

益气温阳活血化瘀中药对心力衰竭大鼠心肌细胞葡萄糖转运蛋白 4 的干预作用研究

韩世飞¹, 曹雪滨¹, 徐淑乐¹, 何建成², 胡元会³, 崔英凯¹, 张刚¹, 杨梅¹

1. 解放军二五二医院心内科, 河北保定 071000; 2. 上海中医药大学基础医学院, 上海 201203; 3. 中国中医科学院广安门医院, 北京 100053

【摘要】 目的 研究中药复制剂心复康口服液对压力负荷型充血性心力衰竭(CHF)大鼠心肌细胞葡萄糖转运蛋白 4(GLUT4)的影响,探讨中药改善心肌能量代谢的机制。方法 将 60 只 SD 大鼠随机分为假手术组(SH)、腹主动脉缩窄模型组(CAA)、心复康口服液治疗组(XFK),每组 20 只。复制压力负荷型 CHF 大鼠模型,分别于药物干预 6 周、10 周时检测各组大鼠心功能参数、心肌细胞 GLUT4 蛋白表达。结果 制模 6 周、10 周时 CAA 组大鼠心功能明显降低,左室舒张期末压(LVEDP)、左室重量指数(LVMI)显著升高,左心室内压上升、下降最大变化速率($\pm dp/dt \max$)显著下降(P 均 <0.01);XFK 组大鼠心功能各项指标较 CAA 组明显改善(P 均 <0.01);10 周时 LVEDP、LVMI 下降及 $+dp/dt \max$ 升高较 6 周时更为显著($P<0.05$ 或 $P<0.01$),而 $-dp/dt \max$ 则无明显变化。CAA 组 6 周与 10 周时 GLUT4 较 SH 组显著下降;XFK 组较 CAA 组显著升高(P 均 <0.01),且 10 周时 GLUT4 蛋白表达较 6 周时明显升高($P<0.01$)。结论 具有益气温阳、活血化瘀作用的心复康口服液对压力负荷型 CHF 大鼠心功能及心肌细胞 GLUT4 表达具有明显的改善作用。

【关键词】 心复康口服液; 葡萄糖转运蛋白 4; 心力衰竭, 充血性; 心肌能量代谢

中图分类号:R285.5;R256.2 文献标识码:A DOI:10.3969/j.issn.1008-9691.2009.04.003

Effects of Xinfukang oral liquid (心复康口服液) on glucose transporter 4 of cardiac muscle in rats with experimental congestive heart failure HAN Shi-fei*, CAO Xue-bin, XU Shu-le, HE Jian-cheng, HU Yuan-hui, CUI Ying-kai, ZHANG Gang, YANG Mei. * Department of Cardiology, 252 Hospital of PLA, Baoding 071000, Hebei, China

Corresponding author: CAO Xue-bin, Email: cxb252@yahoo.com.cn

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of traditional Chinese medicine (TCM) Xinfukang oral liquid (心复康口服液) on the glucose transporter 4 (GLUT4) of cardiac muscle in rats with pressure overload-induced left ventricular hypertrophy and study its mechanisms of improving myocardial energy metabolism. **Methods** The models of congestive heart failure (CHF) were established by constricting the abdominal aorta of rats partly. Sixty Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into sham operation (SH) group, coarctation of abdominal aorta (CAA) model group and Xinfukang oral liquid (XFK) treatment group (each, $n=20$). The parameters of cardiac function and quanta of GLUT4 expression in cardiac muscle in every group were respectively measured at the time points of 6th and 10th week after the intervention of the drug. **Results** ①The study showed that in CAA group, the cardiac function was decreased significantly, left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP) and left ventricular mass index (LVMI) were markedly increased, and the maximum ascending and descending changing rates of the left intra-ventricular pressure ($\pm dp/dt \max$) was decreased obviously (all $P<0.01$). In the XFK group all kinds of cardiac function parameters were significantly improved compared with those in CAA group (all $P<0.01$); the LVEDP and LVMI were more significantly decreased, and $+dp/dt \max$ was more obviously increased in XFK group at the 10th than those at the 6th week point ($P<0.05$ or $P<0.01$), while this comparison did not show any obvious difference in $-dp/dt \max$ ($P>0.05$). ②The study showed that at the time points of 6th and 10th week, GLUT4 expression in XFK group was higher than that in the CAA group (both $P<0.01$). The comparison of GLUT4 expression at the time points of 6th and 10th week in XFK group revealed obvious difference ($P<0.01$). **Conclusion** TCM Xinfukang oral liquid possessing actions of replenishing Qi (益气), warming Yang (温阳), improving blood circulation and removing blood stasis (活血化瘀) can obviously improve cardiac function and enhance GLUT4 expression in the cardiac muscle of rats with pressure overload-induced cardiac failure.

