

天麻与钩藤配伍前后对SHR大鼠肝脏相关基因表达的影响[△]

李晓倩*, 王兴#, 李莹, 袁琳, 张卫国(西南交通大学生命科学与工程学院, 成都 610031)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)07-0580-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.07.02

摘要 目的:研究天麻与钩藤配伍前后对SHR大鼠肝脏相关基因表达的影响。方法:实验分为空白、天麻(2.3 ml)、天麻钩藤(2.7 ml)组,灌胃给药,每天1次,连续10 d。末次给药后提取肾脏mRNA,与基因芯片进行杂交,经扫描、计算机软件分析后观察配伍前后基因表达的变化。结果:筛选出天麻与钩藤配伍前后在肝脏中的相关基因16个,主要集中在调控血脂代谢、炎症反应、G-蛋白偶联受体介导的信号通路以及胰岛素抵抗等方面。结论:天麻钩藤配伍后可增强天麻对肝脏的相关作用。

关键词 天麻;钩藤;配伍;肝脏;基因表达

Impact of the Compatibility of *Gastrodia elata* with *Uncaria Ramulus Cum uncis* on Liver Gene Expression in SHR Rats

LI Xiao-qian, WANG Xing, LI Ying, YUAN Lin, ZHANG Wei-guo(School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the impact of the compatibility of *Gastrodia elata* with *Uncaria Ramulus Cum uncis* on liver gene expression in SHR rats. METHODS: SHR rats were divided into 3 groups, i.e. blank group, *G. elata*(2.3 ml) group, *G. elata* and *Uncaria Ramulus Cum uncis*(2.7 ml) group. They were given medicine intragastrically once a day for consecutive 10 days. The mRNA in the kidney of SHR rats was extracted after the last medication, and then was hybridized with gene chip. After computerized scanning and analyzing, the changes of gene expression were observed before and after compatibility. RESULTS: 16 target genes were selected before and after compatibility of *G. elata* with *Uncaria Ramulus Cum uncis*, in field of regulating lipid metabolism, inflammatory reaction, G-protein coupled receptor mediated signal channel and insulin resistance. CONCLUSION: It indicates that the related effects of *G. elata* on liver are strengthened after the compatibility.

KEY WORDS *Gastrodia elata*; *Uncaria Ramulus Cum uncis*; Compatibility; Liver; Gene expression

天麻是兰科植物天麻 *Gastrodia elata* BL. 的干燥块茎,性甘,味平,归肝经,为治疗肝阳上亢、肝风内动的要药^[1]。天麻与钩藤的配伍应用源自天麻钩藤饮,其出自《中医内科杂病证治新义》,具有平肝潜阳、补益肝肾、清热活血的作用,是治疗高血压肝阳上亢证的经典方。归经理论是中药药性理论的重要组成部分,但对于中药归经的实质,即中药是通过何种途径对机体的某些脏腑经络产生选择作用,这些作用经过了什么环节,有哪些物质基础,目前尚不清楚。本研究利用基因芯片,研究了天麻与钩藤配伍前后大鼠肝脏中相关基因表达的变化,从基因表达的角度探讨了中药配伍对天麻归肝经的影响。

1 材料

1.1 仪器

Z216MK 型台式高速冷冻离心机(德国 Hermle 公司); BioPulverizer TM System I 型生物粉碎机(美国 Bio Spec 公

司); Nanodrop ND-1000 型核酸蛋白定量检测仪(美国 Thermo-Finnigan 公司); Agilent Scanner 芯片扫描仪(美国 Agilent 公司); MICRO-4 杂交炉(英国 Hybaid 公司)。

1.2 药材

天麻(产地:四川峨眉山)、钩藤(产地:安徽亳州),均购自四川新荷花中药饮片股份有限公司,经西南交通大学生命科学与工程学院宋良科副教授鉴定为真品。

1.3 试剂

TE 缓冲液,1× 无菌溶液(pH 8.0, 美国 Amresoc 公司); RNasey Mini Kit 试剂盒(德国 Qiagen 公司); Baseline-ZERO™ DNase(美国 Epicentre 公司); Gene Expression Hybridization Kit 试剂盒、小鼠基因组芯片、旋转芯片杂交片段(美国 Agilent 公司)。

1.4 动物

SPF 级 SHR 大鼠 40 只,14 周龄,♂, 体质量(270±20) g, 由上海斯莱克实验动物有限责任公司供应[动物使用许可证号 SCXK(沪)2008-0005]。饲养于独立送回风净化笼具(IVC)系统中,5 只/盒,温度为(22±3)℃,相对湿度为 50%~80%,光照为 12 h 明/12 h 暗(光照强度为 150~300 lx),饮用水采用无菌水,饲料为卫生质量合格的全价颗粒饲料,并经辐照后喂养。

