短篇论著

文章编号:1000-5404(2011)09-0970-03

心复康口服液对压力超负荷大鼠心肌 ND4 表达的影响

徐淑乐[1],张 刚[1],曹雪滨[1],平 政[1],崔英凯[1],何建成[2],胡元会[3],王士雯[4] (071000 河北 保定,解放军第252医院心血管内科,全军老年心血管病研究诊疗中心[1];201203 上海,上海中医药大学基础医学院中医诊断学教研室[2];100053 北京,中国中医科学院广安门医院心血管内科[3];100853 北京,解放军总医院老年心血管病研究所[4])

【摘要】 **目的** 探讨心复康口服液对压力超负荷心衰大鼠心肌线粒体 ND4 mRNA 和蛋白表达的影响。**方法** 240只雄性 SD 大鼠采用随机数字表法分为3组:假手术组、腹主动脉缩窄模型组(模型组)、心复康口服液治疗组(治疗组)。采用腹主动脉部分缩窄法制作心衰大鼠模型,RT-PCR 和 Western blot 检测分别大鼠第4、8、12周心肌线粒体 ND4 mRNA 和蛋白的表达。**结果** ①术后第8周,与假手术组比较,模型组大鼠 ND4 mRNA 和蛋白表达均显著降低($P<0.01$);与模型组比较,治疗组 ND4 mRNA 表达升高($P<0.01$),ND4 蛋白表达也升高($P<0.05$)。②术后第12周,与8周时比较,模型组大鼠 ND4 mRNA 含量降低($P<0.05$),ND4 蛋白显著降低($P<0.01$);与同期模型组比较,治疗组 ND4 mRNA 和蛋白表达均显著升高($P<0.01$),较8周时也均显著升高($P<0.01$)。**结论** 心复康口服液可上调压力超负荷心衰大鼠心肌线粒体 ND4 mRNA 的表达,提高心肌细胞 ND4 蛋白含量,改善心肌能量生成障碍。

【关键词】 压力超负荷;ND4;心肌能量代谢;心复康口服液

【中图法分类号】 R289.5;R322.1;R329.2 **【文献标志码】** A

充血性心力衰竭(congestive heart failure,CHF,心衰)时心肌工作异常的发生有两种机制:①基因表达异常;②能量代谢异常。调节心脏的能量代谢已经成为心衰治疗的一种新方法。我们既往的工作已证实益气温阳活血化瘀方药心复康口服液在改善心衰大鼠心功能[1]、改善心肌能量代谢产物[2]及心肌能量代谢产物相关调节酶基因和蛋白的表达的同时[3-4],能够显著提高心衰大鼠心肌线粒体呼吸酶复合物活性。还原型尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶亚单位4(NADH dehydrogenase subunit 4,ND4)是线粒体呼吸链复合体Ⅰ的重要组成成分之一,ND4 的缺失可使复合体Ⅰ活性完全丧失、复合体Ⅱ活性丧失50%、复合体Ⅳ的活性降至正常的64%[5]。目前,有关心肌细胞线粒体 ND4 表达改变与呼吸链酶活性的关系研究较少,仅可见到关于缺血心肌线粒体中 ND4 基因表达改变与呼吸链酶活性关系的报道[6]。关于慢性心衰心肌细胞线粒体 ND4 表达改变及其与呼吸链酶活性的关系尚不清楚。本研究拟通过对压力负荷型心衰大鼠心肌细胞线粒体 ND4 表达的检测,明确心复康口服液对 ND4 表达是否有调节作用,并探讨其改善心肌能量代谢的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂

雄性 SD 成年大鼠240只,体质量(200±20)g,由军事医学科学院实验动物中心提供,按随机数字表法分为假手术组、腹主动脉缩窄模型组(模型组)、心复康口服液治疗组(治疗组),每组80只。由于 ND4 蛋白目前研究较少,实验的步骤及检测方法不明确,因此增加了动物例数,以增加实验的重复性,摸索出较成熟的实验条件,进而能顺利完成实验。

