

或下降时,导致机体对乙醇的吸收提高,从而加重乙醇对肝、肾、脑等脏器的损害。本实验另一研究结果表明随着大鼠白酒灌胃时间的延长,血中乙醇浓度逐渐升高。给药治疗 8 周和 12 周后,葛花枳椇子各剂量配伍组均可明显降低血中乙醇浓度,且至第 12 周末,配伍低剂量组血中乙醇浓度最低,显示一定的治疗优势,提示随着给药时间的延长治疗效果越好。

结合大鼠酒后血中乙醇质量浓度和肝中乙醇脱氢酶活性的改变,可以看出给药 8 周和 12 周后低剂量组大鼠肝中 ADH 活性增强,血中乙醇浓度明显降低。并且随着给药时间的延长,低剂量组可以通过增强乙醇脱氢酶活性加强肝脏对乙醇的代谢,降低对肝脏的损伤而起到一定的保肝效果。

参 考 文 献

- [1] Cohen JJ, Nagy LE. Pathogenesis of alcoholic liver disease: interactions between parenchymal and nonparenchymal cells[J]. J Dig Dis, 2011, 12(1): 3.
- [2] 厉有名. 酒精性肝病的流行病学特点[J]. 实用肝脏病杂志, 2012, 15(3): 180-182.
- [3] 卿笃信, 凌奇荷. 酒精代谢酶与酒精性肝病的关系研究进展[J]. 国外医学·生理、病理科学与临床分册, 2003, 23(3): 310.
- [4] 柳海艳. 葛花枳椇子配伍对酒精性肝损伤的防治作用及机理探讨[D]. 北京: 北京中医药大学, 2011.
- [5] 李先栓. 乙醇代谢物的解毒探究[J]. 实验教学与仪器, 2010, (10): 36-37.
- [6] 时代音, 董蕾, 鲁晓岚, 等. 乙酰半胱氨酸对大鼠酒精性肝病的保护作用研究[J]. 陕西医学杂志, 2012, 41(5): 519.
- [7] You M, Crabb DW. Recent Advances in Alcoholic Liver Disease II. Minireview: molecular mechanisms of alcoholic fatty liver[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2004, 287(1): G1-G6.
- [8] 杨万枝. 酒精性肝病发病机制研究进展[J]. 安徽医科大学学报, 2012, 47(1): 97-99.
- [9] Tilg H, Moschen AR, Kaneider NC, et al. Pathways of liver injury in alcoholic liver disease [J]. J Hepatol, 2011, 55(5): 1159-1161.

(收稿日期: 2014-09-02)

(本文编辑: 蒲晓田)

连夏配方颗粒对心肌梗死后大鼠心梗周围区神经生长因子 mRNA、酪氨酸激酶受体 A mRNA 表达的影响

李家立 李平 马洪皓 白芳芳 田辰 郝腾 赵利 朱国东

【摘要】 目的 观察连夏配方颗粒对心肌梗死后大鼠心梗周围区心肌组织神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) mRNA、酪氨酸激酶受体 A (tyrosine kinase receptor A, TrKA) mRNA 表达的影响。**方法** 将 90 只清洁级健康 7 周龄 Wistar 雄性大鼠随机分为假手术组、心梗模型组、美托洛尔组、连夏配方颗粒高、中、低剂量 (189.00、94.50、47.25 mg/kg) 组。各组均结扎左冠状动脉前降支以复制心肌梗死大鼠模型, 假手术组只穿线, 不结扎。假手术与心梗模型组大鼠予生理盐水, 余各组予相应实验药物; 连续灌胃给药 30 天, 采用 Real-time RT-PCR 方法检测心梗周围区 NGF mRNA、TrKA mRNA 表达水平。**结果** 与假手术组比较, 心梗模型组大鼠心梗周围区心肌组织 NGF mRNA、TrKA mRNA 表达均明显增高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 连夏配方颗粒高、中、低剂量组大鼠心梗周围区 NGF mRNA 表达均明显降低 ($P < 0.01$); 连夏配方颗粒高、中剂量组大鼠心梗周围区 TrKA mRNA

