

- [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 1673, 579.
- [2] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第二十三卷·第二分册)[M]. 北京: 科学出版社, 1995: 364.
- [3] 冯周莲, 高少茹, 陈婉敏, 等. 拔脓膏配合黄油纱治疗开放性骨折感染创面的效果观察[J]. 护理学报, 2010, 17(7B): 52-54.
- [4] 刘旭阳, 杜清涛, 李开莹, 等. 多枝雾水葛不同提取部位的抗炎镇痛作用研究[J]. 现代药物与临床, 2012, 27(4): 341.
- [5] 李开莹, 谢郁峰, 陈艳芬, 等. 多枝雾水葛不同提取物对小鼠皮下脓肿的作用[J]. 广东药学院学报, 2012, 28(5): 540-544.
- [6] 万毅, 刘碧山, 沈德凯. 艾叶挥发油治疗疮疡的实验研究[J]. 中医基础医学杂志, 2007, 13(8): 595-597.
- [7] 刘林祥, 宋红月. 小鼠皮下脓肿模型及其在中草药抗菌作用研究中的初步运用[J]. 微生物学通报, 1983, (4): 168-171.
- [8] 王德成, 王星, 周文江, 等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌皮肤脓肿小鼠感染模型的建立与评估[J]. 中国实验动物学报, 2010, 18(3): 221-224.
- [9] 张压西, 曾亚男. 单氏丁桂散促进疮疡愈合的实验研究[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2002, 8(6): 431-433.
- [10] 邓琪. 多枝雾水葛药理作用及化学成分研究[D]. 广州: 广东药学院, 2011.

(编辑: 梁进权)

异钩藤碱对血管平滑肌细胞中 Baml1、Clock 基因表达的调节作用

曾 武, 张振服, 刘启德, 杨 蕾, 宓穗卿, 王宁生(广州中医药大学临床药理研究所, 广东 广州 510405)

摘要: 目的 研究异钩藤碱对血管紧张素 II (Ang II) 诱导的血管平滑肌细胞(VSMC)中时钟基因(Bmal1、Clock)昼夜节律表达变化的调节作用。方法 以 Ang II 诱导胸主动脉平滑肌细胞(A7r5 细胞)建立节律变化模型。实验分 Ang II 诱导组、异钩藤碱组、正常对照组。Ang II 诱导组以终浓度为 $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Ang II 诱导 24 h, 异钩藤碱组加入终浓度为 $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Ang II 和 $12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 异钩藤碱处理 24 h。采用 Real-time PCR 方法检测不同时间点 VSMC 中 Bmal1、Clock 基因表达水平, 比较各组之间节律参数的差异。结果 异钩藤碱通过调节 Ang II 诱导的 A7r5 细胞中的 Baml1、Clock 基因表达, 改变其中值、振幅及峰相位, 使 A7r5 昼夜节律发生改变。结论 异钩藤碱对 A7r5 细胞中 Baml1、Clock 基因的昼夜节律的表达有调节作用。

关键词: 异钩藤碱; 昼夜节律; Baml1 基因; Clock 基因

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2013)03-0251-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.03.011

Study of Isorhynchophylline in Regulating Baml1 and Clock Gene Expression in Vascular Smooth Muscle Cells

ZENG Wu, ZHANG Zhenfu, LIU Qide, YANG Lei, MI Suiqing, WANG Ningsheng(Institute of Clinical Pharmacology, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China)

Abstract: Objective To study the effect of isorhynchophylline on regulating circadian-rhythm expression of Bmal1 and Clock genes of the vascular smooth muscle cells(A7r5 cells) induced by angiotensin II (Ang II). **Methods** We established circadian-rhythm A7r5 cells model with Ang II, and divided the cells into Ang II induction group, isorhynchophylline treatment group and normal control group. The cells in Ang II induction group were cultured with Ang II at final concentration of $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ for 24 hours, and isorhynchophylline treatment group were cultured with $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Ang II and $12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ isorhynchophylline for 24 hours. We used the real-time PCR method to investigate the circadian rhythm expression of Bmal1 and Clock genes in vascular smooth muscle cells at different time points. **Results** Isorhynchophylline showed an effect on the median, amplitude and peakphase of circadian rhythm of Ang II-induced

收稿日期: 2012-11-18

作者简介: 曾武, 男, 硕士研究生, 研究方向: 中药有效性和安全性评价。Email: zengwu99@126.com。通讯作者: 杨蕾, 副研究员, 研究方向: 中药药理学研究。Email: yanglei@gzhtcm.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金(30801462); 广东省自然科学基金(9451040701002867)。

A7r5 cells through regulating the Bmal1 and Clock gene expression of the vascular smooth muscle cells. **Conclusion** Isorhynchophylline has an effect on regulating the circadian-rhythm expression of Bmal1 and Clock genes in A7r5 cells.

