

镇肝熄风汤对自发性高血压大鼠 PCNA mRNA 和蛋白表达的影响

谢 鑫, 杨 芳, 张 林, 陈士玉, 张立德*

辽宁中医药大学, 沈阳 110032

摘要: 研究不同剂量镇肝熄风汤对自发性高血压大鼠(SHR)心血管 PCNA 蛋白和 PCNA mRNA 表达的影响。采用 24 周自发性高血压大鼠(SHR), 雄性, 50 只, 模型组、中药低剂量组、中药中剂量组、中药高剂量组、复方罗布麻组, 每组 10 只, 同源雄性京都威斯特大鼠(WKY)10 只作为对照组, 灌胃给药 5 周后, Western Blot 法测定心血管 PCNA 蛋白表达, Real-Time RT-PCR 法测定大鼠 PCNA mRNA 基因表达。结果显示镇肝熄风汤中药中剂量、高剂量组与模型组比较, PCNA 蛋白表达明显升高($P < 0.01$); 镇肝熄风汤中剂量与模型组比较, PCNA mRNA 表达明显升高($P < 0.05$)。通过研究表明镇肝熄风汤中剂量组、高剂量组中的 PCNA 蛋白表达和 PCNA mRNA 表达明显升高, 促进血管内皮细胞正常增值活性。

关键词: 镇肝熄风汤; 自发性高血压; PCNA

中图分类号: R289

文献标识码: A

Effect of Zhengan Xifeng Decoction on PCNA mRNA Expression and PCNA Protein Expression of Spontaneously Hypertensive Rats

XIN Xie, YANG Fang, ZHANG Lin, CHEN Shi-yu, ZHANG Li-de*

Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Liaoning Shenyang 110032, China

Abstract: The aim of this study was to investigate the effect of different doses of Zhengan Xifeng decoction on PCNA mRNA expression and PCNA protein expression of spontaneously hypertensive rats (SHRs). Fifty male SHRs (24 weeks old) were randomly divided into model group, low dose sample group, medium dose sample group, high dose sample group and apocynum group with 10 rats of each group. Control group contained 10 male homologous rats (WKY). After intragastric administration of 5 weeks, Western Blot and Real-Time RT-PCR methods were used to detect the PCNA protein expression and PCNA mRNA expression, respectively. The results showed that compared with model group, the PCNA protein expressions of medium dose and high dose sample groups had significantly increased ($P < 0.01$) and the PCNA mRNA expression of medium dose sample group had significantly increased ($P < 0.05$). These results indicated that medium dose and high dose of Zhengan Xifeng decoction obviously increased PCNA protein and PCNA mRNA expressions and promoted proliferation activity of vascular endothelial cells.

Key words: Zhengan Xifeng decoction; spontaneous hypertension; PCNA

PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) 又称增殖细胞核抗原, PCNA 是一种分子量为 36KD 的蛋白质, 在细胞核内合成, 并存在于细胞核内, 为 DNA 聚合酶 δ 的辅助蛋白, 只存在于正常增殖细胞及肿瘤细胞内^[1], 在细胞增殖的启动上起重要作用, 是反映细胞增殖状态情况重要的指标之一。

镇肝熄风汤在临床可改善阴虚阳亢的症状, 治疗高血压及其并发症具有一定的疗效, 本方出自

《医学衷中参西录》^[2], 具有镇肝息风, 滋阴潜阳作用, 用于治疗肝阳上亢, 气血上逆证。本实验是以自发性高血压大鼠 (spontaneously hypertensive rats, SHR) 为研究对象, 观察镇肝熄风汤对心血管细胞中 PCNA 蛋白表达和 PCNA mRNA 的表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

镇肝熄风汤: 生代赭石(先煎)、生龙骨(先煎)、生牡蛎(先煎)、炙龟板(先煎)、牛膝、钩藤、黄芩、栀子、甘草、白芍等, 采购辽宁中医附属医院药店; 复方

罗布麻片(江西桔王药业有限公司生产,国药准字 H32026105);SHR 大鼠和 WKY 大鼠,采购北京维通利华,合格证号:SCXK(京)2012-0001;一抗兔抗大鼠 PCNA 抗体(Cell Signaling Technology);二抗羊抗兔碱性磷酸酶标记(ALP);引物:上游 5'-TTG-GCAATGGGAACA-3',下游 5'-GACAGTGGAGTG-GCTTT-3',RT-PCR 试剂盒和实时定量试剂盒购于 TaKaRa;PCR 扩增仪(9700 ABI),Triazol Reagent (Invitrogen Life Technologies)。

1.2 实验方法

1.2.1 药物剂量

按人与大鼠体表面积比换算给药等效剂量(见陈奇主编《中药药理实验方法》,人民卫生出版社,1994),大鼠的剂量 = X mg/kg × 70 kg × 0.018/200 g = X mg/kg × 70 kg × 0.018/0.2 kg = 6.3 X mg/kg = (260/60) × 6.3 = 27.09 g/kg,中药低剂量:13.5 g/kg,中药中剂量:27.1 g/kg,中药高剂量:54.2 g/kg,浓度分别是 2.5、5、10 g/mL,复方罗布麻片 0.126 g/kg,浓度是 0.02 g/mL,灌胃体积是 1.08 mL/d,早晚各一次灌胃,连续给药 30d。

