

• 实验研究 •

芪苈强心胶囊对慢性心力衰竭大鼠心肌
P2X 受体 mRNA 表达的影响

于春泉 李欣桐 肖 扬 邢永发 王 怡*

天津中医药大学, 天津市南开区玉泉路 88 号, 300193)

基金项目: 国家中医药管理局中医药科学技术研究专项资助(06-07JQ03); 天津市卫生局项目资助(07013)

* 通讯作者: wangyi1965@gmail.com, (022)59596572

[摘要] 目的 观察芪苈强心胶囊对慢性心力衰竭(CHF)大鼠心室重构的影响及机制。方法 Wistar 大鼠 200 只, 采用结扎大鼠冠状动脉左前降支的方法造成心肌梗死, 8 周后形成 CHF 大鼠模型, 随机分为模型组(予蒸馏水)、假手术组(予蒸馏水)、芪苈强心胶囊高剂量组(1.0g/kg)、中剂量组(0.5g/kg)、低剂量组(0.25g/kg)、缬沙坦组(20mg/kg), 每组 7 只。连续给药 4 周后, RT-PCR 法测定 CHF 大鼠心肌组织中配体门控型嘌呤受体(P2X1~P2X7) mRNA 的表达水平。结果 与假手术组比较, 模型组大鼠心肌组织中 P2X2、P2X4、P2X5、P2X6 受体亚型 mRNA 水平显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与模型组比较, 芪苈强心胶囊高剂量组能上调 P2X2、P2X4、P2X5、P2X6 等受体亚型 mRNA 水平($P<0.05$); 与假手术组比较, 模型组大鼠心肌组织中 P2X3 受体亚型 mRNA 水平显著升高($P<0.05$), 但各给药组与模型组比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。结论 芪苈强心胶囊可调节 CHF 大鼠心肌组织的 P2X 受体 mRNA 表达水平, 从而改善心室收缩功能, 增加心输出量, 抑制心力衰竭的心室重构的作用机制可能与上调 P2X2、P2X4、P2X5、P2X6 受体 mRNA 表达有关。

[关键词] 芪苈强心胶囊; 慢性心力衰竭; 配体门控型嘌呤受体; 心功能

Effect of Qili Qiangxin Capsule on the mRNA Expression of Purinoceptor 2X1-7 in Chronic Heart Failure Rats

YU Chunquan, LI Xintong, XIAO Yang, XING Yongfa, WANG Yi

(Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, TianJin 300193)

ABSTRACT Objective To observe the effect of Qiliqiangxin Capsule on the mRNA expression of purinoceptor 2X1-7 (P2X1-P2X7) in chronic heart failure (CHF) rats. **Methods** The CHF models were established by ligating the anterior descending coronary artery of 200 Wistar rats for 8 weeks. The rats were randomized into the model group, Qiliqiangxin Capsule large-dose group, Qiliqiangxin Capsule middle-dose group, Qiliqiangxin Capsule small-dose group, sham operation group and valsartan group. After 4 weeks of successive administration, the mRNA expression of P2X1-P2X7 in the myocardial tissues of CHF model rats was detected by RT-PCR. **Results** Comparing with the sham group, the mRNA expression of P2X2, P2X4, P2X5 and P2X6 in the model group was significantly decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$). Comparing with the model group, the mRNA expression of P2X2, P2X4, P2X5 and P2X6 in the Qiliqiangxin Capsule large-dose group was significantly increased ($P<0.05$ or $P<0.01$). The mRNA expression of P2X3 in the model group was significantly increased only as compared with the sham group ($P<0.05$), but the differences with other administration groups were no statistically significant ($P>0.05$). **Conclusion**

Qiliqiangxin Capsule could regulate the mRNA expression of P2X, improve ventricular contraction function, increase heart output and inhibit heart failure, which maybe relevant to increasing the mRNA expression of P2X2, P2X4, P2X5 and P2X6.

