

实验研究

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2020.15.014

温阳振衰颗粒对心肾综合征模型大鼠血浆外泌体及心、肾组织 p38MAPK 表达的影响

欧阳过¹, 蔡虎志², 王雅乐¹, 王敏², 陈青扬², 刘越美², 陈新宇^{2*}

1. 湖南中医药大学, 湖南省长沙市岳麓区学士路 300 号, 410208; 2. 湖南中医药大学第一附属医院

摘要 目的 探讨温阳振衰颗粒对心肾综合征大鼠心功能、肾功能的影响及可能作用机制。方法 40 只 SD 大鼠随机分为空白组、模型组、温阳振衰组、依那普利组, 每组 10 只。除空白组外其余各组大鼠采用阿霉素 3 mg/kg 腹腔注射, 每周 1 次, 共 6 周建立心肾综合征大鼠模型。造模 3 周后空白组和模型组大鼠给予生理盐水每次 1 ml/100 g 灌胃, 温阳振衰组每次给予 0.72 g/kg 温阳振衰颗粒灌胃, 依那普利组每次给予 0.9 mg/kg 依那普利片灌胃。每天给药 2 次, 连续 4 周。HE 染色观察肾组织病理改变, TUNEL 法检测心肌及肾组织细胞凋亡阳性率, 检测心功能、肾功能及血清 N 端前脑钠素 (NT-pro BNP)、肾损伤分子 1 (KIM-1) 含量, 检测心脏和肾脏 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38MAPK) 和磷酸化 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p-p38MAPK) 蛋白及 mRNA 表达, 检测血浆外泌体定量, 心脏、肾脏组织及血浆外泌体 miR-155 表达。结果 与空白组比较, 模型组大鼠心功能、肾功能损伤, 心肌及肾组织细胞凋亡阳性率增加, 血清 NT-pro BNP、KIM-1 含量升高, 心脏和肾脏 p-p38MAPK 蛋白、p38MAPK mRNA 表达均升高, 心脏、肾脏和血浆外泌体 miR-155 均降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与模型组比较, 温阳振衰组和依那普利组上述指标均不同程度改善 ($P < 0.01$)。结论 温阳振衰颗粒可改善心肾综合征模型大鼠心功能、肾功能, 其作用可能与增加外泌体 miR-155 抑制 p-p38MAPK 表达, 从而抗细胞凋亡有关。

关键词 心肾综合征; 温阳振衰颗粒; 外泌体; miR-155; p38 丝裂原活化蛋白激酶; 细胞凋亡

心肾综合征 (cardio-renal syndromes, CRS) 是指心脏和肾脏中的某一个器官急性或慢性功能障碍引起另一个器官的急性或慢性功能损害的临床综合征, 是心力衰竭及肾功能不全患者重要的临床表现^[1]。据报告, 中国心血管病患者约 2.9 亿, 其中慢性心力衰竭 (chronic heart failure, CHF) 患者约 450 万, 同时, 中国约有慢性肾病 (chronic kidney disease, CKD) 患者近 1.2 亿^[2]。心肾疾病经常同时存在, 相互影响。前期研究^[3-4]已证实, 温阳振衰颗粒通过上调 miR-155 抑制磷酸化 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p-p38MAPK) 的表达, 且能改善 CKD 患者的肾功能^[5]。另有研究^[6]证实, 抑制

p-p38MAPK 的表达, 能减少心肌及肾组织细胞凋亡, 增强 CRS 大鼠心功能、肾功能。本研究从外泌体 miR-155 角度探讨温阳振衰颗粒对心肌及肾组织细胞凋亡的影响, 现报告如下。

1 材料与方法

1.1 动物

清洁级雄性 SD 大鼠 40 只, 6~8 周龄, 体重 200~250 g, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司, 实验动物许可证号: SCXK (湘) 2016-0002, 合格证号: 43004700049940。

1.2 药物

温阳振衰颗粒由炮附片、干姜、茯苓、红参、麦冬、五味子、甘草以 10:10:15:6:15:10:10 比例配伍, 制备分装成 8 g/袋颗粒剂, 湖南中医药大学第一附属医院院内制剂。注射用盐酸多柔比星 (阿霉素), 深圳万乐药业有限公司, 批号: H44024359, 规格 10 mg/瓶。依那普利片, 扬子江