1.2.2 Western Blot 测定

每组大鼠取心血管左冠状动脉前降支,每个样本加入总蛋白裂解液,在冰块中操作匀浆,酚试剂法进行蛋白定量,用 722 分光光度计在波长为 650 nm 的条件下测得 OD 值,配成同体积同浓度后,加入 Running Buffer 煮沸,加样进行分离胶和浓缩胶板中跑胶,取胶放入转印槽中进行转移,取出转印膜,5% 脱脂奶粉封闭,TTBS 清洗,加入一抗(1:1000 稀释),加入二抗(1:300 稀释),加入碱性磷酸酶色液(ALP)进行显色。

1.2.3 Real Time RT-PCR 测定

每个样本加入 TRIzol 法抽提总 RNA,在冰浴中迅速匀浆,加入氯仿,12000 g 4 °C 离心 15 min,吸取上清液,加入异丙醇摇匀,12000 g 4 °C 离心 15 min,弃上清,加 75% 乙醇 1 mL,7500 g 4 °C 离心,弃上清,加 Nuclease free water。采用紫外可见分光光度计测定 260 nm、280 nm OD 值,配成同体积同浓度后,加入 RT-PCR 试剂盒中的试剂(按说明书操作)逆转录合成 cDNA,加入 Real-Time PCR 试剂进行实时定量 PCR 扩增(按说明书操作)。

1.2.4 统计学处理

SPSS 13.0 处理所得数据,选用 One-way ANOVA 方法进行统计分析,以均数标准差($\bar{X} \pm s$)表

示, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 实验结果

2.1 Western Blot 分析结果

图 2 显示,对照组、中药中剂量、中药高剂量和复方罗布麻组与模型组比较,PCNA 蛋白表达明显升高($P < 0.01$);模型组、中药中剂量组与中药中剂量组比较,PCNA 蛋白表达明显降低($P < 0.01$)。

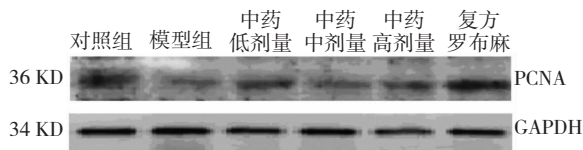


图 1 PCNA 和 GAPDH 蛋白表达

Fig. 1 Protein expression of PCNA and GAPDH

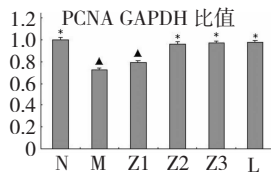


图 2 PCNA/GAPDH 灰度值比较

Fig. 2 The gray value comparison of PCNA and GAPDH

*:与模型组比较,PCNA 蛋白表达明显升高($P < 0.01$);▲:与中药中剂量组比较,PCNA 蛋白表达明显降低($P < 0.01$);N:对照组,M:模型组,Z1:中药低剂量组,Z2:中药中剂量组,Z3:中药高剂量组,L:复方罗布麻组

*: Compared with model group, PCNA protein expression increased significantly ($P < 0.01$); ▲: Compared with medium dose sample group, PCNA protein expression significantly decreased ($P < 0.01$); N: Control group, M: Model group, Z1: Low dose sample group, Z2: Medium dose sample group, Z3: High dose sample group, L: Apocynin group

2.2 Real Time RT-PCR 结果

图 7 显示,对照组、中药中剂量、中药高剂量和复方罗布麻组与模型组比较,PCNA mRNA 表达明显升高($P < 0.05$);模型组、中药低剂量组与中药中剂量组比较,PCNA mRNA 表达明显降低($P < 0.05$)。

