



益气养阴活血配伍对缺血心肌差异基因表达的影响

殷惠军, 郭春雨, 史大卓*

中国中医科学院西苑医院心血管病中心, 北京 100091

* 联系人, E-mail: heartmail@263.net

2009-02-02 收稿, 2009-05-12 接受

国家自然科学基金资助项目(批准号: 30572430)

摘要 本研究在既往建立的大鼠缺血心肌基因差异表达谱基础上, 探讨了益气养阴、活血及其配伍中药对缺血心肌差异基因表达影响及可能的作用机制。采用冠状动脉左前降支结扎法制备大鼠 AMI 模型, 造模后将大鼠随机分为 5 组: 模型组、美插洛尔组、益气养阴组、活血组和益气养阴活血组, 并设正常组和假手术组, 假手术组只穿线不结扎, 术后 24 h 给予正常组和假手术组等体积生理盐水, 给予其他各组相应药物灌胃。第 8 天截取心肌缺血区组织, 光学显微镜观察病理形态, 分别应用荧光定量 PCR 及化学比色法检测目标基因 mRNA 表达水平和翻译蛋白酶活性。结果显示, 模型组 HE 染色可见心肌组织缺血区心肌肿胀、炎细胞浸润和细胞溶解, 各用药组病理改变较模型组均明显较轻, 益气养阴组、活血组能量代谢相关基因细胞色素 C 氧化酶 5a (Cox5a) 和 ATP 合酶 5e (ATP5e) 基因表达量和酶活性均出现了下调趋势, 而益气养阴活血配伍组 Cox5a, ATP5e 对应的蛋白酶活性显著下降 ($P < 0.05$)。这表明能量代谢作用通路相关基因的异常表达是引起 AMI 心肌损伤的重要分子机制之一, 益气养阴活血配伍中药影响 COX5a, ATP5e 等能量相关功能基因的表达是其抗心肌缺血的可能机制, 较单纯益气养阴、活血效果理想。

关键词

缺血心肌
益气养阴活血配伍
差异表达基因
能量代谢

急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 引起的心肌缺血过程存在着心肌细胞的能量代谢障碍^[1], 虽然 AMI 发生的确切病理机制尚有待进一步的阐明, 但大量研究证明, 由心肌细胞急性缺血缺氧引发的心肌能量耗竭是多种原因诱导引起 AMI 心肌损伤的共同基础。深入研究缺血心肌能量代谢改变的分子机制、干预这些机制中的分子靶点, 成为世界范围内心血管基础和临床研究领域关注的焦点。

缺血缺氧引起心肌收缩功能减退、能量储备下降等表现为心前疼痛、乏力、气短等, 符合中医气虚血瘀特点, 益气养阴活血治法是目前中医临床治疗 AMI 的主要方法。多项研究证明, 采用益气养阴、活血及其配伍结合西医常规治疗 AMI, 可明显减少 AMI 患者住院死亡率及并发症发生率^[2]。心悦胶囊 (西洋

参茎叶总皂苷) 具有益气阴之效, 是目前国内治疗冠心病的有效中药。本课题组前期研究显示, 心悦胶囊可改善心肌缺血、调整糖脂代谢、促进缺血心肌血管新生^[3]。丹参片是目前国内治疗冠心病最为普及的活血化瘀制剂。大量研究表明, 该药可以改善心肌缺血、扩张冠脉、对 AMI 后左室重构亦有一定作用, 与心悦胶囊有机结合可充分体现传统中医益气养阴活血治法。

本课题组前期应用长标签基因表达系列分析 (LongSAGE) 方法, 构建了 AMI 后大鼠缺血心肌基因差异表达谱。对其进行生物信息学分析后发现, 以正常心肌 LongSAGE 谱为对照, 得到缺血心肌组织显著性差异基因 142 个 ($P < 0.05$), 其中大部分差异基因在缺血心肌组织特异性表达, 有 20 个基因与氧化磷酸

