

# 芪苈强心胶囊对改善慢性心力衰竭大鼠心功能及 AQP-2 表达的影响

张健<sup>1,2</sup>, 崔向宁<sup>1\*</sup>, 曹戩<sup>1</sup>

(1. 中国中医科学院广安门医院, 北京 100053; 2. 北京中医药大学, 北京 100029)

**[摘要]** **目的:**探讨芪苈强心胶囊对改善慢性心衰(CHF)大鼠的心功能及水通道蛋白-2(AQP-2)表达的影响及其改善慢性心力衰竭水代谢紊乱的机制。**方法:**结扎冠脉左前降支,建立急性心肌梗死(AMI)模型,存活者随机分为模型组(等体积水),芪苈强心组( $1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ),缬沙坦组( $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ),另设假手术组(等体积水)。给药 4 周后,应用超声心动图检测大鼠的心功能;并通过免疫组化和 Western blotting 检测大鼠肾集合管 AQP-2 表达。**结果:**与假手术组相比,模型组左心室舒张末期内径(LVEDD)和左心室舒张末期内径(LVESD)明显增加,射血分数(EF)和短轴缩短分数(FS)显著降低( $P < 0.05$ ),证实造模成功;与模型组相比,芪苈强心组和缬沙坦组 LVEDD 和 LVESD 均明显减小,EF 和 FS 均显著升高( $P < 0.05$ );芪苈强心组与缬沙坦组比较,差异无统计学意义;与假手术组相比,模型组 AQP-2 表达水平显著升高( $P < 0.05$ );与模型组相比,芪苈强心和缬沙坦组 AQP-2 表达均显著降低( $P < 0.05$ ),两组 AQP-2 表达比较,差异亦无统计学意义。**结论:**芪苈强心可有效下调 AQP-2 的表达水平,调节由慢性心衰导致的水代谢紊乱,改善水肿症状、从而提高慢性心衰患者的生存质量。

**[关键词]** 慢性心力衰竭; 芪苈强心胶囊; 水通道蛋白-2

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)10-0183-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014100183

**[收稿日期]** 20140225(007)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81273945)

**[第一作者]** 张健,硕士,从事中西医结合心脑血管疾病基础与临床的研究, Tel:18613828731, E-mail:zhangjian1281015@163.com

**[通讯作者]** \*崔向宁,博士,主任医师,从事中西医结合心脑血管疾病基础与临床的研究, Tel:010-88001246, E-mail:cuixiangning@126.com

- [4] Steinman R M, Hemmi H. Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2006, 311: 17.
- [5] 杨小舟, 曾富华, 饶力群. 模式识别受体 Dectin-1 与  $\beta$ -葡聚糖的免疫识别作用 [J]. *生命的化学*, 2008, 28(5): 556.
- [6] Vautier S, Sousa Mda G, Brown G D. C-type lectins, fungi and Th17 responses [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2010, 21(6): 405.
- [7] Turner M, Schweighoffer E, Colucci F, et al. Tyrosine kinase SYK: essential functions for immunoreceptor signalling [J]. *Immunol Today*, 2000, 21: 148.
- [8] 孙水林, 罗杰, 张吉翔. CARD9 蛋白与先天性免疫 [J]. *生命的化学*, 2007, 27(6): 514.
- [9] Hara H, Ishihara C, Takeuchi A, et al. The adaptor protein CARD9 is essential for the activation of myeloid cells through ITAM-associated and Toll-like receptors [J]. *Nat Immunol*, 2007, 8(6): 619.
- [10] Leibund Gut-Landmann S, Gross O, Robinson M J, et al. Syk and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17 [J]. *Nat Immunol*, 2007, 8(6): 630.
- [11] Carter R W, Thompson C, Reid D M, et al. Preferential induction of CD4<sup>+</sup> T cell responses through in vivo targeting of antigen to dendritic cell-associated C-type lectin-I [J]. *J Immunol*, 2006, 177(4): 2276.
- [12] Babatz J, Röllig C, Oelschlägel U, et al. Large-scale immunomagnetic selection of CD14<sup>+</sup> monocytes to generate dendritic cells for cancer immunotherapy: a phase I study [J]. *J Hematother Stem Cell Res* 2003, 12(5): 515.