Keywords Qiliqiangxin Capsule; chronic heart failure; purinoceptor 2X (P2X); mRNA; cardiac function; RT-PCR

配体门控型嘌呤(P2X)受体为选择性阳离子通道受体, 开放后介导 Ca^{2+} 内流, 激活电压门控 Ca^{2+} 通道, 介导胞浆 Ca^{2+} 内流, 产生多种生理作用。P2X 受体在心血管系统分布广泛, 并且在血管收缩及舒张、血小板聚集、炎症反应、高血压、心肌梗死、心律失常、心力衰竭等多方面具有重要的调控作用^[1-2], 嘌呤信号传导系统可能和交感神经系统以及肾素血管紧张素醛固酮系统具有同样重要的调节

作用。外源性 ATP 作为细胞外信号分子, 作用于选择性的阳离子通道 P2X 受体^[3-4], 介导胞浆内 Ca^{2+} 的内流, 导致心肌收缩功能增强。既往研究发现, 芪苈强心胶囊能够明显的增强慢性心功能衰竭(CHF)模型大鼠的心功能, 因此本实验通过观察芪苈强心胶囊对阳离子通道 P2X1~P2X7 受体 mRNA 表达的影响, 探讨其对改善 CHF 大鼠心功能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

Wistar 大鼠 200 只, 雄性, 体重 230 ~ 250g, SPF/VAF 级, 由天津市实验动物中心提供[许可证号: SCXK(津)2009-0001], 分笼饲养, 每笼 5 只。

1.2 主要仪器和试剂

MP-150 多导生理记录仪 (BIOPAC Systems Inc, 美国); LOGIQ 400CL 彩色超声心动仪 (GE medical System, 美国); Allegra-64R Centrifuge 低温高速离心机 (BECKMAN, 美国), DU-530 紫外分光光度计 (DNA/Protein Analyzer, BECKMAN, 美国), ECP3000 水平电泳仪 (北京六一仪器厂), GENE GENIUS 凝胶成像系统 (Bio Imaging System, SYNGENE, 英国), ABI 7300 实时荧光定量系统 (Applied Biosystems, 美国)。

1.3 药物和试剂

芪蒴强心胶囊, 由河北以岭医药集团提供, 每克药粉相当于 6.325g 生药 (批号: 100208); 缬沙坦片由北京诺华制药有限公司生产 (国药准字 H20040217), 药物采用蒸馏水溶解备用; Trizol Reagent (Invitrogen); Reverse Transcription Reagents Kit; Power SYBR Green PCR Master Mix Reagents Kit (Applied Biosystems, 美国); 引物由上海生物工程技术服务有限公司合成。

1.4 造模及给药方法

结扎 Wistar 大鼠冠状动脉左前降支, 造成心肌梗死, 8 周后形成 CHF 模型^[5-6]。动物用水合氯醛 (30mg/kg) 腹腔注射麻醉, 仰卧位固定, 胸部备皮, 沿左侧第四、五肋间剪开左胸部皮肤, 钝性分离胸肌, 剥开心包, 轻压右胸, 将心脏轻轻挤压出胸腔外, 于肺动脉圆锥与左心耳之间距离左冠状动脉前降支起始部 2mm 处穿线, 立即把心脏送回胸腔内, 恢复自主呼吸后稳定 5min 左右, 结扎冠状动脉左前降支, 缝合伤口, 肌肉注射庆大霉素预防感染。

于手术后第 5 周用 L-400 彩色超声心动仪进行心功能检测, 以射血分数 (EF 值) 小于 60% 作为模型成功的标志^[7]。剔除死亡和未达到标准的大鼠后, 继续饲养至第 8 周, 采用随机数字表法分为模型组、假手术组、芪蒴强心胶囊高剂量组 (1.0g/kg)、中剂量组 (0.5g/kg)、低剂量组 (0.25g/kg)、缬沙坦组 (20mg/kg), 每组 7 只, 共 42 只, 各组连续灌胃 4 周, 每天 1 次, 每只大鼠给药体积为 1ml/100g, 假手术组及模型组灌服等体积蒸馏水。

1.5 逆转录 PCR (RT-PCR) 法测定 P2X1-P2X7 受体 mRNA 的表达水平

将给药 4 周后的大鼠腹腔注射水合氯醛 (30mg/kg) 麻醉, 腹主动脉取血后, 迅速摘取心脏, 在冰上剪除心房、大血管和附着结缔组织, 用生理盐水冲洗干净, 切去心尖部心肌组织, 取梗死区与非梗死区之间的缺血心脏组织, 用锡纸包裹后装入冻存管, 迅速投入液氮中冷冻, 之后置于 -80℃ 保存。

