

[文章编号] 1007-3949(2004)12-05-0585-04

•临床研究•

复方丹参注射液对冠心病患者血管内皮功能及内皮素和一氧化氮合酶基因表达的影响

王 静, 吴时达, 闫亚非, 陈守春¹, 黄永成, 郑 铿

(成都市第一人民医院; 1. 成都地奥制药集团公司, 四川省成都市 610016)

[关键词] 中西医结合医学; 复方丹参注射液对血管内皮的作用及机制; 逆转录-聚合酶链反应; 血管内皮依赖性舒张功能; 血管超声检查; 一氧化氮合酶; 内皮素

[摘要] 为探讨复方丹参注射液对冠心病患者血管内皮功能的影响及其作用机制, 将 84 例冠心病患者随机分为对照组、复方丹参注射液治疗组和维生素 C 治疗组, 分别于治疗前、后用彩色多普勒检测血管内皮依赖性舒张功能, 并采血检测内皮素 1 和一氧化氮水平及内皮素 1 和内皮型一氧化氮合酶 mRNA 表达。结果发现, 治疗前 3 组间血管内皮依赖性舒张功能、内皮素 1 及一氧化氮水平及其 mRNA 表达比较差异无显著性, 治疗后复方丹参注射液和维生素 C 两治疗组血管内皮依赖性舒张功能明显改善 ($16.7\% \pm 5.0\%$ 和 $13.8\% \pm 5.1\%$ 比 $9.4\% \pm 4.5\%$ 和 $9.7\% \pm 4.1\%$, $P < 0.05$), 高于对照组 ($11.20\% \pm 3.90\%$, $P < 0.05$), 前者又优于后者 ($P < 0.05$); 复方丹参注射液治疗组内皮素 1 水平及其 mRNA 表达下降, 内皮型一氧化氮合酶水平及其 mRNA 表达升高, 与对照组及治疗前比较差异有显著性; 维生素 C 治疗组一氧化氮水平及内皮型一氧化氮合酶 mRNA 表达也升高, 但低于复方丹参注射液治疗组 ($P < 0.05$)。以上提示复方丹参注射液能改善冠心病患者血管内皮功能, 其机制之一为调节内皮型一氧化氮合酶和内皮素 1 mRNA 表达。

[中图分类号] R543

[文献标识码] A

Effect of Compound Salvia Miltiorrhiza Bunge Injection on the Vascular Endothelium-dependent Relaxation and the mRNA Expression of ET-1 and eNOS in the Patients of Coronary Heart Disease

WANG Jing, WU Shi-Da, YAN Ya-Fei, CHEN Shou-Chun¹, HUANG Yong-Cheng, and ZHENG Keng

(Chengdu First People's Hospital, Chengdu 610016; 1. Chengdu Diaoyao Pharmaceutical Co Ltd, Chengdu 610041, China)

[KEY WORDS] Compound Salvia Miltiorrhiza Bunge Injection; Endothelin-1; Nitric Oxidize; eNOS; mRNA; Vascular Endothelial Function; Endothelial Dependent Vasodilatation

[ABSTRACT] **Aim** To evaluate the effect and explore the mechanism of the Compound Salvia Miltiorrhiza Bunge Injection on the vascular endothelium-dependent vasodilatation in patients with CHD. **Methods** 84 patients were randomly divided into three groups ($n = 28$): all patients were given basic therapy according to the therapeutic guide of CHD, while the two therapeutic groups were respectively added the Compound Salvia Miltiorrhiza Bunge Injection and VitC. We examined the baseline (D_0) and the flow-mediated vasodilation (FMD) of brachial artery by high-resolution ultrasound technique and drew blood to examine the concentration of ET-1, NO and the expression of ET-1 and eNOS mRNA before experiment and after three week's therapy. The expanding percentage of the flow-mediated vasodilation (FMD) of brachial artery represented the endothelium-dependent vasodilation (EDD) [$EDD = (FMD - D_0) / D_0 \times 100\%$]. **Results** Three groups had no significant difference in D_0 , FMD and EDD of brachial artery before experiment. But the EDD of two therapeutic groups improved notably after three weeks' therapy, and the Compound Salvia Miltiorrhiza Bunge Injection group was better than VitC group. There was no difference of ET-1 and NO among three groups before experiment. After three week's therapy, the compound salvia miltiorrhiza bunge injection group showed decreasing in the concentration of ET-1 and expression of ET-1 mRNA, increasing in the concentration of NO and expression of eNOS mRNA, all that were significantly different from that of the control group ($P < 0.05$). The VitC group also showed increasing in the concentration of NO and expression of eNOS mRNA, but lower than that of the Compound Salvia Miltiorrhiza Bunge Injection group ($P < 0.05$). **Conclusion** The Compound Salvia Miltiorrhiza Bunge Injection could improve the brachial endothelial function of CHD patients by regulating the expressions of ET-1 and eNOS mRNA.

