

实验研究

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2015.21.017

坎离颗粒对压力负荷超载所致舒张性心力衰竭大鼠心肌肌质网钙转运的影响

刘永明¹, 徐裕亚², 那木海³, 腾名子⁴, 吴大正⁵, 蒋梅先^{*}

(1. 上海中医药大学附属曙光医院, 上海市浦东新区张衡路 528 号, 201203; 2. 浙江省宁波市镇海区中医院; 3. 蒙古乌兰巴托 Songdo 医院; 4. 江苏省无锡市第三人民医院; 5. 上海中医药大学中药所)

[摘要] 目的 探讨坎离颗粒改善舒张性心力衰竭大鼠左室舒张功能的可能作用机制。方法 56 只 Wistar 大鼠随机分为假手术组、模型组、中药组和缬沙坦组, 每组 14 只。除假手术组外其余各组采用腹主动脉缩窄法制成心脏压力负荷超载心力衰竭模型。术后 1 周中药组给予坎离颗粒溶液 6.75 g/(kg·d) 灌胃, 缬沙坦组给予缬沙坦混悬液 7.2 μg/(kg·d) 灌胃, 假手术组、模型组给予等量双蒸水灌胃, 每日 1 次, 共干预 32 周。观察各组大鼠心肌肌质网形态学变化、钙摄取功能、钙 ATP 酶 2a (SERCA2a) 活性及其蛋白表达。结果 与假手术组比较, 模型组大鼠心肌肌质网钙摄取速率显著降低, 心肌组织 SERCA2a 活性降低, SERCA2a 蛋白表达增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 心肌肌质网明显减少, 线粒体空化严重。与模型组比较, 中药组心肌肌质网钙摄取速率提高, SERCA2a 活性、蛋白表达明显增高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 心肌肌质网、线粒体结构完好。结论 坎离颗粒可能通过增加心肌组织 SERCA2a 蛋白和活性、促进心肌肌质网钙摄取速率, 从而改善舒张性心力衰竭大鼠左心室舒张功能。

[关键词] 舒张性心力衰竭; 坎离颗粒; 左室舒张功能; 心肌细胞; 肌质网; 钙转运

舒张性心力衰竭 (diastolic heart failure, DHF) 重要的病理机制之一是由于舒张期心肌肌质网的 Ca^{2+} 摄取能力减弱、胞质内游离 Ca^{2+} 浓度下降速度减慢所致, 使舒张期心室的主动松弛能力受损和心室顺应性降低, 导致心室在舒张期充盈障碍, 从而造成左室舒张末压增高而发生心力衰竭^[1-2]。到目前为止, 现代医学对 DHF 缺乏有效的治疗和预防手段, 关于 DHF 的多中心临床实验几乎都显示中性或阴性结果^[3-6]。我们前期研究发现, 坎离颗粒干预压力负荷超载所致心力衰竭大鼠, 能显著改善模型鼠的左室舒张功能^[7], 推测其机制可能与改善心肌肌质网钙转运有关。本研究运用腹主动脉缩窄诱导的压力过载性 DHF 大鼠模型, 观察坎离颗粒对 DHF 大鼠肌质网钙转运的影响。

1 材料与方法

1.1 动物

雄性 Wistar 大鼠 56 只, 清洁级, 体重 200 ~

220 g, 购自中国科学院上海实验动物中心, 实验动物合格证号: SCXK (沪) 2008-0016。

1.2 药物

坎离颗粒: 主要由黄芪、炮附片、葶苈子、车前子、白术、茯苓、白芍等 11 味中药组成 (处方涉及保密, 由上海中医药大学附属曙光医院制剂室完成制剂工艺并制成浸膏), 使用时将坎离颗粒浸膏配成 0.675 g/ml 的水溶液。缬沙坦: 80 mg/片, 北京诺华制药有限公司, 批号: X0584, 碾碎, 过药典 100 目筛后, 制成 0.72 g/L 浓度的缬沙坦混悬剂。戊巴比妥钠, 德国 Merck 公司, 批号: 20130112。