1.5.1 总 RNA 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。RNA 的反转录: 反应体系为 10 × RT Buffer 1.0μl, MgCl₂ (25mmol/L) 4.4μl, deoxyNTPs Mixture (2.5mmol/L) 4.0μl, Random Hexamers (50μmol/L) 1.0μl, RNase Inhibitor (20U/L) 0.4μl, MultiScribe Reverse Transcriptase (50U/μl) 0.5μl。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 12.3μgRNA, 用 RNase-free water 补足反应体系至 20μl。反应条件: 25℃、10min, 48℃、30min, 95℃、5min。

1.5.2 PCR 反应 反应体系为 2 × Master Mix 12.5μl, 正向引物 0.5μl (200nm/L), 反向引物 0.5μl (200nm/L), cDNA Sample 0.5μl, RNase-free water 11μl, 反应体系为 25μl。混合以上反应物, 放入实时定量 PCR 仪反应, 扩增条件为 95℃ 预变性 10min 后, 95℃、15s, 60℃、1min, 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。

1.6 统计学方法

用 SPSS 11.5 软件包进行统计学分析, 所有实验数据采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较用方差分析。

2 结果

表 1 示, 与假手术组比较, 模型组大鼠心肌组织 P2X2、P2X4、P2X5、P2X6 受体亚型 mRNA 水平显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与模型组比较, 芪蒴强心胶囊高剂量组能上调降低的 P2X2、P2X4、P2X5、P2X6 等受体亚型 mRNA 水平 ($P < 0.05$); 与假手术组比较, 模型组大鼠心肌组织中仅 P2X3 受体亚型 mRNA 水平升高 ($P < 0.05$), 但各给药组与模型组比较差异均无统计学意义。

表 1 各组大鼠 P2X 受体各亚型 mRNA 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	P2X1	P2X2	P2X3	P2X4	P2X5	P2X6	P2X7
假手术组	7	1.18±0.76	1.03±0.23	1.07±0.42	1.01±0.13	1.08±0.51	1.09±0.57	1.07±0.42
模型组	7	0.78±0.28	0.56±0.32**	1.68±0.59*	0.68±0.22**	0.52±0.21*	0.55±0.29*	0.89±0.31
芪苈强心胶囊高剂量组	7	1.41±0.50 [#]	1.25±0.49 [#]	1.40±0.48	1.45±0.53 [#]	1.69±0.50 [#]	1.12±0.60 [#]	1.16±0.60
芪苈强心胶囊中剂量组	7	0.86±0.39	0.77±0.54	2.16±1.16	1.16±0.36 [#]	0.75±0.15	0.87±0.40	1.06±0.34
芪苈强心胶囊低剂量组	7	0.83±0.37	0.92±0.54	2.18±1.05	1.13±0.55	0.70±0.34	0.36±0.26	1.22±0.56
缬沙坦	7	1.04±0.39	0.51±0.36	1.47±0.56	0.88±0.57	0.77±0.50	0.73±0.52	1.05±0.51

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

3 讨论

芪苈强心胶囊是以络病理论为指导治疗 CHF 的中成药。由黄芪、附子、人参、丹参、葶苈子、泽泻、红花、玉竹、陈皮、桂枝、香加皮组成。依据 CHF 的“心气虚乏、络脉瘀阻、络息成积”等本虚标实的病理改变,以益气温阳为治病之本,辅以活血通络药物使气旺血行络通,兼用利水消肿药以治其标。既往研究结果表明^[8-10],芪苈强心胶囊对 CHF 的作用主要集中在:①改善心室收缩功能,增加心输出量;②抑制 CHF 的心肌重构,并且在分子水平得到验证;③降低血清炎症因子水平;④抑制心衰时过度激活神经内分泌系统。CHF 时,心肌组织缺血和炎症反应,以及过度激活的交感神经能诱导心肌内 ATP 释放。ATP 作用于选择性的阳离子通道 P2X 受体,能够介导胞浆内 Ca^{2+} 浓度的增加,由此推测 P2X 受体激活,增加了心肌细胞 Ca^{2+} 内流从而导致心肌收缩功能增强。前期研究显示^[11],芪苈强心胶囊可以较好地改善 CHF 模型大鼠心气虚证候,调节 CHF 时心肌细胞的能量代谢障碍,缓解左室结构异常,增强心功能。因此本实验通过观察芪苈强心胶囊对阳离子通道 P2X 受体 mRNA 表达的影响,探讨其对改善 CHF 大鼠心功能的作用机制,具有重要的意义。

