

心复康口服液对心梗后心衰大鼠心肌组织 CK-MM mRNA 及蛋白表达的影响

胡元会^{1*}, 杜柏¹, 方素萍¹, 马铁民², 冯玄超¹, 姜北¹, 杨正¹

(1. 中国中医科学院广安门医院, 北京 100053; 2. 北京大学医学部, 北京 100038)

[摘要] **目的:**观察心复康口服液对心肌梗死心衰大鼠心肌组织肌酸激酶同工酶(CK-MM)mRNA及CK-MM蛋白表达的影响。**方法:**采用结扎SD大鼠左冠状动脉前降支复制心肌梗死后心衰大鼠模型,大鼠随机分为假手术组(Sham组)、模型组(Model组)、Capt 0.1 g·kg⁻¹组(Capt组)、心复康口服液组 5.4 g·kg⁻¹(XFK组),分别于术后 24 h 灌胃给药,给药 4 周末,用 Real-time RT-PCR 方法,Western blotting 方法检测心肌细胞能量穿梭关键酶 CK-MM mRNA 和蛋白表达水平。**结果:**①与假手术组比较,模型组左心室心肌 CK-MM 的 mRNA 表达水平下调,在第 4 周末,统计学有显著性意义($P < 0.01$);与模型组比较,Capt组、XFK组心肌 CK-MM mRNA、蛋白表达均上调,在第 4 周末,统计学有显著性意义($P < 0.01$)。②与 Captopril 组比较,XFK组心肌 CK-MM mRNA 表达水平在第 4 周末下调,统计学有显著性意义($P < 0.05$);XFK组心肌 CK-MM 蛋白表达水平在第 4 周末比较无显著性意义。**结论:**心复康口服液可上调心梗后心衰大鼠心肌细胞 CK-MM mRNA 的表达,促进 CK-MM 蛋白含量增加,达到改善 CHF 心肌细胞能量穿梭紊乱,重塑心梗后心衰大鼠心肌能量代谢作用。

[关键词] 心复康口服液;心力衰竭;能量代谢;磷酸肌酸激酶-MM

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)16-0206-04

[doi] 10.11653/syfy2013160206

Effect of Xinfukang Oral Liquid on CK-MM mRNA and CK-MM Protein Expression Level in Rat's Heart Failure Model after Myocardial Infarction

HU Yuan-hui^{1*}, DU Bai¹, FANG Su-ping¹, MA Tie-ming², FENG Xuan-chao¹, JIANG Bei¹, YANG Zheng¹

(1. Guanganmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China;

2. Peking University Health Science Center, Beijing 100038, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Xinfukang (XFK) oral liquid on MM isoenzyme of creatine kinase (CK-MM) mRNA and CK-MM protein expression level in rat of heart failure model after myocardial infarction. **Method:** The rat heart failure mode after myocardial infarction was created by ligating the left anterior descending coronary arteries. All the rats were randomly divided into 4 groups: sham group, model group, XFK 5.4 g·kg⁻¹ group and captopril 0.1 g·kg⁻¹ group. After 24 hours of modeling, rats were ig given XFK and captopril for 4 weeks, Cardiac function, myocardial ultrastructure and key enzymes of myocardial energy shuttle, CK-MM mRNA and protein expression level were separately measured in all groups. **Result:** ① Compared with model group, in captopril group and XFK group CK-MM mRNA and protein expression increased ($P < 0.01$). ② Compared with captopril group, in XFK group CK-MM mRNA expression level decreased ($P < 0.05$). In XFK group CK-MM protein expression has no significant change. **Conclusion:** XFK oral liquid can effectively increase the expression level of CK-MM mRNA, as well as the protein content of CK-MM to improve myocardial energy shuttle and remodel the process of myocardial energy metabolism function.

