

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2017.22.013

实验研究

心康冲剂对慢性心力衰竭大鼠心室重构的影响

刘蓉芳¹, 孙玲¹, 张抒惠¹, 谭雄², 张辉², 杨婷¹, 吴玲娇¹, 毛以林^{2*}

(1. 湖南中医药大学研究生院, 湖南省长沙市岳麓区含浦科教园, 410208; 2. 湖南中医药大学第二附属医院)

摘要 目的 探讨心康冲剂治疗慢性心力衰竭的可能作用机制。方法 90 只 SD 大鼠随机分为正常组 10 只, 模型组, 对照组及心康低、中、高剂量组各 16 只。除正常组外, 其余各组通过腹腔注射注射用盐酸阿霉素 1.5 mg/kg 制造慢性心力衰竭大鼠模型。心康低、中、高剂量组分别给予 0.5、1、2 g/(kg·d) 心康冲剂。对照组给予 0.06 g/(kg·d) 芪苈强心胶囊。正常组、模型组予 1.0 g/(kg·d) 生理盐水灌胃。各组均每日 1 次, 连续灌服 8 周。观察大鼠心功能, TUNEL 染色法观察心肌细胞凋亡, Masson 染色法观察心肌纤维化, 采用 Real-time PCR 法及免疫组化法检测心肌组织半胱天冬酶 12 (Caspase-12)、葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78)、CCAAT 增强子结合蛋白同源蛋白 (CHOP) 蛋白及 mRNA 表达水平。结果 与模型组比较, 心康低、中、高剂量组心肌细胞凋亡和纤维化明显减少。与模型组比较, 对照组及心康低、中剂量组左室舒张期内径 (LVIDd)、左室收缩末期内径 (LVESD) 及 Caspase-12、GRP78、CHOP 蛋白, 心康中剂量组 Caspase-12、GRP78、CHOP mRNA 明显下降, 左室射血分数 (LVEF)、左心室短轴缩短率 (LVFS) 及心输出量 (CO) 明显升高 ($P < 0.05$); 与对照组比较, 心康低剂量组 LVIDd、LVESD 下降, LVEF 及 CO 增大, 心康中剂量组 LVESD、Caspase-12 表达下降, LVIDd、CHOP mRNA 表达升高, 心康低、中剂量组 CHOP、Caspase-12 mRNA 蛋白表达下降 ($P < 0.05$)。结论 心康冲剂能下调心肌组织 Caspase-12、GRP78、CHOP 表达、减轻内质网应激凋亡、抗心室重构, 可能是其治疗慢性心力衰竭的机制之一, 以心康冲剂低、中剂量疗效更佳。

关键词 慢性心力衰竭; 心室重构; 内质网应激; 葡萄糖调节蛋白 78; 半胱天冬酶 12; CCAAT 增强子结合蛋白同源蛋白; 心康冲剂

慢性心力衰竭 (以下简称心力衰竭) 是指在静脉回流正常的情况下, 由于不同的病因引起心脏排血量绝对或相对不足, 临床上以组织血流灌注不足以及肺循环和 (或) 体循环淤血为主要表现的一种疾病, 是由多种结构性或功能性心脏疾病导致心室充盈和射血功能受损而引起的一组临床综合征, 是心血管疾病晚期共有的终末器官损害^[1]。心室重构是心力衰竭非常复杂的病理生理过程, 主要包括心肌肥大、坏死凋亡及纤维化, 确切发病机制仍不完全清楚。近年来学者发现, 心力衰竭病理过程中伴随内质网应激^[2], 并与心肌凋亡^[3-4]及心肌纤维化^[5]等心室重构有关。葡萄糖调节蛋白 78

(GRP78) 是内质网应激基因, 半胱天冬酶 12 (Caspase-12)、CCAAT 增强子结合蛋白同源蛋白 (CHOP) 是内质网凋亡基因, 三者过度激活可引起内质网特征性细胞凋亡^[6]及心肌纤维化^[6-5,7]。临床抗心肌重构药物主要是血管紧张素转换酶抑制剂 (ACEI) 类和血管紧张素 2 受体阻滞剂 (ARB) 类, 但很多患者不能耐受其副作用或者因禁忌症而导致药物停药。心康冲剂是以真武汤、升陷汤及参苓白术散为基础的临床效方, 具有健脾渗湿、温阳化气逐水饮的功效, 前期研究显示, 其对慢性心力衰竭具有抗肾上腺素-血管紧张素-醛固酮系统作用^[8], 并可下调心力衰竭大鼠下丘脑 AVP mRNA 及肾脏 AQP2 mRNA、AVPV2 mRNA 表达, 从而减少水潴留^[9-10], 改善心肌重构^[8]。本研究观察心康冲剂对慢性心力衰竭大鼠 Caspase12、GRP78、