[收稿日期] 2003-12-24

[修回日期] 2004-07-30

[作者简介] 王静, 硕士, 主治医师, 现从事中西医结合心血管内科工作。吴时达, 主任医师, 现从事中西医结合心血管内科工作。陈守春, 医学博士, 现从事基因工程药品的开发研制, E-mail 为 chenshch@mail.sc.cninfo.net。

血管内皮在调节心脏循环和稳定内环境中起着重要作用, 血管内皮功能异常与动脉粥样硬化特别是冠心病的发生、发展密切相关, 因此改善血管内皮功能对冠心病防治尤为重要, 本研究旨在探讨复方

丹参注射液对冠心病患者血管内皮依赖性舒张功能的作用及可能的机制, 现予报告。

1 对象与方法

1.1 对象及分组

选择 2001 年 7 月~2003 年 2 月我院心内科住院的冠心病患者共 84 例, 全部符合诊断标准^[1], 且按中医辨证分型标准(中华人民共和国卫生部颁布的《中药新药临床研究指导原则》)均属瘀血内阻型, 其中有 41 例经冠状动脉造影证实存在冠状动脉病变。排除急性心肌梗死、严重心力衰竭(\geq Ⅳ级, 纽约分级)、血压 $>160/100$ mm Hg 或 $<90/60$ mm Hg、合并糖尿病和严重肝胆肾器质性疾病者。女性均为绝经后妇女。纳入者随机分成 3 组, 每组 28 例, 3 组患者性别构成、年龄、血压、血糖、总胆固醇、甘油三酯、高密度脂蛋白胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇和肌酐等差异无显著性($P>0.05$)。

对照组参照冠心病常规治疗, 复方丹参注射液治疗组(简称丹参组)和维生素 C 治疗组分别在此基础上加复方丹参注射液(由四川宜宾五粮液集团宜宾制药有限责任公司提供, 批准文号为国药准字 Z51020170, 40 mL 复方丹参注射液溶解在生理盐水 100 mL 中静滴, 1 次/日)和维生素 C(维生素 C 3 g 加入生理盐水 100 mL 中静滴, 1 次/日), 疗程 3 周。

1.2 血管内皮依赖性舒张功能的检测

血管内皮舒张功能(endothelial-dependent vasodilatation, EDD)测定参照 Celebmajer 等^[2]方法, 应用美国惠普 2000 型彩色多普勒超声诊断系统, 7.0 MHz 线阵探头。患者取仰卧位, 右上肢外展 15°, 掌心向上, 用二维超声成像扫描肱动脉, 以肘上 2~15 cm 肱动脉为靶目标, 取其纵切面, 当动脉前后壁内膜显示最清楚时, 调节增益直至能满意识别管腔分界面。同步显示心电图, 冻结图像, 测量心室舒张末期(心电图显示 R 波时)肱动脉前后内膜之间的距离。取 3 个心动周期的平均值。每位受试者分别测量休息时、反应性充血和含服硝酸甘油后肱动脉内径。受试者测试前休息 10 min, 测定肱动脉内径基础值(D_0)后进行反应性充血试验: 将血压计袖带缚于右上肢前臂, 充气至 300 mm Hg, 维持 4 min 后迅速放气, 60~90 s 内测量右肱动脉血流介导血管扩张内径(flow-mediated vasodilation, FMD), $EDD = (FMD - D_0) / D_0 \times 100\%$ 。为评价该测试方法的可靠性, 3 组患者各取 5 例在 2 周后再进行血管内皮依赖性舒张功能测定。由原操作者进行, 测量基础状态下和反

