

益气活血中药复方对 CVB₃ 大鼠心肌细胞感染模型 ATP6 基因表达的影响 *

车红花¹ 张明雪^{2△} 何伟³ 侯平² 顾平⁴

(1 辽宁中医药大学 辽宁 沈阳 110032 2 辽宁中医药大学附属医院 辽宁 沈阳 110032 ;
3 中国中医科学院 北京 100700 ;4 大连市中医院 辽宁 大连 116013)

摘要 目的 研究益气活血中药复方对 CVB₃ 大鼠心肌细胞感染模型 ATP6 (ATP synthase F0 subunit 6) 基因表达的作用机制。方法 : 本实验用新生 2-3dWistar 大鼠心肌细胞,建立 CVB₃ 病毒感染模型,通过改良的抑制性消减杂交技术 (SSH),克隆了受 CVB₃ 攻击的心肌细胞中被中药 (益气活血中药复方) 调控的基因。结果 :ATP 6 基因,在中药组中高表达,而病毒组中表达减弱或抑制。结论 : 益气活血中药复方能影响受 CVB₃ 病毒攻击的宿主细胞 ATP6 基因的表达,有效保护心肌、阻断病程进度,从而实现治疗病毒性心肌炎的目的。

关键词 病毒性心肌炎 益气活血中药复方 抑制性消减杂交技术 ;ATP6

中图分类号 R542.2+1 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2012) 23-4412-04

The Influence of Supplementing Qi and Activating Blood Circulation Chinese Herbal Compound to the Genetic Expression of CVB₃ Rat Cardiac Muscle Cell Infection Model ATP Synthase F0 Subunit 6*

CHE Hong-hua¹, ZHANG Ming-xue^{2△}, HE Wei³, HOU Ping², GU Ping⁴

(1 Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang, Liaoning, 110032;
2 Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang, Liaoning, 110032;
3 China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing, 100700; 4 Dalian Hospital of Traditional Chinese Medicine, Dalian, 116013)

ABSTRACT Objective: This study is about the mechanism of supplementing Qi and activating blood circulation Chinese Herbal Compound to the genetic expression of CVB₃ rat cardiac muscle cell infection model ATP synthase F0 subunit 6. **Methods:** This experiment set CVB₃ infection model by the new 2-3d rats' cardiac muscle cells, used the improved suppression subtractive hybridization (SSH), and cloned genes of host cells attacked by CVB₃ and regulated by supplementing Qi and activating blood circulation Chinese Herbal Compound. **Results:** The expression of ATP synthase F0 subunit 6 in Chinese medicine group present high, but in virus group suppressed. **Conclusion:** Supplementing Qi and activating blood circulation Chinese Herbal Compound can effect on the genetic expression of ATP synthase F0 subunit 6 attacked by CVB₃, protect myocardial effectively and block the course of disease, so that achieve the purpose of treating viral myocarditis.

Key words: Viral myocarditis (VMC); Supplementing Qi and activating blood circulation Chinese Herbal Compound; Suppression subtractive hybridization (SSH); ATP synthase F0 subunit 6

Chinese Library Classification: R542.2+1 **Document code:** A
Article ID: 1673-6273 (2012) 23-4412-04

病毒性心肌炎 (Viral myocarditis ,VMC) 是病毒侵犯心脏引起的心肌非特异性间质性反应为主要病变的心肌炎、是临床常见心血管疾病。其发病机理为,病毒通过直接作用和免疫机制引起心肌细胞损伤。因此,病毒性心肌炎的治疗主要是针对病原和保护心肌。近年来该病的发病率呈逐渐上升,又可能发生爆发流行,因此,针对病毒性心肌炎的治疗及其机制研究显得迫在眉睫。鉴于气虚血瘀为本病病机,且益气活血中药复方在临床运用较广、疗效佳,为进一步阐明其心肌保护作用,本

实验建立柯萨奇病毒 B3(CVB₃)感染模型,用 SSH 技术,筛选出受 CVB₃ 攻击的心肌细胞中被益气活血中药复方调控的基因。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 新生 2—3d 的 wistar 大鼠,体重约 5-6g,清洁级,分批购自辽宁中医药大学实验动物中心。

