

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2017.16.015

黄芪、党参对心力衰竭小鼠心肌细胞钙瞬变的影响

高群¹, 李思耐², 林谦^{3*}

(1. 北京中医药大学, 北京市朝阳区北三环东路 11 号, 100029; 2. 首都医科大学附属北京中医医院; 3. 北京中医药大学东方医院)

摘要 目的 探讨黄芪、党参治疗心力衰竭的可能作用机制。方法 48 只 C57BL/6J 小鼠随机分为假手术组、模型组、黄芪组、党参组, 每组 12 只。除假手术组外其余各组采用缩窄胸主动脉的方法建立心力衰竭小鼠模型, 3 天后黄芪组给予黄芪颗粒制剂 12 g/(kg·d), 党参组给予党参颗粒制剂 6 g/(kg·d), 假手术组和模型组给予生理盐水 20 ml/(kg·d), 各组均灌胃 4 周。检测各组小鼠心功能, 收缩功能指标包括射血分数 (EF)、左室短轴收缩率 (FS), 舒张功能指标包括二尖瓣环口处的血流早期峰波 (E)、晚期充盈波 (Ea), 并计算 E/Ea; 分离心肌细胞, 通过激光共聚焦显微镜记录钙瞬变的峰值、回落时间。结果 与假手术组比较, 模型组 EF、FS、Ea 均明显下降, 而 E/Ea 明显升高, 钙瞬变峰值下降, 回落时间延长 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 黄芪组 EF、FS、E、Ea 升高, E/Ea 降低, 钙瞬变回落时间缩短; 党参组 EF、FS、钙瞬变峰值升高, 钙瞬变回落时间缩短 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 党参、黄芪能缩短心力衰竭小鼠心肌细胞钙瞬变回落时间, 党参能提高其钙瞬变峰值, 可能是其治疗心力衰竭作用机制之一。

关键词 心力衰竭; 党参; 黄芪; 心功能; 钙瞬变

心力衰竭是多种心脏疾病导致的心脏结构或功能异常, 使心室充盈或泵血障碍, 以乏力、呼吸困难和液体潴留为主要临床表现的复杂综合征, 也是各种心血管疾病的终末阶段。随着中西医结合治疗心力衰竭的不断发展, 中医在改善患者症状、控制心力衰竭的发生发展、提高患者生活质量、改善预后等方面取得了突出的效果^[1]。在心肌细胞中, 钙离子通过细胞内浓度的瞬间改变参与兴奋-收缩耦联, 形成钙瞬变, 而尤其是心功能下降的细胞学基础, 在心肌收缩和舒张功能降低之前, 钙瞬变已经发生异常改变^[2]。中医学认为, 在慢性心力衰竭过程中, 其基本病机为心气不足, 并贯穿心力衰竭发生发展始终, 因此, 益气为治疗心力衰竭过程中重要的法则之一^[3], 而黄芪、党参为临床上常见的益气药。本实验通过黄芪、党参干预压力负荷导致的心力衰竭小鼠, 并检测其心肌细胞钙瞬变, 探究黄芪、党参对心力衰竭的干预机制。

1 材料与方法

1.1 动物

清洁级健康雄性 C57BL/6J 小鼠 48 只, 8 周龄, 体重 (25 ± 5) g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物许可证编号: SCXK (京) 2012-0001。

1.2 药物及试剂

黄芪颗粒制剂 (批号: 15014601)、党参颗粒制剂 (批号: 15006951), 购自北京康仁堂药业有限公司; 水合氯醛为国产分析纯试剂 (国药集团化学试剂有限公司, 批号: 20151023); 自配台氏液: 每 1000 ml 含 NaCl 8695.9 mg、KCl 298.2 mg、MgCl₂ 50.47 mg、HEPES 1191.5 mg、D-Glucose 900.8 mg、NaH₂PO₄ 39.6 mg, NaOH 调至 pH7.4; 自配 KB 液: 每 500 ml 含 KOH 3366 mg、L-Glutamic 8828 mg、MgCl₂ 238 mg、Taurine 1252 mg、EGTA 190 mg、HEPES 1192 mg、D-Glucose 901 mg, KOH 调整至 pH7.2; 自配消化液: 含 0.6% 胶原酶 B、0.6% BSA、含有 30 μ mol/L Ca²⁺ 的台氏液。异氟烷 (瑞沃德公司, 批号: 21715301); 肝素 (万邦