应性充血后肱动脉内径舒张率。2 次测量的变异系数分别为 4.31% 和 4.15%。

1.3 内皮素 1 和一氧化氮水平的检测

分别于治疗前及治疗 3 周后采空腹静脉血检测内皮素 1(endothelin)和一氧化氮(nitric oxidized, NO)水平。内皮素-1 采用放射免疫法, 药盒由北京北方生物技术研究提供; NO 采用硝酸还原酶法, 药盒由南京聚力生物医学工程研究所提供。样本制备、冰存及测定均按说明书进行。

1.4 内皮素 1 和一氧化氮合酶基因表达的检测

1.4.1 全血总 RNA 抽提 患者治疗前后分别采集空腹外周静脉血(EDTA 抗凝)。每份标本各取新鲜血 1.5 mL, 采用 Qiagen 公司全血 RNA 抽提试剂盒进行总 RNA 提取(详细方法见试剂盒操作说明)。抽提所得总 RNA 分别溶于 30 μ L 纯水中, 置-80℃冰箱保存。

1.4.2 引物设计 根据 Genbank 中内皮素 1 和一氧化氮合酶(eNOS)基因序列资料, 选取保守区域设计引物(上海基康生物技术有限公司合成)。其中内皮素 1、eNOS 和内对照 β 肌动蛋白(β -actin)基因扩增产物大小分别为 500 bp、400 bp 和 600 bp。目的基因扩增引物序列内皮素 1 为 Pe_1: 5'-gattattgctcaggattt-3', Pe_2: 5'-tcaccaatgtgctcggtg-3'。eNOS 为 Pn_1: 5'-tagccaaagtccaccatcgt-3', Pn_2: 5'-gagccat-acaggattgtcg-3'。

1.4.3 逆转录—聚合酶链反应 每例标本各取总 RNA 5 μ L, 分别以聚合酶链反应下游引物(Pe_2、Pn_2 或 β -actin 下游引物)为特异性引物进行逆转录(逆转录反应采用 Qiagen 公司逆转录试剂盒进行, 具体操作按说明进行), 反应产物置-20℃保存。

每份标本各取逆转录反应产物 5 μ L 为模板, 分别进行聚合酶链反应, 每次反应均设 β -actin 内对照, 反应体系如下: 逆转录产物 5 μ L, 聚合酶链反应上游引物(10 μ mol/L) 1 μ L, 聚合酶链反应下游引物(10 μ mol/L) 1 μ L, 4 \times dNTP(2.5 mmol/each) 4 μ L, 10 \times PCR buffer(含 $MgCl_2$) 5 μ L, Vent DNA 聚合酶(1×10^6 u/L) 1 μ L, 双蒸馏水 33 μ L, 共 50 μ L。反应条件: 94℃预变性 5 min \rightarrow 94℃变性 30 s \rightarrow 55℃退火 30 s \rightarrow 72℃延伸 45 s, 循环 35 次; 72℃延伸 5 min 后于 4℃保存。

1.4.4 产物分析 取聚合酶链反应产物 5 μ L 加样于 1.5% 的琼脂糖凝胶中, 80 V 电压电泳 30 min。置凝胶成像系统上测定各目的条带灰度值。各目的条带均以 β -actin 扩增产物为内参照, 计算待测目的基因产物与 β -actin 的灰度扫描比值, 以此作为待测

目的基因的表达值。

1.5 统计分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 分组资料比较用 t 检验。统计分析采用 SPSS10.0 统计软件进行。

2 结果

2.1 各组血管内皮依赖性舒张功能的变化

治疗前 D₀、FMD 和 EDD 3 组之间差异无显著性。治疗后丹参组、维生素 C 组 EDD 较对照组明显升高, 前者疗效又优于后者(表 1, Table 1)。

