

温阳化饮益气活血法对慢性心功能不全大鼠心肌 α -MHC、 β -MHC 基因表达的影响^{*}

□陈 晶^{**} (黑龙江中医药大学 哈尔滨 150040)

曹洪欣 (中国中医科学院 北京 100700)

郭 欣 (江苏大学 镇江 212003)

摘 要:目的:探讨温阳化饮益气活血法对慢性心功能不全大鼠心肌 α -MHC、 β -MHC 基因表达的影响。方法:采用腹腔注射阿霉素法复制慢性心功能不全大鼠动物模型,利用 RT-PCR 技术检测心肌重构的相关调控因素 α -MHC、 β -MHC 在慢性心功能不全发病中的作用,同时观察温阳化饮益气活血法对其干预作用。结果:慢性心功能不全大鼠模型组心肌组织 α -MHC 基因表达下调, β -MHC 基因表达上调;温阳化饮益气活血法治疗组心肌组织 α -MHC 基因表达上调, β -MHC 基因的表达下调。结论:温阳化饮益气活血法能上调慢性心功能不全大鼠 α -MHC 基因的表达,下调 β -MHC 基因的表达,为温阳化饮益气活血法的临床应用提供了实验依据,这可能是温阳化饮益气活血法防治慢性心功能不全的作用机制之一。

关键词:慢性心功能不全 温阳化饮 益气活血 肌球蛋白重链 心肌重塑

慢性心功能不全是许多心血管疾病最终的病理转归,病情呈进行性发展,且发病率仍在显著持续增加^[1],与房颤共同成为 21 世纪困扰人类健康的两大顽疾^[2]。据 Framingham 统计,严重慢性心功能不全 2 年死亡率高达 30%,6 年死亡率达 70%,其愈后与恶性肿瘤相仿,已严重影响人类健康。

温阳化饮益气活血法是针对慢性心功能不全心肾阳虚、瘀血水饮互结的基本病机而提出的,选用附子、

人参、黄芪等 10 味药物组成中药复方强心胶囊。本研究采用腹腔注射阿霉素法复制了慢性心功能不全大鼠动物模型,利用 RT-PCR 技术检测了心肌重构的相关调控因素 α -MHC、 β -MHC 在慢性心功能不全发病中的作用,同时观察了温阳化饮益气活血法对其干预作用,从分子水平揭示了该法治疗慢性心功能不全的作用机制。

一、实验材料

1. 实验动物

收稿日期:2006-00-00

修回日期:2006-00-00

* 黑龙江省科技厅科技攻关项目 (GC02C123): 强心胶囊治疗充血性心力衰竭的基础研究,负责人:陈晶;黑龙江省教育厅资助项目 (10541198): 强心胶囊治疗充血性心力衰竭的作用机制研究,负责人:陈晶。

** 联系人:陈晶,研究员,医学博士,硕士研究生导师,主要研究方向:中医治则治法机理研究。Tel: 0451-82193498 E-mail: chenjing6385@yahoo.com.cn

健康 Wistar 雄性大鼠 108 只, 体重 240–260 g, 由黑龙江中医药大学实验动物中心提供。

2 实验药物

强心胶囊 (由黑龙江中医药大学实验中心制备) 主要由炮附子、红人参、黄芪、云茯苓、焦白术、白芍、葶苈子、丹参、三七等药物组成。规格: 0.4 g/粒, 每克药粉相当于生药 2.99 g。卡托普利、参附注射液、灭菌注射用水均为市售品。

3 主要试剂

盐酸阿霉素 (深圳万乐药业有限公司)、TRIzol Reagent、SuperScript II RT-PCR 试剂盒 (Invitrogen)、DEPC (Sigma)、Taq DNA 聚合酶、dNTP、MgCl₂、10 × buffer、琼脂糖、DNA Marker DL2000 (大连宝生物公司)、溴酚蓝 (上海申能博彩公司)

二、实验方法

1 慢性心功能不全大鼠模型的复制

参照文献^[3]方法, 将盐酸阿霉素用灭菌注射用水 5 mL 使之溶解, 再加置 0.9% 生理盐水中至 12.5 mL 配成浓度为 0.8 mg/mL 的阿霉素溶液 (避光)。除正常对照组外, 其余各组大鼠分别于第 1、3、5 周腹腔注射阿霉素溶液 3 mg/kg 体重, 于第 2、4、6 周腹腔注射阿霉素溶液 2 mg/kg 体重, 每周一次, 共注射 6 次。正常对照组同时腹腔注射等容积的生理盐水。

