

·方药研究·

养阴活血方对转基因盐皮质激素受体过度表达小鼠模型心室重塑的影响

华浩明¹ 山本泰弘² 邱志刚² 东纯一² 王灿晖¹ 杨进¹

(1. 南京中医药大学基础医学院, 南京市汉中路282号, 210029; 2. 大阪大学大学院药学研究科)

[摘要] **目的** 观察养阴活血方对转基因(TG)盐皮质激素受体(MR)过度表达小鼠模型心室重塑的影响。**方法** 将小鼠分为3组, 即雄性非转基因小鼠组(NTG组)、雄性转基因小鼠组(TG组)和雄性转基因小鼠加中药组(TG+K组), 心肌梗死造模后观察心脏重量和心脏重量/体重比、脑钠肽(BNP)的mRNA表达、生存率和心脏病理切片。**结果** 养阴活血方干预治疗后, TG+K组心脏重量和心脏重量/体重比与TG组比较差异均有显著性意义($P < 0.05$), 但与NTG组比较, 差异无显著性意义($P > 0.05$); TG+K组的BNP mRNA较TG组表达减弱($P < 0.05$), 较NTG组差异无显著性意义($P > 0.05$); TG+K组生存率高于TG组($P < 0.05$), 与NTG组比较差异无显著性意义($P > 0.05$); 心脏病理切片显示, TG组心脏纤维化明显, TG+K组心脏纤维化减轻, 而NTG组最轻。**结论** 养阴活血方可减轻雄性TGMR心肌梗死小鼠模型的心室重塑。

[关键词] 盐皮质激素受体; 醛固酮; 心室重塑; 养阴活血方

Effect of Nourishing Yin and Promoting Blood Circulation Formula on Ventricular Remodeling of Transgenic Mice with Mineralocorticoid Receptor Overexpression

HUA Hao-ming¹, YAMAMOTO Yasuhiro², QIU Zhi-gang², et al.

(1. The Pre-clinical Medical College of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029; 2. Graduate School of Pharmaceutical Sciences of Osaka University)

ABSTRACT **Objective** To observe the influence of Nourishing Yin and Promoting Blood Circulation Formula on ventricular remodeling of transgenic mice with mineralocorticoid receptor overexpression. **Methods** The mice were divided into three groups: male non-transgene (NTG) group, male transgene (TG) group, and male transgene + Chinese medicine (TG+herbs) group. After myocardial infarction model-making, the heart weight, ratio of heart weight to body weight, mRNA expression of brain natriuretic peptide, survival rate and heart pathological section were observed. **Results** With the herbal treatment to nourish yin and promote blood circulation, the heart weight and the ratio of heart weight to body weight of the TG+herbs group was significantly different from those of TG group ($P < 0.05$), but the difference was not significant in comparison with NTG group ($P > 0.05$). The mRNA expression of brain natriuretic peptide of TG+herbs group was weakened than that of TG group ($P < 0.05$), but the difference was not significant in comparison with NTG group ($P > 0.05$). The survival rate of TG+herbs group was higher than that of TG group ($P < 0.05$), but the difference was not significant in comparison with NTG group ($P > 0.05$). The heart pathological section showed an obvious fibrosis in TG group, a relieved fibrosis in TG+herbs group and a least fibrosis in NTG group. **Conclusion** The herbal treatment to nourish yin and promote blood circulation can relieve the ventricular remodeling of male TG mice with MR overexpression after myocardial infarction.

Key Words Mineralocorticoid receptor (MR); Aldosterone (ALD); Ventricular remodeling; Nourishing Yin and Promoting Blood Circulation Formula

醛固酮(ALD)作为肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)中的重要组成部分,近年来在心室重塑中的作用与地位颇受关注,特别是在RALES研究^[1]中指出ALD在心脏与血管中发挥其特异性作用,还须与位于细胞质中的MR结合方能产生效应,但ALD作为心

室重塑危险因子的具体机制尚未完全明了。本研究观察了养阴活血方对转基因盐皮质激素受体(TGMR)过度表达小鼠心室模型的影响,表明养阴活血方可减轻心室重塑可能与抑制ALD有关,现报告如下。

