

· 中医药治疗扩张型心肌病的应用基础研究 ·

[编者按] 本系列研究主要通过动物实验及临床试验,探讨中医药治疗扩张型心肌病(DCM)的疗效及可能机制。通过临床病例观察DCM患者的中医证素及患者血清中抗腺嘌呤核苷酸(ADP/ATP)转位酶(ANT)自身抗体、抗毒蕈碱-2(M2)受体自身抗体、抗 β_1 肾上腺素能受体自身抗体(β_1 receptor)和抗肌球蛋白重链(MHC)自身抗体4种抗心肌抗体的水平,比较非DCM患者与DCM患者抗心肌抗体水平,并探讨中医证素和抗心肌抗体两者间的关系,为DCM患者临床诊治提供客观的依据。根据上述研究的结果,使用黄芪来治疗DCM中医证素分布较多的心气虚和(或)阳虚证素患者,观察黄芪对DCM患者临床症状、体征、纽约心脏病协会(NYHA)心功能分级等的干预作用,并观察黄芪对抗心肌抗体水平的影响,为黄芪的临床应用提供理论依据。在上述研究的基础上,观察含黄芪的苓桂养心汤对DCM大鼠心功能、心肌的保护作用及心肌肌浆网钙调控相关蛋白的影响,探讨苓桂养心汤治疗DCM的作用机制,为中医药治疗DCM提供理论依据和实验基础。

苓桂养心汤对扩张型心肌病大鼠心肌保护作用及肌浆网钙调控蛋白的影响

沈丽娟¹, 戴飞², 陆曙^{1*}, 周春刚¹, 李岚¹, 周永华³, 杨庆有¹

(1. 南京中医药大学无锡附属医院, 江苏无锡 214071; 2. 江西中医药大学附属医院, 南昌 330006; 3. 江苏省血吸虫病防治研究所, 江苏无锡 214064)

[摘要] 目的:明确苓桂养心汤对扩张型心肌病(DCM)大鼠心功能、心肌的保护作用;观察苓桂养心汤对DCM大鼠损伤心肌肌浆网(SR)钙调控相关蛋白的影响,探讨其可能的作用机制。方法:以60只SD大鼠腹腔注射阿霉素1.0 mg/kg/次,每周2次,连续6周,总量 $12 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 建立DCM模型,另设正常组(10只),观察2周,8周后将存活DCM模型大鼠随机分为培喋普利组、苓桂养心汤组、模型组,连续灌胃给药8周。治疗后对上述各组大鼠行心脏超声检查;采血测定大鼠血清B型尿钠肽(BNP)水平及肌钙蛋白-I(cTnI);取大鼠左心室心肌进行苏木素-伊红(HE)染色和透射电子显微镜检测大鼠心肌病理学形态。采用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)和蛋白质免疫印迹法(Western blot)分别测定大鼠心肌肌浆网钙泵(SERCA_{2a}),钙释放通道(RyR₂),受磷蛋白(PLB),肌集钙蛋白(Calsequestrin),L-型钙离子通道(CAV_{1,3})的mRNA及蛋白表达水平。结果:与模型组比较,苓桂养心汤组可以改善DCM模型大鼠的心腔大小、心功能、心肌损伤及心肌病理学形态。与模型组比较,苓桂养心汤组SERCA_{2a}, RyR₂, CAV_{1,3}, Calsequestrin mRNA表达升高;PLB mRNA表达下降。与模型组比较,苓桂养心汤组SERCA_{2a}及Calsequestrin蛋白表达升高;PLB蛋白表达下降。结论:苓桂养心汤能缩小DCM大鼠左心室内径,提高左心室射血分数和缩短率,降低血清BNP和cTnI水平,保护DCM大鼠损伤心肌,改善心功能。苓桂养心汤可部分调控DCM大鼠心肌肌浆网钙泵,兰尼碱受体,受磷蛋白,肌集钙蛋白,L-型钙离子通道的mRNA基因和蛋白表达。苓桂养心汤治疗DCM大鼠的作用机制,可能与通过调节DCM大鼠心肌肌浆网钙调控相关蛋白的基因及蛋白表达,改善心肌细胞钙转运及心脏舒缩功能有关。

[关键词] 苓桂养心汤; 扩张型心肌病; 阿霉素; 血清B型尿钠肽; 血清肌钙蛋白-I; 肌浆网钙调控相关蛋白

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2017)18-0145-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017180145

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170628.1606.012.html>

[网络出版时间] 2017-06-28 16:06

[收稿日期] 20170504(014)

[基金项目] 江苏省六大人才高峰项目(No2006057);无锡市卫计委联合攻关项目(YGZXL1303);无锡市医院管理中心面上项目(YGZXM14047)

[第一作者] 沈丽娟,博士,从事心血管疾病的中医诊疗及研究,Tel:13915336393,E-mail:panda55@163.com

[通讯作者] *陆曙,博士,主任中医师,从事心血管疾病的中医诊疗及研究,Tel:0510-88859999,E-mail:panda55007@163.com

Protective Effect of Linggui Yangxin Decoction on Rats with Dilated Cardiomyopathy and Effect of Calcium Regulation-associated Protein of Myocardial Sarcoplasmic Reticulum