引用格式: 殷惠军, 郭春雨, 史大卓. 益气养阴活血配伍对缺血心肌差异基因表达的影响. 科学通报, 2009, 54: 2325~2328

Yin H J, Guo C Y, Shi D Z. Effects of Chinese herbs capable of replenishing qi, nourishing yin and activating blood circulation and their compatibility on differentially expressed genes of ischemic myocardium. Chinese Sci Bull, 2009, 54, doi: 10.1007/s11434-009-0484-9

化、ATP合成、糖酵解/糖异生等能量代谢通路相关,提示AMI发生后能量代谢相关基因表达调控的改变是诱发缺血心肌损伤的一个主要原因^[4]。

益气养阴、活血及其配伍治法是否通过调控能量相关靶基因来发挥促进心肌血供,保护存活心肌的作用,其作用机制如何呢?由此,本研究选取线粒体氧化磷酸化作为目标通路,以表达差异较大的通路关键基因细胞色素 C 氧化酶 5a (Cox5a)和 ATP 合酶 5e (ATP5e)基因为目标基因,观察益气养阴、活血及其配伍中药对 2 个基因 mRNA 表达和蛋白酶活性的影响,为益气养阴、活血及其配伍治疗 AMI 提供分子生物学依据。

1 材料和方法

() 材料. 健康 Wistar 大鼠 140 只,雄性,体重(160 ± 20) g,清洁级,由北京维通利华实验动物技术公司提供,经适应性喂养 1 周后开始实验. 倍他乐克(酒石酸美托洛尔)为阿斯利康制药有限公司生产,规格 25 mg/片,批号 0707012; 心悦胶囊为吉林省集安益盛药业公司生产,每粒含西洋参茎叶总皂苷 50 mg,批号 Z20030073; 复方丹参片由广州白云山中药厂生产,每粒含丹参酮 A 0.44 mg,丹参素 193 mg,批号 030435; 荧光定量 PCR (real time fluorescence quantitative PCR, Q-PCR)试剂盒购自 BioEasy 公司; 细胞色素 C 氧化酶(CCO)及 ATP 合成酶(ATPase)活性试剂盒购自美国 GENMED 公司。

() 动物模型建立. 参照文献[5]建立大鼠 AMI 模型: 钝性分离肌肉,打开胸腔,轻挤出心脏,在肺动脉圆锥与左心耳交界处下 1~2 mm 用无创手术线结扎左冠状动脉前降支,以结扎部位下心肌组织变白和体表心电图肢体 导联出现 ST 段弓背向上抬高,持续半小时以上为模型成功的标志. 假手术组开胸后,在造模对等位置只穿线不结扎。

() 实验分组及给药. 造模成功后,大鼠随机分为 7 组,术后第 2 日开始灌胃给药,药物计量换算依 70 kg/日用量,换算出大鼠的日用量,制成一定浓度水溶液灌胃. 分组及给药情况见表 1。

() 样本的取得、分离、制备. 以上各组大鼠分别于手术 7 d 后麻醉剪开胸腔,迅速取出心脏,截取左室游离壁和心尖部,生理盐水冲洗后,一部分以 10% 甲醛溶液固定,一部分 -80℃ 保存备用。

() 病理切片观察. 心肌组织由 10% 的甲醛溶液固定后,进行常规切片、染色、脱水、包埋等处理,

表 1 实验分组及给药情况

分组	给药($n = 20, 20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)
正常对照组	常规饲养
假手术组	常规饲养
模型对照组	常规饲养
美托洛尔组	美托洛尔水溶液
益气养阴组	心悦胶囊水溶液
活血组	复方丹参片水溶液
益气养阴活血组	心悦胶囊和丹参片水溶液

i50 型 Nikon 光学显微镜观察组织学病理改变。

() Cox5a 及 ATP5e 相对表达量检测. 将各组心肌组织制备成 10% 的组织匀浆,按照 Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司)操作说明,一步法提取总 RNA. 分别将各组组织总 RNA 充分混合,各取 200 μg 进行纯度鉴定. 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 的完整性,紫外分光法确定 RNA 的量和纯度. 利用 Q-PCR 技术检测 2 个差异基因在各组总 RNA 混合样品中的相对表达量. 以 $\beta\text{-actin}$ 作为内参基因,每个基因重复 3 次实验。

