

文章编号: 1672-3384 (2007) -04-0040-05

丹参素对糖尿病脑梗塞大鼠 t-PA、PAI-I 含量及 mRNA 表达的影响 *

【作者】 史丽谨¹ 朱晓云² 刘喜明²

1. 河南新乡医学院 (新乡 453000)

2. 中国中医科学院广安门医院 (北京 100053)

【摘要】 目的 观察丹参素对糖尿病脑梗塞大鼠脑组织纤溶酶原激活物及其抑制剂 mRNA 表达, 及对血浆纤溶功能的影响, 探讨其可能作用机制。方法 糖尿病大鼠丹参素治疗一周后, 应用自体血栓注入大鼠脑动脉制成糖尿病脑梗塞模型。ELISA 方法检测血浆中 t-PA、PAI-I 含量, RT-PCR 方法测定脑组织中 t-PA 与 PAI-I, u-PA 与 NSP 的 mRNA 表达。结果 丹参素治疗组促纤溶因子 t-PA 含量及 mRNA 表达升高、抑制因子 PAI-I 含量及 mRNA 表达降低。作用强度随丹参素浓度的增大而增强。u-PAmRNA、NSPmRNA 的表达无显著性变化。结论 丹参素可显著改善糖尿病脑梗塞大鼠血浆纤溶功能, 通过促进 t-PA 含量及其 mRNA 表达、抑制 PAI-I 含量及其 mRNA 表达, 而提高鼠脑纤溶功能。

【关键词】 糖尿病; 脑梗塞; 纤溶酶原激活物; 丹参素

Effects of danshensu pretreatment on content and expression of mRNA of t-PA and PAI-I in diabetic rats with cerebral infarction

【Writers】 SHI Li-jin¹ ZHU Xiao-yun² LIU Xi-ming²

1. Henan Xinxiang Medical College (Xinxiang 453000)

2. China Academy of Chinese Medical Sciences Guanganmen Hospital (Beijing 100053)

【Abstract】 **Objective** To observe the influence of Danshensu pretreatment on the expression of mRNA of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor and the function of plasma fibrin dissolve in diabetic rats with cerebral infarction. To study the role of danshensu in prevention and treatment of diabetic cerebral infarction and its possible mechanism. **Methods** The diabetic rats were injected Danshensu by tail vein. After one week, cerebral infarcted models were made. PAI-I and t-PA in the plasma were detected with ELISA. The expression of mRNA of t-PA and PAI-I, u-PA and NSP, were detected with RT-PCR. **Results** Danshensu pretreatment can improve plasma fibrin dissolve of diabetic rats with cerebral infarction. The expression of t-PA mRNA increased and PAI-I mRNA decreased, And the effect was more and more enhanced when the content of danshensu increased, nevertheless there was no significantly effective on the expression of u-PA and NSP mRNA. **Conclusions** Danshensu pretreatment can improve the function of plasma fibrin dissolve significantly, and it in brain by increasing t-PAmRNA and decreasing PAImRNA in diabetic rats with cerebral infarction. The effect might relate to the function, which protecting endothelial cells and invigorating the circulation of blood, so it might react on the prevention and treatment of diabetic cerebral infarction.

【Key words】 diabetes; cerebral infarction; plasminogen activator; danshensu

【中图分类号】 R285.5; R587.2

【文献标识码】 A

* 基金项目: 北京市科委重点资助项目 (H010210460112)

糖尿病脑血管病变是糖尿病的严重并发症,研究表明高糖造成内皮细胞损伤,导致纤溶活性降低,血小板聚集形成微血栓,是糖尿病脑血管并发症的关键原因。纤溶酶原激活物及其抑制剂是参与纤溶功能的重要物质,二者之间活性表达的平衡与机体纤溶功能密切相关,是预测和评价2型糖尿病危险性的指标^[1,2]。

