

# 补阳还五汤对球囊扩张主动脉后再狭窄其内皮 PDGFR 和 SOD-1 基因表达的探讨\*

谢全锦 侯 灿 吴伟康 何 勤

**内容提要** 目的:探讨补阳还五汤防治经皮腔内冠脉成形术(PTCA)后再狭窄的消长机制。方法:仿 PTCA 术后再狭窄的新西兰兔模型 28 只,以原位引物标记法测动脉内皮铜-锌超氧化物歧化酶(SOD-1)及血小板衍化生长因子受体(PDGFR)的基因表达,分析再狭窄消长机理。结果:主动脉球囊扩张术后 7 天,手术部位动脉内皮的 SOD-1 基因表达增强,与对照组有显著差异( $P < 0.05$ ),而 PDGFR mRNA 的表达则减弱,与对照组也有显著性差异( $P < 0.05$ )。结论:补阳还五汤增强动脉内皮 SOD-1 的基因表达,改善缺血再灌注的供氧。同样情况下,补阳还五汤抑制 PDGFR mRNA 表达,以控制细胞的病理性增殖。

**关键词** 补阳还五汤 血小板衍化生长因子 铜-锌超氧化物歧化酶 基因表达

**Study on Platelet-Derived Growth Factor mRNA and Copper-Zinc Superoxide Dismutase mRNA Expression Changes of Aortic Artery Endothelium with Restenosis after Aortic Artery Dilatation Treated with Buyang Huanwu Decoction** XIE Quan-jin, HOU Can, WU Wei-kang, et al Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou (510080)

**Objective:** To study on dynamic mechanism of restenosis after PTCA treated with Buyang Huanwu Decoction (BYHWD). **Methods:** Twenty-eight male New Zealand rabbits with mimic restenosis after aortic artery dilatation were detected by prime in situ labeling in aortic endothelium. The items included gene expression of copper-zinc superoxide dismutase (SOD-1) and platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) mRNA to analyse dynamic mechanism of restenosis. **Results:** Seven days after aortic artery dilatation, PDGFR mRNA of aortic endothelium decreased clearly. The comparison between experimental and the control group showed significant difference ( $P < 0.05$ ). By the same condition, the gene expression of SOD-1 was increasing, which showed a significant difference with the control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusions:** BYHWD increased SOD-1 gene expression of artery endothelium, to improve oxygen feed for ischemia reperfusion in the same way, BYHWD suppressed PDGFR mRNA expression to control cellular pathological proliferation.

**Key words** Buyang Huanwu Decoction, platelet-derived growth factor, copper-zinc superoxide dismutase, gene expression

补阳还五汤的活血化瘀疗效,其治疗机制仍不甚了解。另一方面自 Gruentzig (1977)<sup>[1]</sup>首次在临床中推出经皮腔内冠脉成形术后(PTCA),至今尚无一种药物较满意的改善术后再狭窄的病理症状。本研究采用家兔主动脉球囊扩张术后再狭窄模型,仿临床 PTCA 术后再狭窄,以引物原位标记法检测血小板衍化生长因子受体(PDGFR)和铜-锌超氧化物歧化酶(SOD-1)的基因表达,以此途径探讨补阳还五汤抑制细胞病理增殖的机制。

## 材料和方法

1 动物及模型 雄性新西兰兔 28 只,兔龄为 2 月龄,体重 2.7~3.1kg,由中山医科大学动物中心提供。将兔随机分为 2 组,用药组、对照组各 14 只。设计兔主动脉球囊扩张术仿 PTCA 术后再狭窄。每例扩张 4 次,每次 5s,扩张压约为 11.4g/mm<sup>2</sup>。术后 7 天分别切取手术部位的动脉标本(离左侧股动脉约 5cm 处的胸主动脉),按常规石蜡切片备用。

2 药物及给药方法 补阳还五汤浓缩剂型(消栓口服液),5ml/支,由哈尔滨制药三厂生产(批号:0085),用药组 2.5ml/kg 经口灌服,每周 6 次,7 天为 1