心复康口服液(由人参、黄芪、丹参、附子、淫羊藿、灵芝等药物组成)由本院制剂中心制成,每支10 ml,含生药量1.5 g/ml。PCR DNA 凝胶纯化试剂盒、M-MLV 逆转录酶、dNTPmix、TaqDNA 聚合酶、Rnasin、PCR 标准,购自华美生物工程公司;羊抗 ND4 抗体(1∶500)、辣根过氧化物标记的兔抗羊二抗(1∶2 000)购自 Santa Cruz 公司。

1.2 方法

1.2.1 动物模型建立 方法见文献[7],采用10%水合氯醛300 mg/kg 腹腔注射麻醉大鼠,经左脊肋角区入路,暴露左肾动脉起始部上端腹主动脉1 cm,以直径0.7~0.8 mm 的不锈钢探针与腹主动脉一起结扎,抽出探针形成腹主动脉狭窄(50%~60%),缝合切口。同时腹腔内注射青霉素10万U预防感染。模型组用生理盐水灌胃,2 ml/只,每天1次。治疗组手术方法同模型组,用心复康口服液灌胃,3 g/(kg·d),加生理盐水至2 ml 后灌胃。假手术组:腹主动脉下穿线后打一松结,生理盐水灌胃,2 ml/只。假手术组死亡率12.5%,模型组死亡率26.25%,治疗组死亡率21.25%。各组分别于术后喂养4、8、12周,随机取存活大鼠中15只作为研究对象。

1.2.2 RT-PCR 检测心肌线粒体 ND4 mRNA 的表达 采用 Trizol 一步法提取冰冻心肌组织总 RNA,取10 μl 总 RNA 经1%甲醛变性琼脂糖凝胶电泳,检测18S rRNA 和28S rRNA 完整性,取2 μg 总 RNA 进行逆转录反应合成 cDNA,随后进行 PCR 反应。ND4 上游引物5′-ATTGCCCTCATTTCA-3′,下游引物5′-TTAGTATTGTGGCTCCC-3′,产物大小463 bp。β-actin 上游引物5′-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3′,下游引物5′-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC-3′,产物大小540 bp。PCR 产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳,EB 染色后紫外光下观察,条带灰度用 GDS28000 型凝胶成像分析系统(V4.01)进行测定,经

【基金项目】 国家自然科学基金(30873398);全军医学科研"十一五"科技攻关项目(2006MA064);河北省科技攻关课题(06276012D-114)

【通信作者】 曹雪滨,电话:(0312)2058548,E-mail:cxb252@yahoo.com.cn

β-actin 内参照标准化后进行半定量分析。实验重复 3 次。

1.2.3 Western blot 检测心肌线粒体 ND4 蛋白的表达　每泳道加心肌组织线粒体蛋白 20 μg，加入羊抗 ND4 抗体(1∶500)为一抗，辣根过氧化物标记的兔抗羊二抗(1∶2 000)，ECL 显色为二抗，将胶片进行扫描，用 GDS8000 凝胶成像仪分析目标带的分子量和净光密度值，检测蛋白水平的表达，以 β-actin 作为内参照进行定量分析。实验重复 3 次。

1.3 统计学分析

数值用 $\bar{x} \pm s$ 表示，使用 SPSS 10.0 统计软件进行处理，同一时间段各组结果之间的比较用单因素方差分析。各组均值的多重比较采用 FLSD 法，方差不齐时用 Dunnertt ST3 法。

2 结果

2.1 RT-PCR 检测心肌线粒体 ND4 mRNA 的表达

结果见表 1。术后第 4 周，由于造模时间较短，各组大鼠 ND4mRNA 的相对含量均未出现明显变化($P > 0.05$)。第 8 周，模型组较同期假手术组明显降低($P < 0.01$)，较同组 4 周时亦降低($P < 0.05$)，治疗组较模型组显著升高($P < 0.01$)，较 4 周时降低($P < 0.05$)。第 12 周，模型组较第 8 周降低($P < 0.05$)；治疗组比同期模型组显著升高($P < 0.01$)，较 8 周时亦显著升高($P < 0.01$)。

