

心肌梗死后心力衰竭大鼠心脏基因表达谱及活血益气方药对其心脏的影响

陈金星 王硕仁 朱陵群 赵明镜 吕唏莹 秦 英 张 壮

摘要 **目的** 观察活血益气方药对心肌梗死后心力衰竭模型大鼠心脏功能结构的影响。**方法** 以大鼠左冠状动脉结扎术造成心肌梗死后心衰模型。对心衰形成期(术后 10 天)、稳定期(术后 8 周)大鼠左心室梗死区、非梗死区和同期假手术组左心室分别取材并提取总 RNA,以 6 张大鼠 40S 基因芯片(4 096 个基因/张芯片)对其进行检测;用基因芯片分析软件 Genespring、Treeview、Clustering、SOM 对芯片结果进行分析。术后 4 周以活血益气方药对模型大鼠开始治疗,共 4 周,以卡托普利作为阳性对照药;经阻抗法观察给药前后大鼠心脏功能和心脏系数的变化。**结果** (1)用 Genespring 软件分析基因表达谱芯片检测结果发现有参与能量代谢、心肌细胞骨架及纤维化等 13 类共千余条表达显著上调和下调的基因,在梗死区差异表达基因以形成期最多(1 086 条)、稳定期次之(724 条);而非梗死区差异表达基因也以形成期最多(196 条),稳定期较少(97 条)。(2)心肌梗死后心衰大鼠经活血益气方药、卡托普利治疗,心功能明显改善,每搏输出量(SV)、心输出量(CO)、心脏指数(CI)均较治疗前显著提高($P < 0.01$);同时活血益气方药还能改善模型动物的心脏系数(与模型组比较, $P < 0.01$,与假手术组比较, $P > 0.05$)。**结论** 心肌梗死后心衰是一种多基因表达异常的超负荷心脏病,活血益气方药能改善心肌梗死后心衰大鼠心脏功能和组织学指标,达到治疗心衰的作用。

关键词 活血益气方药;心力衰竭;基因芯片;血流动力学

Study on Cardiac Gene Expression Microarray and Recipe for Activating Blood Circulation and Supplementing Qi on Heart of Rats with Post-infarction Heart Failure CHEN Jin-xing, WANG Shuo-ren, ZHU Ling-qun, et al Key Lab of Ministry of Education on Internal Medicine of TCM, Dongzhimen Hospital of Beijing CM University, Beijing (100700)

Objective To observe the effect of recipe for activating blood circulation and supplementing Qi (RAS) on cardiac functional structure in rats with post-infarction heart failure (PIHF). **Methods** Rat model of PIHF was established by left coronary artery ligation. Left ventricular samples of model rats from infarcted or peri-infarcted area were obtained at PIHF formation stage and stable stage (10 days and 8 weeks respectively after operation), the total RNA extracted and detected using 6 pieces of rat's 40s gene microarray (4096 genes/microarray), the data were analyzed using software as Genespring, Treeview, Clustering and SOM. Besides, RAS was used to treat the model rats beginning from 4 weeks after modeling and lasted for 4 weeks, changes of heart function and cardiac coefficient before and after treatment were observed by impedance method with Captopril as positive control. **Results** (1) Genespring analysis showed thousands of genes differential expression (upper or down regulated), including 13 kinds of gene involving energy metabolism, myocardial cytoskeleton, fibrosis, etc. which, in the infarcted area at heart formation stage were 1086 genes and at the stable stage, 724 genes, while in the peri-infarcted area, formation stage 196 genes and stable stage 97 genes. (2) After RAS or Captopril treatment, the heart function improved significantly, with the stroke volume, cardiac output and cardiac index increased significantly ($P < 0.01$). RAS could also improve the cardiac coefficient of model rats, as compared with that in untreated model, $P < 0.01$, compared with that in the sham-operated rats, $P < 0.05$. **Conclusion** PIHF is a

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.30171187)

作者单位:中医内科学教育部重点实验室 北京中医药大学东直门医院(北京 100700)

通讯作者:王硕仁, Tel:010-84013196, Fax:010-64010817, E-mail:doctor_wang@sohu.com

kind of overload heart disease with multiple genes abnormality. RAS could improve the heart function and histologic indexes, so as to treat the heart failure.

