

当归对自发性高血压大鼠脑组织 Tnfaip8l2、Ahsg 及 Tlr3 基因表达的影响

伊琳¹, 赵昕², 李屹¹

(1. 甘肃中医学院中西医结合系; 2. 兰州大学基础医学院遗传学研究所, 甘肃省兰州市 730000)

[关键词] 当归; 基因表达谱; 肿瘤坏死因子 α 诱导蛋白 8 样蛋白; α_2 -HS 糖蛋白; Toll 样受体 3

[摘要] 目的 探讨当归对自发性高血压(SHR)大鼠脑组织肿瘤坏死因子 α 诱导蛋白 8 样蛋白(Tnfaip8l2)、 α_2 -HS 糖蛋白(Ahsg)及 Toll 样受体 3(Tlr3)基因表达谱的影响。方法 将 SHR 大鼠分为当归组、模型组,并将同周龄的 Wistar 大鼠作为对照组。测定用药前后各组尾动脉收缩压;分组灌胃给药 4 周后,取大鼠脑组织,提取 RNA 进行表达谱的测定。结果 当归可降低 SHR 大鼠的血压水平;同时基因表达谱分析显示当归可导致 Tnfaip8l2、Ahsg 及 TLR3 基因表达上调,且为差异表达上调基因,而这三个基因均为动脉粥样硬化抑制因子。结论 当归具有一定的降压作用,并对 SHR 脑组织基因表达谱产生影响,通过抑制动脉粥样硬化的发生发挥作用。

[中图分类号] R394.3

[文献标识码] A

The Effect of Angelica on Expression of Tnfaip8l2, Ahsg and TLR3 Gene in Brain Tissue of Spontaneously Hypertensive Rats

YI Lin¹, ZHAO Xin², and LI Yi¹

(1. Department of Cooperation of Chinese and Western Medicine, Gansu College of Traditional Chinese Medicine; 2. Institute of Genetics of Basic Medical Sciences School, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730000, China)

[KEY WORDS] Angelica; Gene Expressive Profile; Tnfaip8l2; Ahsg; Tlr3

[ABSTRACT] **Aim** To clarify the effects of Angelica on Tnfaip8l2, Ahsg and Tlr3 gene of brain in spontaneously hypertensive rats (SHR). **Methods** The SHR were divided into Angelica group and model group, week-old Wistar rats was act as control group. Systolic blood pressure was measured in different groups before and after treatment, after 4 weeks, RNA from brain of mice was extracted and gene expressive profile was measured. **Results** Angelica can reduce blood pressure levels in SHR. Compared with the model group, Tnfaip8l2, Ahsg and Tlr3 gene in Angelica group were up-regulated in gene expression profile which biology process was all related to inhibition of atherosclerosis. **Conclusion** Angelica has some function of antihypertensive and can regulate the gene expression profile of brain in SHR. Angelica produce marked effect mainly through inhibiting atherosclerosis.

原发性高血压(EH)为临床常见病和多发病,同时也是心肌梗死、心力衰竭、血管疾病、脑卒中和肾脏病发病的主要危险因素^[1]。高血压所致心脑血管疾病的相对危险高达 3~4 倍。有研究表明,23.7% 的急性冠心病归因于高血压,我国脑卒中发生危险的 40%~50% 归因于高血压^[2]。可见高血压对脑组织具有很重要的影响。传统中药当归,俗有“十方九归”之称,其味辛、甘,而性微温,归心、肝、脾三经,具有补血、活血化瘀的功效。当归同时

还有抗炎、清除氧自由基、保肝利胆、保护肾脏、增强免疫功能等作用^[3]。本研究主要通过当归干预,利用基因表达谱研究与高血压变化相关的基因,为进一步探讨高血压脑损伤提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 动物选择

12 周龄雄性自发性高血压大鼠(SHR)及正常

[收稿日期] 2013-06-04

[作者简介] 伊琳,博士,副教授,主要研究方向为原发性高血压,E-mail 为 yxxlyyy@163.com。赵昕,硕士,主要研究方向为医学遗传学,E-mail 为 zhaox2011@lzu.edu.cn。李屹,博士,主要研究方向为医学遗传学,E-mail 为 liyilz@163.com。

血压 Wistar 大鼠(体重 250 ~ 270 g),分别购自北京维通利华实验动物有限责任公司(动物合格证号 SCXK(京)2006-2009)和甘肃中医学院实验动物中心。SHR 大鼠分为模型组与当归组,Wistar 大鼠为对照组,每组 10 只。试验程序和方法得到甘肃中医学院医学伦理学会批准。

1.2 药物及试剂

由甘肃中医学院科研实验中心与甘肃省膜科学研究院联合制备的当归超滤膜液,较好地去除了药液中的大分子蛋白质、树脂、鞣质等成分,稳定药液性质,显著提高了药效。以 10 万分子量浓度为 7.5 g/L 的超滤物制备当归超滤膜液。