[Key words] Xinfukang oral liquid; heart failure; energy metabolism; CK-MM

[收稿日期] 20121227(027)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30973838);北京市自然科学基金项目(12960169)

[通讯作者] *胡元会,博士研究生导师,主任医师,从事中西医结合心血管病防治研究工作, Tel: 010-88001018, E-mail: dubaidubai@sina.com

能量代谢是心力衰竭重要的病理生理环节,心脏负荷的持续增加使能量供需失衡,刺激心肌细胞基因表达改变,蛋白合成增加而发生心肌肥厚,但其蛋白合成以胚胎型表达增多为主,使细胞结构发生了变化,长期的超负荷将使能量耗竭、心肌失代偿而发生衰竭^[1]。能量代谢障碍贯穿于心肌从代偿性肥大到衰竭的全过程,是心衰发生、发展和恶化的重要因素之一^[2]。

心复康口服液是笔者临床治疗气虚血瘀型充血性心力衰竭的经验方。临床和实验研究提示^[3-5],心复康口服液可改善心肌缺血,提高心功能。本实验通过研究心复康口服液对心肌梗死心衰大鼠心肌组织肌型肌酸激酶同工酶(CK-MM)能量穿梭中 mRNA 及 CK-MM 蛋白表达的影响,探讨心复康口服液对心衰心肌能量代谢尤其是能量转运的干预作用,使心复康口服液治疗慢性心力衰竭 CHF 得到实验的证据,同时也为寻找改善心肌能量代谢的药物做出有益的探索。

1 材料

1.1 仪器 HX-300S 动物呼吸机(成都泰盟科技有限公司),TA1003 型精密电子天平(上海天平仪器厂),BL-820S 生物机能实验系统(成都泰盟科技有限公司),HP 5500 彩色多普勒超声显像仪(Philips 美国),YY0103-93 冷光单孔手术灯(上海富众生物科技有限公司),Bio-Rad CFX96 实时荧光 PCR 仪(Bio-Rad 美国)DU 800 分光光度计(Beckman 美国)Bio-Rad 电泳仪,multiskan 酶标仪(Thermo 美国)。

1.2 药物 心复康口服液(Xinfukan oral liquid, XFK,由人参、黄芪、丹参、附子、淫羊藿、灵芝等药物组成(北联制字,批号 2011FP04006)。卡托普利(Captopril,中美上海施贵宝制药有限公司,批号 1112035)。

1.3 试剂 TRIzol, M-MLV Reverse Transcriptase, RNaseOUT™ Ribonuclease Inhibitor [Invitrogen]; pMD18-T Vector, ExTaq 酶 [Takara]; Ampicillin [Sigma]; SuperReal PreMix (SYBR Green), DH5 α 感受态细胞, X-Gal, IPTG、质粒提取试剂盒(天根); DEPC 水(碧云天); DNA 纯化回收试剂盒(广州东盛);引物均由 Invitrogen 公司合成。30% 凝胶贮备液(Sigma), SDS 1% TEMED(*N,N,N',N'*-四甲基乙二胺),过硫酸铵(均为 Bio-Rad)、考马斯亮蓝 R250(碧云天),标准蛋白质溶液(Kanglong),一抗 CK-MM (SANTA CRUZ, sc-28898); GAPDH (Sigma,

g8795),二抗 羊抗(Sigma, A5420),兔抗(Abcam),鼠抗(Abcam)。

1.4 动物 正常雄性 SD 大鼠(清洁 II 级),体重(200 \pm 20)g,60 只,由北京维通利华实验动物中心提供,许可证编号 SCXK(京)2007-0001,由中国中医科学院广安门医院 II 级动物房分笼饲养,饲以标准的大鼠合成饲料,自由饮用自来水,环境温度(20 \pm 2) $^{\circ}$ C,相对湿度 45%~70%。

2 方法

2.1 动物模型复制 动物模型参照 Pfeffer 报道^[6]的方法结扎冠状动脉前降支(LAD),制备心肌梗死后心衰大鼠模型,术后每只青霉素钠 10 万 U \cdot d⁻¹ im,连续 3 d。

假手术组制备:仅在 LAD 起始点下约 2~3 mm 处针带线从 LAD 下穿过而不结扎前降支,余步骤与动物模型制备方法相同。

2.2 动物分组及给药方法 动物适应性喂养观察 3 d;禁食 12 h 后,按体重均衡,随机分为 2 组。假手术组(Sham)12 只和造模组 48 只;造模组大鼠按动物模型复制方法所述方法造模,造模成功大鼠复苏后 24 h,经超声检测心功能,以心输出量(CO)减损 15% 为 CHF 模型成功,列入造模组,然后再将造模成功大鼠随机分为模型组(Model)、Captopril 组(Capt)、心复康组(XFK)3 组,与假手术组(Sham)共 4 组,每组 12 只大鼠,术后 24 h 开始灌胃给药。各组大鼠于给药后 4 周末取材,进行指标检测。①假手术组(Sham):生理盐水 4.0 mL \cdot kg⁻¹ ig, qd; ②模型组(Model):生理盐水 4.0 mL \cdot kg⁻¹ ig, qd; ③Captopril 组(Capt):Captopril 100 mg \cdot kg⁻¹ 溶于生理盐水中 4.0 mL \cdot kg⁻¹ ig, qd; ④心复康组(XFK):心复康口服液按 5.4 g \cdot kg⁻¹ 剂量溶于生理盐水中 ig, qd。