[△] 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.30801547);中央高校基本科研业务会专项资金资助项目(No.SWJTU09ZT29)

* 硕士研究生。研究方向:中药药理学。E-mail:lxq1055@126.com

通信作者:副教授,硕士研究生导师。研究方向:中药药理学。电话:028-87601838。E-mail:wshing@263.net

2 方法

2.1 药物溶液的制备

2.1.1 天麻混悬液 取天麻 15 g, 粉碎成细粉, 过 200 目筛, 加入 10 倍蒸馏水制成混悬液(含生药 0.1 g/ml), 即得。

2.1.2 天麻钩藤煎液 取天麻 15 g, 加 450 ml 蒸馏水浸泡 1 h 后煎煮, 沸腾 30 min 后加钩藤 20 g, 共煎 15 min, 浓缩成 175 ml (含生药 0.2 g/ml) 溶液, 备用。

为保证样品的一致性, 所有药液均一次制备, 4 °C 贮藏, 备用。

2.2 动物实验

SHR 大鼠适应性饲养 1 周后按体质量随机分为 3 组, 即空白(生理盐水, 3 ml)、天麻(天麻混悬液, 2.3 ml)、天麻钩藤(天麻钩藤煎液, 2.7 ml) 组。所有大鼠均正常饮水。每日上午 10 点 ig1 次, 连续 10 d。末次给药 30 min 后股动脉放血处死。将各组大鼠肾脏分离后, 迅速投入液氮中, 然后移至 -80 °C 贮藏, 备用。

2.3 基因芯片杂交^[2]

合并“2.2”项下各组肝脏组织, 在液氮条件下粉碎组织, 加入 Trizol 试剂, 提取总 mRNA。各组提取的 mRNA 用 cy3 荧光标记成 RNA 探针, 分别与 4 张 Agilent 基因芯片进行杂交、洗涤, 再用基因芯片扫描仪进行扫描, 得到用于数据处理的芯片

扫描图。

2.4 差异表达基因的过滤^[3]

通过 GeneSpring GX 10.0 软件分析, 将给药组与空白组芯片的信号比值转换成差异倍数(表达量经 median normalization 法归一化但不取 lg2 对数值, 取进行比较的 2 个值的绝对比值) 表示基因表达的倍数变化值。本研究将筛选的标准——差异表达基因的阈值设定为 1.5, 表达水平高于或等于阈值的基因即被视为表达有差异。

3 结果

3.1 基因选择

经由 GeneSpring GX 软件将数据处理并过滤后, 进行天麻-肝脏目标基因筛选, 得到天麻组-空白组肝脏差异表达基因 1 788 个, 天麻钩藤组-空白组肝脏差异表达基因 478 个, 在两组差异表达基因中, 共同出现 181 个基因, 对这 181 个基因做天麻钩藤组-天麻组肝脏差异表达的差示倍数分析, 其中有显著性差异(差示倍数 > 1.5) 且经美国国立生物技术信息中心收录的基因共有 15 个, 入选天麻给药后在肝脏中表达的相关期。这可能恰好说明天麻和钩藤二者的引经配对之后对某些生物过程起到的促进或抑制作用, 表现为其相关的基因表达水平显著上调或下调, 从而具有增强某一功效的作用。天麻在大鼠肝脏中的相关基因列表见表 1。

表 1 天麻在大鼠肝脏中的相关基因列表

Tab 1 Target gene list of *G. elata* in liver tissue of rats

基因数据访问标号	基因缩写	表达量			归一化表达量			配伍后倍数变化值	配伍后变化趋势
		空白组	天麻组	天麻钩藤组	空白组	天麻组	天麻钩藤组		
BC103490	LOC497860	92.6	40.9	184.0	2.3	0.8	3.2	5.4	up
NM_144755	Trnb3	628.4	357.9	1 195.9	5.1	3.9	5.9	4.0	up
NM_031620	Phgdh	622.1	1 337.4	3 586.8	5.1	5.8	7.5	3.2	up
NM_080902	Higd1a	32.2	23.4	60.8	0.8	0.0	1.6	3.1	up
NM_053769	Dusp1	936.3	691.6	1 674.9	5.6	4.9	6.4	2.9	up
NM_022209	Ppp2r2b	77.1	54.5	130.5	2.0	1.2	2.7	2.8	up
NM_199381	NAPE-PLD	21.2	15.7	37.1	0.2	-0.6	0.9	2.8	up
XM_217167	RGD1311874	562.7	417.5	125.0	4.9	4.1	2.6	2.8	down
NM_019286	Adh1	33 241.2	9 903.0	22 158.6	10.8	8.7	10.1	2.7	up
XM_240367	RGD1563825	353.9	1 939.0	673.2	4.2	6.3	5.1	2.4	down
NM_199113	Popdc2	164.7	787.1	344.1	3.1	5.0	4.1	1.9	down
NM_031333	Cdh2	34.0	120.4	54.9	0.9	2.3	1.5	1.8	down
AW527866	AW527866	21.2	83.1	38.6	0.2	1.8	0.9	1.8	down
NM_012881	Spp1	24.6	40.6	86.3	0.4	1.9	1.0	1.8	up
NM_031598	Pla2g2a	70.3	208.8	289.1	1.9	3.1	3.8	1.6	up