1.3 主要试剂

超微量 ATP 酶测试盒 (南京建成科技有限公司, 批号 20141118); 钙荧光探针 Indo-1 (Sigma 公司, 货号 57182); GAPDH 一抗 (Abcam 公司, 货号 54620); 肌质网钙 ATP 酶 2a (SERCA2a) 一抗 (ABR 公司, 货号 007-126); HRP 标二抗 (羊抗小鼠, Santa Cruz 公司, 货号 C0104); HRP 标二抗 (羊抗兔, Chemicon 公司, 货号

基金项目: 国家自然科学基金 (81102671); 上海市高级中西医结合人才培养项目 (ZYSNXD012-RC-ZXY002)

* 通讯作者: jmx591@126.com, 13817974379

25050142); Western Blot ECL 超敏发光液 (Amersham 公司, 货号 62)。

1.4 仪器

ADIML740 型 PowerLab/4SP 生物信号处理和分析系统 (澳大利亚 ADInstruments 公司); Chart4.0 (Powerlab/4SP) 记录和分析软件 (澳大利亚 ADInstruments 公司); 尾动脉血压测定分析系统 BP-98A (北京软隆科技有限责任公司); F-4500 荧光分光光度计 (日本日立公司); VARIOSKAN FLASH 酶标仪 (美国 Thermo 公司); BRANSON 超声细胞破碎仪 (美国 Sonics 公司); 水平、垂直电泳及转膜装置 (美国 Bio-Rad 公司); FR-200A 全自动紫外与可见分析装置-凝胶成像分析系统 (上海复日科技有限公司); 图像扫描仪 (日本惠普公司); Smart View 图像分析软件 (上海复日科技); H7500 透射电镜 (日本日立公司)。

1.5 动物分组及造模方法

56 只大鼠按体重采用随机数字表法分为假手术组、模型组、中药组、缬沙坦组, 每组 14 只。除假手术组外其余各组参照文献 [7] 采用腹主动脉缩窄法制成心脏压力负荷超载心力衰竭模型。具体步骤如下: 实验大鼠手术前 12h 禁食不禁水, 以 2% 戊巴比妥钠按 35 mg/kg 腹腔注射麻醉后开腹, 切口约 1.5 cm, 在双侧肾动脉间分离该处腹主动脉, 将直径约为 0.7 mm 的银夹套入, 使之狭窄, 缝合腹壁, 常规消毒。假手术组分离双侧肾动脉间腹主动脉不套入银夹, 其余步骤与模型动物处理相同。

1.6 给药方法

所有大鼠术后饲养 1 周后开始干预, 中药组给予坎离颗粒溶液 6.75 g/(kg·d), 缬沙坦组给予缬沙坦混悬液 7.2 μg/(kg·d), 假手术组、模型组给予等量双蒸水。各组均每日灌胃 1 次, 共干预 32 周。

1.7 观察指标与方法

末次灌胃后 24 h, 以 2% 戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔注射麻醉实验鼠后, 快速打开胸腔, 从主动脉根部离断心脏, 迅速剪去心底部大血管后心脏称重; 在充氧的 K-H 液中剪去右室、右房、左房, 快速左室称重; 在心尖部取 4 块 100 mg 心肌组织, 分别置于 EP 管中液氮迅速冷冻 (其中 1 份立即进行肌质网钙转运功能试验, 其余 3 份置于 -80℃ 冰箱冷冻, 用于分子生物学检测); 取左室后壁薄层肌条 1 块置于丙二醛 -4℃ 保存并送电镜检测。

1.7.1 心肌肌质网钙摄取功能检测 配制心肌匀浆液, 离心匀浆液 (1600 r/min, 2℃ 离心,

10 min), 然后吸取上清液, Bradford 法定蛋白浓度; 以 MgATP 启动肌质网 Ca^{2+} 的摄取, 囊泡外游离 Ca^{2+} 浓度不变提示肌质网摄取活动结束, 根据囊泡外游离 Ca^{2+} 对应于时间变化曲线中负的斜率得出肌质网 Ca^{2+} 摄取速率, 用蛋白浓度作校正^[8-9]。

