疫吸附法^[4] 检测血清 NO,3-NT,COX-2 水平,检测步骤严格按试剂盒说明书进行。

2.3 p38 MAPK 阳性面积检测 选取与病理图像分析所用片子相邻的切片用免疫组化方法^[5] 检测 p38MAPK 阳性面积。每只动物选取 3 张切片,每张切片随机观察 5 个不同的高倍镜视野(10×40),计算阳性细胞(细胞内有黄褐色或棕黄色沉淀物)面积占内膜面积的百分比,取其平均值。

2.4 iNOS mRNA,p38 MAPKmRNA 基因检测

2.4.1 标本收集 自第 8 周开始给药,给药 16 周(第 24 周)后,用 3% 戊巴比妥钠(30 mg·kg⁻¹)麻醉,将动物固定于手术台,无菌条件下在获取主动脉,生理盐水冲洗后,置于组织冻存管,液氮保存备用,余新鲜组织置于 -80 ℃ 冰箱保存。

2.4.2 引物设计 根据 GeneBank 提供的基因序列,由北京千汇博联生物科技有限公司用 Primer Premier 5.0 软件设计合成,见表 1。

表 1 iNOS,p38MAPK 基因引物序列

基因名称	引物序列	基因长度 /bp
iNOS	F:5'-AGGAGGATGGGACTGGAGAC-3'	83
	R:5'-TGGAGCACGGCGATGTTG-3'	
p38MAPK	F:5'-AGTCGCAGTCGGATCTCAG-3'	94
	R:5'-GTGGTCAGCAGGTTGTTCTC-3'	
GAPDH	F:5'-CATCATCCCTGCCTCCAC-3'	181
	R:5'-TGCCTGCTTCACCACCTT-3'	

注:F 为上游引物,R 为下游引物;iNOS 为诱导型一氧化氮合酶基因;p38 MAPK 为丝裂原活化蛋白激酶基因。

2.4.3 p38 MAPK mRNA,iNOS mRNA 检测 采用 Trizol 法提取总 RNA,每个标本均进行 p38 MAPKmRNA,iNOS mRNA 和内参 GAPDH 基因的荧光定量 PCR^[6]。总反应体积 10 μL,反应体系为:5 μL SYBR Green Mix-Plus,上下游引物各 0.5 μL(10 μmol·L⁻¹),2 μL cDNA,加 ddH₂O 至反应总体积 10 μL。反应条件:95 ℃ 5 min,95 ℃ 30 s,59 ℃ 30 s,共进行 40 个循环,57~96 ℃ 绘制熔解曲线,利用比较 CT 法^[7-8] 计算各样本 mRNA 的表达。比较 CT 法^[7] 计算各样本 mRNA 的表达情况,依据公式 $\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{内参基因}}$,分别计算各组的 ΔCt 值,各样本 mRNA 的相对表达量以 $2^{-\Delta Ct}$ 表示,以 $2^{-\Delta \Delta Ct}$

表示各组间的相对表达率,其中 $\Delta \Delta Ct = \Delta Ct_{\text{目的基因}} - \Delta Ct_{\text{校正样本基因}}$ 。

2.5 检测 eNOS 蛋白水平 取 100 mg 主动脉组织样本剪碎,加入裂解液(50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl,pH 8.0,150 mmol·L⁻¹ NaCl,100 mg·L⁻¹ PMSF,1% TritonX-100),用组织匀浆器冰上裂解组织 30 min,12 000×g,5 min 离心后,取 20 μg 样品与上样缓冲液混合,煮沸 5 min,进行 10% SDS-PAGE 电泳,转硝酸纤维素膜(Pall Corporation);将膜在含 5% 脱脂奶粉的 TBST(10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl,pH 7.5,150 mmol·L⁻¹ NaCl,0.05% Tween-20)中室温下封闭 1 h,随后加入羊抗兔 eNOS 多克隆一抗,抗羊 IgG-HRP 二抗,ECL 化学发光试剂检测,显影,摄像,图片分析。

2.6 统计学方法 采用 PASW Statistics 18.0 统计软件进行数据统计,多组间比较采用 One-way ANOVA 检验,显著性水平为 $P < 0.05$ 。

3 结果

3.1 各组 NO,3-NT,COX-2 水平比较 与正常组比较,模型组 NO 水平在给药前、给药后 8,12,16 周均明显降低,在补肾抗衰片干预 8 周后,NO 水平逐渐升高,补肾抗衰片组和辛伐他汀组在第 12,16 周时,与正常组同期比较,差异有显著的统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$);与正常组比较,模型组 3-NT 水平在给药前、给药后 8,12,16 周均明显升高,提示动脉组织硝基化,在补肾抗衰片干预 8 周后,3-NT 水平逐渐下降,补肾抗衰片抑制了硝基化损伤;模型组在给药前、8 周,COX-2 活性高于同期正常组($P < 0.05$),但在 12,16 周时,各组均没有明显差异,见表 2。

