

# 温阳活血方对慢性心力衰竭大鼠心室重构的影响

王健, 范世珍

广州中医药大学深圳医院, 广东 深圳 518034

**[摘要]** 目的: 探讨温阳活血方对慢性心力衰竭(Chronic heart failure, CHF)大鼠心室重构的影响。方法: 用肾上腺腹主动脉缩窄法制备CHF模型。雄性Wistar大鼠30只随机分为假手术组、模型组、温阳活血方组, 每组10只。观察各组大鼠左心室重量指数(Left ventricular mass index, LVMI)、胶原容积分数(Collagen volume fraction, CVF), 免疫组化法测定各组大鼠左心室心肌结缔组织生长因子(Connective tissue growth factor, CTGF)、转化生长因子(Transforming growth factor- $\beta_1$ , TGF- $\beta_1$ ) mRNA表达水平。结果: 与假手术组比较, 模型组LVMI、CVF明显升高( $P < 0.05$ ), 左心室心肌CTGF、TGF- $\beta_1$  mRNA表达明显升高( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 温阳活血方组LVMI、CVF明显下降( $P < 0.05$ ), 左心室心肌CTGF、TGF- $\beta_1$  mRNA表达明显下降( $P < 0.01$ )。结论: 温阳活血方通过影响信号通路中CTGF、TGF- $\beta_1$  mRNA的表达来改善心衰大鼠心肌纤维化(Myocardial fibrosis, MF)程度。

**[关键词]** 慢性心力衰竭(CHF); 温阳活血方; 心室重构; 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 (2019) 06-0005-03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2019.06.002

## Yang-warming and Blood-promoting Prescription Has Effect on Ventricular Remodeling in Rats with Chronic Heart Failure

WANG Jian, FAN Shizhen

**Abstract:** **Objective:** To discuss the effect of yang-warming and blood-promoting prescription on ventricular remodeling in rats with chronic heart failure(CHF). **Methods:** Prepared the CHF model by suprarenal abdominal aortic coarctation method. Divided 30 cases of male Wistar rats randomly into the sham operation group, the model group and the group of yang-warming and blood-promoting prescription, 10 rats in each group. Observed the left ventricular mass index (LVMI) and collagen volume fraction (CVF) of rats in each group, and detected the left ventricular myocardial connective tissue growth factor (CTGF) and the expression level of transforming growth factor- $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ ) mRNA by immunohistochemistry. **Results:** Compared with that in the sham operation group, the LVMI and CVF in the model group were significantly increased( $P < 0.05$ ); the expressions of CTGF and TGF- $\beta_1$  mRNA in the left ventricle were significantly increased( $P < 0.01$ ). Compared with that in the model group, the LVMI and CVF in the group of yang-warming and blood-promoting prescription were decreased evidently( $P < 0.05$ ); and the CTGF and the expression of TGF- $\beta_1$  mRNA in left ventricle myocardium were obviously decreased( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** The application of yang-warming and blood-promoting prescription can improve the degree of myocardial fibrosis (MF) in rats with heart failure by affecting the CTGF and the expression of TGF- $\beta_1$  mRNA in the signaling pathway.

**Keywords:** Chronic heart failure(CHF); Yang-warming and blood-promoting prescription; Ventricular remodeling; Animal experiment; Rats

心室重构是慢性心力衰竭(Chronic heart failure, CHF)的基本发病机制, 心肌纤维化(Myocardial fibrosis, MF)是多种心脏疾病发展到一定阶段的共同病理改变, 是心肌重构的主要表现之一<sup>[1]</sup>。近年来发现某些细胞因子与MF关系密切, 被认为是

各种促MF因素作用的最后共同环节。转化生长因子- $\beta$  (Transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )、结缔组织生长因子(Connective tissue growth factor, CTGF)在MF发生、发展过程中有促进肌成纤维细胞的转化、胶原基因表达、细胞外基质合

**[收稿日期]** 2018-11-12

**[基金项目]** 2012 深圳市科技计划项目 (201203189)

**[作者简介]** 王健 (1966-), 女, 主任中医师, 研究方向: 中医内科。

成与沉积的作用,是最重要的促MF细胞因子之一<sup>[2]</sup>。本研究旨在探讨温阳活血方对CHF大鼠心肌组织TGF- $\beta_1$ 、CTGF的影响,为MF的防治提供新的理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 清洁级雄性Wistar大鼠30只,体质量200~220g,由广州中医药大学实验动物中心提供,合格证号:粤监证字2012C066,各组大鼠在相同环境中分组分笼喂养,于室温20~24℃,湿度40%左右的普通级环境中饲养,实验期间各组大鼠自由进食和饮水。

