

生脉散对 DCM 大鼠的干预作用及对 TLR-4/NF- κ B 炎症信号通路的影响

邢清敏¹, 陆曙^{1*}, 周永华², 李岚¹, 周春刚¹, 沈丽娟¹

(1. 无锡市中医医院, 江苏无锡 214000; 2. 江苏省血吸虫病防治研究所, 江苏无锡 214000)

[摘要] **目的:**研究生脉散对扩张型心肌病(dilated cardiomyopathy, DCM)大鼠的干预作用,探讨生脉散对 Toll 样受体-4(Toll like receptor-4, TLR-4)/核转录因子- κ B(nuclear factor kappa B, NF- κ B)信号通路及炎症因子的影响。**方法:**用腹腔注射阿霉素法建立 DCM 大鼠模型,将大鼠随机分为空白组、阿霉素组、生脉散组、培哚普利组,分别采用生脉散和培哚普利对 DCM 大鼠进行干预。治疗后对大鼠行心脏超声检查;用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测血清 B 型钠尿肽(BNP),肿瘤坏死因子- α (TNF- α)及白细胞介素-6(IL-6)水平;用实时荧光定量 PCR 法(Real-time PCR)法检测心肌组织 TLR-4, NF- κ B mRNA 表达水平;用蛋白质印迹法(Western blot)检测心肌组织 TLR-4, NF- κ B 蛋白表达水平;取大鼠左室心肌组织用苏木素-伊红(HE)染色和透射电子显微镜的方法观察大鼠心肌组织形态。**结果:**与空白组比较,阿霉素组左室舒张末期内径(LVIDd),左室收缩末期内径(LVIDs)增大($P < 0.01$),左心室射血分数(LVEF),短轴缩短率(FS)下降($P < 0.01$);血清 BNP, TNF- α , IL-6 水平升高($P < 0.01$);心肌组织 TLR-4, NF- κ B mRNA 及蛋白表达水平升高($P < 0.01$);心肌组织病理损伤增加。与阿霉素组比较,生脉散组 LVIDs, LVIDd 减小($P < 0.01$), LVEF, FS 增加($P < 0.01$);血清 BNP, TNF- α , IL-6 水平下降($P < 0.01$);心肌组织 TLR-4, NF- κ B mRNA 及蛋白表达水平下降($P < 0.01$),心肌组织病理损伤有所改善。**结论:**生脉散可有效改善 DCM 大鼠心功能,抑制心肌损害。生脉散治疗 DCM 大鼠的作用机制,可能与调节 TLR-4 和 NF- κ B mRNA 及蛋白水平从而抑制 TLR-4/NF- κ B 信号通路下游炎症因子有关。

[关键词] 扩张型心肌病; 生脉散; 培哚普利; Toll 样受体-4; 核转录因子- κ B; 炎症因子

[中图分类号] R2-031; R22; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)02-0128-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2018020128

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171011.1433.056.html>

[网络出版时间] 2017-10-11 14:33

Effect of Shengmaisan on DCM Rats and TLR-4/NF- κ B Inflammatory Signal Pathway

XING Qing-min¹, LU Shu^{1*}, ZHOU Yong-hua², LI Lan¹, ZHOU Chun-gang¹, SHEN Li-juan¹

(1. Wuxi Traditional Chinese Medicine Hospital, Wuxi 214000, China;

2. Jiangsu Institute of Parasitic Diseases, Wuxi 214000, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the effect of Shengmaisan on rats with dilated cardiomyopathy (DCM), Toll-like receptor-4 (TLR-4)/nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) signaling pathway as well as inflammatory factors. **Method:** The establishment of dilated cardiomyopathy rats model was induced through intraperitoneal injection with doxorubicin ($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, twice a week) for 6 weeks, and then observed for 2 weeks, which lasted for eight weeks in total. The rats were randomly divided into four groups: blank group, doxorubicin group, Shengmaisan group and perindopril group. The drug groups were given Shengmaisan and perindopril, while blank group and model group were given equal volume of normal saline. left ventricular internal diameter at end-diastole (LVIDd), left ventricular internal diameter at end-systole (LVIDs), left ventricular

[收稿日期] 20170518(013)

[基金项目] 无锡市医院管理中心科研项目(YGZXM14047)

[第一作者] 邢清敏, 硕士, 住院医师, 从事中西医结合防治扩张型心肌病研究, Tel:0510-88859999, E-mail: qingminxing@sina.com