1.7.2 心肌组织 SERCA2a 活性测定 采用微量 ATP 酶试剂盒, 取粗制的心肌匀浆液, 定磷法检测 SERCA2a 活性。

1.7.3 心肌组织 SERCA2a 蛋白测定 取 200 mg 左心肌组织制备匀浆液, 采用 Western blotting 法测定蛋白; 使用图像扫描仪进行胶片扫描, 再采用 SmartView 图像分析软件对蛋白条带定量分析, 读取蛋白条带吸光度积分值, 并以 SERCA2a/GAPDH 作相对定量。

1.7.4 心肌组织形态学检测 垂直于肌束方向快速切下 1 mm × 1 cm 的长条形心肌薄片, 在 1 min 内投入 2.5% 戊二醛固定液, 操作最好在低温 (0 ~ 4℃) 下进行, 以降低酶的活性, 防止细胞自溶, 送电镜专业检测部门盲法检测。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件, 数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组比较采用单因素方差检验, 两组比较采用 q 检验。

2 结果

本实验中造模后共死亡 7 只大鼠, 其中假手术组 1 只、模型组 2 只、中药组 2 只、缬沙坦组 2 只。为保证各指标检测一致性, 每个指标选取 7 只大鼠进行检测。

2.1 各组大鼠心肌肌质网钙摄取速率比较

表 1 示, 与假手术组比较, 模型组、缬沙坦组大鼠心肌肌质网钙摄取速率显著降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 中药组心肌肌质网钙摄取速率增高 ($P < 0.05$), 缬沙坦组心肌肌质网钙摄取速率无明显变化 ($P > 0.05$); 与缬沙坦组比较, 中药组心肌肌质网钙摄取速率增高 ($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠心肌肌质网钙摄取速率比较 [$\mu\text{Mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$, $\bar{x} \pm s$]

组别	鼠数	肌质网钙摄取速率
假手术组	7	19.70 ± 6.66
模型组	7	12.23 ± 6.90*
缬沙坦组	7	11.05 ± 5.17*
中药组	7	39.11 ± 24.95 ^{△▲}

注: 与假手术组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$; 与缬沙坦组比较, $\blacktriangle P < 0.05$

2.2 各组大鼠心肌组织 SERCA2a 活性比较

表 2 示, 与假手术组比较, 模型组大鼠心肌组织 SERCA2a 活性降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 中药组 SERCA2a 活性增高 ($P < 0.05$); 与缬沙坦组比较, 中药组 SERCA2a 活性增高 ($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠心肌组织 SERCA2a 活性比较 [$\mu\text{Mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$, $\bar{x} \pm s$]

组别	鼠数	SERCA2a 活性
假手术组	7	6.61 ± 1.70
模型组	7	$5.03 \pm 1.24^*$
缬沙坦组	7	5.69 ± 1.25
中药组	7	$7.11 \pm 1.32^{\Delta\Delta}$

注: SERCA2a, 肌质网钙 ATP 酶 2a; 与假手术组比较, $* P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$; 与缬沙坦组比较, $\Delta\Delta P < 0.05$

2.3 各组大鼠心肌组织 SERCA2a 蛋白表达比较

表 3 示, 与假手术组比较, 模型组大鼠心肌组织 SERCA2a 蛋白表达增高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 中药组大鼠心肌组织 SERCA2a 蛋白表达增高, 缬沙坦组 SERCA2a 蛋白表达明显降低 ($P < 0.01$); 与缬沙坦组比较, 中药组 SERCA2a 蛋白表达增高 ($P < 0.01$)。

表 3 各组大鼠心肌组织 SERCA2a 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	SERCA2a/GAPDH
假手术组	7	0.412 ± 0.025
模型组	7	$0.754 \pm 0.038^*$
缬沙坦组	7	$0.081 \pm 0.032^{\Delta}$
中药组	7	$0.901 \pm 0.073^{\Delta\Delta}$

注: 与假手术组比较, $* P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.01$; 与缬沙坦组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$

2.4 各组大鼠心肌组织病理形态学比较

图 1 示, 假手术组电镜下见 Z 带两边对称的肌质网, Z 带内有 T 管, 肌质网周围有结构完整的线粒体; 模型组心肌肌质网明显减少, 线粒体空化严重; 中药组大鼠心肌肌质网、线粒体结构完好; 缬沙坦组线粒体存在空化现象。