[责任编辑 顾雪竹]

## Effect of Qili Qiangxin Capsule on AQP-2 and Heart Function in Experimentally Induced Heart Failure

ZHANG Jian<sup>1,2</sup>, CUI Xiang-ning<sup>1\*</sup>, CAO Jian<sup>1</sup>

(1. Guang Anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China;  
2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study Qili Qiangxin capsule (QL)'s function in improves the chronic heart failure rats' cardiac function and its' influence in the aquaporin-2 Water channel expression, then discuss benefit of how Qili Qiangxin therapies for disorders that chronic heart failure rats' aberrant water movement. **Method:** The proximal left anterior descending branch (LAD) of coronary artery was ligated using a terylene suture in acute myocardial infarction (AMI) rats, after building AMI model successfully, survivors were randomly divided into four groups, model group (equal volume of water), QL group ( $1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ), valsartan group ( $10\text{ mg}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ), sham-operated group (equal volume of water). Drug intervention four weeks, then detection of related indicators. Echocardiography and the expressions of aquaporin-2 were detected by the method of immunohistochemistry and western blotting were assessed 4 weeks after the drug therapy. **Result:** Compared with the sham-operated group, the left ventricular end-diastolic dimension (LVEDD) and left ventricular end-systolic dimension (LVESD) of model group is significantly increased, ejection fractions (EF) and factional shortening (FS) was significantly lower ( $P < 0.05$ ); compared with model group, QL group LVEDD and LVESD is significantly reduced, EF and FS were significantly higher ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference between QL group and valsartan group; compared with the sham-operated group, the aquaporin-2 water channel expression levels were significantly higher in model group ( $P < 0.05$ ); compared with the model group, the AQP-2 expression were reduced to varying degrees in QL and valsartan group ( $P < 0.05$ ); while there was no significant difference between QL group and valsartan group. **Conclusion:** QL can be effectively reduced AQP-2 expression levels, improve chronic heart failure caused by the water metabolism, elimination of edema symptoms, thereby improving the quality of life in patients with chronic heart failure.

**[Key words]** chronic heart failure; Qili Qiangxin capsule; aquaporin-2

水钠潴留是慢性心力衰竭(CHF)发生发展的重要病理生理变化,主要表现为水肿,并可导致心脏功能进一步受损<sup>[1]</sup>。改善水钠潴留是治疗心衰的重要方法,利尿剂在临床上得到广泛应用,但过度应用会导致心输出量降低和心功能受损,心肾综合征等严重不良反应,还可能激活肾素-血管紧张素-醛固酮(RAAS)系统,血管紧张素和醛固酮刺激下,加速心室重构<sup>[2]</sup>,不仅如此,临床上还有近 30% 患者因利尿剂耐药导致失代偿<sup>[3]</sup>。因此,探询 CHF 新型治疗方案成为临床关注的热点。

水通道蛋白-2(AQP-2)是调节心衰水代谢的关键性蛋白,既往研究<sup>[4]</sup>表明,冠脉结扎心衰大鼠肾 AQP-2 蛋白表达上调,其表达水平随心衰病程进展而升高。在心衰大鼠模型中,AQP-2 蛋白过度表达,并在集合管主细胞、顶尖质膜和胞质小泡广泛分布<sup>[5]</sup>。调控 AQP-2 的表达或可成为治疗心衰的又

一突破。

芪劳强心于 2004 年经 CFDA 批准上市,近期一项大型随机、双盲多中心临床研究再次证实其可靠的疗效和安全性<sup>[6]</sup>。其有效成分主要包括黄芪、附子、丹参及茯苓子等传统药材,以益气温阳药为治络强心之本,辅以活血通络药,使气行血旺络通,兼用利水消肿药以治其标,体现复方中药的综合优势<sup>[7]</sup>。本研究目的在于探究芪劳强心对 AQP-2 表达的影响及对 CHF 心功能的改善作用,并进一步探究芪劳强心对 AQP-2 表达影响的可能机制,为慢性心衰的治疗开辟新思路。

