

益气活血方对慢性心力衰竭大鼠心肌 NCX 与 SERCA2a mRNA 及蛋白表达水平的影响

于春泉, 王 怡, 李 芳, 李欣桐

天津中医药大学, 天津 300193

摘 要: 目的 观察益气活血方(由丹参、黄芪、香加皮等组成)对慢性心力衰竭(CHF)大鼠心肌钠钙交换蛋白(Sodium-calcium exchanger, NCX)与肌浆网钙泵-2a(SR calcium ATPase-2a, SERCA2a) mRNA 及蛋白表达水平的影响,初步探讨益气活血方改善慢性心衰大鼠心功能的作用机制。方法 采用结扎大鼠冠状动脉左前降支的方法制备急性心肌梗死后慢性心力衰竭模型。实验分6组:假手术组,模型组,卡托普利组,益气活血方高、中、低3个剂量组,连续ig给药4周后取材,检测心肌组织 NCX 与 SERCA2a mRNA 及蛋白表达。结果 各给药组均可不同程度的下调 NCX mRNA 的表达,上调 SERCA2a mRNA 的表达,其中益气活血方高、低剂量组以及卡托普利组与模型组比较有显著性差异($P<0.05$);各给药组均能降低 NCX/SERCA2a mRNA 的比值,与模型组比较差异显著($P<0.05$)。各给药组均有下调 NCX 蛋白、上调 SERCA 蛋白表达的趋势,但与模型组相比无显著差异($P>0.05$)。结论 益气活血方能够降低 CHF 大鼠 NCX mRNA 的表达,升高 SERCA mRNA 的表达,降低 NCX/SERCA mRNA 的比值,调节心肌细胞内钙循环,从而改善心肌的舒缩功能,其可能为益气活血方改善心脏功能、抗心力衰竭的机制之一。

关键词: 益气活血方药; 心力衰竭; 钠钙交换蛋白; SERCA; Ca^{2+} -ATP 酶

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)03-0555-04

Effect of Yiqi Huoxue Recipe on protein and mRNA expression of SERCA2a and NCX in chronic heart failure rats

YU Chun-quan, WANG Yi, LI Fang, LI Xin-tong

Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Key words: Yiqi Huoxue Recipe; chronic heart failure (CHF); NCX; SERCA; Ca^{2+} -ATPase

慢性充血性心力衰竭(CHF)属于中医学心悸、喘证、痰饮、水肿等范畴,根据慢性心衰的演变规律(心气阳虚→血瘀→水停)确定以益气温阳、活血利水为基本治疗原则。益气活血方是由丹参、黄芪、香加皮等药物组方而成,组方符合中医学对心力衰竭的病机认识,具有益气活血、温阳利水之功效。该方经过临床验证能够改善充血性心力衰竭肺水肿症状,减少水钠潴留,调节神经内分泌因子和细胞因子,具有明确的抗心力衰竭疗效^[1-3]。

CHF 的发生过程有多种因素参与,其发生与细胞内钙调节异常有关, Ca^{2+} 调节不仅决定心肌舒缩功能,还对心脏肥厚、重塑等结构改变有重要影响^[4],因此, Ca^{2+} 调节是心力衰竭病理生理的中心环节^[5]。本研究通过考察益气活血方对慢性心衰模型大鼠心

肌组织中钙转运过程中的重要通道蛋白 NCX 和 SERCA2a 的 mRNA 和蛋白表达水平的影响,探讨益气活血方抗心力衰竭的机制,为临床用药提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康 Wistar 大鼠,雄性,体质量(300±30)g,购于北京维通利华公司,动物合格证编号:SCXK(京)2002-0003。分笼饲养,每笼5只,自由饮水。

1.2 主要仪器

LOGIQ400CL 彩色超声心动仪(美国 GE 公司); Allegra-64R Centrifuge 低温高速离心机(Beckman, 美国); DU-530 紫外分光光度计(DNA/

收稿日期: 2010-08-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30672682); 天津市卫生局资助项目(07013)