上述 15 条目标基因, 主要集中在调控血脂代谢、炎症反应、G-蛋白偶联受体介导的信号通路以及胰岛素抵抗等方面。其中调控血脂代谢、炎症反应和胰岛素抵抗的相关基因与天麻钩藤药对治疗高血压肝阳上亢证有密切关系^[4-5]。

3.2 肝脏中调控血脂代谢的相关基因表达趋势

SHR 大鼠给予天麻混悬液后, 在肝脏中天麻对相关基因的作用趋势比较平均, 有的表现为上调, 有的表现为下调, 但是配伍后, 这些基因几乎都出现了明显的上调。天麻能使膜相关磷脂酶 A2(Pla2g2a)、N-酰基磷脂酰乙醇胺-磷酸酯水解酶(NAPE-PLD)、甲状腺特异表达转录基因 Ppp2r2b 表达上调。肝脏中调控血脂代谢的相关基因表达趋势见图 1。

3.3 炎症反应相关基因表达趋势

SHR 大鼠经天麻给药后, 炎症反应相关基因 Spp1 的表达增强; 与钩藤配伍后 Spp1 的表达继续上调。炎症反应相关基

因表达趋势见图 2。

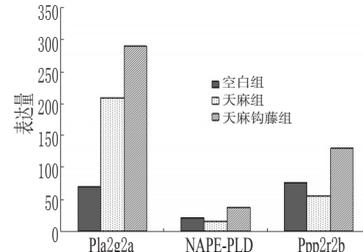


图 1 肝脏中调控血脂代谢的相关基因表达趋势

Fig 1 Expression tendency of gene related to regulation of lipid metabolism in liver

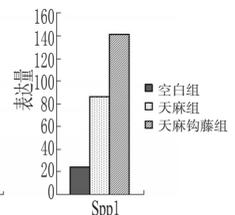


图 2 炎症反应相关基因表达趋势

Tab 2 Expression tendency of gene related to inflammatory reaction

3.4 胰岛素对抗相关基因表达趋势

经天麻单用给药后,双特异性磷酸酶 Dusp1(NM_053769)表达下调,双特异性磷酸酶 Dusp 是胰岛素信号转导分子,Dusp 表达的增强可以提高胰岛素敏感性,配伍后可以使 Dusp1 由下调逆转为显著上调;胰岛素诱导基因 Insig2(NM_178091)表达上调,其表达的上调可以引起胰岛素抵抗,配对后 Insig2 的表达回复到空白组的水平,改善胰岛素抵抗;信号转导抑制因子 Socs3(NM_053565)表达上调,Socs3 通过与胰岛素受体相互作用抑制胰岛素信号转导,也可能通过诱导信号蛋白降解而抑制胰岛素信号转导^[6],但是配伍后 Socs3 的表达上调的程度有所下降,在一定程度上可促进胰岛素信号转导;胰岛素样生长因子 Igf2(NM_031511)上调,Igfbp6(NM_013104)和 Igfals(NM_053329)下调,但给予天麻钩藤煎液后由下调逆转为上调,胰岛素样生长因子(IGF)家族表达的上调能够改善胰岛素抵抗。胰岛素对抗相关基因的表达趋势见图3。

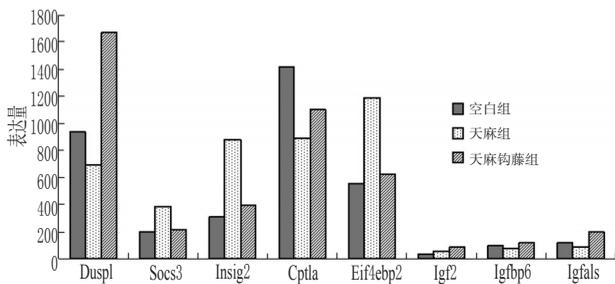


图3 胰岛素对抗相关基因的表达趋势

Fig 3 Expression tendency of gene related to insulin resistance

4 讨论

4.1 配伍前后对肝脏中调控血脂代谢相关基因表达趋势的影响

由试验结果可知,图1中的相关基因都是与外源性脂质代谢有关的基因,这些基因的上调能够使肝脏代谢外源性脂质的作用增强,降低血脂,保护心脑血管。配伍后,这些基因表达都出现了上调,且上调趋势更为显著,提示天麻配伍钩藤后可能有助于增强肝脏降低血脂的作用。