1.1.2 实验药品及制备 CVB₃m 嗜心肌株 (哈尔滨医科大学

* 基金项目 国家自然科学基金面上项目 (30873399) 教育部博士点基金(20070162002) ;
辽宁省高等学校优秀人才支持计划
作者简介 车红花 (1982) ,女,博士生,主治医师
△通讯作者 张明雪,电话 024-82318256,E-mail zhmx6228@163.com
(收稿日期 2012-04-23 接受日期 2012-05-19)

微生物实验室提供

益气活血中药复方注射液 中药饮片主要由黄芪、郁金、丹参、麦冬、白参、白茅根等组成(购自辽宁中医药大学附属医院门诊中药局),经鉴定,状态、产地、质量均符合国家药典标准。配制成含生药浓度为 1g/mL 的注射液(沈阳药科大学药学院制备)。

1.2 实验方法

1.2.1 心肌细胞原代培养 取新生 2-3d wistar 大鼠,取出心脏,用预冷 HBSS 液轻轻冲洗 2 遍以清除表面血液,剪取心室部,剪为 1mm³ 碎块,冲洗一次,用移液器吸弃 HBSS 液后,适量分装试管中,加入 8mL 0.25%胰蛋白酶(1:250) 消化液,放置 37℃ 恒温水浴震荡器中,消化 50min,待心肌组织块消化完全后,以 2 mL/管的计量加入含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液终止消化,1000 rpm 离心 8 min,缓慢弃上清液,每管加入 8 mL HBSS 液洗涤细胞,轻轻混匀后,1000rpm 离心 8 min,再次弃掉上清液,加入 10 mL 含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液,吹打混匀心肌细胞,先用 100 目不锈钢滤网过滤后,再次以 200 目不锈钢滤网过滤,接种于培养器皿中^[1-3]。

1.2.2 CVB3 病毒性心肌炎模型的建立 心肌细胞培养 72 h 后,可在镜下观察到细胞规律性搏动,接入 CVB₃ 病毒 1mL,放入 CO₂ 培养箱中吸附 1.5 h。将细胞分为病毒组与益气活血中药复方治疗组。弃掉病毒稀释液后,病毒组加入 1 mL 10%胎牛血清为 tester 2 组加入 1 mL 益气活血中药复方(10%胎牛血清稀释) 为 driver,培养箱内放置 24 h 后,弃去液体,用 HanK 氏液轻轻冲洗,加入 0.25%胰酶待 3~5min 密切注意细胞形态、间隙的变化,收集细胞至离心管中,1000 rpm 离心 10 min,提取 mRNA^[4-6]。

1.2.3 心肌细胞 mRNA 的提取 使用 QuickPrep[®] micro mRNA purification 试剂盒(Pharmacia 公司)。详细步骤按操作说明进行,总 RNA 提取后,于分光光度计(Backman 640) 定量。

1.2.4 双链 cDNA 的合成 采用 CLONTECH 公司 PCR-Select

TMcDNA SubtractionKit 试剂和酶,分别以 driver 和 tester mRNA 为模板,进行单链和双链 cDNA 的合成。

SSH 方法利用的寡核苷酸 以下应用于 SSH 的寡核苷酸(均由 Clontech 公司的 PCR-select[™] cDNA subtraction kit 试剂盒提供) :ADAPTER-1:5'-CTAATACGACTCACTATA GGG CTCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGT-3'3'-GGCCGTCCA- 5'ADAPTER-2R: 5'-CTAATACGACTCACTATAGGG CAGCG TG-GTCGCGGCCGAGGT-3'3'-CGGCTCCA-5' 第一轮 PCR 引物: 5'-CTAATACGACTCACTATAGGCC-3' 第二轮 PCR 引物: NESTEDPCR 引物 1 5'TCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGT-3' NESTEDPCR 引物 2R 5'AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT-3'。

1.2.5 SSH 差减杂交 详细操作按 Clontech 公司的 PCR-selectTMcDNA subtraction kit 试剂盒说明书执行。利用 glassmilk 将 PCR 扩增产物(差异 cDNA 片断) 回收并克隆到 pGEM-T easy 载体中,连接产物转化 XL1-Blue 菌,随机筛选 30 个白色克隆,挑单菌落于 3 mL LB 培养基中,培养 12-16 h 后,取出 1ml 菌液进行测序后,余下菌液以 20%甘油 -80℃ 保存。