2 动物分组及给药方法

(1) 分组。将 108 只大鼠随机分为 7 组: 慢性心功能不全模型组、强心胶囊低剂量组、中剂量组、高剂量组、卡托普利组和参附注射液组。除正常对照组为 12 只大鼠外, 余组数量相同。

(2) 给药方法。在第 5 周腹腔注射阿霉素后, 开始给予治疗用药, 即强心胶囊低、中、高剂量组分别给予 0.66 g/kg d⁻¹, 1.32 g/kg d⁻¹ 和 2.64 g/kg d⁻¹ 强心胶囊溶液, 按 1 mL/100 g 体重灌胃; 卡托普利组给予 2.31 mg/kg d⁻¹ 卡托普利溶液, 按 1 mL/100 g 体重灌胃; 正常对照组和模型组给予同体积蒸馏水灌胃; 参附注射液组腹腔注射 1.84 mL/kg d⁻¹ 参附注射液。强心胶囊低、中、高三个剂量组、卡托普利组、正常对照组和模型组灌胃给药或给水的同时, 腹腔注射 1.8 mL/

kg d⁻¹ 注射用生理盐水, 参附注射液组在腹腔注射参附注射液的同时, 口服给予 1 mL/100 g 体重蒸馏水, 连续给药四周。

3 心肌肌球蛋白重链 (MHC) 检测

采用半定量逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 方法检测心肌组织 MHC mRNA 的表达。

(1) 引物的合成。引物均在上海中科开瑞生物芯片科学股份有限公司完成。α-MHC 基因引物序列: 上游引物: 5'-CGAAACTGAAAA CGGCAAGACG-3' 下游引物: 5'-AGGCAGCTACCACTTCCGCATT-3' 扩增序列为 183–400 计 239 个碱基。β-MHC 基因引物序列: 上游引物: 5'-AAGGCCAAGATCGAGACGG-3' 下游引物: 5'-CCACTTATAGGGGTTGACGGTG-3' 扩增序列为 142–323 计 203 个碱基。三磷酸甘油醛脱氢酶 (G₃PDH) 基因引物序列: 上游引物: 5'-GGTGAAGTCGGTGTCAAC-3' 下游引物: 5'-GGGGTCGTTGATGGCAACA-3'。

(2) 心肌总 RNA 提取。取心尖部心肌组织, 经液氮速冻后, -80℃ 存放。实验时, 剪取约 0.1 g 迅速放入盛有 1 mL TRIzol 的试管中。按照试剂盒说明, 用 TRIzol (Invitrogen, Rockville, MD) 试剂提取心肌组织的总 RNA, 用紫外分光光度计测定样品 OD₂₆₀、OD₂₈₀ 数值, 以计算 RNA 纯度和含量。

(3) 逆转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR)。按照 TaKaRa RNA PCR Kit Ver 2.0 (TaKaRa 大连) 试剂盒说明书操作。RT 反应总体积 40 μL, 30℃ 反应 10 min, 55℃ 20 min, 95℃ 5 min, 5℃ 5 min 灭活逆转录酶, PCR 扩增反应总体积 25 μL, α-MHC mRNA 的 cDNA 扩增: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 30 sec, 58.3℃ 30 sec, 72℃ 30 sec, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min, β-MHC mRNA 的 cDNA 扩增: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 30 sec, 57.6℃ 30 sec, 72℃ 30 sec, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min, G₃PDH 扩增条件除退火温度为 72℃、30 个循环, 其它条件与 α-MHC mRNA 的 cDNA 扩增条件相同。取 PCR 产物 5 μL 和 DL2000 Marker 在 2% 琼脂糖下电泳, 于紫外线箱中观察并记录。凝胶成像分析系统进行拍照和分析扩增产物电泳强度, 相对含量用各 PCR 产物电泳条带密度 / G₃PDH 产物电泳条带密度表示。

4 统计方法

计量资料以 $\bar{X} \pm S$ 表示, SPSS11.5 软件包处理数据, 组间比较用方差分析。

三、不同个体 α -MHC、 β -MHC 基因表达情况

如图 M 泳道 从上至下依次为 2000 bp 1000 bp 750bp 500 bp 250 bp 100 bp 其后的 A、B、C、D、E、F、G 泳道分别为空白对照、模型组、低剂量组、中药对照组、中剂量组、西药对照组和高剂量。

