

◆方药研究◆

参芪养心汤对心力衰竭大鼠心功能的保护作用及相关机制研究

胡宁¹, 徐长福²

1. 浙江中医药大学附属宁波中医院, 浙江 宁波 315000

2. 浙江省立同德医院, 浙江 杭州 310012

[摘要] 目的: 研究参芪养心汤对心力衰竭大鼠心功能的保护作用及相关机制。方法: 将 40 只雄性 SD 大鼠随机分为四组: 假手术组, 心衰模型组, 参芪养心汤低剂量组, 参芪养心汤高剂量组。通过腹主动脉缩窄法制作慢性心力衰竭模型, 给予不同剂量的参芪养心汤干预, 通过检测血清脑钠肽 (BNP) 及血流动力学变化评估心功能, 免疫组化法观察心肌组织病理学改变, TUNEL 法检测心肌细胞凋亡, Western blotting 检测凋亡相关蛋白 Bcl-2 及 Bax 的表达。结果: 与假手术组比较, 心衰模型组大鼠 BNP 水平升高, 大鼠左室收缩压 (LVSP)、左室内压最大上升速率 (+dP/dt_{max}) 和左室内压最大下降速率 (-dP/dt_{max}) 均显著降低, 左室舒张末压 (LVEDP) 升高, 心肌细胞凋亡量数量显著增加, 促凋亡蛋白 Bax 表达量增加, 抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 说明心衰模型造模成功。与心衰模型组比较, 参芪养心汤低剂量组和高剂量组大鼠 BNP 水平均显著降低, LVSP、+dP/dt_{max} 和 -dP/dt_{max} 均显著升高, LVEDP 均降低, 大鼠心肌细胞凋亡数量显著减少, Bax 表达下降, Bcl-2 表达回升, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与假手术组比较, 参芪养心汤低剂量组和高剂量组大鼠 BNP 水平均仍较高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: 参芪养心汤能改善心力衰竭大鼠心功能, 抑制心肌细胞凋亡。

[关键词] 慢性心力衰竭; 参芪养心汤; 心肌凋亡; 血清脑钠肽 (BNP); 血流动力学; 动物实验; 大鼠

[中图分类号] R285.5 [文献标志码] A [文章编号] 0256-7415 (2017) 03-0001-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2017.03.001

Protective Effect and Mechanism of Shenqi Yangxin Tang for Heart Failure Rats

HU Ning, XU Changfu

Abstract: Objective: To study protective effect and related mechanism of Shenqi Yangxin tang for heart failure rats. Methods: Selected 40 male SD rats and divided them into four groups: sham operation group, heart failure model group, low dose Shenqi Yangxin tang group and high dose Shenqi Yangxin tang group. Establishing chronic heart failure model with abdominal aortic banding method, and giving Shenqi Yangxin tang intervention of different doses. Evaluated cardiac function by detecting change of serum brain natriuretic peptide (BNP) and hemodynamics, observed change of histopathology of myocardium with immunohistochemistry, detected cardiomyocyte apoptosis with terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling assay (TUNEL), and apoptosis-related proteins Bcl-2 and Bax with Western blotting. Results: Comparing with sham operation group, BNP levels of heart failure model group were increased, left ventricular systolic pressure (LVSP), maximal ascending rate of internal pressure of left ventricle (+dP/dt_{max}), and maximum descending rate of internal pressure of left ventricle (-dP/dt_{max}) of rats were all decreased significantly, left ventricular end diastolic pressure (LVEDP) was increased, the number of myocardial apoptosis was increased significantly, expression of pro-apoptotic protein Bax was increased, and the expression of anti-apoptotic protein Bcl-2 was decreased, the difference being significant ($P < 0.05$), which suggested the successful modeling of heart failure model. Compared with heart failure model group, BNP levels of the low dose and high dose Shenqi Yangxin tang group were decreased significantly, LVSP, +dP/dt_{max} and -dP/dt_{max} were all increased, LVEDP levels were both decreased, the number of myocardial apoptosis of rats was

[收稿日期] 2016-09-27

[基金项目] 浙江省自然科学基金青年项目 (LQ14H270002)

[作者简介] 胡宁 (1982-), 女, 主治医师, 研究方向: 中西医结合心血管内科。

decreased significantly, expression of Bax was decreased, expression of Bcl-2 was returned, differences being significant ($P < 0.05$). Comparing with sham operation group, BNP levels of the low dose and high dose Shenqi Yangxin tang group were still high, differences being significant ($P < 0.05$). Conclusion: Shenqi Yangxin tang can improve cardiac function and inhibit cardiomyocyte apoptosis of rats with heart failure.