中药丹参是临床治疗缺血性心脑血管病主要药物之一,本实验用丹参素治疗糖尿病大鼠,然后制成糖尿病脑梗塞模型,观察糖尿病大鼠、糖尿病脑梗塞大鼠的血浆及脑组织纤溶功能的变化,探讨丹参素对糖尿病脑血管并发症的预防治疗作用及其可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

健康雄性 Wistar 大鼠 3 月龄,50 只,体重 250~300g,广安门医院实验动物中心提供,随机分为 5 组 (A~E),每组 10 只。A 组:正常假手术组,B 组:糖尿病假手术组,C 组:糖尿病脑梗塞组,D 组:低剂量丹参素组,E 组:高剂量丹参素组。B、C、D、E 组大鼠制作糖尿病模型,成模后 D、E 组尾静脉分别注射丹参素 (天津天士力医药公司) 5mg/(kg·d)、10mg/(kg·d),A、B、C 组用等量生理盐水对照。用药一周后行手术,A、B 为假手术组,C、D、E 组行自体血栓脑梗塞处理。所有大鼠均术后 24h 眶静脉采血,其后断头处死大鼠,冰浴中快速分离脑组织。

1.2 糖尿病大鼠模型的制作

B、C、D、E 组大鼠共 40 只,参照文献^[3]制备糖尿病大鼠模型。大鼠腹腔注射溶于 0.1M 枸橼酸钠缓冲液中的链脲佐菌素 (Streptozotocin, STZ) 试剂,按链脲佐菌素 50mg/kg 体重,一周后成模 (血糖>10.0mmol/L)。

1.3 糖尿病脑梗塞大鼠模型制备与假手术组处理

参考有关文献^[4,5]对 C、D、E 组实施自体血栓栓塞性大鼠脑梗塞模型手术,方法 ①制作血栓:

入 75U 凝血酶,立即混匀,注入 2 根连续硬膜外麻醉导管内,静置 15min。用生理盐水清洗掉血凝块表面的红细胞,显微镜下选择富含纤维素的血栓切成 1~2mm 小段,放入 pH 为 7.4 的磷酸缓冲液 (PBS) 中静置 5h,使其凝缩,吸入导管备用。②制作血栓栓塞模型:大鼠麻醉后手术钝性分离出左侧颈总、颈内、颈外动脉。离断颈外动脉,结扎翼腭动脉,动脉夹夹闭颈总动脉和颈内动脉,在颈外动脉远端剪口,导管插入颈内动脉,松开颈内动脉夹,缓慢将血栓注入颈内动脉,拔出导管,结扎颈外动脉近心端,松开颈总动脉夹,缝合皮肤。③假手术组不将套管插入颈外动脉、不制作血栓,余同手术组。手术过程中保持肛温 (37±0.5)℃。

1.4 ELISA 方法检测

眶静脉采抗凝血,3000rpm 离心、10min 分离上层血浆,用大鼠 t-PA、PAI-I ELISA 试剂盒 (大连泛邦生物技术有限公司) 检测 t-PA、PAI-I 含量。

1.5 逆转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR) 检测

眶静脉采血后断头处死大鼠,冰浴中快速分离缺血侧距额极 2~8mm 脑组织。用 Trizol (Invitrogen) 提取 50~100mg 样本中总 RNA。反转录反应 (RT) 采用 RevertiAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas)。2μg 总 RNA 以 Oligo (dT)₁₈ 为引物, M-MuLV 反转录酶反应总体积 20μL,其中 2μL cDNA 样本进行 PCR 扩增。引物采用 primer premier 5.0 设计,由赛百盛公司合成。Beta-actin 引物序列分别为:5'-GAG ACC TTC AAC ACC CCA GCC-3' 和 5'-ATG TCA CGC ACG ATT TCC C-3' 扩增片段为 263bp。NSP 引物序列:5'-GCT CTC TTT AGT GGC CAT GC-3' 和 5'-TGG CGG ATT TCT TTC A-GA GT-3' 扩增片段为 204bp。PAI 引物序列:5'-TGC TGA GTG AAG GCG TAG-3' 和 5'-TCG GCA CAA TCC AAC AGA-3' 扩增片段为 382bp。t-PA 引物序列:5'-AGG ATT GTG GGA GGA TGG-3' 和 5'-TCA GAT GAG ATG ACA GGG AAA T-3' 扩增片段为 300bp。u-PA 引物序列:5'-GCA TCA CGG