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划 (2007BAI10B027); 北京中医药大学自主选题 (2013-ZYLC-015); 北京中医药大学自主选题 (2013-JYBZZ-XS-170)

作者单位: 100029 北京中医药大学 [李家立 (博士研究生)、田辰、郝腾、赵利、朱国东 (硕士研究生)]; 北京中医药大学第三附属医院内科 (李平、白芳芳), 重症监护室 (马洪皓)

作者简介: 李家立 (1985 -), 2012 级在读博士研究生。研究方向: 中医药防治心血管系统疾病。E-mail: lijiali5678@163.com

通讯作者: 李平 (1965 -), 女, 博士, 主任医师, 博士生导师。研究方向: 中医药防治心血管系统疾病。E-mail: pearll2008@126.com

NA 表达均明显降低($P < 0.01$);与美托洛尔组比较,连夏配方颗粒高剂量组大鼠心梗周围区 NGF mRNA 表达明显降低($P < 0.05$)。结论 连夏配方颗粒可显著降低心肌梗死后大鼠心梗周围区心肌组织 NGF mRNA、TrKA mRNA 的表达,达到改善心肌梗死后大鼠心梗周围区自主神经重构的作用。

【关键词】 连夏配方颗粒; 心肌梗死; 自主神经重构; 神经生长因子; 酪氨酸激酶受体 A
【中图分类号】 R285.5 【文献标识码】 A doi: 10.3969/j.issn.1674-1749.2015.03.010

Effects of LianXia Formula Granule on NGF mRNA and TrKA mRNA expression level at infarcted border zone of rats after myocardial infarction LI Jia-li, LI Ping, MA Hong-hao, et al. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Corresponding author: LI Ping, E-mail: pearll2008@126.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the effects of LianXia Formula Granule (LXFG) on NGF mRNA、TrKA mRNA expression level at infarcted border zone of rats after myocardial infarction (MI).

Methods Ninety healthy male Wistar rats were randomly assigned to six groups: sham operated group, model group, metoprolol group, high, middle and low-dose of LXFG group (189.00, 94.50, 47.25 mg/kg). The sham operated rats were not ligated in the left anterior descending coronary artery except the rest groups. The sham operated group and model group were given with normal saline by intragastric administration, and the rest groups were given with medicine for testing. 30 days later, NGF mRNA, TrKA mRNA expression level were separately measured in all groups. **Results** Compared with the model group, NGF mRNA expression level in the high, middle and low-dose of LXFG group decreased ($P < 0.01$) and TrKA mRNA expression level in the high and middle-dose of LXFG group decreased ($P < 0.01$). Compared with the metoprolol group, NGF mRNA expression level in the high-dose of LXFG group decreased ($P < 0.05$).

Conclusion Application of LianXia Formula Granule in rats after MI can significantly decrease the expression level of NGF mRNA、TrKA mRNA to improve cardiac autonomic neural remodeling.

【Key words】 LianXia Formula Granule; Myocardial Infarction; Cardiac Autonomic Neural Remodeling; Nerve growth factor; Tyrosine kinase receptor A

神经生长因子(nerve growth factor, NGF)作为最先被发现的神经营养因子,具有促进神经细胞存活和生长发育的作用^[1-3]。而酪氨酸激酶受体 A (tyrosine kinase receptor A, TrkA)可激活多个胞内信号通路参与 NGF 介导的神经细胞轴突生长、神经元分化存活以及神经元特性的维持等诸多过程,是 NGF 信号转导通路上的重要信号蛋白^[2-6]。

本研究通过复制心肌梗死大鼠模型,连续灌胃给予实验药物,旨在观察中药小复方连夏配方颗粒(组名中简称连夏)对心肌梗死后大鼠心梗周围区 NGF mRNA、TrKA mRNA 表达的影响,探讨连夏配方颗粒对心肌梗死后大鼠心梗周围区自主神经重构的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级健康 7 周龄 Wistar 雄性大鼠 90 只,北京华阜康生物科技股份有限公司,许可证:SCXK(京)2009-0007。