Keywords: Isorhynchophylline; Circadian rhythm; Bmal1 gene; Clock gene

哺乳动物的中枢生物钟位于下丘脑视交叉上核,感受外界光刺激,形成了一种与24 h周期性昼夜节律同步的行为和生理功能^[1],外周组织甚至体外培养的细胞亦拥有生物钟^[2]。生物钟主要分子基础由时钟基因 mPer, mCry, Clock, Bmal1 和时钟输出基因 Dbp, Hlf, Tef 组成。时钟基因及其蛋白质产物构成的自主调节的转录和翻译反馈循环是生物钟运转的分子基础^[3-4],其中 Bmal1、Clock 两个基因作为时钟基因核心组成部分,激活一系列的时钟调控基因,调节其转录和翻译的反馈循环。近期研究显示,血管平滑肌细胞(VSMC)中血管紧张素 II (Ang II)通过 Ang II-AT1 通路调节时钟基因周期性表达^[5]。血管平滑肌细胞异常增殖是许多心血管疾病的共同病理过程,是高血压血管重构、动脉硬化、血管成形术后再狭窄的主要病因之一^[6]。心血管参数及心血管发病事件周期节律性,表明心血管功能和生物钟时钟基因之间存在密切联系^[7]。

天麻钩藤饮为治疗高血压疾病的经典中药复方,而异钩藤碱(Isorhynchophylline)作为其主要成分,具有扩血管、降血压、抗血小板聚集、抗血栓形成等作用^[8]。前期研究^[9]显示,天麻钩藤饮对高血压大鼠的血压昼夜节律有调节作用,并且能够改善大鼠的血压节律;对高血压模型大鼠主动脉中时钟基因 Bmal1、Per2 的昼夜节律的表达具有调节作用。本文通过考察异钩藤碱对 Ang II 诱导的 VSMC 中 Bmal1、Clock 基因节律表达的干预作用,结合前期研究,探讨天麻钩藤饮的主要成分异钩藤碱对时钟基因的调节作用,从而阐明其治疗高血压病的作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株 大鼠胸主动脉平滑肌细胞 A7r5 细胞系,美国 ATCC 公司。

1.2 药品 异钩藤碱,昆明伊普瑞斯商贸有限公司,批号: MUST-11092801,用 DMEM 培养基配成 12 mg·L⁻¹ 溶液,过滤除菌; Ang II,西格玛奥德里奇(上海)贸易公司,批号: A9525,用含 10 %胎牛血清 DMEM 培养基配成 100 nmol·L⁻¹ 溶液,过滤除菌。4 ℃冰箱保存备用。

1.3 试剂 胎牛血清(批号: 10099)、DMEM 培养基(批号: C11995),澳洲 GIBCO 公司;逆转录试剂盒(批号: DRR036A)、Total RNA 提取试剂(批号: D9108S)、SYBR Green I 荧光染料(批号: DRR820A),TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司。

1.4 引物设计 Baml1、Clock 基因引物及管家基因 β -actin 引物由 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司设计。Bmal1 基因上游引物: 5'-GCTTTGAGGT-GACCAGCAAGTACA-3';下游引物: 5'-AAGGGCTCCAAGGTCCACAG-3',产物片段大小为 146 bp。Clock 基因上游引物: 5'-ACACAGCCAGCGATGTCTCAA-3';下游引物: 5'-CATGGCTCCTAACT-GAGCTGAAAG-3';产物片段大小为 87 bp。 β -actin 上游引物: 5'-GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA-3';下游引物: 5'-GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG-3',产物片段大小为 124 bp。

1.5 仪器 MCO-2A CO₂ 培养箱, SANYO 公司; NANODROP2000 分光光度计, Thermo 公司; steponePlus Real-Time PCR 仪, ABI 公司; CX31-12C04 倒置显微镜, OLYMPUS 公司; KDC-220HR 高速冷冻离心机,科大中佳公司。

1.6 细胞培养 A7r5 细胞株接种于含 10 % FBS 的新鲜 DMEM 培养液中,置 37 ℃、饱和湿度、5 %CO₂ 培养箱中培养,0.1 %胰酶消化传代。实验均采用对数生长期的细胞。