() CCO 及 ATPase 活性检测. 将心肌组织制备成 10% 的组织匀浆,应用 GENMED 试剂盒提取组织线粒体并定量蛋白含量. 利用化学比色法,参照 GENMED 公司试剂盒说明书,波长在 550 nm 处,并设置 0 和 60 s 各测读 1 次,分别记为 A1 和 A2, $\Delta A = A1 - A2$. CCO 比色活性(U/mg) = $(\Delta A \text{ 样品} - \Delta A \text{ 背景}) / [\text{取样量中线粒体蛋白毫克数} \times 21.84 \text{ (毫摩尔吸光系数)}]$. ATPase 活性检测方法同 CCO。

() 统计方法. 采用 SPSS13.0 软件进行统计分析,所有数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm S$)表示,计量资料用单因素方差分析,组间比较用 q 检验, $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠心肌组织病理形态学观察

HE 染色后,光学显微镜下观察心肌组织. 与空白对照组相比,其他各组可见缺血区心肌肿胀、炎细胞浸润,部分心肌细胞出现空泡样变性,细胞溶解,梗死的心肌可见纤维化等病理改变,以模型组表现最为明显. 各用药组的损伤程度介于空白组与模型组之间. 具体见图 1。

2.2 目标差异基因 mRNA 表达检测结果

应用 Q-PCR 技术检测 COX5a, ATP5e mRNA 的相对表达丰度. 检测结果进行标准曲线分析,得出 C_t

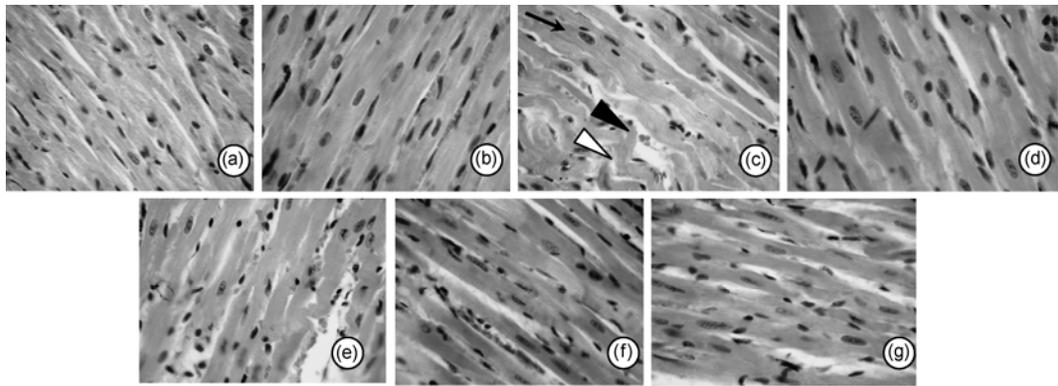


图1 各组大鼠心肌组织病理切片光学显微镜照片(×400)

(a) 正常对照组; (b) 假手术组; (c) 模型组; (d) 美托洛尔组; (e) 活血组; (f) 益气养阴组; (g) 益气养阴活血组。
以模型组病理切片为例, \blackrightarrow , 心肌细胞; \blacktriangleleft , 炎性等细胞浸润; ∇ , 屈曲变形的心肌纤维

值, 计算 2 个目标基因的 C_t 值与 β -actin的 C_t 值的差值 ΔC_t , 以 $2^{-\Delta C_t}$ 作为Cox5a及ATP5e mRNA的相对含量。然后以正常组作为对样品, 以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 为各处理组样品中检测到的相对基因表达量^[6,7]。COX5a, ATP5e基因表达结果见表 2。与正常组相比, 模型组、假手术组及各药物组基因表达出现明显下调趋势, 其中以模型组下调最显著; 与模型组比较, 各个用药组目标基因mRNA均出现明显上调趋势, 其中以益气养阴活血组基因上调较为明显。

表2 样品中 COX5a, ATP5e 基因表达量比较(2^{-ΔΔC_t})