P2X 受体、外源性 ATP 以及胞外核苷酸酶一起组成的信号受体系统参与了包括心肌缺血、心力衰竭、血管舒张、动脉粥样硬化和血小板聚集在内的多种病理生理过程,参与调节心血管系统的内稳态。既往研究发现^[12-19],P2X1 对血管紧张度的调节和血管内皮功能具有重要作用,调节 P2X1 受体的表达可以介导血管舒张,降低血压;血管外周的 P2X2 受体亦具有调节血压的作用;P2X3 的受体拮抗剂可改善心律失常和心肌缺血;P2X4 的高表达可以增加心肌收缩力,抑制心肌肥大,增加心输出量;P2X5 受体在左心室、右心室、窦房结都有 P2X 受体 mRNA 的表达,其具有影响心功能的潜在能力;

P2X6 受体具有诱导肿瘤坏死因子 α 产生,从而延长收缩时间,破坏细胞钙稳态,诱导细胞凋亡;P2X7 受体在免疫系统的炎症反应中具有重要地位,抑制 P2X7 的过表达可能成为预防动脉粥样硬化的有效途径。

前期研究发现,芪苈强心胶囊能降低大鼠的心率、呼吸频率,提高力竭游泳时间,并且具有剂量依赖性,可见芪苈强心胶囊能有效的改善心气虚证候,增强 CHF 大鼠的运动耐力。本研究将 P2X 受体家族作为研究对象,通过 RT-PCR 法力求找到芪苈强心胶囊治疗 CHF 的新的作用靶点及机制。本研究发现,CHF 模型大鼠的缺血心肌中 P2X mRNA 的表达成整体下调趋势,P2X2、P2X4、P2X5、P2X6 等受体 mRNA 水平明显下调($P<0.05$ 或 $P<0.01$),并且芪苈强心胶囊高剂量组对这 4 种 P2X 受体均有明显的上调作用($P<0.05$);模型组 P2X1 和 P2X7 的变化差异无统计学意义,仅 P2X3 受体 mRNA 水平明显上调($P<0.05$),但是各给药组对上调的 P2X3 受体均没有作用。结果表明,芪苈强心胶囊具有调节 P2X 受体家族的作用,其改善心室收缩功能,增加心输出量,抑制 CHF 的心室重构的作用机制可能与上调 P2X2、P2X4、P2X5、P2X6 受体 mRNA 表达有关,其确切机制有待今后进一步研究。

参考文献

- [1] Burnstock G, Kennedy C. A dual function for adenosine 5'-triphosphate in the regulation of vascular tone. Excitatory cotransmitter with noradrenaline from perivascular nerves and locally released inhibitory intravascular agent [J]. Circ Res, 1986, 58(3): 319-330.
- [2] Gachet C. Regulation of platelet functions by P2 receptors [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2006, 46: 277-300.
- [3] Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines [J]. Pharmacol Rev, 1998, 50(3): 413-492.
- [4] Burnstock G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission [J]. Physiol Rev, 2007, 87(2): 659