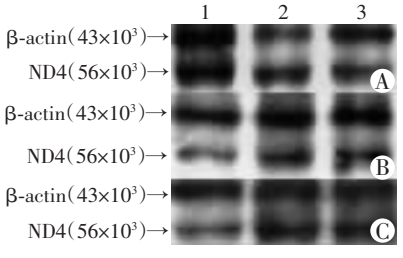
表 1　各组大鼠术后 4、8、12 周 ND4 mRNA 的表达($n = 15$，$\bar{x} \pm s$)

组别	4 周	8 周	12 周
假手术组	15.60 ± 1.40	15.93 ± 0.88	17.23 ± 1.10
模型组	14.94 ± 1.26	8.37 ± 1.36^{ac}	5.63 ± 0.90^{ade}
治疗组	16.02 ± 1.30	13.59 ± 0.92^{bc}	17.49 ± 1.12^{bf}

a：$P < 0.01$，与假手术组比较；b：$P < 0.01$，与模型组比较；c：$P < 0.05$，d：$P < 0.01$，与 4 周比较；e：$P < 0.05$，f：$P < 0.01$，与 8 周比较

2.2 Western blot 检测心肌线粒体 ND4 蛋白的表达

结果见图 1、表 2。术后第 4 周，各组大鼠 ND4 蛋白相对含量未出现明显变化。第 8 周，模型组较同期假手术组明显降低($P < 0.01$)，较 4 周时亦显著降低($P < 0.01$)，治疗组较模型组升高($P < 0.05$)，较 4 周时降低($P < 0.05$)。第 12 周时，模型组与 8 周时相比显著降低($P < 0.01$)，治疗组与模型组相比显著升高($P < 0.01$)，较 8 周时亦显著升高($P < 0.01$)。



A、B、C：分别为术后 4、8、12 周；1～3：分别为模型组、假手术组、治疗组

图 1　Western blot 检测各组大鼠不同时间点心肌细胞 ND4 蛋白表达

表 2　各组大鼠术后 4、8、12 周 ND4 蛋白的表达($n = 15$，$\bar{x} \pm s$)

组别	4 周	8 周	12 周
假手术组	1.87 ± 0.08	1.67 ± 0.34	1.93 ± 0.25
模型组	1.79 ± 0.07	0.60 ± 0.11^{ae}	0.32 ± 0.03^{aef}
治疗组	1.82 ± 0.07	1.34 ± 0.38^{bd}	2.13 ± 0.13^{cf}

a：$P < 0.01$，与假手术组比较；b：$P < 0.05$，c：$P < 0.01$，与模型组比较；d：$P < 0.05$，e：$P < 0.01$，与 4 周比较；f：$P < 0.01$，与 8 周比较

3 讨论

线粒体是提供细胞生命活动能量的主要细胞器，在心脏中占心肌细胞体积的 45%，线粒体通过嵴上含有的电子传递链及氧化磷酸化酶体系(复合物Ⅰ-Ⅴ)为细胞生命活动提供能量。ND4 在线粒体呼吸酶链中有重要作用，其活性的改变对线粒体能量代谢有重要影响。

我们前期的实验研究提示，心复康口服液可保护心肌缺血性损害，改善心功能，具有多方面的药理作用；在国内率先证实具有益气温阳活血化瘀功效的中药对改善心肌能量代谢有明确作用，可能是中药治疗充血性心力衰竭的重要机制之一[8-9]。研究证实：心复康能通过影响能量代谢的不同环节改善心肌细胞能量代谢障碍，可显著改善多种心衰动物模型的血流动力学指标，提高心输出量，有效保护心功能[1,3]；明显提高心肌细胞线粒体 SDH、Ca-ATPase 活性[10]；提高 CHF 大鼠心肌 ATP 含量，稳定线粒体膜电位，降低心肌组织 Pi 含量，有效保护心肌磷酸化过程，改善心肌能量代谢障碍[11]；明显提高压力负荷大鼠的线粒体呼吸酶复合物的活性，保护大鼠心肌细胞线粒体的呼吸功能；上调缺血性心衰大鼠心肌葡萄糖转运因子 GLUT1 基因的表达[7]，增加压力负荷心衰大鼠心肌 GLUT4 蛋白表达，促进心肌组织葡萄糖的摄入、利用[3]；上调心肌链酰基辅酶 A 脱氢酶基因 MCAD mRNA 表达，增强心肌脂肪酸氧化，维持正常心肌能量代谢模式[4]。