基金项目: 国家自然科学基金 (81173176)

* 通讯作者: linqian62@126.com, {010} 67689611

医药, 国药准字 H32020612); 20% F127 (Sigma 公司, 批号: 101141111); Flou2-AM (Lifetechnologies 公司, 批号: 1558750)。

1.3 主要仪器

单细胞动缘探测系统 (IonOptix, USA); 电子刺激器 SEN 27103 (IonOptix, USA); 倒置显微镜 (Nikon, Japan); M 型小动物超声心动检测系统 (Vevo770 ultrasound system, Visual Sonics Inc, USA)。

1.4 分组及处理方法

48 只小鼠采用随机数字表法分为假手术组、模型组、黄芪组、党参组, 每组 12 只。除假手术组外其余各组参照文献 [4] 方法建立心力衰竭小鼠模型: 称重后予 4% 水合氯醛 (1.5 ml/20 g) 腹腔注射进行麻醉。麻醉成功并脱毛后将小鼠仰卧位固定于鼠板上, 于胸骨正中线处剪开皮肤, 切口约 0.5 ~ 1 cm, 然后用镊子钝性分离肌肉。于主动脉弓胸主动脉分支处分离胸主动脉, 将注射器针头平行放置于胸主动脉上, 用 4 号手术线将注射针头和腹主动脉结扎后缓慢抽出针头, 关闭肌肉, 缝合皮肤。假手术组分离胸主动脉, 不用手术线结扎, 其余步骤同模型组。各组小鼠苏醒后常规喂养 3 天后开始灌胃给药, 黄芪组给予黄芪 12 g/(kg · d) 灌胃 (相当于人临床用量 30 g/d), 党参组给予党参 6 g/(kg · d) 灌胃 (相当于人临床用量 15 g/d), 假手术组和模型组给予生理盐水 20 ml/(kg · d), 各组均灌胃 4 周。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 心功能检测 使用 3% 的异氟烷吸入麻醉, 仰卧位固定于恒温加热板上保持体温, 然后持续吸入 1.5% ~ 3% 的异氟烷保持麻醉状态。采用 M 型小动物超声心动检测系统检测小鼠收缩功能, 将探头置于小鼠胸骨前, 使用二维超声显示左室短轴切面, 于乳头肌水平记录左心室运动曲线, 各参数连续测量 3 个心动周期, 收缩功能指标包括射血分数 (EF)、左室短轴收缩率 (FS)。将探头放在心尖

搏动处, 方向朝向心底, 二维超声显示心尖四腔心位, 切换为脉冲多普勒模式, 连续测量 3 个心动周期, 舒张功能指标包括二尖瓣环口处的血流早期峰值 (E)、晚期充盈波 (Ea), 并计算 E/Ea。

1.5.2 心肌细胞钙瞬变检测 检测心功能后, 腹腔注射 2000 U/kg 肝素及 4% 水合氯醛, 开胸迅速取出一段带有主动脉的心脏, 以冰冷的无钙台式液冲洗残余血液, 修剪心脏, 以 6 ml/min 的流速于 37℃ 经主动脉逆行灌流氧饱和的消化液约 16 ~ 20 min, 当心脏松软、颜色变浅时终止消化, 取下心脏, 在充氧的 KB 液中剪取左心室, 眼科剪剪碎, 用吸管吹打后用尼龙网过滤, 离心后弃去上清液, 更换 KB 液 1 次。室温静置 1 h 后弃去上清液, 使用不同浓度的钙离子台式液逐步复钙, 最后使细胞保存在正常的有钙台式液 (1.2 mmol/L Ca^{2+})。将 20% F127 与 Flou2-AM 储备液各取 1 ml, 充分混合, 加入 1 ml 小鼠左心室肌细胞悬液 (终浓度为 2 $\mu\text{mol/L}$), 于室温避光负载 20 min 后弃去上清液。吸取细胞悬液移入灌流槽中, 用含钙离子的氧饱和台式液灌流, 并于倒置显微镜下观察, 选取横纹清晰、收缩稳定、边界清楚的长杆状细胞, 利用 IonOptix 单细胞动缘检测系统测定细胞功能。在显微镜下以 1.0 Hz 频率刺激细胞, 并进行记录至少 20 个周期, 记录钙瞬变的峰值、回落时间。