[通信作者] * 陆曙, 博士, 主任中医师, 从事中西医结合防治扩张型心肌病研究, Tel:0510-88859999, E-mail: lushu@medmail.com.cn

ejection fraction (LVEF) and fractional shortening (FS) were measured by echocardiography. Then the levels of serum brain natriuretic peptide (BNP) and inflammatory factors, including tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) were tested by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). TLR-4, NF- κ B mRNAs and proteins expressions in rat cardiac muscle were respectively determined. Histopathological characteristics of left ventricular cardiac muscle were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining and transmission electron microscopy. **Result:** Compared with blank group, LVIDd and LVISd in the doxorubicin group were increased significantly ($P < 0.01$); LVEF and FS were decreased significantly. Rats serum BNP, TNF- α and IL-6 levels increased significantly ($P < 0.01$); TLR-4, NF- κ B mRNA and protein expressions were increased significantly ($P < 0.01$). And the pathological damage of myocardium was increased. Compared with doxorubicin group, LVIDd and LVISd in the Shengmaisan group were decreased significantly ($P < 0.01$); LVEF and FS were increased significantly, Rat serum BNP, TNF- α and IL-6 levels decreased significantly ($P < 0.01$); TLR-4, NF- κ B mRNA and protein expressions were decreased significantly ($P < 0.01$). And pathological damage in myocardial tissues was alleviated. **Conclusion:** Shengmaisan can effectively improve cardiac function and restrain myocardial damage of DCM rats. The mechanisms of action of Shengmaisan can regulate partly TLR-4 and NF- κ B mRNA and protein expressions of rats with dilated cardiomyopathy, and restrain downstream inflammatory factors in TLR-4/NF- κ B signaling pathways.

[**Key words**] dilated cardiomyopathy; Shengmaisan; perindopril; Toll-like receptor-4 (TLR-4); nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B); inflammatory factor

扩张型心肌病(DCM)^[1]以左心室或双侧心室扩大伴收缩功能障碍为特征,以心脏扩大、心力衰竭、心律失常、血栓栓塞及猝死为主要临床表现。目前 DCM 在我国人群中患病率约(13~84)/10 万,预后极差,确诊后 5 年生存率约 50%,10 年生存率约 25%,已经成为心力衰竭的第 3 位原因,是心脏移植的最常见原因^[2-3]。目前 DCM 病因不明,尚无特异而有效的治疗方法^[4],因此对该病发病机制及治疗的研究迫在眉睫。一些学者从免疫炎症角度对本病的病理机制进行了有益的探索。研究发现,在 DCM 发病及疾病演变过程中,过度的免疫炎症反应发挥了关键性作用^[5]。免疫反应可导致扩张型心肌病患者体内多种细胞因子改变,如血清白细胞介素(IL)-2,肿瘤坏死因子(TNF)水平升高,这些改变直接参与了 DCM 心肌重塑的病理生理改变过程^[6-7]。Timmers 等^[8]发现,Toll 样受体 4(TLR-4)参与了左室心肌重塑,并且可能通过产生炎性细胞因子(如 TNF- α ,IL-1)实现。TLR-4 是内毒素/脂多糖(LPS)的特异性识别受体,TLR-4 与 LPS 结合,LPS 通过髓样分化因子 88(MyD88)依赖和非依赖两条途径激活 TLR-4/核转录因子- κ B(NF- κ B)信号通路,导致炎性因子(如 IL-6,TNF- α 等)大量释放,触发一系列炎症反应。TLR-4/NF- κ B 信号转导通路是重要的炎性通路之一,与许多疾病的发生发展过程密切相关,TLR-4/NF- κ B 信号通路可能在 DCM 的

发展过程中发挥了重要作用。

中医学把本病归于“心悸”、“喘证”、“水肿”等范畴,有学者认为阳虚水停为本病主要病机^[9],但本课题组在临床中发现,本病患者常有心悸、气短、疲乏、动则汗出、自汗或盗汗、心烦、口干、舌红少苔、脉细数无力或结代等气阴两虚的表现,在前期研究中也发现气虚、阴虚为慢性心力衰竭的重要证候要素^[10]。古方生脉散为益气养阴名方,专家共识建议使用生脉饮等中药可明显改善扩张型心肌病患者的心功能^[11]。病毒性心肌炎为 DCM 病因之一,已有学者发现,生脉散治疗病毒性心肌炎能够防止和减轻心肌细胞损伤,对炎症损伤指标有较好的修复作用^[12]。但生脉散治疗扩张型心肌病的具体机制目前仍不清楚。生脉散通过直接抑制下游炎症因子如 IL-6,TNF- α 等发挥作用,还是通过对 TLR-4/NF- κ B 信号通路的调节干预 DCM 的发生发展,目前研究尚未证实。本课题组在前期研究中已成功复制出 DCM 大鼠模型^[13-14],本研究通过开展动物实验的方式,研究生脉散对 DCM 大鼠 TLR-4/NF- κ B 信号通路及炎症因子的影响,揭示其防治 DCM 的分子生物学机制,为生脉散的临床应用提供理论依据。