2.3 检测指标和方法

2.3.1 心肌组织 CK-MM mRNA 表达的检测 灌胃给药 4 周末各组大鼠取心肌组织 100 mg,保存于 -86 $^{\circ}$ C。用 Real-time RT-PCR 方法测定心肌组织 CK-MM mRNA。①心肌组织总 RNA 的提取:采用 1 mL TRIzol 经氯仿、异丙醇提取总 RNA。空气干燥 5~10 min,加入 DEPC 水 20 μ L,吹吸混匀。分装, -20 $^{\circ}$ C 备用。取 5 μ L RNA 溶液,10 倍稀释,测量 A₂₆₀, A₂₈₀, 计算 RNA 含量。②逆转录:Oligo dT, 10 μ mol \cdot L⁻¹ 1 μ L, dNTP 10 mmol \cdot L⁻¹ 4 μ L, RNA 2 μ g, DEPC 水补至 12 μ L; 65 $^{\circ}$ C 5 min,立即放于冰上 5 min。在上水管中加入:5 \times First-Strand Buffer

4 μL , DTT 0.1 mol \cdot L⁻¹ 2 μL , RNaseOUT. Ribonuclease Inhibitor 40 U \cdot μL^{-1} 1 μL , MMLV 200 U \cdot μL^{-1} 1 μL 。总共 RT 条件:37 $^{\circ}\text{C}$ 50 min,70 $^{\circ}\text{C}$ 15 min。③ Real-time PCR: 引物: CK-MM, creatine kinase (muscle) mRNA, Forward primer: 5'-ATTCT-CACCCGCCTTCGTC-3', Reverse primer: 5'-TTACGC-CATCCACCACCAG-3'。实时 PCR 条件:95 $^{\circ}\text{C}$, 15 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 和 62 $^{\circ}\text{C}$ 30 s \times 40 个循环;制备溶解曲线:65 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,0.5 $^{\circ}\text{C} \cdot \text{s}^{-1}$ 升温至 95 $^{\circ}\text{C}$ 。④ 对照品制备:吸取 2 μL 质粒样本,50 倍稀释,测量 A_{260} 值,计算质粒拷贝数。分别稀释至 1×10^{10} 拷贝 \cdot μL^{-1} ,再依次 10 倍稀释,制备成 1×10^3 , 1×10^8 拷贝 \cdot μL^{-1} 系列浓度对照品。

2.3.2 检测样本 Real-time RT-PCR 绝对定量 样本 RNA 逆转录(见 2.3.1②逆转录)产物与对照品同时进行 PCR 扩增(见 2.3.1③Real-time PCR)。

2.3.3 心肌组织 CK-MM 蛋白表达的检测 给药 4 周末各组大鼠取心肌组织 100 mg,保存于 -86 $^{\circ}\text{C}$,用 Western blotting 方法测定心肌组织 CK-MM 蛋白。将所取心肌组织研磨成匀浆,测定样品中蛋白浓度后,用 SDS-聚丙烯酰胺缓冲液与蛋白样品混合,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 μg 进行电泳,电压 10 mV。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 100 mA,NCX 和 SERCA 转移 2 h。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。目的蛋白含量以其与内参照磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)条带的灰度比值表示。

2.4 统计学方法 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 分析软件进行 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对心肌组织 CK-MM mRNA 表达的影响 与假手术组比较,模型组左心室心肌 CK-MM 的 mRNA 表达水平下调,在第 4 周末,统计学有显著性意义($P < 0.01$);与模型组比较,Capt 组、XFK 组左心室心肌 CK-MM mRNA 表达上调,在第 4 周末,统计学有显著性意义($P < 0.01$);与 Capt 组比较,XFK 组左心室心肌 CK-MM mRNA 表达水平在第 4 周末下调($P < 0.05$)。见图 1~3,表 1。

