

参芪益心方对阿霉素诱导的慢性心力衰竭大鼠心肌结构和细胞因子的影响

金娟¹, 崔璐², 邹国良¹, 刘莉^{1*}

(1. 黑龙江中医药大学附属第一医院, 哈尔滨 150040; 2. 黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040)

[摘要] 目的: 观察参芪益心方对慢性心力衰竭(CHF)大鼠心肌形态、心功能、血浆中血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的影响。方法: 将90只Wistar雄性大鼠随机平均分为6组: 正常对照组、模型组、依那普利对照组、芪苈强心对照组、参芪益心方低剂量($16.96 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)组、高剂量($33.92 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)组。利用阿霉素第1, 3, 5周, $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; 第2, 4, 6周, $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量, 每日1次, 灌胃4周, 观察大鼠的心肌组织形态学及超微结构变化, 运用超声心动图检测大鼠左室收缩末期内径(LVSD)、左室舒张末期内径(LVDD)、左室射血分数(EF)、左室短轴缩短率(FS), 放免法测定大鼠血浆AngⅡ, TNF- α 。结果: 经EF, FS提示造模成功, 各治疗组LVSD, LVDD, EF, FS均有改善, 参芪益心方高剂量组、中药对照组、西药对照组与模型组比较有统计学意义($P < 0.05$)。各治疗组AngⅡ, TNF- α 均有不同程度的降低, 与模型组比较有统计学意义($P < 0.05$)。结论: 参芪益心方可以改善CHF大鼠心肌组织形态, 抑制心室重构, 改善CHF大鼠心功能。

[关键词] 心力衰竭; 阿霉素; 参芪益心方

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)08-0128-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfix.2014080128

[收稿日期] 20130819(021)

[基金项目] 黑龙江省自然科学基金(QC2010091/C190402); 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(12531615); 黑龙江中医药大学新药基金(201102)

[第一作者] 金娟, 博士, 副主任医师, 从事心力衰竭发生机制与治疗方面的研究, Tel: 13845112850, E-mail: jinjuan_723@163.com

[通讯作者] * 刘莉, 博士, 主任医师, 从事心力衰竭与代谢综合征方面的研究, Tel: 13904616262, E-mail: liliu429@163.com

- [4] Hitchcock M J M, Jaffe H S, Martin J C, et al. Cidofovir, a new agent with potent antiherpes virus activity [J]. Antiviral Chem Chemother, 1996, 7(3):115.
- [5] 施畅, 廖明阳. 环磷酰胺与异环磷酰胺在体内的代谢特点分析[J]. 解放军药学报, 2001, 17(2):92.
- [6] 廖新成, 刘伦, 郭艳春, 等. α -氨基磷酸酯衍生物的合成及其表征[J]. 有机化学, 2006, 26(2):233.
- [7] 孙宏斌. 五环三萜类天然产物的研究进展[J]. 药物化学进展, 2006(4):253.
- [8] 王会敏, 田炜, 喇孝瑾, 等. 葛根素、齐墩果酸及其配伍对T2DM大鼠氧化应激和炎症反应的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(15):174.
- [9] Yuko F, Takeshi Y, Shun-ichw, et al. Lupane and oleanane triterpenoids from the cones of liquidamber strytraciflua[J]. J Nat Prod, 2006, 69(1):142.
- [10] 邹盛勤, 黄浩. RP-HPLC同时测定草莓中齐墩果酸和熊果酸[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(11):79.
- [11] Ma C M, Nakamura N, Hattori M. Chemical modification of oleanene type triterpenes and their inhibitory activity against HIV-1 protease dimerization [J]. Chem Pharm Bull, 2000, 48(11):1681.
- [12] Sobhani S, Tashrfi Z. Al(OTf)₃ as an efficient catalyst for one-pot synthesis of primary diethyl 1-aminophosphonates under solvent-free conditions [J]. Synthetic Commun, 2009, 39:120.
- [13] Zhu Y Y, Qian L W, Zhang J, et al. New approaches to the structural modification of olean-type pentacyclic triterpenes via microbial oxidation and glycosylation [J]. Tetrahedron, 2011, 67(23):4206.
- [14] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. J Immunol Methods, 1983, 65(1):55.