Keywords: Chronic heart failure; Shenqi Yangxin tang; Myocardial apoptosis; Serum brain natriuretic peptide (BNP); hemodynamics; Animal experiment; Rats

慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF)是心血管内科的常见疾病,是多数心脏疾病发展的终末阶段,严重影响患者生活质量^[1]。目前心力衰竭治疗的药物主要有血管紧张素转换酶抑制剂/血管紧张素 II 受体拮抗剂、 β 受体阻滞剂、醛固酮受体拮抗剂、利尿剂、血管扩张剂、洋地黄制剂^[2]。尽管 CHF 治疗药物繁多,但临床患者因 CHF 死亡人数始终居高不下,目前中西医结合治疗 CHF 已越来越得到重视。参芪养心汤由黄芪、生晒参、川芎、冰片、槐花、丹参、人工麝香、水蛭、人工牛黄组方而成,具益气养阴、活血行水的功效。本研究通过腹主动脉缩窄法(coarctation of abdominal aorta, CAA)建立心力衰竭大鼠模型,予不同剂量参芪养心汤干预,观察其对大鼠心功能的保护作用及其抗心肌细胞凋亡作用,探讨参芪养心汤治疗心力衰竭的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组与处理 清洁级雄性 SD 大鼠 40 只,体重 220~240 g,浙江中医药大学动物中心提供,动物许可证号: X1302614。常规饲料饲养,自由饮水,饲养环境温度(21 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,湿度(55 ± 2)%。动物实验通过动物伦理委员会的审批。随机选取 10 只雄性 SD 大鼠为假手术组,30 只腹主动脉缩窄大鼠随机分为模型组、参芪养心低剂量组、参芪养心汤高剂量组,每组 10 只。各组 SD 大鼠术后 6 周开始给药,参芪养心汤低剂量组和高剂量组:分别灌胃参芪养心汤 4 mL/kg 和 8 mL/kg。假手术组及心力衰竭模型组以等体积蒸馏水灌胃。持续治疗 6 周后进行各指标检测。

1.2 实验试剂 GAPDH、Bcl-2、Bax 抗体购自美国 CST 公司(批号: 20150212, 20150309, 20141203);参芪养心汤:炙黄芪、生晒参、丹参各 30 g,川芎、槐花、水蛭各 10 g,人工牛黄 6 g,冰片 2 g,人工麝香 1 g,由宁波市中医院煎药室电子煎药机常规煎药,每次浓煎成 150 mL,即生药浓度 1.267 g/mL;TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒购自美国罗氏公司,批号: 20140924;鼠脑钠肽(BNP)检测试剂盒,南京建成科技有限公司,批号: 20141123。

1.3 动物模型制备 参考文献[3],SD 大鼠备皮,10%水合氯醛 3 mL/kg 腹腔麻醉,在大鼠剑突下正中切口,打开腹腔,钝性分离腹主动脉于肾动脉分支以上部分,7 号注射器针头平置于腹主动脉上,4 号手术线将针头和腹主动脉一起结扎,缓

慢撤出针头,使腹主动脉截面积缩窄为原来的 50%~60%,分层缝合后关闭腹腔。假手术组将注射器针头平置于腹主动脉上,不结扎,后撤出针头,其他与模型组相同,术后 3 天使用普通青霉素预防切口感染。

1.4 血清 BNP 水平测定 大鼠造模后 6 周和 12 周取静脉血 2 mL,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 15 min,2 500 r/min 离心 15 min,取上部血清,保存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中,用 ELISA 法测定 BNP 浓度。

1.5 血流动力学检测 大鼠用 20%乌拉坦腹腔麻醉,固定后,颈部正中偏右切开颈部皮肤 1.5~2 cm,钝性分离右侧颈总动脉,结扎远心端,近端活结备用,将动脉切一小口,插入 1 mm 聚乙烯导管,导管内预先充满肝素盐水。利用 ALCB10 MPA2000 系统(上海奥尔科技生物科技有限公司)测量大鼠左心室收缩压(left ventricular systolic pressure, LVSP)、左心室舒张末压(left ventricular end-diastolic pressure, LVEDP)、左心室压力上升/下降最大速率(maximum rate of rise/decrease of LVSP, $\pm dp/dt_{\max}$)。