分组	COX5a	ATP5e
正常对照组	1	1
假手术组	0.88	0.75
模型对照组	0.26	0.56
美托洛尔组	0.95	0.62
活血化瘀组	0.80	0.63
益气养阴组	0.78	0.72
益气养阴活血组	0.92	0.91

2.3 目标基因翻译蛋白酶活性检测结果

应用试剂盒进行细胞色素 C 氧化酶、ATP 合酶活性检测。与正常组相比, 各用药组 CCO 酶活性均未见显著性差异。从检测的数值趋势发现, 模型组、假手术组 CCO 活性有所下降, 其中以模型组下降最明显。与模型组相比, ATPase 酶活性在正常组和益气养阴活血组出现显著下降($P < 0.05$), 具体见表 3。

3 讨论

AMI 是严重危害人类健康的重大疾病之一, 具有发病率和死亡率高的特点。能量的耗竭是 AMI 引

表3 样品中 CCO, ATPase 酶活性比较(单位: U/mg)

分组	n	CCO	ATPase ^{a)}
正常对照组	20	1.15 ± 0.26	2.16 ± 0.42*
假手术组	20	0.83 ± 0.40	1.88 ± 0.37
模型对照组	20	0.81 ± 0.33	1.25 ± 0.23
美托洛尔组	20	1.18 ± 0.22	1.49 ± 0.36
活血化瘀组	20	0.90 ± 0.24	1.54 ± 0.41
益气养阴组	20	0.89 ± 0.22	1.90 ± 0.45
益气养阴活血组	20	1.00 ± 0.31	2.12 ± 0.34*

a) *, 与模型组比较, $P < 0.05$

起的心肌组织最初和最直接损伤的原因。目前认为线粒体是缺血性损害的亚细胞目标, 线粒体功能障碍是导致心肌组织缺血、损伤和坏死的主要原因, 同时也是启动细胞凋亡的关键因素^[8,9]。COX5a和ATP5e是存在于线粒体氧化磷酸化通路上的显著差异基因, 它们的表达量及酶活性变化直接影响整个呼吸链的功能发挥。有研究报道, COX5a的转录水平与凋亡机制的启动密切相关, 在小鼠卵母细胞中应用RNA干扰(RNA interference, RNAi)技术使COX5a等3个CCO亚基基因表达沉默, 能够导致细胞内Caspase-3等凋亡前因子水平升高, 促使大量细胞凋亡^[10,11]。ATPase是线粒体进行氧化磷酸化合成和水解ATP的关键酶, 在能量代谢中有至关重要的作用。AMI发生时, 为了满足缺血心肌对能量的需要, 线粒体ATPase活性应激性升高, 以产生更多的ATP, 维持心肌能量的供需平衡^[12,13]。有学者对酵母中的ATP5亚基功能进行研究, 结果提示ATP5亚基是构成ATPase的关键部分, ATP5翻译蛋白能固定在线粒体内膜N端, 以稳定ATPase的二聚结构, 从而发挥影响ATPase表达的作用^[14]。

既往研究表明,西洋参茎叶总皂苷和丹参酮具有促进心肌血管新生、抗氧化损伤、增加氧供的心肌保护作用^[15,16]。本研究将益气养阴药物西洋参茎叶总皂苷制剂和活血化瘀常用药物丹参制剂有机配伍治疗AMI模型大鼠,结果显示,与正常组相比,COX5a基因的表达与CCO酶活性在模型组明显下调。AMI后,缺血心肌COX5a表达发生下调,使其翻译蛋白CCO活性降低,引发了部分缺血心肌细胞凋亡机制的启动;与模型组比较,各个用药组COX5a基因的表达及CCO酶活性均有所上调,其中以美托洛尔组和益气养阴活血组上调最为明显。同时,研究发现,在AMI后缺血心肌中,ATP5e基因的表达和ATPase酶活性均发生了下调,其中ATPase酶活性出现显著下降($P < 0.05$),表明益气养阴活血配伍能够通过降低

线粒体ATPase活性的应激性升高,减轻心肌氧化应激损伤,进一步抑制细胞凋亡。综上所述,西洋参茎叶总皂苷和丹参酮可能通过提升CCO及ATPase mRNA及蛋白活性,增加ATP生成的速率,减少无氧酵解和乳酸产生,抑制钙离子超载,最终达到促进缺血心肌供能、减轻氧化应激损伤的目的,其效果比单纯应用益气养阴或活血化瘀中药更加显著。