1 材料

1.1 动物 清洁级健康成年雄性 SD 大鼠 51 只,体重 270~300 g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号 SCXK(京)2012-0001,饲养于

江苏省血吸虫病防治研究所, 许可证号 SYXK(苏)2012-0033。本研究中通过江苏省寄生虫病防治研究所动物伦理委员会审查, 批号 201x008。

1.2 药物 注射用盐酸阿霉素(ADR, 深圳万乐药业有限公司, 国药准字 H44024359, 10 mg/瓶)。生脉散由红参 10 g, 麦冬 15 g, 五味子 6 g 组成, 所有中药均选用颗粒剂, 由江阴天江药业有限公司提供, 红参颗粒(批号 1310134), 2 g/袋, 相当于生药 10 g; 麦冬颗粒(批号 1411036), 3 g/袋, 相当于生药 10 g; 五味子颗粒(批号 1403165), 1 g/袋, 相当于生药 6 g。培哌普利片[雅施达, 施维雅(天津)制药有限公司, 国药准字 H20034053, 4 mg/片]。

1.3 试剂 血清 B 型钠尿肽(BNP), TNF- α , IL-6 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(上海蓝基生物科技有限公司, 批号分别为 E01B0452, E02T0008, E02I0006); trizol(美国 Invitrogen 公司, 批号 15596-026); 逆转录试剂盒, SYBR[®] Premix ExTaq[™] II 试剂盒(大连宝生物工程有限公司, 批号分别为 RR047A, RR420A); RIPA 裂解液, 苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(碧云天生物技术有限公司, 批号分别为 P0013B, C0105); 兔抗鼠 TLR-4 antibody, NF- κ B antibody, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH) antibody(Santa Cruz 公司, 批号分别为 sc-30002, sc-109, sc-25778); 羊抗兔二抗(美国 Abcam 公司, 批号 ab6721); 蛋白定量试剂盒(美国 Bio-Rad 公司, 批号 5000122)。

1.4 仪器 CX50 型超声心动仪(美国 Philips 公司); MIKRO 200R 型高速冷冻离心机(德国 Hettich 科学仪器公司); LightCycler480 型基因扩增仪, SmartSpec plus 型核酸蛋白测量仪, 041BR111422 型电泳装置, mini 型蛋白转膜系统(美国 Bio-Rad 公司); CLINX3500 mini 型化学发光成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司); 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)。

2 方法

2.1 模型制备 DCM 大鼠模型的建立参照文献[13-14], 大鼠按照体重每次腹腔注射盐酸阿霉素(1 mg·kg⁻¹), 每周 2 次, 连续 6 周, 共 12 次, 总量 12 mg·kg⁻¹。空白组注射同剂量生理盐水。每次根据大鼠体重调整阿霉素注射剂量, 6 周后停药观察 2 周。预实验中, 随机抽取正常大鼠 8 只和模型大鼠 12 只行超声心动图检测, 血清 BNP 检查及心肌病理检查, 结果符合扩张型心肌病的改变, 证明模型复制

成功。

2.2 分组 51 只 SD 大鼠随机分为空白组(12 只), 阿霉素组(15 只), 阿霉素 + 生脉散组(生脉散组, 12 只)和阿霉素 + 培哌普利组(培哌普利组, 12 只)。

2.3 喂养方法 模型建立成功后灌胃治疗, 1 次/d, 共 8 周。生脉散组大鼠灌胃生脉散, 用量按人体重(60 kg)的 7 倍计算^[15], 每日用量为中药剂量 $\times 7 / (60 \text{ kg}) \times$ 大鼠体重(kg), 即红参 0.233 g \times 大鼠体重(kg) + 麦冬 0.525 g \times 大鼠体重(kg) + 五味子 0.117 g \times 大鼠体重(kg)。培哌普利组大鼠灌胃培哌普利片, 用量 3 mg \times 大鼠体重(kg)^[16]。空白组和阿霉素组灌胃等体积生理盐水。

2.4 大鼠一般状态观察 观察实验过程中各组大鼠的体重、生活状态及死亡情况。

2.5 超声心动图检查 S12-4 高频探头, 频率为 12 MHz。腹部朝上固定于平板上, 将探头放置于大鼠胸骨旁, 获得满意的切面和 M 型图, 测量后获得左室舒张末期内径(LVIDd), 左室收缩末期内径(LVIDs), 左室射血分数(LVEF)及短轴缩短率(FS)。

2.6 ELISA 法检测血清 BNP, TNF- α , IL-6 水平 提前禁食 12 h, 常规消毒, 腹腔麻醉后沿腹中线剪开腹腔, 充分暴露下腔静脉, 获取血液 4 mL, 3 000 r·min⁻¹离心 15 min, 吸取上清液。按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作。