1.6 HE 染色观察心肌组织病理学改变 10%福尔马林固定大鼠左心室心肌组织,梯度酒精溶液脱水并透明后石蜡包埋,切片。展片,捞片,60 $^{\circ}\text{C}$ 烤片,二甲苯脱蜡后予苏木精-伊红(HematoxylinEosin, HE)染色,光学显微镜下观察各组大鼠心肌组织病理形态学改变。

1.7 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒测定心肌细胞凋亡 取大鼠心脏,冰 PBS 缓冲液冲洗,取左心室心尖部组织,固定、脱水、包埋、切片,根据 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒说明书操作,计算凋亡心肌细胞数量。

1.8 凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bax 的表达检测 取少许左心室心肌组织,加入液氮后研钵中研磨,加入含 PMSF 的 RIPA 裂解液,冰上裂解 30 min,10 min 震荡一次,13 000 r/min 离心 10 min,取上清液,BCA 法蛋白定量。加入 5 \times loading buffer 上样缓冲液并煮沸 5 min。上样 50 μg 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,后转印至 PVDF 膜上进行转膜,5%脱脂牛奶封闭 2 h,分别孵育 GAPDH、Bcl-2、Bax 抗体过夜。TBS-T 洗 3 次,每次 10 min,加入辣根过氧化物酶标记二抗孵育 1 h,ECL 法显影,富士 LAS-4000 曝光机上曝光显像。

1.9 统计学方法 采用 SPSS22.0 软件进行统计分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,组间两两比较采用单因素方差分析,配对

分析采用 T 检验。

2 结果

2.1 各组大鼠血清 BNP 水平变化比较 见表 1。治疗前,与假手术组比较,心衰模型组大鼠 BNP 水平显著较高,差异有统计学意义($P < 0.05$),说明心衰模型造模成功。治疗 6 周后,与心衰模型组比较,参芪养心汤低剂量组和高剂量组大鼠 BNP 水平均显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与假手术组比较,参芪养心汤低剂量组和高剂量组大鼠 BNP 水平均仍较高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠血清 BNP 水平变化比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	BNP(pg/mL)	
	治疗前	治疗后
假手术组	104.2± 14.04	92.8± 13.19
心衰模型组	552.8± 96.78 ^①	534.0± 92.29
参芪养心汤低剂量组	548.0± 107.17	397.0± 101.11 ^{②③}
参芪养心汤高剂量组	553.5± 101.55	341.0± 74.01 ^{②③}

与假手术组治疗前比较,① $P < 0.05$;与心衰模型组治疗后比较,② $P < 0.05$;与假手术组治疗后比较,③ $P < 0.05$

2.2 各组大鼠血流动力学相关指标变化比较 见表 2。与假手术组比较,心衰模型组 LVSP、+dP/dt_{max}、-dP/dt_{max} 均显著

降低,LVEDP 升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$),说明心衰模型组大鼠心脏收缩及舒张功能均明显下降。与心衰模型组比较,参芪养心汤低剂量和高剂量组 LVSP、+dP/dt_{max}、-dP/dt_{max} 均显著升高,而 LVEDP 均降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠血流动力学相关指标变化比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	LVSP(mmHg)	LVEDP(mmHg)	+dp/dt _{max} (mmHg/S)	-dp/dt _{max} (mmHg/S)
假手术组	199.1± 18.16	2.12± 0.73	22 256.8± 2752.67	16 499.7± 2 293.45
心衰模型组	146.1± 15.18 ^①	7.65± 0.88 ^②	13 331.2± 1 011.56 ^③	8 014.5± 846.07 ^③
参芪养心汤低剂量组	160.8± 18.41 ^②	6.22± 0.57 ^②	15 311.4± 1 697.54 ^②	9 840.4± 1 205.38 ^②
参芪养心汤高剂量组	173.9± 17.54 ^②	5.4± 0.41 ^②	17 516.0± 2 171.02 ^②	11 619.1± 1 068.38 ^②

与假手术组比较,① $P < 0.05$;与心衰模型组比较,② $P < 0.05$

2.3 各组大鼠心肌组织病理形态学观察 见图 1。HE 染色显示假手术组心肌细胞形态纤长,排列规则,胞核清晰,未见胞体水肿,无纤维组织增生;心衰模型组心肌细胞形态不一,部分水肿,排列不规则,细胞间隙增大,部分伴炎症细胞浸润,细胞间心肌纤维增生;参芪养心汤低剂量和高剂量组病理形态均有不同程度改善。