基金项目: 湖南省中医药科研计划 (201610); 湖南省自然科学基金 (2016JJ4068)

* 通讯作者: maoyilin8518@126.com; (0731) 84917823

CHOP 基因表达的调控作用, 探讨其改善心室重构可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级 SD 大鼠 90 只, 6 周龄, 体重 150 ~ 180 g, 雌雄各半, 购于湖南斯达实验动物有限公司, 实验动物合格证号: 43004700025095。饲养温度 20 ~ 25℃, 湿度 50% ~ 70%。

1.2 药物

心康冲剂溶液配制: 白参 10 g, 黄芪 30 g, 北柴胡 5 g, 升麻 5 g, 桔梗 5 g, 茯苓 15 g, 薏苡仁 30 g, 生姜皮 10 g, 大腹皮 10 g, 陈皮 10 g, 桂枝 6 g, 炮附片 10 g, 砂仁 6 g, 经湖南省中医院药剂科制成干燥颗粒后, 配制成心康冲剂低、中、高剂量浓度分别为 0.6、1.2、2.4 g/ml 的溶液。芪苈强心胶囊 (石家庄以岭药业股份有限公司, 国药准字: Z20040141) 按每 30 g 溶于无菌蒸馏水 410 ml, 配成浓度为 0.073 g/ml 的溶液, 贮存于 4℃ 冰箱备用。注射用盐酸阿霉素 (深圳万乐药业有限公司, 国药准字: H44024359), 10 mg/支, 按每 10 mg 阿霉素粉针剂溶于生理盐水 65 ml, 配成浓度为 0.15 mg/ml 的溶液。

1.3 主要试剂及仪器

mRNA 逆转录试剂盒 (北京康为世纪生物科技有限公司, 批号: CW0661); 免疫组化检测一抗 Caspase-12 (货号: BA3142)、GRP78 (货号: PB0669)、CHOP (货号: A00311-1)、actin (货号: BM0626) 试剂盒均购于武汉博士德生物工程有限公司; 免疫组化二抗通用型二步法检测试剂盒 (北京中杉金桥生物技术有限公司, 批号: WP140612); 末端脱氧核苷酸转移酶 (TdT, 上海江莱生物科技有限公司, 批号: 9027-67-2); Weigert 苏木精液 (上海抚生实业有限公司, 货号: FS-0001-1177); 酸性丽春红 (上海金穗生物科技有限公司, 货号: JS11335); 3% 双氧水 (北京百奥莱博科技有限公司, 货号: SNM492)。

Motic B5 显微摄像图像分析系统 (麦克奥迪实业集团公司), BX43 型双目生物摄像显微镜 (日本 Olympus 公司), DM LB2 型双目显微镜 (德国 Leica 公司), DW-PF522 型便携式彩色多普勒超声仪 (徐州市大为电子设备有限公司)。

1.4 动物分组及造模

动物适应饲养 1 周后按随机数字表法取 10 只

为正常组, 余下 80 只大鼠进行造模。造模方法参考文献 [1], 注射用盐酸阿霉素按 1.5 mg/kg 腹腔注射, 每周 2 次, 共 7 周。末次注射停药后 1 周, 以左心室短轴缩短率 (LVFS) < 30% 为心力衰竭造模成功 [2]。80 只造模成功大鼠按随机数字表法分为模型组、对照组及心康低、中、高剂量组各 16 只。心康低、中、高剂量组分别给予成人等效剂量 [3]、2 倍等效剂量、4 倍等效剂量即 0.5、1、2 g/(kg · d) 的心康冲剂灌胃。对照组给予成人等效剂量 0.06 g/(kg · d) 的芪苈强心胶囊灌胃。正常组、模型组予 1.0 g/(kg · d) 生理盐水灌胃。各组均每日 1 次, 连续灌胃 8 周。大鼠每周称重 1 次, 根据体重调整大鼠给药量。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 心功能 大鼠给予 10% 水合氯醛溶液 (3 ml/kg) 麻醉后固定, 前胸备皮涂擦脱毛膏及耦合剂, DW-PF522 彩色多普勒超声诊断仪取大鼠左心室长轴切面后进行 M 超声检测, 连续记录 10 个心动周期, 测量左室舒张期内径 (LVIDd)、左室收缩末期内径 (LVESD)、左室射血分数 (LVEF)、左心室短轴缩短率 (LVFS)、心输出量 (CO), 所有数据均测量 3 次, 取其平均值记录。