1 材料

1.1 动物

雄性BDF-1小鼠36只系日本大阪大学药学部实验动物中心繁殖而供实验使用。实验所用均系2~4个月龄小鼠,体重20~30g。实验小鼠自由摄食和饮水,环境

恒温、恒湿,在8时~20时明期与20时~次日8时暗期的明暗周期下饲养。小鼠的饲养与实验操作按照《大阪大学动物实验指南》进行。

1.2 药物与试剂

养阴活血方由玄参、生地黄、麦冬、丹参各50g组成。购自日本大阪市栞本天海堂药局,其原产地均为中国。加2000ml蒸馏水浸泡1小时,煎煮加热至沸腾,再煎煮40分钟,过滤得A液;再加1000ml蒸馏水,煎煮至沸腾后煮30分钟,过滤得B液;合并A液和B液,60℃水浴浓缩至200ml,即得含生药1g/ml的药液。置冰箱中冷藏备用。

实验用 QLAzol™ Lysis Reagent 和 Megaprime™ DNA Labelling Systems 等试剂,购自 QLAGEN 和 Amersham Bioscience 公司。其他试剂购自荣研化学株式会社。

2 方法

2.1 动物分组及处理

使用诱导心肌特异性基因表达的 α MHC,将大鼠的 MRcDNA 注射至小鼠的受精卵,获得雄性 TGMR 过度表达小鼠模型,将其分为3组,即雄性非转基因小鼠组(NTG组)、雄性转基因小鼠组(TG组)和雄性转基因小鼠加中药组(TG+K组),每组12只小鼠。以上3组小鼠均行冠状动脉结扎术造成心肌梗死模型,方法为:克他命(100mg/kg)和甲苯噻嗪(5mg/kg)腹腔注射麻醉。小鼠用人工自动呼吸仪行人工呼吸(96ml/分钟),开胸,暴露心脏及冠状动脉,用7-0号缝合线结扎左冠状动脉前降支。再用5-0号缝合线缝合关胸。术后1日禁食,如1日内未死亡则列为实验对象予以观察,共观察40天。TG+K组按0.2ml/10g(体重)每日予中药灌胃给药,其他两组小鼠则按0.2ml/10g(体重)每日予蒸馏水灌胃。连续灌胃30天,处死,摘取心脏,作相关处理及检测。

2.2 观察指标及方法

2.2.1 心脏重量及心脏重量/体重比 在秤取小鼠的体重(BW)之后,摘出心脏,用PBS(-)清洗,除去血液,测定心脏重量(HW),然后计算心脏重量/体重比(HW/BW)。

2.2.2 生存率 3组小鼠心肌梗死后1个月的生存率采用 Kaplan-Meier 法计算。

2.2.3 脑钠肽(BNP) BNP 是反映心脏肥大及心室重塑的重要标记性指标之一。采用 Northernblot 法对3组小鼠心脏BNP的mRNA表达作了检测。具体方法为:摘取心脏用PBS(-)清洗,加入 QLAzol™ Lysis Reagent(QLAGEN),用粉碎仪粉碎,得到组织匀浆。加

入氯仿,用振动仪振动15秒混匀,室温下静置3分钟后,用低温离心机以15000转/分钟离心15分钟。取上清液,加入异丙醇颠倒混匀,在室温下静置10分钟后,再用低温离心机以15000转/分钟离心10分钟,取沉淀物。所得沉淀物溶解于0.1% DEPC 后,使用分光光度仪测定 O.D. 260值,并据此计算出总 RNA 量。调整 RNA 至 2 μ g/ μ l,在10 μ g 中加入3倍量的 gelloading buffer,65℃加温15分钟,使高次构造变性后,在含2.2M 甲醛的1.2%琼脂糖凝胶上行70V 120min 电泳。电泳后的凝胶转染至 Hybond-H+塑料薄膜。转染结束后,将此薄膜在 QuikHyb Hybridization Solution 中行 Prehybridization 20分钟。使用 Megaprime™ DNA 标记系统,将 BNPcDNA 片断,以 [α -³²P]-dCTP(Perkin Elmer) RI 标识作出特异的标证,以68℃行 hybridization 120分钟。反应结束后,将塑料薄膜用2 $\times$ SSC-0.1%SDS 清洗3次,68℃的0.1 $\times$ SSC-0.1%SDS 清洗2次,每次清洗时间15分钟。再将此薄膜于-80℃用放射自显影法显影于 X 线射线胶片,从而检出目的光带。mRNA 的表达量采用 Scion Image 定量。

2.2.4 心脏病理组织学检测 小鼠心脏用 PBS(-)清洗后,用4%多聚甲醛4℃温度下固定12小时。后用石蜡包埋,在心脏乳头肌水平处作横轴像切片。切片选择马森氏三色染色法染色。根据含胶原纤维的间质细胞与正常心肌细胞质的面积比判断心肌纤维化程度。面积比采用 Scion Image 予以定量。