- 797.
- [5]王硕仁,王振涛,赵明镜,等. 心气虚病证动物模型及其评价体系的构建[J]. 中国实验动物学报,2002,10(1):33—38.
- [6]李敏,王硕仁,赵明镜,等. 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[J]. 中国中医基础医学杂志,2001,7(6):22—25.
- [7]Burrell LM, Chan R, Phillips PA, et al. Validation of an echocardiographic assessment of cardiac function following moderate size myocardial infarction in the rat[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 1996, 23(6—7): 570—572.
- [8]李娅,宋优,程翔,等. 芪蒴强心胶囊对大鼠心肌梗死后心肌重构及心功能的影响[J]. 中国分子心脏病学杂志,2007, 7(4):201—204.
- [9]李佳,杨萍. 芪蒴强心胶囊对心梗后心力衰竭大鼠 perlestin 蛋白表达干预作用的研究[J]. 中国实验诊断学,2009, 13(2):170—172.
- [10]李如意,范亚坤,李英肖,等. 芪蒴强心胶囊对慢性心力衰竭患者心功能及血清脑钠肽的影响[J]. 中国中医基础医学杂志,2010,16(9):787—788.
- [11]李欣桐,肖扬,邢永发. 芪蒴强心胶囊对心气虚型慢性心衰大鼠心功能的影响[J]. 天津中医药大学学报,2011,30(1):30—32.
- [12]Chan CM, Unwin RJ, Bardini M, et al. Localization of P2X1 purinoceptors by autoradiography and immunohistochemistry in rat kidneys[J]. Am J Physiol,1998,274(4 Pt 2):799—804.
- [13]Inscho EW, Cook AK, Imig JD, et al. Renal autoregulation in P2X1 knockout mice[J]. Acta Physiol Scand, 2004,181(4):445—453.
- [14]Loesch A, Burnstock G. Ultrastructural localisation of ATP-gated P2X2 receptor immunoreactivity in vascular endothelial cells in rat brain[J]. Endothelium,2000,7(2): 93—98.
- [15]李桂林,戴群,梁尚栋,等. P2X 受体拮抗剂对大鼠心肌梗死心电图的影响[J]. 基础医学与临床,2007,27(5): 254—255.
- [16]Yamamoto K, Sokabe T, Matsumoto T, et al. Impaired flow-dependent control of vascular tone and remodeling in P2X4-deficient mice[J]. Nat Med,2006,12(1):133—137.
- [17]Yamamoto K, Korenaga R, Kamiya A, et al. P2X4 receptors mediate ATP-induced calcium influx in human vascular endothelial cells[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol,2000, 279(1):285—292.
- [18]Surprenant A, Rassendren F, Kawashima E, et al. The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7) [J]. Science, 1996, 272(5262):735—738.
- [19]Kawamura H, Aswad F, Minagawa M, et al. P2X7 receptor-dependent and -independent T cell death is induced by nicotinamide adenine dinucleotide[J]. J Immunol,2005, 174(4):1971—1979.
- (收稿日期:2011—11—14;修回日期:2011—12—20)
- [编辑:侯建春]

关于举办“2012 年第四届海峡两岸中医药合作发展论坛”的通知

由中华中医药学会和海峡两岸中医药合作发展交流协会联合主办的“2012 年第四届海峡两岸中医药合作发展论坛”定于 2012 年 6 月 15—22 日在台湾台中市新市政中心举办。本次论坛旨在发扬中华传统中医药文化;拓展两岸中西医药产、学、研的合作交流;建立中西医药的两岸科技交流平台;探讨两岸中西医药法规及适用范围;扩大两岸中西医药合作发展的渠道。论坛期间拟将安排与会人员拜会台湾台中市医师公会、参访台中医院、台中慈济医院和台北中医耳鼻喉科医学会等。大会诚挚邀请各界相关人士踊跃参加,共襄盛举。现将有关事项通知如下:

一、参会费用:报名费 3000 元/人。报名后将发正式参会通知,并交纳会务费用。交款方式:1. 银行汇款:开户行:中国工商银行北京市分行和平里北街支行,账号:0200004209200015436,户名:中华中医药学会。汇款时请注明“赴台湾报名费”(汇款请在报名截止日期前办理)。2. 邮政汇款:邮编:100029,北京市朝阳区樱花东街甲 4 号 中华中医药学会国际部。

二、联系方式:中华中医药学会国际部,电话/传真:010—64206805, E-mail: zyyxhgjb@163.com, 联系人:孙永章 13901230469, 闫铮 13810568161, 贾雪晴 15110101817。

三、论文征集:发送邮件到 zyyxhgjb@163.com 和 2012@cstcm.org, 论文请以 Microsoft Office Word 文档格式(宋体,4 号字,1.5 倍行距,勿用稿纸格式)添加附件形式发送,并于电子邮件中注明作者姓名、职称、职务、单位、手机等相关信息。论文征集及报名交费截止日期为 2012 年 3 月 31 日。

四、相关说明:1. 赴台材料:大陆地区人民入出台湾地区申请书;任职证明(与会人员每人独立开具,并加盖公章);彩色白底两寸大头正向相片(请背面注明姓名),身份证正面、背面复印件;最高学历毕业证书文件复印件。与会人员是医师者需另附医师执照文件复印件。所属单位相关法人证书或登记证明。2. 参会代表担任党、政、军职之真实身份需据实填写;如因个人原因未能赴台参会,所交报名费不予退还。