基金项目: 国家自然科学基金 (81704061; 81173213); 湖南省自然科学基金 (2019JJ50465); 湖南省教育厅科学研究项目 (18A218); 湖南省中医药科研计划项目 (201904); 湖南中医药大学研究生创新课题 (2018CX11); 湖南中医药大学中医国内一流建设学科

* 通讯作者: chenxinyuchen@163.com, (0731) 85600703

药业集团江苏制药股份有限公司, 批号: H32026567, 规格 10 mg/粒。

1.3 主要试剂及仪器

大鼠 N 端前脑钠素 (NT-pro BNP) ELISA 试剂盒 (货号: CSB-E08752r)、人肾损伤分子 1 (KIM-1) ELISA 试剂盒 (货号: CSB-E08808r), 上海希美化学有限公司; 兔多克隆 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38MAPK) 抗体 (货号: 14064-I-AP)、小鼠单克隆 β -actin 抗体 (货号: 60008-I-Ig), 美国 Proteintech 公司; 兔多克隆 p-p38 抗体 (CST 公司, 货号: 9211); 苏木素 (货号: H9627)、伊红 (货号: E6003), 美国 Sigma 公司; RIPA 裂解液 (上海碧云天生物技术有限公司, 货号: P0013B); Super ECL Plus 超敏发光液 (美国 Advansta 公司, 货号: K-12045-D50); mRNA 逆转录试剂盒 (货号: CW2569)、miRNA 逆转录试剂盒 (货号: CW2141)、UltraSYBR Mixture (货号: CW2601)、DM2000 Plus DNA Marker (货号: CW0632), HiFiScript cDNA Synthesis 试剂盒 (货号: CW2569), 北京康为世纪生物科技有限公司; Trizol (美国 Thermo 公司, 货号: 15596026); TUNEL 试剂盒 (凯基生物技术股份有限公司, 货号: KGA704); DAB 试剂盒 (北京中杉金桥生物技术有限公司, 货号: ZLI-9018); 血清外泌体提取试剂盒 (SBI 公司, 货号: 01.SBI.EXOQ5TM-1); 外泌体定量试剂盒 (Biovision 公司, 货号: K120-100); 10% 水合氯醛 (青岛宇龙海藻有限公司, 批号: H37022673); 10% 甲醛溶液 (上海笃玛生物科技有限公司, 批号: DF0128)。

超声彩色多普勒诊断仪 (深圳市开立科技有限公司, S2N 型); 包埋机 (常州中威电子仪器有限公司, BMJ-A 型); 振荡切片机 (莱卡公司, VT1000S 型); 多功能显微镜 (Motic 公司, BA410B 型); 台式高速冷冻离心机 (湘仪离心机仪器有限公司, H1650R 型); 多功能酶标分析仪 (汇松发展有限公司, MB-530 型); 电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司, 164-5050 型); 转膜仪 (北京六一仪器厂, DYCZ-40A 型); 全自动凝胶成像分析系统 (英国 Syngene G 公司); 荧光定量 PCR 仪 (Thermo 公司, PIKO REAL 96 型); 透射电子显微镜 (日立公司, 7700 型); 数码相机 (AMT 公司, ER-B 型); 全自动生化仪 (罗氏公司, Cobas6000 型); 紫外分光光度计 (上海仪电分析仪器有限公司, L6 型)。

1.4 分组、造模及给药方法

40 只 SD 大鼠按随机数字表法分为空白组、模型组、依那普利组和温阳振衰组, 每组 10 只。除空白组外其余各组参照文献 [7] 并结合预实验结果建立 CRS 大鼠模型: 用生理盐水将阿霉素配置成浓度为 2.0 mg/ml 的溶液, 以 1.5 ml/kg 的剂量对大鼠进行腹腔注射, 每周注射 1 次, 共 6 周。空白组大鼠腹腔注射等量生理盐水。

造模 3 周后空白组和模型组大鼠给予生理盐水 1 ml/100 g 灌胃, 温阳振衰组大鼠给予每次 0.72 g/kg 温阳振衰颗粒灌胃, 依那普利组给予每次 0.9 mg/kg 的依那普利片灌胃。每天给药 2 次, 连续 4 周, 同时继续造模 3 周。共造模 6 周, 药物干预 4 周。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 心功能 大鼠平卧位固定, 以 10% 水合氯醛 0.2 ml/100 g 腹腔麻醉后, 用超声彩色多普勒诊断仪检测, 将探头置于胸骨左缘取左室长轴最大直径处 M 型超声标记室间隔与左室后壁收缩末和舒张末心内膜位置, 自动计算左室射血分数 (LVEF)、左室短轴缩短分数 (LVFS)。