2.3 统计学方法

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析或 t 检验进行统计分析。组间生存率比较采用 Log rank 检验。 $P < 0.05$ 者为差异有显著性意义。

3 结果

3.1 心脏重量及心脏重量/体重比

表1示,TG+K组的HW和HW/BW与TG组比较,差异有显著性意义($P < 0.05$),而TG+K组的HW和HW/BW与NTG组比较则差异无显著性意义($P > 0.05$)。

表1 3组小鼠的HW、BW及HW/BW比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	HW (mg)	BW (g)	HW/BW (%)
NTG组	7	136 $\pm$ 29	24.3 $\pm$ 1.2	5.59 $\pm$ 1.12
TG组	3	195 $\pm$ 35	25.7 $\pm$ 1.3	7.01 $\pm$ 1.10
TG+K组	6	141 $\pm$ 31*	24.8 $\pm$ 0.9	5.68 $\pm$ 1.18*

*与TG组比较, $P < 0.05$

3.2 生存率

NTG组的生存率为58.33%,TG组为25%,TG+K组为50%。TG+K组与TG组比较,生存率差异有

显著性意义($P < 0.05$),TG+K 组与 NTG 组比较,差异无显著性意义($P > 0.05$)。

3.3 BNP mRNA 的表达

表2示,TG+K 组的 BNP mRNA 较 TG 组表达减弱,两组差异有显著性意义($P < 0.05$);而 TG+K 组与 NTG 组比较,两组的 BNP mRNA 表达量差异无显著性意义($P > 0.05$)。

表2 3组小鼠的 BNP mRNA、间质细胞与心肌细胞面积比的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	BNP mRNA	间质细胞与心肌细胞面积比(%)
NTG	7	1.08±0.32	3.21±0.28
TG	3	2.11±0.28	14.82±0.74
TG+K	6	1.31±0.21*	3.56±0.38**

与TG 组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

3.4 心脏病理组织学检测

TG 组心肌梗死模型小鼠的胶原纤维明显增多,存在着显著的纤维化;TG+K 组小鼠的胶原纤维虽有增多,但并不很严重;在 NTG 组则稍有胶原纤维。上述病理组织学切片,又根据所含胶原纤维的间质细胞与正常心肌细胞的面积比判断心肌纤维化程度,表2示,TG+K 组与 TG 组比较,纤维化的间质细胞明显减少($P < 0.01$);TG+K 组与 NTG 组比较,则纤维化的间质细胞差异无显著性意义($P > 0.05$)。

4 讨论

养阴活血方中生地黄、玄参、麦冬滋补养阴,丹参活血化瘀,合而成方,共成养阴活血之效。本方的前3味药即增液汤。增液汤出自《温病条辨·中焦》,原为阳明温病阴津耗伤的大便秘结而设。但方中3味药均属养阴药,其中生地黄甘寒入北水之主肾而凉心营,玄参滋肝肾、泻血热,两药凉血热以护阴津,滋肾阴以濡五脏,能够兼顾心肝肾三脏。又有滋养肺胃之津的麦冬,则肾水源泉不竭,气分阴津可充。三药合用,同补五脏之阴,故后世有方书将其列为养阴基础方^[4]。可见增液汤组方之奇妙,非单滋肠道之阴,实为“一切阴虚立法”。我们对养阴行血法和养阴方药的研究表明,养阴方药对心血管系统具有较广泛的作用^[6~10],而养阴方药对于内分泌系统的调节作用和丹参对心血管系统的作用乃众所周知。为了探讨养阴活血方是否能调节神经内分泌系统和 RAAS 从而抗心室重塑,故将该方用于 TGMR 过度表达小鼠心室重塑模型。

对 HW 及 HW/BW 的观察表明,TG 组小鼠的 HW 及 HW/BW 较之 NTG 组小鼠明显升高,说明存在心脏肥大。而 TG+K 组的 HW 及 HW/BW 与 TG 组比较差异有显著性意义,与 NTG 组比较则差异无显

著性意义,提示养阴活血方具有减轻 TGMR 小鼠心肌梗塞后所致心脏肥大的作用,亦即减轻心室重塑。

TG 组小鼠心肌梗死1个月后的生存率较 NTG 组降低,差异有显著性意义,说明 TG 小鼠在心肌梗死后因心室重塑等引发心力衰竭从而导致死亡增加。TG+K 组小鼠的生存率为50%,较 TG 组的生存率明显升高,而较 NTG 组则差异无显著性意义,提示养阴活血方能减少 TG 小鼠心肌梗死引发心衰之死亡。