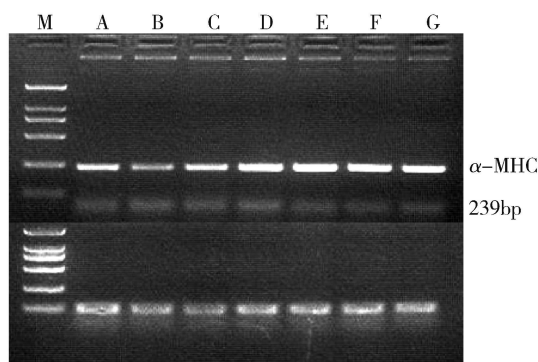


图 2 心肌组织 α -MHC 基因表达凝胶电泳图谱

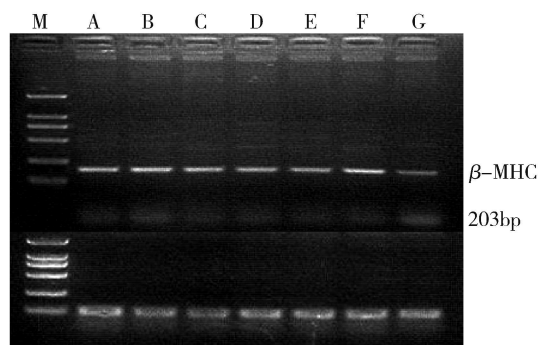


图 3 心肌组织 β -MHC 基因表达凝胶电泳图谱

表 1 温阳化饮益气活血法对慢性功能不全大鼠心肌肌球蛋白重链 (MHC) mRNA 表达的影响 ($\bar{X} \pm S$, $n = 3$)

组别	α -MHC/G3PDH	β -MHC/G3PDH
空白对照	5.23 $\pm$ 0.89 [△]	0.84 $\pm$ 0.18 [△]
模型	2.78 $\pm$ 0.48	1.86 $\pm$ 0.34
参附注射液	3.97 $\pm$ 0.52 [△]	1.24 $\pm$ 0.16 [△]
卡托普利	3.78 $\pm$ 0.39 [△]	1.27 $\pm$ 0.30
低剂量	3.41 $\pm$ 0.66	1.36 $\pm$ 0.35
中剂量	4.55 $\pm$ 0.69 [△]	1.14 $\pm$ 0.15 [△]
高剂量	4.20 $\pm$ 0.62 [△]	0.81 $\pm$ 0.13 ^{△△}

注: 与模型比较: [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$ 。

如表所示, 与空白对照组相比, 慢性心功能不全模型 α -MHC 基因 mRNA 表达明显减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。经温阳化饮益气活血法治疗后能够上调 α -MHC 的 mRNA 基因的表达, 其中高剂量表达水平高于卡托普利组和参附组。模型组 β -MHC 基因 mRNA 表达与空白对照组相比明显增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。经温阳化饮益气活血法治疗后能够下调 β -MHC 的 mRNA 基因的表达, 并呈一定的剂量依赖性, 以高剂量效果显著 ($P < 0.01$); 参附注射液也能降低 β -MHC 基因 mRNA 表达水平 ($P < 0.05$); 卡托普利虽然降低心肌 β -MHC 基因 mRNA 表达, 但与模型组比较无显著性差异 ($P > 0.05$)。

四、讨论

研究表明, 作为心肌收缩物质基础的主要心肌收缩蛋白之一的肌球蛋白 (myosin), 在心力衰竭时其表达形式有别于在正常心肌中的表达^[4,5]。主要表现为 myosin 分子的重链发生了由 α -MHC 向 β -MHC 的转化, 即 myosin 同工酶由 V1 向 V3 转化。 α 、 β -MHC 由两个不同的基因编码, 都有 40 个外显子, 位于 14 号染色体, 长约 4.2 kb, β 基因位于 α 基因上游 4000 bp 处, 二者同源性达 96%, 这两个基因的转录各自独立, 但被协同调节^[6]。大鼠胚胎期心肌表达以 β -MHC 为主, 成年后, 甲状腺激素经特殊的核受体作用于 α -MHC 基因启动子上游的顺式反应元件, 促进 α -MHC 表达并同时抑制 β -MHC 表达, 成年时大鼠心室肌表达以 α -MHC 为主, β -MHC 仅占 10% 左右。左心室在受到机械牵张或神经体液因子的刺激下, MHC 正常的基因表达将发生适应不良性改变, 表现为胚胎型 β -MHC 基因的再表达, 可占总 MHC 的 80%^[7]。肌球蛋白分子出现由 V1 向 V3 亚型的转变, 后果是心肌收缩功能减退。这种胚胎表型的基因不仅收缩功能低下, 且生存时间缩短, 从而促进心衰的发展。