1.2 主要药品与试剂

连夏配方颗粒,北京康仁堂药业有限公司。酒石酸美托洛尔片,阿斯利康制药有限公司,批号:1103070C。UltraSYBR Mixture (With ROX) (CW0956)、超纯 RNA 提取试剂盒(CW0581)、DNase 1 (CW2090)、5xRNA Loading Buffer (CW0611A)、HiFi-MMLV cDNA 第一链合成试剂盒(CW0744)等均购自北京康为世纪生物科技有限公司。

1.3 主要仪器

分光光度计(NANODROP 2000, Thermo scientific)、涡旋振荡仪(QL-902, 海门其林贝尔仪器公司)、荧光定量 PCR 仪(ABI7500, Applied Biosystems)、离心机(Centrifuge 5415D, Eppendorf)等。

1.4 分组与给药

将 90 只大鼠随机分为假手术组、心梗模型组、美托洛尔组、连夏高、中、低剂量(189.00、94.50、47.25 mg/kg)组,每组 15 只。假手术组、心梗模型组大鼠分别予 0.9% 生理盐水 10 mL/kg 灌胃,美托洛尔组大鼠予美托洛尔 100 mg/kg 灌胃,连夏配方

颗粒高、中、低剂量组大鼠分别给予相应剂量连夏配方颗粒灌胃;模型建立的当天即灌胃给药;每天给药 1 次,连续进行 30 天;每天每只大鼠 0.9% 生理盐水的灌胃量均为 10 mL/kg。最终每组取 3 只大鼠进行指标检测。

1.5 模型复制

大鼠模型复制采用手术结扎法^[7],经用 3.5% 水合氯醛 10 mL/kg 剂量腹腔麻醉,仰卧固定大鼠后,于左侧第 4、5 肋间切口,打开胸腔、心包,轻压胸廓挤出心脏,结扎冠状动脉左前降支,后立即将心脏放回,关闭切口,缝合皮肤,局部应用青霉素防感染。假手术组大鼠只穿线不结扎。

1.6 取材与指标检测

给药 30 天后进行取材:腹腔麻醉,取心梗周围相同区域心肌组织,迅速放入液氮降温后,转移至 -80℃ 冰箱保存。采用 Real-time RT-PCR 方法进行指标检测:取心肌组织 100 mg,用 RNA 提取试剂盒提取组织样本中总 RNA,取总 RNA 1 μL 以紫外分光光度计测定 RNA 纯度、浓度,计算 OD260/OD280 比值,比值在 1.8 ~ 2.0 之间视为纯度较高、完整性较好,否则重新提取 RNA,并计算总 RNA 浓度。按照试剂盒说明书进行逆转录,合成 cDNA,再进行 cDNA 扩增,引物序列见表 1。用 ABI7500 型荧光定量 PCR 仪,采用 2^{-ΔΔCT} 法计算目的基因的表达变化。实验步骤参照试剂盒说明书及文献^[8-9] 进行。

表 1 引物序列

引物名称(长度)	碱基序列(5' to 3')
NGF(149 bp)	F: TGCATAGCGTAATGTCCATGTTG
	P: TGTGTCAAGGGAATGCTGAAGT
TrKA(95 bp)	F: ACCCAGTGGAGAAGAAGGACGAAAC
	P: TAGGAGGAGGGCAGAAAGGAAGA
GAPDH(138 bp)	F: TGGAGTCTACTGGCGTCTT
	P: TGTTCATATTCTCGTGTTCA

1.8 统计学方法

数据全部采用 SPSS 17.0 软件进行分析。计量数据均以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,数据均符合正态分布且方差齐,故均采用 One-way ANOVA 分析,组间比较用 LSD 法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对心肌组织 NGF mRNA 表达的影响