BNP 在心室表达的启动因素常为左心室的持续性超负荷,临床多见于心力衰竭、心肌梗死和高血压患者^[11]。BNP 的生理功能主要有降压、利尿、促进体液的减少及抑制 RAAS 等。心力衰竭患者的 BNP 可作为观察心功能和心室重塑的重要指标。结果表明,TG+K 组的 BNP mRNA 较 TG 组表达减弱;而 TG+K 组与 NTG 组比较,两组的 BNP mRNA 表达量则差异无显著性意义。说明 TGMR 小鼠心肌梗死后引起的心室重塑和心力衰竭,经养阴活血方干预治疗后有较明显改善。

心脏纤维化是心室重塑的主要表现之一。心脏组织学切片显示,TG 组小鼠的胶原纤维明显增多,存在着显著的纤维化;TG+K 组小鼠切片的胶原纤维稍有增多,纤维化并不很严重;在 NTG 组小鼠则可见轻微的纤维化。提示对于 TG 小鼠心肌梗死后的心脏纤维化,养阴活血方有较好的治疗作用。

ALD 作为 RAAS 的重要组成成员,在心室重塑中的作用受到广泛关注^[2]。ALD 需要特异性地与位于细胞质中的 MR 结合,才能引发心室重塑^[3,12,13]。本文的研究表明,对 TGMR 过度表达小鼠所致心室重塑,养阴活血方具有良好的抗重塑作用。该作用可能与抑制 ALD 效应有关。不过,其具体机制是直接抑制 ALD 还是通过 MR 间接抑制 ALD 或通过调节 RAAS 而抑制 ALD,目前尚不清楚,有待作进一步研究。

参考文献

- [1]Pitt B, Zannad F, Remme WJ, et al. for the Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. The effect of spironolactone on mortality and morbidity in patients with severe heart failure. N Engl J Med, 1999, 341(10): 709~718.
- [2]葭山稔,大村崇,吉川纯一. 心脏リモデリング抑制作用に対するアンジオテンシンII 受容体拮抗薬とアルドステロン拮抗薬の并用療法について. 日本药理学杂志, 2004, 124(2): 83~89.
- [3]Le Menuet D, Zennaro MC, Viengchareun S, et al. Transgenic mouse models to study human mineralocorticoid receptor function in vivo. Kidney Int, 2000, 57(4): 1299~1306.
- [4]李嵩山,康秀英. 中医方剂诠释. 石家庄:河北科学技术出版

社, 1990: 433.

[5] 方药中, 许家松. 温病汇讲. 北京: 人民卫生出版社, 1986: 163.

[6] 杨进. 论养阴行血. 南京中医药大学学报, 2003, 19(3): 129~133.

[7] 杨进. 养阴方对家兔实验性弥漫性血管内凝血防治作用的观察. 中医杂志, 1990, 31(9): 50~53.

[8] 龚婕宁, 卞慧敏, 魏凯峰. 滋阴活血方及其拆方抗血栓作用的研究. 中药药理与临床, 2002, 18(1): 35~38.

[9] 张旭, 张超英, 王文, 等. 麦冬药物血清对血管内皮细胞凋亡相关基因表达及胞内 Ca^{2+} 的影响. 中国病理生理杂志, 2003, 19(6): 789~794.

[10] 万海同, 王灿晖, 杨进, 等. 养阴通瘀方对心脑血管疾病血

瘀证及其血液流变学指标的影响. 中国中医药信息杂志, 2000, 7(9): 39~43.

[11] Mukoyama M, Nakao K, Hosoda K, et al. Brain natriuretic peptide as a novel cardiac hormone in humans. Evidence for an exquisite dual natriuretic peptide. J Clin Invest, 1991, 87(4): 1402~1412.

[12] Weber KT, Janicki JS, Pick R, et al. Myocardial fibrosis and pathologic hypertrophy in the rat with renovascular hypertension. Am J Cardiol, 1990, 65(14): 1~7.

[13] Weber KT, Brilla CG. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium: fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. Circulation, 1991, 83(6): 1849~1865.