【Key words】 Xinfukang oral liquid; glucose transporter 4; congestive heart failure; myocardial energy metabolism

心力衰竭(心衰)时心肌细胞利用脂肪酸减少,利用葡萄糖供能增多。缺血细胞摄取葡萄糖量的高低与葡萄糖通过细胞膜转运率相关,而葡萄糖的转运则主要依赖葡萄糖转运蛋白(GLUT)来进行,而在心肌细胞中, GLUT 主要为 GLUT4。本研究中通过观察具有益气温阳、活血化瘀功效的中药制剂心复康口服液对充血性心衰(CHF)大鼠心功能及心肌细胞 GLUT4 蛋白表达的影响,探讨心复康口服液治疗 CHF 的可能机制。

1 材料与方法

1.1 动物分组及模型制备:雄性 SD 大鼠 60 只,体重(225±25)g,由河北医科大学实验动物中心提供。按随机数字表法分为假手术组(SH)、腹主动脉缩窄模型组(CAA)、心复康口服液治疗组(XFK),每组 20 只。按文献[1]方法制备压力负荷型左室肥厚 CHF 大鼠模型。

1.2 主要实验材料:心复康口服液(由人参、黄芪、丹参、附子、淫羊藿、灵芝等药物组成)由本院制剂中心按照口服药物制剂工艺制成,批准文号:北制字(2006)F17003;每支 10 ml,含生药量 1.5 g/ml。羊抗兔多克隆抗体(多抗,1:5 000,上海康成生物工程有限公司)、小鼠抗大鼠 GLUT4 单克隆抗体(单抗,上海肯强仪器有限公司)。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 心功能参数测定:于药物干预 6 周、10 周时检测各组大鼠左室舒张期末压(LVEDP)、收缩期左室内压上升最大变化速率(+dp/dt max)、舒张期左室内压下降最大变化速率(-dp/dt max)等指标。称取大鼠体重及左室重量,计算左室重量指数(LVMI=左室重量/体重),反映左室心肌肥厚程度。

1.3.2 蛋白质免疫印迹法(Western blotting)测定心肌细胞中 GLUT4 蛋白的含量:取 100 mg 左室心

肌组织,加 1 ml 组织裂解液(RIPA)和 10 μl 苯甲基磺酰氟(PMSF),冰浴中匀浆,4 ℃、20 000×g 离心 30 min。取上清液,以 BCA 法测定上清液中蛋白浓度。各组取等量蛋白匀浆液,调节上样量一致,对照孔加预染蛋白 Marker(上海康成生物工程有限公司),然后进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白,经过电转膜、封闭、加入小鼠抗大鼠 GLUT4 单抗稀释液孵育、洗膜、加入羊抗兔多抗、再洗膜等过程后,用增强化学发光法(ECL)显像曝光,经扫描凝胶成像仪分析,检测蛋白表达水平,以 GLUT4/三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)进行定量分析。

1.4 统计学处理:实验数据用 SPSS 11.0 统计软件处理。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 心功能参数结果(表 1):6 周、10 周时 CAA 组 LVEDP、LVMI 较 SH 组显著升高,±dp/dt max 显著降低(P 均 < 0.01),说明 CAA 组心衰大鼠心功能障碍随着时间的延长持续存在,并呈恶化趋势;XFK 组 LVEDP、LVMI 均较 CAA 组显著降低,±dp/dt max 显著升高,LVEDP 较 SH 组显著升高,±dp/dt max 显著降低(P 均 < 0.01),表明心复康口服液治疗后 CHF 大鼠心功能得到改善。SH 组大鼠 6 周、10 周时心功能各项指标比较差异无统计学意义(P 均 > 0.05);CAA 组 10 周时 LVEDP、LVMI 较 6 周时明显升高,±dp/dt max 较 6 周时明显下降(P 均 < 0.05);XFK 组 10 周时 LVEDP、LVMI 较 6 周时明显下降(P 均 < 0.05),+dp/dt max 显著升高($P < 0.01$),-dp/dt max 无明显变化。