3.2 主动脉 eNOS 蛋白水平比较 Western blot 结果,以预染 Marker 为标准条带显示,eNOS 蛋白为 133 kDa,GAPDH 为 35 kDa,符合相对分子质量。家兔经造模因素干预后,主动脉 eNOS 蛋白较正常组比较明显减少,经补肾抗衰片干预后 eNOS 蛋白表达较模型组明显升高($P < 0.05$)。见图 2。

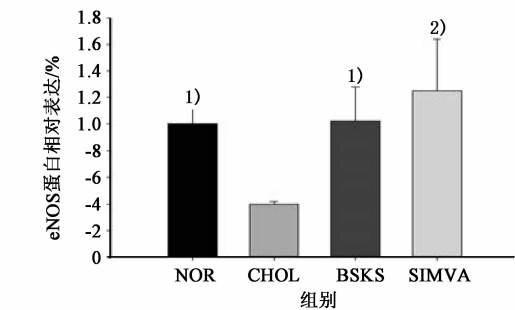
3.3 主动脉 p38 MAPK 阳性表达面积比较 正常对照组血管壁见少量 p38 MAPK 阳性表达;模型组血管壁平滑肌细胞、内皮细胞的胞核有大量棕黄色阳性区域,在胞质内也有少量阳性表达;补肾抗衰组和辛伐他汀组内皮细胞和平滑肌细胞有少量棕黄色阳性沉淀物。见图 3。

3.4 主动脉 p38 MAPK mRNA 及 iNOS mRNA 基因表达 家兔正常组主动脉 iNOS mRNA 基因在仅有少量表达,模型组 iNOSmRNA 表达增加,经补肾抗

表 2 补肾抗衰片对各组 NO,3-NT,COX-2 水平比较($\bar{x} \pm s$)

时间	组别	剂量/g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	n	3-NT/U·L ⁻¹	NO/mg·L ⁻¹	COX-2/U·L ⁻¹
0 周	正常	—	8	76.36 ± 7.31 ²⁾	73.63 ± 22.51 ¹⁾	62.64 ± 3.08 ¹⁾
	模型	—	8	95.92 ± 12.77	52.46 ± 17.03	79.32 ± 2.53
	补肾	1	12	102.44 ± 14.24	65.11 ± 14.53	72.65 ± 5.73
	辛伐	0.005	9	99.88 ± 19.18	77.64 ± 21.72 ²⁾	68.73 ± 1.55
8 周	正常	—	8	80.63 ± 10.41 ²⁾	98.99 ± 13.58 ²⁾	45.09 ± 3.27 ¹⁾
	模型	—	8	116.28 ± 18.68	55.05 ± 12.17	65.20 ± 5.94
	补肾	1	12	87.50 ± 10.65 ²⁾	66.74 ± 16.48	69.80 ± 3.94
	辛伐	0.005	9	99.14 ± 10.59 ¹⁾	61.88 ± 12.12	64.76 ± 5.32
12 周	正常	—	8	88.89 ± 15.87 ¹⁾	87.59 ± 28.33 ²⁾	61.23 ± 3.58
	模型	—	8	109.19 ± 13.77	40.65 ± 20.05	65.96 ± 3.61
	补肾	1	12	89.14 ± 15.18 ¹⁾	69.50 ± 14.94 ²⁾	73.80 ± 5.89
	辛伐	0.005	9	96.40 ± 18.62	67.79 ± 23.77 ²⁾	77.34 ± 14.05
16 周	正常	—	8	78.74 ± 10.33 ²⁾	82.62 ± 18.28 ²⁾	68.03 ± 5.62
	模型	—	8	133.35 ± 13.26	54.60 ± 9.17	68.90 ± 3.42
	补肾	1	12	77.34 ± 9.24 ²⁾	61.96 ± 22.16	70.26 ± 4.39
	辛伐	0.005	9	84.44 ± 12.82 ²⁾	69.88 ± 20.56	67.69 ± 2.42

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$ ²⁾ $P < 0.01$ 。



正常组 (NOR, $n = 8$); 模型组 (CHOL, $n = 8$); 补肾抗衰片 (BSKS, $n = 12$) 1 g·kg⁻¹·d⁻¹ 组; 辛伐他汀组 (SIMVA, $n = 9$) 0.005 g·kg⁻¹·d⁻¹ 组;
与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (图 3 同)