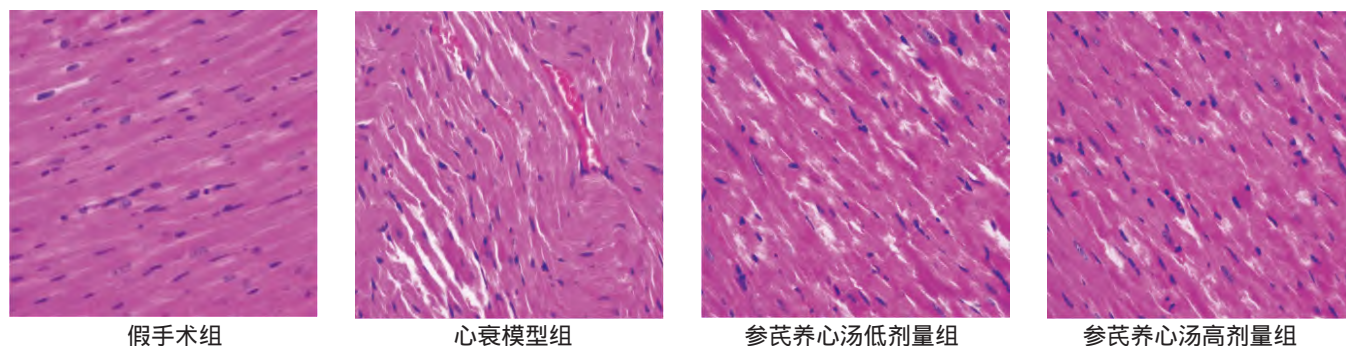


图 1 各组大鼠心肌组织病理形态学图片 ($\times 200$)

2.4 各组大鼠心肌细胞凋亡数量比较 见表 3 和图 2。与假手术组比较,心衰模型组大鼠心肌细胞凋亡量数量显著增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与心衰模型组比较,参芪养心汤低剂量和高剂量组大鼠心肌细胞凋亡数量显著减少,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表 3 各组大鼠心肌细胞凋亡数量比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	心肌细胞凋亡数量
假手术组	115.50± 21.15
心衰模型组	246.17± 13.66 ^①
参芪养心汤低剂量组	225.17± 8.75 ^②
参芪养心汤高剂量组	191.17± 11.80 ^②

与假手术组比较,① $P < 0.05$;与心衰模型组比较,② $P < 0.05$

2.5 各组大鼠心肌组织凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 的表达比较 见表 4。与假手术组比较,心衰模型组大鼠的促凋亡蛋白 Bax 表达量增加,抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$),凋亡水平升高。与心衰模型组比较,参芪养心汤低剂量和高剂量组 Bax 表达下降,Bcl-2 表达回升,差异均有统计学意义($P < 0.05$),凋亡被抑制。

3 讨论

CHF 是各种心脏疾病导致心脏结构或功能异常,心脏泵血或充盈能力下降,不能保证机体代谢需求而导致的临床综合征。除正规的西医药物及器械治疗外,中医药在 CHF 中的应用已越来越得到大家的认同,李立新等研究发现在 CHF 标准用药治疗基础上加用芪苈强心胶囊,进一步降低了 CHF 患者血浆氨基末端脑钠肽前体(NT-proBNP)水平,相关研究发表在

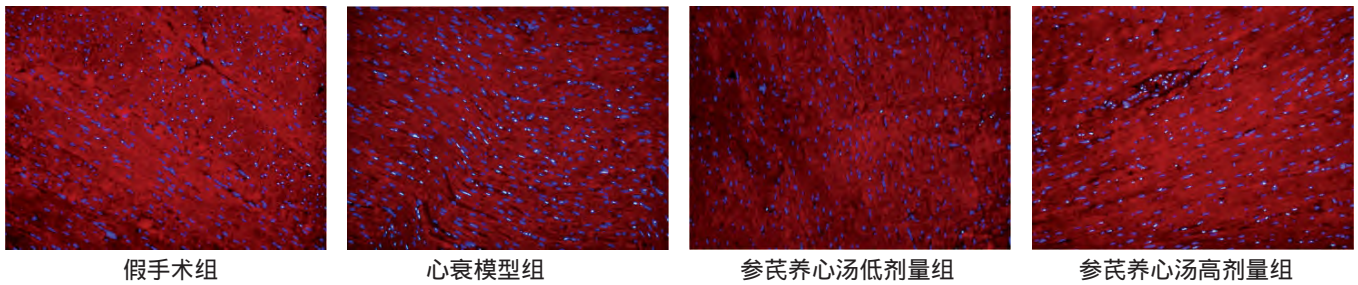


图2 各组大鼠心肌细胞凋亡图片(×200)