Key words recipe for activating blood circulation and supplementing Qi; heart failure; gene microarray; hemodynamics

充血性心力衰竭的病理生理学内容已从器官、组织水平的研究发展到细胞和分子病理学阶段,但对于心衰各阶段的基因表达及调控的了解仍不多;对于心衰的治疗也仍以益气为主的报告为多,而对于“血为气之母”、以活血药为主干预心衰的研究尚少^[1]。为此,我们在心衰的分子病理学和活血为主的治则方面开展研究。

材料与方法

1 药品与仪器 活血益气浓缩液由丹参 30g 川芎 30g 赤芍 30g 黄芪 20g 党参 20g 等药物组成,由本实验室按水煮、醇沉工艺制备(含生药 2 g/ml)。卡托普利(常州制药厂生产,批号 CG0502)。大鼠 40S 基因表达谱芯片(上海博星基因芯片有限公司产品),RM-6000 型多导生理记录仪(日本光电公司产品),心脏急救监护仪(上海医用电子仪器厂产品),DH-140B 型小动物呼吸机(浙江医科大学医学实验仪器厂产品),电子天平(上海天平仪器厂产品),点样仪(Cartesian Pixsys 7500),扫描仪(AXON)。

2 动物分组与处理 健康雄性 SD 大鼠 80 只,体重 230~260 g,由北京维通利华实验动物中心提供。随机分为假手术组和造模组;经多导生理记录仪用心阻抗法检测心功能,心脏指数(cardiac index, CI)值 $\leq 180 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ 者列入造模组,然后将存活大鼠再随机分为模型组、卡托普利组、活血益气组,每组 7 只。

3 造模及给药 动物经 1% 戊巴比妥钠 50 mg/kg 腹腔麻醉后,气管插管接人工呼吸机,开胸后结扎左冠状动脉主干支(在动脉圆锥与左心耳之间下约 1mm 处),心电示波器显示 I 导联 ST 段明显抬高后迅速关胸缝合。假手术组手术方法同上,但在冠状动脉下穿线后不打结。各组术后 4 周开始分别治疗至 8 周,每组 7 只。手术后 10 天为心衰形成期,手术后 56 天为心衰稳定期。卡托普利组每日灌胃卡托普利 10.125 mg/kg 体重,活血益气组每日灌胃活血益气液 4mg/kg 体重,假手术组、模型组每日灌胃等体积的生理盐水。

4 指标检测

4.1 血流动力学测定 采用有关文献^[2-4]的无创性阻抗法测定,使用 RM-6000 型多导生理记录仪

描记,分别求出胸部阻抗变化一级微分量大值、左室射血时间和心率,将所得数值代入 Kubicek 公式,计算每搏排出量(SV)、每分钟排出量(CO)和心脏指数(CI)。

4.2 心脏系数的测定 采用文献^[4]方法。冠脉结扎术后 8 周,大鼠称量体重后,经 1% 戊巴比妥钠 50 mg/kg 腹腔麻醉,迅速取出心脏,用冰冷的 PBS 漂洗残血,滤纸吸干表面液体,剪去各种动静脉,称量心脏重量,心脏系数=心脏重量/体重。

4.3 基因芯片检测 采用文献方法^[5,6]。以 6 张 40S 大鼠基因芯片(4 096 个基因)对心衰形成期、稳定期大鼠左心室梗死区、非梗死区和同期假手术组大鼠左心室分别取材和提取总 RNA,以 Cy3-dUTP 标记正常大鼠心肌组织 RNA(100 μg),Cy5-dUTP 标记心衰心脏组织 RNA(100 μg)进行基因表达谱检测(包括 cDNA 芯片制备,探针标记与杂交,洗片,荧光扫描和结果分析),用 ScanArray4000 扫描仪扫描芯片,观察杂交结果,用 ImaGene3.0 软件分析 Cy3 和(或)Cy5 两种荧光信号的强度和比值。用以下 3 个条件作为判断基因差异表达的标准:(1)Cy5/Cy3 的自然对数的绝对值 >0.69 (Cy3 和 Cy5 信号相差 2 倍以上);(2)Cy3 或 Cy5、Cy3 和 Cy5 信号值其中之一必须 >800 ;(3)PCR 结果良好。芯片的质量标准控制:Biodoor Chip 4000 基因表达谱芯片的质量标准是:有 40 个管家基因必须阳性,32 个植物基因(阴性对照)必须阴性,42 个点样液(空白对照)也必须阴性。本实验结果完全符合上述条件,说明实验无污染而且检测体系正常。