SHEN Li-juan¹, DAI Fei², LU Shu^{1*}, ZHOU Chun-gang¹, LI Lan², ZHOU Yong-hua³, YANG Qing-you¹

(1. Wuxi Hospital Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Wuxi 214071, China;

2. Affiliated Hospital of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China;

3. Jiangsu Institute of Parasitic Diseases, Wuxi 214064, China)

[Abstract] **Objective:** To clarify the protective effect of Linggui Yangxin decoction (LGYXD) on myocardial injury and heart function, and observe the effect of LGYXD on calcium regulation associated protein of myocardial sarcoplasmic reticulum (SR) in rats with Adriamycin-induced dilated cardiomyopathy (DCM), in order to explore its possible mechanism. **Method:** A total of 60 SD rats were randomly divided into normal group and DCM group. The latter was further divided into five groups: DCM control, perindopril and LGYXD groups. DCM was induced through intraperitoneal injection with Adriamycin ($1.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, twice a week) for 6 weeks. The treatment lasted for 8 weeks. At the 9th week, echocardiography and myocardial metabolism imaging were performed on DCM rats to evaluate the efficiency. Serum levels of brain natriuretic peptide (BNP) and cardiac troponin-I (cTnI) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. Cardiac histological changes were examined by hematoxylin and eosin (HE) staining and electron microscopy. The mRNA and protein expressions of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA_{2a}), ryanodine receptor (RyR₂), phospholamban (PLB), Calsequestrin, L-type Ca^{2+} channel (CAV_{1.3}) in rat hearts from each group were determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and western blotting. **Result:** Compared with the DCM control group, LGYXD can improve cardiac cavity size, and alleviate cardiac function, myocardial injury and cardiac histological changes in DCM rats. Compared with the DCM control group, expressions of SERCA_{2a} mRNA, RyR2 mRNA, CAV_{1.3} mRNA, and Calsequestrin mRNA in myocardial tissues of LGYXD group were increased, and expression of PLB mRNA was decreased. Compared with the DCM control group, the protein expressions of SERCA_{2a} and Calsequestrin of LGYXD group were increased, and the protein expression of PLB was decreased. **Conclusion:** LGYXD can effectively reduce the dilated left ventricular diameter of DCM rat, improve EF and FS, decrease the serum levels of BNP and cTnI, protect myocardium and improve heart function. LGYXD can partially regulate mRNA and protein expressions of PLB, SERCA_{2a}, RyR₂, CAV_{1.3}, Calsequestrin in rats with dilated cardiomyopathy. The mechanism of LGYXD in treating DCM rats may be correlated with the regulation of the mRNA and protein expressions of calcium regulation-associated protein of myocardial sarcoplasmic reticulum in rats with dilated cardiomyopathy, and the improvement of Ca^{2+} transport function of myocardial cells and systolic-diastolic function of heart.

[Key words] Linggui Yangxin decoction; dilated cardiomyopathy; adriamycin; brain natriuretic peptide (BNP); cardiac troponin-I (cTnI); calcium regulation-associated protein

扩张型心肌病(DCM)是以心室扩大、舒缩障碍为主要特征的心肌疾病,以心衰、心律失常、栓塞、猝死为主要表现^[1],是多种因素作用引起心肌损害、重构的最终结果,是导致充血性心衰的主要原因之一,也是心脏移植最常见原因^[2]。但是DCM发病机制尚不明确,目前认为可能与病毒持续感染、免疫损伤、基因与遗传等有关^[3]。其中免疫损伤导致的心肌或心肌细胞损伤,心肌重塑,引起心肌收缩和舒张障碍是DCM主要发病机制之一^[3]。而心肌细胞内钙离子浓度或钙稳态对心肌收缩和舒张功能的调节起着重要的作用,心肌细胞内钙的释放主要源于

肌浆网储钙释放^[4],因此心肌细胞内钙离子浓度或钙稳态受到多种肌浆网钙调控相关蛋白的调节,其中心肌肌浆网钙泵(SERCA_{2a}),钙释放通道(RyR),受磷蛋白(PLB)和肌集钙蛋白(Calsequestrin)等是心肌细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 调节的最重要的环节^[5]。因此,对此环节进行深入研究,对阐明DCM发病机制以及提高DCM临床疗效具有重要意义。

目前DCM缺乏有效的治疗手段,预后不良。中医认为DCM为本虚标实之证,通过前期临床研究、总结及阅读相关文献,总结出心气阳不足、痰饮血瘀是其基本病机,甚至贯穿整个疾病始终,采用益气