3 讨论

既往研究认为, 腹主动脉缩窄动物的左室舒张末压持续升高是这种模型出现心力衰竭最重要的病理机制^[11]。本研究发现, 模型组大鼠心肌肌质网钙摄取速率显著降低, 提示肌质网 Ca^{2+} 摄取能力减弱、胞质内游离 Ca^{2+} 浓度下降可能是腹主动脉缩窄诱发的舒张性心力衰竭的重要病理机制; 另外

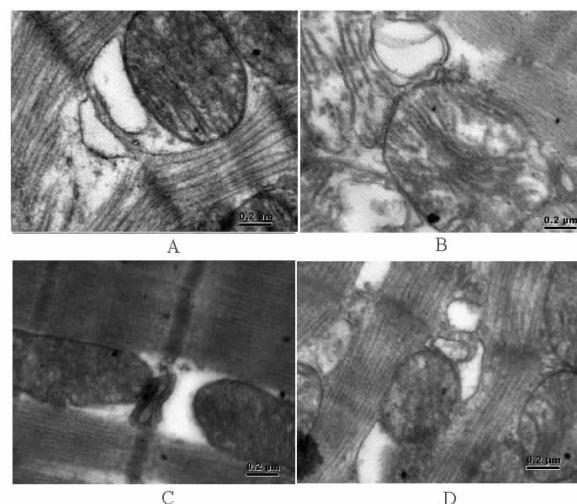


图 1 各组大鼠心肌病理形态图 ($\times 43000$)

注: A: 假手术组; B: 模型组; C: 中药组; D: 缬沙坦组
还发现, 模型组大鼠心肌 SERCA2a 活性降低, 肌质网明显减少, 线粒体空化严重, 部分解释了模型大鼠心肌肌质网 Ca^{2+} 摄取能力减弱的原因。但是, 我们的研究也发现模型组大鼠心肌 SERCA2a 蛋白表达并没有下调, 其活性和功能的降低可能与其调控能量代谢失衡有关, 这将在以后的研究中进一步探讨。本研究揭示了心肌 SERCA2a 和心脏舒张功能的密切关系, 也为腹主动脉缩窄可诱导舒张性心力衰竭大鼠模型提供了可靠的实验室证据。

坎离颗粒是针对慢性心力衰竭“心肾阳虚、饮瘀内停”的基本病机立方, 以温阳益气治其本, 祛瘀蠲饮治其标。方中以黄芪、附子为君, 益气温阳, 上助心阳以通脉, 下温肾阳以主水; 臣以白术、茯苓健脾利水, 三棱、莪术活血利水, 软坚消癥; 佐以车前子、葶苈子利水泻肺逐饮; 并以麦冬、白芍为使, 既引诸药入心, 又敛阴和营, 以制附子刚燥之性, 并使该方无利水伤阴之虞。诸药合用, 使心阳得振, 肾阳自复, 饮瘀分消。以往研究中发现, 该方能显著改善压力负荷超载诱导舒张性心力衰竭大鼠左室舒张功能^[7]。本研究发现, 坎离颗粒对 DHF 大鼠心肌肌质网钙转运具有明显影响, 该药物能提高心肌肌质网钙摄取速率, 增加心肌 SERCA2a 活性, 促进心肌 SERCA2a 蛋白表达, 从而改善舒张性心力衰竭的左室舒张功能, 并可能存在保护肌质网、线粒体结构的作用。

参考文献

- [1] Ouzounian M, Lee DS, Liu PP. Diastolic heart failure: mechanisms and controversies [J]. Nat Clin Pract Cardiovasc Med, 2008, 5(7): 375-386.