表4 各组大鼠心肌组织凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 的表达比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	Bcl-2	GAPDH	Bcl-2/GAPDH	Bax	GAPDH	Bax/GAPDH
假手术组	3.338±254.45	3.672±313.77	0.91	1.449±133.29	8.410±811.60	0.17
心衰模型组	1.132±92.44 ^①	4.063±398.71	0.28 ^①	3.935±311.99 ^①	7.826±711.38	0.50 ^①
低剂量组	1.816±155.32 ^②	4.028±312.60	0.45 ^②	1.882±178.82 ^②	7.534±715.62	0.25 ^②
高剂量组	3.080±284.91 ^②	3.983±376.22	0.77 ^②	1.574±144.88 ^②	7.555±745.56	0.21 ^②

与假手术组比较, ① $P < 0.05$; 与心衰模型组比较, ② $P < 0.05$

《美国心脏病学会杂志》上, 说明中西医结合治疗 CHF 已经开始得到国际社会的认可^[4]。

CHF 以水肿咳嗽常见, 归属于中医学心悸、胸痹、喘证等范畴, 病因病机多为气虚阳微、血滞水停, 病位以心为主, 并涉及肺、肾、脾、肝等其他脏腑, 证属本虚标实。本研究中的参芪养心汤, 方由黄芪、生晒参、川芎、冰片、槐花、丹参、人工麝香、水蛭、人工牛黄而成, 具益气养阴、活血行水的功效。通过腹主动脉缩窄法建立 CHF 模型, 用不同剂量参芪养心汤干预, 参芪养心汤低剂量组和高剂量组均显著降低心力衰竭大鼠 BNP 及 LVEDP 水平, 升高 LVSP、+dP/dt_{max} 和 -dP/dt_{max}, 说明参芪养心汤能改善心衰模型组大鼠心脏收缩及舒张功能, 高剂量组尤其明显。

CHF 发病机制复杂, 心肌细胞肥大、凋亡、坏死、间质纤维化导致心室重塑是心力衰竭发展过程中的重要步骤。因此, 在心力衰竭过程中抑制心肌细胞凋亡能缓解心肌细胞的减少, 延缓心力衰竭过程。心肌细胞凋亡受到多因素和多基因的调控, 其中 Bcl-2 家族是第一个发现参与调控细胞凋亡的基因家族, 其主要由促凋亡蛋白(如 Bak、Bad、Bax 等)和抗凋亡蛋白(如 Bcl-2、Bcl-W、Bcl-xL 等)组成^[5]。目前研究较多的是 Bcl-2 和 Bax 基因, Bcl-2 具有抑制心肌细胞凋亡的作用, Bax 具有促进心肌细胞凋亡的作用, 两者常作为评估心肌

细胞凋亡的重要指标^[6]。免疫蛋白印迹结果提示心衰模型组心肌组织 Bcl-2 表达下降, Bax 表达升高, 参芪养心汤组 Bcl-2 表达回升, Bax 表达下降, 所以参芪养心汤改善心衰大鼠心功能可能与其抑制心肌细胞凋亡相关。

【参考文献】

- [1] Pasini E, Aquilani R, Testa C, et al. Pathogenic Gut Flora in Patients With Chronic Heart Failure [J]. JACC Heart Fail, 2016, 4(3): 220-227.
- [2] Francis GS, Cogswell R, Thenappan T. Reply: applying cluster analysis to data of previously published chronic heart failure trials [J]. J Am Coll Cardiol, 2015, 65(12): 1270.
- [3] Li R, Zhang Q, Yi QJ. Effect of carvedilol and Radix astragali on ryanodine receptor in heart failure in mice [J]. Zhonghua Er Ke Za Zhi, 2011, 49(6): 433-438.
- [4] Li X, Zhang J, Huang J, et al. A multicenter, randomized, double-blind, parallel-group, placebo-controlled study of the effects of qili qiangxin capsules in patients with chronic heart failure [J]. J Am Coll Cardiol, 2015, 62(12): 1065-1072.
- [5] 张旭, 金娟, 刘莉. 心力衰竭与细胞凋亡研究进展 [J]. 中西医结合心脑血管杂志, 2015, 13(3): 315-317.
- [6] Kumar P, Coltas IK, Kumar B, et al. Bcl-2 protects endothelial cells against gamma-radiation via a Raf-MEK-ERK-survivin signaling pathway that is independent of cytochrome c release [J]. Cancer Res, 2007, 67(3): 1193-1202.

(责任编辑: 冯天保, 郑锋玲)