[责任编辑 聂淑琴]

Effects of Shenqi Yixin Fang on Myocardial Structure and Cytokines in Doxorubicin-induced Chronic Heart Failure Rats

JIN Juan¹, CUI Lu², ZOU Guo-liang¹, LIU Li^{1*}

(1. Cardiovascular Department of First Hospital Affiliated to Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Harbin 150040, China; 2. Heilongjiang University of TCM, Harbin 150040, China)

[Abstract] Objective: To observe the effect of the Shenqi Yixin Fang on cardiac function, plasma angiotensin II (Ang II) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) of chronic heart failure (CHF) rats. **Method:** Ninety male Wistar rats were randomly divided into six groups: normal control group, model group, enalapril control group, the Qili Qiangxin control group, the low dose of Shenqi Yixin Fang group ($16.96 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), the high dose of Shenqi Yixin Fang group ($33.92 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$). Doxorubicin was used to induce CHF models, and the modelling rats were given drug intervention for 4 weeks. The echocardiography was used to measure cardiac function, plasma Ang II and TNF- α were measured by radioimmunoassay. **Result:** In model group the left ventricular end-systolic diameter (LVSD), left ventricular end-diastolic diameter (LVDD), left ventricular ejection fraction (EF), left ventricular fractional were shorten compared with normal control group ($P < 0.05$). In treatment group, these indicators were improved compared with modek group ($P < 0.05$). In treatment groups the plasma Ang II/TNF- α levels were reduced compared with the model group ($P < 0.05$). **Conclusion:** The Shenqi Yixin Fang can improve myocardial tissue morphology, inhibit ventricular remodeling and improve cardiac function in CHF rats.

[Key words] CHF; doxorubicin; Shenqi Yixin Fang

慢性心力衰竭(CHF)是一种机制复杂的病理生理过程,也是多种疾病终末期的共同通路。心功能下降是CHF病理生理过程中一个非常重要的环节,心功能的变化能够检验动物模型成功与否,评价治疗CHF的药物疗效、评估疾病的预后等,是评价CHF程度的重要指标。目前,大部分的实验研究依据血流动力学指标评价CHF大鼠心功能,尚缺乏精确的检测手段评价慢性心衰大鼠模型的心脏改变,超声心动图作为一种评价左室重构和心功能的手段,由于其具有快速、方便、无创、可重复测量等优点,受到学者的广泛关注^[1]。本实验采用阿霉素诱导的CHF大鼠模型,使用参芪益心方对其进行干预,旨在探讨参芪益心方对阿霉素诱导的心力衰竭大鼠心肌结构以及细胞因子血管紧张素II(Ang II)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的影响。

1 材料

1.1 动物 健康SPF级Wistar雄性大鼠90只,由长春市亿新实验动物有限公司提供,体重(200 ± 20)g,许可证号SCXK-(吉)2011-0004,常温饲养,自由饮水,所饲饲料均为标准合成大鼠饲料。

1.2 药品 ①参芪益心方:黄芪20g,人参20g,桂

枝10g,丹参15g,白术15g,茯苓20g,淫羊藿20g,益母草15g,仙鹤草30g,葶苈子15g,甘草10g。购于黑龙江中医药大学附属第一医院。煎剂由黑龙江中医药大学煎药室提供,后被分别浓缩制成浓度为 $1.696, 3.392 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的水煎剂备用。②依那普利(批号11093001,扬子江制药股份有限公司)用灭菌注射用水配成 $1.76 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 溶液备用。③阿霉素(批号110501,浙江海正药业股份有限公司),配成 $0.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液。④芪苈强心胶囊(批号20110601,石家庄以岭药业股份有限公司)用灭菌注射用水配成 $32.14 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 溶液备用。