温阳、化饮活血养心法治疗后可明显改善 DCM 临床症状及心功能。课题组基于中医理论认识及大量临床实践基础,总结出了治疗扩张型心肌病的有效验方——苓桂养心汤,具有益气、温阳、化饮、活血、养心之功,通过整体调节达到安脏祛邪之功效^[6]。前期研究也证实,在标准治疗的基础上加用苓桂养心汤可进一步改善扩张型心肌病患者的临床症状、心功能。但是,苓桂养心汤干预扩张型心肌病的疗效机制尚不明确^[5]。前期研究证实,方中黄芪具有调节心肌细胞中 SERCA_{2a} mRNA 的含量,提高 SERCA 活力的作用^[7],防己黄芪汤能够影响离体家兔心房 L-型钙离子通道信号传导而增强心房肌的收缩力^[8]。故推测苓桂养心汤的疗效机制可能与调节心肌肌浆网钙调控相关蛋白的表达等有关。目前中医药对肌浆网干预的研究主要集中在 Ca²⁺-ATP 酶,PLB,也有涉及中医药对兰尼碱受体影响的文献。但是,系统地探讨中医药对 SERCA_{2a}, Calsequestrin, PLB,兰尼碱受体,细胞膜 L-型 Ca²⁺ 通道多环节,多靶点的文献尚未见有报道。因此,本研究拟通过动物模型,研究苓桂养心汤对扩张型心肌病心功能、心肌损伤及心肌肌浆网钙调控相关蛋白的影响,初步探讨其治疗扩张型心肌病的作用机制,为中药治疗 DCM 提供了新的理论依据和实验基础。

1 材料

1.1 动物 选取健康 16 周龄雄性 SD 大鼠 70 只,体重 300 ~ 350 g,由北京维通利华公司提供,合格证号 SCXK(京)2012-0001。本研究获得江苏省血吸虫防治研究伦理审查委员会许可,编号 201X008。

1.2 仪器 041BR111422 型电泳装置(美国 Bio-Rad 公司),LeicaDMI6000B 型倒置显微镜(北京中仪光科科技发展有限公司),JEM-1010 型透射电子显微镜(日本 JEOL 电子公司),CX50 型超声诊断及 12MHz 超声探头(美国 Philips 公司),Elx-800 型酶联免疫分析仪(美国 BioTek 公司),LightCycler480 型基因扩增仪(美国 BioER 公司)。

1.3 药物试剂 注射用盐酸多柔比星(盐酸阿霉素,ADR,10 mg/瓶,深圳万乐药业有限公司,批号 0303E1);培哌普利片[雅施达,施维雅(天津)制药有限公司,国药准字 H20034053];美托洛尔片(倍他洛克,阿斯利康制药有限公司,国药准字 H32025391);苓桂养心汤中药颗粒剂[黄芪 1.5 g/袋(批号 1211114)相当于生药 10 g,茯苓 1 g/袋(批号 1212125)相当于生药 10 g,桂枝 0.5 g/袋(批号 1210030)相当于生药 6 g,白术 3 g/袋(批号

1211130)相当于生药 10 g,防己 0.5 g/袋(批号 1302034)相当于生药 10 g,干姜 0.5 g/袋(批号 1301130)相当于生药 3 g,甘草 0.5 g/袋(批号 1212124)相当于生药 3 g,江阴天江药业有限公司],水合氯醛(青岛宇龙海藻药业有限公司,国药准字 H37022673);B 型尿钠肽(BNP),肌钙蛋白-I(CTn I)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(上海蓝基生物科技有限公司,批号 E02T0542, E02C0009);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号 C0105);trizol RNA Isolation(美国 Invitrogen 公司,批号 15596-026);逆转录试剂盒,SYBR® Premix ExTaq™ II 试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司,批号分别为 RR047A, RR420A];引物序列(上海博彩生物技术有限公司合成);兔抗鼠 RyR₂ antibody,兔抗鼠 SERCA_{2a} antibody,兔抗鼠 PLB antibody,兔抗鼠 Cav_{1.3} antibody,兔抗鼠 Calsequestrin antibody,兔抗鼠 p-PLB antibody,兔抗鼠 GAPDH antibody(Abcam 公司,批号分别为 ab59225, ab150435, ab85146, ab191038, ab3516, ab85146, ab181602)。

2 方法

2.1 造模及分组 70 只 SD 大鼠随机分为正常组(10 只)和 DCM 组(60 只),DCM 组予腹腔注射阿霉素诱导 DCM 模型^[9],每次按 1 mg·kg⁻¹腹腔注射阿霉素,每周 2 次,连续 6 周,观察 2 周。正常组腹腔注射等量生理盐水。8 周后 DCM 组大鼠随机分为培哌普利组、美托洛尔组、黄芪组、模型组。实验过程中观察各组大鼠的死亡率。

2.2 给药 培哌普利组以培哌普利 3 mg·kg⁻¹·d⁻¹灌胃(ig)^[10],每日 1 次。苓桂养心汤组,大鼠中药用量根据临床经验,按人的 7 倍计算^[11] ig(用蒸馏水充分溶解中药颗粒剂,根据前期预实验结果配制质量浓度为 172 g·L⁻¹颗粒剂溶液^[6],按照 1.72 g·kg⁻¹·d⁻¹ ig 为最优剂量),每日 1 次。正常组和模型组大鼠灌以同体积蒸馏水。疗程共 8 周。