1.5.2 TUNEL 染色法观察心肌细胞凋亡 打开胸腔, 剪下心脏, 去掉心房及右心室, 余下左心室投入 10% 多聚甲醛溶液固定、石蜡包埋、切片, 依次二甲苯透明、梯度乙醇脱水、PBS 漂洗, 50 μl TdT + 450 μl 荧光素标记后反应 10 min。再加 50 μl TUNEL 反应混合液 (即 50 μl TdT + 450 μl 荧光素标记的 dUTP 液混匀), PBS 漂洗、DAPI 染色, 封片, 取材左心室横切面观察。

1.5.3 Masson 染色法观察心肌纤维化 取材左心室横切面, 石蜡切片脱蜡、水洗。用 Weigert 苏木精液染核 5 ~ 10 min, 盐酸酒精分化, 蒸馏水漂洗, 用酸性丽春红染 5 ~ 10 min。2% 冰醋酸水溶液浸泡数秒, 1% 磷钼酸水溶液分化 3 ~ 5 min, 亮绿液染 5 min, 依次用梯度脱水, 二甲苯透明, 封片, BX43 型双目生物摄像显微镜下观察。

1.5.4 Real-time PCR 法检测 Caspase-12、GRP78、CHOP mRNA 表达 取大鼠左心室心尖部分约 1 g, Trizol 法提取大鼠心脏组织总 RNA, 行 RNA 琼脂糖凝胶电泳。取 2 μg 以组织总 mRNA 为模板, 逆转录 cDNA, 42℃ 孵育 15 min, 85℃ 孵育 5 min, 冰上冷却。以各检测基因引物 (引物序列如下) 进行实时定量 PCR。定量 PCR 扩增条件, 95℃

10 min, 95℃ 15s, 60℃ 60s, 40 个循环。收集每循环第 3 个步骤荧光信号量, 以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 反映各样品相对于对照组样品目的基因的表达式, $-\Delta\Delta Ct = \text{对照组 } \Delta Ct - \text{各样品 } \Delta Ct$, $\Delta Ct = \text{目的 } \Delta Ct - \text{内参 } \Delta Ct$ 。每个样本重复 3 次。

在 NCBI 上搜索 Caspase12、GRP78、CHOP 基因的序列, primer5 软件设计引物, 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。引物: actin, 上游: ACATCCGTAAAGACCTCTATGCC, 下游: TACTCCTGCTTGCTGATCCAC, 223bp; Caspase12, 上游: ATAAAGAGCCAGATATTCTTCGT, 下游: TCACCCCTCTCACTGGTCA, 154bp; GRP78, 上游: ACCAATGACCAAAACCGCCTGA, 下游: TTCCTCGTGTCAATGCGCTCT, 110bp; CHOP, 上游: CCAGCAGAGGTCACAAGCAC, 下游: CCTTCTCCTTCATGCGCTGT, 163bp。

1.5.5 免疫组化法检测心肌组织 Caspase12、GRP78、CHOP 蛋白含量 心肌切片经脱蜡、脱水后, 3% 双氧水阻断内源性过氧化物酶, 入微波炉修复, 冷却, 加 1 : 100 一抗 (Caspase12、GRP78、CHOP) 4℃ 过夜; PBS 洗 3 次; 加二抗, PBS 洗 3 次; 每片滴二甲基联苯胺 (DAB) 显色液, 水洗, 苏木精复染; 脱水、透明、封片。MOTIC 图像分析系统在 400 倍光学显微镜下对 Caspase12、GRP78、CHOP 阳性结果进行半定量分析。每个标本观察 6 个视野, 以阳性产物面积/视野面积表示该抗原的相对含量, 重复 3 次, 取其平均值。

1.6 统计学方法

采用 SPSS17.0 统计软件处理数据。计量资料用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 先进行正态性和方差齐性检验, 满足正态性时, 采用单因素方差分析, 两两比较若方差齐时采用 LSD 检验, 方差不齐时用 Games-Howell 检验; 不满足正态性时采用秩和检验; 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

