

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2018.01.014

祛痰通阳汤对慢性心力衰竭模型大鼠超声心动图及血清 Ang II 含量、心肌组织 AT1 mRNA 表达的影响

尚莉莉¹, 全爱君¹, 王馨², 赵惠¹, 邢艳丽¹, 王爽^{*}

(1. 黑龙江中医药大学附属第二医院, 黑龙江省哈尔滨市南岗区果戈里大街 411 号, 150001; 2. 黑龙江中医药大学附属第二医院哈南分院)

摘要 目的 探讨祛痰通阳汤治疗慢性心力衰竭的可能作用机制。方法 将 90 只雄性 Wistar 大鼠随机分为正常组、模型组、卡托普利组和中药低、中、高剂量组, 每组 15 只。除正常组外, 其余各组均给予注射用盐酸多柔比星阿霉素腹腔注射制备慢性心力衰竭大鼠模型。造模后卡托普利组给予卡托普利片 4.375 mg/(kg·d) 灌胃, 中药低、中、高剂量组每日分别给予祛痰通阳汤水煎液 (浓度 1.85 mg/ml) 1.8、3.6、7.2 ml 灌胃, 正常组和模型组给予 3.6 ml 蒸馏水灌胃, 每天灌胃 1 次, 连续 4 周。测定各组大鼠血清血管紧张素 II (Ang II) 含量及心肌组织中血管紧张素 II 1 型受体 (AT1) mRNA 水平, 造模前、造模后及给药后检测各组大鼠超声心动图参数 [包括左心室舒张末期内径 (LVEDD)、每搏心输出量 (SV) 和射血分数 (EF)] 变化情况。结果 与正常组比较, 模型组大鼠血清 Ang II、心肌组织 AT1 mRNA 水平、LVEDD 显著增加, SV、EF 降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 治疗后卡托普利组和中药中、高剂量组大鼠血清 Ang II 含量、心肌组织 AT1 mRNA 水平降低, LVEDD 降低, SV 和 EF 均增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 祛痰通阳汤可降低慢性心力衰竭大鼠血清中 Ang II 含量, 抑制 AT1 mRNA 表达, 改善心功能, 从而改善心肌重构。

关键词 慢性心力衰竭; 祛痰通阳汤; 血管紧张素 II; 超声心动图

慢性心力衰竭 (chronic heart failure, CHF) 是由于心脏结构及功能改变引起泵血不足, 导致机体代谢障碍而引起的一系列临床症状^[1]。神经内分泌系统的过度激活对心力衰竭的发生、发展意义重大^[2]。研究证实, 肾素-血管紧张素-醛固酮系统 (RAAS) 通过血管紧张素 II (Ang II) 实现对血压、体液容量及电解质平衡的调节作用^[3]。Ang II 过度释放可诱导心室重构, 致使心脏结构和功能失常^[4-5]。血管紧张素 II 1 型受体 (AT1) 在 Ang II 发挥作用过程中起到关键作用, 所以阻止 AT1 基因的表达可以有效减少 Ang II 的释放及其生物学效应的发挥^[6-7], 并且对 CHF 的诊断、严重程度、预后和药物疗效的评定具有重要意义。CHF 在中医学中属于“胸痹”“喘证”“水肿”“心悸”等范畴, 我们临床采用祛痰通阳汤治疗 CHF 疗效较

好^[8]。本研究采用祛痰通阳汤干预阿霉素致 CHF 大鼠, 观察其对大鼠血清 Ang II 含量、心肌组织 AT1 mRNA 表达水平和超声心动图的影响, 以探讨祛痰通阳汤治疗 CHF 的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级雄性 Wistar 大鼠 90 只, 6~8 周龄, 体重 (200±20) g, 由上海加科生物科技有限责任公司提供, 实验动物许可证号: SCXK-(沪)2015-0005。适应性饲养 1 周, 自由进食和饮水。

1.2 实验药物

祛痰通阳汤组成: 薤白 15 g, 桂枝 15 g, 瓜蒌 30 g, 木香 10 g, 厚朴 20 g, 丹参 30 g, 黄精 35 g, 炙甘草 30 g, 以上药物均采购自黑龙江中医药大学附属第二医院, 每剂药重 185 g, 加水 5 倍量, 煎煮 30 min, 用直火加热法煎煮两遍, 药液合并, 浓度为 1.85 mg/ml。卡托普利片: 每片 12.5 mg, 批号: C1420011098, 中美上海施贵宝制药有限责任