**1.2 实验药物** 温阳活血方(各药物生粉量为:桂枝、茯苓各0.5g,制附子0.7g,红参1.2g,黄芪、赤芍各2g,三七末、丹参各1.5g,郁金、葶苈子各1g)由三九医药公司提供中药免煎剂各1包,用开水冲至100mL。

**1.3 试剂与仪器** 兔抗大鼠TGF- $\beta_1$ 抗体购自武汉博士德生物工程公司,兔抗大鼠CTGF多克隆抗体、SP免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥生物公司。Biosens Digital Imaging System医学图像分析系统,北航医学图像分析管理系统。

**1.4 模型制备及动物分组** 30只大鼠随机分为3组,假手术组、模型组、温阳活血方组,每组10只。参考文献<sup>[3]</sup>建立大鼠CHF模型:用3%戊巴比妥钠1.5mL/kg腹腔注射麻醉,腹部正中剑突下切开皮肤2~3cm,打开腹腔,在左肾动脉上方分离腹主动脉,穿过一条0号丝线,将去尖磨钝的7号手术针置于丝线处,结扎丝线,迅速抽取手术针,检查腹主动脉通畅后分层关腹。术后均给予连续3天腹腔青霉素20万U注射。常规喂养4周后,大鼠逐渐出现呼吸、心跳加快、倦怠无力、食欲减退等表现。检测血流动力学参数:以左心室舒张末压(Left ventricular terminal diastolic pressure, LVEDP) $\geq 15$  mmHg(1 mmHg=0.133 kPa)作为模型成功标准;假手术组只分离腹主动脉而不结扎。成功建立模型后,温阳活血方组给予温阳活血方8 mL/(kg·d)灌胃<sup>[4]</sup>,模型组和假手术组给予等量生理盐水灌胃,连续4周。

**1.5 各指标检测** ①左心室重量指数(Left ventricular mass index, LVMI):处死大鼠后,迅速开胸取出心脏,用0.9%氯化钠清洗,滤纸吸干,称重;沿房室环剪去心房及右室游离壁,称重,余下的左室游离壁和室间隔测定左室质量,左室质量与体质量的比值为LVMI。②Masson染色和胶原容积分数(Collagen volume fraction, CVF)检测:每只大鼠选取左室中段横截面心肌,3张组织切片进行Masson染色,用Biosens Digital Imaging System医学图像分析系统分析,每组大鼠心肌病理切片中随机选取10个视野( $\times 400$ )测量选定区域染色组织的面积(胶原染色呈红色),计算胶原面积与心肌组织总面积的比值,取其均值为CVF。③免疫组化测定心肌CTGF、TGF- $\beta_1$ 蛋白表达:切片常规脱蜡、脱水,3% $H_2O_2$ 封闭内源性过氧化物酶,微波修复抗原,10%正常兔血清封闭;滴加第一抗体CTGF工作液浓度为1:150;TGF- $\beta_1$ 的工作液浓度为1:100,4℃

过夜;滴加1:1稀释的生物素化兔抗羊IgG,37℃孵育20min;滴加1:1稀释的辣根酶标记链霉卵白素三抗工作液,37℃孵育20min;DAB显色,苏木素复染,盐酸分色,脱水,封片。免疫组织化学图像分析经标准灰度校正后,随机取5个视野( $\times 200$ ),测定阳性细胞的吸光度和面积,以两者的乘积表示组织中该抗原的相对含量。随机选取每张切片至少5个视野,以细胞质内有棕黄色颗粒为阳性区域并计算积分光密度值。

**1.6 统计学方法** 采用SPSS18.0统计软件处理数据,所有数据以( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组大鼠LVMI、CVF检测结果比较** 见表1。与假手术组比较,模型组LVMI、CVF明显升高( $P < 0.05$ );与模型组比较,温阳活血方组LVMI、CVF明显降低( $P < 0.05$ )。

表1 各组大鼠LVMI、CVF检测结果比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数	LVMI(mg/g)	CVF(%)
假手术组	10	2.07 $\pm$ 0.36	12.11 $\pm$ 2.02
模型组	10	2.89 $\pm$ 0.79 <sup>①</sup>	27.09 $\pm$ 7.12 <sup>①</sup>
温阳活血方组	10	2.46 $\pm$ 0.23 <sup>②</sup>	16.83 $\pm$ 2.79 <sup>②</sup>