### 1 材料与方法

**1.1 动物及分组** SPF 级雄性 SD 大鼠,体质量 220 ~ 240 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,实验动物使用许可证:SCXK(京)2012-0001,饲养于中国中医科学院广安门医院实验动物

中心动物房。动物的饲养条件:温度 20 ~ 25 °C,标准 12 h 光照/12 h 黑暗节律,标准的饲料和饮水。随机分为 4 组:假手术组( $n=10$ ),模型组( $n=13$ ),芪苈强心组( $n=9$ ),缬沙坦组( $n=9$ ),给药 4 周后处死大鼠取材。

**1.2 药物** 芪苈强心药粉(石家庄以岭药业股份有限公司),缬沙坦胶囊(北京诺华制药有限公司)。

**1.3 试剂及仪器** 一抗小鼠抗大鼠 AQP-2 单克隆抗体(美国 Abcam 公司),二抗为通用型二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司),免疫组化 ABC 试剂盒、棕色 DAB 显色试剂盒(北京中山生物技术有限公司);Vivid 7 Dimension 型彩色多普勒超声诊断仪(通用电气有限公司),CX21 型显微镜(日本奥林巴斯),Image-Pro Plus Version 6.0 (IPP) 型图像分析软件,Quantity One (Bio Rad, USA) 型图像分析软件。

## 2 方法

**2.1 模型制备** 采用左冠状动脉前降支结扎致急性心肌梗死(AMI)后心力衰竭大鼠模型,大鼠用 2% 戊巴比妥钠( $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )腹腔内注射麻醉,经口气管插管,接小动物呼吸机,潮气量 2 ~ 3 mL,吸呼比 1:2,呼吸频率 60 次/min。沿左胸骨第 3 ~ 4 肋间开胸,安置小动物开胸器。暴露心脏并打开心包,在左心耳和右心室流出道之间以 5-0 无创丝线结扎左冠状动脉前降支,肉眼观察前降支供血区变苍白,ECG 出现 2 个或 2 个以上导联 J 点抬高  $>0.2 \text{ mV}$ ,提示 AMI 手术成功,然后挤压胸腔排出空气并逐层关闭胸腔。假手术组手术方法同上,但术中只穿线,不结扎,术后经腹腔注射青霉素  $160 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ,共 3 d,预防感染。AMI 术后 4 周,存活大鼠经超声心动图检查后,可见大鼠心脏前壁变薄,室壁运动减弱,确定为 CHF 大鼠造模成功。

**2.2 给药方式及途径** 芪苈强心组: $1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  灌胃;缬沙坦组: $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  灌胃;假手术组和模型组:蒸馏水每日  $0.01 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$  灌胃。

**2.3 超声心动图检测** 大鼠用 2% 戊巴比妥钠( $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )腹腔内注射麻醉,仰卧位固定后胸部备皮,用 Vivid 7 Dimension 彩色多普勒超声诊断仪进行心脏超声检测,探头频率为 13 MHz,深度 3.5 cm,速度  $200 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$ 。在取得满意的胸骨旁左心室短轴二维图像后,于乳头肌水平将 M 型取样线垂直于室间隔和左心室后壁获得 M 型超声心动图,测定左心室舒张末期内径(left ventricular end-diastolic dimension, LVEDD),左心室收缩末期内径(left

ventricular end-systolic dimension, LVESD),短轴缩短分数(fractional shortening, FS)和射血分数(ejection fractions, EF),连续取 3 个心动周期的平均值。

**2.4 免疫组化检测 AQP-2 表达** 将备用切片预热后脱蜡梯度乙醇脱水,3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  室温氧化 15 min,微波修复后 0.01% PBS 漂洗  $5 \text{ min} \times 3$  次,滴加 AQP-2 (抗体稀释度均为 1:100)一抗,置湿盒中  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  孵育过夜,加辣根过氧化物酶标记的二抗置于湿盒中室温孵育 2 h, DAB 显色,苏木素复染,脱水透明后封片。阴性对照用  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  PBS 代替一抗进行孵育,其余步骤同前,采用 Image-Pro Plus Version 6.0 图像分析软件进行分析, AQP-2 在肾脏集合管中表达,切片中以肾脏集合管呈棕色为阳性。

