

• 论著 •

心复康口服液对慢性压力负荷性心力衰竭大鼠心肌腺苷酸转位酶的影响

王洪良¹, 曹雪滨¹, 王艳飞², 张刚¹, 崔英凯¹, 何建成³, 胡元会⁴

(1. 解放军二五二医院心血管内科, 河北 保定 071000; 2. 河北大学附属医院心内科, 河北 保定 071000; 3. 上海中医药大学基础医学院, 上海 201203; 4. 中国中医科学院广安门医院, 北京 100053)

【摘要】 目的 探讨益气温阳活血化瘀方药心复康口服液对慢性压力负荷性心力衰竭大鼠心肌线粒体腺苷酸转位酶(ANT)的影响。方法 将 90 只雄性 SD 大鼠按随机数字表法分为假手术组、模型组、治疗组, 每组 30 只。采用腹主动脉缩窄法制作慢性压力负荷性心力衰竭大鼠模型; 假手术组仅穿线、不结扎。治疗组于术后 1 周灌胃心复康口服液(10 ml · kg⁻¹ · d⁻¹)4 ml; 模型组及假手术组灌胃等量生理盐水。于治疗 4、8、12 周取大鼠心肌组织, 采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测心肌线粒体 ANT1 和 ANT2 的 mRNA 表达。结果 与假手术组比较, 模型组 4、8、12 周心肌线粒体 ANT1 mRNA 表达逐渐升高, ANT2 mRNA 表达逐渐降低, 分别于 12 周达峰值和谷值, 差异有统计学意义(ANT1 mRNA: 28.44 ± 0.04 比 27.32 ± 0.49; ANT2 mRNA: 21.40 ± 0.12 比 23.97 ± 0.05, 均 P < 0.05); 与模型组比较, 治疗组 ANT1 和 ANT2 的 mRNA 表达均逐渐升高, 并于 12 周达峰(ANT1 mRNA: 29.39 ± 0.15; ANT2 mRNA: 23.83 ± 0.20), 差异有统计学意义(均 P < 0.05)。结论 心复康口服液能通过改善慢性压力负荷性心力衰竭心肌 ANT1、ANT2 的表达, 从而抑制细胞凋亡、改善能量代谢。

【关键词】 心复康口服液; 慢性压力负荷性心力衰竭; 腺苷酸转位酶; 能量代谢; 细胞凋亡

中图分类号: R285.5; R256.2 文献标识码: A DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2011.01.005

Effect of Xinfukang oral liquid (心复康口服液) on adenine nucleotide translocator in myocardium of rats with chronic pressure overload heart failure WANG Hong-liang*, CAO Xue-bin, WANG Yan-fei, ZHANG Gang, CUI Ying-kai, HE Jian-cheng, HU Yuan-hui. * Department of Cardiology, the 252th Hospital of PLA, Baoding 071000, Hebei, China

Corresponding author: CAO Xue-bin, Email: cxb252@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of Xinfukang oral liquid (心复康口服液) with actions of supplementing Qi (益气), warming yang (温阳), promoting blood circulation and removing blood stasis (活血化瘀) on adenine nucleotide translocator (ANT) in myocardial mitochondria of rats with chronic pressure overload heart failure induced by partial coarctation of abdominal aorta. **Methods** Ninety male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into three groups: sham operation, model and treatment groups (each, n = 30). Chronic pressure overload heart failure model was reproduced by partial coarctation of abdominal aorta, and rats in sham operation group received an operation with only the penetration of a thread without coarctation of abdominal aorta. One week after operation, 4 ml Xinfukang oral liquid (10 ml · kg⁻¹ · d⁻¹) began to be administered into the stomach in the treatment group, and the same amount of normal saline was given in model and sham operation groups. The myocardium was harvested at 4, 8, 12 weeks after treatment, and the mRNA expressions of ANT1 and ANT2 were detected from myocardial mitochondria by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** Compared with sham operation group, the ANT1 mRNA expression was significantly increased, while the ANT2 mRNA expression was obviously decreased in model group at 4, 8, 12 weeks after treatment, and they reached the highest and lowest value at 12 weeks, respectively (ANT1 mRNA: 28.44 ± 0.04 vs. 27.32 ± 0.49; ANT2 mRNA: 21.40 ± 0.12 vs. 23.97 ± 0.05, both P < 0.05). Compared with model group, the expressions of ANT1 mRNA and ANT2 mRNA were markedly increased at 4, 8, 12 weeks after treatment in treatment group, and they peaked at 12 weeks (ANT1 mRNA: 29.39 ± 0.15; ANT2 mRNA: 23.83 ± 0.20, both P < 0.05). **Conclusion** Xinfukang oral liquid can inhibit the cell apoptosis and enhance the energy metabolism through improving the expressions of ANT1 mRNA and ANT2 mRNA in chronic pressure overload heart failure myocardium.