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

**2.2 各组大鼠CTGF、TGF- $\beta_1$ 表达结果比较** 见图1、表2。光镜下观察CTGF、TGF- $\beta_1$ 表达,其阳性产物主要位于心肌细胞质,假手术组未见明显阳性反应,模型组可见大量棕黄色颗粒呈强阳性反应,温阳活血方组棕黄色颗粒表达明显减少。与假手术组比较,模型组大鼠心肌血管周围平滑肌CTGF、TGF- $\beta_1$ 表达增强( $P < 0.01$ ),在其心肌间质亦有表达;与模型组比较,温阳活血方组大鼠心肌CTGF、TGF- $\beta_1$ 表达减弱( $P < 0.01$ )。

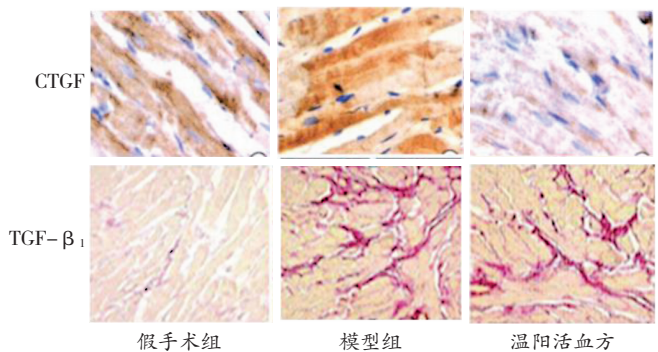


图1 各组大鼠CTGF、TGF- $\beta_1$ 表达结果比较( $\times 200$ )

表2 各组大鼠CTGF、TGF- $\beta_1$ 表达结果比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数	CTGF	TGF- $\beta_1$
假手术组	10	108.07 $\pm$ 8.30	93.13 $\pm$ 11.02
模型组	10	135.35 $\pm$ 6.79 <sup>①</sup>	161.19 $\pm$ 14.12 <sup>①</sup>
温阳活血方组	10	114.16 $\pm$ 6.63 <sup>②</sup>	133.73 $\pm$ 5.89 <sup>②</sup>

与假手术组比较,① $P < 0.01$ ;与模型组比较,② $P < 0.01$

### 3 讨论

当心肌中胶原合成与降解的动态平衡被打破,胶原的产生增多或降解下降,均可使胶原过多沉积导致MF。MF包括心肌间质胶原沉积和间质纤维化,以心肌间质胶原纤维浓度显著升高或CVF显著增高为特征<sup>[5]</sup>。本实验与假手术组比较,模型组LVMI、CVF浓度增加,说明模型组出现心肌肥厚。用温阳活血方治疗后,LVMI、CVF浓度减少,说明温阳活血方有改善心肌肥厚的作用。

机体损伤和纤维化发生时,CTGF高表达并作为TGF- $\beta$ 的下游介质介导细胞外基质的生成。CTGF在心脏成纤维细胞和心肌细胞的表达是由TGF- $\beta$ 特异性诱导的<sup>[6]</sup>。CTGF是MF的重要生物学标记和将来减轻MF的重要靶点。CTGF启动子包含TGF- $\beta_1$ 的一个反应元件,提示CTGF是TGF- $\beta_1$ 的下游效应因子,CTGF介导TGF- $\beta_1$ 诱导成纤维细胞的胶原合成。在心脏成纤维细胞和心肌细胞中,TGF- $\beta_1$ 诱导其表达CTGF<sup>[7]</sup>。Koitabashi NC等<sup>[8]</sup>研究证实,人心肌组织CTGF染色阳性的面积与MF的程度有关。心肌细胞尤其是肥大的心肌细胞可表达并分泌TGF- $\beta_1$ ,体外研究直接以不同浓度的TGF- $\beta_1$ 刺激心肌细胞,发现细胞发生肥大性改变,并呈剂量依赖性<sup>[9]</sup>;在正常人体心肌组织中TGF- $\beta_1$ 仅有少量表达,而在左、右心室肥厚的心肌组织中TGF- $\beta_1$ 表达均明显增加,并与心室肥厚呈显著正相关。在心血管疾病发病中TGF- $\beta$ /Smads信号通路发挥了重要作用<sup>[10]</sup>。心肌细胞和心肌成纤维细胞中可见到TGF- $\beta_1$ 上调,且贯穿于心肌细胞的生长和纤维化进程中<sup>[11]</sup>。MF是一个复杂的病理过程,CTGF和TGF- $\beta$ 是重要的促纤维化因子,在MF病变部位两者表达明显增加。病理性TGF- $\beta$ 及其信号传导通路在心力衰竭的发生发展中起着关键作用,目前对抗CHF的治疗药物能通过TGF- $\beta$ 及其信号通路发挥作用。