表 1. 复方丹参注射液及维生素 C 对肱动脉内皮依赖性舒张功能的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 28$)

Table 1. The effects of the Compound Salvia Miltiorrhiza Bunge Injection and VitC on the endothelium dependent vasodilatation of brachial artery

分 组		D ₀	FMD	EDD
对照组	治疗前	4.19 ± 0.76	4.62 ± 0.81	10.3% ± 3.2%
	治疗后	4.16 ± 0.88	4.63 ± 0.86	11.2% ± 3.9%
丹参组	治疗前	4.10 ± 0.82	4.48 ± 0.90	9.4% ± 4.5%
	治疗后	4.17 ± 0.79	4.87 ± 1.05	16.7% ± 5.0% ^{ab}
VitC 组	治疗前	4.26 ± 0.90	4.70 ± 0.74	9.7% ± 4.1%
	治疗后	4.21 ± 0.92	4.79 ± 0.97	13.8% ± 5.1% ^{abc}

$P < 0.05$, a: 与治疗前比较; b: 与对照组比较; c: 与丹参组比较。

2.2 各组一氧化氮和内皮素 1 水平的变化

治疗前 3 组内皮素 1 和 NO 水平差异无显著性; 治疗后丹参组内皮素 1 较对照组及治疗前显著降低; 丹参组和维生素 C 组较对照组 NO 升高, 前者又高于后者(表 2, Table 2)。

表 2. 复方丹参注射液及维生素 C 对血浆内皮素 1 和一氧化氮水平的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 28$)

Table 2. The effects of the Compound Salvia Miltiorrhiza Bunge Injection and Vit C on concentration of ET-1 and NO

分 组		内皮素 1 (ng/L)	一氧化氮 (μmol/L)
对照组	治疗前	63 ± 7	112 ± 12
	治疗后	61 ± 9	117 ± 13
丹参组	治疗前	62 ± 8	110 ± 10
	治疗后	52 ± 10 ^{ab}	136 ± 12 ^{ab}
VitC 组	治疗前	60 ± 10	115 ± 14
	治疗后	56 ± 9	125 ± 11 ^{abc}

$P < 0.05$, a: 与治疗前比较; b: 与对照组比较; c: 与丹参组比较。

2.3 各组内皮素 1 和一氧化氮合酶 mRNA 表达水平的变化

治疗前 3 组内皮素 1 和 eNOS mRNA 表达差异无显著性。治疗 3 周后, 丹参组内皮素 1 mRNA 表达下降, eNOS mRNA 表达升高, 与治疗前及对照组比较差异有显著性($P < 0.05$); 维生素 C 组 eNOS mRNA 表达也升高, 与治疗前比较差异有显著性, 但低于丹参组($P < 0.05$)(表 3 和图 1, Table 3 和 Figure 1)。

表 3. 复方丹参注射液及维生素 C 对内皮素 1 和一氧化氮合酶 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 28$)

Table 3. The effects of the Compound Salvia Miltiorrhiza Bunge Injection and Vit C on expression ET-1 and eNOS mRNA

分 组		内皮素 1	一氧化氮合酶
对照组	治疗前	1.27 ± 0.65	0.35 ± 0.09
	治疗后	1.24 ± 0.45	0.40 ± 0.19
丹参组	治疗前	1.31 ± 0.51	0.37 ± 0.10
	治疗后	1.01 ± 0.34 ^{ab}	0.56 ± 0.20 ^{ab}
VitC 组	治疗前	1.24 ± 0.55	0.34 ± 0.13
	治疗后	1.14 ± 0.37	0.46 ± 0.17 ^{ac}