1.7 分组及处理 选用 5~10 代大鼠胸主动脉血管平滑肌细胞系,以胰蛋白酶消化法传代,制备细胞悬液,计数,将 1.2×10^5 个/孔接种于 6 孔板中。以含 10 %胎牛血清的 DMEM 培养基培养 96 h 后,小心吸弃上清液,并用 PBS 洗涤 1 次,加入 1 mL 新的培养基,然后进行分组。①正常对照组: 不加处理因素。②Ang II 诱导组: 加入终浓度为 100 nmol·L⁻¹ 的 Ang II 诱导。③异钩藤碱组: 加入终浓度为 100 nmol·L⁻¹ 的 Ang II 和 12 mg·L⁻¹ 异钩藤碱处理。各组继续培养 24 h,从细胞接种 120 h 后的 09:00 时开始,以授时因子(Zeitgeber Time, ZT)零时(ZT0)为取样起始点,每 4 h 取样 1 次,取样时间点依次为 ZT0、ZT4、ZT8、ZT12、ZT16、ZT20、ZT24。取样时小心吸弃上清液,并用 PBS 洗涤 1 次后加入 1 mL/

孔的 Total RNA 提取试剂充分裂解，按要求提取总 RNA，并逆转录成 cDNA，4℃保存。

1.8 荧光定量 PCR 扩增 荧光定量 PCR 反应体系为 20 μL。SYBR Premix EX Taq 10 μL，PCR Forward Primer 0.8 μL，PCR Reverse Primer 0.8 μL，ROX referenceDye 0.4 μL，cDNA 模板 2.0 μL，dH₂O 6 μL。循环条件：95℃预变性 30 s，95℃变性 5 s，60℃退火延伸 30 s，循环 40 次。

1.9 统计学处理方法 所有数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示，用 SPSS 17.0 软件进行统计学处理，组间比较采用单因素方差分析， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

建立生物节律的数学模型分析昼夜节律，通过余弦法对昼夜节律数据进行周期为 24 h 的拟合^[10]。数学模型为： $Y_j = M + A \cdot \cos(\omega t_j + \varphi)$ 。其中 Y_j 是时间变量 t_j 时间序列指标的数值； M (mesor)为变量节律的调整中值； A 为节律的振幅； ω 为节律的角频率； φ 为峰值相位。采用组平均余弦拟合法做拟合度检验，如 $P < 0.05$ 则接受检验假设，说明该指标的分布节律可由上述模型正确描述。然后采用零振幅检验(Zeroamplitude test)评价所研究指标的昼夜节律是否确实存在，如 $P < 0.05$ 则说明该指标呈现为昼夜节律，而非无节律的随机分布。再对数据进行 t 检验，估算出各个特征值的 95% 置信区间(CI)。

2 结果

2.1 异钩藤碱对 Ang II 诱导的 VSMC 中 Bmal1、Clock 基因表达的影响 与正常对照组比较，Ang II 诱导组的 VSMC 中各时间点之间 Bmal1、Clock 基因表达呈现出较为明显的节律波动，Ang II 诱导组的 Bmal1、Clock 基因表达水平明显增强，且各时间点之间的波动差异较大，其中 Bmal1 基因在 ZT0、ZT8、ZT12、ZT16 时间点的变化有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)，而 Clock 基因表达在 ZT0、ZT8、ZT12 时间点变化有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与 Ang II 诱导组比较，通过异钩藤碱处理 Bmal1、Clock 基因表达均呈现出下降趋势，且 7 个时间点之间两个基因的表达趋于稳定，各时间点之间波动较小。结果见表 1、表 2。

2.2 VSMC 中 Bmal1、Clock 基因节律性表达的数学模型分析 对 3 个实验组测得的 24 h 内 7 个时间点的基因表达结果应用最小二乘法进行余弦拟合，得出各自的拟合曲线及特征值。经零振幅检验显示，各测量值的昼夜节律性均存在。

表1 异钩藤碱对 24 h 内 Bmal1 基因不同时间点表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