基金项目: 2014 年哈尔滨市应用技术与开发项目 (2014RFQJ155)

* 通讯作者: 1252798840@qq.com, 18646026917

公司生产。注射用盐酸多柔比星 (阿霉素): 每支 10 mg, 批号: 151001, 浙江海正药业股份有限公司。

1.3 主要试剂及仪器

大鼠 Ang II 检测试剂盒 (货号: CEA005Ra), 中国 USCN 公司; Super M-MLV 反转录酶 (货号: PR6502), 中国 BioTeke 公司; 高纯总 RNA 快速提取试剂盒 (货号: RP1201), 中国 BioTeke 公司; RNase 固相清除剂 (货号: 3090-250), 中国天恩泽公司; Powder 琼脂糖 (货号: 111860), 法国 Biowest 公司; 2 × Power Taq PCR MasterMix (货号: PR1702), 中国 BioTeke 公司; 二甲苯 (货号: X112051)、无水乙醇 (货号: 10009218), 中国国药集团化学试剂有限公司; 苏木精 (货号: H8070), 中国 Solarbio 公司。

超纯水系统 (型号 NW10LVF), 香港 Heal Force 公司; -70℃ 超低温冰箱 (型号 DW HL-668), 安徽中科美菱公司; 酶标仪 (型号 ELX-800), 美国 BioTek 公司; 电热恒温培养箱 (型号 DH36001B), 天津泰斯特公司; 超速冷冻离心机 (型号 H-2050R), 长沙湖南湘仪公司; PCR 仪 (型号 Life Express), 杭州 BIOER 公司; 电泳仪 (型号 DYY-6D), 北京六一公司; 真空干燥箱 (型号 DZF-6050), 上海 SYSBERY 公司; 紫外分光光度计 (型号 NANO 2000), 美国 Thermo 公司; 彩色多普勒超声心动仪 (GEL-400 型), 美国通用公司; 石蜡切片机 (型号 RM2235), 德国 Leica 公司; 显微镜 (型号 DP73), 日本 Olympus 公司。

1.4 分组与造模

90 只大鼠采用随机数字表法分为正常组、模型组、卡托普利组及中药低、中、高剂量组, 每组 15 只。除正常组外, 其余各组选用阿霉素 (浓度 2 mg/ml) 2 ml/kg 腹腔注射, 每周 1 次, 共 6 周, 制备 CHF 模型^[9-10]; 正常组给予等体积生理盐水腹腔注射。

1.5 给药方法

各组大鼠造模后, 卡托普利组给予卡托普利片 4.375 mg/(kg·d) 灌胃, 相当于成人临床等效剂量; 中药低、中、高剂量组每日分别给予祛痰通阳汤水煎液 1.8 ml (相当于成人临床等效剂量的 0.5 倍)、3.6 ml (相当于成人临床等效剂量)、7.2 ml (相当于成人临床等效剂量的 2 倍) 灌胃; 正常组、模型组给予 3.6 ml 蒸馏水灌胃, 每天灌胃 1 次, 连续给药 4 周。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 超声心动图检测 造模前、造模后及给药后采用 GEL-400 彩色多普勒超声心动仪检测各组大鼠超声心动图参数变化情况, 包括左心室舒张末期内径 (LVEDD)、每搏心输出量 (SV) 和射血分数 (EF)。

1.6.2 血清 Ang II 含量测定 腹主动脉采血, 将血样静置 30min 后, 3500r/min 离心 10min, 收集上清液, 采用放射免疫法检测血清 Ang II 含量, 按试剂盒说明书步骤操作。

1.6.3 心肌组织 AT1 mRNA 水平检测 取左心室心肌组织于液氮中冷冻后在 -70℃ 条件下保存, 采用 RT-PCR 法测定, 以 β -actin 为内参照, 基本步骤如下: 1) 总 RNA 提取: 利用总 RNA 提取试剂盒提取样本总 RNA; 2) 反转录: 将得到的 RNA 样本进行反转录以得到对应的 cDNA; 3) PCR 检测: 建立 PCR 反应体系并设计 PCR 反应程序; 4) 电泳分析, 并对 RT-PCR 数据进行分析。引物序列由中国 BioTeke 公司设计合成, AT1: 上游 TAA-CAACTGCCTGAACCCCTCTGT, 下游 GCTTTGAAC-CTGTCACTCCACCT, 目的条带 214bp; β -actin: 上游 GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTAGC, 下游 GGC-CGGACTCATCGTACTCCTGCTT, 目的条带 155bp。经 Alpha Imager HP 荧光和凝胶成像系统软件 (美国 Protein Simple 公司) 分析得知各组大鼠心肌组织中 AT1 mRNA 的相对表达量。