1.3 仪器 GEL-400型彩色多普勒心脏超声(美国,10MHz探头),IBAS2.5全自动图像分析系统(德国Kontron公司),XSJ-D倒置显微镜(重庆光学仪器厂),Moticam3000显微摄影成像系统(美国),电热恒温箱(上海一恒公司),生物组织包埋机(天津航空机电公司),2135型轮转式组织切片机(德国莱卡公司)。

2 方法

2.1 造模方法及动物分组 Wistar雄性大鼠90只,适应性喂养1周后,随机平均分为6组,即正常

对照组、模型组、西药对照组、中药对照组、参芪益心高剂量组、参芪益心低剂量组, 每组 15 只。参照文献^[2], 按照造模第 1, 3, 5 周, $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量; 第 2, 4, 6 周, $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量, 对除正常对照组外的其他 5 组大鼠进行腹腔注射阿霉素, 正常对照组同时腹腔注射等量的生理盐水, 每周 1 次, 共注射 6 周。

2.2 给药 各组动物造模后, 正常对照组大鼠自由饮食、水; 模型组 ig 生理盐水 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$; 西药对照组 ig 依那普利混悬液 $1.76 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 中药对照组 ig 芪苈强心胶囊混悬液 $0.32 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 参芪益心高、低剂量组 $33.92, 16.96 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。各组大鼠均每日 ig 1 次, 连续 ig 4 周。

2.3 大鼠心功能检测 各组大鼠灌胃 4 周后超声心动图检测大鼠心功能变化。大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉 ($0.3 \text{ mL}/100 \text{ g}$), 仰卧位, 胸部备皮, 选用 10 MHz 高频探头, 于胸骨成 $20 \sim 30$ 度夹角, 显示心脏沿二尖瓣口至心尖方向的左室长轴切面。B 型超声获取胸骨旁左心室长轴二维图像, 在乳头肌水平将 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 (LVDD) 和收缩末期内径 (LVSD) 应用 Teichholtz 公式计算左室射血分数 (LVEF) 和左室短轴缩短率 (LVFS)。每组数据取连续 3 个心动周期的平均值。

2.4 大鼠血浆血管紧张素 II 含量测定 取大鼠颈动脉血 1 mL, 注入含有 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA $10 \mu\text{L}$, $0.32 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 二巯基丙醇 $5 \mu\text{L}$, $0.34 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 8 羟基喹啉硫酸盐 $10 \mu\text{L}$ 的低温抗凝管中, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ $2\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 7 min 后分离血浆, 血浆密封后 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存待测各组大鼠血浆血管紧张素 II 含量。

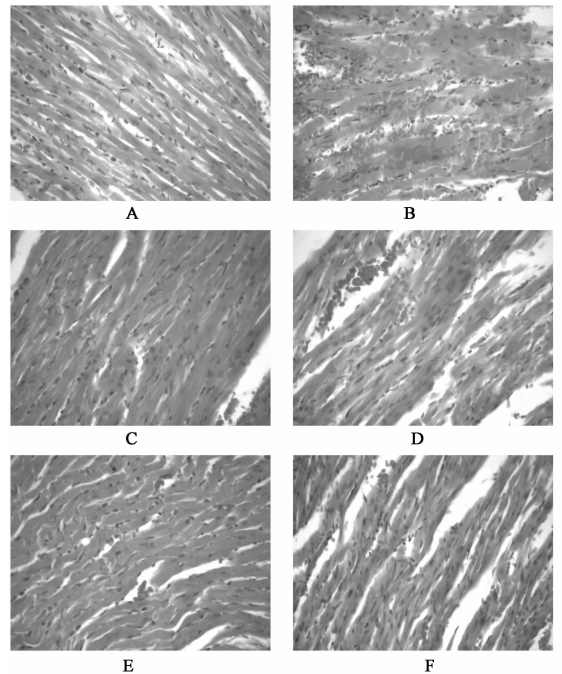
2.5 大鼠血浆肿瘤坏死因子含量测定 取大鼠颈动脉血 1 mL, 注入含 $3 \mu\text{L}$ 10% EDTA-k2 的试管内, 混匀后 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 后分离血浆, 取 0.2 mL 血浆, 加入 $2 \mu\text{L}$ 抑肽酶, 样本 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下保存待测各组大鼠血浆肿瘤坏死因子含量。