作者简介: 于春泉(1975—),男,天津中医药大学,从事中医药治疗心脑血管疾病及中医证候学研究。

Tel: 13821624788 (022)59596311 E-mail: ycq-4@163.com

Protein Analyzer, Beckman, 美国); 逆转录仪 (PCR Express, 英国); ABI®7300 实时荧光定量系统 (Applied Biosystems, 美国); DYY—IIIB 电泳仪 (北京六一仪器厂); 转膜装置 (Bio-Rad, 美国); ENE GENIUS 凝胶成像系统 (Bio Imaging System, Syngene, 英国)。

1.3 受试药物和试剂

益气活血方干膏由天津中医药大学中医药研究院药学部提供, 每克干膏相当于生药 9.515 g, 批号 040915; 阳性对照药卡托普利 (中美上海施宝贵制药有限公司), 规格 12.5 mg/片, 批号 0702031G。

Trizol Reagent (invitrogen); Reverse Transcription Reagents Kit; Power SYBR®Green PCR Master Mix Reagents Kit (Applied Biosystems, 美国); RNase-free water (生工生物 (上海) 有限公司); 引物均由上海生物工程技术服务有限公司合成。引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

引物	正向	反向
β-actin	5'-TCTGTGTGGATT- GGTGGCTCTA-3'	5'-CTGCTTGCTGATC- CACATCTG-3'
NCX	5'-CTGGAGCGCGAG- GAAATGTTA-3'	5'-GACGGGGTTCTCC- AATCTCAA-3'
SERCA2a	5'-TCTGACTTTCGTT- GGCTGTG-3'	5'-GCCTTGTATATCCC- CAGTGA-3'

RIPA 裂解液 (强) (碧云天生物技术研究所), PMSF, BCA 蛋白浓度测定试剂盒, 丙烯酰胺 (Solarbio), 预染 marker (Fermentas); 小鼠抗大鼠 NCX (chemicon® International)、SERCA (abcam, 美国)、actin 单克隆抗体 (Santa Cruz Biotechnology, 美国); 山羊抗小鼠 IgG1 HRP 标记二抗 (中杉试剂公司), 增强型化学发光底物 (Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate, 美国)。

1.4 心力衰竭大鼠模型的制备

采用 10%水合氯醛腹腔麻醉 (3 mL/kg), 仰卧位固定, 在左侧 4~5 肋间开胸暴露心脏, 挑破心包, 轻压右胸, 将心脏轻轻挤压出胸腔外, 于左心耳下 2~3 mm 左冠状动脉前降支处穿线, 随后立即把心脏送回胸腔内, 轻轻挤压胸腔排出空气, 关胸, 恢复动物自主呼吸, 稳定 5 min 左右, 结扎冠脉 (假手术组只穿线不结扎), 观察心电图变化并记录, 缝合伤口后, sc 青霉素, 预防伤口感染。心电图显示

ST 段显著抬高则表示急性心肌梗死造模成功。

1.5 动物分组及给药

于手术后第 5 周检测心功能, 根据文献报道, 以 EF 值小于 60%作为心衰模型成功的标志^[6]。剔除死亡和未达到心衰标准的大鼠后, 随机分为模型组, 益气活血方高、中、低剂量 (0.84、0.42、0.21 g/kg) 组, 卡托普利 (40 mg/kg) 组, 以及假手术组。各给药组每天 ig 给药 (10 mL/kg), 假手术以及模型组 ig 等体积的蒸馏水, 连续给药 4 周。

1.6 RT-PCR 法检测 NCX 和 SERCA2a mRNA 表达

将给药 4 周后的大鼠 ip 水合氯醛 (30 mg/kg) 麻醉, 腹主动脉取血, 摘取心脏, 取左心室梗死区与非梗死区之间的缺血组织, 装入冻存管, 迅速置于液氮中冷冻, -80 °C 冰箱保存, 待测。