1.6.4 心肌组织病理形态学变化 取各组心肌组织, 4% 多聚甲醛固定, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 浸蜡, 石蜡包埋切片, 二甲苯进行脱蜡, 梯度浓度的乙醇进行水化, Harris 苏木精染色 3 ~ 5 min, 蒸馏水冲洗 1 min, 75% 盐酸乙醇分化数秒钟, 蒸馏水冲洗 10 min 至细胞核呈蓝色, 0.5% 伊红水溶液 1 min, 梯度浓度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 显微镜下观察并拍照。

1.7 统计学方法

采用 SPSS17.0 统计软件进行统计学分析, 数据用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

实验过程中卡托普利组和中药低、中剂量组分别死亡大鼠 2 只、1 只、1 只, 解剖探查未发现与实验相关的死亡原因。

2.1 各组大鼠血清 Ang II 含量及心肌组织 AT1 mRNA 表达比较

表 1 示, 与正常组比较, 模型组血清 Ang II 含量及心肌组织 AT1 mRNA 升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 卡托普利组及中药高、中剂量组血清 Ang II 含量及心肌组织 AT1 mRNA 均不同程度降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 卡托普利组与中药中、高剂量组比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠血清 Ang II 含量及心肌组织 AT1 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Ang II (pg/mL)	AT1 mRNA
正常组	15	237.45 ± 49.89	1.00 ± 0.01
模型组	15	643.27 ± 128.69*	2.53 ± 0.22*
卡托普利组	13	291.21 ± 59.79 ^{△△}	1.49 ± 0.11 [△]
中药低剂量组	14	466.46 ± 98.02	2.15 ± 0.19
中药中剂量组	14	376.71 ± 78.07 [△]	1.32 ± 0.13 [△]
中药高剂量组	15	337.09 ± 70.43 ^{△△}	1.22 ± 0.21 [△]

注: Ang II, 血管紧张素 II; AT1, 血管紧张素 II 1 型受体; 与正常组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

2.2 各组大鼠不同时间超声心动图参数比较

表 2 示, 造模前各组大鼠 LVEDD、SV、EF 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 造模后与正常组比较, 其余各组 LVEDD 增加, SV、EF 降低 ($P < 0.01$)。治疗后与正常组比较, 模型组 LVEDD 增加, SV、EF 降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 卡托普利组、中药中剂量组、中药高剂量组 LVEDD

降低, SV 和 EF 增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与卡托普利组比较, 中药中剂量组 EF 降低 ($P < 0.05$); 卡托普利组、中药中剂量组、中药高剂量组 LVEDD、SV 比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 各组大鼠心肌组织病理形态学情况

图 1 示, 正常组大鼠心肌纤维排列规整, 心肌纤维间间隙正常; 胞质胞核染色均匀, 间隙间未见炎细胞浸润及充血。模型组心肌纤维排列紊乱, 心肌细胞肿胀断裂, 细胞核固缩深染。各给药组较模型组心肌细胞病理改变均有不同程度改善, 心肌细胞排列较模型组规整, 局部心肌纤维肿胀、融合、断裂, 其中卡托普利组改善效果最明显, 中药高剂量组次之, 中药中剂量组和中药低剂量组改善效果略差。

3 讨论

祛痰通阳汤是根据《金匱要略》中枳实薤白桂枝汤加减化裁而成, 方中瓜蒌涤痰散结, 开胸通痹; 丹参通行血脉, 祛瘀止痛, 与瓜蒌相配, 祛痰通络, 化瘀活血, 痰瘀同治。薤白辛温, 通阳散结, 化痰散寒, 行气止痛, 能散胸中凝滞之阴寒、化上焦结聚之痰浊, 乃治疗胸痹之要药; 桂枝善通阳散寒, 降逆平冲, 温阳行气利水, 二药共助瓜蒌温通胸阳、祛痰通痹。佐以黄精平补阴阳, 益气健脾, 以防温燥之气伤阴; 厚朴燥湿化痰, 下气除满; 木香辛行苦泄, 芳香性温, 通畅气机; 炙甘草补