图 2 补肾抗衰片给药 16 周对 AS 家兔主动脉 eNOS 蛋白相对表达水平的影响($\bar{x} \pm s$)

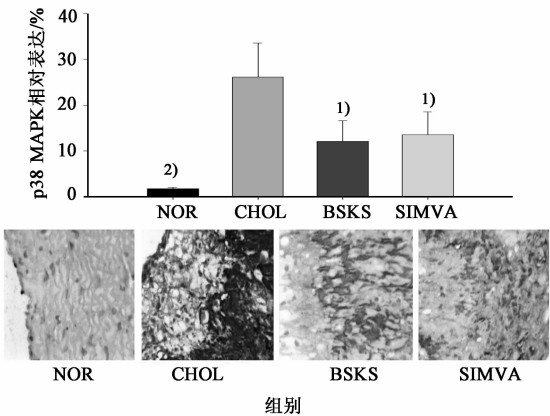


图 3 补肾抗衰片给药 16 周对 AS 家兔主动脉 p38 MAPK 相对表达的影响($\bar{x} \pm s$)

衰片干预后 iNOSmRNA 表达明显减少,差异具有显著的统计学意义 ($P < 0.05$),辛伐他汀也有类似于补肾抗衰片的抑制硝基化效应;家兔正常组主动脉 p38MAPK mRNA 基因在仅有少量表达,模型组 p38MAPKmRNA 表达增加,经补肾抗衰片干预后 p38MAPK mRNA 表达明显升高,差异具有显著的统计学意义 ($P < 0.05$),辛伐他汀也有类似于补肾抗衰片的抗氧化效应。见表 3。

4 讨论

蛋白质硝基化是与氧化应激密切相关的蛋白质翻译后修饰,作为一种蛋白质翻译后修饰,酪氨酸硝基化常在病理状态下伴随活性氧和活性氮的增加而产生^[9]。AS 病变组织内产生大量活性氧,这些活性氧可以与炎症状态下产生的大量一氧化氮(NO)结合生成过氧化亚硝基阴离子(ONOO⁻),启动硝基化应激,损害蛋白质的功能和酶的活性,造成细胞凋亡,增强 iNOS 的表达,使蛋白质酪氨酸残基硝基化生成 3-NT^[10-11]。AS 的不同时期,在巨噬细胞丰富的损伤部位都可检测到 iNOS 的表达和蛋白质酪氨酸的硝基化。临床研究发现,蛋白质硝基化现象在心血管疾病中普遍存在,体内蛋白质硝基化水平的升高可以作为 AS 的独立危险因素^[12]。

补肾抗衰片具有健脾益肾、涤痰降浊、活血散结之功效。方中丹参活血通络,桑寄生、淫羊藿、何首乌等调补肝肾、益精填髓,茯苓、石菖蒲祛痰开窍,全方令脾肾健旺,气血和畅,五脏经脉条达,以此达

表 3 补肾抗衰片对各组 iNOS mRNA,p38 MAPK mRNA 的影响($\bar{x} \pm s$)

指标	组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	<i>n</i>	<i>Ct</i> (目标基因)	<i>Ct</i> (<i>GAPDH</i>)	<i>Ct</i> (<i>Ct</i> _{目标} - <i>Ct</i> _{<i>GAPDH</i>})	Normalized2 ^{-$\Delta\Delta C_t$}
iNOS	正常	—	8	30.22 ± 0.93	25.43 ± 1.26	4.79 ± 0.45	1.06 ± 0.21 ⁽¹⁾
	模型	—	8	29.74 ± 1.31	24.37 ± 3.32	5.25 ± 1.16	3.29 ± 1.02
	补肾	1	12	29.26 ± 1.15	22.76 ± 4.04	6.49 ± 1.27	1.15 ± 0.41 ⁽¹⁾
	辛伐	0.005	9	30.01 ± 0.83	24.59 ± 2.25	6.06 ± 0.97	1.32 ± 0.56 ⁽¹⁾
p38 MAPK	正常	—	8	31.59 ± 1.25	21.40 ± 1.19	9.47 ± 0.25	1.03 ± 0.23 ⁽¹⁾
	模型	—	8	30.26 ± 1.15	21.79 ± 2.44	8.14 ± 0.51	2.64 ± 0.69
	补肾	1	12	30.72 ± 1.30	22.63 ± 3.97	8.27 ± 0.71	1.43 ± 0.15
	辛伐	0.005	9	30.98 ± 1.96	22.46 ± 3.64	8.52 ± 0.93	1.31 ± 0.24 ⁽¹⁾