实验过程中, 模型组死亡 5 只, 对照组死亡 5 只, 心康低剂量组死亡 3 只, 心康中剂量组死亡 3 只, 心康高剂量组死亡 5 只。

2.1 各组大鼠心功能指标比较

表 1 示, 与正常组比较, 模型组 LVIDd、LVESD 明显升高, 而 LVFS、LVEF 及 CO 显著下降 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 对照组及心康低、中、高剂量组 LVIDd、LVESD 明显下降 ($P < 0.05$), 对照组及心康低、中剂量组 LVEF、LVFS 及 CO 明显升高, 心康高剂量组 LVEF 明显升高 ($P < 0.05$); 与对照组比较, 心康低剂量组 LVIDd、LVESD 下降, 而 LVEF 及 CO 增大 ($P < 0.05$), 心康中剂量组 LVESD 下降, LVIDd 升高, 心康高剂量组 LVESD 升高, LVFS、LVEF 及 CO 下降 ($P < 0.05$); 与心康低剂量组比较, 心康中剂量组 LVIDd、LVFS 增大, LVEF、CO 下降 ($P < 0.05$), 心康高剂量组 LVIDd、LVESD 升高, LVFS、LVEF、CO 下降 ($P < 0.05$); 与心康中剂量组比较, 心康高剂量组 LVESD 上升, LVFS、LVEF 及 CO 下降 ($P < 0.05$)。

2.2 各组大鼠心肌细胞凋亡情况

图 1 示, 正常组细胞核呈长梭形, 蓝色, 排列规整。与正常组相比, 模型组棕褐色坏死颗粒物质明显增多; 与模型组相比, 心康低、中、高剂量组棕褐色坏死颗粒物质则明显减少; 与对照组相比, 心康低、中剂量组心肌细胞凋亡相对较少。心康低、中剂量组蓝色椭圆形细胞核与棕褐色颗粒物质并见, 二组凋亡颗粒无明显差异。心康高剂量组棕褐色坏死颗粒物质均较心康低、中剂量组多。

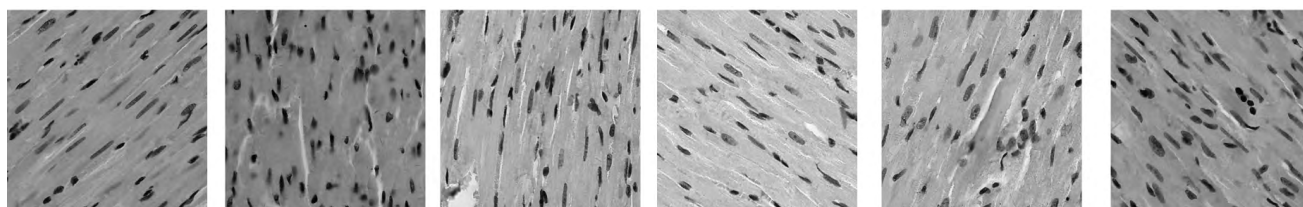
2.3 各组大鼠心肌细胞纤维化结果

正常组肌纤维呈红色可见极少量蓝绿色胶原纤维; 模型组可见大量蓝、绿色胶原纤维呈网状排列, 中间可见极少量红色肌纤维; 与模型组比较,

表 1 各组大鼠心功能指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	LVIDd (mm)	LVESD (mm)	LVEF (%)	LVFS (%)	CO (ml/min)
正常组	10	4.02 ± 0.81	2.68 ± 0.43	90.17 ± 2.20	55.85 ± 10.08	76.96 ± 5.06
模型组	11	6.56 ± 1.31*	8.95 ± 2.34*	31.04 ± 4.13*	27.32 ± 2.32*	46.28 ± 2.90*
对照组	11	4.83 ± 0.97*△	5.76 ± 1.19*△	52.76 ± 6.86*△	49.13 ± 8.42*△	55.58 ± 3.12*△
心康低剂量组	13	4.43 ± 1.0△▲	4.40 ± 0.65*△▲	61.09 ± 5.61*△▲	44.80 ± 5.21*△	63.40 ± 5.59*△▲
心康中剂量组	13	5.49 ± 1.58*△▲▼	4.82 ± 0.86*△▲	52.62 ± 7.53*△▼	51.92 ± 8.21*△▼	57.23 ± 3.19*△▼
心康高剂量组	11	5.13 ± 1.23*△▼	7.19 ± 1.25*△▲▼#	40.96 ± 4.19*△▲▼#	32.30 ± 8.75*△▲▼#	43.14 ± 7.94*△▲▼#