**2.5 Western blotting 检测 AQP-2 表达** 取 100 mg 冻存肾脏组织用考马斯亮蓝法进行蛋白定量。取  $40 \text{ } \mu\text{g}$  蛋白量经 SDS-PAGE 电泳后电转至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉封闭 2 h 后与 AQP-2 (用封闭液 1:2 000 稀释)  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  孵育过夜, PBS 洗 3 次,每次 10 min; GAPDH (1:200) 作为内标,加辣根过氧化物酶标记二抗(用封闭液 1:2 000 稀释)中,室温孵育 1 h; PBS 洗 3 次,每次 10 min; 置于 1:500 稀释的 ABC 试剂中,室温孵育 30 min; PBS 洗 3 次,每次 10 min; 用 ECL 系统进行检测, X 射线片显影; Quantity One (Bio-Rad, USA) 图像分析软件进行半定量灰度分析,计算 AQP-2 吸光度值比值代表相对表达量。

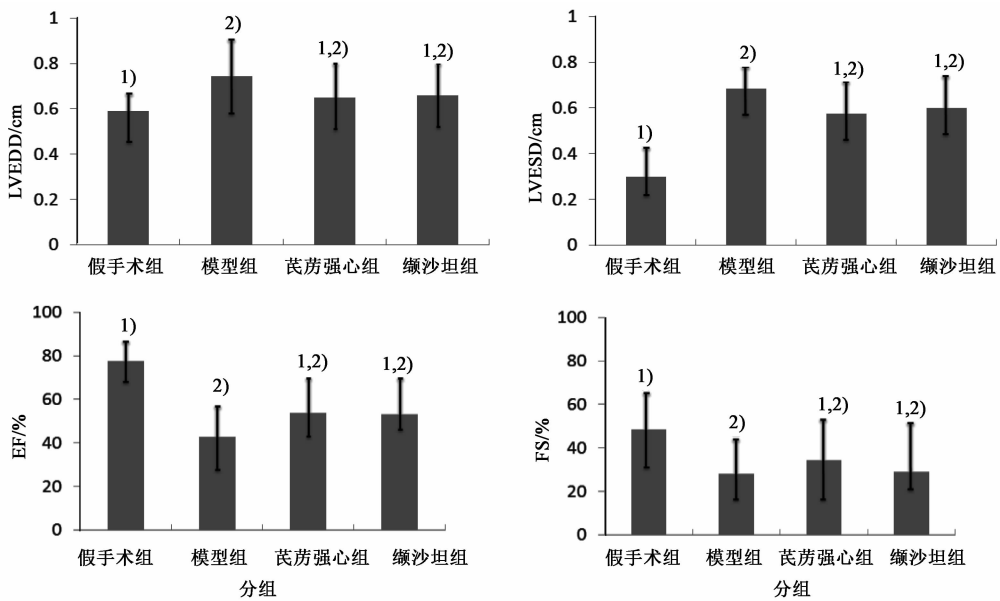
**2.6 统计学处理** 采用 SPSS 17.0 统计软件分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示。多组间数据比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 法。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 超声心动图检测结果** 治疗 4 周后模型组死亡 2 只,芪苈强心组和缬沙坦组各死亡 1 只,假手术组全部存活。与假手术组相比,模型组 LVEDD 和 LVESD 明显增加,EF 和 FS 显著降低( $P < 0.05$ );与模型组相比,芪苈强心组 LVEDD 和 LVESD 明显减小,EF 和 FS 显著升高( $P < 0.05$ ),梗死面积有所降低;芪苈强心组与缬沙坦组比较,差异无统计学意义(图 1)。

**3.2 AQP-2 表达情况** 免疫组化结果显示,4 组大鼠的肾脏集合管中存在不同程度 AQP-2 表达,结果如图 2 所示。

为进一步量化,进行 Western blotting 检测。结果显示:与假手术组相比,模型组 AQP-2 表达水平



与模型组相比<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ; 与假手术组相比<sup>2)</sup>  $P < 0.05$

图 1 芪苈强心胶囊治疗 4 周后超声心动情况 ( $\bar{x} \pm s$ )