本实验结果说明CTGF、TGF- $\beta_1$ 在MF和心室重构进程中发挥重要作用。中医研究认为CHF属本虚标实,虚实夹杂之证,以心之阳气虚衰为本,血脉瘀滞、水饮内停、痰浊不化为标。心阳亏虚是其病理基础,血脉瘀滞为其病理中心环节,临床证实温阳活血方对CHF患者有明显疗效。红参、三七可益气活血、化瘀而不耗气伤血,两者共为君药;丹参、赤芍为臣药可活血;黄芪、桂枝为佐使药能辛温通阳、疏通脉络,并兼引诸药归于心经之力,制附子温阳宣肺利水,活血化痰通痹,桂枝、葶苈子、茯苓能增加冠状动脉血流,增强心肌收缩力,减慢心率,增加心输出量,故该方有益气活血、通脉止痛的功效。研究表明,方剂中单味药有促进冠状动脉血管生成及改善心衰后心脏功能、降压、调脂、改善血流动力学和内皮细胞的功能<sup>[12-13]</sup>,可显著抑制MF<sup>[14-15]</sup>。本实验结果说明温阳活血中药能抑制心肌肥厚,其减轻MF、改善心脏功能,可能与其抑制心肌组织CTGF、TGF- $\beta_1$  mRNA的过度表达有关。

### [参考文献]

- [1] 张海啸,史载祥. 转化生长因子- $\beta$  信号传导通路与心肌纤维化[J]. 中日友好医院学报, 2007, 21(2): 110-112.
- [2] 赵玉兰,程劲松,杨树涵. 辛伐他汀对慢性心衰大鼠心肌纤维化及TGF- $\beta$  1 CTGF表达的影响[J]. 医药论坛杂志, 2006, 27(24): 7-9
- [3] 谢亚芹,周青云,康大伟,等. TGF- $\beta$  1与慢性心力衰竭大鼠心肌肥厚的关系[J]. 中国老年学杂志, 2011, 31(7): 1183-1186.
- [4] 施新猷. 现代医学实验动物学[M]. 北京:人民军医出版社, 2000: 333
- [5] 谢亚芹,刘宏伟,李秀芬,等. 转化生长因子- $\beta_1$ 和结缔组织生长因子在慢性心力衰竭大鼠心肌纤维化中的动态表达[J]. 解剖学杂志, 2011, 34(4): 446-449.
- [6] 周书春,程劲松,赵玉兰,等. 坎地沙坦对慢性心衰大鼠心肌结缔组织生长因子表达的影响[J]. 山东医药, 2009, 49(20): 33-35.
- [7] 刘诗英,邢卫平,吴志勇,等. 葛根素对心肌纤维化模型大鼠左室心肌组织中转化生长因子 $\beta$  1和结缔组织生长因子表达的影响[J]. 临床心血管病杂志, 2010, 26(12): 942-945.
- [8] KOITABASHI N C, ARAI M, Kogure S, et al. Increased connective tissue growth factor relative to brain natriuretic peptide as a determinant of myocardial fibrosis[J]. Hypertension, 2007, 49: 1120-1127
- [9] 洪志斌,张卫泽. 转化生长因子 $\beta$ 在心室重构中的作用[J]. 医学综述, 2006, 12(18): 1102-1104.
- [10] 陈蓉,谢梅林. TGF- $\beta$ /Smads信号通路在心肌纤维化发生和治疗中应用前景的研究进展[J]. 中国药理学通报, 2012, 28(9): 1189-1192.
- [11] 孙红霞,杨世杰. 依那普利抗肾丙肾上腺素诱导的心肌纤维化作用及机制[J]. 中国药理学通报, 2009, 25(8): 1060-1064.
- [12] 李艳艳,赵自冰. 益气强心法对慢性充血性心力衰竭患者心功能的影响[J]. 河北中医, 2009, 31(8): 1162-1163.
- [13] 刘先明,熊新忠. 益气活血方治疗冠心病心衰30例临床观察[J]. 中国中医急症, 2006, 15(9): 946-947.
- [14] 王健,余蓉,许香广. 益气活血法对冠心病心肌纤维化影响的观察[J]. 湖北中医杂志, 2004, 26(5): 13-14.
- [15] 陈杰,黄政德. 中医药干预心肌纤维化的实验研究进展[J]. 湖南中医药大学学报, 2007, 27(5): 78-80.

(责任编辑:冯天保,钟志敏)