2.2 GLUT4 蛋白表达(图 1;表 2):6 周时 SH 组 GLUT4 蛋白表达最高,CAA 组 GLUT4 蛋白表达较 SH 组明显降低,而 XFK 组 GLUT4 蛋白表达显

表 1 各组大鼠不同时间点心功能比较($\bar{x} \pm s$)

组别	6 周时心功能					10 周时心功能				
	动物数	LVEDP (mm Hg)	+dp/dt max (mm Hg/s)	-dp/dt max (mm Hg/s)	LVMI	动物数	LVEDP (mm Hg)	+dp/dt max (mm Hg/s)	-dp/dt max (mm Hg/s)	LVMI
SH 组	10	12.0±1.8	3 526.4±280.5	-3 155.4±236.3	1.758±0.500	7	11.6±2.5	3 639.9±323.7	-3 025.9±337.7	1.883±0.103
CAA 组	10	8.3±1.2 ^a	1 145.4±103.4 ^a	-784.0±72.0 ^a	2.898±0.151 ^a	5	12.6±2.6 ^{ac}	874.8±175.3 ^{ac}	-656.7±125.6 ^{ac}	3.192±0.167 ^{ac}
XFK 组	10	2.6±0.6 ^{ab}	2 240.9±267.2 ^{ab}	-2 065.8±154.5 ^{ab}	2.306±0.400 ^b	7	0.6±2.8 ^{abc}	2 969.0±313.1 ^{abd}	-2 185.6±309.3 ^{ab}	1.750±0.316 ^{bc}

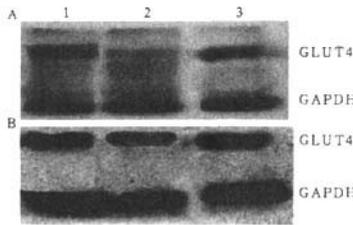
注:与 SH 组比较,^a $P < 0.01$;与 CAA 组比较,^b $P < 0.01$;与本组 6 周时比较,^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$;1 mm Hg=0.133 kPa

基金项目:国家自然科学基金项目(30873398);全军“十一五”攻关课题资助(2006MA064);河北省科技攻关课题(06276012D-114)

通信作者:曹雪滨,Email:cxbs252@yahoo.com.cn

作者简介:韩世飞(1977-),男(汉族),河北省人,硕士研究生,医师。

著高于 CAA 组 (P 均 < 0.01); 随着制模时间的延长, CAA 组 GLUT4 蛋白表达持续降低, 10 周时 XFK 组 GLUT4 蛋白表达显著高于 CAA 组 ($P < 0.01$), 但略低于 SH 组 ($P > 0.05$)。



A: 6 周, B: 10 周, 1~3 依次为 SH 组、CAA 组、XFK 组
图 1 Western blotting 检测各组大鼠不同时间点心肌细胞 GLUT4 蛋白表达

表 2 各组大鼠不同时间点心肌细胞 GLUT4 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	GLUT4/GAPDH	
	6 周	10 周
SH 组	0.588 0 ± 0.081 1 (6)	0.599 1 ± 0.103 6 (7)
CAA 组	0.272 7 ± 0.065 8 (6) ^a	0.237 0 ± 0.128 0 (5) ^a
XFK 组	0.403 4 ± 0.063 9 (6) ^b	0.509 4 ± 0.041 9 (7) ^{bd}

注: 与 SH 组比较, ^a $P < 0.01$; 与 CAA 组比较, ^b $P < 0.01$; 与本组 6 周时比较, ^d $P < 0.01$; 括号内为动物数