2.7 实时荧光定量 PCR 检测心肌组织 TLR-4, NF- κ B mRNA 表达水平 取血后将大鼠处死, 取出心脏, 用生理盐水冲洗干净, 沿冠状沟剪去心房, 再沿室间隔剪去室间隔和右心室, 获取左心室心肌。Trizol 法提取总 RNA, 紫外分光光度计测定 RNA 浓度, 应用 Takara 反转录及 PCR 试剂盒进行 PCR 反应。反应条件为 94 $^{\circ}$ C 30 s, 94 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 60 s, 40 个循环。通过溶解曲线, 2% 琼脂糖凝胶电泳和基因测序确定产物的准确性, mRNA 表达程度采用相对定量计算, 标准化比值计算公式采用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法。将 β -actin 作为内参基因, 引物序列由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因	序列	长度/bp
TLR-4	5'-AGAATGAGGACTGGGTGA-3'	243
	5'-AGCGGCTACTCAGAAACT-3'	
NF- κ B	5'-GCAAACCTGGGAATACTTCTATGTGACTAAG-3'	123
	5'-ATAGGCAAGGTCAGAATGCACCAGAAGTCC-3'	
β -actin	5'-CCTCTATGCCAACACAGTGC-3'	190
	5'-ACATCTGCTGGAAGGTGGAC-3'	

2.8 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测心肌组织 TLR-4, NF- κ B 蛋白表达水平 采用相同方法获得心肌组织 50 mg, 加入裂解液 1 mL, 4 $^{\circ}$ C, 12 000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 30 min, 测定蛋白浓度, 进行蛋白变性。将蛋白 30 ~ 50 μ g 于 SDS-聚丙烯酰胺凝胶中电泳, 结束后转膜, 转膜完毕后, 将 PVDF 膜置于 5% 脱脂奶粉 1 h, 加入一抗 (TLR-4 1 : 1 000, NF- κ B 1 : 1 000, GAPDH 1 : 4 000), 4 $^{\circ}$ C 轻摇结合 12 ~ 18 h, 洗膜 5 min。加入二抗 (1 : 5 000), 封于杂交袋中结合 1 h, 洗膜 5 min。用 ECL 显色后用医用 X 射线胶片采集荧光信号。采用 Clinx Chemi 图像分析软件分析条带灰度值, 以目的蛋白与 GAPDH 条带灰度值比值表示目的蛋白相对表达量。

2.9 心肌组织 HE 染色 取左室心肌组织, 多聚甲醛固定, 脱水, 常规石蜡包埋, 连续切片, HE 染色, 脱水, 中性树胶封片, 显微镜下观察。

2.10 心肌组织透射电子显微镜 取左室心肌组织, 修剪为 1 mm \times 1 mm \times 1 mm, 用 2.5% 戊二醛固定, 脱水、浸透及包埋后切片, 染色后在透射电子显微镜下观察。

2.11 统计学方法 采用 SPSS 19.0 统计软件, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分

析, 组内两两比较采用最小显著差数法 (bonferroni) 分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 生脉散对大鼠生活状态及死亡率的影响 空白组大鼠毛发柔顺, 有光泽, 精神、活动度、进食如常, 无腹水形成, 无死亡。阿霉素组大鼠毛发凌乱, 无光泽, 精神、活动度差, 进食减少, 有明显腹水形成, 死亡率高。与阿霉素组大鼠比较, 生脉散组、培哌普利组大鼠活动较正常, 毛发较柔顺, 有光泽, 饮食、饮水无明显异常, 腹水减轻。见表 2。

表 2 生脉散对各组大鼠死亡率的影响

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	死亡/只	死亡率/%
空白	-	0	0
阿霉素	-	6	40
生脉散	0.875	1	8.33
培哌普利	0.003	2	16.67

3.2 生脉散对大鼠体重的影响 给药 8 周后, 与空白组比较, 阿霉素组大鼠体重显著下降 ($P < 0.01$); 与阿霉素组比较, 生脉散组、培哌普利组大鼠体重显著增加 ($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 生脉散对大鼠体重的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of Shengmaisai on body weight in rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	第 0 周	第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周	第 5 周	第 6 周	第 7 周	第 8 周
空白	12	-	415 \pm 26	426 \pm 25	435 \pm 20	442 \pm 21	450 \pm 22	457 \pm 24	466 \pm 24	478 \pm 17	489 \pm 21
阿霉素	9	-	342 \pm 21	354 \pm 19	372 \pm 20	363 \pm 14	356 \pm 15	343 \pm 16	335 \pm 23	319 \pm 25	301 \pm 24 ¹⁾
生脉散	11	0.875	342 \pm 24	344 \pm 24	348 \pm 24	354 \pm 24	362 \pm 24	379 \pm 24	387 \pm 24	397 \pm 24	415 \pm 24 ²⁾
培哌普利	10	0.003	346 \pm 36	356 \pm 35	354 \pm 31	358 \pm 31	363 \pm 35	367 \pm 40	389 \pm 38	409 \pm 48	420 \pm 42 ²⁾

