

补肾活血汤对慢性心衰大鼠心功能及 AQP-2 的影响

宋业琳^{*}, 李洁, 于广宇, 聂颖颖, 朱栋栋, 李雨真
(青岛市海慈医疗集团, 山东 青岛 266033)

[摘要] **目的:**探讨补肾活血汤对慢性心衰大鼠的疗效及心肾靶向功能的作用机制。**方法:**采用 32 周龄以上自发性高血压大鼠(SHR)为慢性心衰大鼠,分为补肾活血汤高、中、低剂量组(5.7, 2.85, 1.43 g·kg⁻¹),卡托普利组 0.05 g·kg⁻¹、模型对照组,Wistar 大鼠为正常对照组,予以相应药物干预,8 周后检测超声心动指标及肾脏组织水通道蛋白 2(AQP-2)的水平。**结果:**补肾活血汤可延缓心衰大鼠的左室重构进程,左室后壁厚度(LVAWT)由 2.93 mm 降至 2.72 mm、左室舒张末期内径(LVEDD)由 7.65 mm 降至 7.57 mm、左室收缩末期内径(LVESD)由 3.87 mm 降至 3.68 mm、短轴缩短率(LVFS)由 0.44 提高至 0.48、左室射血分数(LVEF 由 0.42 提高至 0.47),药物高、中、低剂量组较模型组有统计学意义($P < 0.05$);可降低心衰大鼠肾脏组织 AQP-2 的表达,平均由 2.1% 降至 1.63% ($P < 0.05$),其作用均与药物浓度呈正相关。**结论:**补肾活血汤可改善慢性心衰大鼠的心功能,并通过降低肾脏组织 AQP-2 的水平,从而发挥利尿改善心室重构的作用。

[关键词] 补肾活血汤; 慢性心力衰竭; 水通道蛋白 2; 心功能

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)21-0261-04

Effect of Bushen Huoxue Decoction on Cardiac Function and Expression of AQP-2 in CHF Rats

SONG Ye-lin^{*}, LI Jie, YU Guang-yu, NIE Ying-ying, ZHU Dong-dong, LI Yu-zhen
(Qingdao Hiser Medical Center, Qingdao, 266033 China)

[Abstract] **Objective:** To discuss effect of Bushen Huoxue decoction (BSHXD) on chronic heart failure in rat as well as mechanism. **Method:** The spontaneously hypertensive rats (SHR) were radomly divided into Bushen Huoxue decocotion high, medium and low dose group, Captopril group, the model group, normal rats were as normal group. Corresponding drugs were given for 8 weeks, then echocardiography index and kidney tissue aquaporin 2 (AQP-2) level were measured. **Result:** BSHXD could delay left ventricular remodeling process, high, medium and low dose compared with model group showed statistically significant ($P < 0.05$); and reduce tissue AQP-2 expression ($P < 0.05$), which was positively correlated with drug concentration. **Conclusions:** Bushen Huoxue decoction can improve cardiac function and reduce tissue AQP-2 level.

[Key words] Bushen Huoxue decoction; chronic heart failure; AQP-2; cardiac function

慢性心力衰竭(CHF)是多种心血管疾病的最后转归,随着人口老龄化进程的加快,CHF的发病率正逐年升高,加强对CHF的防治已成为心血管研究领域的热点。本研究根据对心衰病机“肾虚血瘀”的认识,选取高龄SHR,采用补肾活血法深入探讨其对心衰的治疗作用和心肾靶向机制。

1 材料

1.1 动物 健康 32 周龄自发性高血压大鼠(SHR) 60 只,SPF 级,雄性,体重 200 ~ 300 g,北京维通利华实验动物有限公司提供,生产许可证号 SCXX(京)2006-0009。健康 32 周龄 Wistar-Kyoto 大鼠(WKY) 12 只,清洁级,雄性,体重 200 ~ 300 g,青岛市药物检验研究所提供,生产许可证号 SCXE(鲁)20030010。饲养于青岛市海慈医疗集团动物房,金属鼠笼,分笼饲养,每笼 6 只,保持室内环境恒温(19 ± 3)℃,湿度在(50% ~ 60%),通风良好,标准饲料,自由进食饮水。

[收稿日期] 20120205(005)