AAG ACC AAA T-3' 和 5'-ACC CAA GTG TAG GAG GAG A-3' 扩增片段为 404bp。反应条件：95.0℃ 预变性 5min；95.0℃ 变性 25 秒，55.0℃ 退火 25 秒，72.0℃ 延伸 1min，共循环 40 次；72.0℃ 后延伸 8min。取 6uL PCR 扩增产物 1.5% (w/v) 琼脂糖凝胶 80V 电泳，结果用凝胶图像分析仪分析每条带的灰度值，目的基因与 Beta-actin 的比值为目的基因的 mRNA 相对表达量。

1.6 统计学处理

由 SPSS10.0 统计软件包完成，计量资料用均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示，多组均数的比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)，两两比较采用最小显著差法 (LSD)。

2 结果

2.1 血清中 t-PA、PAI-I 含量的变化见表 1。B 组糖尿病假手术大鼠与 A 组正常假手术大鼠相比，血浆中 t-PA 含量明显降低 ($P<0.01$)，C 组糖尿病脑梗塞大鼠 t-PA 含量较 B 组明显下降 ($P<0.01$)，D、E 组丹参素预处理糖尿病脑梗塞大鼠 t-PA 含量明显高于未经处理 C 组 ($P<0.05$, $P<0.01$)，D、E 组之间差异有显著性意义 ($P<0.01$)，丹参素大剂量 E 组 t-PA 含量升高超过 B 组 ($P<0.01$)，但仍低于 A 组 ($P<0.01$)，小剂量 D 组 t-PA 含量有所升高，但未恢复至 B 组水平 ($P<0.01$)。B 组糖尿病假手术大鼠血浆中 PAI-I 含量明显高于 A 组正常假手术大鼠 ($P<0.01$)，C 组糖尿病脑梗塞大鼠与 B 组糖尿病大鼠相比，PAI-I 含量明显升高 ($P<0.05$)，D、E 组丹参素预处理糖尿病大鼠 PAI-I 含量明显低于 C 组 ($P<0.05$, $P<0.01$)，与 B 组无显著性差异 ($P>0.05$)，D、E 组之间差异有显著性意义 ($P<0.05$)。

表 2 丹参素预处理对糖尿病脑梗塞大鼠 t-PA、mRNA 表达的影响

| 组别 | 动物数 (n) | t-PA/ β -actin | PAI-I/ β -actin | u-PA/ β -actin | NSP/ β -actin |
|----|---------|----------------------|-----------------------|----------------------|---------------------|
| A | 10 | 0.56±0.05 | 0.32±0.04 | 0.35±0.04 | 0.54±0.08 |
| B | 10 | 0.52±0.04▼ | 0.55±0.10▼▼ | 0.31±0.05▼ | 0.61±0.03▼ |
| C | 10 | 0.20±0.03▲▲ | 0.65±0.06▲ | 0.19±0.02▲▲ | 0.71±0.09▲▲ |
| D | 10 | 0.26±0.04* | 0.52±0.11*▼▼ | 0.21±0.03 | 0.69±0.02 |
| E | 10 | 0.41±0.02* | 0.29±0.06* | 0.18±0.02 | 0.70±0.04 |

注：▼表示与 A 组相比 $P<0.05$ ；▼▼表示与 A 组相比 $P<0.01$ ；▲表示与 B 组相比 $P<0.05$ ；▲▲表示与 B 组相比 $P<0.01$ ；★表示与 C 组相比 $P<0.01$