1.6.1 总 RNA 的提取 采用 Trizol 法提取心肌组织总 RNA, 紫外分光光度计检测, 琼脂糖凝胶电泳分析其完整性。取 0.2 μg RNA 用于反转录。RNA 的反转录: 反应体系为 10×RT Buffer 1.0 μL, MgCl₂ (25 mmol/L) 4.4 μL, deoxyNTPs Mixture (2.5 mmol/L) 4.0 μL, Random Hexamers (50 μmol/L) 1.0 μL, RNase Inhibitor (20 U/L) 0.4 μL, MultiScribe Reverse Transcriptase (50 U/μL) 0.5 μL。混合以上反应物, 离心, 涡旋, 再次离心后装入 PCR 小管, 每个 PCR 小管加入 12.3 μg RNA, 用 RNase-free water 补足反应体系至 20 μL。反应条件: 25 °C、10 min, 48 °C、30 min, 95 °C、5 min。

1.6.2 PCR 反应 反应体系为 2×Master Mix 12.5 μL, 正向引物 0.5 μL (200 nm/L), 反向引物 0.5 μL (200 nm/L), cDNA Sample 0.5 μL, RNase-free water 11 μL, 反应体系为 25 μL。混合以上反应物, 放入实时定量 PCR 仪反应, 扩增条件为 95 °C 预变性 10 min 后, 95 °C、15 s, 60 °C、1 min, 扩增 40 个循环。反应结束后, 分析 PCR 过程各检测样本的域值循环数 (threshold cycle, CT) 值, 通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算。PCR 反应重复 3 次。

1.7 Western-blotting 法检测 NCX 和 SERCA2a 蛋白表达情况

将所取心肌组织研磨成匀浆, 测定样品中蛋白浓度后, 用十二烷基硫酸钠缓冲液与蛋白样品等体积混合, 置于水浴锅中恒温变性。将变性处理过的蛋白样品加入浓缩胶中, 每孔加蛋白 20 g 进行电泳, 电压 90 V。蛋白进入分离胶后, 将电压调至 120 V。电泳结束后, 将分离胶上的蛋白转移至 PVDF 膜上。

转膜条件: 恒定电流 150 mA, NCX 和 SERCA 转移 90 min。转膜结束后将膜放入封闭液中封闭。封闭结束后膜上蛋白依次与一抗、二抗结合, 一抗结合过夜, 二抗结合 1 h。二抗结合结束后, 在膜上加 ECL 化学发光底物, 反应 5 min 后于暗室内将胶片置于转移膜上曝光, 显影、定影后以凝胶成像系统分析结果。

1.8 统计学处理

所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 SPSS11.5 统计软件进行组间单因素方差分析比较。

2 结果

2.1 益气活血方对慢性心力衰竭大鼠心肌 NCX 与 SERCA2a mRNA 表达的影响

与假手术相比, 模型组大鼠心肌 NCX mRNA 表达显著升高 ($P < 0.01$), SERCA2a mRNA 表达降低 ($P < 0.05$)。卡托普利组以及益气活血方组均能下调

NCX mRNA 表达, 上调 SERCA2a mRNA 表达, 其中与模型组比较卡托普利组能显著下调 NCX mRNA 的表达 ($P < 0.01$), 益气活血方高、低剂量组效果明显 ($P < 0.05$); 益气活血方高、中剂量组能显著上调 SERCA2a mRNA 表达 ($P < 0.01$ 、 0.05), 卡托普利组亦有明显效果 ($P < 0.05$)。各给药组均能降低 NCX/SERCA2a mRNA 比值, 与模型组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 结果见表 2。

2.2 益气活血方对慢性心力衰竭大鼠心肌 NCX 与 SERCA2a 蛋白表达水平的影响

与假手术组相比, 模型组大鼠心肌 NCX 蛋白表达有升高趋势, SERCA2a 表达有降低趋势, NCX/SERCA2a 蛋白比值有升高趋势。各给药组均有下调 NCX 蛋白及上调 SERCA2a 蛋白表达的趋势, 并且各给药组 NCX/SERCA 蛋白比值均有降低的趋势, 结果见表 3、图 1。