注: LVIDd, 左室舒张期内径; LVESD, 左室收缩末期内径; LVEF, 左室射血分数; LVFS, 左心室短轴缩短率; CO, 心输出量; 与正常组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, △ $P < 0.05$; 与对照组比较, ▲ $P < 0.05$; 与心康低剂量组比较, ▼ $P < 0.05$; 与心康中剂量组比较, # $P < 0.05$



正常组

模型组

心康低剂量组

心康中剂量组

心康高剂量组

对照组

图 1 各组大鼠心肌细胞凋亡 TUNEL 染色结果 (×400)

心康低、中、高剂量组及对照组蓝、绿色胶原纤维组织相对较少; 心康低、中、高剂量组与对照组接近。与心康高剂量组比较, 心康低、中剂量组蓝、绿色胶原纤维相对较少, 与红色肌纤维间隔排列。

2.4 各组大鼠心肌组织 Caspase-12、GRP78、CHOP 蛋白表达比较

表 2 示, 与正常组比较, 模型组 Caspase-12、GRP78、CHOP 蛋白表达升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 对照组及心康低、中、高剂量 Caspase-12、GRP78、CHOP 蛋白表达均下降 ($P < 0.05$); 与对照组比较, 心康低、中剂量组 CHOP、Caspase-12 蛋白表达下降 ($P < 0.05$); 与心康低剂量组比较, 心康中剂量组 Caspase-12 蛋白表达下降 ($P < 0.05$); 与心康低、中剂量组比较, 心康高剂量组 CHOP、GRP78、Caspase-12 蛋白表达均升高 ($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠心肌组织 Caspase-12、GRP78、CHOP 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	CHOP	GRP78	Caspase-12
正常组	10	1.25 ± 0.92	1.27 ± 0.23	2.17 ± 0.41
模型组	11	6.47 ± 2.84*	8.40 ± 2.16*	9.49 ± 2.38*
对照组	11	4.15 ± 1.01*△	4.24 ± 1.47*△	5.49 ± 1.98*△
心康低剂量组	13	2.55 ± 0.94*△	4.37 ± 1.25*△	3.95 ± 1.37*△
心康中剂量组	13	3.02 ± 1.07*△	5.10 ± 2.35*△	2.87 ± 1.89*△
心康高剂量组	11	4.36 ± 1.19*△	5.74 ± 2.25*△	6.88 ± 2.77*△

注: CHOP, CCAAT 增强子结合蛋白同源蛋白; GRP78, 葡萄糖调节蛋白 78; Caspase-12, 半胱天冬酶 12; 与正常组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, △ $P < 0.05$; 与对照组比较, ▲ $P < 0.05$; 与心康低剂量组比较, ▼ $P < 0.05$; 与心康中剂量组比较, # $P < 0.05$ 。

2.5 各组大鼠心肌组织 Caspase-12、GRP78、CHOP mRNA 表达比较

表 3 示, 与正常组比较, 模型组 Caspase-12、GRP78、CHOP mRNA 表达升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 对照组及心康低、中、高剂量 Caspase-12、CHOP mRNA 表达均下降 ($P < 0.05$), 对照组和心康中剂量组 GRP78 mRNA 表达下降 ($P < 0.05$); 与对照组比较, 心康中剂量组 CHOP 及心

康高剂量组 Caspase-12 mRNA 表达升高 ($P < 0.05$), 心康中剂量组 Caspase-12、心康高剂量组 CHOP mRNA 表达下降 ($P < 0.05$); 与心康低剂量组比较, 心康中剂量组 CHOP 升高 ($P < 0.05$), 心康高剂量组 CHOP、中剂量组 Caspase-12 mRNA 表达下降 ($P < 0.05$); 与心康中剂量组比较, 心康高剂量 Caspase-12 mRNA 表达升高, CHOP mRNA 表达下降 ($P < 0.05$)。