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与阿霉素组比较²⁾ $P < 0.01$ (表 4 ~ 7 同)。

3.3 生脉散对大鼠超声心动的影响 给药 8 周后, 与空白组比较, 阿霉素组大鼠 LVIDd, LVIDs 均显著增大 ($P < 0.01$); LVEF, FS 均显著降低 ($P < 0.01$)。与阿霉素组比较, 生脉散组以及培哌普利

组大鼠的 LVIDd, LVIDs 均显著降低 ($P < 0.01$); LVEF, FS 均显著增大 ($P < 0.01$)。提示生脉散组、培哌普利组大鼠心腔缩小, 心功能改善。见表 4, 图 1。

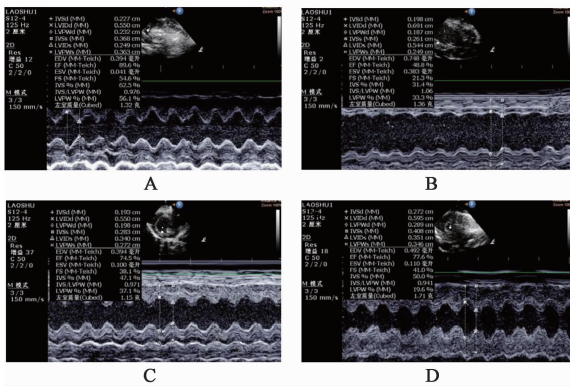
表 4 生脉散对大鼠超声心动的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Effect of Shengmaisai on echocardiography in rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	LVIDd/mm	LVIDs/mm	LVEF/%	FS/%
空白	12	-	5.31 \pm 0.19	2.29 \pm 0.21	90.85 \pm 2.10	57.05 \pm 3.37
阿霉素	9	-	6.53 \pm 0.26 ¹⁾	4.01 \pm 0.38 ¹⁾	55.14 \pm 6.68 ¹⁾	34.37 \pm 4.58 ¹⁾
生脉散	11	0.875	5.88 \pm 0.36 ²⁾	3.20 \pm 0.36 ²⁾	76.24 \pm 2.31 ²⁾	43.11 \pm 6.12 ²⁾
培哌普利	10	0.003	5.67 \pm 0.63 ²⁾	3.32 \pm 0.44 ²⁾	79.61 \pm 7.04 ²⁾	45.42 \pm 6.83 ²⁾

3.4 生脉散对大鼠血清 BNP, TNF- α , IL-6 水平的

影响 给药 8 周后, 与空白组比较, 阿霉素组大鼠



A. 空白组; B. 阿霉素组; C. 生脉散组; D. 培哌普利组 (图 2~4 同)

图 1 生脉散对大鼠超声心动的影响

Fig. 1 Effect of Shengmaisan on echocardiography in rats

表 5 生脉散对大鼠血清 BNP, TNF- α , IL-6 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/g·kg ⁻¹	BNP	TNF- α	IL-6
空白	12	-	246.65 ± 67.57	197.84 ± 58.83	22.66 ± 12.65
阿霉素	9	-	401.79 ± 141.91 ¹⁾	341.02 ± 106.16 ¹⁾	90.14 ± 25.56 ¹⁾
生脉散	11	0.875	234.30 ± 52.07 ²⁾	207.21 ± 61.78 ²⁾	39.16 ± 21.03 ²⁾
培哌普利	10	0.003	208.14 ± 41.33 ²⁾	207.64 ± 53.71 ²⁾	49.70 ± 29.83 ²⁾

表 6 生脉散对大鼠心肌组织 TLR-4, NF- κ B mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/g·kg ⁻¹	TLR-4	NF- κ B
空白	12	-	0.79 ± 0.35	0.96 ± 0.43
阿霉素	9	-	3.25 ± 1.23 ¹⁾	3.18 ± 1.07 ¹⁾
生脉散	11	0.875	0.93 ± 0.67 ²⁾	1.16 ± 0.57 ²⁾
培哌普利	10	0.003	0.90 ± 0.27 ²⁾	0.91 ± 0.41 ²⁾

($P < 0.01$); 与阿霉素组比较, 生脉散组以及培哌普利组大鼠心肌组织 TLR-4, NF- κ B 蛋白表达水平均显著下降 ($P < 0.01$)。见表 7, 图 2。