众所周知, 心衰的产生主要是由于心肌收缩性减弱所致^[8,9], 而 α -MHC 与肌动蛋白 (actin) 的亲合力高于 β -MHC, 故以 α -MHC 为主的心肌收缩力强, 收缩速度快^[10]。因此, 在去除引起心衰的原发病因后, 进行心功能不全的基因治疗时, 修复 α -MHC 基因的正常表

达水平,是恢复心肌收缩力的关键措施之一。

本实验采用腹腔注射 ADR 制造慢性心功能不全大鼠模型, RT-PCR 结果显示,与空白对照组相比,模型组大鼠心肌组织中 MHC 基因表达: α -MHC 显著下降, β -MHC 显著升高,即 α -MHC 向 β -MHC 转化, V1 向 V3 转化, 心肌收缩力降低,提示 MHC 基因表达出现胚胎化特征,说明 MHC mRNA 表达异常 (α -MHC 向 β -MHC 转化),参与了心室重塑。温阳化饮益气活血法干预后,能够下调 β -MHC mRNA 的表达,上调 α -MHC mRNA 的表达,表明 α -MHC 向 β -MHC 转化减轻,并呈一定的剂量依赖性,以温阳化饮益气活血高剂量效果显著。我们分析温阳化饮益气活血法可能通过降低 AngII, 抑制组织肾素-血管紧张素系统活性,从而抑制了 β -MHC 的表达,使 α -MHC 向 β -MHC 转化减轻,恢复心肌收缩力,本研究结果为温阳化饮益气活血法的临床应用提供了实验依据,温阳化饮益气活血法可能是治疗慢性心功能不全的有效方法之一。

参考文献

- 1 张玉英. 心力衰竭的流行病学及诊治现状. 中国循环杂志, 2004 19 (1): 74~ 76
- 2 陈国伟. 充血性心力衰竭研究的若干进展. 现代实用医学, 2002, 14 (1): 1~ 3
- 3 徐淑云. 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学. 第 3 版. 人民卫生出版社. 2003, 9
- 4 李小鹰. 心血管疾病分子生物学. 人民卫生出版社, 2000 年 11 月.
- 5 戴闰柱. 心力衰竭诊断与治疗研究进展. 中华心血管病杂志, 2003 31 (9): 641.
- 6 Nakao K, Minobe W, Roden R, *et al*. Myosin heavy chain gene expression in human heart failure. *J Clin Invest* 1997, 100 2362~ 2370
- 7 Schwartz K, Boheler KR, Bastie D, *et al*. Switches in cardiac muscle gene expression as a result of pressure and volume overload. *Am J Physiol* 1992, 262: 364~ 369.
- 8 冯新为. 病理生理学. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 1991, 229~ 235.
- 9 张子彬, 张玉传. 充血性心力衰竭学. 科学技术出版社, 2002 年 10 月.
- 10 姜红, 戴闰柱, 屈伸. 心肌肌球蛋白与心血管疾病. 国外医学心血管病分册, 1996 23 (1): 67

A TCM Approach to Increase Heart Blood Circulation by Warming the Yang and Its Effects on α -MHC and β -MHC Expressions in CHF Rats

Chen Jing

(Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040)

Cao Hongxin

(China Academy of Chinese Medical Science, Beijing 100000)

Guo Xin

(Jiangsu University, Zhenjiang 212003)

This paper studies a TCM approach to increase heart blood circulation by warming the Yang and its effects on α -MHC and β -MHC expressions. In the study, CHF rats were injected with ADR using the technique of RT-PCR, in an attempt to observe the control factors of myocardial modeling including α -MHC and β -MHC. A depressed α -MHC expression with an elevated β -MHC expression is observed in the group of rats having chronic heart failure. On the contrary, the α -MHC expression is elevated with a depressed β -MHC expression in the treatment group using the approach to increase heart blood circulation by warming the Yang. It is concluded that the TCM approach employed can elevate the α -MHC expression while depressing the β -MHC expression. This provides an experimental evidence for clinic applications of the TCM approach to increase heart activating blood circulation through warming the Yang. It could eventually become a mechanism for CHF prevention.

Keywords chronic heart failure; TCM approach to increase heart activating blood circulation through warming the Yang; myosin heavy chain; myocardial modeling

(责任编辑: 王 珉, 责任编审: 张志华, 责任译审: 邹春申)