1.5.2 肾功能及血清 NT-pro BNP、KIM-1 含量 静脉采血分离血清, 尿素氮、肌酐采用全自动生化仪检测。NT-pro BNP、KIM-1 含量采用 ELISA 法检测, 按试剂盒说明书操作。

1.5.3 形态学观察 取大鼠肾脏用生理盐水洗净血块, 浸泡于 10% 甲醛溶液中固定 24 h, 制作石蜡切片, 常规 HE 染色, 采用光学显微镜观察各组细胞形态学变化。

1.5.4 心脏及肾脏 p38MAPK、p-p38MAPK 蛋白表达 采用 Western Blot 法检测, 具体步骤参照相关试剂盒说明书进行。另外采用免疫组化检测心脏、肾脏 p38MAPK 表达, 石蜡包块切片, 脱蜡, 抗原修复, p38MAPK 一抗孵育 4℃ 过夜, 二抗孵育, DAB 显色, 苏木素复染, 盐酸乙醇分色, 脱水透明封片。光镜下观察心脏及肾脏 p38MAPK 阳性表达, 图像采集系统获取图像, 每张切片取 3 个高倍镜视野采图, 采用 ProPlus 6.0 图像分析软件计算阳性表达物平均光密度, 取平均值。

1.5.5 心脏及肾脏 p38MAPK mRNA 表达 采用荧光定量 RT-PCR 法检测, 大鼠心、肾组织约 0.02 g, 加入 1 ml Trizol, 于匀浆器中充分研磨匀浆, 采用酚/氯仿萃取法提取总 RNA, 紫外分光光度计测定 RNA 浓度以及 260 nm、280 nm 处吸光度值, 计算其纯度, 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 条带

完整性,按 HiFiScript cDNA Synthesis 试剂盒说明书合成 cDNA,以 cDNA 为模板按 UltraSYBR Mixture 合成试剂盒说明书进行扩增。根据所得 Ct 值,以 GAPDH 为内参、正常组样本为对照样品计算 $2^{-\Delta\Delta Ct}$,得到目的基因的相对表达量。引物由上海生工生物技术有限公司合成, p38MAPK: 上游 5'-AGCTTACCGATGACCACGTT-3', 下游 5'-CACG-TAGCCGGTCATTTTCGTC-3', 长度 178bp; GAPDH: 上游 5'-ACAGCAACAGGCTGGTGGAC-3', 下游 5'-TTTGAGGGTGCAGCGAAGCTT-3', 长度 252bp。

1.5.6 心肌及肾组织细胞凋亡阳性率 采用 TUNEL 法检测,标记大鼠心肌及肾组织细胞凋亡细胞核中的 DNA3'-OH 末端, DAB 显色,苏木素复染,晾干后中性树胶封片。凋亡细胞 TUNEL 阳性表现为胞核呈深棕黄色,细胞轮廓完整。每张切片取 3 个高倍视野,电脑采集图片,采用图像分析软件 IPP 6.0 计算每张切片凋亡阳性率,取平均值。

1.5.7 血浆外泌体定量检测 采用外泌体提取试剂盒抽提血浆中的外泌体,用 ELISA 检测试剂盒对血浆外泌体进行定量,具体步骤参照定量试剂盒说明书。

1.5.8 心脏、肾脏、血浆外泌体 miR-155 表达 采用 RT-PCR 法检测,取血浆 250 μ l,加入 50 μ l 外泌体提取试剂,混匀,4 $^{\circ}$ C 静置 1 h,1500 g 离心 30 min,沉淀即为外泌体;取大鼠心、肾组织约 0.02 g。Trizol 法提取外泌体及心、肾组织沉淀总 RNA。按 miRNA 逆转录试剂盒合成 cDNA,以 cDNA 为模板按 UltraSYBR Mixture 合成试剂盒说明书进行扩增。根据所得 Ct 值,以 5s 为内参、正常组样本为对照样品计算 $2^{-\Delta\Delta Ct}$,得到目的基因的相对表达量。引物由上海生工生物技术有限公司合成, rno-miR-155-3p: 5'-GGCACCTCCTACCTGTTAG-CATT-3'; 5s: 上游 5'-GCCTACAGCCATACCAACCGG-GAA-3', 下游 5'-CCTACAGCACCCGGTATCCCA-3', 长度 116bp。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计软件,计量资料用均数 $\pm$