[通讯作者] ^{*}宋业琳,硕士,主治医师,从事中医心血管内科研究,Tel: 13589386112, E-mail: yelinsong@yahoo.com.cn

1.2 药物 补肾活血汤(BSHXD)含党参、黄芪、补骨脂、制附子(先煎)、熟地黄、山茱萸、丹参、赤芍、葶苈子(包煎)、大枣,按 10:5:5:3:7:7:7:5:5:3 比例,由海慈医疗集团药剂科制备,质量标准参照 2010 年《中国药典》。配制成补肾活血高浓度(相当于生药 570 g·L⁻¹)、中浓度(相当于生药 285 g·L⁻¹)、低浓度(相当于生药 142.5 g·L⁻¹)制剂。卡托普利片,天津飞鹰制药有限公司,批号 0607005。

1.3 试剂 大鼠水通道蛋白 2(AQP-2)免疫组化试剂盒,购自上海蓝基生物科技有限公司,批号 201008151。

1.4 仪器 FA1104 医用电子天平(上海天平仪器厂),Agilent Sonos 5500 多普勒超声诊断仪(美国 Agilent 公司),显微摄像系统(Olympus BX50),RBP-1 型大鼠尾压心率测定仪(中日友好临床医学研究所)。

2 方法

2.1 动物模型 实验动物选取 32 周 SHR 为慢性心衰动物模型。SHR 与人类原发性高血压病的生理病理发展极为相似,于 6 周龄时血压开始升高,至 10 周龄时左室肥厚和心肌纤维化已经建立,在 12

周出现典型高血压症状,18 周出现典型左心室肥厚且舒张功能下降,30 周出现典型慢性心衰症状体征,并且随着鼠龄的增加而逐渐加重^[1]。

2.2 判定模型标准 大鼠适应性饲养后,测定其尾动脉血压、体重、心脏超声学参数,并观察体征。淘汰不合格大鼠,余下进入分组给药。

2.2.1 血压 大鼠血压测定方法(无创尾套法):WKY 组尾端收缩压在 90~120 mmHg,SHR 尾端收缩压在 160~180 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa)。

2.2.2 体征及症候比较 WKY 正常对照组大鼠,体重增加明显,精神状态良好,动作自如,反应灵敏毛色白而有光泽。SHR 大鼠生长迟缓,皮毛凌乱,色枯无泽,少量脱毛,形体消瘦,易激惹等,体重增长较慢,部分大鼠尾部水肿,口唇、趾端紫绀等表现。

2.2.3 超声心动图参数比较 两组大鼠的体重、血压及超声心动图指标比较差异有显著性($P < 0.05$)。SHR 较 WKY 均出现左室后壁厚度增厚(LVPWT),左室舒张末期直径(LVEDD)及左室收缩末期直径(LVESD)变大、左室短轴缩短率及左室射血分数(LVEF)减少的现象,提示发生左室重构,心功能下降,模型成功,可以进入分组给药。见表 1。

表 1 两组大鼠体重、血压及超声心动图指标比较($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | 体重/g | 收缩压/mmHg | LVPWT/mm | LVEDD/mm | LVESD/mm | LVFS | LVEF |
|-----|----|------------------------|------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| SHR | 60 | 280 ± 40 ¹⁾ | 170 ± 14 ¹⁾ | 2.32 ± 0.06 ¹⁾ | 7.15 ± 0.43 ¹⁾ | 3.41 ± 0.47 ¹⁾ | 0.50 ± 0.12 ¹⁾ | 0.51 ± 0.18 ¹⁾ |
| WKY | 12 | 320 ± 50 | 110 ± 15 | 1.90 ± 0.05 | 5.41 ± 0.34 | 2.78 ± 0.24 | 0.62 ± 0.11 | 0.82 ± 0.09 |

注:与 WKY 组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

2.3 分组及给药

2.3.1 分组 按随机数字表法将 SHR 随机分成 5 组,每组 12 只。补肾活血汤 BSHXD 高、中、低剂量组卡托普利组(Captopril)为阳性药物对照组;模型对照组(SHR)为空白对照组;12 只 WKY 为正常对照组(WKY)。共 6 组动物,对每组大鼠的体重、血压及超声心动图指标,并进行基线分析。结果显示除 WKY 组外,SHR 各组间比较无统计学意义,基线相同。