表 1 丹参素预处理对糖尿病脑梗塞大鼠血浆 t-PA、PAI-I 含量的影响

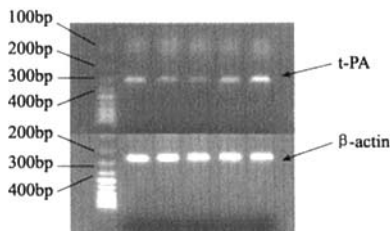
| 组别 | 动物数 (n) | t-PA (ng/mL) | PAI-I (ng/mL) |
|----|---------|---------------|---------------|
| A | 10 | 8.33±0.94 | 1.69±0.06 |
| B | 10 | 4.55±0.38▼ | 2.66±0.43▼ |
| C | 10 | 2.63±0.42▲ | 3.02±0.38▲▲ |
| D | 10 | 3.19±0.12*** | 2.64±0.33** |
| E | 10 | 6.32±0.17**▲▼ | 2.32±0.31* |

注：▼表示与 A 组相比 $P<0.01$ ；▲▲分别表示与 B 组相比 $P<0.01$, $P<0.05$ ；***分别表示与 C 组相比 $P<0.01$, $P<0.05$

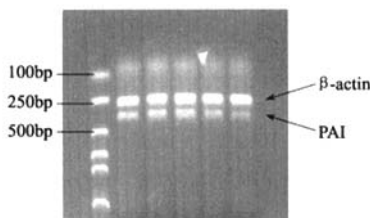
2.2 t-PA、PAI-I、u-PA 和 NSP mRNA 相对表达值见表 2。t-PA 表达：B 组明显低于 A 组 ($P<0.05$)，C 组明显低于 B 组 ($P<0.01$)，D、E 组明显高于 C 组，差异有统计学意义 ($P<0.01$)，D、E 组之间差异有显著性意义 ($P<0.01$)。PAI-I 表达：B 组明显高于 A 组 ($P<0.01$)，C 组明显高于 B 组 ($P<0.05$)，D、E 组明显低于 C 组，有显著性差异 ($P<0.01$)，D、E 组之间差异有显著性意义 ($P<0.01$)，E 组明显降低但与 A 组无显著性差异 ($P>0.05$)，D 组明显降低但与 B 组无显著性差异 ($P>0.05$)，而仍高于 A 组，差异有统计学意义 ($P<0.01$)。u-PA 表达：B 组明显低于 A 组 ($P<0.05$)，C 组明显低于 B 组 ($P<0.01$)。D 组高于 C 组，E 组略低于 C 组，但差异均无显著性意义 ($P>0.05$)。D、E 组之间差异无统计学意义 ($P>0.05$)。NSP 表达：B 组明显高于 A 组 ($P<0.05$)，C 组明显高于 B 组 ($P<0.01$)，D、E 组与 C 组无显著性差异 ($P>0.05$)。D、E 组之间差异无显著性意义 ($P>0.05$)，见图 1。

3 讨论

国内外研究表明，血糖控制不佳是 2 型糖尿病并发脑血管疾病的重要因素^[6]。高血糖引起过氧化损伤，活性氧增多，超过机体的清除能力，在损伤



大鼠 t-PA mRNA 表达的电泳图



大鼠 PAI-I mRNA 表达的电泳图

大鼠 u-PA mRNA 表达的电泳图

大鼠 NSP mRNA 表达的电泳图

图1 丹参素预处理对糖尿病脑梗塞大鼠 t-PA、PAI-I 及 mRNA 表达的影响

注：泳道从左到右依次为：Marker A、B、C、D、E

处引起血管收缩，平滑肌层异常增殖、白细胞聚集或血小板收缩、黏附力增强，使血液循环发生障碍，导致内皮细胞损伤。正常的血管内皮细胞通过释放多种活性物质调节凝血与纤溶活性平衡、血管收缩与舒张。高糖损伤内皮细胞后，其释放的血管活性物质含量以及活性发生变化，造成凝血作用增强，纤溶活性降低，从而使血小板易聚集形成微血栓，是导致糖尿病脑血管病的重要原因之一^[7]。