1.3 实验分组及血压测定

将小动物血压计和生物信号机能系统连接在一起(BP-98A 大鼠血压测定仪,日本软隆生物技术有限公司),采用无创性套尾法测定大鼠清醒状态下尾动脉收缩压,测定血压前将大鼠放入 37 ± 1℃ 保温筒内预热,感觉到大鼠尾动脉的清晰搏动为度,用尾动脉测压法测定大鼠的收缩压。正式实验前每天测血压训练 1 次,连续 2 周,待大鼠适应环境血压稳定后将 SHR 随机分为两组,即模型组(0.5% 生理盐水)和当归组(0.3 g 当归/100 g 大鼠),对照组也给予 0.5% 生理盐水灌胃,每周称量体重 1 次,并且依据体重调整给药量,连续 4 周给药,测每周血压,每只大鼠测量 5 次血压,取平均值。

1.4 样本采集及基因表达谱测定

给药 4 周后,将动物禁食 12 h,称重,水合氯醛麻醉后将大鼠颈椎脱臼处死,开颅取出脑组织。DEPC 水冲洗后,取脑组织 100 mg,立即置于液氮保存。运用标 Trizol 方法提取总 RNA,按说明书操作,经紫外分光光度仪和 1% 变性琼脂糖凝胶电泳鉴定总 RNA。将提取的 RNA 按照要求送去博森生物科技(北京)有限公司进行表达谱的测定。

1.5 表达谱芯片数据分析

尾动脉收缩压数据分析采用 SPSS20.0 软件包进行统计学处理,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,当 $P < 0.05$ 时有统计学意义。芯片结果应用 GCOS1.4 软件对荧光信号的强度和比值进行计算和统计分析。应用 GeneSpring 软件(version7.2)进行两组间微阵列结果的两两比较并筛选出 P 值 < 0.01 并且两组间差异表达倍数大于 2 的基因,做为差异表达的基因。通过 Affymetrix 网站(www. Affymetrix. com)分析中心(Go Gene Ontology)分类数据库中基因生物学过程描述的查询,以确定差异表达基因的最新信息。

2 结 果

2.1 当归对 SHR 大鼠尾动脉收缩压的影响

模型组大鼠收缩压显著高于对照组 ($P < 0.01$);连续灌服当归溶液 4 周后,当归组收缩压显著下降,与模型组比较差异有显著性 ($P < 0.01$; 表 1)。可见当归可以降低 SHR 大鼠血压水平。

表 1. 当归对 SHR 大鼠尾动脉收缩压的影响 (mmHg)
Table 1. The effect of Angelica on systolic blood pressure in SHR (mmHg)

时 间	对照组	模型组	当归组
给药前	112.4 ± 7.4	197.4 ± 8.3	195.8 ± 7.1
给药 1 周	110.6 ± 6.5	187.6 ± 9.8 ^a	159.5 ± 6.5 ^{ab}
给药 2 周	113.4 ± 9.0	194.3 ± 15.3 ^a	152.6 ± 7.1 ^{ab}
给药 3 周	117.8 ± 8.7	189.7 ± 11.2 ^a	141.5 ± 12.3 ^{ab}
给药 4 周	119.4 ± 10.3	181.2 ± 7.3 ^a	140.2 ± 5.4 ^{ab}

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与模型组比较。

2.2 表达谱芯片结果

与模型组比较,当归组信号值变化幅度 2 倍以上的差异表达基因共计 85 个,在 85 个差异表达基因中,已知生物学过程的基因有 38 个(上调 23 个,下调 15 个;表 2 和表 3),其中肿瘤坏死因子 α 诱导蛋白 8 样蛋白 (Tnfaip8l2) 基因、 α_2 -HS 糖蛋白 (Ahsg) 基因和 Toll 样受体 3 (Tlr3) 基因这 3 个基因为差异表达基因,且均为上调基因。

表 2. 上调的差异表达基因

基 因	log2 (ratio)	P 值
Tnfaip8l2	2.27	0.033
Ahsg	2.01	0.009
Cyp26b1	2.74	0.001
Gria3	2.08	0.008
Itga1	3.46	0.048
Bmp3	2.36	0.001
Sorl1	2.36	0.0005
Ank3	2.07	0.018
Slc22a9	5.38	0.0001
Lhx9	2.08	0.001
Shox2	2.69	0.001
Nr4a3	2.38	0.001
Nr4a2	2.40	0.001
Cblb	2.04	0.006
Tlr3	2.50	0.014
Spata6	2.10	0.0001
Prss35	2.38	0.003
Ttn	2.10	0.026
Dnah8	2.03	0.012
Slc38a4	2.57	0.001
Osbpl3	2.78	0.0001
Pdia2	2.15	0.028
Ero1l	2.11	0.038

表 3. 下调的差异表达基因

Table 3. Down-regulated differentially express gene

基因	log2(ratio)	P 值
Arl6ip4	- 2. 72	0. 001
Lgf2bp1	- 2. 69	0. 037
Aurkb	- 2. 00	0. 047
Rgs11	- 2. 54	0. 0003
Nog	- 2. 00	0. 039
Gpr149	- 2. 84	0. 0009
Olr1219	- 2. 21	0. 0099
Tshr	- 2. 29	0. 001
Mlana	- 2. 97	0. 0099
Mfsd10	- 2. 33	0. 0008
Cyp2a3	- 2. 76	0. 015
Cst11	- 2. 50	0. 033
Mgat4a	- 2. 17	0. 001
Fabp1	- 2. 27	0. 003
Defb4	- 2. 28	0. 001