到抗氧化损伤保护血管,稳定 AS 斑块的作用^[13]。前期研究显示,中药复方制剂补肾抗衰片在动脉粥样硬化所致脑损伤中具有重要的抗氧化作用^[14]。因此,为进一步探讨补肾抗衰片减少 3-NT 的机制,本研究通过检测主动脉内 iNOS 的表达,来探讨补肾抗衰片影响 AS 病变组织内 3-NT 的机制。本次研究发现,家兔正常组主动脉 iNOS mRNA 基因在仅有少量表达,模型组 iNOS mRNA 表达增加,经补肾抗衰片干预后 iNOS mRNA 表达明显升高。本研究结果显示,动脉粥样硬化发生后,机体内存在氧化/抗氧化调节系统失衡,模型组内膜明显增厚、纤维帽较薄,斑块内有大量脂质沉积,血清 3-NT 水平明显升高,补肾抗衰片干预后,血清 3-NT 水平下降,NO 水平明显升高,而 COX-2 活性没有明显变化;免疫组化染色发现,补肾抗衰片也明显降低了家兔 p38 MAPK 水平;主动脉 p38 MAPK mRNA、iNOS mRNA 基因在正常组仅有少量表达,动脉粥样硬化病变组 p38 MAPK mRNA 以及 iNOS mRNA 表达增加,经补肾抗衰片干预后 p38 MAPK mRNA、iNOS mRNA 基因表达明显下降,辛伐他汀也有类似的抑制硝基化效应。

本研究发现,家兔经高脂饲喂、球囊拉伤以及免疫损伤后,机体处于应激状态,COX-2 活性明显升高,补肾抗衰片干预后 COX-2 活性有降低的趋势,但与同期对照组比较没有显著的统计学差异,同时,免疫组织化学法发现,模型组血管壁有大量 p38 MAPK 棕黄色阳性区域,而补肾抗衰干预组和辛伐他汀干预组内皮细胞和平滑肌细胞仅有少量棕黄色阳性沉淀物。

在体内,酪氨酸硝基化途径不是唯一的,而且可能不是相互独立而是同时发生。人体是一个复杂的巨系统,对于每种疾病,很可能必须分别地探讨酪氨酸硝基化在其中的作用。与此同时,体内硝基化的

机制仍然在研究中并且存在很多争议,并期望能找到一种直接抑制酪氨酸硝基化的方法,在机体硝基化损伤的防治中起到重要作用,对于相关疾病的治疗开辟一条新的途径。蛋白质硝基化普遍存在于 AS 的发生及发展阶段,找到抑制酪氨酸硝基化的方法,可为防治 AS 提供新的途径。中药复方制剂补肾抗衰片可明显提高机体的抗硝基化能力,延缓 AS 发生、发展,本次研究也提示补肾抗衰片通过激活 iNOS/NO-COX-2 路径中关因子的表达是其抗硝基化应激作用的机制,也是其抗 AS 的机制之一。

[参考文献]

[1] Daiber A, Münzel T. Increased circulating levels of 3-nitrotyrosine autoantibodies; marker for or maker of cardiovascular disease [J]. Circulation, 2012, 126 (20):2371.

[2] Penna C, Perrelli M G, Tullio F, et al. Post-ischemic early acidosis in cardiac postconditioning modifies the activity of antioxidant enzymes, reduces nitration, and favors protein S-nitrosylation [J]. Pflugers Arch, 2011, 462(2):219.

[3] Guangyin Zhang, Junping Zhang, Ming Li, et al. The immunologic injury composite with balloon injury leads to dyslipidemia: a robust rabbit model of human atherosclerosis and vulnerable plaque [J]. J Biomed Biotechnol, 2012, 249129.

[4] Lequin R M. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [J]. Clin Chem, 2005, 51(12):2415.

[5] Pikkarainen M, Martikainen P, Alafuzoff I. The effect of prolonged fixation time on immune histochemical staining of common neurodegenerative disease markers [J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2010, 69(1):40.

[6] Wagner E M. Monitoring gene expression; quantitative real-time rt-PCR [J]. Methods Mol Biol, 2013, 1027:19.