$P < 0.05$, a: 与治疗前比较; b: 与对照组比较; c: 与丹参组比较。

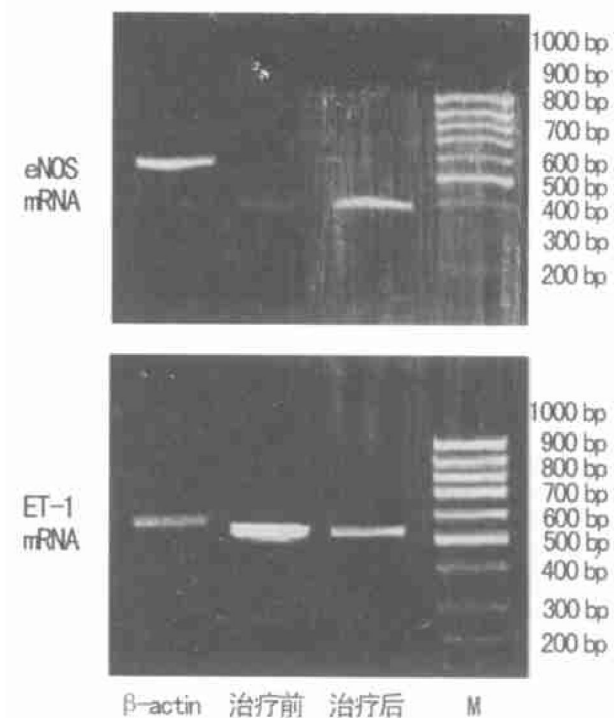


图 1. 复方丹参注射液治疗组治疗前后内皮素 1 和一氧化氮合酶 mRNA 表达的比较

Figure 1. The effects of the Compound Salvia Miltiorrhiza Bunge Injection and Vit C on the expression of ET-1 and eNOS mRNA

3 讨论

内皮细胞所处的解剖位置是一易损伤的功能性界面,各种损伤、刺激和心血管危险因素均首先作用于血管内皮细胞,导致其功能的降低或紊乱,出现内皮功能障碍亦称之为内皮功能障碍综合征(endothelial dysfunction syndrome, EDS)^[3]。它与冠心病等多种疾病的发生、发展有关,与中医血瘀证的关系也十分密切^[4]。研究显示,维生素C可改善冠心病、高血压及糖尿病患者的内皮功能,其作用机制与其抗氧化作用有关^[5,6]。本文通过肱动脉血管超声检测发现复方丹参注射液能明显改善冠心病血瘀证患者的血管内皮依赖性舒张功能,效果优于维生素C。

一氧化氮和内皮素1是两种主要的内皮源性血管活性因子,两者作用相反。NO可扩张血管,调节血压,改善局部血流,抑制血小板聚集,抗平滑肌细胞增殖。一氧化氮合酶是NO生成的唯一限速酶,给予一氧化氮合酶的抑制剂(EDNO),血流介导的内皮依赖性血管舒张现象可消失。内皮素1是已知最强的缩血管和加压物质,血管内皮通过调控内皮素1和NO的平衡来调节血管的功能。冠心病患者致密粥样硬化斑块处内皮素1表达明显增强,而内皮型一氧化氮合酶mRNA表达微弱且局限,非冠心病患者无这种变化^[7]。中医血瘀证也表现出NO和NO/ET比值明显降低^[8]。本研究结果显示复方丹参注射液治疗后,EDD明显改善,内皮型一氧化氮合酶mRNA的表达明显增强,高于维生素C组,而内皮素1的表达减弱,血浆NO水平升高,内皮素1水平降低,由此认为复方丹参注射液改善肱动脉的内皮依赖性舒张功能的机制与内皮型一氧化氮合酶和内皮素1 mRNA表达有关。

复方丹参注射液调节内皮素1和内皮型一氧化氮合酶的表达可能通过以下途径实现:丹参的抗氧化作用,丹参及丹参的有效成分丹参素和丹参酮是良好的自由基清除剂,可减少氧自由基、脂质过氧化物和氧化型低密度脂蛋白等的形成,而氧化型低密度脂蛋白下调内皮型一氧化氮合酶mRNA的表达,增加内皮素1 mRNA表达^[9],并损伤内皮细胞,诱导内皮细胞凋亡^[10],推测丹参直接或间接通过抗氧化作用保护血管内皮。④丹参对凝血纤溶系统的影响,实验发现老年冠心病患者的血浆凝血酶显著升高,其中不稳定型心绞痛患者升高更明显,凝血酶能抑制内皮型一氧化氮合酶mRNA表达,缩短内皮