(收稿日期: 2006-06-13; 修回日期: 2007-03-25)

苦必春消银方治疗寻常型银屑病58例

余远遥 黄尧洲 姚春海 郎娜 迟慧彦 罗然

(中国中医科学院西苑医院, 北京市海淀区西苑, 100091)

我们于2004年12月~2006年2月应用苦必春消银方对58例寻常型银屑病患者进行了临床疗效观察, 同时以口服复方青黛胶囊为对照取得了较为满意的疗效, 现报道如下。

1 临床资料

1.1 一般资料

临床确诊的银屑病患者106例, 按随机数字表分为两组。治疗组58例, 男性32例, 女性26例; 年龄15~47岁, 平均32.6岁; 病程12天~26年, 平均6.8年。对照组48例, 男性20例, 女性28例; 年龄17~62岁, 平均37.8岁; 病程8个月~30年, 平均7.5年。两组进行期患者55例, 静止期38例, 消退期13例。皮损类型: 斑块状71例, 地图状6例, 点滴状29例。两组患者性别、年龄、病程经统计学处理, 差异无显著性意义。多数患者之前均接受多种中西医结合治疗, 疗效不佳, 且病情仍反复发作。近1个月未接受任何药物治疗。

1.2 病例入选标准

所有病例均符合赵辨主编《临床皮肤病学》中“寻常型银屑病”的诊断标准和《中医病证诊断疗效标准》中“白_风”的诊断标准, 常规检查无其他器质性病变。

2 治疗方法

治疗组用苦必春消银方内服合并外洗。方剂组成: 苦参10g, 草_薢15g, 椿根皮15g, 水煎服, 每日1剂, 每日2次。同时用本方另煎外洗, 每日2次。对照组口服复方青黛胶囊, 每次4粒, 每日3次, 两组均治疗4周为1个疗程, 连服2个疗程后进行疗效评估。两组服药前及服药8周后查血常规及肝功能。

3 治疗结果

3.1 疗效评价标准

患者每周复诊1次, 于治疗前及治疗8周后由同一名皮肤科医师记录以下项目: 皮损部位与范围, 红斑、鳞屑及皮损浸润的程度, 用药后的变化及各种副作用, 并以PASI评分检验治疗结果。治愈为PASI变化值>90%, 显效为PASI变化值61%~

90%, 有效为PASI变化值31%~60%, 无效为PASI变化值<30%。

3.2 结果

治疗组58例中痊愈32例, 显效12例, 有效10例, 无效4例, 总有效率93.1%。对照组48例中痊愈19例, 显效10例, 有效4例, 无效15例, 总有效率68.8%。治疗后治疗组PASI总评分为(56.4±7.7)分, 对照组PASI总评分为(77.2±6.0)分。两组PASI评分差异有显著性意义($P<0.01$)。治疗组病例全部随访12个月, 痊愈后有3例停药后4个月后复发, 其中1例全身泛发, 再用苦必春消银方加减治疗仍然有效。

3.3 不良反应

治疗组用药期间有1例患者服药后有轻微呕恶感, 但可以耐受, 继续治疗。对照组中有5例用药后出现消化道症状, 其中3例表现为恶心呕吐, 1例表现为腹痛、1例表现为便秘, 患者可以耐受, 减少用药量后症状自行缓解或消失, 两组患者用药后8周复查血常规、肝功能未出现异常情况。

4 讨论

苦必春消银方是黄尧洲教授经过多年临床筛选治疗银屑病的验方, 以清热解毒除湿为组方原则。方中草_薢具利湿去浊, 祛风通痹, 临床常用于湿热疮毒、风湿痹痛、淋病白浊等。现代医学证明其有抗菌作用, 还可以促进单核巨噬细胞系统吞噬功能的作用及能明显增强绵羊红细胞所致的小鼠迟发超敏反应。苦参是临床常用清热燥湿药, 是治疗湿热所致皮肤病常用药, 现代研究其有确切的止痒和抗过敏作用, 因其清热燥湿之力甚强, 既可内服又可外用。椿根皮有清热燥湿、涩肠、止血、止泻、杀虫等功效, 《本草求原》有: “椿根气平, 色赤而香, 能燥湿泻热, 涩能收阴实肠, 治湿热为病, 燥痰湿, 去疳虫。”诸药合用, 共奏清热解毒除湿之效, 使热毒得解, 湿邪得导, 血脉流畅, 邪无所依, 病遂告愈。苦必春消银方疗效肯定, 长期服用安全性高, 且药源丰富, 价格低廉, 既可以缓解患者的症状又可以减轻患者的经济负担。

(收稿日期: 2006-12-15; 修回日期: 2007-03-14)