3 讨论

GLUT4 是一种膜蛋白, 有证据表明心肌葡萄糖摄取是通过细胞器膜 GLUT4 移位所致^[2]。许多因素可诱导 GLUT4 表达, 但以缺血刺激时心肌 GLUT4 表达最明显^[3]。在基础状态下, GLUT4 位于细胞质中的小囊泡中, 在胰岛素或运动刺激时, GLUT4 转移至细胞器膜, 使细胞器膜的 GLUT4 含量增高 10~20 倍^[4]; 从而使 GLUT4 在细胞器膜的表达增多, 进而加快葡萄糖的转运。葡萄糖进入细胞主要依靠葡萄糖载体 GLUT1 和 GLUT4, 前者在多种组织中表达, 主要调控基础葡萄糖摄取; 而 GLUT4 主要在心脏表达, 胰岛素、缺血、缺氧和快速收缩可刺激其快速移位到细胞器膜, 增加葡萄糖的摄取, 而葡萄糖摄取量的增高则可较好代偿缺血心肌能量平衡的需要。故糖代谢的上调有利于保护心肌收缩和舒张功能, 减少心肌酶的释放, 预防缺血痉挛。由上可知, GLUT4 在增加葡萄糖的供给方面具有重要的意义。

本课题组前期的研究证实, 益气活血中药心复康口服液具有促进心肌梗死后心衰大鼠心肌细胞 GLUT1 mRNA 表达的作用, 促进心衰心肌葡萄糖

利用, 改善心衰引起的心肌能量代谢障碍, 从而保护心功能^[5]。研究证实多味中药均可使 GLUT4 在细胞器膜上的表达增多, 加快葡萄糖转运^[6-8]。本研究结果显示 SH 组 GLUT4 蛋白表达最高, XFK 组 GLUT4 蛋白表达较 CAA 组明显升高, 说明心复康口服液可拮抗心衰大鼠心肌细胞 GLUT4 蛋白表达下降; 10 周时表达高于 6 周时, 说明随着药物干预时间的延长, 心复康口服液对 GLUT4 表达调节作用亦逐渐增强。表明心复康口服液可通过增加 GLUT4 的表达, 加快葡萄糖转运, 增加心肌组对织葡萄糖的摄入、利用, 从而为心肌提供更充足的产能底物来改善心肌能量代谢障碍, 进而可明显改善心功能障碍, 达到治疗心衰的目的; 此作用随着药物干预时间的延长而逐渐加强。

本研究提示, 心复康口服液对心衰大鼠心肌细胞 GLUT4 表达有明显的调节作用, 进而能显著改善心衰大鼠心功能障碍, 因而我们推测心复康口服液对 GLUT4 这种调节作用可能是其改善心肌能量代谢、治疗 CHF 的主要机制之一。

参考文献

- [1] 吴时达, 徐俊波, 付远志, 等. 慢性充血性心力衰竭肾阳虚型大鼠模型的研究[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2002, 9(4): 197-201.
- [2] James DE, Strube M, Mueckler M. Molecular cloning and characterization of an insulin-regulatable glucose transporter[J]. Nature, 1989, 338(6210): 83-87.
- [3] 殷仁富, 陈金明, 吴宗贵, 等. 胰岛素促进犬在体心肌葡萄糖转运子 4 基因表达[J]. 免疫学杂志, 2001, 17(2): 132-134.
- [4] Govers R, Coster AC, James DE. Insulin increases cell surface GLUT4 levels by dose dependently discharging GLUT4 into a cell surface recycling pathway[J]. Mol Cell Biology, 2004, 24(14): 6456-6466.
- [5] 吴华芹, 胡会元, 王阶, 等. 心复康口服液对心梗后心衰大鼠心肌组织 ATP 含量及 GLUT1 基因表达的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2008, 14(4): 268-270.
- [6] 宋春宇, 毕会民. 葛根素对大鼠胰岛素刺激下骨骼肌细胞膜 GLUT4 蛋白含量的影响[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(2): 172-175.
- [7] 李娟娟, 毕会民. 葛根素对胰岛素抵抗大鼠脂肪细胞葡萄糖转运蛋白 4 的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(8): 885-888.
- [8] 张雷, 陈立梅, 倪红霞, 等. 葛根素影响链脲佐菌素诱导糖尿病大鼠脂肪细胞葡萄糖转运蛋白 4 的表达[J]. 中国临床康复, 2006, 10(39): 135-138.

(收稿日期: 2009-06-25)
(本文编辑: 李银平)

• 广告目次 •

- ① 珠海丽珠: 丽珠血液灌流器 (封 2)
- ② 天津红日药业: 血必净注射液 (封底)