成年鼠脑有纤溶酶原激活物及其抑制剂基因转录，在许多部位均可检测到 t-PA 和 u-PA、PAI-I 和 NSP 的表达^[8,9]。t-PA 和 u-PA 均能够激活纤溶酶原，使其转化为纤溶酶，启动纤维蛋白和细胞外蛋白溶解级联反应，除主要参与纤溶活动外，也与炎症、细胞迁移、排卵、肿瘤浸润和转移、神经元细胞保护等许多生理和病理过程密切相关^[10,11]。PAI-I 是这两者主要的快速抑制剂，它主要抑制 t-PA 介导的纤溶活性，被认为是体内最重要的纤溶活性调节者，并参与血管的生成调解，也是体内多种肿瘤的预后指标^[12-16]。PAI-I 和 NSP 均属于丝氨酸蛋白酶抑制剂，后者是轴索性分泌蛋白，

也是 t-PA 的天然抑制剂。

基础及临床研究都表明，活血化瘀的中药具有保护内皮细胞的功能，以活血化瘀为主要作用的丹参是临床糖尿病、心脑血管病治疗常用的中药制剂，效果肯定，安全度高，但化学组成复杂，不利于药效的评价，对其活性单体成分的研究十分必要。丹参的主要活性成分丹参素（danshensu）（β-3, 4-二羟基苯基乳酸钠， $C_6H_{10}O_5$ ）是一种酚性芳香酸类化合物，主要药理作用以改善微循环、抗血小板聚集、抗氧化、活血化瘀为主，还有抑制单核细胞产生炎症介质、抗缺氧、抗心律失常、保护肝细胞等作用^[17-20]。

本文结果显示，糖尿病大鼠体内存在纤溶功能紊乱，有血栓形成倾向，且糖尿病大鼠发生急性脑梗塞后其纤溶功能紊乱进一步加重，不利于血栓的溶解和血管的再通。而丹参素可改善糖尿病脑梗塞大鼠血浆纤溶活性，促进脑纤溶酶原激活物 t-PA 的表达、抑制其抑制剂 PAI-I 的表达，从而提高脑纤溶活性。丹参素的作用可能与其具有活血化瘀、保护内皮细胞的功能有关，说明丹参素通过改善血