- [2] Stüdeli R, Jung S, Mohacsi P, et al. Diastolic dysfunction in human cardiac allografts is related with reduced SERCA2a gene expression [J]. Am J Transplant, 2006, 6 (4): 775-782.
- [3] Yang XS, Sun JP. Advances in diastolic heart failure [J]. World J Cardiol, 2010, 2(3): 58-63.
- [4] Lloyd-Jones D, Adams R, Carnethon M, et al. Heart disease and stroke statistics—2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee [J]. Circulation, 2009, 119(3): 480-486.
- [5] Owan TE, Hodge DO, Herges RM, et al. Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction [J]. N Engl J Med, 2006, 355(3): 251-259.
- [6] Bursi F, Weston SA, Redfield MM, et al. Systolic and diastolic heart failure in the community [J]. JAMA, 2006, 296(18): 2209-2216.
- [7] 刘永明, 徐裕亚, 王肖龙, 等. 益气温阳中药干预对压力负荷超载诱导的舒张性心力衰竭大鼠血流动力学的影响 [J]. 上海中医药大学学报, 2012, 26(4): 71-75.
- [8] Ward CW, Spangenburg EE, Diss LM, et al. Effects of varied fatigue protocols on sarcoplasmic reticulum calcium uptake and release rates [J]. Am J Physiol, 1998, 275 (1Pt2): R99-R104.
- [9] Williams JH, Ward CW, Spangenburg EE, et al. Functional aspects of skeletal muscle contractile apparatus and sarcoplasmic reticulum after fatigue [J]. J Appl Physiol, 1998, 85 (2): 619-626.
- [10] Cutler MJ, Wan X, Plummer BN, et al. Targeted sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase 2a gene delivery to restore electrical stability in the failing heart [J]. Circulation, 2012, 126(17): 2095-2104.
- [11] Crandall DL, Goldstein BM, Ferraro GD, et al. Relationship of cardiac hemodynamic and biochemical adaptations to mortality during long-term aortic constriction [J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1991, 198(2): 747-753.

The Effect of *Kanli Granule* (坎离颗粒) on Calcium Transport in Cardiac Muscle Sarcoplasmic Reticulum of Rats with Diastolic Heart Failure Induced by Pressure Overload

LIU Yongming¹, XU Yuya², Namuhai³, TENG Mingzi⁴, WU Dazheng⁵, JIANG Meixian¹

(1. Shuguang Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, 201203; 2. Zhenhai District Hospital of Traditional Chinese Medicine, Ningbo City, Zhejiang Province; 3. Songdo Hospital in Ulaanbaatar, Republic of Mongolia; 4. The Third People's Hospital of Wuxi City, Jiangsu Province; 5. Chinese Medicine Institute of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Kanli Granule* in improving the left ventricular diastolic function in rats with diastolic heart failure. **Methods** Fifty-six Wistar rats were randomly divided into sham operation group, model group, Chinese medicine group and valsartan group, with 14 rats in each group. Except for the sham operation group, the rest groups were treated with abdominal aortic constriction to make cardiac pressure overload induced heart failure model. One week after operation, Chinese medicine group were gavaged with *Kanli Granule* solution 6.75 g/(kg · d), the valsartan group were gavaged with valsartan suspension 7.2 μg/(kg · d), the sham operation group and model group were gavaged with double distilled water, 1 time a day, a total intervention of 32 weeks. The changes of morphology, calcium uptake, the activity of SERCA2a and protein expression in myocardium sarcoplasmic reticulum of all groups rats were observed. **Results** Compared with sham operation group, the calcium uptake rate of myocardial sarcoplasmic reticulum in model group was significantly decreased, SERCA2a activity was decreased and SERCA2a protein expression was increased in cardiac muscle tissue ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); Myocardial muscle mass was significantly decreased, and the mitochondria were severely cavitation. Compared with the model group, the calcium uptake rate increased, SERCA2a activity and protein expression were significantly increased in the Chinese medicine group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); Cardiac muscle sarcoplasmic reticulum and mitochondria keep good structure. **Conclusion** *Kanli Granule* can improve the left ventricular diastolic function in rats with diastolic heart failure probably by increasing the SERCA2a protein and activity of the myocardium and promoting the calcium uptake rate of the myocardium sarcoplasmic reticulum.

Keywords diastolic heart failure; *Kanli Granule*; left ventricular diastolic function; myocardial cell; sarcoplasmic reticulum; calcium transport

(收稿日期: 2015-02-05; 修回日期: 2015-03-24)

[编辑: 邓媛]