表 3 各组大鼠心肌组织 Caspase-12、GRP78、CHOP mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	CHOP	GRP78	Caspase-12
正常组	10	1.15 ± 0.16	1.10 ± 0.23	1.11 ± 0.41
模型组	11	5.47 ± 0.84*	1.54 ± 0.58*	2.18 ± 0.49*
对照组	11	2.68 ± 1.04*△	1.24 ± 0.41△	1.32 ± 0.41△
心康低剂量组	13	2.55 ± 0.94*△	1.35 ± 0.27	1.55 ± 0.33△
心康中剂量组	13	3.10 ± 0.65*△	1.31 ± 0.35*△	1.00 ± 0.11△
心康高剂量组	11	1.36 ± 0.19△	1.43 ± 0.32*	1.63 ± 0.34*△

注: CHOP, CCAAT 增强子结合蛋白同源蛋白; GRP78, 葡萄糖调节蛋白 78; Caspase-12, 半胱天冬酶 12; 与正常组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, △ $P < 0.05$; 与对照组比较, ▲ $P < 0.05$; 与心康低剂量组比较, ▼ $P < 0.05$; 与心康中剂量组比较, # $P < 0.05$ 。

3 讨论

慢性心力衰竭在中医学中没有对应的病名, 依据肢体水肿、胸腹水、气促等临床症状历代古医籍中将其类属于“水肿”“喘证”“心悸”等范畴。本病早期主要为心气、心阳亏虚为主; 中期为脾阳受损, 复加肺气亏虚, 水湿内停; 后期肾阳虚衰, 膀胱气化不利, 水饮泛滥。总体病机主要是本虚标实、虚实夹杂。陈可冀^[4]认为, 其病机可用“虚”“瘀”“水”概括。治疗上, 早期益气活血; 中期健脾化饮; 后期温阳利水。心康冲剂以真武汤、升陷汤、及参苓白术散为基础方, 方中白参、黄芪升补下陷之宗气为君; 茯苓、薏苡仁甘淡健脾利水为臣; 生姜皮、大腹皮专利肌肤之水, 砂仁化湿运脾, 陈皮理气, 炮附片温阳化饮, 桂枝温阳化气为佐; 柴胡、升麻提升清阳之气, 桔梗为舟楫之药,

载诸药上达而至病所为使。诸药合用健脾渗湿、温阳化气逐水饮，有效治疗慢性心力衰竭水肿、喘证、心悸等水湿内停之证^[8]。

慢性心力衰竭除表现为水肿外，心室重构是主要的病理现象，表现为心肌细胞肥大、凋亡、心肌间质胶原沉积。内质网具有维持细胞内环境稳定的重要功能^[13]，当细胞遭遇 Ca^{2+} 超载、缺血、缺氧、中毒等情况，发生内质网应激以清除和降解异常物质，起到维持细胞内环境的生理作用^[14]。研究显示，内质网应激是冠状动脉粥样硬化性心脏病、缺血性心脏病、心力衰竭及糖尿病心肌病等心血管疾病发生、发展的共同通路，可诱导心肌细胞肥大、纤维化、凋亡，导致心室重构的发生^[17-18]。内质网应激在真核细胞主要通过内质网伴侣分子 GRP78 来感受内稳态失衡，GRP78 是内质网稳态的感受器，是内质网应激激活的标志性蛋白^[18]。持续严重的内质网应激则激活细胞自噬性死亡或者内质网特征性 CHOP、Caspase-12 通路引起的细胞凋亡^[19]。多项研究证明，心力衰竭诱导内质网应激反应伴随 CHOP、JNK、Caspase-12 三条通路激活并参与了心力衰竭心肌细胞凋亡及心肌纤维化^[5,20-22]。

本研究结果显示，阿霉素腹腔注射造模后大鼠 LVIDd、LVESD 明显升高而 LVFS、LVEF 及 CO 下降，有明显心肌凋亡及心肌纤维化，且 Caspase-12、GRP78、CHOP mRNA 及蛋白表达升高，表明造模后大鼠心功能下降，心室重构中存在内质网应激过度并激活内质网凋亡通路。而给予心康冲剂以后，心康低、中剂量组 LVIDd、LVESD 明显下降，而 LVFS、LVEF 及 CO 上升，心肌凋亡及心肌纤维化减轻，Caspase-12、GRP78、CHOP mRNA 及蛋白表达也下降，提示心康冲剂低、中剂量可以通过下调 Caspase-12、GRP78、CHOP 表达减轻内质网过度激活，从而阻断凋亡通路而抗心室重构，这可能是心康冲剂治疗慢性心力衰竭的机制之一。与对照组比较，心康低、中、高剂量在抗心肌纤维化方面无明显差异，但心康低、中剂量组在抗心肌凋亡及阻断内质网应激性凋亡方面疗效更佳，表现在心康低、中剂量组 CHOP、Caspase-12 蛋白表达及心康中剂量组 Caspase-12 mRNA 表达下降更明显。在心康各剂量组间，心康中剂量较低、高剂量降低 Caspase-12 蛋白及 mRNA 表达更有优势；心康高剂量较心康低、中剂量降低 CHOP mRNA 表达更有优势，说明心康低、中、高剂量在改善心功能及干预内质网应激性凋亡分子作用中有一定差异性，在降低凋亡