浆和脑组织中纤溶功能可能对预防糖尿病脑血栓形成有一定作用。

总之, 本实验为中药单体研究提供了理论依据和实验基础, 提示丹参素具有良好的新药开发前景, 可能在临床预防和治疗糖尿病脑血管病中发挥有效的作用。

【参考文献】

- [1] 韩仲岩, 唐盛孟, 石秉霞. 实用脑血管病学. 第1版. 上海: 上海科学技术出版社, 1994; 5(3): 43
- [2] Mavri A, Alessi MC, Juhan-Vague I. Hypofibrinolysis in the insulin resistance syndrome: implication in cardiovascular diseases. *J Intern Med*, 2004, 255: 448-456
- [3] Mavrikakis ME, Sfrikakis PP, Kontoyannis D, et al. Macrovascular disease of coronaries and cerebral arteries in streptozocin-induced diabetic rats. A Controlled comparative study. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 1998, 106: 35-40
- [4] 毛春, 张苏明, 邓小红, 等. 一种改进的自体血血栓栓塞性大鼠缺血性脑卒中模型的建立. *中华老年心脑血管病杂志*, 2000, 2 (1): 48-50
- [5] Busch E, Kruher K, Hossmann KA. Improved model of thromboembolic stroke and rt-PA induced reperfusion in the rat. *Brain Res*, 1997, 778: 16-24
- [6] 陈亚梅, 谢莲君. 2型糖尿病合并脑血管疾病的危险因素分析. *中国临床康复*, 2004, 8 (36): 8241-8245
- [7] Graier WF, Grubenthal I, Dittich P, et al. Intracellular mechanism of high D-glucose-induced modulation of vascular cell proliferation. *Eur J Pharmacol*, 1995, 294 (1): 221
- [8] 王亮, 吕传真, 董强, 等. 慢性糖尿病大鼠脑缺血再灌注损伤时纤溶酶原激活物及其抑制剂 mRNA 表达的动态变化. *复旦学报 (医学版)*, 2002, 29 (2): 83-86
- [9] Sappino A P, Madan R, Huarte J, et al. Extracellular proteolysis in the adult murine brain. *J Clin Invest*, 1993, 92: 679-685
- [10] Kanse SM, Benzakour O, Kanthou C, et al. Induction of vascular SMC proliferation by urokinase indicates a novel mechanism of action in vasoproliferative disorders. *Arterioscler Thromb Vasc Bio*, 1997, 17: 2848-2854
- [11] Piallat MLB, Gabbiani G, Pepper MS, et al. Plasminogen activator expression in rat arterial smooth muscle cells depends on their phenotype and is modulated by cytokines. *Circ Res*, 1998, 82: 1086-1093
- [12] Knoop A, Andreasen PA, Andersen, et al. Prognostic significance of urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in primary breast cancer. *Br J Cancer*, 1998, 77 (6): 932
- [13] Lee HY, Hwang IY, Im H, et al. Non-proteolytic neurotrophic effects of tissue plasminogen activator on cultured mouse cerebrocortical neurons. *J Neurochem*, 2007, 101 (5): 1236-1247
- [14] Aso Y, Okumura KI, Yoshida N, et al. Enhancement of fibrinolysis in poorly controlled, hospitalized type 2 diabetic patients by short-term metabolic control: association with a decrease in plasminogen activator inhibitor 1. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2004, 112 (4): 175-180
- [15] Binder BR, Mihaly J, Prager GW. uPAR-uPA-PAI-1 interactions and signaling: a vascular biologist's view. *Thromb Haemost*, 2007, 97 (3): 336-342
- [16] Aso Y, Matsumoto S, Fujiwara Y, Tayama K, Inukai T, Take-mura Y. Impaired fibrinolytic compensation for hypercoagulability in obese patients with type 2 diabetes: association with increased plasminogen activator inhibitor-1. *Metabolism*, 2002, 51: 471-476
- [17] 王倩, 汪海. 具有抗动脉粥样硬化作用的天然药物及其单体化合物. *世界科学技术: 中药现代化*, 2004, 4 (5): 52-58
- [18] 金昔陆, 陈滨凌, 吴卫江, 等. 8种丹参素衍生物对兔血小板聚集性的影响. *上海医科大学学报*, 2000, 27 (3): 181-184
- [19] 孙可青, 徐长庆, 王新一, 等. 丹参素的抗心律失常作用及其电生理机制的研究. *中国中医药科技*, 2000, 7 (3): 171-172
- [20] 郑元义, 戴立里, 王文兵, 等. 丹参素治疗肝纤维化及其作用机制研究. *中华肝脏病杂志*, 2003, 11 (5): 288-291

(上接第31页)

- [3] 谭家凤. 谈儿童的合理用药. *江苏药学与临床研究*, 2005, 13 (1): 38-40
- [4] 王俊, 王奕, 毛德莉. 儿童合理用药中值得注意的若干问题. *中国药师*, 2005, 8 (3): 247-248
- [5] 孙蓓蓓, 赵真龄. 浅谈临床合理用药. *儿科药学杂志*, 2003, 9 (4): 33-35
- [6] 郑育平. 儿科用药特点与儿科合理用药. *中医临床杂志*, 2004, 16 (1): 13-15