标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,符合正态分布和方差齐性,多样本均数间比较用单因素方差分析,不符合正态分布和方差齐性用非参数检验 (Kruskal-Wallis H 检验),假设检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

实验中依那普利组死亡 1 只、模型组死亡 2 只。

2.1 各组大鼠心功能指标比较

表 1 示,与空白组比较,模型组 LVEF、LVFS 降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,温阳振衰组、依那普利组 LVEF、LVFS 升高 ($P < 0.01$);温阳振衰组和依那普利组组间比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠心功能指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	LVEF	LVFS
空白组	10	0.88 ± 0.02	0.52 ± 0.03
模型组	8	$0.69 \pm 0.06^{\Delta}$	$0.34 \pm 0.04^{\Delta}$
温阳振衰组	10	$0.86 \pm 0.02^{*}$	$0.49 \pm 0.03^{*}$
依那普利组	9	$0.85 \pm 0.02^{*}$	$0.49 \pm 0.03^{*}$

注: LVEF, 左室射血分数; LVFS, 左室短轴缩短分数;与空白组比较, $\Delta P < 0.01$;与模型组比较, $* P < 0.01$

2.2 各组大鼠肾功能及血清 NT-pro BNP、KIM-1 含量比较

表 2 示,与空白组比较,除温阳振衰组大鼠尿素氮差异无统计学意义外,其余各组大鼠血清肌酐、尿素氮及 NT-pro BNP、KIM-1 含量均升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较,温阳振衰组和依那普利组大鼠血清肌酐、尿素氮及 NT-pro BNP、KIM-1 含量均降低 ($P < 0.01$)。与温阳振衰组比较,依那普利组大鼠血清尿素氮及 NT-pro BNP、KIM-1 含量均升高 ($P < 0.01$),而肌酐差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 各组大鼠肾脏组织形态学观察

空白组肾小球结构正常,内皮细胞和系膜细胞数目正常,周围的肾小管正常。模型组可见部分肾小球形态异常,肾小球结构破坏,肾小管上皮细胞变性肿胀,部分扩张而大小形状不一。温阳振衰组、依那普利组肾小球结构大致正常,损伤程度较

表 2 各组大鼠肾功能及血清 NT-pro BNP、KIM-1 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	肌酐 (μ mmol/L)	尿素氮 (μ mmol/L)	NT-pro BNP (pg/mL)	KIM-1 (ng/ml)
空白组	10	28.48 ± 2.47	5.98 ± 0.22	74.64 ± 10.07	0.52 ± 0.77
模型组	8	$38.16 \pm 2.24^{\Delta\Delta}$	$7.19 \pm 0.31^{\Delta\Delta}$	$777.79 \pm 70.97^{\Delta\Delta}$	$12.68 \pm 1.59^{\Delta\Delta}$
温阳振衰组	10	$30.95 \pm 2.42^{\Delta*}$	$5.86 \pm 0.29^{*}$	$159.79 \pm 11.98^{\Delta\Delta*}$	$2.80 \pm 0.26^{\Delta\Delta*}$
依那普利组	9	$31.73 \pm 2.23^{\Delta\Delta*}$	$6.47 \pm 0.42^{\Delta\Delta*}$	$215.30 \pm 37.98^{\Delta\Delta*}$	$5.67 \pm 0.38^{\Delta\Delta*}$

注: NT-pro BNP, N 端前脑钠素; KIM-1, 人肾损伤分子 1;与空白组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与模型组比较, $* P < 0.01$;与温阳振衰组比较, $\# P < 0.01$