本实验结果表明，模型组大鼠 ND4 mRNA 的相对含量较同期假手术组明显降低($P < 0.01$)，心复康组与假手术组比较 ND4 mRNA 的含量显著升高($P < 0.01$)，ND4 蛋白含量升高($P < 0.05$)，表明心衰大鼠心肌线粒体 ND4 mRNA 和 ND4 蛋白含量降低，心复康口服液可上调大鼠心肌线粒体 ND4 mRNA 的表达，增加心衰大鼠心肌线粒体中 ND4 蛋白含量，显著改善心衰大鼠心肌能量生成障碍。研究显示压力负荷心衰大鼠复合物Ⅱ(SDH)、Ⅳ(CCO)的活性显著降低，且随时间的延长呈恶化趋势，心复康治疗组大鼠心肌线粒体呼吸酶复合物活性可明显提高，尤以复合物Ⅱ、Ⅳ的活性提高显著，推测益气温阳活血化瘀方药可能通过增加 ND4 的表达活性来提高线粒体呼吸链酶的活性，进而改善心肌细胞心肌能量代谢。

参考文献：

[1] 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)：680-681.

[2] 胡元会，吴华芹，张百舜，等. 心复康口服液对心梗后心衰大鼠心肌组织 ATP ADP AMP 影响的研究[J]. 辽宁中医杂志，2008，36(8)：1141－1143.
[3] 胡元会，吴华芹，王阶，等. 心复康口服液对心肌梗死后心衰大鼠心功能及心肌葡萄糖转运因子1表达的影响[J]. 上海中医药杂志，2008，42(6)：75－77.
[4] 吴华芹，胡元会，马铁民，等. 心复康口服液对心力衰竭大鼠心功能及心肌中链酰基辅酶A脱氢酶基因表达的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志，2007，5(12)：1205－1207.
[5] Bourges I，Ramus C，Mousson-de-Camaret B，*et al*. Structural organization of mitochondrial human complex I：role of the ND4 and ND5 mitochondria-encoded subunits and interaction with prohibitin[J]. Biochem J，2004，383(Pt 3)：491－499.
[6] Bornstein B，Huertas R，Ochoa P，*et al*. Mitochondrial gene expression and respiratory enzyme activities in cardiac diseases[J]. Biochim Biophys Acta，1998，1406(1)：85－90.
[7] 王艳飞，曹雪滨，徐淑乐，等. 心复康口服液对慢性压力超负荷大鼠心肌能量代谢的影响[J]. 第三军医大学学报，2009，31(18)：1720－1723.
[8] 曹雪滨，李培建，黄河玲，等. 心复康口服液对大鼠实验性心肌缺血的保护作用[J]. 中国药科大学学报，1998，29(增刊)：196－198.
[9] 胡元会，车维新，李新毅，等. 心复康口服液对亚急性阿霉素心肌损伤大鼠心功能及自由基代谢的影响[J]. 中医药研究，1999，15(5)：38－39.
[10] 胡元会，车维新，曹雪滨，等. 心复康口服液对大鼠实验心衰模型心肌细胞 Ca^{2+}-ATPase 及琥珀酸脱氢酶活性的影响[J]. 中国医药学报，2000，15(2)：31－33，48.
[11] 王红英，曹雪滨，徐淑乐，等. 心复康口服液对心衰大鼠线粒体跨膜电位及心肌能量代谢的影响[J]. 第四军医大学学报，2009，30(19)：1875－1878.