型一氧化氮合酶半衰期,凝血酶激活的蛋白酶激活受体-1对内皮型一氧化氮合酶mRNA表达虽无影响,但能显著增加内皮素1 mRNA的表达,有作者认为这可能是心血管疾病功能障碍的重要原因,尤其是急性冠脉疾病患者^[11],而实验证明丹参能降低血浆凝血酶原片断及D二聚体,从而改善高凝状态^[12]。④丹参调节细胞因子作用。血管内皮损伤是多种细胞因子相互作用的结果,TNF- α 、INF- γ 、MCP-1和MIP-1 α 等可促进人脐静脉内皮细胞内皮素1和内皮素转换酶mRNA的表达,而丹参具有调节细胞因子内分泌的功能。其他研究也表明,复方及单味中药从抗氧化、抗血栓及调节血管活性物质和细胞因子分泌等方面来改善血管内皮的功能^[13,14]。

[参考文献]

- [1] 贝政平,主编. 内科疾病诊断标准. 北京: 科学出版社, 2001; 50-52
- [2] Celebmajer DS, Sorensen KE, Gooch WM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet*, 1992, **340**: 1111-1115
- [3] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 1993, **362**: 801-809
- [4] 陈颂,葛金文. 血瘀证实质与血管内皮细胞关系的研究概况. 湖南中医学院学报, 2001, **21** (1): 67-69
- [5] Raitakari OT, Adams MR, McCredie RJ, Griffiths KA, Stocker R, Celebmajer DS. Oral vitamin C and endothelial function in smokers: short-term improvement, but no sustained beneficial effect. *J Am Coll Cardiol*, 2000, **35**: 1616-1621
- [6] Jackson TS, Xu A, Vita JA, Keaney JF Jr. Ascorbate prevents the interaction of superoxide and nitric oxide only at very high physiological concentrations. *Circ Res*, 1998, **83**: 916-922
- [7] Fukuchi M, Giald A. Endothelial expression of endothelial nitric oxide synthase and endothelin-1 in human coronary artery disease. Specific reference to underlying lesion. *Lab Invest*, 1999, **79** (6): 659-670
- [8] 王奇,陈云波,赖世隆,梁伟雄,温泽淮. 血府逐瘀汤对血瘀证兔模型血清损伤的血管内皮细胞内分泌功能的影响. 中国实验方剂学杂志, 2002, **8** (2): 12-14
- [9] Tanner FC, Noll G, Boulanger CM, Luscher TF. Oxidized low density lipoproteins inhibit relaxation of porcine coronary arteries. *Circulation*, 1991, **83**: 2012-2013
- [10] 王庸晋,魏武,王治平,公惠平. 氧化型极低密度脂蛋白诱导小鼠腹腔巨噬细胞凋亡. 中国动脉硬化杂志, 2004, **12**: 19-22
- [11] Eto M, Barandier C, Rathgeb L, Kozai T, Joch H, Yang Z, et al. Thrombin suppresses endothelial nitric oxide synthase and upregulates endothelin converting enzyme-1 expression by distinct pathways: role of Rho/Rock and mitogen-activated protein kinase. *Circ Res*, 2001, **89** (7): 583-590
- [12] 魏寿兰,李萍,刘汉,景本年,李卓江. 脑梗死患者凝血分子标志物变化及丹参干预治疗的研究. 中风与神经疾病杂志, 2002, **19** (1): 32-34
- [13] 李亚俊,宋剑南,周瑕箴,牛晓红,王宇辉,金红,等. 脂素胶囊对实验性动脉粥样硬化家兔内皮素及一氧化氮合酶基因表达的影响. 中国动脉硬化杂志, 1999, **7**: 4-8
- [14] 陈志勇,翁进,李福刚,汪钟. 764-3对血小板功能及血管内皮细胞抗凝作用的影响. 中国动脉硬化杂志, 1994, **2**: 137-139

(此文编辑 朱雯霞)