表 3 各组大鼠心脏和肾脏 p38MAPK、p-p38MAPK 蛋白表达 Western Blot 法检测结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	心脏		肾脏	
		p38MAPK	p-p38MAPK	p38MAPK	p-p38MAPK
空白组	10	0.64 ± 0.02	0.04 ± 0.01	0.58 ± 0.02	0.03 ± 0.01
模型组	8	0.66 ± 0.03	0.29 ± 0.02 [△]	0.58 ± 0.03	0.33 ± 0.01 [△]
温阳振衰组	10	0.65 ± 0.02	0.18 ± 0.01 ^{△*}	0.59 ± 0.04	0.23 ± 0.02 ^{△*}
依那普利组	9	0.65 ± 0.01	0.16 ± 0.02 ^{△*#}	0.61 ± 0.03	0.13 ± 0.01 ^{△*#}

注: p38MAPK, p38 丝裂原活化蛋白激酶; p-p38MAPK, 磷酸化 p38 丝裂原活化蛋白激酶; 与空白组比较, $\Delta P < 0.01$; 与模型组比较, $* P < 0.01$; 与温阳振衰组比较, $\# P < 0.01$

模型组轻微。

2.4 各组大鼠心脏和肾脏 p38MAPK、p-p38MAPK 蛋白表达 Western Blot 法检测结果比较

表 3 示, 各组大鼠心脏和肾脏 p38MAPK 蛋白表达差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。与空白组比较, 其余各组大鼠心脏和肾脏 p-p38MAPK 增高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 温阳振衰组和依那普利组大鼠心脏和肾脏 p-p38MAPK 降低 ($P < 0.01$); 与温阳振衰组比较, 依那普利组心脏和肾脏 p-p38MAPK 降低 ($P < 0.01$)。

2.5 各组大鼠心脏和肾脏 p38MAPK 蛋白表达免疫组化法检测结果比较

表 4 示, 各组大鼠心脏和肾脏 p38MAPK 蛋白表达比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 4 各组大鼠心脏和肾脏 p38MAPK 蛋白表达免疫组化法检测结果比较 (IOD/AREA, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	心脏 p38MAPK	肾脏 p38MAPK
空白组	10	0.0178 ± 0.0015	0.0487 ± 0.0021
模型组	8	0.0186 ± 0.0018	0.0506 ± 0.0028
温阳振衰组	10	0.0187 ± 0.0010	0.0505 ± 0.0017
依那普利组	9	0.0176 ± 0.0019	0.0505 ± 0.0019

注: p38MAPK, p38 丝裂原活化蛋白激酶

2.6 各组大鼠心脏和肾脏 p38MAPK mRNA、miR-155 表达比较

表 5 示, 与空白组比较, 其余各组大鼠心脏和肾脏 p38MAPK mRNA 表达升高, miR-155 表达降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较, 温阳振衰组、依那普利组大鼠心脏和肾脏 p38MAPK

mRNA 表达降低, miR-155 表达升高 ($P < 0.01$)。与温阳振衰组比较, 依那普利组大鼠心脏和肾脏 p38MAPK mRNA 表达升高, 肾脏 miR-155 表达降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.7 各组大鼠血浆外泌体定量、外泌体 miR-155 表达比较

表 6 示, 与空白组比较, 其余各组大鼠血浆外泌体含量、外泌体 miR-155 降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 温阳振衰组和依那普利组血浆外泌体含量降低, 外泌体 miR-155 含量增高 ($P < 0.01$); 与温阳振衰组比较, 依那普利组血浆外泌体含量增加, 外泌体 miR-155 降低 ($P < 0.01$)。

表 6 各组大鼠血浆外泌体定量、外泌体 miR-155 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	血浆外泌体定量 (μg)	外泌体 miR-155
空白组	10	34.93 ± 1.51	1.12 ± 0.13
模型组	8	12.06 ± 1.03 [△]	0.11 ± 0.01 [△]
温阳振衰组	10	8.29 ± 0.50 ^{△*}	0.60 ± 0.06 ^{△*}
依那普利组	9	10.20 ± 1.48 ^{△*#}	0.41 ± 0.06 ^{△*#}

注: 与空白组比较, $\Delta P < 0.01$; 与模型组比较, $* P < 0.01$; 与温阳振衰组比较, $\# P < 0.01$

2.8 各组大鼠心肌及肾组织细胞凋亡阳性率比较

表 7 示, 与空白组比较, 其余各组大鼠心肌及肾组织细胞凋亡阳性率升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 温阳振衰组、依那普利组心肌及肾组织细胞凋亡阳性率降低 ($P < 0.01$); 与温阳振衰组比较, 依那普利组心肌及肾组织细胞凋亡阳性率降低 ($P < 0.01$)。