颈动脉采血后处死大鼠, 立即开胸取出心脏, 放入装有冰盐水的培养皿中冲洗后在冰块上操作, 沿房室交界处剪去心房、大血管, 沿心室长轴切取心肌, 迅速剪取心尖部约 1 mm^3 置于 2.5% 戊二醛中固定 24 h, 供电镜观察使用, 另取心尖部 0.5 mm^3 的心肌组织, 于 4% 多聚甲醛中固定, 备用 HE 染色。

2.6 统计方法 用 SPSS 13.0 统计学软件分析处理。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较用单因素方差分析, 两两比较用 q 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠心肌组织改变 (光镜) 正常对照组心肌纤维成束状排列, 结构较均匀, 细胞间质无水肿及充血, 亦无炎细胞浸润。模型组心肌纤维呈断裂、变性和坏死, 细胞间质血管扩张充血, 炎细胞浸润, 心肌间质成纤维细胞增生明显。依那普利 $1.76 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组: 心肌纤维轻度肿胀, 少部分纤维肿胀、断裂, 间质血管扩张、充血, 少量炎细胞浸润。芪苈强心 $32.14 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组心肌纤维肿胀, 部分心肌萎缩, 间质血管扩张充血, 有炎细胞浸润。参芪益心方低剂量组心肌纤维充血、肿胀, 炎细胞散在浸润。参芪益心方高剂量组心肌纤维排列成束, 轻度肿胀, 少量炎细胞浸润。见图 1。



A. 正常对照组; B. 模型组;

C. 依那普利 $1.76 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; D. 芪苈强心 $32.14 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;

E. 参芪益心方 $16.96 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;

F. 参芪益心方 $33.92 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组 (图 2 同)

图 1 各组大鼠心肌组织病变显微观察 (HE, $\times 400$)

3.2 心肌组织超微结构观察 (电镜) 正常对照组心肌纤维走行规则, 肌节各带结构清晰, 肌原纤维间可见成排线粒体。模型组心肌纤维排列不规则, 肌节明暗带结构消失, 线粒体肿胀、代偿性增生明显。依那普利 $1.76 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组心肌纤维排列尚规整, 线粒体轻度增生伴轻度肿胀, 间质无明显改变。芪苈强心 $32.14 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组心肌纤维排列尚可, 线粒体增生伴轻度肿胀; 间质纤维增生。参芪益心方低剂量组心肌纤维排列不规则, 线粒体增生明显, 间质胶原纤维增生。

参芪益心方高剂量组心肌纤维走形较规整,线粒体轻度肿胀伴增生,间质无明显改变。见图2。

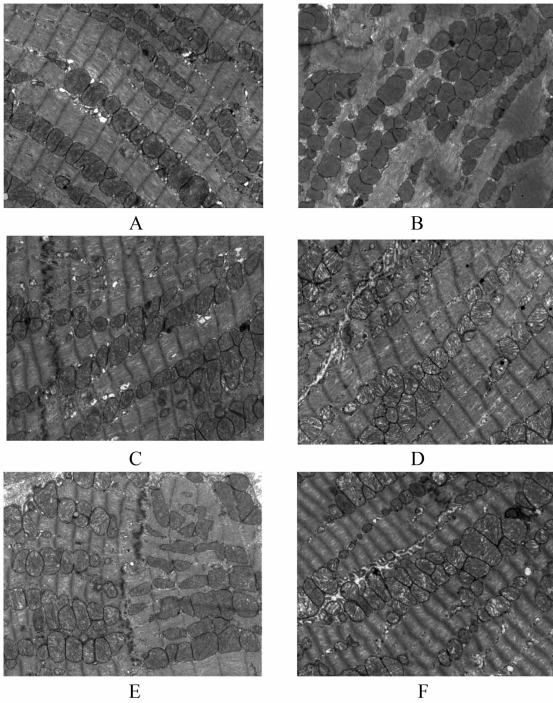


图2 各组大鼠心肌组织超微结构观察(电镜,×6000)