2.3 超声检查 8 周后大鼠行心脏超声检查,腹腔注射 10% 水合氯醛(3 mL·kg⁻¹)麻醉,麻醉成功后将大鼠仰卧位固定,左前胸脱毛,放置超声探头,获得满意的左室长轴切面、心脏四腔切面和 M 型超声心动图,测量后获得大鼠左心室舒张末期内径(LVEDD),左心室收缩末期内径(LVESD),左心室射血分数(LVEF)和短轴缩短率(FS)等数据。

2.4 大鼠血液、心肌标本的采集 采集前禁食 12 h,造模前经尾静脉采血,造模后通过下腔静脉取

血,取血后处死,摘取心脏,生理盐水冲洗,滤纸吸干水分,解剖获得左心室心肌, - 80 ℃ 保存,用于 mRNA 测定;取一块多聚甲醛固定,用于 HE 染色,取一块戊二醛固定,用于电镜检查。

2.5 大鼠血清 BNP 及 cTnI 检测 采用 ELISA 法进行加样,加酶标液,孵育,洗板,加入显色剂,避光反应,加终止液终止反应,并在波长 450nm 波长下检测其吸光度 A。

2.6 大鼠左室心肌组织匀浆制备与 SERCA_{2a}, PLB, RyR₂, L-型钙离子通道 (L-type Ca²⁺ channel, CAV_{1.3}), Calsequestrin mRNA 表达 将冷冻心肌组织 50 mg 按照说明书提取总 RNA, - 80 ℃ 保存。参考文献方法^[12]采用逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 两步法进行检测,以大鼠 β-actin 作为内参基因,检验所用引物序列见表 1。

表 1 大鼠心肌的基因和内参基因引物序列

Table 1 Target gene and reference gene primer sequences of rat myocardium

基因	引物序列(5'-3')	引物长度/bp
SERCA _{2a}	上游 TCTGACTTTCGTTGGCTGTG	121
	下游 TCACTGGGATAACAAAGGC	
PLB	上游 CTTTTGTCTTCTGGCATCA	111
	下游 AGGTTCTGGAGTTCTGACG	
RyR ₂	上游 TTGGCTTGTGGCTGTTG	211
	下游 GCAGGAGATGAGTACGAGAT	
CAV _{1.3}	上游 CTGCGATGTGCCAGTAGGT	200
	下游 GTGGTGGTTGAGTTTGTG	
Calsequestrin	上游 TCAAAGACCCACCCTACGTC	200
	下游 AGTCCTCTGGGTCAATCCAC	
β-actin	上游 CCAACCGTGAGAAGATGACA	130
	下游 TCGCCAGAATCCAGAACAAT	

表 2 苓桂养心汤对大鼠心脏超声的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of Linggui Yangxin decoction on echocardiography($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/mg·kg ⁻¹	LVEDD/mm	LVESD/mm	LVEF/%	FS/%
正常	10	-	4.96 ± 0.64	2.49 ± 0.14	92.23 ± 7.65	65.23 ± 1.15
模型	14	-	6.87 ± 0.43 ¹⁾	4.46 ± 0.76 ¹⁾	68.65 ± 1.25 ¹⁾	35.56 ± 1.45 ¹⁾
培哚普利	14	3	5.57 ± 1.22 ²⁾	3.21 ± 0.53 ²⁾	82.02 ± 3.12 ²⁾	52.05 ± 6.46 ²⁾
苓桂养心汤	12	1 720	5.49 ± 0.69 ²⁾	3.18 ± 0.73 ²⁾	81.86 ± 5.06 ²⁾	51.19 ± 5.92 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾P < 0.01,与模型组比较²⁾P < 0.01(表 3,5 同)。

表 3 苓桂养心汤组对大鼠血清 BNP, cTnI 水平的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of Linggui Yangxin decoction on serum levels of BNP and cTnI($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/mg·kg ⁻¹	BNP /ng·L ⁻¹	cTnI/μg·L ⁻¹
正常	10	-	346.56 ± 78.64	0.76 ± 0.02
模型	14	-	823.78 ± 98.67 ¹⁾	0.92 ± 0.08 ¹⁾
培哚普利	14	3	509.64 ± 65.87 ²⁾	0.80 ± 0.09 ²⁾
苓桂养心汤	12	1 720	513.35 ± 59.74 ²⁾	0.79 ± 0.07 ²⁾

2.7 大鼠左心室心肌肌浆网钙调控相关蛋白表达 蛋白质免疫印迹 (Western blot) 检测参照《分子生物学实验方法与技巧》^[13] 及相关文献制定^[14]。用 Quantity one V462 软件扫描条带, 比对灰度值。

2.8 统计学分析 采用 SPSS 21.0 软件。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 组间比较采用单因素方差分析 q 检验或秩和检验。其中 P < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 苓桂养心汤对大鼠死亡率的影响 模型复制后实验大鼠死亡 13 只, 剩余 47 只, 死亡率为 21.7%。47 只大鼠进入药物干预实验, 培哚普利组 (15 只), 苓桂养心汤组 (15 只), 模型组 (17 只)。干预结束时共死亡 7 只, 其中培哚普利组死亡率 6.7% (1/15), 苓桂养心汤组死亡率 6.7% (1/15), 模型组死亡率 29.4% (5/17), 模型组剩余大鼠中 33.3% (4/12) 有腹水形成, 正常组无死亡。