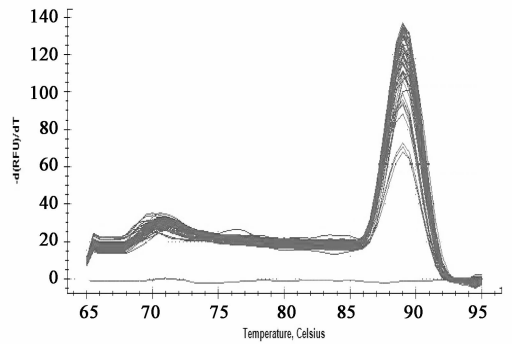


图 1 CK-MM mRNA 溶解曲线

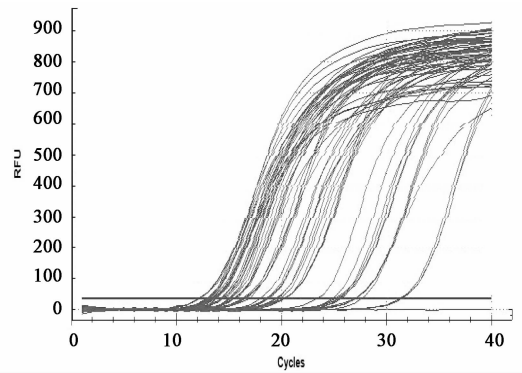


图 2 CK-MM mRNA 扩增曲线

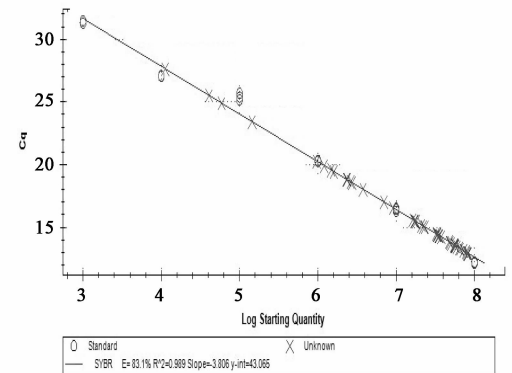


图 3 CK-MM mRNA 标准曲线

3.2 对 CHF 大鼠左心室心肌 CK-MM 蛋白表达的影响 与假手术组比较,模型组左心室心肌 CK-MM 的蛋白表达水平下调,在第 4 周末,统计学有显著性意义($P < 0.01$);与模型组比较,Capt 组、XFK 组左心室心肌 CK-MM 蛋白表达上调,在第 4 周末,统计学有显著性意义($P < 0.01$)。见表 1,图 4。

4 讨论

心肌细胞的能量物质主要是三磷酸腺苷(adenosinetriphosphate, ATP)和磷酸肌酸(phosphocreatine, PCr),其中 ATP 是直接的供能物质,但含量很少;PCr 是主要的能量储备。能量代谢障碍具体表现为

表1 XFK 治疗对 CHF 大鼠左心室非梗死心肌 CK-MM mRNA 及蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	CK-MM mRNA /copies·mL ⁻¹	CK-MM 蛋白灰度 CK-MM/GAPDH
假手术	-	58 938 972 ± 10 308 566 ¹⁾	0.82 ± 0.15 ¹⁾
模型	-	28 318 583 ± 4 184 322	0.21 ± 0.14
卡托普利	0.1	50 275 907 ± 8 814 665 ¹⁾	0.54 ± 0.12 ¹⁾
心复康	5.4	48 599 731 ± 8 446 254 ^{1,2)}	0.48 ± 0.18 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ P < 0.01;与卡托普利组比较²⁾ P < 0.05。