表 7 生脉散对大鼠心肌组织 TLR-4, NF- κ B 蛋白水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/g·kg ⁻¹	TLR-4/GAPDH	NF- κ B/GAPDH
空白	12	-	1.55 ± 0.22	0.83 ± 0.07
阿霉素	9	-	2.45 ± 0.40 ¹⁾	1.63 ± 0.31 ¹⁾
生脉散	11	0.875	1.41 ± 0.47 ²⁾	0.92 ± 0.36 ²⁾
培哌普利	10	0.003	1.74 ± 0.39 ²⁾	1.02 ± 0.28 ²⁾

3.7 生脉散对大鼠心肌组织形态学的影响 空白组大鼠心肌纤维无断裂, 排列整齐, 细胞质均匀丰富; 细胞排列整齐, 无间质纤维化, 细胞间隙正常。阿霉素

BNP, TNF- α , IL-6 水平均显著升高 ($P < 0.01$); 与阿霉素组比较, 生脉散组、培哌普利组大鼠 BNP, TNF- α , IL-6 水平均显著下降 ($P < 0.01$)。见表 5。

3.5 生脉散对大鼠心肌组织 TLR-4, NF- κ B mRNA 表达的影响 给药 8 周后, 与空白组比较, 阿霉素组大鼠心肌组织 TLR-4, NF- κ B mRNA 水平均显著升高 ($P < 0.01$); 与阿霉素组比较, 生脉散组以及培哌普利组大鼠心肌组织 TLR-4, NF- κ B mRNA 水平均显著下降 ($P < 0.01$)。见表 6。

3.6 生脉散对心肌组织 TLR-4, NF- κ B 蛋白水平的影响 给药 8 周后, 与空白组比较, 阿霉素组大鼠心肌组织 TLR-4, NF- κ B 蛋白表达水平均显著升高

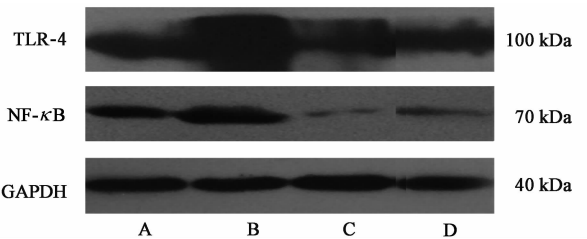


图 2 生脉散对心肌组织 TLR-4, NF- κ B 蛋白水平的影响

Fig. 2 Effect of Shengmaisan on TLR-4, NF- κ B protein expressions in myocardial tissues in rats

组大鼠心肌部分肌纤维溶解、断裂, 心肌细胞变性, 甚至坏死; 细胞排列紊乱, 组织间质纤维化, 细胞间隙增宽, 炎症细胞浸润, 呈心肌病样改变。生脉散组、培哌普利组大鼠心肌 HE 染色结果显示, 大鼠心肌纤维断裂、变性坏死情况较阿霉素组减轻, 间质纤维化及炎症细胞浸润程度较阿霉素组改善。见图 3。

3.8 生脉散对大鼠心肌组织超微结构的影响 空白组大鼠心肌纤维排列齐整完好, 线粒体大小正常, 分布均匀, 无水肿, 膜完整, 内膜嵴密度正常。阿霉素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。生脉散组和培哌普利组大鼠心肌纤维断裂、线粒体肿胀、分布欠均匀、空泡变性、内膜嵴缺失等情况较阿霉素组改善。见图 4。

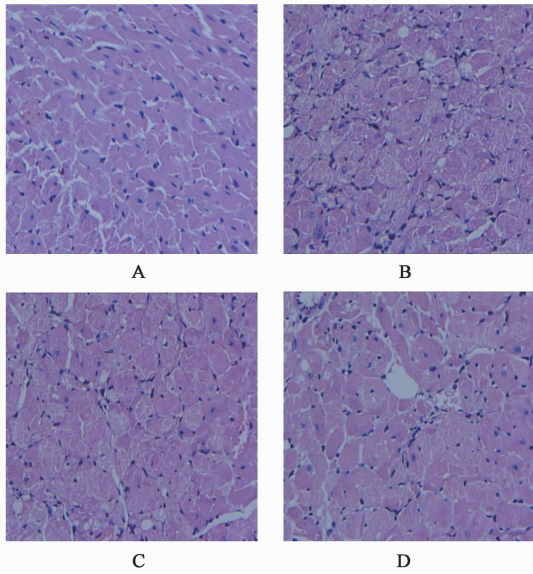


图 3 生脉散对心肌组织病例形态的影响(HE, ×200)
Fig.3 Effect of Shengmaisan on pathomorphology of myocardial tissues(HE, ×200)