1.6 统计学方法

使用 SPSS 20.0 统计分析软件, 数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 连续变量并符合正态分布的数据组间比较用单因素方差分析, 不符合正态分布或未通过方差齐性检验的使用非参数检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠心功能比较

手术过程中模型组和党参组小鼠死亡各 3 只, 黄芪组死亡 2 只, 假手术组死亡。表 1 示, 与假手术组比较, 模型组 EF、FS、Ea 均明显下降, 而 E/Ea 明显升高 ($P < 0.01$), 表明压力负荷增加导致小鼠心力衰竭。与模型组比较, 黄芪组 EF、FS、

表 1 各组小鼠心功能比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	EF (%)	FS (%)	E (cm/s)	Ea (cm/s)	E/Ea
假手术组	12	43.7 $\pm$ 7.3**	21.6 $\pm$ 4.3**	89.5 $\pm$ 8.8	3.9 $\pm$ 0.6**	23.3 $\pm$ 4.5**
模型组	9	29.4 $\pm$ 7.8	13.8 $\pm$ 4.0	76.8 $\pm$ 17.4	2.4 $\pm$ 1.1	36.2 $\pm$ 10.8
黄芪组	10	39.5 $\pm$ 11.2*	19.3 $\pm$ 6.2*	91.0 $\pm$ 11.1*	3.5 $\pm$ 0.5*	26.7 $\pm$ 4.7*
党参组	9	43.7 $\pm$ 7.3**	21.5 $\pm$ 4.2**	79.2 $\pm$ 11.5	3.0 $\pm$ 0.8	27.9 $\pm$ 6.8

注: EF, 射血分数; FS, 左室短轴收缩率; E, 早期峰值; Ea, 晚期充盈波; 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

E、Ea 均有升高, E/Ea 明显降低 ($P < 0.05$), 党参组 EF、FS 均明显升高 ($P < 0.01$), 而 E、Ea、E/Ea 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.2 各组小鼠心肌细胞钙瞬变比较

表 2 示, 与假手术组比较, 模型组钙瞬变峰值下降, 回落时间延长 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 党参组钙瞬变峰值提高, 黄芪组、党参组钙瞬变回落时间明显缩短 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 2 各组小鼠心肌细胞钙瞬变比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞数	峰值 (ratio)	回落时间 (ms)
假手术组	21	$0.36 \pm 0.07^{**}$	$0.11 \pm 0.02^{**}$
模型组	25	0.22 ± 0.07	0.19 ± 0.03
黄芪组	26	0.27 ± 0.05	$0.16 \pm 0.05^*$
党参组	24	$0.32 \pm 0.11^*$	$0.13 \pm 0.03^{**}$