2.3.2 给药 按临床给药剂量与大鼠体表面积换算,按 BSHXD 高、中、低剂量按 5.7, 2.85, 1.43 g·kg⁻¹ 给药,Captopril 组给予卡托普利 0.05 g·kg⁻¹,SHR 组、WKY 组给予蒸馏水。各组均配制成相应液体,ig 10 mL·kg⁻¹,每日 1 次,给药 8 周。

2.4 指标检测

2.4.1 超声心动图指标测定 按照国际心脏病学

会及世界卫生组织推荐方法^[2-4]检测左室后壁厚度、左室舒张末期内径、左室收缩末期内径、短轴缩短率、左室射血分数。

2.4.2 肾脏组织 AQP-2 测定 在免疫组织化学 SABC 法胶原染色下,采用 Brilla 等^[5]描述的方法,测量肾脏组织水通道蛋白 2 容积分数(CVF)。(随机分析 5 个视野,计算均值)。

$$CVF = \text{水通道蛋白 2 面积} / \text{视野总面积} \times 100\%$$

2.5 统计学处理方法 采用 SPSS 13.0 软件包处理,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,入组前 SHR 组间均衡性检验用方差分析,两组间用 q 检验,多组间用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对超声心动图参数的影响 给药后(8 周)较给药前(0 周)随着病理发展的进程 SHR 各组的 LVAWT, LVEDD, LVESD 均有不同程度的增加。补肾活血汤高、中剂量组, Captopril 组较模型组有延缓

表2 补肾活血汤给药8周对SHR慢性心衰动物模型超声心动图参数的影响($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ | 时间/周 | <i>n</i> | LVPWT/mm | LVEDD/mm | LVESD/mm | LVFS | LVEF |
|-----------|-------------------------------------|------|----------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| BSHXD | 5.7 | 0 | 12 | 2.29 ± 0.21 | 7.13 ± 0.32 | 3.36 ± 0.37 | 0.48 ± 0.07 | 0.51 ± 0.08 |
| | | 8 | 10 | 2.61 ± 0.17 ¹⁾ | 7.54 ± 0.43 | 3.61 ± 0.67 ¹⁾ | 0.48 ± 0.05 ¹⁾ | 0.48 ± 0.13 ¹⁾ |
| | 2.85 | 0 | 12 | 2.38 ± 0.26 | 7.12 ± 0.28 | 3.38 ± 0.47 | 0.47 ± 0.09 | 0.50 ± 0.11 |
| | | 8 | 9 | 2.72 ± 0.28 ¹⁾ | 7.57 ± 0.45 | 3.68 ± 0.47 | 0.48 ± 0.11 ¹⁾ | 0.47 ± 0.18 ¹⁾ |
| | 1.43 | 0 | 10 | 2.27 ± 0.16 | 6.95 ± 0.44 | 3.45 ± 0.31 | 0.52 ± 0.11 | 0.52 ± 0.08 |
| | | 8 | 8 | 2.87 ± 0.16 ²⁾ | 7.61 ± 0.31 | 3.74 ± 0.43 | 0.47 ± 0.08 ^{1,2)} | 0.46 ± 0.11 ^{1,2)} |
| Captopril | 0.05 | 0 | 12 | 2.35 ± 0.25 | 7.23 ± 0.32 | 3.45 ± 0.34 | 0.51 ± 0.08 | 0.49 ± 0.09 |
| | | 8 | 9 | 2.54 ± 0.29 ¹⁾ | 7.55 ± 0.46 | 3.71 ± 0.44 | 0.49 ± 0.03 ¹⁾ | 0.49 ± 0.15 ¹⁾ |
| 模型(SHR) | - | 0 | 12 | 2.28 ± 0.16 | 6.93 ± 0.33 | 3.42 ± 0.52 | 0.52 ± 0.12 | 0.51 ± 0.08 |
| | | 8 | 9 | 2.93 ± 0.17 ²⁾ | 7.65 ± 0.43 | 3.87 ± 0.62 | 0.44 ± 0.09 ²⁾ | 0.42 ± 0.08 ²⁾ |
| 正常(WKY) | - | 0 | 12 | 1.90 ± 0.05 | 5.41 ± 0.34 | 2.79 ± 0.24 | 0.62 ± 0.11 | 0.82 ± 0.09 |
| | | 8 | 11 | 2.18 ± 0.27 ^{1,2)} | 5.91 ± 0.24 ^{1,2)} | 2.79 ± 0.31 ^{1,2)} | 0.63 ± 0.11 ^{1,2)} | 0.80 ± 0.11 ^{1,2)} |