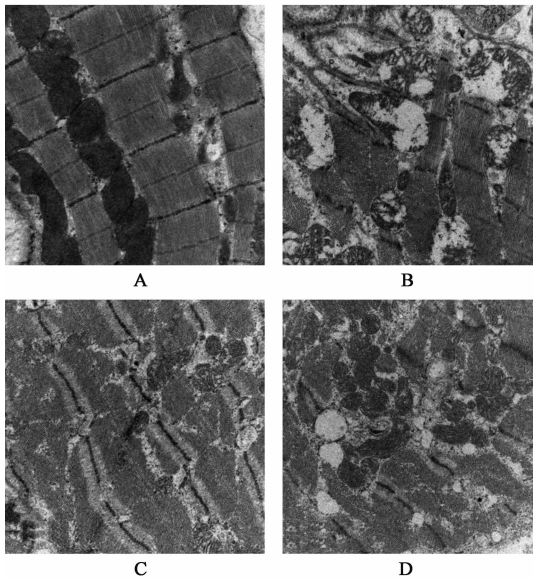


图 4 生脉散对心肌组织超微结构的影响(乙酸铀, ×20 000)
Fig.4 Effect of Shengmaisan on ultrastructure of myocardial tissues (uranyl acetate, ×20 000)

4 讨论

扩张型心肌病临床主要表现为心脏扩大、心力衰竭、心律失常、血栓栓塞及猝死。本病发病率较高,预后极差。中医学把本病归于“心悸”、“喘证”、“水肿”等范畴,本病患者常有心悸、气短、疲乏、动则汗出、自汗或盗汗、心烦、口干、舌红少苔、脉细数无力或结代等气阴两虚的表现。在本实验中,大鼠病程中主要表现为活动度下降,饮食减少,消瘦,心悸(心脏彩超显示心律失常)等,符合气阴两虚的

临床表现。历代医家认为,心气是推动血液运行的原动力,气盛则血行,因此,该病病机必然与“心气”相关。《黄帝内经》中提出“心藏血脉之气”,心气充沛才可维持心脏功能,使血液正常运行于脉内,周流不息,营养全身。若心气不足,则血液运行无力,血脉不充,心脉失养,瘀阻脉络,心功能低下;心气亏虚,邪毒乘虚而入,传入于脉,心脉痹阻,血行不畅,日久可致心体胀大;心气进一步耗散,心阴受损,终致阳气虚衰,严重时五脏俱损、心阳暴脱,出现厥逆,甚至阴阳离绝危候。因此,本课题组推测,气阴两虚乃本病重要病机,甚至贯穿本病病程的始终。以生脉散中人参大补元气,振奋心阳,充实心气;麦冬滋阴养心;五味子能聚耗散之气,三药合用益气滋阴,养心复脉。现代医学研究也证实,生脉散能够增强心肌收缩力,降低心肌耗氧量,改善微循环,使心率减慢,增加左室的顺应性,正性肌力等作用,从而提高心排量^[17-18]。在本研究中,生脉散组大鼠一般情况有所改善;心腔明显缩小,左室射血功能明显改善;血中 BNP 水平明显下降;心肌组织的病理状态有所改善,抑制了心肌的进一步损害,与上述研究结果一致,表明气阴两虚是本病的重要病机,生脉散可有效治疗 DCM 大鼠。

免疫炎症反应机制是 DCM 的关键发病机制,TLR-4/NF- κ B 炎症信号通路是目前研究的热点。此通路包括 TLR, NF- κ B, 多聚二磷酸腺苷核糖聚合酶(PARP)等多个环节。TLR 识别炎症刺激,并通过髓细胞样分化因子 88(MyD88)依赖途径和非依赖途径将信号转移至细胞内,最终激活 NF- κ B 和 PARP-1,促进下游炎症因子(TNF- α , IL-1, IL-6 等)的表达,从而诱发机体的一系列变异炎症反应。有学者研究阿霉素诱导的心肌病小鼠,发现心肌病的发病与 TLR-4 信号通路相关^[19]。同时,TLR-4 参与左室心肌重塑可能是通过产生炎症细胞因子(如 TNF- α , IL-1)实现的^[8]。在本研究中,与正常组比较,模型组大鼠血清 TNF- α 和 IL-6 水平均增加,心肌组织 TLR-4 和 NF- κ B mRNA 及蛋白表达水平均升高,也表明炎症因子,TLR-4 及 NF- κ B 参与了本病的发病机制。推测 TLR-4 通过识别 DCM 大鼠心肌细胞释放的某些物质,作为配体,这些物质与 TLR-4 结合,经过一系列级联反应逐步激活信号通路上的 NF- κ B。NF- κ B 为重要的核转录因子,参与了诸多生理病理过程,如炎症反应、细胞凋亡等,是促进多种炎症细胞因子释放的直接作用分子。心肌细胞受到病理刺激时,NF- κ B 通过 TLR-4 激发的信号传导,