注: 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3 讨论

《圣济总录·心脏门》曰“心衰则健忘, 不足则胸腹胁下与腰背隐痛, 惊悸, 恍惚, 少颜色, 舌本强”, 其描述与现代医学中的心力衰竭有一定的相似之处。《素问·痹论篇》曰“心痹者, 脉不通, 烦则心下鼓, 暴上气而喘”; 《灵枢·胀论》曰“心胀者, 烦心短气, 卧不安”; 《金匱要略·水气病脉证并治》曰“心水者, 其身重而少气, 不得卧, 烦而躁, 其人阴肿”, 可以概括出现代医学中心力衰竭病的主要表现。中医学认为, 气为血之帅, 血液的运行靠心气的推动, 而气虚、气滞均可导致血瘀, 因此, 在慢性心力衰竭过程中, 心气虚是其基本病机, 并贯穿其始终^[1]。气虚日久不能行血, 又可产生血瘀、水停等实邪; 而心气虚进一步发展, 可发展为阳虚或气阴两虚^[2], 故中医治疗当“伏其所主, 而先其所因”, 益气为治疗心力衰竭过程中重要的方法之一。前期研究结果显示, 党参、黄芪等益气药能纠正心力衰竭心肌能量代谢重构^[3], 改善慢性心力衰竭大鼠血流动力学指标^[4], 保护心肌功能; 党参可通过抑制磷酸二酯酶的活性, 产生正性肌力的作用^[5]。

钙瞬变的改变是心肌收缩和舒张功能降低的细胞学基础, 是慢性心力衰竭发生的主要机制, 在多数情况下, 钙瞬变的异常变化往往早于心肌舒缩功

能的降低。钙瞬变幅度反映在心肌收缩过程中, 细胞质内钙离子浓度的变化, 钙瞬变幅度越高, 收缩时细胞质内钙离子浓度越高, 可以激活的横桥数量越多, 则心肌收缩力越高; 而回落时间反映出心肌细胞舒张的时间, 钙瞬变回落时间越长, 则心肌细胞舒张功能越弱^[6]。

本研究结果显示, 模型组小鼠心脏收缩功能和舒张功能均降低, 在心力衰竭心肌细胞中, 钙瞬变峰值降低, 回落时间延长, 心肌细胞收缩及舒张功能受损。党参、黄芪干预后可不同程度改善心脏收缩功能和舒张功能, 提高钙瞬变峰值、缩短回落时间。在细胞水平上, 党参改善心肌细胞的收缩功能效果更明显, 黄芪则可改善心力衰竭心肌细胞的舒张功能, 这可能是不同益气中药改善心功能的机制之一。

参考文献

- [1] 毛静远, 朱明军. 慢性心力衰竭中医诊疗专家共识 [J]. 中医杂志, 2014, 55(14): 1258-1260.
- [2] ZHOU X, LIN P, YAMAZAKI D, et al. Trimeric intracellular cation channels and sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium homeostasis [J]. Circ Res, 2014, 114(4): 706-716.
- [3] 吕东, 汪海霞, 吕宏, 等. 益气回阳、固脱逐水法辅助治疗慢性心力衰竭急性发作合并原发性休克 30 例疗效观察 [J]. 中医杂志, 2016, 57(3): 237-240.
- [4] HU P, ZHANG D, SWENSON L, et al. Minimally invasive aortic banding in mice: effects of altered cardiomyocyte insulin signaling during pressure overload [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003, 285(3): 1261-1269.
- [5] 苏敬泽, 李乐文, 林谦. 林谦中西医结合治疗慢性心力衰竭经验总结 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2016, 22(1): 128-130.
- [6] 张子彬, CHENG TO, 张玉传. 充血性心力衰竭学 [M]. 北京: 科学技术文献出版社, 2000: 3-24.
- [7] 李岩. 益气药对慢性心力衰竭心气虚证模型大鼠心肌能量代谢重构的干预作用 [J]. 北京: 北京中医药大学, 2012.
- [8] 李岩, 武乾, 林谦. 补气药党参黄芪对慢性心衰大鼠血流动力学的影响 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2010, 16(7): 597-598.
- [9] 秦腊梅, 杨金铎, 廖家桢, 等. 党参、黄芪补益心气作用的研究 [J]. 中药药理与临床, 1987, 3(3): 217-220.