3.3 对 CHF 大鼠心功能的影响 模型组大鼠 LVSD, LVDD, EF, FS 与正常对照组比较差异具有统计学意义($P < 0.05$)。各治疗组大鼠在药物干预后以上各项指标均有改善,参芪益心方高剂量组、芪苈强心 $32.14 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 对照组、依那普利 $1.76 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),见表1。

3.4 对 CHF 大鼠血浆 Ang II, TNF- α 的影响 模型组大鼠血浆 Ang II, TNF- α 含量较正常对照组升高明显($P < 0.05$)。各治疗组 CHF 大鼠经药物干预后血浆 Ang II 水平均有不同程度的降低,与模型组比较有统计学意义($P < 0.05$);参芪益心方高剂量组与芪苈强心对照组比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见表2。

4 讨论

本实验采用 B 型超声评价心衰大鼠的心功能情况,专人统一测量,应用 Teichholtz 公式计算 EF 和 FS。研究表明,高频探头二维成像能清晰显示大鼠左室心腔,准确检测大鼠心功能^[3]。故本实验选用测量准确度较高的 LVDD 和 LVSD。评价大鼠收

表1 参芪益心方对 CHF 大鼠心功能的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	n	LVSD/mm	LVDD/mm	EF/%	FS/%
正常对照	-	15	3.74 ± 0.30	5.10 ± 0.24	83.74 ± 2.37	48.28 ± 1.99
模型	-	10	$5.15 \pm 0.46^{1)}$	$6.73 \pm 0.33^{1)}$	$44.70 \pm 3.74^{1)}$	$22.22 \pm 2.10^{1)}$
依那普利	1.76×10^{-3}	12	$4.31 \pm 0.20^{2)}$	$5.62 \pm 0.18^{2)}$	$76.53 \pm 3.19^{2)}$	$41.53 \pm 2.48^{2)}$
芪苈强心	32.14	13	$4.31 \pm 0.19^{2)}$	$5.80 \pm 0.16^{2)}$	$74.92 \pm 3.29^{2)}$	$41.62 \pm 2.31^{2)}$
参芪益心	16.96	13	4.84 ± 0.17	6.32 ± 0.25	52.50 ± 4.70	28.02 ± 2.50
	33.92	11	$4.30 \pm 0.16^{2)}$	$6.00 \pm 0.16^{2)}$	$73.80 \pm 2.29^{2)}$	$42.49 \pm 1.72^{2)}$

注:与正常对照组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

表2 参芪益心方对各组大鼠血浆 Ang II, TNF- α 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	n	Ang II / $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$	TNF/ $\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$
正常对照	-	15	773.4 ± 86.8	5.83 ± 0.47
模型	-	10	$1365.3 \pm 100.2^{1)}$	$15.87 \pm 2.31^{1)}$
依那普利	1.76×10^{-3}	12	$948.8 \pm 93.2^{2)}$	$9.91 \pm 1.22^{2)}$
芪苈强心	32.14	13	$1145.3 \pm 85.4^{2)}$	$8.82 \pm 1.17^{2)}$
参芪益心	16.96	13	$1157.0 \pm 102.6^{2)}$	14.42 ± 2.59
	33.92	11	$967.3 \pm 100.4^{2,3)}$	$8.95 \pm 0.97^{2)}$

注:与正常对照组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$;与芪苈强心对照组比较³⁾ $P < 0.05$ 。

缩功能最常用的是 EF,它是缩短分数的心室转化。正常大鼠的左室收缩功能非常强,几乎能够排出左心室的全部血液,因此正常大鼠的 EF 值在 80% 以上^[4],这与本实验结果相符合。EF 值下降能够反映