【Key words】 Xinfukang oral liquid; Chronic pressure overload heart failure; Adenine nucleotide translocator; Energy metabolism; Apoptosis

基金项目: 国家自然科学基金项目(30873398); 全军“十一五”攻关课题资助项目(2006MA074); 河北省科技攻关项目(062760120-114)
通信作者: 曹雪滨, Email: cxb252@126.com
作者简介: 王洪良(1983-), 男(汉族), 山东省人, 硕士研究生, 医师。

心力衰竭(心衰)发生发展的基础是心肌重构。Braunwald 和 Bristow^[1]指出: 心肌重构是心脏功能和结构的内源性缺陷, 可能有真正的生物学基础改变; 能量代谢障碍及基因表达异常贯穿于心肌重构

的全过程,是心衰发生发展和恶化的重要因素之一。位于心肌线粒体内膜的线粒体腺苷酸转位酶(ANT)对维持心肌细胞的能量状态以及在影响心功能的发挥中有重要作用。本实验中通过建立慢性压力负荷性心衰大鼠模型,观察用益气温阳活血化瘀中药心复康口服液治疗 4、8、12 周后心肌线粒体 ANT 的变化,研究心复康口服液对细胞凋亡、能量代谢的影响及可能机制。

1 材料与与方法

1.1 实验动物及分组:清洁级雄性 SD 大鼠 90 只,体重(200±25) g,由军事医学科学院实验动物中心提供,许可证号:SCXK(京)2003-1-003。按随机数字表法分为假手术组、模型组、治疗组,每组 30 只。

1.2 动物模型制备及给药:采用腹主动脉缩窄法制备慢性压力负荷性心衰动物模型^[2];假手术组仅腹主动脉穿线而不结扎。术后 1 周治疗组给予心复康口服液(10 ml·kg⁻¹·d⁻¹)4 ml 灌胃;模型组、假手术组灌胃等量生理盐水。心复康口服液由解放军第二五二医院制剂中心按口服药物制剂工艺制成,由人参、黄芪、丹参、附子、淫羊藿、灵芝等药物组成,10 ml/支,含生药 1.5 g/ml,批准文号:北联制字(2001)FP04006。喂养 4 周、8 周后分别取 6 只、7 只大鼠作为研究对象。喂养 12 周后,假手术组、模型组、治疗组各死亡 8 只、8 只、7 只,均以剩余大鼠作为各组 12 周研究对象。

1.3 检测指标及方法:各时间点处死大鼠取心脏进行组织匀浆,低温高速离心机多次离心后获得沉淀即得线粒体。将线粒体用 20 mmol/L、pH 值 7.2 的三羟甲基氨基甲烷盐酸缓冲液(Tris-HCl)悬浮待用。采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 ANT mRNA 的表达。用 TRIzol 一步法提取心肌组织总 RNA,取 10 μl 总 RNA 经 1%甲醛溶液变性琼脂糖凝胶电泳检测 18S rRNA 和 28S rRNA 并证实完整性后,取 2 μg 总 RNA 进行逆转录反应合成 cDNA,随后进行 PCR 反应。PCR 产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭(EB)染色后紫外光下观察,用 GDS28000 型凝胶成像分析系统测定条带灰度,经内参照 β-肌动蛋白(β-actin)标准化后进行半定量分析。实验重复 3 次。

1.4 统计学处理:使用 SPSS 10.0 统计软件。数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,同一时间点各组间比较用单因素方差分析,同组内不同时间点两两比较采用成组 *t* 检验,不符合正态分布则采用非参数检验(Wilcoxon 检验),*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RT-PCR 结果(图 1):大鼠心肌 ANT1、ANT2 基因 RT-PCR 产物电泳 DNA 条带与引物设计的目的条带一致。

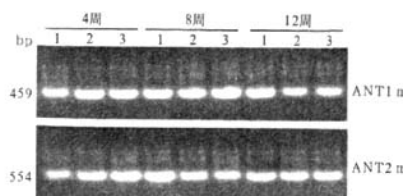


图 1 RT-PCR 检测各组大鼠 ANT1 和 ANT2 的 mRNA 表达

2.2 各组大鼠 ANT1 mRNA 表达水平比较(表 1):随着制模时间的延长,心肌负荷逐渐加重,模型组 4、8、12 周 ANT1 mRNA 表达水平较假手术组逐渐升高(均 *P*<0.05),说明凋亡程序已启动。治疗组各时间点 ANT1 mRNA 表达较假手术组、模型组明显升高,12 周达峰值(均 *P*<0.05),说明心复康口服液对慢性压力负荷性心衰模型大鼠治疗效果较好。