与假手术组比较,心梗模型组大鼠心肌梗死周围区心肌组织 NGF mRNA 明显升高 ($P < 0.01$)。给药 30 天后,与心梗模型组比较,美托洛尔组大鼠 NGF mRNA 明显降低 ($P < 0.01$);连夏配方颗粒高、中、低剂量组大鼠 NGF mRNA 均明显降低 ($P < 0.01$)。与美托洛尔组比较,连夏配方颗粒高剂量组大鼠 NGF mRNA 明显降低 ($P < 0.05$)。说明连夏配方颗粒可以显著改善心肌梗死后大鼠心梗周围区心肌组织 NGF mRNA 的表达,上述差异均有统计学意义,见表 2。

表 2 各组大鼠心肌组织 NGF mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	NGF mRNA
假手术组 ($n=3$)	0.51 ± 0.06
心梗模型组 ($n=3$)	1.49 ± 0.16 ^a
美托洛尔组 ($n=3$)	0.97 ± 0.04 ^{ab}
连夏高剂量组 ($n=3$)	0.78 ± 0.09 ^{abc}
连夏中剂量组 ($n=3$)	0.96 ± 0.04 ^{ab}
连夏低剂量组 ($n=3$)	1.09 ± 0.12 ^{ab}

注:与假手术组比较,^a $P < 0.01$;与心梗模型组比较,^b $P < 0.01$;与美托洛尔组比较,^c $P < 0.05$

2.2 对心肌组织 TrKA mRNA 表达的影响

与假手术组比较,心梗模型组大鼠心肌梗死周围区心肌组织 TrKA mRNA 明显升高 ($P < 0.01$)。给药 30 天后,与心梗模型组比较,美托洛尔组大鼠 TrKA mRNA 明显降低 ($P < 0.01$);连夏配方颗粒高、中剂量组大鼠 TrKA mRNA 均明显降低 ($P < 0.01$)。与美托洛尔组比较,连夏配方颗粒高剂量组大鼠 TrKA mRNA 无明显变化 ($P > 0.05$)。说明连夏配方颗粒可以明显改善心肌梗死后大鼠心梗周围区心肌组织 TrKA mRNA 表达,上述差异均有统计学意义,见表 3。

3 讨论

NGF 是最早被发现的神经营养因子家族成员,包括 α、β、γ 三个亚基,其中的 β 亚基则是 NGF 的活性亚单位,发挥 NGF 的全部生物学效应。NGF 可以促进感觉神经元及交感神经元的存活及分化,参

表 3 各组大鼠心肌组织 TrKA mRNA 表达的影响

($\bar{x} \pm s$)

组别	TrKA mRNA
假手术组($n=3$)	0.68 ± 0.04
心梗模型组($n=3$)	1.92 ± 0.07^a
美托洛尔组($n=3$)	0.95 ± 0.05^{ab}
连夏高剂量组($n=3$)	0.86 ± 0.04^{ab}
连夏中剂量组($n=3$)	1.27 ± 0.07^{abc}
连夏低剂量组($n=3$)	1.89 ± 0.10^{ac}

注:与假手术组比较,^a $P < 0.01$;与心梗模型组比较,^b $P < 0.01$;与美托洛尔组比较,^c $P < 0.01$

与损伤修复,维持神经元生物学功能的稳定;对此在控制神经系统的生长、发育、存活和再生等方面研究较为广泛^[2-3, 10]。研究指出,除外源性 NGF,心肌细胞也可以自主合成并分泌 NGF。它在心肌受损后立刻被释放到相应部位,促进心脏神经的生长及受损去甲肾上腺素能神经元的再生,因此可能参与心肌梗死后心脏自主神经支配、再生和过度支配过程,进而与心肌梗死后致命性心律失常的发生密切相关^[11-13]。

TrkA 是 NGF 的高亲和力受体,与 NGF 具有较高的亲和力;它是一种由 TrkA 原癌基因表达的、具有酪氨酸蛋白激酶活性的跨膜蛋白^[2, 4-5, 14],其下游通路主要包括有丝分裂素活化蛋白激酶(MAPK)通路、PI3K/Akt 通路和 PLC γ 通路等^[3, 6, 10, 15]。TrKA 一般介导正性信号,与到目前为止研究仍不明确、主要介导负性信号的 NGF 低亲和力受体 p75 受体(p75 NTR)一起调控着神经生长、存活和分化^[16-17]。