注:与模型(SHR)组比较¹⁾ $P < 0.05$;与Captopril组比较²⁾ $P < 0.05$ (表3同)。

病理进程的效果($P < 0.05$)。其中补肾活血汤高、中剂量组与Captopril作用近似,尤其改善LVESD的作用最好。

给药后(8周)较给药前(0周)LVFS, LVEF影响情况,补肾活血汤高、中剂量组及Captopril前后对照不具有统计学意义,较模型组具有统计学意义($P < 0.05$),说明可延缓IVFS的下降趋势,改善心室收缩功能。见表2。

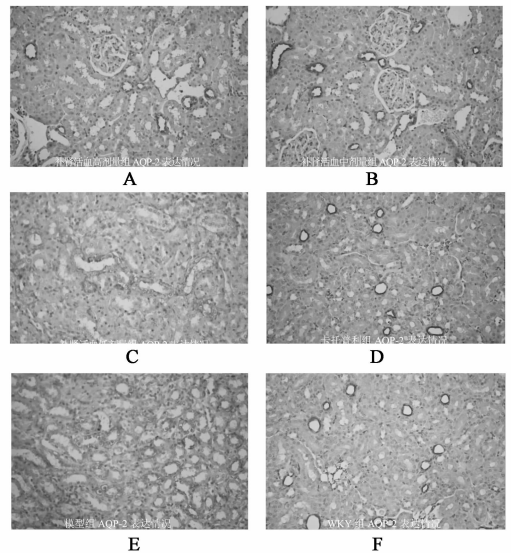
3.2 对肾脏组织AQP-2的影响 光镜下,WKY组肾小球未见染色,细胞外基质及毛细血管未见染色,阳性表达仅在肾脏髓质,其中大部分集合管腔内壁细胞被染成浅棕黄色,着色部位以细胞膜和细胞浆为主。各心衰SHR组的肾脏外髓质可见大部分集合管腔内壁细胞被染成比WKY组更深的棕黄色,说明心衰时AQP-2的表达增加,使水的重吸收增加,从而加重心脏负荷,形成恶性循环。通过定量分析得出,BSHXD高剂量组仅见少量AQP-2表达,颜色为淡黄色,与Captopril比较,表达无明显差异;BSHXD中剂量组可见中等量表达,颜色黄色或深黄色,相对密集;BSHXD低剂量组可见大量AQP-2表达明显较活跃,颜色棕黄色,密集。说明补肾活血汤可降低AQP-2蛋白的表达,作用与剂量正相关。见表3,图1。

4 讨论

本课题采用32周以上高龄SHR为慢性心衰大鼠模型,经超声心动图及后续检验指标验证,此种造模方法对试验技术要求不高,动物成活率高,模型稳定,是一种理想的心力衰竭造模方法。缺点是SHR

表3 补肾活血汤对SHR慢性心衰动物模型大鼠肾脏组织AQP-2表达的影响($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ | <i>n</i> | AQP-2 CVF/% |
|-----------|-------------------------------------|----------|-----------------------------|
| BSHXD | 5.7 | 10 | 1.15 ± 0.42 ¹⁾ |
| | 2.85 | 9 | 1.63 ± 0.54 ^{1,2)} |
| | 1.43 | 8 | 2.15 ± 0.36 ²⁾ |
| Captopril | 0.05 | 9 | 1.12 ± 0.37 ¹⁾ |
| SHR | - | 9 | 2.1 ± 0.39 ²⁾ |
| WKY | - | 11 | 0.7 ± 0.21 ^{1,2)} |



A. 补肾活血汤 5.7 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; B. 补肾活血汤 2.85 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; C. 补肾活血汤 1.43 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; D. 卡托普利 0.05 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; E. 模型组; F. WKY 正常对照组
图1 补肾活血汤对SHR慢性心衰动物模型大鼠肾脏组织AQP-2表达的影响(SABC法胶原染色, $\times 200$ 倍)