（收稿：2010-12-05 修回：2011-02-23）
（编辑　汪勤俭）

短篇论著

文章编号：1000-5404(2011)09-0972-03

AR、MMP-10 和 Bcl-2 在非小细胞肺癌中的表达

刘　源[1]，王淑玲[2]，古兆森[1]　（450052 郑州，郑州大学：第一附属医院中西医结合科[1]，基础医学院病理生理学教研室[2]）

【摘要】 **目的**　探讨 AR、MMP-10 和 Bcl-2 在非小细胞肺癌(NSCLC)中的表达及临床意义。**方法**　用免疫组织化学 S-P 法检测 AR、MMP-10 和 Bcl-2 在 65 例非小细胞肺癌及癌旁正常组织中的表达，并分析与临床病理特征的关系。**结果**　AR、MMP-10 和 Bcl-2 在肺癌中的阳性表达率分别是 29.2%、70.8%、55.4%，显著高于癌旁正常肺组织($P<0.05$)。AR 的表达与临床分期和淋巴结转移有统计学意义($P<0.05$)，MMP-10 的表达与分化程度、临床分期、淋巴结转移有关($P<0.05$)，Bcl-2 在鳞癌中的表达显著高于腺癌($P<0.05$)。**结论**　AR 的阳性表达可能与淋巴结转移和进展相关，与 MMP-10 联合检测更能提示患者的预后。

【关键词】 非小细胞肺癌；AR；MMP-10；Bcl-2
【中图法分类号】 R734.2；R730.2　　**【文献标志码】** A

肺癌是发病率和死亡率增长速度最快的恶性肿瘤，其中近 80% 为非小细胞肺癌。研究证明体内性激素紊乱及其受体的异常表达可能为肺癌的发病机制之一。已经证实雄激素受体(androgen receptor，AR)在肺癌中的表达且其预后可能更差[1]。但是 AR 在肺癌中的生物学行为如何，是否与其他癌基因存在相互作用，目前尚不清楚。本研究采用免疫组化 S-P 法检测 AR、基质金属蛋白酶-10(matrix metalloproteinase-10，MMP-10)和 Bcl-2(b-cell leukemia/lymphoma-2)在肺鳞癌和腺癌的表达，并分析其与临床病理特征的关系，以期为临床治疗及预后提出指导意义。

1　资料与方法

1.1　材料

选用 2007－2009 年郑州大学第一附属医院中西医结合科住院经病理诊断为非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer，NSCLC)的存档标本 65 例，男性 42 例、女性 23 例；年龄 32～76 岁，平均 56.3 岁；组织学类型：鳞癌 40 例，腺癌 25 例；分化程度：低分化 20 例，中分化 27 例，高分化 18 例；临床 TNM 分期按照 2002 年国际抗癌联盟(UICC)标准：Ⅰ期 8 例、Ⅱ期 20 例、Ⅲ期 27 例、Ⅳ期 10 例；无淋巴结转移 20 例，有淋巴结转移 45 例；所有病例为初治病例，未经放疗及化疗。正常组织取自肿瘤远端 5 cm 以外并经病理诊断未发现癌细胞者。

1.2　方法

所有标本经 10% 甲醛溶液固定，常规石蜡包埋，4 μm 连续切片。鼠抗人 MMP-10 单克隆抗体、鼠抗人 Bcl-2 单克隆抗体购自福州迈新生物技术公司，AR(克隆系：AR27)检测试剂盒及 SP 试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。用已知阳性切片做阳性对照，用 PBS 代替一抗做阴性对照。操作步骤严格按照说明书进行。

1.3　结果判定

AR、MMP-10 及 Bcl-2 以细胞核或细胞质出现黄色颗粒为阳性，每例标本随机选取 10 个高倍镜视野，计数 300 个细胞，

【基金项目】 河南省杰出青年科学基金(04120001000)
【通信作者】 王淑玲，E-mail：wsl651127@163.com