5 统计学方法 结果以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,以 SPSS 10.0 统计软件进行单因素方差分析。

结果

1 各组大鼠治疗前后血流动力学变化比较 模型组大鼠的心脏指数($\text{ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$)在心衰形成期和稳定期均显著低于假手术组(77.82 ± 15.97 与 258.12 ± 9.67 , $P < 0.01$; 105.92 ± 26.79 与 354.69 ± 49.18 , $P < 0.01$)。用药前模型组与各治疗组比较,心功能数值差异无显著性($P > 0.05$),且各治疗组间比较差异无显著性($P > 0.05$)。经治疗后 SV、CO、CI 值,模型组、卡托普利组、活血益气组比较差异有显著性($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 各组大鼠治疗前后血流动力学变化比较 (x̄±s)

组别	n	SV(ml/beat)	CO(ml/min)	CI
假手术	7	治疗前 0.314±0.084	138.80±24.03	323.74±26.50
	7	治疗后 0.403±0.156	167.40±49.67	354.69±49.18
模型	7	治疗前 0.095±0.026▲	43.42±11.60▲▲	96.14±23.79▲▲
	7	治疗后 0.114±0.022	53.02±11.35▲	105.92±26.79
卡托普利	7	治疗前 0.096±0.026▲	42.80±11.02▲▲	102.34±31.00▲▲
	7	治疗后 0.319±0.082**△	136.90±35.12**△	284.09±65.74**△
活血益气	7	治疗前 0.079±0.017▲	34.89±7.21▲▲	78.75±17.35▲▲
	7	治疗后 0.320±0.062**△△	140.30±24.74**△△	271.26±48.50**△△

注:与本组治疗前比较,*P<0.05,**P<0.01;与模型组同期比较,△P<0.05,△△P<0.01;与假手术组同期比较,▲P<0.05,▲▲P<0.01

2 心肌梗死后心衰心脏基因表达谱变化结果
见表 2。用 Genespring 软件对基因表达谱芯片结果分析,发现有参与能量代谢和心肌细胞骨架及纤维化等 13 类共千余条表达上调和下调的基因,梗死区差异表达基因在形成期最多(1 086 条)、稳定期次之(724 条),其中能量代谢相关基因表达下调最多,其次为心脏纤维化基因表达明显上调;而非梗死区的差异表达基因也以形成期最多(196 条),稳定期较少(97 条),其中心脏纤维化基因表达上调为多;已知基因序列但功能未知的新基因也都在梗死区的为多。

表 2 心肌梗死后心衰心脏基因、新基因表达谱变化结果

时间 (d)	梗死区	基 因				新 基 因		
		均一化 系数	差异表达 基因数	表达上调 基因数	表达下调 基因数	差异表达 新基因数	表达上调 新基因数	表达下调 新基因数
10	+	0.919	1086	504	582	178	92	86
10	-	1.064	110	96	14	14	12	2
10	-	0.985	196	97	99	40	14	26
56	+	0.877	724	323	401	126	71	55
56	-	0.948	43	22	21	8	3	5
56	-	1.087	97	42	55	20	5	15

注:标记荧光 Ratio=Cy5/Cy3 比值<0.5、或>2.0 为差异表达基因;+为梗死区,-为非梗死区

3 各组大鼠心脏重量及心脏系数比较 见表 3。
经治疗 4 周后的大鼠与假手术组比较,模型组心脏重量增加,差异有显著性(P<0.05),各治疗组心脏重量增加,差异无显著性(P>0.05)。与假手术组比较,模型组、卡托普利组心脏系数增加,差异有显著性(P<0.01),活血益气组心脏系数增加差异无显著性(P>0.05),说明活血益气药对心衰大鼠心脏形态学有改善作用。