3.2 苓桂养心汤对大鼠心脏超声的影响 与正常组比较, 模型组 LVEDD, LVESD 明显升高 (P < 0.01), 与模型组比较, 苓桂养心汤组、培哚普利组大鼠 LVEDD, LVESD 明显下降 (P < 0.01), LVEF, FS 明显升高 (P < 0.01); 两治疗组之间无统计学差异。见表 2。

3.3 苓桂养心汤对大鼠血清 BNP, cTnI 水平的影响 与正常组比较, 模型组大鼠血清 BNP, cTnI 明显升高 (P < 0.01); 与模型组比较, 苓桂养心汤组、培哚普利组大鼠血清 BNP 明显下降 (P < 0.01); 两治疗组之间无统计学差异。与模型组比较, 苓桂养心汤组、培哚普利组大鼠血清 cTnI 明显下降 (P < 0.01); 两治疗组之间无统计学差异。见表 3。

3.4 苓桂养心汤对大鼠左心室心肌的影响 从左心室心肌 HE 染色可见, 正常组大鼠心肌纤维排列整齐, 胞质均匀丰富, 间质血管正常, 心肌细胞未见变性和坏死。模型组大鼠心肌纤维排列紊乱, 肌纤维断裂, 细胞间隙增宽、水肿, 心肌细胞肥大并有空泡变性, 血管充血, 间质纤维化。与模型组比较, 苓桂养心汤组与培哚普利组大鼠心肌纤维排列紊乱较轻, 心肌

细胞肥大、空泡变性,血管充血和炎性细胞浸润及间质轻度纤维化程度有明显改善。见图 1。

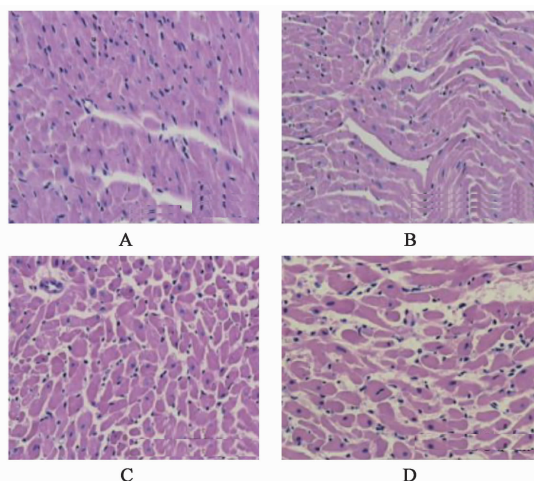


图 1 苓桂养心汤对大鼠左心室心肌的影响(HE, ×200)

Fig. 1 Effect of Linggui Yangxin decoction on HE staining of left ventricular myocardium in rats(HE, ×200)

3.5 苓桂养心汤对大鼠左心室心肌组织的影响

从左心室心肌组织透射电镜看,正常组大鼠心肌纤维排列齐整完好,线粒体大小正常,分布均匀,线粒体无水腫,膜完整,内膜嵴密度正常。模型组大鼠心肌纤维断裂,线粒体肿胀,分布欠均匀,空泡变性,内膜嵴缺失,向细胞核聚集。与模型组比较,苓桂养心汤组和培哚普利组大鼠心肌电镜结果大鼠心肌电镜

结果改善。见图 2。

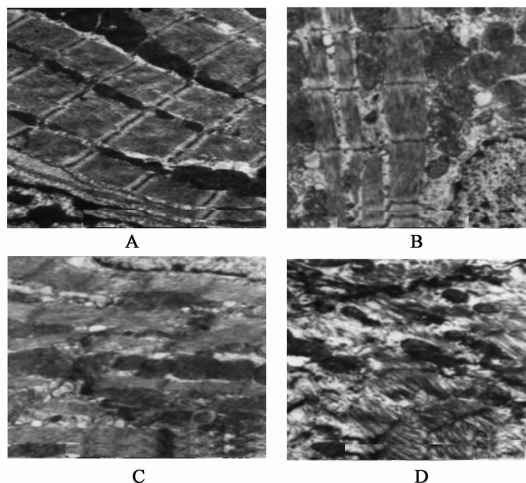


图 2 苓桂养心汤对大鼠左心室心肌组织的影响(透射电镜, ×20 000)

Fig. 2 Effect of Linggui Yangxin decoction on transmission electron microscopy of left ventricular myocardium in rats(TEM, ×20 000)

3.6 苓桂养心汤对大鼠左心室心肌 PLB, SERCA_{2a}, RYR₂, CAV_{1.3}, Calsequestrin mRNA 表达的影响

3.6.1 对大鼠左心室心肌 PLB, SERCA_{2a}, RyR₂, CAV_{1.3}, Calsequestrin mRNA 表达的影响 与模型组比较,苓桂养心汤组 SERCA_{2a}, RyR₂, CAV_{1.3}, Calsequestrin mRNA 的表达升高;PLB mRNA 的表达下降。见表 4。