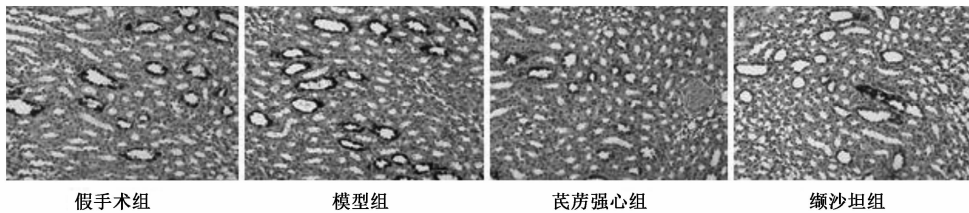


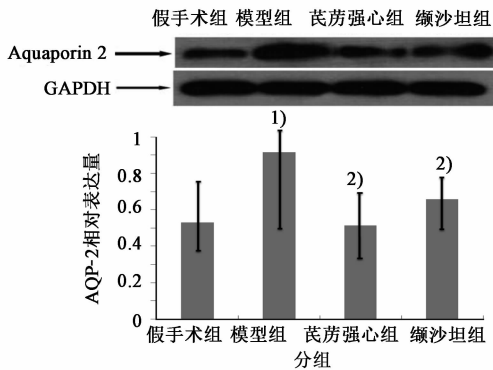
图 2 芪苈强心胶囊对 AQP-2 在肾脏集合管中表达的影响 (DAB, 阳性表达棕色颗粒,  $\times 200$ )

显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组相比, 芪苈强心组和缬沙坦组 AQP-2 表达水平均有不同程度降低 ( $P < 0.05$ ); 同时芪苈强心组与缬沙坦组 AQP-2 表达水平比较, 差异亦无统计学意义 (图 3)。

研究发现 AQP-2 除维持机体水平衡外, 还参与血管功能的调节, 并影响某些疾病的发生和发展, 尤其是在充血性心力衰竭等病理过程中 AQP-2 均扮演主要角色。

AQP-2 位于集合管上皮细胞顶膜上, 其表达受 AVP 调控, 具有调节水重吸收的功能。CHF 患者由于清除多余水的能力下降, 肾脏中 AQP-2 表达和转运均显著增加, AQP-2 对肾脏水调节具有独特作用, 心衰时心输出量降低, 血浆 AVP 升高, 肾脏集合管主细胞上存在着血管加压素受体 V2, 与 AVP 特异性结合后, 激活腺苷酸环化酶而产生 cAMP, 后者成为第二信使, 激活蛋白激酶 A (PKA), 再激活 AQP-2。AQP-2 由此受 AVP 调控的最主要的肾脏水通道蛋白, 在调节机体水平衡中至关重要<sup>[8]</sup>, 血浆 AVP 调控下, 分布在集合管上面的 AQP-2 对水的渗透性迅速增加, 并重吸收 10% ~ 20% 未被近端肾单位重吸收的肾小球滤液, 并由此发挥水液调节作用<sup>[9]</sup>。

本研究中, 模型组 AQP-2 表达明显升高, 提示 AQP-2 表达的确参与心衰水肿的形成, 这为心衰提



与假手术组相比<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ; 与模型组相比<sup>2)</sup>  $P < 0.05$

图 3 芪苈强心胶囊对 AQP-2 的表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

#### 4 讨论

水潴留是 CHF 的重要病理生理变化之一, 也是心源性水肿的发病机制, 同时还是 CHF 出现临床症状的重要原因, 并可导致心功能进一步受损。既往

供了新的治疗靶点。芪苈强心有效改善心功能,其机制可能与下调心衰大鼠 AQP-2 表达相关。治疗 4 周后,芪苈强心组超声显示心功能改善,AQP-2 水平远低于模型组。从中医学角度,心衰机制主要是心阳气虚,无力鼓动,运化不足,血瘀导致体液运行不畅<sup>[10]</sup>。芪苈强心中黄芪益气利水,以治心气虚乏之本、益气升阳,具有利水消肿之功效,并以香加皮、泽泻为佐剂,发挥并行发挥利水消肿之功。与模型组相比,芪苈强心组 LVEDD 和 LVESD 明显减小,EF 和 FS 显著升高,提示梗死面积可能存在缩减趋势,表明芪苈强心通过调节 AQP-2 水平,改善了 CHF 大鼠心功能,疗效与缬沙坦组无显著差异,这与既往相关研究结果相符<sup>[11]</sup>。综上所述,芪苈强心可能通过调节 AQP-2 水平的途径,改善 CHF 大鼠心功能,值得临床深入研究。