继而导致下游多种细胞因子如 TNF- α 和 IL-6 的分泌,促使心脏组织产生慢性炎症反应,引起心脏组织的损伤与修复过程,参与扩张型心肌病的发病。治疗结果显示,生脉散组及培哌普利组大鼠血清 TNF- α 和 IL-6 水平较模型组显著降低;心肌组织 TLR-4 和 NF- κ B mRNA 和蛋白表达水平较模型组也显著下降。研究已证实,培哌普利能降低 DCM 患者血清炎症因子水平,改善心功能^[20]。而生脉散治疗 DCM 的作用机制尚不清楚。在本研究中,生脉散能显著降低 DCM 大鼠心肌组织 TLR-4, NF- κ B mRNA 及蛋白表达水平,同时能够降低血清 IL-6 和 TNF- α 水平,提示生脉散可能是通过下调 TLR-4, NF- κ B 的表达降低下游炎症因子水平从而抑制免疫炎症反应的。通过干预 TLR-4/NF- κ B 信号通路对 DCM 的免疫炎症损伤发挥抗炎作用,这可能是其治疗扩张型心肌病的机制之一。另外,中药成分复杂,生脉散可能通过多途径、多靶点发挥抑制炎症反应的作用,其具体机制还有待于进一步研究。

[参考文献]

[1] 陈灏珠,钟南山,陆再英,等.内科学[M].北京:人民卫生出版社,2013:272.

[2] 张茜,孙爱军,范铮,等.一个扩张型心肌病伴房室传导阻滞家系 SCN5A 基因的突变研究[J].中国分子心脏病学杂志,2009,9(2):65-69.

[3] Van de Meerakker J B, Christiaans I, Barnett P, et al. A novel alpha-tropomyosin mutation associates with dilated and non-compaction cardiomyopathy and diminishes actin binding[J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1833(4):833-839.

[4] 高晓飞,许轶洲.扩张型心肌病治疗手段的进展[J].心脏杂志,2016,28(4):488-491.

[5] Yndestad A D, Amas J K, Oie E, et al. Systemic inflammation in heart failure—the whys and wherefores[J]. Heart Fail Rev, 2006, 11(1):83-92.

[6] Cleland J G F, Dauhert J C, Erdmann E, et al. The effect of cardiac resynchronization on morbidity and mortality in heart failure[J]. Engl J Med, 2005, doi:10.1111/j.1527-5299.2005.04176.

[7] 王飞.扩张型心肌病的免疫机制及治疗进展[J].甘肃科技,2011,27(10):145-147.

[8] Timmers L, Sluijter J P, Hoefler I E, et al. Toll-like receptor 4 mediates maladaptive left ventricular remodeling and impairs cardiac function after myocardial infarction[J]. Circ Res, 2008, 102(2):257-264.

[9] 于睿,赵昕,于游.李德新诊疗扩张型心肌病经验总结[J].辽宁中医杂志,2011,38(10):1958-1959.

[10] 潘茜.扩张型心肌病中医证素及其与心功能指标和抗心肌抗体相关性的研究[D].南京:南京中医药大学,2013.

[11] 中华医学会心血管病学分会,《中华心血管病杂志》编辑委员会,中国心肌病诊断与治疗建议工作组.心肌病诊断与治疗建议[J].中华心血管病杂志,2007,35(1):5-16.

[12] 许之民,赵美华,陆秋芬,等.生脉散对急性病毒性心肌炎临床症状及炎症损伤指标的影响[J].中西医结合心脑血管病杂志,2003,1(2):86-87.

[13] 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.

[14] 沈丽娟,陆曙,周永华,等.18 氟-氟脱氧葡萄糖微型正电子发射断层扫描心肌代谢显像技术在大鼠扩张型心肌病模型评价中的应用[J].中国循环杂志,2016,31(8):802-806.

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

[16] 戴飞.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[D].南京:南京中医药大学,2014.

[17] 陆曙,沈丽娟,任春,等.扩张型心肌病患者中医证素与抗心肌抗体的相关性[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(18):152-156.

[18] 刘志辉,王丽君,王平,等.左卡尼丁联合生脉注射液治疗扩张型心肌病的临床观察[J].中国实用医药,2013,8(34):166-167.

[19] Divanovic S, Trompette A, Atabani S F, et al. Negative regulation of Toll-like receptor 4 signaling by the Toll-like receptor homolog RP105[J]. Nat Immunol, 2005, 6(6):1571-1578.

[20] 刘超,宋耀明,黄岚,等.缬沙坦与培哌普利对扩心病心力衰竭患者细胞因子和心肌纤维化的影响[J].第三军医大学学报,2008,30(12):1189-1192.

[责任编辑 张丰丰]