表 3 各组大鼠心脏重量及心脏系数比较 (x̄±s)

组别	n	心脏重量(g)	心脏系数
假手术	7	1.10±0.22	2.27±0.19
模型	7	1.59±0.16△	3.15±0.24△
卡托普利	7	1.45±0.09	3.02±0.28△
活血益气	7	1.47±0.11	2.52±0.96*

注:与模型组比较,*P<0.01;与假手术组比较,△P<0.05

讨 论

心衰是以心功能下降和循环衰竭为特征的临床综

合征,其实质是由于心肌能量不足造成基因表达障碍而引起的一种超负荷心肌病^[7]。充血性心衰一旦作出诊断,大多数呈进行性恶化,NYHA 心功能分级Ⅲ、Ⅳ级的患者一年病死率高达 26%和 42%。改善生存质量并降低病死率,将是心衰治疗的新方向。早期应用卡托普利可通过影响肾素-血管紧张素-醛固酮系统、心衰基因表达的调控而逆转左室重构、改善心功能^[8]。我们和一些单位的前期工作都证实心梗后心衰存在一个证候的演变过程:心梗心衰的产生以血瘀为开始,继而发生血瘀伤正、产生心气虚证^[9-12]。

采用冠脉结扎术造成急性心梗、成功复制慢性心力衰竭动物模型,并完整模拟心衰的急性期、代偿期两个病理阶段是现今成熟的公认的心衰动物模型。本实验所用大鼠 40S 基因表达谱芯片每张上总共有 4 096 个 cDNA,包括 3 308 条已知基因,788 条未报道基因。分子生物学实验严格操作方法,各部分均经质量控制检查合格后,方进行后续实验。这是基因芯片工作提高重复性、稳定性的必备条件之一。基因芯片工作的重复性、稳定性要在实验各部分控制、把关,决非基因芯片质量的单一因素所决定。

已有研究证实:活血益气方药改善血流动力学的机制可能与其扩张冠脉、改善心肌供血、降低心肌耗氧量、保护心肌细胞、抑制血小板聚集、清除氧自由基等作用有关;益气药党参、黄芪可改善心衰心脏的收缩、舒张功能,其药理机制为通过抑制 cAMP 降解,升高 cAMP 含量,cAMP 使人型钙通道钙内流增加,细胞内钙水平增加而加强心肌收缩;同时增加肌浆网钙-ATP 酶活性,对钙摄取增加,细胞内钙水平下降而使心肌舒张;维持细胞内外钠钙交换、钠氢交换、钠钾交换平衡的双向调节作用^[11];活血益气药还能改善心肌线粒体三羧酸循环和氧化磷酸化过程,从根本上解决心衰心肌能量供应不足,引起信号转导异常导致的基因表达紊乱。本室曾研究了心衰发展过程中左室重构和心肌细胞凋亡时相特点,发现活血、益气中药能改善心梗后心衰大鼠模型心脏室壁变薄比、脏体比值、左室腔面积、单位面积内细胞核数的减少、胶原纤维的增殖,并能通过上调 Bcl-2 蛋白表达、下调 Bax 蛋白表达抑制心衰心肌细胞凋亡,最终改善左室重构,使心脏收缩、舒张功能好转^[9,11]。

本研究结果显示:(1)在心衰形成期,模型大鼠梗死区内参与能量代谢的基因(如 ATP 合成酶、腺苷酸环化酶活性多肽前体、P450ⅢB3、腺苷酸激酶 1、三磷酸腺苷酶、Ca²⁺转运慢通道、三磷酸腺苷合酶 H⁺转运线粒体 FO 复合物、磷酸甘油酸变位酶、NADH-Cytb-5

还原酶等)表达下调,而与心脏纤维化相关的基因表达显著上调;在稳定期时,能量代谢的基因仍然表达下调,但与心衰形成期比较有所改善;心脏纤维化相关基因表达也显著上调,但与心衰形成期比较有所减少。在模型大鼠心脏的非梗死区与梗死区比较,非梗死区存有较少能量代谢差异表达基因呈上调表达,而心脏纤维化相关基因呈表达明显下调。(2)应用活血益气药(以卡托普利为阳性对照研究)能明显改善心肌梗死后心衰大鼠的心功能、心脏系数。