1.2.6 测序 交由上海博亚英骏生物技术有限公司测序。

1.2.7 GenBank 序列比较 通过 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> 进行序列,比较测序结果,寻找该片段在基因组和 dbEST 中有无明显同源的序列。

2 结果

2.1 SSH 结果

以病毒组心肌细胞 cDNA 为 tester,病毒吸附后用益气活血中药复方干预的心肌细胞 cDNA 为 driver,两组 cDNA 进行杂交,得到的消减杂交文库稀释 1000 倍,作为模板进行 PCR 扩增,其产物连接到 pGEM-T easy 载体中,进行 DNA 序列分析。

通过序列测定结果,在 ncbi 的 blastn 结合 blastx 分析,结果(部分)如下,列于下表(表 1)。

表 1 益气活血中药复方对基因表达的影响(SSH 技术)

Table 1 Effect of Chinese Herbal Compound of supplementing Qi and activating blood circulation on the expression of gene(technique of SSH)			
Colonial code	Group	High expression group	Results of blast
C08	Cross	Drug group	ref YP_002791216.1 ATP synthase F0 subunit 6
D08	Cross	Drug group	ref YP_002791216.1 ATP synthase F0 subunit 6
B05	Cross	Drug group	ref YP_002791216.1 ATP synthase F0 subunit 6
C02	Cross	Drug group	ref YP_002791216.1 ATP synthase F0 subunit 6
D02	Cross	Drug group	ref YP_002791216.1 ATP synthase F0 subunit 6
G02	Cross	Drug group	ref YP_002791216.1 ATP synthase F0 subunit 6
E05	Cross	Drug group	ref YP_002791216.1 ATP synthase F0 subunit 6

2.2 荧光定量 RT-PCR 验证结果

结果提示 ATP 6 基因在中药组中的表达均高于病毒组,说明益气活血中药复方可上调该基因的表达(图 1,表 2)。

3 讨论

病毒性心肌炎从发病特点可归于中医学的《温病》范畴,根

据临床特点又可归属于“虚损”、“心悸”、“胸痹”、等范畴。本病病位在心,涉及肺、脾、胃等脏腑。发病因身体素虚,复感温热之邪所致。肺为华盖,位亦居膈、开窍于鼻、外合皮毛,且为娇脏、不耐寒热,外感温热之邪侵袭机体,肺首当其冲。温热之邪,耗气伤阴,肺之气阴耗伤,进而伤及心气。心肺气虚,宗气不足,不能正常贯心脉行气血。若心气虚、运血无力,毒邪外侵、内舍于