表 2 各组大鼠不同时间超声心动图参数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	例数	LVEDD (mm)	SV (μl)	EF (%)
正常组	造模前	15	3.14 ± 0.55	350.62 ± 35.87	62.10 ± 8.89
	造模后	15	3.13 ± 0.59	374.26 ± 62.76	60.20 ± 6.36
	治疗后	15	3.19 ± 0.38	367.39 ± 48.97	60.13 ± 5.14
模型组	造模前	15	3.08 ± 0.50	355.10 ± 42.16	61.04 ± 5.74
	造模后	15	6.53 ± 0.61*	144.88 ± 31.35*	32.59 ± 5.20*
	治疗后	15	6.24 ± 1.01*	142.55 ± 25.74*	24.78 ± 4.05*
卡托普利组	造模前	13	3.10 ± 0.71	368.34 ± 87.17	61.93 ± 6.79
	造模后	13	6.04 ± 1.00*	149.94 ± 30.12*	31.30 ± 9.21*
	治疗后	13	4.09 ± 0.54 ^{△△}	317.50 ± 65.52 ^{△△}	48.29 ± 6.83 ^{△△}
中药低剂量组	造模前	14	3.04 ± 0.68	343.13 ± 59.54	68.13 ± 5.93
	造模后	14	6.54 ± 0.75*	139.23 ± 32.45*	29.02 ± 5.83*
	治疗后	14	5.60 ± 1.00	174.21 ± 36.58	29.48 ± 4.98
中药中剂量组	造模前	14	3.05 ± 0.59	360.22 ± 85.22	63.87 ± 7.83
	造模后	14	6.50 ± 0.85*	136.08 ± 27.66*	31.04 ± 6.46*
	治疗后	14	4.76 ± 0.71 [△]	242.16 ± 46.55 ^{△△}	33.63 ± 4.94 ^{△△▲}
中药高剂量组	造模前	15	3.72 ± 0.60	363.39 ± 68.82	67.65 ± 4.64
	造模后	15	6.52 ± 1.19*	125.63 ± 20.22*	30.70 ± 3.41*
	治疗后	15	4.49 ± 0.89 ^{△△}	298.44 ± 26.77 ^{△△#}	47.99 ± 5.19 ^{△△}

注: LVEDD, 左室舒张末期径; SV, 每搏输出量; EF, 射血分数; 与正常组同时时间比较, * $P < 0.01$; 与模型组同时时间比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$, 与卡托普利组同时时间比较, $\Delta\Delta P < 0.05$