时间点	Bmal1/ β -actin		
	正常对照组	Ang II 诱导组	异钩藤碱组
ZT0	1.023 ± 0.114	0.797 ± 0.035*	1.143 ± 0.046 ^Δ
ZT4	1.081 ± 0.053	1.043 ± 0.043	0.764 ± 0.021 ^Δ
ZT8	0.705 ± 0.023	0.962 ± 0.034*	0.874 ± 0.071
ZT12	0.655 ± 0.013	1.258 ± 0.079**	0.592 ± 0.022 ^{ΔΔ}
ZT16	0.715 ± 0.023	0.986 ± 0.184*	0.696 ± 0.034 ^Δ
ZT20	0.644 ± 0.024	0.799 ± 0.024	0.639 ± 0.034
ZT24	1.360 ± 0.034	1.214 ± 0.034	0.641 ± 0.021 ^{ΔΔ}

注：与正常对照组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；与 Ang II 诱导组比较，^Δ $P < 0.05$ ，^{ΔΔ} $P < 0.01$ 。

表2 异钩藤碱对 24 h 内 Clock 基因不同时间点表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

时间点	Clock/ β -actin		
	正常对照组	Ang II 诱导组	异钩藤碱组
ZT0	0.884 ± 0.083	1.018 ± 0.040*	1.069 ± 0.060
ZT4	0.878 ± 0.049	0.948 ± 0.028	0.854 ± 0.018
ZT8	0.642 ± 0.037	0.927 ± 0.040*	0.902 ± 0.046
ZT12	0.564 ± 0.019	1.041 ± 0.048**	0.840 ± 0.025
ZT16	0.578 ± 0.023	0.768 ± 0.104	0.777 ± 0.027 ^Δ
ZT20	0.556 ± 0.021	0.655 ± 0.024	0.722 ± 0.059
ZT24	0.816 ± 0.034	0.846 ± 0.104	0.719 ± 0.047

注：与正常对照组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；与 Ang II 诱导组比较，^Δ $P < 0.05$ 。

如表 3 所示，与正常对照组比较，Ang II 诱导组细胞 Bmal1 基因表达昼夜节律的中值、振幅均明显升高，相位位移明显提前，昼夜节律发生改变，差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与 Ang II 诱导组比较，异钩藤碱组细胞 Bmal1 基因表达昼夜节律的中值、振幅均明显降低，峰相位升高，相位后移，昼夜节律发生改变，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表3 异钩藤碱对细胞中 Bmal1 基因表达昼夜节律参数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 3 The comparison of the circadian rhythm parameters of Bmal1 gene expression in each group

组别	中值	振幅(95% CI)	峰相位(95% CI)
正常对照组	0.883 ± 0.040	-0.548(-0.600, -0.500)	0.591(0.580, 0.601)
Ang II 诱导组	1.001 ± 0.059*	-0.209(-0.243, -0.175)**	0.538(0.389, 0.686)*
异钩藤碱组	0.764 ± 0.031 ^Δ	-0.325(-0.336, 0.315) ^Δ	0.553(0.530, 0.576)

注：与正常对照组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；与 Ang II 诱导组比较，^Δ $P < 0.05$ 。

如表 4 所示，与正常对照组比较，Ang II 诱导组

细胞中 Clock 基因的表达中值、振幅均明显升高,相位位移明显提前,昼夜节律发生改变,差异有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$)。与 Ang II 诱导组比较,异钩藤碱组细胞中值、振幅均明显降低,峰相位升高,相位后移,昼夜节律发生改变,差异有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$)。

表 4 异钩藤碱对细胞中Clock 基因表达昼夜节律参数的影响
($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 4 The comparison of the circadian rhythm parameters of Clock gene expression in each group

组别	中值	振幅(95 % CI)	峰相位(95 % CI)
正常对照组	0.702±0.036	-0.368(-0.403, -0.333)	0.524(0.506, 0.542)
Ang II 诱导组	0.886±0.046 [*]	-0.249(-0.300, -198) [*]	0.318(0.261, 0.375) ^{**}
异钩藤碱组	0.840±0.035 ^Δ	-0.264(-0.283, -0.245) ^Δ	0.541(0.495, 0.587) ^{ΔΔ}

注:与正常对照组比较, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$;与 Ang II 诱导组比较, ^Δ $P<0.05$, ^{ΔΔ} $P<0.01$ 。