表 4 苓桂养心汤对大鼠左心室心肌 PLB, SERCA_{2a}, RYR₂, CAV_{1.3}, Calsequestrin mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Effect of Linggui Yangxin decoction on mRNA expression of PLB, SERCA_{2a}, RYR₂, CAV_{1.3}, Calsequestrin in rat hearts($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/mg·kg ⁻¹	SERCA ₂	RyR ₂	CAV _{1.3}	Calsequestrin	PLB
正常	10	-	1.09 ± 0.25	0.95 ± 0.26	1.55 ± 0.56	1.19 ± 0.48	0.90 ± 0.34
模型	14	-	0.87 ± 0.10 ¹⁾	0.50 ± 0.10 ¹⁾	1.12 ± 0.34 ¹⁾	0.79 ± 0.26 ¹⁾	1.28 ± 0.34 ¹⁾
培哚普利	14	3	1.01 ± 0.10 ²⁾	0.60 ± 0.30 ³⁾	1.32 ± 0.80 ²⁾	0.84 ± 0.22 ²⁾	0.88 ± 0.39 ³⁾
苓桂养心汤	12	1 720	1.00 ± 0.09 ²⁾	0.66 ± 0.11 ³⁾	1.51 ± 0.48 ³⁾	1.04 ± 0.26 ³⁾	0.95 ± 0.25 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾P < 0.01;与模型组比较²⁾P < 0.05, ³⁾P < 0.01。

3.6.2 大鼠 LVEDd 与 PLB mRNA 相关性分析 大鼠 LVEDd 与 PLB mRNA 呈正相关关系(线性回归方程为 $Y = 0.72X - 4.01, r = 0.98$)。

3.7 苓桂养心汤对心肌肌浆网 SERCA_{2a}, Calsequestrin, PLB 蛋白表达的影响 与模型组比较,苓桂养心汤组 SERCA_{2a} 及 Calsequestrin 蛋白表达升高; PLB 蛋白表达下降(P < 0.01)。见表 5, 图 3。

4 讨论

中医认为本病是本虚标实之证,正气虚弱:禀赋不足,素体虚弱,或劳逸失度,或情志不洁,或久病体虚等,易使正气内需,卫气不能固护于外,营气失守

于内,外邪乘虚而入,内舍于心,心气耗散,日久心体胀大,发为本病^[15]。因此临床治以益气温阳,活血化瘀之法。课题组基于中医理论认识及大量临床实践基础,总结出了治疗 DCM 的有效验方——苓桂养心汤。本方由防己黄芪汤、苓桂术甘汤两首经方化裁而成,主要由黄芪、茯苓、桂枝、白术、防己、干姜、炙甘草等组成,具有益气、温阳、化饮、活血、养心之功,通过整体调节达到安脏祛邪之功效。前期研究发现,苓桂养心汤能有效改善患者临床证候,提高患者 LVEF,同时降低患者的 LVEDD 及 NT-proBNP 水平,对患者心功能具有明显的改善作用,并能减少患者低血压、心律失常及刺激性干咳的发生率。本

表 5 苓桂养心汤对大鼠左心室心肌肌浆网 SERCA_{2a}, Calsequestrin, PLB 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of Linggui Yangxin decoction on proteins expression of SERCA_{2a}, Calsequestrin, PLB in rat hearts ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	SERCA _{2a} /GAPDH	Calsequestrin/GAPDH	PLB/GAPDH
正常	-	1.16 ± 0.21	0.78 ± 0.11	0.54 ± 0.10
模型	-	0.72 ± 0.23 ¹⁾	0.53 ± 0.16 ¹⁾	0.66 ± 0.09 ¹⁾
培哚普利	3	0.97 ± 0.15 ²⁾	0.71 ± 0.15 ²⁾	0.55 ± 0.10 ²⁾
苓桂养心汤	1 720	1.00 ± 0.21 ²⁾	0.68 ± 0.15 ²⁾	0.57 ± 0.09 ²⁾

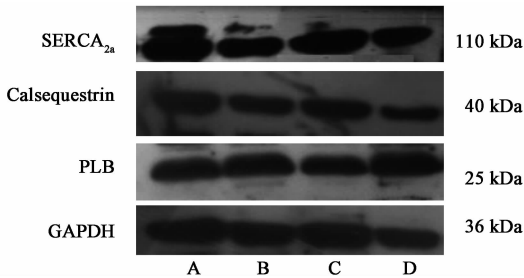


图 3 苓桂养心汤对大鼠左心室心肌肌浆网 SERCA_{2a}, Calsequestrin, PLB 蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of Linggui Yangxin decoction on proteins expression of SERCA_{2a}, Calsequestrin, PLB in rat hearts