表 5 各组大鼠心脏、肾脏 p38MAPK mRNA、miR-155 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	心脏		肾脏	
		p38MAPK mRNA	miR-155	p38MAPK mRNA	miR-155
空白组	10	0.89 ± 0.13	1.09 ± 0.24	0.97 ± 0.13	1.02 ± 0.11
模型组	8	3.71 ± 0.63 ^{△△}	0.30 ± 0.08 ^{△△}	4.23 ± 0.72 ^{△△}	0.15 ± 0.07 ^{△△}
温阳振衰组	10	1.37 ± 0.26 ^{△*}	0.83 ± 0.21 ^{△△*}	1.48 ± 0.55 ^{△*}	0.78 ± 0.14 ^{△△*}
依那普利组	9	2.11 ± 0.52 ^{△△*#}	0.71 ± 0.22 ^{△△*}	2.07 ± 0.51 ^{△△*#}	0.66 ± 0.15 ^{△△*#}

注: p38MAPK, p38 丝裂原活化蛋白激酶; 与空白组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与模型组比较, $* P < 0.01$; 与温阳振衰组比较, $\# P < 0.05$, $\#\# P < 0.01$

表 7 各组大鼠心肌及肾组织细胞凋亡阳性率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	心肌细胞凋亡 阳性率	肾组织细胞凋亡 阳性率
空白组	10	0.46 ± 0.02	0.51 ± 0.02
模型组	8	0.87 ± 0.02 [△]	0.84 ± 0.02 [△]
温阳振衰组	10	0.61 ± 0.03 ^{△*}	0.64 ± 0.03 ^{△*}
依那普利组	9	0.51 ± 0.03 ^{△*#}	0.58 ± 0.03 ^{△*#}

注:与空白组比较, $\Delta P < 0.01$; 与模型组比较, $* P < 0.01$; 与温阳振衰组比较, $\# P < 0.01$

3 讨论

根据 CRS 临床表现,可归属于中医学“水肿”“喘证”范畴,其基本病机以阳气虚衰为本,瘀血、痰浊、水饮为标^[8]。心、肾二脏同属少阴经,心为阳脏,如在天之日,普照万物,肾阳为一身阳气之本,在二者共同推动和温煦下,全身机能得以正常运行。心、肾某一脏阳气不足,往往引起另一脏阳气不足,导致心肾阳虚,血液推动无力为瘀,气化无权,水湿内停为饮。温阳振衰颗粒有温阳固阴、益气利水之功效。前期临床研究^[9-10]结果显示,温阳振衰颗粒对慢性心力衰竭阳虚水泛证有较好的治疗作用,亦可明显改善慢性肾功能衰竭患者的肾纤维化,且有较好的临床疗效^[9]。本研究结果显示,温阳振衰颗粒可以改善 CRS 模型大鼠心功能、肾功能及肾脏病理,同时显著降低了灵敏、特异性反映大鼠肾功能的生物学标记物 NT-pro BNP、KIM-1 含量,进一步证明温阳振衰颗粒治疗 CRS 疗效确切。

研究^[11-13]证实,CRS 的发生主要与肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)激活、交感神经系统活化、慢性炎症反应等有关,在上述因素作用下均可引起心脏和肾脏细胞凋亡,而心肾组织 p-p38 MAPK 表达增多是其主要因素之一。本研究显示,模型组大鼠心肌及肾组织 p-p38 MAPK 表达增多,心肌及肾组织细胞凋亡率升高;而温阳振衰颗粒和依那普利片均能降低心肌及肾组织 p-p38 MAPK 的表达,降低心肌及肾组织细胞凋亡率。本实验也证实,依那普利片能够抑制 p38 MAPK 磷酸化、心肌及肾组织细胞凋亡,且作用强于温阳振衰颗粒,但温阳振衰颗粒在改善心功能、肾功能及 NT-pro BNP、KIM-1 方面强于依那普利片,这可能与中药复方的多通路、多靶点作用有关。