\*国家自然科学基金资助课题  
中山医科大学(广州 510080)

个疗程。

3 主要试剂 RNA 逆转录酶和 RNA 酶抑制剂购自华美生物工程公司。DNA 地高辛标记试剂盒购自德国宝灵曼公司。SOD-1 基因引物由上海细胞所提供, PDGFR 基因引物由中山医科大学遗传室提供。

4 SOD-1 和 PDGFR 基因表达检测 按 Mogensen 的引物原位标记一步法测定<sup>(2)</sup>。方法稍有改变。原操作步骤中反应混合物在 42℃ 下保温 90min, 在此条件下, 反应混合液中的试剂尚没有充分反应。本实验延长 3 倍保温时间, 其之保温过夜, 反应结果都优于 90min 保温。显色反应采用 NBT 和 X-phosphate。全部反应都是在 0.5ml 的 Eppendorf 管中进行, 所以要求自制的小玻片做载体。小玻片在管中反应充分, 避免使用塑料盖玻片、硅化等步骤。

5 统计学处理 非参数秩和检验法。

## 结 果

1 主动脉内皮 SOD-1 基因表达的动态变化 采用实验兔手术后 7 天的主动脉标本, 以原位引物标记法测定主动脉内皮 SOD-1 的动态变化。用药组 SOD-1 的基因表达明显高于对照组, 两者有显著性差别 ( $P < 0.05$ )。用药组的主动脉内皮细胞其胞质内 SOD-1 基因表达的阳性信号较强, 并呈现明显的不均匀分布, 此提示 SOD-1 的增量区域特征。见附表。

2 主动脉内皮 PDGFR mRNA 动态变化 动物数、实验方法和非参数统计都与 SOD-1 基因表达的测定相同。实验兔经球囊扩张损伤主动脉后, 其内皮的引物原位标记信号表明: 内皮 PDGFR mRNA 呈现明显的浓度变化。预实验的测定表明, 上述阳性信号最早可在术后 4~5h 被检测。一般都在伤缘呈现较强的阳性信号, 1 周左右此阳性信号呈现峰值, 其后逐渐减弱, 但在气囊损伤后 60 余天, 血管壁仍可检出较弱的阳性信号。信号在血管内皮区显示浓度梯度的迹象, 即愈近内皮前缘信号愈强, 此现象支持血管内皮细胞的自分泌特征。主动脉球囊扩张术后 7 天, 用药组的血管内膜前缘的内皮区其 PDGFR mRNA 应呈中度阳性, 而对照组则呈强阳性, 提示用药 7 天后此生长因子

附表 补阳还五汤对主动脉球囊扩张术后 7 天的 SOD-1 及 PDGFR 基因表达比较 [例数(%)]

| 组别 | SOD-1 mRNA |        |       | PDGFR mRNA |        |        |
|----|------------|--------|-------|------------|--------|--------|
|    | +          | ++     | +++   | +          | ++     | +++    |
| 服药 | 8(57)*     | 5(36)* | 1(7)* | 9(64)*     | 3(22)* | 2(14)* |
| 对照 | 2(14)      | 4(29)  | 8(57) | 3(22)      | 4(28)  | 7(50)  |