研究与上述研究一致,与模型组比较,苓桂养心汤组可以改善 DCM 模型大鼠的心腔大小、心功能、心肌损伤及心肌病理学形态。

DCM 发生发展主要由发生重构的心肌功能障碍所导致,其表现为心肌细胞收缩和(或)舒张功能的异常,而在心肌收缩和舒张功能的调节中,钙离子转运起着关键作用,而 Ca²⁺ 转运受到多种钙调控蛋白的调节。研究发现 SERCA_{2a}, RyR₂, PLB 异常是 DCM 心衰发病机制之一^[16],且随着 SERCA_{2a} 活性进行性下降,心衰逐渐形成并进行性加重^[17]。随着 SERCA_{2a} 表达水平下降,肌浆网对 Ca²⁺ 的摄取力下降,心肌细胞胞浆中 Ca²⁺ 浓度下降速度减慢,引起心肌的舒张障碍,并影响了心肌肌浆网 Ca²⁺ 释放通道兰尼碱受体对 Ca²⁺ 的释放而引起心肌的收缩障碍。研究显示,终末期扩张型心肌病患者心肌 PLB/SERCA_{2a} 的比值升高导致 SERCA_{2a} 对 Ca²⁺ 亲和力下降而发生心肌舒张和收缩障碍^[18]。阿霉素诱导的扩张型心肌病大鼠心肌 SERCA_{2a}, RyR₂ 蛋白水平显著降低^[19]。扩张型心肌病的病理生理研究显示,兰尼碱受体磷酸化异常可引起钙通道减少,改变了钙的转运而导致心肌功能损害。BAI 等^[20] 研究显示扩张型心肌病大鼠左心室心肌 RyR, SERCA/PLB 降低。本研究结果显示,扩张型心肌病确实存在着肌浆网钙调控相关蛋白 SERCA_{2a}, RyR₂, CAV_{1.3}, Calsequestrin, PLB mRNA 表达的异常及 SERCA_{2a}, Calsequestrin, PLB 蛋白表达的异常,其中 PLB

mRNA 的表达与左心室舒张末内径呈弱的正相关性,随着左心室舒张末内径的增大而升高。本研究结果与文献报道相似。

因此,通过改善心肌肌浆网钙调控相关蛋白的表达或活性,如提高 SERCA_{2a}, RyR₂ 表达或活性,降低 PLB 的表达,或者改善 SERCA_{2a}/PLB 可以改善扩张型心肌病的临床表现、心功能,延缓心肌损伤。

中医药亦能够有效地调节心肌肌浆网钙调控相关蛋白。研究显示黄芪及其有效成分能够改善心力衰竭心肌的收缩舒张功能可能与其改变 RyR₂ 的数量或功能, SERCA-ATP 蛋白或 mRNA 水平, PLB 磷酸化状态,从而提高了钙泵与 Ca²⁺ 的亲和力,增加了钙离子的转运效率有关^[21],黄芪注射液可改善肥大心肌细胞 SERCA_{2a} mRNA 及蛋白表达,同时改善 PLB mRNA 水平和 SERCA_{2a}/PLB^[22-23]。防己黄芪汤能够影响离体家兔心房 L-型钙离子通道信号传导途径来增强心房的收缩力^[24]。本实验研究结果显示,与模型组比较,苓桂养心汤组 SERCA_{2a}, RyR₂, CAV_{1.3}, Calsequestrin mRNA 表达升高; PLB mRNA 的表达下降。与模型组比较,苓桂养心汤组 SERCA_{2a} 及 Calsequestrin 蛋白表达升高; PLB 蛋白表达下降。

因此,苓桂养心汤能够有效地改善扩张型心肌病模型大鼠心功能、延缓或抑制心肌损伤,其机制可能与苓桂养心汤能够提高心肌肌浆网钙调控相关蛋白 SERCA_{2a}, RyR₂, CAV_{1.3}, Calsequestrin 的表达,降低 PLB 的表达有关。首先,苓桂养心汤能够提高 DCM 大鼠心肌 CAV_{1.3} 的表达,从而增加了细胞外钙离子进入细胞内的数量,改善了心肌细胞钙释放的功能,增加了激活兰尼碱受体的钙离子数目;第二,苓桂养心汤提高了 DCM 大鼠心肌 RyR₂ 的表达,从而提高了肌浆网释放的钙离子数量,并且有利于降低肌浆网内的钙浓度,缓解肌浆网钙超载,从而增强了心肌细胞的收缩力;第三,苓桂养心汤能够降低 DCM 大鼠心肌 PLB 的表达,缓解 PLB 对肌浆网钙泵的抑制作用,从而提高了肌浆网钙泵对钙离子的摄取,改善了心肌细胞的舒张功能从而改善其收缩功能。第

四, 苓桂养心汤能够提高 DCM 大鼠心肌 Calsequestrin 的表达, 有利于肌浆网内钙离子浓度的降低及钙离子的转运和储存。第五, 苓桂养心汤能够提高 DCM 大鼠心肌 SERCA_{2a} 的表达, 改善了肌浆网对钙离子的摄取与储存功能, 从而改善了心肌细胞的舒张功能, 促进了心肌细胞下一次的收缩作用。总之, 苓桂养心汤通过多环节、多途径、多靶点的治疗效应, 改善和促进了心肌细胞钙离子的转运和心肌的舒缩功能, 从而延缓了 DCM 心室的扩大、心功能的下降和缓解甚至抑制心肌损伤, 起到保护心肌的作用。

[参考文献]

[1] Iwata Y, Ohtake H, Suzuki O, et al. Blockade of sarcolemmal TRPV2 accumulation inhibits progression of dilated cardiomyopathy [J]. *Cardiovasc Res*, 2013, 99(4):760-768.