ATP

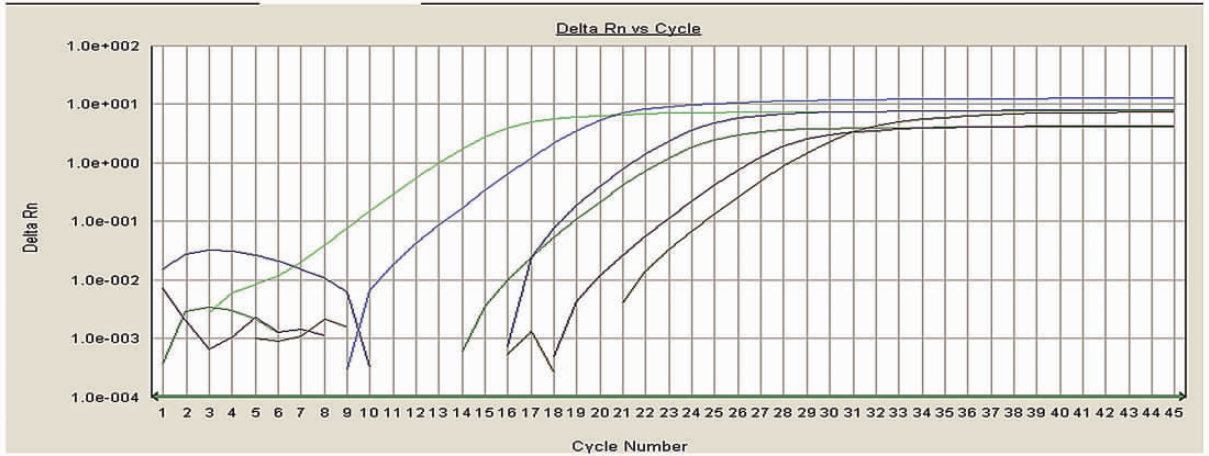


图 1 ATP synthase F0 subunit 6 基因 RT-PCR 扩增曲线图

Fig.1 Amplification curve of ATP synthase F0 subunit 6 gene by RT-PCR

表 2 ATP synthase F0 subunit 6 基因 RT-PCR 扩增 Ct 值

Table 2 Ct value of Rt-PCR amplification about ATP synthase F0 subunit

6 gene		
Well	Name	ct
A1	Control-virus	20.03
A2	Control-drug	21.00
B1	Virus	24.44
B2	Virus	26.22
C1	Drug	12.60
C2	Drug	16.29

心,血脉运行不畅则心血瘀阻。《诸病源候论》记载:“心藏神而主血脉,虚劳损伤血脉,致令心气不足,因为邪之所乘,则使惊而悸动不安。”故正虚邪侵是病毒性心肌炎的发病主因,气血亏虚、瘀血内阻是本病的重要病理变化^[7]。益气活血法广泛运用于病毒性心肌炎的临床治疗,疗效满意^[8]。益气活血中药复方由黄芪、白参、丹参、郁金、麦冬、白茅根等药物组成,其中,黄芪、白参为君药,大补元气,固脱生津。黄芪性微温,味甘,归肺、脾经,补脾胃,建中气而升阳,益气固表。药理研究表明,黄芪可抑制细胞中病毒核糖核酸的复制,从而有效的降低心肌组织中病毒滴度^[9],其主要成分黄芪总黄酮可逆转病毒性心肌炎引起的泵功能的损害^[10],从而可以有效地治疗病毒性心肌炎。白参性味甘平,大补元气,补脾益肺,养阴生津,宁神益智。人参能增强机体免疫力,也对动物心肌无力等症状有改善作用^[11]。丹参始载于《神农本草经》,性微寒,归心、肝经,能活血化瘀,通心脉,补养心血,有研究报道,丹参含有的丹参酮、丹参素、A 磺酸钠可降低过氧化脂质含量,稳定线粒体膜及提高超氧化物歧化酶的活性,同时可保护 ATP,减少其降解,因此对心肌有较好的效应^[12]。郁金作为臣药,以行气化瘀,清心安神。《本草汇言》记载:“郁金,清气化痰,散瘀血之药也。”丹参与郁金相配伍,治疗心胸痹痛、气滞血瘀等症。麦冬,性微寒味甘而质润,可清心除烦,滋阴生津。对心血管系统与免疫系统均有良性作用^[13]。白茅根,

味甘、性寒,入肺、胃、膀胱经,可清泻湿热,从小便而解,以防余邪留恋。《神农本草经》云:“主治劳伤虚羸,补中益气,除瘀血,血闭,寒热,利小便。”白茅根导热下行,配麦冬清解心肺客热,恰合本病温热之邪耗伤气阴的病机特点。二药与君药配伍,共奏益气养阴之效。诸药合用,大补心气,祛瘀行血,而无留滞之患,共收益气活血之效,体现了中医“治病求本,兼顾其标”的整体观念。

心肌能量代谢障碍是病毒性心肌炎的重要病理生理特征之一。线粒体占心肌细胞容积的 35%~40%,不但承担着心肌 90%的能量供应,而且在调节细胞内 Ca^{2+} 浓度及细胞凋亡等方面起着重要作用^[14]。在细胞内,ATP 是所有生物化学能量的储运者,被称为细胞的“能量货币”。线粒体 ATP 合酶也称 FOF1-ATP 合酶,也是参与能量代谢的关键酶。因 ATP 合酶的主要功能为参与氧化磷酸化或光合磷酸化,催化合成 ATP,所以常比喻为制造货币的“印钞机”^[15]。线粒体 ATP 合成酶是定位于线粒体内膜的一个重要的复合体,它由位于膜脂双层区的具有质子转运活性的 F0 蛋白体和具有催化活性的水溶性外周蛋白 F1 组成^[16],是一种 ATP 驱动的质子运输体,当质子顺电化学梯度流动时催化 ATP 的合成,F0 嵌合在膜上,是一个疏水蛋白复合体^[17],形成一个跨膜质子通道。有学者提出,心肌保护作用与 ATP 合酶表达增加有关^[18]。而且,该酶的活性与心肌的损伤程度亦有关。当心肌不同程度的损伤时,受损心肌的 ATP 合酶活性,有不同程度的下降^[19]。