目前,AMI的治疗在血运重建、强化降脂和抗血小板活性等方面取得了较大进展,但如何改善AMI后心肌组织能量代谢障碍一直没有理想的治疗对策。本研究通过能量代谢相关基因的研究,为靶向性干预缺血心肌能量代谢变化提供了一定的实验依据。同时,为大规模筛选抗心肌损伤的药物建立了一个初步的基因水平技术平台。

参考文献

- 1 Wolff A A, Rotmensch H H, Stanley W C, et al. Metabolic approaches to the treatment of ischemic heart disease: The clinicians' perspective. *Heart Fail Rev*, 2002, 7: 187—203 [\[DOI\]](#)
- 2 汤益明, 杨宁. 从冠心病中医防治的若干进展探讨结合点. *中国中西医结合杂志*, 2002, 22: 863—865
- 3 邵南齐, 朱莹莹. 心肌缺氧缺血的药理学研究进展. *实用中医内科杂志*, 2007, 21: 3—4
- 4 郭春雨, 殷惠军, 蒋跃绒, 等. 梗死后大鼠缺血心肌基因差异表达谱构建. *科学通报*, 2008, 53: 1657—1663
- 5 张润峰, 王继生. 建立大鼠心肌梗死模型的若干问题探讨. *山西医科大学学报*, 2004, 35: 13—15
- 6 Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)). *Methods*, 2001, 25: 402—408 [\[DOI\]](#)
- 7 Arocho A, Chen B, Ladanyi M. Validation of the 2-DeltaDelta Ct calculation as an alternate method of data analysis for quantitative PCR of BCR-ABL P210 transcripts. *Diagn Mol Pathol*, 2006, 15: 56—61 [\[DOI\]](#)
- 8 Zhang J, Liem D A, Mueller M, et al. Altered proteome biology of cardiac mitochondria under stress conditions. *J Proteome Res*, 2008, 7: 2204—2214 [\[DOI\]](#)
- 9 Sammut I A, Burton K, Balogun E, et al. Time-dependent impairment of mitochondrial function after storage and transplantation of rabbit kidneys. *Transplantation*, 2000, 69: 1265—1275 [\[DOI\]](#)
- 10 张铭, 周胜华. 心肌缺血的能量代谢障碍治疗进展. *心脏杂志*, 2006, 18: 467—469
- 11 Lee S D, Kuo W W, Lin J A, et al. Effects of long-term intermittent hypoxia on mitochondrial and Fas death receptor dependent apoptotic pathways in rat hearts. *Int J Cardiol*, 2007, 116: 348—356 [\[DOI\]](#)
- 12 Cui X S, Li X Y, Jeong Y J, et al. Gene expression of Cox5a, 5b, or 6b1 and their roles in preimplantation mouse embryos. *Biol Reprod*, 2006, 74: 601—610 [\[DOI\]](#)
- 13 Weinberg J M, Venkatachalam M A, Roeser N F, et al. Mitochondrial dysfunction during hypoxia/reoxygenation and its correction by anaerobic metabolism of citric acid cycle intermediates. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 2826—2831 [\[DOI\]](#)
- 14 梁晚益, 唐立新, 杨宗城, 等. 大鼠严重烧伤早期心肌线粒体 F0F1-ATPase 活性变化及其对能量代谢的影响. *第三军医大学学报*, 2001, 23: 780—782
- 15 殷惠军, 张颖, 杨领海, 等. 西洋参茎叶总皂苷对胰岛素抵抗脂肪细胞葡萄糖转运、GLUT-4 转位和 CAP 基因表达的影响. *中国药理学通报*, 2007, 23: 1332—1337
- 16 殷惠军, 张颖, 蒋跃绒, 等. 西洋参叶总皂苷对急性心肌梗死大鼠心肌细胞凋亡及凋亡相关基因表达的影响. *中国中西医结合杂志*, 2005, 25: 232—235