分子 Caspase-12、GRP78、CHOP 表达上各有优势，但从整体功效看，心康低、中剂量在降低凋亡分子 Caspase-12、GRP78、CHOP 表达上更有优势。

参考文献

- [1] 中华医学会心血管病学分会, 中华心血管病杂志编辑委员会. 慢性心力衰竭诊断治疗指南 [J]. 中华心血管病杂志, 2007, 35(12): 1076-1095.
- [2] LIU Y, WANG J, QI SY, et al. Reduced endoplasmic reticulum stress might alter the course of heart failure via caspase-12 and JNK pathways [J]. Can J Cardiol, 2014, 30(3): 368-375.
- [3] LIU X, KWAK D, LU Z, et al. Endoplasmic reticulum stress sensor protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) protects against pressure overload-induced heart failure and lung remodeling [J]. Hypertension, 2014, 64(4): 738-744.
- [4] ZHAO H, LIAO Y, MINAMINO T, et al. Inhibition of cardiac remodeling by pravastatin is associated with amelioration of endoplasmic reticulum stress [J]. Hypertens Res, 2008, 31(10): 1977-1987.
- [5] NI L, ZHOU C, DUAN Q, et al. Beta-AR blockers suppress ER stress in cardiac hypertrophy and heart failure [J]. PLoS One, 2011, 6(11): e27294.
- [6] LU H, LU L, XU ZC, et al. Tauroursodeoxycholic acid and 4-phenyl butyric acid alleviate endoplasmic reticulum stress and improve prognosis of donation after cardiac death liver transplantation in rats [J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2014, 13(6): 586-593.
- [7] AYALA P, MONTENEGRO J, VIVAR R, et al. Attenuation of endoplasmic reticulum stress using the chemical chaperone 4-phenylbutyric acid prevents cardiac fibrosis induced by isoproterenol [J]. Exp Mol Pathol, 2012, 92(1): 97-104.
- [8] 宋亚妮, 谭雄, 聂孝平. 心康冲剂对慢性心力衰竭大鼠血浆 RAAS 的影响 [J]. 中医药导报, 2015, 21(1): 21-23.
- [9] 张辉. 心康冲剂对慢性心力衰竭大鼠 AQP2 mRNA、AVPV2 mRNA 表达的影响 [J]. 湖南中医药大学学报, 2014, 34(10): 20-23.
- [10] 张辉, 聂孝平, 毛湘屏, 等. 心康冲剂对慢性心衰大鼠 AVP mRNA 表达的影响 [J]. 中医药导报, 2015, 21(14): 70-74.
- [11] 徐建虎, 张琦, 杨子庆, 等. 阿霉素诱导大鼠慢性心衰模型的制备 [J]. 宁夏医科大学学报, 2016, 38(3): 348-351.
- [12] XU K, GEORGE I, KLOTZ S, et al. Erythropoietin derivative improves left ventricular systolic performance and attenuates left ventricular remodeling in rats with myocardial infarct-induced heart failure [J]. J Cardiovasc Pharmacol,

2010, 56(5): 506-512.

- [3] 贺石林, 王键, 王净净. 中医科研设计与统计学 [M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 2006: 48.
- [4] 李立志, 陈可冀. 治疗充血性心力衰竭经验 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2006, 4(2): 136-138.
- [5] HIRAMATSU N, KASAI A, DU S, et al. Rapid, transient induction of ER stress in the liver and kidney after acute exposure to heavy metal: evidence from transgenic sensor mice [J]. FEBS Lett, 2007, 581(10): 2055-2059.
- [6] 钱志强, 杨丹莉. 内质网应激在心室重构中作用的研究进展 [J]. 中国新药与临床杂志, 2016, 35(9): 615-620.
- [7] TSANG KY, CHAN D, BATEMAN JF, et al. In vivo cellular adaptation to ER stress: Survival strategies with double-edged consequences [J]. J Cell Sci, 2010, 123(13): 2145-2154.
- [8] 刘东雷, 王建军, 杨洋, 等. 自噬在顺铂诱导的食管癌

细胞死亡中的作用 [J]. 中华实验外科杂志, 2010, 27(9): 1198-1199.