外泌体是指直径在 40 ~ 100 nm 的包含了蛋白质、miRNAs 以及其他核酸物质的盘状小囊泡^[14-15]。现有研究^[16-17]发现,几乎所有的细胞都能主动分泌外泌体,且外泌体天然存在于体液中,

包括血液、唾液、尿液、脑脊液和乳汁。外泌体被母细胞分泌出后,可以通过自分泌、旁分泌和远端转运来进行信息传递^[18]。当其被其他细胞主动摄取后,其囊泡内含有来源于母细胞的蛋白质、miRNAs 等生物活性成分可以直接作用于主动摄取细胞,这就是外泌体被研究者们高度重视的主要原因^[19]。本研究结果显示,与空白组比较,模型组大鼠心脏、肾脏、血浆外泌体 miR-155 均降低;但温阳振衰颗粒和依那普利片均能使心脏、肾脏、血浆外泌体 miR-155 升高。因此可以得出,外泌体 miR-155 可能通过抑制心肌及肾组织 p-p38 MAPK 的表达降低心肌及肾组织细胞凋亡率,温阳振衰颗粒可能是通过增加外泌体 miR-155 的含量发挥抗凋亡作用;外泌体 miR-155 抑制 p-p38 MAPK 的表达,可能是其治疗 CRS 的疗效机制之一。

本实验也存在不足之处,在体内实验中目前还不能确定外泌体的具体来源,未能直接观察到心脏与肾脏通过外泌体的交互作用,待后续体外实验来证实。

参考文献

- [1] MCCULLOUGH PA, KELLUM JA, HAASE M, et al. Pathophysiology of the cardiorenal syndromes: executive summary from the eleventh consensus conference of the acute dialysis quality initiative (ADQI) [J]. Contrib Nephrol, 2013, 182: 82-98. doi: 10.1159/000349966.
- [2] 陈伟伟, 高润霖, 刘力生, 等. 《中国心血管病报告 2017》概要 [J]. 中国循环杂志, 2018, 33(1): 1-8.
- [3] CHEN X, TANG Y, CHEN H, et al. Wenyangzhenshuai granule improves rabbit chronic heart failure induced by adriamycin through JNK/P38 signaling pathway [J]. J Computat Theoret Nanosci, 2018, 14: 1-6. doi: 10.1166/jctn.2018.7071.
- [4] 蔡虎志, 陈新宇, 徐则林, 等. 温阳振衰颗粒对 miR-155/P38MAPK 调控心肌细胞损伤的影响 [J]. 时珍国医国药, 2019, 30(2): 257-260.
- [5] 刘佑晖, 李琰, 蔡虎志, 等. 温阳振衰颗粒治疗慢性肾功能衰竭(阳虚证)的临床研究 [J]. 中国中医急症, 2018, 27(2): 202-204, 211.
- [6] 王蕾, 王梓, 袁玲, 等. 参附强心丸调控肾素原受体介导 MAPK 信号通路抑制肾细胞凋亡 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(3): 121-126.
- [7] 刘熹, 牛阳阳, 余莹, 等. 不同方法制备 V 型心肾综合征小鼠模型的心肾损伤特点及内质网应激水平变化 [J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2018, 32(7): 625-629.
- [8] 王玲, 俞兴群. 心肾综合征的中西医治疗研究进展 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2013, 14(10): 921-923.
- [9] 尹玲珑, 陈新宇, 蔡虎志, 等. 温阳振衰颗粒对慢性心力

衰竭阳虚水泛证患者临床疗效及血管内皮功能的影响

[] . 湖南中医药大学学报, 2014, 34(4) : 20 - 23.

[10] 林泉成, 陈新宇, 戴飞跃, 等. 温阳振衰颗粒治疗慢性心力衰竭阳虚水泛证的临床研究 [] . 中医药导报, 2019, 25(6) : 82 - 85, 94.

[11] VINOD P, KRISHNAPPA V, CHAUVIN AM, et al. Cardiorenal syndrome: role of arginine vasopressin and vaptans in heart failure [] . Cardiol Res, 2017, 8(3) : 87 - 95.

[12] MATSUSHITA K. Pathogenetic pathways of cardiorenal syndrome and their possible therapeutic implications [] . Curr Pharm Des, 2016, 22(30) : 4629 - 4637.

[13] LINHART C, ULRICH C, GREINERT D, et al. Systemic inflammation in acute cardiorenal syndrome: an observational pilot study [] . ESC Heart Fail, 2018, 5(5) : 920 - 930.