3 讨论

时钟基因控制体内绝大部分激素的节律性分泌释放,调节机体几乎所有的功能。它管理机体每天活动休息,如睡眠觉醒周期、体温波动、心输出量、血压高低、耗氧量等。当生物钟因为各种原因发生重设时,所导致的节律异常(包括位相、节律长短、幅度)将不利于生物个体的健康,产生节律性疾病,如飞行时差反应、睡眠障碍等^[1]。体内生物钟系统的昼夜节律振荡是调控昼夜节律变化的核心机制,时钟基因的节律性表达是构成生物钟振荡的分子基础。体液中的活性因子可通过其相应受体通路调节时钟基因的表达,从而参与生物钟系统的维持和信息传递过程。研究显示^[12],体液中参与血压调节作用的许多活性物质(如去甲肾上腺素、肾素、血管紧张素等)均呈明显的昼夜节律变化,并与血压昼夜节律有明显相关性。高血压时这些体液因子的变化可能是血压异常节律产生的病理基础。血管紧张素水平是评价高血压治疗作用的一个重要指标。血管紧张素作用于血管平滑肌,可使全身微动脉收缩,动脉血压升高。前期研究^[9]显示,天麻钩藤饮能调节大鼠时钟基因节律,改善大鼠血压昼夜节律。本实验在此基础上,采用单一离体培养的血管平滑肌细胞进行机制研究,排除在体实验各种因素的影响,采用单因素诱导、刺激细胞,研究细胞的昼夜节律,为治疗高血压等与昼夜节律相关疾病提供可行的研究方向。在细胞核内, Bmal1 与 Clock 是产生时钟基因的启动因子,作为生物钟昼夜节律的核心部分,

通过其相关蛋白 Clock/Bmal1 异源二聚体的含量变化,共同控制着整个生物钟体系及其他时钟基因的反馈循环^[13-14]。本实验研究显示,应用最小二乘法进行余弦拟合,得出各自的拟合曲线及特征值。异钩藤碱通过调节 Ang II 诱导的 VSMC 中的 Baml1、Clock 基因表达,改变其中值、振幅及峰相位。经零振幅检验显示, VSMC 中昼夜节律发生改变。同时异钩藤碱能降低 Ang II 诱导的 VSMC 中 Baml1、Clock 基因表达,减轻 Ang II 诱导的 VSMC 的昼夜节律的异常改变,调节 VSMC 中的昼夜节律。且在相同条件下, Bmal1 与 Clock 基因表达在各时间点的波动变化趋势相似,与其共同调节时钟基因的反馈循环有关。

参考文献:

[1] Dunlap J. Circadian rhythms: An end in the beginning[J]. Science, 1998, 280(5): 1548-1549.

[2] 黄新艳,魏立,李晓林,等. 血管紧张素 II 对乳大鼠心肌细胞时钟基因表达的影响[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2005, 21(7): 811.

[3] Okamura HJ, Yamaguchi S, Yagita K. Molecular machinery of the circadian clock in mammals[J]. Cell tissue Res, 2002, 309(1): 47-56.

[4] Balsalobre A. Clock genes in mammalian peripheral tissues[J]. Cell tissue Res, 2002, 309 (1): 193-199.

[5] Nonaka H, Emoto N, Ikeda K, et al. Angiotensin II induces circadian gene expression of clock genes in cultured vascular smooth muscle cells[J]. Circulation, 2001, 104(15): 1746-1748.

[6] 杨蕾. 天麻钩藤饮对血管紧张素 II 诱导血管平滑肌细胞 A7r5 增殖的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2010, 21(4): 379-381.

[7] Young ME. Circadian rhythms in cardiac gene expression[J]. Current Hypertension Reports, 2003, 5(6): 445-453.

[8] 余俊先,吴芹,谢笑龙,等. 异钩藤碱对猫的心血管作用与血药浓度的关系[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2002, 16(3): 191-194.

[9] 张振服. 天麻钩藤饮影响血压昼夜节律和时钟基因 Per2、bma11 表达的研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2010.

[10] 洗励坚,王正荣. 生物节律与时间医学[M]. 郑州: 郑州大学出版社, 2003: 295-308.

[11] Mohri T, Emoto N, Nonaka H, et al. Alterations of circadian expressions of clock genes in Dahl salt-sensitive rats fed a high-salt diet [J]. Hypertension, 2003, 42(2): 189-194.

[12] Giles TD. Factors affecting circadian variability[J]. Blood Pressure Monitoring, 2000, 5(1): 3-7.

[13] Li XL, Li QP. Regulation of Clock genes in mammals from central to peripheral pacemakers[J]. Current Genomics, 2004, 5 (6): 483-488.

[14] 包娜仁,于艳秋. 昼夜节律生物钟的分子调节机制[J]. 国外医学: 生理病理科学与临床分册, 2003, 23(4): 416-418.

(编辑: 梁进权)