Effects of Huangqi [*Astragali radix*, 黄芪] and Dangshen [*Codonopsis radix*, 党参] on Calcium Transients in Myocardial Cells of Heart Failure Model Mice

GAO Qun¹, LI Sinai², LIN Qian³

(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100029; 2. Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University; 3. Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To explore the potential mechanism of Huangqi [*Astragali radix*, 黄芪] and Dangshen [*Codonopsis radix*, 党参] in treating heart failure. **Methods** Forty-eight C57BL/6J mice were randomized into sham operation group, model group, Huangqi group and Dangshen group, with 12 mice in each group. The heart failure model was built by shrinking thoracic aorta in each group except the sham operation group. Three days later, Huangqi group was given 12 g/(kg · d) of Huangqi granules, while Dangshen group was given 6 g/(kg · d) of Dangshen granules, and the sham operation group and the model group were administered 20 ml/(kg · d) of normal saline. All groups were treated by gavage for 4 weeks. The cardiac function of mice in each group was detected, and the systolic function indexes included ejection fraction (EF), left ventricular short axis fraction shortening (FS), diastolic function indexes including the early peak wave (E) and late filling wave (Ea) around the mitral valve as well as the E/Ea were calculated. Cardiomyocytes were separated, and calcium transient peak and fall time were recorded by laser confocal microscopy. **Results** Compared with those in the sham operation group, EF, FS and Ea decreased significantly, while E/Ea increased significantly, the calcium transient peak decreased, and the fall time prolonged in the model group ($P < 0.01$). Compared with those in the model group, EF, FS, E and Ea increased, E/Ea decreased, and calcium transient fall time was shorter in the Huangqi group; while EF, FS and calcium transient peak increased and the calcium transient fall time decreased in Dangshen group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** Dangshen and Huangqi could increase the calcium transient peak and shorten the fall time in myocardial cells of heart failure mice, which may be one of the mechanisms of them in treating heart failure.

Keywords heart failure; Dangshen [*Codonopsis radix*, 党参]; [*Astragali radix*, 黄芪]; heart function; calcium transient

(收稿日期: 2017-02-28; 修回日期: 2017-04-17)

编辑: 邓 媛

第八届国际中医妇科学术大会暨世界中医药学会联合会 妇科专业委员会换届改选会议参会通知

由世界中医药学会联合会主办, 世界中医药学会联合会妇科专业委员会承办, 云南植物药业有限公司协办的“第八届国际中医妇科学术大会暨世界中医药学会联合会妇科专业委员会换届改选会议”, 定于 2017 年 11 月 24-26 日在深圳市举行, 届时将举办妇科出血相关性病症诊治高级论坛, 同期进行妇科专业委员会换届改选, 并设“云植杯”云南红药胶囊有奖征文活动, 评选优秀学术论文。现将有关事项通知如下:

一、征文内容: 1. 名老中医对妇科出血相关性病症中医诊疗方案及学术经验; 2. 妇科出血相关性病症诊治的中医优势及其特色疗法; 3. 新技术、新疗法在诊治妇科出血相关性病症中应用及最新研究进展; 4. 历代医家诊治妇科出血相关性病症经验挖掘与文献整理; 5. 云南红药胶囊组方研究、药理作用及临床应用; 6. 云南红药胶囊药效基础及安全性观察; 7. 云南红药胶囊深层次开发思路及远景规划。

二、会议时间: 2017 年 11 月 24-26 日 (24 日报到, 20:00 理事候选人参加改选)。

三、会议地点: 深圳大梅沙海景酒店, 地址: 深圳市盐田区大梅沙盐梅路 100 号。

四、会议费用: 会务及培训费 1200 元 (在读研究生凭身份证及研究生证 800 元), 会议统一安排食宿, 交通及住宿费自理。

五、特别提示: 1. 妇科专业委员会理事候选人不参加会议视为自动放弃理事资格; 2. 所有参会人员请于 10 月 10 日前以电子邮件提交参会回执; 3. 会期评选优秀学术论文, 颁发“云植杯”云南红药胶囊有奖征文 1~3 等奖奖金、奖杯及证书; 4. 会议投稿务请于 9 月 30 日前以电子邮件发送至 fkh189@163.com。

六、会议负责人及联系方式: 刘丹卓 13787132521, fkh189@163.com, 通讯地址: 410007 长沙市韶山中路 113 号湖南中医药大学