化痰通络方对急性脑梗死大鼠 rt-PA 溶栓后 不同脑区星形胶质细胞特异性蛋白表达的影响

周震¹, 王凯², 刘爽¹, 宋宛珊², 马妍², 田涛涛², 张玉莲^{1*}

(1. 天津中医药大学第二附属医院, 天津 300150; 2. 天津中医药大学, 天津 300193)

[摘要] **目的:**观察化痰通络方对急性脑梗死大鼠重组组织纤溶酶原激活剂(rt-PA)溶栓后不同脑组织中星形胶质细胞相关特异性蛋白水通道蛋白 4(AQP-4)及血清中 S100 β 蛋白表达的影响。**方法:**将 240 只健康 SD 大鼠随机分为 6 组:假手术组、模型组、rt-PA 组、化痰通络方联合 rt-PA 组(中药低、中、高剂量组,剂量分别为 3.6, 7.2, 14.4 g $\cdot$ kg⁻¹),采用自身栓子法制备大鼠大脑中动脉栓塞模型(MCAO),rt-PA 组与化痰通络方联合 rt-PA 组于血栓注入后 3 h 一次性予以 5.67 mg $\cdot$ kg⁻¹ rt-PA 溶栓治疗,后者联合给予低、中、高剂量化痰通络方中药灌胃治疗,6 h 组于造模成功后给予中药 1 次;24 h 组于造模成功后及处死前 2 h 各给中药 1 次,共 2 次;72 h 组于造模成功后开始给药,每日给中药 2 次,持续 3 d,共 6 次;7 d 组于造模成功后开始给药,每日给中药 2 次,持续 7 d,共 14 次。分别于 4 个时相应用 Western blot 法观察不同时相大鼠皮质及海马 AQP-4 蛋白的表达,ELISA 法检测血清中 S100 β 蛋白的含量。**结果:**各实验组不同脑组织 AQP-4 相对丰度值及血清 S100 β 含量自 6 h 起逐渐升高,24 h 最高,随后逐渐降低,7 d 时接近 6 h 水平;同一时相与假手术组比较,各实验组 AQP-4 及 S100 β 蛋白均显著升高,说明造模成功。与模型组相比,中药中、高剂量组 AQP-4 蛋白于 24 h 或 72 h 或 7 d 时分别出现显著下降($P < 0.05$),研究结果并无明显集中现象,但整体趋势表明中药中、高剂量组能明显减少 AQP-4 的表达;rt-PA 组、中药低、中、高剂量组 S100 β 虽未出现明显差异,但均有不同程度降低,且以中药组下降趋势明显。**结论:**①溶栓治疗后,血脑屏障结构及功能损害于 24 h 时最为严重;②化痰通络方联合 rt-PA 溶栓可降低不同脑组织中 AQP-4 表达及血清中 S100 β 含量进而防治急性脑梗死溶栓后出血转化的发生与发展。

[关键词] 化痰通络方;急性脑梗死;溶栓;出血转化;水通道蛋白 4;S100 β 蛋白

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)09-0184-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfix.2014090184

[收稿日期] 20130823(010)
[基金项目] 国家自然科学基金项目(81072796)
[第一作者] 周震,医学博士,副主任医师,硕士研究生导师,从事中医药治疗脑血管病的临床及机制研究,Tel:13110057681,E-mail:zhouzhen7681@126.com
[通讯作者] * 张玉莲,医学博士,教授,主任医师,博士研究生导师,从事中西医结合防治脑病工作,Tel:13110057681,E-mail:zhyl220@126.com

[7] Kenneth J Livak, Thomas D Schmittgen. Analysis of relative gene expression data using Real-time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta C_t$} method [J]. Methods, 2001 (25) : 402.

[8] Purushothaman M, Krishnan P, Purushothaman K R, et al. Genotype-dependent impairment of hemoglobin clearance increases oxidative and inflammatory response in human diabetic atherosclerosis [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012, 32 (11) : 2769.

[9] Guingab-Cagmat J D, Stevens S M Jr, Ratliff M V, et al. Identification of tyrosine nitration in UCH-L1 and GAPDH [J]. Electrophoresis, 2011, 32 (13) : 1692.

[10] Kumarathasan P, Vincent R, Blais E, et al. Cardiovascular changes in atherosclerotic apoE-deficient mice exposed to ⁶⁰Co (γ) radiation [J]. PLoS One, 2013, 8 (6) : e65486.

[11] 潘会君,唐宁,华晓东,等. 中药调控一氧化氮合酶—一氧化氮系统的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16 (12) : 202.

[12] Schulman I H, Hare J M. Regulation of cardiovascular cellular processes by S-nitrosylation [J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1820 (6) : 752.

[13] 赵志强,王强,赵忱,等. 加载补肾抗衰片治疗肾虚痰瘀型冠心病心绞痛的临床研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2012, 10 (9) : 1025.

[14] 张光银,张军平,李明,等. 补肾抗衰片对实验性动脉粥样硬化家兔海马氧化应激的影响[J]. 中华中医药杂志, 2011, 5 (26) : 1228.

[责任编辑 聂淑琴]