抑制性消杂交技术是分离差异表达基因的有效方法。其基本原理为:首先将两个群体的 mRNA 反转录为 cDNA,tester 为含有特异表达基因的样本,另一组为 driver,杂交 tester 和 driver 的 cDNA,去除杂交体 cDNA 后,没有形成杂交体的 cDNA 就是在 tester 中高表达或特异表达,而在 driver 中低表达或不表达的基因。因为被扩增、克隆的双链 cDNA 是来源于第一次杂交的不同体系的,并且进一步做第二次杂交,所以具有很高的特异性^[20]。在本研究结果中,中药组与病毒组相比,ATP 6 基因表达增强,其机制可能是益气活血中药复方将受感染心肌细胞的 ATP6 基因活性增加,从而提高线粒体的能量代谢水

平、氧应激水平,抑制 CVB₃ 感染后细胞凋亡,从而保护心肌细胞,治疗病毒性心肌炎。本研究在基因水平探讨益气活血中药复方治疗病毒性心肌炎的作用机制,将为中医药治疗本病提供理论基础和实验依据。

参考文献(References)

- [1] 邵华,金秀东,梁军,等.不同差速贴壁时间对心肌细胞培养的影响实验性研究[J].牡丹江医学院学报,2008,29(1):3-4
Shao Hua, Jin Xiu-dong, Liang Jun, et al. The Effect of Different Tial and Adherent Culture on ardiac Muscle Cells [J]. Journal of Mudanjiang Medical College,2008,29(1):3-4
- [2] 王丽,李忠浩.乳鼠原代心肌细胞培养方法与技巧[J].兽医科学,2011,2:107-108
Wang Li, Li Zhong-hao. Methods and skills of Neonatal rat primary myocardial cell in culture [J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine,2011,2:107-108
- [3] 何伟.益气活血中药复方治疗 CVB₃ 病毒性心肌炎的实验研究[D].辽宁:辽宁中医药大学,2009:39-41
He Wei. Study on Chinese Herbal Compound of supplementing Qi and activating blood circulation to cure CVB₃ viral myocarditis[D]. Liaoning: Liaoning University of Traditional Chinese Medicine,2009: 39-41
- [4] 宋智钢,刘维永.成熟心肌细胞培养技术及其应用进展[J].临床心血管病杂志,2001,17(5):383-384
Song Zhi-gang, Liu Wei-yong. The application progress of immature myocardial cell culture technique [J]. Journal of Clinical Cardiology, 2001,17(5):383-384
- [5] 段海峰,钱嘉磊.心肌细胞分裂和增殖的研究进展[J].细胞生物学杂志,2001,23(3):155-158
Duan Hai-feng, Qian Ling-jia. Progress in research of myocardial cell division and proliferation [J]. Chinese Journal of Coll Biology,2001, 23(3):155-158
- [6] 孙红.体外培养心肌细胞的纯化方法及其应用[J].细胞生物学杂志,1988,10(2):85-87
Sun Hong. Method of purification and its application of cardiomyocytes culture in vitro [J]. Chinese Journal of Cell Biology,1988,10(2):85-87
- [7] 庄欣.林慧娟教授治疗病毒性心肌炎经验例析[J].中医药学刊,2003,21(6):850
Zhuang Xin. Analysis on professor Lin Huijuan's experience in treating viral myocarditis cases [J]. Study Journal of Traditional Chinese Medicine,2003,21(6):850
- [8] 任现志,张建玉,袁斌,等.益气活血法治疗小儿病毒性心肌炎气血瘀证临床观察[J].中国中医药信息杂,2004,11(2):151
Ren Xian-zhi, Zhang Jian-yu, Yuan Bin, et al. Clinical Observation on supplementing Qi and activating blood circulation method in treatment of infantile viral myocarditis with Qi deficiency and blood stasis [J]. Chinese Journal of Information on TCM,2004,11(2):151
- [9] 王建松.黄芪注射液治疗病毒性心肌炎的疗效分析[J].中国实用医药,2011,6(15):176-177
Wang Jian-song. Analysis of therapeutic effect of Huangqi injections on patients with viral myocarditis[J]. China Practical Medicine,2011, 6(15):176-177