注: 与对照组比较, \* $P < 0.05$

的受体基因表达已明显受到抑制。数据统计处理表明用药组和对照组有显著差异 ( $P < 0.05$ ), 见附表。

## 讨 论

对古方的临床疗效使用现代分子生物学方法来研究, 这是一个发展的必由之路。补阳还五汤治疗气虚血瘀证, 心脑血管病已获得医学界的重视, 其疗效机制也得到初步的阐述<sup>(3)</sup>。气囊扩张主动脉后的再狭窄其主要病理反应是血管壁细胞增殖和细胞迁移。近年细胞分子生物学的进展已表明血管细胞增殖与血小板衍化生长因子(PDGF)相关<sup>(3,4)</sup>。PDGF 在功能和结构特征方面类似一些逆转录原癌基因, 可使静止期的细胞转化进入增殖周期, 是机体中一个主要的促细胞分裂原。PDGFR 参与体内重要的生理和病理过程, 包括伤口修复, 胚胎发育, 动脉粥样硬化病变和肿瘤生长等<sup>(5,6)</sup>, 所以 PDGFR mRNA 的原位表达是衡量血管再狭窄消长的一个重要线索。实验结果表明, PDGFR mRNA 的阳性信号数据在用药组和对照组之间有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 此支持补阳还五汤通过抑制 PDGFR mRNA 而降低血管壁的病理性增殖, 这与 PDGF 是体内一种主要促细胞分裂因子的基本概念相吻合。为了进一步印证补阳还五汤的活血化瘀疗效和 PDGFR mRNA 的相关变动。本研究进一步引入 SOD-1 的研究内容。SOD-1 的变动涉及上述实验内容, 即缺血性再灌注的病理反应。对 SOD-1 测定数据的统计分析, 初步表明补阳还五汤除了抑制 PDGFR mRNA 的表达之外, 还同时增加 SOD-1 的基因表达, 此有利于保护细胞膜, 改善细胞供氧。上述两项测定指标的对比研究有力地提示补阳还五汤的主要治疗机理之一是调整机体平衡, 并非专一的单因子作用。

## 参 考 文 献

1. Glazier JJ, Piessen J. Coronary balloon angioplasty: A technique that is here to stay. *Ir Med J* 1991; 84(1):9-11.
2. Mogensen J, Kolvraa S, Hindkjer J, et al. Nonradioactive, sequence-specific detection of RNA in situ by primed in situ labelling (PRINS). *Experimental Cell Research* 1991; 196:92-98.
3. 何熹延. 补阳还五汤治疗心脑血管病和疗效原理研究进展. *陕西中医* 1988; 9(8):376-378.
4. Holmgren L, Glaser A, Pfeifer-Ohlsson S, et al. Angiogenesis during human extraembryonic development involves the spatiotemporal control of PDGF ligand and receptor gene expression. *Development* 1991; 113:749-754.
5. Risau W, Drexler H, Mironov V, et al. Platelet-derived growth factor is angiogenic in vivo. *Growth Factors* 1992; 7:261-266.

Battagay EJ, Rupp J, Iruela-Arispe L, et al. PDGF - BB modulates endothelial proliferation and angiogenesis in vitro via PDGF

b - receptors. J Cell Biol 1994;125:917-928.

(收稿:1996-08-05 修回:1997-06-30)

## 葛根素(普乐林)对冠心病患者血浆纤维蛋白原浓度的影响

王燕妮 马爱群 祝家庆 强蕴蕴 马 西

近年来研究表明,冠心病(coronary heart disease, CHD)与血浆纤维蛋白原(fibrinogen, Fg)水平的升高有密切的关系。我们对 20 例 CHD 患者用葛根素(普乐林)治疗,观察治疗前后血浆 Fg 浓度,并与健康人组及 CHD 未用葛根素治疗组进行对比分析,现将结果报道如下。

### 材料与方法

1 临床资料 40 例 CHD 患者均系我院 1995 年 9 月~1996 年 2 月住院患者。入院后均作心电图、心肌酶谱及空腹血糖检查,除 13 例经心电图、心肌酶谱证实为心肌梗塞外,其余患者均经冠状动脉造影确诊。入院后将患者随机分为 2 组,葛根素组 20 例,其中男 19 例,女 1 例;年龄 50~80 岁,平均(64.05±8.71)岁。其中陈旧性心肌梗塞 6 例,不稳定型心绞痛 10 例,心力衰竭心律失常型 4 例;合并糖尿病者 2 例,合并肺部感染者 6 例。住院期间心功能 I 级者 3 例,II 级者 9 例,III~IV 级者 8 例。CHD 对照组 20 例,男 19 例,女 1 例;年龄 44~78 岁,平均(62.00±10.85)岁。其中陈旧性心肌梗塞 7 例,不稳定心绞痛 6 例,心力衰竭心律失常型 7 例;合并糖尿病者 1 例,合并肺部感染者 7 例。住院期间心功能 I 级者 5 例,II 级者 7 例,III~IV 级者 8 例。20 名健康人(献血员)为正常对照组,其中男 18 名,女 2 名;年龄 34~54 岁,平均(40.87±7.17)岁。