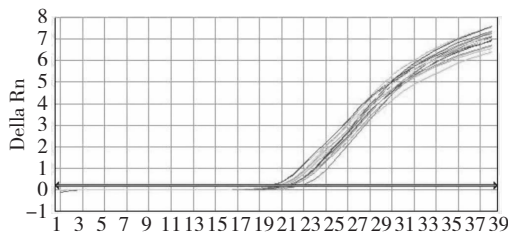


图 3 心血管组织中 PCNA 扩增曲线

Fig. 3 Amplification curve of PCNA in cardiovascular tissue

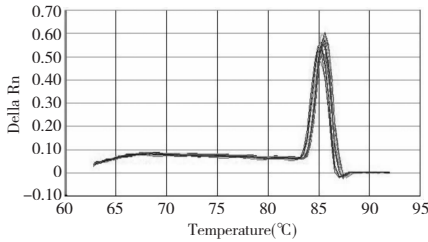


图4 心血管组织中 PCNA 融解曲线

Fig. 4 Dissolution curve of PCNA in cardiovascular tissue

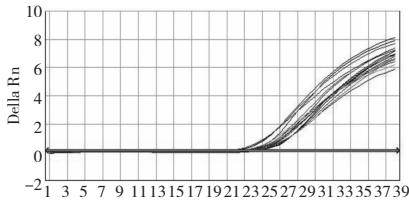


图5 内参 GAPDH 扩增曲线

Fig. 5 GAPDH amplification curve

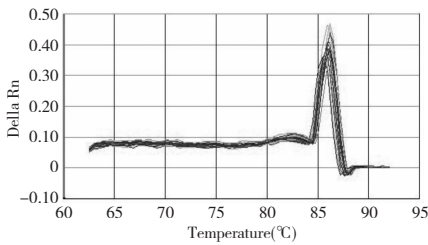


图6 内参 GAPDH 融解曲线

Fig. 6 GAPDH dissolution curve

3 讨论

PCNA 在细胞核内合成,并存在于细胞核内,在细胞核内存在可溶性与不溶性两种 PCNA,可溶性 PCNA 在细胞周期各期中均有表达^[3],其量在 DNA 合成过程中不发生明显变化,易被去污剂提取、甲醇破坏;不溶性 PCNA 较稳定,不易被去污剂洗脱、甲醇破坏,这种 PCNA 在 G0~G1 期细胞中无明显表达,G1 晚期,其表达大幅度增加,S 期达到高峰,G2~M 期明显下降,其量的变化与 DNA 合成一致,检测其在细胞中的表达,可作为评价细胞增殖状态的一个指标^[4]。

镇肝熄风汤的方剂出自《医学衷中参录》^[5],具有镇肝熄风,滋阴潜阳,《内经》谓“诸风掉眩,皆属于肝”^[6]。盖肝为木脏,于卦为巽,巽原主风。且中寄相火,征之事实,木火炽盛,亦自有风。治疗阴虚阳亢、肝风内动所致的头目眩晕,目胀耳鸣,脑中热痛,心中烦热,面色如醉,或肢体渐觉活动不利等^[7,8]。本实验证明,镇肝熄风汤促进自发性高血压大鼠心血管细胞中 PCNA 蛋白表达和 PCNA mRNA

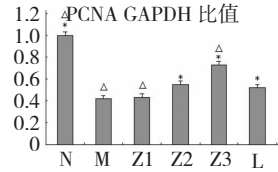


图7 PCNA/GAPDH mRNA 扩增比值

Fig. 7 PCNA/GAPDH mRNA amplification ratio

*:与模型组比较,PCNA mRNA 表达明显升高($P < 0.05$); Δ :与中药中剂量比较,PCNA mRNA 表达有显著差异($P < 0.05$);N:对照组,M:模型组,Z1:中药低剂量组,Z2:中药中剂量组,Z3:中药高剂量组,L:复方罗布麻组。

*:Compared with model group,PCNA mRNA expression increased significantly ($P < 0.05$); Δ :Compared with medium dose sample group,PCNA mRNA expression significantly decreased ($P < 0.05$);N:Control group,M:Model group,Z1:Low dose sample group,Z2:Medium dose sample group,Z3:High dose sample group,L:Apocynin group.

NA 表达,从而促进细胞正常增生,抑制细胞凋亡。

参考文献

- Egelkroun EM, Mariconti L, Settlege SB, *et al.* Two E2F elements regulate the proliferating cell nuclear antigen promoter differently during leaf development. *Plant Cell*, 2002, 14: 3225-3236.
- Xiao C(肖纯), Jin YS(金益强), Hu SY(胡随瑜), *et al.* 潜阳方对高血压肝阳上亢证大鼠模型的实验研究. *J Hunan Coll Tradit Chin Med*(湖南中医学院学报), 1999, 19(2):8-10.
- Kim JJ, Pezik P, Rebholz-Schuhmann D. MedEvi: retrieving textual evidence of relations between biomedical concepts from Medline. *Bioinformatics*, 2008, 24: 1410-1412.
- Mizutani K, Onda M, Asaka S, *et al.* Overexpressed in anaplastic thyroid carcinoma-1 (OEATC-1) as a novel gene responsible for anaplastic thyroid carcinoma. *Cancer*, 103: 1785-1790.
- Meng YH(孟云辉), Wu YX(吴艳霞), Tu X(涂欣), *et al.* Effect of Zhengan Xifeng decoction on angiotensin and endothelin of spontaneously hypertensive rats. *Chin J Clin Pharmacol Therap*(中国临床药理学与治疗学), 2006, 11: 550-553.
- Li Q(李琼), Xu R(许锐), Luo HC(罗汉川), *et al.* 镇肝熄风汤治疗围绝经期综合症的实验研究. *J Tradit Chin Med*(中医杂志), 2005, 46: 897.
- Du WQ(杜午奇), Liu FM(刘福明), Si XC(司晓晨). The research of TCM syndrome differentiation of hypertension. *J Shanxi Coll Tradit Chin Med*(山西中医学院学报), 2007, 8: 60-62.
- Gu YZ(顾月珍), Liu XL(刘旭玲). 高血压病的辨证治疗. *Heilongjiang J Tradit Chin Med*(黑龙江中医药), 2007, 2: 27-28.