#### [参考文献]

- [1] 许顶立. 充血性心力衰竭水潴留的机制——Aquaporin 2 水通道蛋白的作用[J]. 生理科学进展, 2000,31(2):150.
- [2] Schrier R W. Use of diuretics in heart failure and cirrhosis[J]. Semin Nephrol,2011,31(6):503.
- [3] Shekchikhin D, Al Ammary F, Lindenfeld J A, et al. Role of diuretics and ultrafiltration in congestive heart failure [J]. Pharmaceuticals (Basel), 2013, 6(7):851.
- [4] Lütken S C, Kim S W, Jonassen T, et al. Changes of renal AQP-2, ENaC, and NHE3 in experimentally induced heart failure: response to angiotensin II AT1 receptor blockade [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2009, 297(6):1678.
- [5] Nielsen S, Terris J, Andersen D, et al. Congestive heart failure in rats is associated with increased expression and targeting of aquaporin-2 water channel in collecting duct[J]. Proc Natl Acad Sci,1997,94(10):5450.
- [6] Li X, Zhang J, Huang J, et al. A multicenter, randomized, doubleblind, parallel-group, placebo-controlled study of the effects of qiliqiangxin capsules in patients with chronic heart failure [J]. J Am Coll Cardiol,2013,62:1065.
- [7] Mohammadzadeh N, Safdari R, Rahimi A. Multi-Agent System as a New Approach to Effective Chronic Heart Failure Management: Key Considerations [J]. Health Inform Res, 2013,19(3):162.
- [8] 吴以岭. “络脉—血管系统病”新概念及其治疗探讨[J]. 疑难病杂志,2005,4(5):285.
- [9] 邬真力. 中药茯苓和芪苈强心对慢性心力衰竭大鼠肾脏水通道蛋白-2 及心脏功能的影响及其机制[D]. 广州:南方医科大学,2009.
- [10] 张杰. 芪苈强心胶囊对慢性心力衰竭患者醛固酮水平和心功能的干预作用[J]. 中国老年学杂志,2013,33(9):23.
- [11] 杨伟. 芪苈强心胶囊对慢性充血性心力衰竭患者心功能及血浆抗利尿激素的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(3):22.

[责任编辑 邹晓翠]

## 《中国医药导报》杂志 欢迎订阅 欢迎投稿

《中国医药导报》杂志是国家卫生和计划生育委员会主管、中国医学科学院主办的国家级医药卫生类科技核心期刊,现为旬刊,国内统一刊号:CN11-5539/R,国际标准刊号 ISSN1673-7210,邮发代号:80-372,本刊系中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)、中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊,并被万方数据、中国知网、中国学术期刊网络出版总库、中国期刊全文数据库、解放军医学图书馆中文生物医学期刊文献数据库、中文科技期刊数据库收录。每期定价 20 元,全年 36 期优惠价 540 元。

本刊设有专家论坛、研究进展、论著、临床研究、药理与毒理、中医中药、生物医药、病理分析、药品鉴定、制剂与技术、药物与临床、麻醉与镇痛、医学检验、影像与介入、护理研究、教学研究、药物经济学、科研管理、政策研究、医药监管等栏目,是广大医药科研、教育、临床等人员开阔视野、交流经验、增进学术交流的贴身参谋和得力助手,也是发表学术论文的园地。在本刊发表的论文可获得继续教育学分。本刊订户凭订阅单复印件投稿优先发表,来稿注明单位名称、地址、电话、联系人姓名。

社址:北京市朝阳区通惠家园惠润园(壹线国际)5-3-601 邮编:100025

投稿热线:010-59679061 59679063 发行热线:010-59679533

传真:010-59679056 投稿信箱:yyzx68@vip.163.com

网址:www.yiyaodaobao.com.cn