[2] Zipes D P, Camm A J, Borggrefe M, et al. ACC/AHA/ESC 2006 guidelines for management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death-executive summary; a report of the American College of Cardiology /American Heart Association Task Force and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines [J]. *Eur Heart J*, 2006, 27(17): 2099-2140.

[3] 张晓伟, 蔡文锋, 胡卓伟. 扩张型心肌病免疫病理学发病机制研究进展[J]. *心血管病学进展*, 2009, 30(5):814-817.

[4] ZHANG J N, GENG Q, CHEN X J, et al. Alteration of endothelin system and calcium handling protein in left ventricles following drug treatment in dilated cardiomyopathy rats [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2003, 24(11): 1099-1102.

[5] Anger M, Lambert F, Chemla D, et al. Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ pumps in heart and diaphragm of cardiomyopathic hamster; effects of perindopril [J]. *Am J Physiol*, 1995, 5(2): H1947-H1953.

[6] 陶然. 苓桂养心汤对心气阳虚证扩张型心肌病患者的功能影响[D]. 南京: 南京中医药大学, 2014.

[7] 陆曙, 张寄南, 杨笛, 等. 黄芪总皂甙影响病毒感染心肌细胞肌浆网钙泵活力及其基因表达[J]. *中华医学杂志*, 2000, 80(12):953-954.

[8] 崔昊晨, 刘丽婷, 刘翠楼. 防己黄芪汤对离体家兔心房收缩力及心房钠尿肽分泌调节的影响[J]. *延边大学学报*, 2012, 35(2):104-106.

[9] SHEN L J, LU S, ZHOU Y H, et al. Developing a rat model of dilated cardiomyopathy with improved survival [J]. *Biomed Biotechnol*, 2016, 17(12): 975-983.

[10] 王礼春, 马虹, 何建桂, 等. 培哚普利对心力衰竭大鼠心肌细胞钙瞬变及其调控蛋白的影响[J]. *中华心血管病杂志*, 2005, 33(6):513-517.

[11] 陈奇. 中药药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993:1103.

[12] ZHOU M L, SHI J X, HANG C H, et al. Expression of Toll-like receptor 4 in the brain in a rabbit experimental subarachnoid haemorrhage model [J]. *Inflamm Res*, 2007, 56(3): 93-97.

[13] 申焯焯. 分子生物学实验方法与技巧[M]. 广州: 中山大学出版社, 2010:214-228.

[14] 尹春阳, 李卫东, 王成华, 等. 缬沙坦对扩张型心肌病心衰大鼠肌浆网 Ca²⁺-ATP 酶及其调控蛋白的影响[J]. *安徽医药*, 2010, 14(2):143-146.

[15] 陆曙, 戴飞. 《灵枢》“心胀”探析[J]. *中华中医药杂志*, 2013, 28(11):3172-3173.

[16] 王罗卿, 赢予, 俊芳, 等. 缬沙坦对扩张型心肌病大鼠心肌预保护作用机制研究[J]. *江苏大学学报: 医学版*, 2009, 9(3):210-213.

[17] Plank D M, Yatani A, Ritsu H, et al. Calcium dynamics in the failing heart: restoration by beta-adrenergic receptor blockade[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, 285(1): H305-H315.

[18] Hasenfuss G, Reinecke H, Studer R, et al. Relation between myocardial function and expression of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in failing and nonfailing human myocardium [J]. *Circ Res*, 1994, 75(3):434-442.

[19] 李卫东, 王罗卿, 张赢予, 等. 缬沙坦对扩张型心肌病大鼠心肌预保护作用的实验研究[J]. *山西医药杂志*, 2010, 39(9):811-814.

[20] BAI S Z, SUN J, WU H, et al. Decrease in calcium-sensing receptor in the progress of diabetic cardiomyopathy [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2012, 95(3):378-385.

[21] 张萌, 高俊虹, 王玉敏, 等. 黄芪及其有效成分治疗心功能衰竭机制的研究[J]. *中医杂志*, 2011, 5(2): 4349-4352.

[22] 孙娅楠, 农一兵, 林谦. 黄芪及丹参对肥大心肌细胞肌浆网钙转运干预作用研究[J]. *中华中医药杂志*, 2012, 27(1):175-180.

[23] 孙娅楠, 农一兵, 林谦. 黄芪、丹参对肥大心肌细胞 SERCA_{2a}、PLB mRNA 表达的影响[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2011, 17(11):1214-1216.

[24] 崔昊晨, 刘丽婷, 刘翠楼. 防己黄芪汤对离体家兔心房收缩力及心房钠尿肽分泌调节的影响[J]. *延边大学学报*, 2012, 35(2):104-106.

[责任编辑 邹晓翠]