2 用药及观察方法 所有 CHD 患者入院后取空腹静脉血 2ml,按 9:1 比例混合于 10.3mol/L 枸橼酸钠中抗凝,200r/min 离心 10min,取血浆进行 Fg 浓度测定。同时采血测定空腹血糖。随后葛根素组根据病情给予消心痛 10mg,每天 3 次,β 乐克 12.5mg,每天 3 次,硫氮革酮 30mg,每天 3 次。共 2~4 周,同时给予普乐林(山东省医学科学院药物研究所生产,200mg/支,批号:950416)400mg 加入 5% 葡萄糖液 250ml 中静脉滴注,8h 滴完,每天 1 次,共用 2 周。停药后即刻采血检查 Fg 浓度。CHD 对照组同样给予消心痛、β 乐克、硫氮革酮,但不用普乐林。2 周后与用药组同步

采血检查 Fg 浓度及空腹血糖。住院期间禁用尿激酶等对血浆 Fg 浓度有影响的药物。血浆 Fg 浓度测定采用双缩脲法。正常对照组同法测定血浆 Fg 浓度。

### 3 统计学方法 两两均数的 t 检验。

结 果 治疗前 40 例 CHD 患者血浆 Fg 浓度为(484.08±122.98)mg/L,与正常对照组血浆 Fg 浓度(327.00±77.22)mg/L 相比有显著差异( $P<0.001$ ),说明 CHD 患者血浆 Fg 浓度明显高于健康人。CHD 合并肺部感染者血浆 Fg 浓度为(646.08±234.05)mg/L,而未合并肺部感染者其浓度为(393.08±167.39)mg/L,两者之间有显著性差异( $P<0.001$ )。CHD 患者用葛根素后其血浆 Fg 浓度较用药前明显降低,与 CHD 对照组 Fg 浓度比较有显著性差异。CHD 患者用葛根素前后空腹血糖水平无明显变化,并与 CHD 对照组同步空腹血糖比较无显著性差异(见附表)。

附表 两组患者血浆 Fg 浓度及空腹血糖水平的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组 别      | 血浆 Fg(mg/L)                 | 血糖(mol/L)   |
|----------|-----------------------------|-------------|
| 对 照      |                             |             |
| 治疗前 (20) | 469.32±161.28               | 5.621±2.126 |
| 治疗后 (20) | 428.24±137.59               | 5.515±0.937 |
| 葛根素      |                             |             |
| 治疗前 (20) | 494.84±247.47               | 6.030±1.822 |
| 治疗后 (20) | 373.45±151.64* <sup>△</sup> | 5.621±0.507 |

注:与治疗前比较,\* $P<0.001$ ;与对照组治疗后比较,<sup>△</sup> $P<0.05$ ;( )内为例数

讨 论 许多前瞻性流行病学研究证明 CHD 与血浆 Fg 水平之间有直接、独立的关联,这种关联之强度有如胆固醇与 CHD。高 Fg 水平除直接参与冠状动脉粥样硬化形成外,还通过影响血液粘度、血小板聚集和启动凝血时生成纤维蛋白而促使 CHD 发生。

我们通过对 20 例 CHD 患者葛根素用药前后血浆 Fg 浓度的观察发现,用药后比用药前其浓度明显降低( $P<0.001$ )。其作用机制可能是通过抑制肝细胞合成纤维蛋白原或抑制白细胞介素-2 生成及分泌而降低血浆 Fg 浓度。