3 讨 论

中药当归其主要有效成分是阿魏酸钠, 其他还包括丁十二酸、藁本内酯等。已有研究发现当归含有一种新的降血压成分 5-羟甲基糠醛, 可与当归中的其他组分共同作用降低血压^[4]。其降压的机制则是通过兴奋中枢 β 、M 受体和外周 M 胆碱受体、阻滞 Ca^{2+} 通道、降低肾素-血管紧张素活性、扩张小血管、利尿、加速微循环血流和降低高血黏度等综合作用的结果^[4]。现代药理研究同时表明其抗脑缺血作用与抑制血小板聚集、抗血栓、抗动脉粥样硬化、改善血液流变性、促进造血、抗贫血、抗氧化、清除自由基、脑缺血损伤的保护等多种药理活性有关。研究证明当归具有促进脑缺血后侧枝循环的建立和血管新生的作用^[5,6]。

原发性高血压是一种常见的多因素所致的疾病, 与遗传、环境、人口统计学、血管及神经内分泌等多方面有关, 在所有心血管疾病中, 原发性高血压是最主要的危险因素, 高血压合并脑卒中者约占人群脑卒中总数的 70%, 确诊高血压者发生脑卒中的相对危险性是一般人群的 32 倍^[7]。而动脉粥样硬化与高血压及脑卒中都有着密不可分的关系, 本研究发现当归可以降低自发性高血压大鼠血压, 同时通过基因芯片表达谱的分析, 筛选出 38 个差异表达基因, 23 个上调的差异表达基因其生物学过程主要与信号转导、转录和代谢有关。而 15 个下调的差异表达基因其生物学过程主要与信号转导和蛋白

质结合有关。其中 Tnfaip8l2、Ahsg 及 Tlr3 三个基因均为差异表达的上调基因, Tnfaip8l2 基因的生物学过程与蛋白质结合有关; Ahsg 的生物学过程与信号转导有关; Tlr3 则与转录相关。Tnfaip8l2 基因是美国学者陈有海教授实验室于 2008 年从实验性自身免疫脑脊髓炎小鼠模型中发现的新基因, 章桂忠研究发现 Tnfaip8l2 缺陷鼠其颈动脉内膜增生过程加速, 认为 Tnfaip8l2 基因是潜在的动脉粥样硬化抑制因子^[8]。在高加索人群中的研究认为 Ahsg 基因多态性与总胆固醇及低密度脂蛋白水平相关^[9]。Tlr3 基因亦被认为是动脉管壁的保护性因子, 缺乏 Tlr3 基因将极大加速载脂蛋白 E 基因敲除鼠动脉粥样硬化和高脂血症的形成^[10]。因此可以认为 Tnfaip8l2、Ahsg 及 Tlr3 三个基因均是动脉粥样硬化抑制因子, 在当归处理后的 SHR 中基因表达上调, 可以推测当归有可能通过这 3 个基因发挥其抗动脉粥样硬化的作用, 同时达到降低血压的作用。至于其表达丰度、作用路径和相互关系, 在后续的研究中, 将把它们作为差异表达的靶基因进行更深入的研究, 以证实我们的推测并进一步揭示当归降压的分子机制。

[参考文献]

[1] Staessen JA, Wang J, Bianchi G, et al. Essential hypertension[J]. Lancet, 2003, 361(9369): 1 629-641.

[2] 赵 钢. 脑卒中防治与血压管理[J]. 中华高血压杂志, 2013, 2: 87-89.

[3] 李丽丽. 当归属植物研究进展[J]. 中成药, 2009, 4: 601-607.

[4] 当归新的降压成分被发现[J]. 社区医学杂志, 2009, 7(8): 4.

[5] 蒙兰青, 廖维靖, 杨万同, 等. 当归对大鼠缺血性脑损伤再灌注后血管生成的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2005, 20(2): 84-86.

[6] 何晓莉, 关雪晶, 吴 宏, 等. 当归多糖对电离辐射致小鼠骨髓单个核细胞凋亡及氧化损伤的影响[J]. 重庆医科大学学报, 2012, 37(4): 315-319.

[7] 王天根, 组群研究. 流行病学[M]. 北京: 北京医科大学出版社, 1988; 89.

[8] Zhang GZ, Zhang WQ, Lou YW, et al. TIPE2 deficiency accelerates neointima formation by downregulating smooth muscle cell differentiation [J]. Cell Cycle, 2013, 12(3): 501-510.

[9] Nahum S, Drier Y, Avidan N, et al. Different peripheral-blood gene expression in patients with acute myocardial infarction and stable coronary[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2011, 57(5): 542-549.

[10] Cole JE, Navin TJ, Cross AJ, et al. Unexpected protective role for Toll-like receptor 3 in the arterial wall[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108: 62 372-377.

(此文编辑 许雪梅)