本实验结果表明,中药小复方连夏配方颗粒可以显著降低心肌梗死后大鼠心梗周围区心肌组织 NGF 和 TrKA 两者的 mRNA 表达水平。研究显示,连夏配方颗粒之所以能够显著改善心肌梗死后大鼠心梗周围区心脏交感神经与迷走神经的再生重构^[18],其作用机制可能与连夏配方颗粒可以有效降低心肌梗死周围区心肌组织 NGF mRNA 与 TrKA mRNA 表达有关,但其具体作用机制尚需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 陈双叶,方秀斌. NGF 促进神经细胞生长发育的信号通路及与哮喘发病的关系[J]. 解剖科学进展, 2007, 13(4):

388-391.

- [2] T Toni, P Dua, PH van der Graaf. Systems Pharmacology of the NGF Signaling Through p75 and TrkA Receptors[J]. CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol, 2014, (3): e150.
- [3] Chao MV. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways[J]. Nat Rev Neurosci, 2003, 4(4): 299-309.
- [4] Huang EJ, Reichardt LF. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction[J]. Annu Rev Biochem, 2003, (72): 609-642.
- [5] Esposito D, Patel P, Stephens RM, et al. The cytoplasmic and transmembrane domains of the p75 and Trk A receptors regulate high affinity binding to nerve growth factor[J]. J Biol Chem, 2001, 276(35): 32687-32695.
- [6] Reichardt LF. Neurotrophin-regulated signalling pathways[J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2006, 361(1473): 1545-1564.
- [7] 李贻奎,宁可永,梁嵘,等. 大鼠冠状动脉结扎心肌缺血模型方法的改进[J]. 中国新药杂志, 2005, 14(4): 427-428.
- [8] 杜金行,李腾飞,宋威江,等. 血府逐瘀胶囊对 AMI 大鼠血清 ICAM-1 及肾脏组织 ICAM-1 mRNA 表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(11): 3534-3536.
- [9] 刘亚坤,何金波,陈海娥,等. 血必净注射液对缺氧/复氧大鼠心肌 TLR4-NF- κ B-TNF- α 通路的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2014, 34(12): 1463-1468.
- [10] 徐光辉,汤善宏,陈康,等. 神经生长因子及受体与肿瘤发生关系研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2012, 20(7): 1510-1513.
- [11] 郭继鸿. 交感神经重构[J]. 临床心电学杂志, 2008, 17(4): 311-316.
- [12] Cao JM, Chen LS, KenKnight BH, et al. Nerve sprouting and sudden cardiac death[J]. Circ Res, 2000, 86(7): 816-821.
- [13] Zhou S, Chen LS, Miyauchi Y, et al. Mechanisms of cardiac nerve sprouting after myocardial infarction in dogs[J]. Circ Res, 2004, 95(1): 76-83.
- [14] Rost B, Hanf G, Ohnemus U, et al. Monocytes of allergics and non-allergics produce, store and release the neurotrophins NGF, BDNF and NT-3[J]. Regul Pept, 2005, 124(1-3): 19-25.
- [15] 梁家宏,尹朝晖. 神经生长因子及受体在肿瘤中的表达及临床意义[J]. 中国医药科学, 2013, 3(12): 33-34.
- [16] Takei Y, Laskey R. Tumor necrosis factor alpha regulates responses to nerve growth factor, promoting neural cell survival but suppressing differentiation of neuroblastoma cells[J]. Mol Biol Cell, 2008, 19(3): 855-864.
- [17] 何学元,张有成. 神经生长因子及其受体与肿瘤相关性研究进展[J]. 国际消化病杂志, 2010, 30(4): 234-236.
- [18] 张赫楠. 连夏颗粒干预心梗后自主神经重构防治心脏恶性事件的实验研究[D]. 北京: 中国中医科学院广安门医院, 2014.

(收稿日期:2015-01-26)

(本文编辑:黄凡)