- [10] 刘冠男,陈国权.黄芪总黄酮对病毒性心肌炎小鼠心脏血流动力学及心肌细胞钙电流的作用[J].中国心血管杂志,2008,13(6):431-433
Liu Guan-nan, Chen Guo-quan. Effects of total flavonoids of astragalus mongholicus on cardiac hemodynamics and calcium current of ventricular myocytes in BALB/c mouse with viral myocarditis [J]. Chinese Journal of Cardiovascular Medicine,2008,13(6):431-433
- [11] 马春霞.人参的药理作用及临床应用[J].社区医学杂志,2008,6(10):14
Ma Chun-xia. Pharmacological Action and clinical application of Ginseng [J]. Journal of Community Medicine,2008,6(10):14
- [12] 顾坚,黄星原.丹参注射液对病毒性心肌炎小鼠心肌 HSP70 与 SOD 的影响[J].医药导报,2006,25(5):418-420
Gu Jian, Huang Xing-yuan. Effects of Danshen Injection on Expression of HSP70 and SOD in Mice with Viral Myocarditis[J]. Herald of Medicine,2006,25(5):418-420
- [13] 李兰青,张丽娟.麦冬的药理作用[J].河北中医医学报,2000,15(2):34
Li Lan-qing, Zhang Li-juan. Pharmacological Actions of Ophiopogon Root[J]. Journal of Hebei Traditional Chinese Medicine and Pharmacology,2000,15(2):34
- [14] 丁海燕,李阳.小儿病毒性心肌炎心肌线粒体损伤研究进展[J].中华现代儿科学杂志,2006,(5):407-414
Ding Hai-yan, Li Yang. Research progress in injury of myocardial mitochondrion in pediatric viral myocarditis [J]. Journal of Chinese Modern Pediatrics,2006,(5):407-414
- [15] 田亮,张新夷.揭示生命能量之源-ATP 合酶三维结构的同步辐射研究[J].核技术,2003,26(1):2-8
Tian Liang, Zhang Xin-yi. Exploring the source of life energy-A research of synchrotron radiation on ATP synthase [J]. Nuclear Techniques,2003,26(1):2-8
- [16] Paul D. Boyer. ATP synthase-past and future Exploring the source of life energy- A research of synchrotron radiation on ATP synthase[J]. Biochimica et Biophysica Acta,1998, (1365):3-9
- [17] 张欣欣,柳参奎.水稻线粒体 ATP 合成酶小亚基基因的鉴定及解析[J].分子植物育种,2003,1(5/6):605-612
Zhang Xin-xin, Liu Shen-kui. Identification and Characterization of Mitochondrial ATP Synthase Small Subunit Gene in Rice [J]. Molecular Plant Breeding,2003,1(5/6):605-612
- [18] Wu Y N, Liu Y X. Delayed cardioprotection and differentiation of proteins expression induced by ramipril in rats [J]. J Tianjin Med Univ,2004,10(1):5-10
- [19] Kameyama T, Chen Z, Bell SP, et al. Mechanoenergetic alterations during the transition from cardiac hypertrophy to failure in Dahl salt-sensitive rats[J]. Circulation,1998,98:2919-2929
- [20] 王吉村,药立波,赵忠良.筛选差异表达基因和蛋白质的方法进展[J].生物化学与生物物理进展,2001,28(1):33-36
Wang Ji-cun, Yao Li-bo, Zhao Zhong-liang. The Progress of the Methods for Screening Differentially Expressed Genes and Proteins[J]. Progress In Biochemistry and Biophysics,2001,28(1):33-36