表 1 各组大鼠心肌线粒体 ANT mRNA 表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	动物数	ANT1 mRNA	ANT2 mRNA
假手术组	4 周	6	27.37±0.06	23.62±0.12
	8 周	7	27.35±0.15	22.75±0.24
	12 周	9	27.32±0.49	23.97±0.05
模型组	4 周	6	27.49±0.12 ^a	22.40±0.16 ^a
	8 周	7	28.11±0.12 ^{ab}	22.14±0.09 ^{ab}
	12 周	9	28.44±0.04 ^{abc}	21.40±0.12 ^{abc}
治疗组	4 周	6	28.68±0.06 ^{ad}	22.83±0.11 ^{ad}
	8 周	7	29.03±0.17 ^{abd}	23.26±0.27 ^{abd}
	12 周	10	29.39±0.15 ^{abcd}	23.83±0.20 ^{abcd}

注:与假手术组同期比较,^a*P*<0.05;与本组 4 周比较,^b*P*<0.05;与本组 8 周比较,^c*P*<0.05;与模型组同期比较,^d*P*<0.05

2.3 各组大鼠 ANT2 mRNA 表达水平比较(表 1):随着制模时间的延长,心肌负荷逐渐加重,模型组 4、8、12 周 ANT2 mRNA 表达水平较假手术组逐渐降低(均 *P*<0.05),说明心肌存在能量代谢障碍。治疗组各时间点 ANT2 mRNA 表达均较模型组明显升高,12 周达峰值(均 *P*<0.05),说明应用益气温阳、活血化瘀中药心复康口服液治疗后心肌能量代谢明显改善。

3 讨论

缩窄腹主动脉导致慢性压力负荷可造成大鼠肾脏缺血,使肾素生成增加,肾素作用于血管紧张素原,引起血管紧张素 I、II 含量增加,并通过对交感神经的作用使儿茶酚胺增加,血压升高。狭窄腹主动脉可直接使血压升高,心脏后负荷加重,造成左心室

肥厚导致左心衰竭。心脏负荷的增加导致心肌重构的机制目前仍未完全明了,但心肌细胞凋亡及能量代谢紊乱无疑在这一过程中起了重要的作用^[3-4]。位于线粒体内膜的 ANT 有多种同型异构体(人类有 ANT1、ANT2、ANT3,大鼠有 ANT1、ANT2)。ANT1 主要在心肌、骨骼肌表达,是线粒体内、外膜交接点处形成非特异性孔道(mtPTPC),mtPTPC 定位于线粒体内膜和外膜的接触位点^[5];在凋亡过程中,mtPTPC 长时间开放触发各种离子自由跨膜流动,导致膜电位丧失,基质溶胀,引起细胞凋亡。ANT2 主要分布在内膜的外围和脊形成部分,在酵母动力学研究中发现 ANT2 更多参与能量供应。

本实验显示,模型组 ANT1 mRNA 表达较假手术组明显升高,且随心肌负荷加重而逐渐升高。进一步证实诱发细胞凋亡的 ANT1 mRNA 与慢性压力负荷导致的心功能恶化相关。Teiger 等^[6]证实,在压力负荷所致心衰早期即出现心肌细胞凋亡,其机制可能是由于压力负荷加大使心肌能量需求上升,脂肪酸代谢相对增加,导致大量活性氧族(ROS)的生成,同时心肌细胞膜上 Ca^{2+} 泵功能失调,出现 Ca^{2+} 超载,使线粒体 mtPTPC 数目上调,mtPTPC 开放,导致心肌细胞膜电位丧失,基质溶胀,最终引起细胞凋亡。

心复康口服液是临床治疗充血性心衰的经验方,方中黄芪、人参健脾益气;黄芪还有强心作用,可使心脏收缩振幅增大,心排血量增加,对中毒或病劳衰竭的心脏更为明显,在心衰时的强心作用更为明显。本课题组前期的研究证实,具有益气温阳、活血化瘀功效的中药对改善心肌能量代谢有明确作用,可能是中药治疗充血性心衰的重要机制之一^[7];对心衰大鼠线粒体膜通透性的研究显示,心复康口服液可提高心衰大鼠心肌细胞线粒体琥珀酸脱氢酶的含量,改善心肌细胞线粒体能量代谢^[8-9],对心肌能量代谢具有一定的保护作用;并可通过增加葡萄糖转运蛋白 4(GLUT4)的表达,加快葡萄糖运转,增加心肌组织对葡萄糖的摄入、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,可明显改善心功能障碍^[10]。据此,我们提出中药对心肌细胞凋亡的抑制、能量代谢障碍的改善,可提高 ANT 的活性,可能是中药治疗心肌损伤的机制之一。本研究显示,治疗组 ANT mRNA 表达明显高于模型组、假手术组,提示心复康口服液可明显改善 ANT1、ANT2 的活性,其可能机制是通过提高 Ca^{2+} -ATP 酶活性,促进心肌细胞 Ca^{2+} 转运,防止心