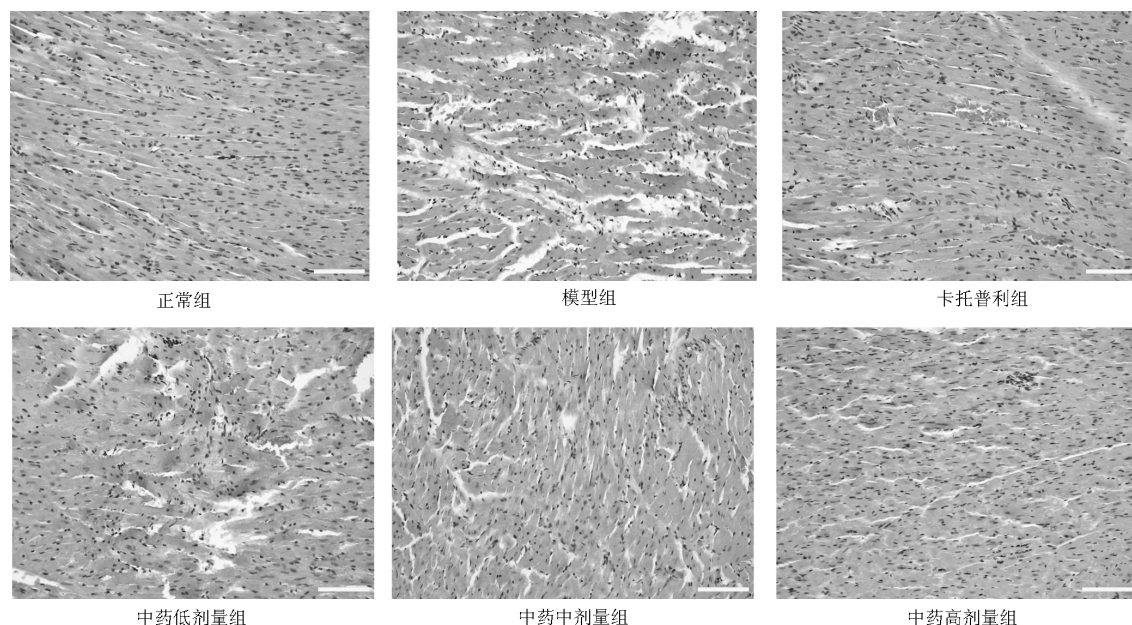


图 1 各组大鼠心肌组织 HE 染色病理图 (×200)

中益气,和营复脉,调和诸药。各药配伍共奏胸阳振,痰浊降,阴寒消,瘀血去,气机畅,助行心血之功效。

CHF 是几乎所有心血管疾病发展的终末事件,RAAS 系统的过度激活导致心室重塑和心肌损伤,Ang II 与 AT1 受体结合,通过细胞信息传导及多种因子参与改变心脏结构,包括心肌肥厚、细胞凋亡及心肌间质纤维化,降低心肌顺应性,导致心脏舒缩功能障碍; Ang II 也通过血流动力学改变促进心肌重构的发生与发展,以此形成恶性循环^[1]。已有研究证实,心力衰竭大鼠血清中 Ang II 随着心力衰竭的进展而升高^[11]。AT1 mRNA 及其下游信号传导因子蛋白激酶 C (PKC) 在其发挥生物效应的过程中起到关键作用^[12]。PKC 是一种 Ca^{2+} 磷脂酶依赖性蛋白质激酶,介导心肌肥大的信号分子,可导致心脏功能减低^[13],其主要机制是作用于心肌细胞膜上 AT1 受体,使细胞内 Ca^{2+} 浓度增加,血管平滑肌收缩增加,致使心室容量负荷、压力负荷增加^[14]。因此,阻断 RAAS 系统的过度激活,延缓心肌重构的发展是干预 CHF 的关键。

本研究采用腹腔注射阿霉素方法建立 CHF 大鼠模型,该模型导致心肌收缩力下降,与人 CHF 病理表现相似,是研究 CHF 的经典动物模型^[15]。研究结果显示,与正常组相比,模型组大鼠 LVEDD 增加,SV、EF 降低,说明造模成功。模型组大鼠血清 Ang II 含量及心肌组织中 AT1 mRNA 表达升高,在各药物干预后,中药高、中剂量组及卡

托普利组大鼠血清 Ang II 含量减少,且心肌组织 AT1 mRNA 的表达也降低,同时大鼠 LVEDD 降低、SV 及 EF 增加,大鼠心肌组织病理形态较模型组心肌细胞病理改变亦有不同程度改善。说明祛痰通阳汤可通过降低大鼠血清 Ang II 含量,减少心肌组织 AT1 mRNA 表达,抑制心力衰竭过程中 RAAS 系统的过度激活,延缓心脏正常结构改变,改善心脏舒缩功能,增加 SV、EF 值,减轻心室重塑,以达到治疗 CHF 的目的,这可能是其治疗 CHF 的作用机制之一。

参考文献

- [1] YANCY CW, JESSUP M, BOZKURT B, et al. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: executive summary: a report of the American college of cardiology foundation/American heart association task force on practice guidelines [J]. Circulation, 2013, 128(16): 1810-1852.
- [2] GEORGE J, STRUTHERS AD, LAHG CC. Modulation of Renin-Angiotensin-aldosterone system in heart failure [J]. Curr Atheroscler Rep, 2014, 16(4): 403.
- [3] ZYCKER IH, HAACK KK. The central reninangiotensin system and sympathetic nerve activity in chronic heart failure [J]. Clin Sci(Lond), 2014, 126(10): 695-706.
- [4] 常文静, 陈曦. 血管紧张素 II 1 型受体基因表达的稳定性研究 [J]. 中国循环杂志, 2001, 15(2): 109-111.
- [5] TAEGTMEYER H. Cardiac metabolism as a target for the treatment of heart failure [J]. Circulation, 2004, 110(8): 894-896.
- [6] 孙韬, 臧崇森, 许钟镐. 血管紧张素 II 1 型受体功能研究进展 [J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(14): 3591-

3594.