- [9] LU H, LU L, XU ZC, et al. Tauroursodeoxycholic acid and 4-phenyl butyric acid alleviate endoplasmic reticulum stress and improve prognosis of donation after cardiac death liver transplantation in rats [J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2014, 13(6): 586-593.
- [10] 陈鹏, 杨成明, 曾春雨, 等. 心肌梗死后心力衰竭小鼠心肌组织内质网应激相关凋亡途径的研究 [J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26(6): 1069-1074.
- [11] NI L, ZHOU C, DUAN Q, et al. Beta-AR blockers suppresses ER stress in cardiac hypertrophy and heart failure [J]. PLoS One, 2011, 6(11): e27294.
- [12] 何云云, 刘春蕾, 李鑫, 等. 培哚普利对心肌梗死大鼠内质网应激分子 GRP78 和 caspase-12 表达的影响 [J]. 解放军医学杂志, 2014, 39(1): 1-4.

Impact of *Xinkang Granule* (心康冲剂) on Ventricular Remodeling in Rats with Chronic Heart Failure

LIU Rongfang¹, SUN Ling¹, ZHANG Zhuhui¹, TAN Xiong², ZHANG Hui², YANG Ting¹, WU Lingjiao¹, MAO Yilin²

(1. Graduate School, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, 410208; 2. Second Affiliated Hospital, Hunan University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Xinkang Granule* in treating chronic heart failure (CHF). **Methods** Ninety Sprague Dawley (SD) rats were randomized into a normal group (n = 10), a model group (n = 16), a control group (n = 16), and *Xinkang* low, medium and high dose groups (n = 16 in each). Rats in all groups were made CHF models by adriamycin 1.5 mg/kg intraperitoneal injection except those in the normal group. The *Xinkang* low, medium and high dose groups were given 0.5, 1 and 2 g/(kg · d) of *Xinkang Granule*, respectively. The control group was given 0.06 g/(kg · d) of *Qili Qiangxin Capsule* (芪苈强心胶囊). The normal group and the model group were given equivalent normal saline by gavage. All groups were treated once every day for 8 weeks. Heart function of rats was examined. Cardiomyocyte apoptosis was examined by TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) stain. Myocardial fibrosis was examined by Masson stain. The expression levels of myocardium caspase 12 (Caspase-12), glucose regulated protein 78 (GRP78), CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein (CHOP) and mRNA were detected by methods of real-time polymerase chain reaction (PCR) and immunohistochemistry. **Results** Compared with those in the model group, cardiomyocyte apoptosis and fibrosis in the *Xinkang* low, medium and high dose groups decreased. Compared with those in the model group, left ventricular diastolic diameter (LVIDd), left ventricular end systolic diameter (LVESD), Caspase-12, GRP78 and CHOP protein decreased in the control group, as well as the *Xinkang* low and medium dose groups, Caspase-12, GRP78 and CHOP mRNA decreased in the *Xinkang* medium dose group, but left ventricle ejection fraction (LVEF), fractional shortening of the left ventricular minor semi axis (LVFS) and cardiac output (CO) increased in the *Xinkang* medium dose group ($P < 0.05$). Compared with those in the control group, LVIDd and LVESD decreased but LVEF and CO increased in the *Xinkang* low dose group, LVESD and Caspase-12 expression decreased but LVIDd and CHOP mRNA expression increased in the *Xinkang* medium dose group, and the expressions of CHOP and Caspase-12 mRNA decreased in the *Xinkang* low and medium dose groups ($P < 0.05$). **Conclusion** *Xinkang Granule* might down-regulate the expressions of myocardium Caspase-12, GRP78 and CHOP, reduce endoplasmic reticulum stress apoptosis and inhibit ventricular remodeling, which might be one of the mechanisms of it in treating CHF. Low and medium dose of *Xinkang Granule* is more effective.

Keywords chronic heart failure; ventricular remodeling; endoplasmic reticulum stress; glucose regulated protein 78; caspase 12; CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein; *Xinkang Granule*

(收稿日期: 2017-05-06; 修回日期: 2017-07-17)

编辑: 王利芬