[14] ZHANG HD, JIANG LH, HOU JC, et al. Exosome: a novel mediator in drug resistance of cancer cells [] . Epigenomics, 2018, 10(11) : 1499 - 1509.

[15] LEI Z, JING Y, JING W, et al. Isolation and Identification of miRNAs in exosomes derived from serum of colon

cancer patients [] . J Cancer, 2017, 8(7) : 1145 - 1152.

[16] YAMASHITA T, TAKAHASHI Y, TAKAKURA Y. Possibility of exosome-based therapeutics and challenges in production of exosomes eligible for therapeutic application [] . Biol Pharm Bull, 2018, 41(6) : 835 - 842.

[17] COLOMBO M, RAPOSO G, THERY C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles [] . Annu Rev Cell Dev Biol, 2014, 30: 255 - 289. doi: 10. 1146/annurev-cellbio-101512-122326.

[18] PIETRANGELO T, DI FILIPPO ES, LOCATELLI M, et al. Extracellular guanosine 5'-triphosphate induces human muscle satellite cells to release exosomes stuffed with guanosine [] . Front Pharmacol, 2018, 9: 152. doi: 10. 3389/fphar. 2018. 00152.

[19] MARINHO R, PAULO SM, ALCÂNTARA JP, et al. Role of exosomal microRNAs and myomirs in the development of cancer cachexia-associated muscle wasting [] . Front Nutr, 2018, 4: 69. doi: 10. 3389/fnut. 2017. 00069.

Effects of *Wenyang Zhenshuai Granules* (温阳振衰颗粒) on the Expression of p38MAPK in the Plasma Exosomes and the Tissues of Heart and Kidney of Cardio-Renal Syndrome Model Rats

OUYANG Guo¹, CAI Huzhi², WANG Yale¹, WANG Min², CHEN Qingyang², LIU Yuemei², CHEN Xinyu²

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, 410208; 2. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To explore the effects and possible mechanism of *Wenyang Zhenshuai Granules* (温阳振衰颗粒) on cardiac and renal function. **Methods** A total of 40 SD rats were randomly divided into blank group, model group, *Wenyang Zhenshuai* group, and enalapril group, with 10 rats in each group. Rat except for the blank group were injected intraperitoneally with 3 mg/kg doxorubicin, once a week for 6 weeks to establish rat model of cardio-renal syndrome. After 3 weeks of modeling, rats in the blank and model groups were given 1 ml/100 g of saline by gavage each time, the *Wenyang Zhenshuai* group was given *Wenyang Zhenshuai Granules* by gavage 0.72 g/kg every time, and the enalapril group was given enalapril tablets intragastrically 0.9 mg/kg each time for gavage. All the groups were administrated twice a day for 4 weeks. HE staining was used to observe the pathological changes of renal tissue. The positive rate of apoptosis in myocardium and renal tissue was detected by TUNEL method. Heart function, renal function, serum N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-pro BNP) and renal injury molecule 1 (KIM-1) content were detected, heart and kidney p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK), phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase (p-p38MAPK) protein and mRNA expression were detected. Quantitation of plasma exosomes, expression of plasma exosome miR-155 in the heart and kidney were detected. **Results** Compared with the blank group, damaged heart function and kidney function, increased positive rates of apoptosis in myocardium and kidney tissue, increased serum NT-pro BNP and KIM-1 levels, increased p-p38MAPK protein and p38MAPK mRNA in the heart and kidney was increased, and decreased exosomes miR-155 in the heart, kidney and plasma were found ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the model group, the above indicators were improved to different degree in the *Wenyang Zhenhuai* group and the enalapril group ($P < 0.01$). **Conclusion** *Wenyang Zhenshuai Granules* can improve the cardiac and renal function of rats with cardio-renal syndrome. The action may be related to increasing exosome miR-155 to inhibit the expression of p-p38MAPK, thus exerting anti-apoptotic effects.

Keywords cardiorenal syndrome; *Wenyang Zhenshuai Granules* (温阳振衰颗粒); exosomes; miR-155; p38 mitogen-activated protein kinase; apoptosis

(收稿日期: 2019 - 10 - 26; 修回日期: 2020 - 01 - 03)

编辑: 邓 媛