因负荷增高引起的潜在的心肌细胞功能降低和缩短减弱,FS 下降也提示心室壁活动度明显下降。

本实验结果显示模型组大鼠 LVSD, LVDD, EF, FS 与正常对照组比较差异具有统计学意义($P <$

0.05)。提示阿霉素复制大鼠心衰模型,可以造成大鼠收缩及舒张功能下降,反映此方法造模成功。各治疗组大鼠在药物干预后,各项指标均有改善,参芪益心方高剂量组、中药对照组、西药对照组与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.05$);三者比较差异无统计学意义。显示参芪益心方有良好的改善心功能的作用,与阳性对照药物的治疗作用相当。

多项大规模的临床及基础实验已经证实,血管紧张素转换酶抑制剂(ACEI)能够降低Ang II活性及交感神经的活性,能够阻断心室重构的始动环节,逆转心脏重构,能够降低有症状心力衰竭患者的死亡率和病残率。^[5-7]本研究结果证实,参芪益心方高剂量组在降低CHF大鼠血浆Ang II水平方面与西药对照组疗效相当,表明参芪益心方在抑制心室重构,改善心功能方面的机制之一可能是通过降低血浆Ang II水平或阻断AT1来实现的。实验结果提示,参芪益心方高剂量组在降低CHF大鼠血浆Ang II水平方面优于中药对照药,表明参芪益心方在减低血浆Ang II水平上存在一定的优势。

目前的研究证实^[8-10],炎症介质通过对心脏和外周循环的有害效应促进了心力衰竭的疾病进展,但还未能找到在心力衰竭中能够安全地对抗细胞因子的药物,临床研究的生物制剂存在它们自身的内在效应,或者TNF- α 拮抗剂在治疗心力衰竭时产生了不利的影响。这给临床治疗心衰的中药开发提供了新的契机。本研究结果显示,降低血浆TNF- α 水平,减少炎症因子对心肌的损害,可能是参芪益心方治疗心衰的机制之一。

[参考文献]

[1] Miqrino R Q, Zhu X, Morker M, et al. Myocardial dysfunction in the periinfaret and remote regions following anterior infarectin in rats quantified by 2D

radial strain echoardi-ography: an observational cohort study[J]. Cardiovasc Ultrasound, 2008, 29(6):17.

- [2] 李玉玲,杨建业,唐俊明,等.阿霉素诱导大鼠心衰模型不同方案的比较[J].中国比较医学杂志,2006,16(2):93.
- [3] 黄国情,刘虹,舒先红,等.超声心动图评价粒细胞集落刺激因子动员自身骨髓干细胞对心肌梗死后左心室重构及心功能的影响[J].中华超声影像学杂志,2004,13(11):848.
- [4] Seherrer C M, Steudel W, Hunziker P R, et al. Three-dimensional echo-Cardiographic assessment of left ventricular wall motion abnormalities in mouse myocardial infarction [J]. J Am Soc Echoardiogr, 1999,12(10):834.
- [5] Mann D L, Deswal A, Bozkurt B, et al. New therapeutics for chronic heart failure [J]. Annu Rev Med, 2002, 53:59.
- [6] Toko H, Oka T, Zou Y, et al. Angiotensin II type Ia receptor mediates doxorubicin-induced cardiomyopathy [J]. Hypertens Res, 2002,25(4):597.
- [7] Gustafsson M V, Zheng X, Pereira T, et al. Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state[J]. Dev Cell, 2005,9:575.
- [8] Mann D L. Stress-activated cytokines and the heart:from adaptation to malad-aptation [J]. Annu Rev Physiol, 2003,65:81.
- [9] Johnston G R, Webster N R. Cytokines and the immunomodulatory function of the vagus nerve[J]. Br J Anaesth, 2009, 102(4):453.
- [10] Franco F, Thomas G D, Giroir B P, et al. Magnetic resonance imaging and invasive evaluation of development of heart failure in transgenic mice with myocardialexpression of tumor necrosis factor-alpha[J]. Circulation, 1999,99:448.

[责任编辑 聂淑琴]