肌细胞 Ca^{2+} 超载的作用^[11],使线粒体上的 mtPTPC 数目减少,缩短 mtPTPC 通道开放的时间,减少细胞凋亡。本实验进一步证实,随着慢性压力负荷导致的心功能恶化,ANT mRNA 表达发生明显变化,诱发细胞凋亡的 ANT1 mRNA 表达增高,参与能量代谢的 ANT2 mRNA 转运活性降低,说明心肌负荷加重时存在明显的细胞凋亡、能量代谢障碍。

现在临床上应用血管紧张素转换酶抑制剂(ACEI)类及血管紧张素受体拮抗剂(ARB)类药物来改善心室重构越来越普遍。动物实验表明,ARB 可抑制心肌梗死大鼠的心肌肥厚和纤维化^[12];也有研究表明,ARB 类药物在降低血压的同时,可抑制心肌梗死患者的心室重构^[13]。作为祖国传统医学的中医药领域,益气温阳、活血化瘀中药心复康口服液能够改善慢性压力负荷性心衰大鼠心肌 ANT1、ANT2 的活性,尤其是早期的治疗效果更加明显,提示益气温阳、活血化瘀中药能够抑制细胞凋亡、改善能量代谢,逆转心肌肥厚及心室重塑提供了新途径。

参考文献

- [1] Braunwald E, Bristow MR. Congestive heart failure; fifty years of progress. *Circulation*, 2000, 102(20 Suppl 4): N 14-23.
- [2] 王艳飞,曹雪滨,崔英凯,等.改良大鼠左心室插管术及心衰大鼠左心功能指标的测定. *中国比较医学杂志*, 2008, 18(12): 34-36.
- [3] van Empel VP, Bertrand AT, Hofstra L, et al. Myocyte apoptosis in heart failure. *Cardiovasc Res*, 2005, 67(1): 21-29.
- [4] van Bilsen M. "Energetics" of heart failure. *Ann N Y Acad Sci*, 2004, 1015: 238-249.
- [5] Vieira HL, Haouzi D, El Hamel C, et al. Permeabilization of the mitochondrial inner membrane during apoptosis: impact of the adenine nucleotide translocator. *Cell Death Differ*, 2000, 7(12): 1146-1154.
- [6] Teiger E, Than VD, Richard L, et al. Apoptosis in pressure overload-induced heart hypertrophy in the rat. *J Clin Invest*, 1996, 97(12): 2891-2897.
- [7] 胡元会,车维新,李新毅,等.心复康口服液对亚急性阿霉素心肌损伤大鼠心功能及自由基代谢的影响. *中医药研究*, 1999, 15(5): 38-40.
- [8] 胡元会,车维新,曹雪滨,等.心复康口服液对大鼠实验性心衰模型心肌细胞 Ca^{2+} -ATPase 及琥珀酸脱氢酶活性的影响. *中国医药学报*, 2000, 15(2): 33-35.
- [9] 胡元会,曹雪滨,曹贵民,等.心复康口服液对实验性心衰模型大鼠心肌细胞自由基代谢和膜通透性的影响. *中国中医基础医学杂志*, 2000, 6(2): 16-19.
- [10] 韩世飞,曹雪滨,徐淑东,等.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. *中国中西医结合急救杂志*, 2009, 16(4): 203-205.
- [11] 胡元会,车维新,曹贵民,等.心复康口服液对大鼠实验性心衰模型心肌 Ca^{2+} 定位及 Ca^{2+} -ATPase 活性的影响. *中国中医基础医学杂志*, 1999, 5(10): 27-30.
- [12] 孙静,张世殊,毛用敏,等.西拉普利和缬沙坦对大鼠心肌梗死后心肌间质成分水平的干预研究. *中国危重病急救医学*, 2007, 19(4): 244-245.
- [13] 黄彦生,孙俊华,李学校,伊贝沙坦对急性心肌梗死后左室功能及重塑的影响. *中国危重病急救医学*, 2003, 15(8): 476-478.

(收稿日期: 2010-12-15)

(本文编辑:李银平)