活血益气药改善心衰模型大鼠血流动力学、心脏系数的作用,可能与其改善心衰能量代谢和纤维化的基因表达密切相关,其详细网络调控分析有待于进一步的深入研究。

参 考 文 献

- 李连达. 冠心 II 号方在日本的应用. 中西医结合杂志 1986; 6(5):315—316.
Li LD. The usage of Guan Xin II in Japan. J Integr Tradit West Med 1986; (5):315—316.
- Kubicek WG, Kameg JK, Patterson RP, et al. Development and evaluation of an impedance cardiac output system. Aerospace Med 1966;37:1208.
- 卢兴,王俊宏,丁延平,等. 大鼠心肌梗死后泵功能的恢复及其机制的实验研究. 病理生理学报 1985;(1):3.
Lu X, Wang JH, Ding YP, et al. The experimental study on the recovery of the bumping function and mechanism after myocardial infarction in rats. Acta Pathophysiol 1985;(1):3.
- 高广道,杜晓军,秦金,等. 阻抗法用于大鼠心排血量的测定及其评价. 西安医学院学报 1984;5(3):256—262.
Gao GD, Du XJ, Tai J, et al. The measure and evaluation of myocardial output by the impedance methods in rats. Acta Xi'an Med Coll 1984;5:256—262.
- Hongkui J, Renhui Y, Tarif A, et al. Effects of early angiotensin-converting enzyme inhibition on cardiac gene expression after acute myocardial infarction. Circul 2001; 103: 736—742.
- Jiacheng Yang, Christine S Moravec, Mark AS. Decreased SLIMI expression and increased gelsolin expression in failing human hearts measured by high-density oligonucleotide arrays. Circul 2000;102:3046.
- 张子彬, Tsung O, Cheng MD, 主编. 充血性心力衰竭. 第 2 版. 北京:科学技术文献出版社, 1997:12.
Zhang ZB, Tsung O, Cheng MD, editors. Congestive heart failure. Second ed. Beijing: Scientific Technical and Documents Publishing House, 1997:12.
- Jacker M, Leier W. Survival in congestive heart failure during treatment with drugs with positive inotropic action. Circul 1987;75(Suppl IV):35—63.
- 王振涛,王硕仁,赵明镜. 活血和益气方药对心肌梗死后左心衰大鼠左心室重构影响的比较研究. 中国中西医结合杂志 2002;22(5):376—378.
Wang ZT, Wang SR, Zhao MJ. Compative study on effect of recipe for activating blood circulation and replenishing Qi on left ventricular remodeling in rats with left heart failure after myocardial infarction. Chin J Integr Tradit West Med 2002; 22(5):376—378.
- 王硕仁,王振涛,赵明镜. 心气虚病证动物模型及其评价体系的构建. 中国实验动物学报 2002;10(1):33—38.
Wang SR, Wang ZT, Zhao MJ. The study on creating and evaluating animal model of disease and syndrome for deficiency of heart-Qi in traditional Chinese medicine. Chin Acta Exp Animal 2002;10(1):33—38.
- 李敏,王硕仁,赵明镜. 活血益气方药对心肌梗死后左心衰大鼠血流动力学影响的实验研究. 中国中医基础医学杂志 2001;7(6):22—25.
Li M, Wang SR, Zhao MJ. Experimental study on effect of method of activating blood, nourishing Qi and their prescriptions on hemodynamic of heart failure post-cardiac infarction of rats. Chin J Tradit Basic Med 2001;7(6):22—25.
- 王显,朱明军,孙建芝. 心衰康对电镜下 CHF 模型心肌线粒体的影响. 上海中医药大学学报 2000;14(1):33—35.
Wang X, Zhu MJ, Sun JZ. Influence of "Heart Failure Rehabilitation" on myocardial mitochondria in CHF model under electric microscope. Acta Univ Tradit Med Sin Pharmacologiae Shanghai 2000;14(1):33—35.

(收稿:2003-09-25 修回:2004-10-20)