喻少峰. 四逆汤治疗心力衰竭临床疗效及其对血浆 BNP 水平的影响 [J]. 河南中医, 2014, 34(5): 801-802.

赵惠, 刘凯, 孙宏, 等. 祛痰通阳汤治疗慢性心力衰竭的临床观察 [J]. 中医药信息, 2011, 28(4): 109-110.

MAISEL AS, KRISHNASWAMY P, NOWAK RM, et al. Rapid measurement of B type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure [J]. N Engl J Med, 2002, 347(3): 161-167.

HUNT SA, ABRAHAM WT, CHIN MH, et al. 2009 focused update incorporated into the ACC/AHA 2005 guidelines for the diagnosis and management of heart failure in adults; a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on practice guidelines: developed in collaboration with the international society for heart and lung transplantation [J]. J Am Coll Cardiol, 2009, 53(15): e1-e90.

KAWANO H, DO YS, KAWANO Y, et al. Angiotensin II has multiple profibrotic effects in human cardiac fibroblasts [J]. Circulation, 2000, 101(10): 1130-1137.

DOENST T, NGUYEN TD, ABEL ED. Cardiac metabolism in heart failure: implications beyond ATP production [J]. Circ Res, 2013, 113(6): 709-724.

DOSTAL DE, BOOZ GW, BAKER KM. Angiotensin II signalling pathways in cardiac fibroblasts: Conventional versus novel mechanisms in mediating cardiac growth and function [J]. Mol Cell Biochem, 1996, 157(1-2): 15-21.

RIEHLE C, ABEL ED. Insulin signaling and heart failure [J]. Circ Res, 2016, 118(7): 1151-1169.

GOLDENTHAL MJ. Mitochondrial involvement in myocyte death and heart failure [J]. Heart Fail Rev, 2016, 21(2): 137-155.

Effect of *Qutan Tongyang Decoction* (祛痰通阳汤) on Echocardiography, Serum Ang II Level and Expression of AT1 mRNA in Myocardium of Chronic Heart Failure Model Rats

SHANG Lili¹, QUAN Aijun¹, WANG Xin², ZHAO Hui¹, XING Yanli¹, WANG Shuang¹

(1. Second Affiliated Hospital, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin, 150001; 2. Hanan Branch, Second Affiliated Hospital, Heilongjiang University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Qutan Tongyang Decoction* (祛痰通阳汤) in the treatment of chronic heart failure. **Methods** Ninety male Wistar rats were randomly divided into normal group, model group, captopril group, and low, middle and high dose Chinese medicine groups, with 15 rats in each group. Except for normal group, rats were given intraperitoneal injection of doxorubicin hydrochloride injection to prepare the chronic heart failure rat model. After modeling, captopril group was given captopril tablets 4.375 mg/(kg·d) by gavage. Low, middle and high dose Chinese medicine groups were respectively given 1.8, 3.6 and 7.2 ml *Qutan Tongyang Decoction* (concentration 1.85 mg/ml) by gavage each day. Normal group and model group were given 3.6 ml distilled water by gavage, once a day and lasted for 4 weeks. The levels of serum Ang II and AT1 mRNA in myocardium in each group were determined. Echocardiography parameters including left ventricular end diastolic diameter (LVEDD), stroke volume (SV) and ejection fraction (EF) were detected before and after modeling and after administration. **Results** Compared with normal group, the level of serum Ang II and myocardial AT1 mRNA and LVEDD were significantly increased in the model group and the SV and EF were decreased in the model group ($P < 0.01$). Compared with the model group, the levels of serum Ang II and myocardial AT1 mRNA and LVEDD in captopril group and middle and high dose Chinese medicine groups were decreased and SV and EF in captopril group and middle and high dose Chinese medicine group were both increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** *Qutan Tongyang Decoction* could reduce the level of serum Ang II in the rats with chronic heart failure, inhibit the expression of AT1 mRNA and improve the cardiac function so that the myocardial remodeling could be improved.

Keywords chronic heart failure; *Qutan Tongyang Decoction*; angiotensin II; echocardiography

(收稿日期: 2017-05-30; 修回日期: 2017-08-22)

编辑: 邓 媛