4.2 配伍前后对炎症反应相关基因表达的影响

炎症与许多心血管疾病的发生、发展均密切相关。多项研究显示,慢性低水平炎症亦与原发性高血压的发生、发展有关,因而推测原发性高血压也是一种炎症性病理过程。分泌磷蛋白 Spp1 是一种多效性免疫因子,多效性免疫包括激活巨噬细胞趋化和辅助性 T 细胞 1(Th1 细胞)的免疫反应。Spp1 基因多态性已被证明是与一些免疫炎症性疾病包括多发性硬化症(MS)有关,Spp1 的降低,会造成局部 Th1 细胞相关的炎症性细胞因子过度表达,出现病理性炎症反应和组织坏死,Spp1 表达的增强可以减少过敏症状,对肝脏的炎症反应有抑制作用。

由试验结果可知,天麻与钩藤配伍后对肝脏炎症反应的抑制作用更为显著。这或许也提示配伍后在一定程度上可增强天麻对肝脏的相关作用。

4.3 配伍前后对胰岛素抵抗相关基因表达的影响

胰岛素抵抗作为一种独立的危险因素与高血压病的发生、发展、预后和治疗都有着密不可分的关系。张玲研究了天麻钩藤饮对高血压肝阳上亢证的胰岛素抵抗的影响,结果表明天麻钩藤饮对胰岛素抵抗有改善作用,且效果优于福辛普利^[7]。

由试验结果分析可知,天麻与钩藤配伍后,肝脏中的相关基因都向着有利于改善胰岛素抵抗的方向调控。这可能说明配伍后的煎液改善胰岛素抵抗的作用更为显著,或加强了对肝脏的相关作用。

本文以筛选的15条基因为例,阐述笔者思路,后分述时还是在181条基因中选取。笔者对天麻与钩藤配伍前后SHR大鼠肝脏相关基因表达的变化进行研究后发现,天麻与钩藤配伍后对肝脏中与治疗高血压肝阳上亢证有密切关系的调控血脂代谢、炎症反应和胰岛素抵抗的相关基因表达有显著的影响,在一定程度上增强了天麻对肝脏的相关作用。而笔者在对肾脏相关基因的表达分析研究中却发现,配伍后钩藤会削弱天麻对肾脏的相关作用,这或许可从基因表达角度说明药对配伍后可起到引药归经的作用。综合上述结果,天麻和钩藤配伍时,天麻为君药,钩藤为使药,钩藤的配伍使得煎液对肾脏的效应削弱了,使得天麻的药理作用更专注于肝脏,从而为药对的引经配理论提供了相应的生物学验证。

历代古籍均记载天麻归肝经,但是中医的肝、肾与现代医学的肝脏、肾脏是两个不同的概念。中医的肝、肾是一个功能单位,涵盖了多个相关脏器。笔者还将从整体观的角度,对天麻与钩藤配伍前后对其他组织器官如脑、心脏、大血管等的基因表达进行分析研究,以期从基因表达的角度探索药对配伍与药物归经的相关性。另外,在方法学上对基因芯片的数据分析还有待进一步深化,以望更全面的从基因表达的角度对中药配伍与归经理论进行研习。

参考文献

- [1] 康延国.中药鉴定学[M].北京:中国中医药出版社,2005:237.
- [2] 王兴,任敏,闫智勇,等.糖肾平胶囊对糖尿病小鼠脾脏基因表达的影响[J].中国药科大学学报,2006,37(4):358.
- [3] 王兴,任敏,徐思,等.糖肾平胶囊对糖尿病小鼠大血管基因表达的影响[J].中国天然药物,2005,3(1):53.
- [4] 钟海兰,卢新政.高血压与炎症的研究进展[J].心血管病学进展,2010,31(2):203.
- [5] 郑小璞,吕卓人,郭宁,等.胰岛素抵抗在高血压患者中的特征及其与血压的相关性[J].西安医科大学学报,2002,23(1):24.
- [6] 王念鸿.Socs-3与胰岛素抵抗[J].国外医学内分泌学分册,2005,25(6):409.
- [7] 张玲.天麻钩藤饮对高血压病肝阳上亢证胰岛素抵抗的影响[J].光明中医,2008,23(6):717.

(收稿日期:2012-02-19 修回日期:2012-06-28)