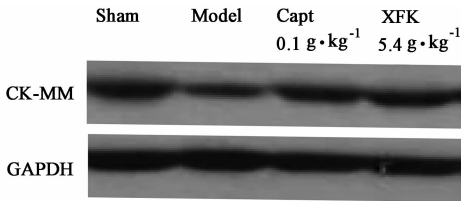


图4 XFK 对 CHF 大鼠左心室心肌 CK-MM 的蛋白表达的影响

心肌能量物质三磷酸腺苷(ATP)和磷酸肌酸(PCr)的改变。于春泉等^[7]研究表明:心衰大鼠模型缺血心肌组织中腺苷酸含量降低,使用益气药(芪茛强心胶囊)后可明显增加缺血心肌中 ATP 含量,提高能荷,改善心肌梗死后心衰大鼠心肌能量代谢。PCr 和 ATP 之间的能量转换主要受磷酸肌酸激酶(creatinekinase,CK)穿梭机制的调控,ATP 的能量可被线粒体肌酸激酶(sarcomeri cmitochondrial creatinekinase,mit-CK)转移并存储于 PCr 中,PCr 在需能部位再经胞质 CK 同工酶(CK-MM,CK-MB,CK-BB)催化转为 ATP 以供利用。CK 是肌酸激酶能量穿梭系统的关键酶,CK 活性的变化直接影响着能量穿梭的效率,进而影响心肌能量代谢过程,最终影响心功能^[8-9]。目前已知心肌组织中 CK 有 3 种亚型即 CK-MM,CK-MB 和 CK-BB。CK-MM 存在于肌原纤维中,与心肌肌凝蛋白-ATP 酶耦联,此外 CK-MM 与肌浆网膜紧密结合,与 Ca²⁺-ATP 酶耦联,从而确保心肌兴奋-收缩耦联过程的能量供应。CHF 时肌酸激酶穿梭系统功能明显受损,CK 活性显著受抑,其中主要受抑的 CK 是 CK-MM。CHF 心肌组织 CK 活性的降低导致肌酸激酶能量穿梭系统功能受损,使 ATP 产生和利用失耦联,直接影响心肌纤维的兴奋-收缩耦联过程,抑制心肌收缩力。

本研究结果提示,心梗后心衰大鼠心脏由于缺血缺氧刺激,CK-MM mRNA 表达下调,CK-MM 蛋白含量减少与既往研究结果一致^[10]。Capt 治疗组心梗后心衰大鼠心肌细胞 CK-MM mRNA 的表达进一步增加,调控肌酸激酶能量穿梭系统功能,从而导致

ATP 转运穿梭效率改善,细胞内能量流增加,直接促进心肌纤维的兴奋-收缩耦联过程,增强心肌收缩力。起到保护心衰心肌及心肌能量代谢的作用,达到保护心脏功能的目的。益气活血中药心复康口服液组可进一步上调心梗后心衰大鼠心肌细胞 CK-MM mRNA 的表达,促进 CK-MM 蛋白含量增加。表明益气活血中药心复康口服液具有促进心梗后心衰大鼠心肌 CK-MM mRNA 的表达,增加 CK-MM 蛋白含量的作用,从而促进 CHF 时肌酸激酶穿梭系统的效率,进而影响心肌能量代谢过程,改善心衰引起的心肌能量代谢障碍及心肌功能损伤。

[参考文献]

- [1] 张子彬. Tsung O Cheng, 张玉传. 充血性心力衰竭学[M]. 北京:科学技术文献出版社,2000:224.
- [2] 殷仁富,陈金明. 心脏能量学:代谢与治疗[M]. 上海:第二军医大学出版社,2002:261.
- [3] 曹雪滨,黄河玲,张斌,等. 心复康治疗充血性心衰 41 例[J]. 陕西中医,2000(2):45.
- [4] 胡元会,马铁民,陈双厚,等. 心复康口服液对心肌梗死心衰大鼠心功能的影响[J]. 中国中医基础医学杂志,2006,12(9):680.
- [5] 胡元会,曹雪滨,陆文云,等. 心复康口服液对阿霉素心衰模型大鼠心功能及心肌 Ca-ATPase 定位的影响[J]. 陕西中医学院学报,2000,23(3):38.
- [6] Pfeffer J M, Pfeffer M A, Fletcher P J, et al. Progressive ventricular remodeling in rat with myocardial infarction[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 1991, 260(5):1406.
- [7] 于春泉,李欣桐,史芳,等. 芪茛强心胶囊对心气虚型慢性心力衰竭大鼠心肌腺苷酸含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(3):174.
- [8] Spindler M, Niebler R, Remkes H, et al. Mitochondrial creatine kinase is critically necessary for normal myocardial high-energy phosphate metabolism[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002,283(2):680.
- [9] Lygate C A, Fischer A, Sebag-Montefiore L, et al. The creatine kinase energy transport system in the failing mouse heart[J]. Mol Cell Cardiol, 2007,42(6):1129.
- [10] Shen W, Spindler M, Higgins M A, et al. The fall in creatine levels and creatine kinase isozyme changes in the failing heart are reversible; complex post-transcriptional regulation of the components of the CK system[J]. Mol Cell Cardiol,2005,39(3):537.

[责任编辑 聂淑琴]