表 2 益气活血方对慢性心衰大鼠心肌 NCX 和 SERCA2a mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of Yiqi Huoxue Recipe on mRNA expression of NCX and SERCA2a in CHF rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	n	NCX	SERCA2a	NCX/SERCA2a
假手术	—	11	0.22 ± 0.16	1.36 ± 0.67	0.004 ± 0.004
模型	—	12	1.24 ± 0.32**	0.59 ± 0.39*	0.024 ± 0.020*
益气活血方	0.84	11	0.64 ± 0.43 [#]	1.38 ± 0.82 [#]	0.008 ± 0.003 [#]
	0.42	10	0.86 ± 0.19	2.05 ± 1.05 ^{##}	0.009 ± 0.004 [#]
	0.21	13	0.65 ± 0.42 [#]	0.98 ± 0.53	0.008 ± 0.003 [#]
卡托普利	0.04	10	0.71 ± 0.25 ^{##}	1.36 ± 0.73 [#]	0.006 ± 0.004 [#]

与假手术组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs Sham group; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs model group

表 3 益气活血方对慢性心衰大鼠心肌 NCX 和 SERCA2a 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of Yiqi Huoxue Recipe on protein expression of NCX and SERCA2a in CHF rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	n	NCX	SERCA2a	NCX/SERCA2a
假手术	—	11	0.68 ± 0.10	0.53 ± 0.17	1.72 ± 0.89
模型	—	12	0.73 ± 0.22	0.46 ± 0.18	1.89 ± 1.25
益气活血方	0.84	11	0.67 ± 0.20	0.50 ± 0.21	1.54 ± 0.84
	0.42	10	0.63 ± 0.21	0.52 ± 0.24	1.52 ± 1.19
	0.21	13	0.63 ± 0.21	0.49 ± 0.11	1.36 ± 0.65
卡托普利	0.04	10	0.73 ± 0.16	0.50 ± 0.14	1.54 ± 0.59

3 讨论

在慢性心衰发生发展的过程中, 心肌细胞的钙稳态遭到破坏, 胞内钙瞬变减小和衰减减慢, 这种变化被认为与细胞膜表面的 NCX、SERCA2a、L-型钙通道 (LTCC) 及肌浆网钙释放通道 (ryanodine receptor, RyR) 蛋白等钙调蛋白的改变有关^[7], 其中

NCX 和 SERCA2a 的变化对衰竭心脏细胞钙瞬变影响最为显著^[8]。大量研究表明, 在衰竭心脏中, SERCA2a 的蛋白和 mRNA 水平明显降低^[9], 而 NCX 却显著增高^[10-12]。又有研究显示, NCX 的 Na⁺/Ca²⁺ 交换活性增强可以代偿 SERCA 摄取 Ca²⁺ 的功能降低^[13-15], 增强心脏的舒张及收缩功能, 但同时过度

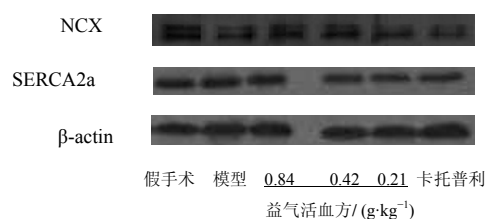


图1 益气活血方各组 NCX、SERCA2a 蛋白印迹分析
Fig. 1 Blotting analysis of NCX and SERCA2a protein in Yiqi Huoxue Recipe different groups

增强的 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换活性又可导致 Ca^{2+} 过度外排, SR 钙负荷减少, 从而影响心脏收缩性能^[16]。因此, NCX 与 SERCA 在降低胞内钙方面不能协调一致, 导致细胞内钙稳态失衡, 心脏功能逐步恶化, 这就是通常所说的“NCX 与 SERCA 平衡假说”。