单只费用较高,但是其他造模方法均存在偏低的成功率,这种方法不失为一种高效的模型来源,对于本实验来说是一种较为合适的造模方法。实验过程中因牢笼闭合不严密丢失 2 只,灌胃不当死亡 6 只,超声心动图检测局部皮肤损伤后,被同伴撕咬致死 1 只,不明原因腹部脓肿死亡 1 只,考虑心衰及不明原因死亡 6 只。

慢性心力衰竭归属于中医学“心悸”、“水肿”、“喘证”、“胸痹”等范畴,传统治疗多从心、肺、脾入手,以补气、健脾、化痰、平喘、利尿等为主要治法。笔者在临床治疗中观察到,本病病位虽然在心,但与肾关系密切,肾虚血瘀是慢性心力衰竭的基本病机。补肾活血、化瘀通络是中医治疗慢性充血性心力衰竭的基本治法

现代药理研究表明,补肾中药具有强心、利尿、增加免疫功能、调节血压等作用^[6]。活血化瘀药物多有扩张血管、减轻心脏前后负荷、降脂、抗血小板聚集等作用^[7-8]。研究表明,补肾活血药物通过调节溶血纤溶系统,脂质代谢、微血管循环、RAAS 系统、保护血管内皮细胞等综合作用,多靶点、多药效的起到治疗慢性心力衰竭的作用^[9]。

本实验表明,补肾活血汤可提高慢性心衰大鼠的心脏泵功能,可以降低衰竭心脏的扩张,维持心脏的正常形态功能,防止和延缓其恶化进程。在 CHF 水潴留机制的研究中,肾脏是水潴留的中心环节,受血管加压素调节的 AQP2 更是其关键性蛋白,CHF 时心输出量下降-血中 AVP 增加-肾集合管主细胞 V2 受体激活 AQP2 激活/或基因表达上调-水重吸收增加-水潴留^[10]。实验中发现补肾活血汤可抑制 AQP-2 的表达,以达到纠正心力衰竭的目的,可能通过降低 AQP2 mRNA 转录水平,具体机制需进一步研究。本研究显示补肾活血汤对 AQP2-的抑制作用与浓度正相关,可能与 AQP-2 合成过程中的竞争性抑制有关。综上所述补肾活血汤可改善慢性心衰大

鼠的心功能,并通过降低肾脏组织 AQP-2 的水平,从而发挥利尿改善心室重构的作用。

[参考文献]

- [1] 于学军,戚文航,顾德官,等. 自发性高血压大鼠左室肥厚及心肌纤维化的动态变化[J]. 高血压杂志, 1999,7(2):159.
- [2] Suzuki J, Ogawa M, Futamatsu H, et al. Tea catechins improve left ventricular dysfunction, suppress myocardial inflammation and fibrosis, and alter cytokine expression in rat autoimmune myocarditis[J]. Eur J Heart Fail, 2007, 9:152.
- [3] Lee S S, Naqvi T Z, Forrester J, et al. The effect of granulocyte colony stimulating factor on regional and global myocardial function in the porcine infarct model [J] Int J Cardiol, 2007, 116:225.
- [4] Plante E, Lachance D, Roussel E, et al. Impact of anesthesia on echocardiographic evaluation of systolic and diastolic function in rats [J]. J Am Soc Echocardiogr, 2006, 19:1520.
- [5] Brill C G, Janich J S, Weber K T. Impaired diastolic function and coronary reserve in genetic hypertension [J]. Cir Res,1991,69:107.
- [6] 刘小渭,孙金桥. 补肾活血法治疗慢性心力衰竭的思路与方法[J]. 山西中医学院学报,2005,6(2):55.
- [7] 李奎生. 论活血化瘀法对心力衰竭的治疗作用[J]. 现代中西医结合杂志,2006,15(11):1487.
- [8] 冷兴文,刘志华,罗书练,等. 活血化瘀与补肾健脾疗法降血脂、抗自由基损伤比较研究[J]. 中国中药杂志,1997,22(2):116.
- [9] 于广宇,宋业琳,李洁. 补肾活血法治疗慢性心力衰竭的研究现状[J]. 国际中医中药杂志,2011,33(1):80.
- [10] 欧阳劭,陈琳. 水通道蛋白 2 与心血管疾病[J]. 心血管病学进展,2005,26(6):620.

[责任编辑 聂淑琴]