本研究依据“NCX 与 SERCA 平衡假说”, 通过检测 NCX 与 SERCA2a 在 mRNA 及蛋白水平的变化以及 NCX 与 SERCA2a 比值, 从心肌细胞内钙循环方向进一步探讨了益气活血方治疗心衰的作用机制。研究显示, 本方药能够降低 NCX mRNA 水平, 升高 SERCA2a mRNA 的表达水平, 并且各剂量组 NCX 与 SERCA2a 比值与模型组比较均具有显著差异 ($P < 0.05$), 表明本益气活血组方能调节失衡的 NCX 和 SERCA2a, 增强细胞内的钙稳态, 从细胞和分子水平影响心衰大鼠的心功能。虽然本方对 NCX 与 SERCA2a 的蛋白表达水平的影响无统计学意义, 但是其趋势与 mRNA 的变化一致, 其原因可能是转录后修饰的结果或是组织放置后导致蛋白降解引起蛋白水平下降。因此, 本研究可以得出益气活血方通过改善 NCX 与 SERCA2a mRNA 表达水平, 从而促进舒张期肌浆网 Ca^{2+} 的摄取以及心肌细胞内 Ca^{2+} 的泵出, 降低舒张期心肌细胞内 Ca^{2+} 浓度, 增强心肌舒缩力。这可能是其增强心功能, 治疗心力衰竭的机制之一。

参考文献

- [1] 郭志军, 高秀梅, 王保和, 等. 加参方对 CHF 大鼠肺脏水通道蛋白 mRNA 表达的影 [J]. 环球中医药, 2009, 2(2): 106-108.
- [2] 郭志军, 高秀梅, 王保和, 等. 加参方对 CHF 大鼠缩血管保钠和扩血管排钠因素的影响 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2009, 11(11): 196-197.
- [3] 王 怡, 郭志军, 徐 强, 等. 加参方对 CHF 大鼠肾脏水通道蛋白(AQP)mRNA 表达的影响 [J]. 天津中医药

大学学报, 2007, 26(4): 188-191.

- [4] Esposito G, Santana L F, Dilly K, *et al.* Cellular and functional defects in a mouse model of heart failure [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000, 279: H3101-H3112.
- [5] Houser S R, Piacentino V, Weissner J. Abnormalities of calcium cycling in the hypertrophied and failing heart [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2000, 32(9): 1595-1607.
- [6] Burrell L M, Chan R, Phillips P A, *et al.* Validation of Anechocardiographic assessment of cardiac function following moderate size myocardial infarction in the rat [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 1996, 23: 570- 572.
- [7] Yano M, Ikeda Y, Matsuzaki M. Altered intracellular Ca^{2+} handling in heart failure [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115: 556-564.
- [8] Winslow R L, Rice J, Jafri S, *et al.* Mechanisms of altered excitation-contraction coupling in canine tachycardia- induced heart failure II: model studies [J]. *Circ Res*, 1999, 84: 571-586.
- [9] Qi M, Shannon T R, Euler D E, *et al.* Downregulation of sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase during progressing of left ventricular hypertrophy [J]. *Am Physiol Soc*, 1997, 275: H2416-H2423.
- [10] Nakanishi H, Makino N, Hata T, *et al.* Sarcoplasmal Ca^{2+} transport activities in cardiac hypertrophy caused by pressure overload [J]. *Am J Physiol*, 1989, 257: 349-356.
- [11] Studer R, Reinecke H, Bilger J, *et al.* Gene expression of the cardiac $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in end-stage human heart failure [J]. *Circulation Res*, 1994, 75: 443-453.
- [12] Pogwizd S M. Increased $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in the failing heart [J]. *Circ Res*, 2000, 87: 641.
- [13] Reinecke H, Studer R, Vetter R, *et al.* $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange activity in patients with end-stage heart failure [J]. *Cardiovas Res*, 1996, 31: 48-54.
- [14] Arai M, Alpert N R, MacLennan D H, *et al.* Alterations in sarcoplasmic reticulum gene expression in human heart failure: A possible mechanism for alterations in systolic and diastolic properties of the failing myocardium [J]. *Circ Res*, 1993, 72: 463-469.
- [15] Hasenfuss G, Schillinger W, Preuss M, *et al.* Relationship between $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger protein levels and diastolic function of failing human myocardium [J]. *Circulation*, 1999, 99: 641-648.
- [16] Bers D M. Calcium fluxes involved in control of cardiac myocyte contraction [J]. *Circ Res*, 2000, 87: 275-281.