

康心汤对异丙肾上腺素诱导实验性心肌肥厚大鼠维生素 D 代谢的调节作用

陈云志^{1*}, 杨长福¹, 郭军², 陈昱江², 王瑶瑶², 柴艺汇³

(1. 贵阳中医学院基础医学院, 贵阳 550002; 2. 贵阳中医学院第一临床医学院 贵阳 550001;
3. 贵阳中医学院研究生院, 贵阳 550002)

[摘要] 目的: 观察康心汤对异丙肾上腺素致大鼠心肌肥厚模型血清 25 羟维生素 D₃ [25 (OH) D₃] 的影响。方法: 雄性 SD 大鼠随机分为 5 组: 对照组, 模型组, 康心汤 10, 5, 2.5 g·kg⁻¹ 组。异丙肾上腺素 2.4 mg·kg⁻¹ 皮下注射, 连续 7 d, 建立心肌肥厚模型, 药物干预 6 周后酶联免疫法 (ELISA) 检测血清 25 (OH) D₃, 心房利钠肽 (ANP), 肾素 (Renin), 大鼠心肌标本 HE 染色观察组织病理改变。结果: 与对照组比较, 模型组血清 25 (OH) D₃ 降低, ANP, Renin 升高 ($P < 0.05$)。心肌 HE 染色见心肌排列紊乱, 纤维化增生。与模型组比较, 康心汤 10 g·kg⁻¹ 干预后, 血清 25 (OH) D₃ 升高, 伴随 ANP, Renin 降低 ($P < 0.05$), 心肌纤维化程度减轻。结论: 康心汤对 25 (OH) D₃ 的调节作用参与逆转异丙肾上腺素致大鼠的心肌肥厚。

[关键词] 心肌肥厚; 维生素 D; 肾素; 心房利钠肽; 康心汤

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903 (2012) 19-0257-004

Effect of Kangxin Decoction on Regulating Vitamin D in Rats with Myocardial Hypertrophy Induced by Isoproterenol

CHEN Yun-zhi^{1*}, YANG Chang-fu¹, GUO Jun², CHEN Yu-jiang², WANG Yao-yao², CHAI Yi-hui³

(1. School of Basic Medical Sciences, Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China;
2. First Clinical Medicine College, Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001, China;
3. Graduate School, Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Kangxin decoction on regulating vitamin D in rats with myocardial hypertrophy induced by isoproterenol. **Method:** Fifty male SD rats were randomly divided into 5 groups: normal group, model group, three dose groups of Kangxin decoction (10, 5, 2.5 g·kg⁻¹). Myocardial hypertrophy model in rats was induced by subcutaneous injection of isoproterenol (ISO, 2.4 mg·kg⁻¹, 7 d). After Kangxin Decoction intervention for 6 weeks, serum 25 (OH) D₃, atrial natriuretic peptide (ANP), renin were detected by ELISA. Pathological changes in myocardial tissue were determined by hematoxylin-eosin (HE) staining. **Result:** Compared with the controls, serum 25 (OH) D₃ in the model group was reduced, and serum ANP and renin were elevated ($P < 0.05$). Myocardium derangement and fibrotic hyperplasia were also seen in the models. After Kangxin decoction treatment, serum 25 (OH) D₃ was increased, accompanied with lower ANP and rennin. The degree of myocardial fibrosis was improved after the treatment. **Conclusion:** Kangxin decoction had an effective role to treat myocardial hypertrophy induced by ISO by regulating vitamin D and protecting myocardial cells from injury.

[Key words] myocardial hypertrophy; vitamin D; renin; atrial natriuretic peptide; Kangxin decoction

[收稿日期] 20120319 (022)

[基金项目] 贵州省科技厅科技基金 [黔科合 J 字 (2012) 2064 号]; 贵州省科技厅、贵阳中医学院联合基金 [黔科合中药字 (2010) LKZ7017]; 贵阳市科技局项目 [筑科农合同字 (2009) 3-028]; 贵州省中医药管理局课题 [QZY2010-32]

[通讯作者] * 陈云志, 硕士, 副教授, 从事中西医结合基础与临床研究, Tel: 0851-5652822, E-mail: chenyunzhichen@163.com

近年来研究表明人群中血浆维生素 D 水平降低伴随着严重的心血管疾病危险因素,包括高血压、糖尿病、肥胖、高脂血症^[1]。血浆 25 羟维生素 D₃ [25(OH) D₃]、1α,25 羟维生素 D₃ [1α,25(OH) D₃]降低与心血管疾病死亡率呈正相关^[2]。左室肥厚是缺血性心脏病、充血性心力衰竭、心律失常的主要危险因素及常见并发症,与维生素 D 缺乏具有一定相关性。维生素 D 受体及 1α,25 羟化酶基因敲除大鼠表现出心肌肥厚,活性维生素 D₃ 治疗高盐敏感性大鼠及 1α,25 羟化酶基因敲除大鼠能逆转心肌肥厚^[3-4]。前期研究表明具有补肾益气作用的康心汤改善心肌重塑,发挥心脏保护作用^[5]。为探讨康心汤抗心肌重塑机制,本实验通过康心汤对异丙肾上腺素致大鼠心肌肥厚模型进行干预,研究康心汤对心肌肥厚大鼠 25(OH) D₃ 的影响,通过检测代表维生素 D 水平的血清 25 羟维生素 D₃ [25(OH) D₃],探讨该方调节维生素 D 代谢,改善心肌重塑的作用。

1 材料

1.1 动物 SD 大鼠,雄性,清洁级,体重(150 ± 12)g,由第三军医大学野战外科研究所医学实验动物中心提供,许可证号 SCXK(渝)2007-0005。

1.2 仪器 Bio-TEK ELX808 酶标仪(美国 BioTeck 公司);Anke TGL-16G 离心机(上海安亭科学仪器厂);JA5003 电子天平(上海天平仪器厂)。

1.3 药物与试剂 异丙肾上腺素,上海禾丰制药有限公司生产,批号 100702;心房利钠肽 ELISA 试剂盒,ANP,批号 DZE100406;25 羟维生素 D₃ ELISA 试剂盒,25(OH) D₃,批号 DZE100322;肾素 ELISA 试剂盒, Renin,批号 DZE100527,均为 R&D 公司生产。康心汤(黄芪 30 g、人参 15 g、淫羊藿 15 g、麦冬 15 g、五味子 10 g)水煎浓缩至 1 g·mL⁻¹,药物购于贵州同济堂制药有限公司。

2 方法

2.1 造模 参照文献^[6]方法造模,术前禁食 12 h,自由饮水。大鼠皮下注射异丙肾上腺素 2.4 mg·kg⁻¹,连续 7 d;正常组以等量生理盐水注射,连续 7 d,所有大鼠在造模结束后即开始给药。

2.2 分组及给药 50 只雄性 SD 大鼠常规喂养普通标准颗粒饲料,随机分组,对照组(8 只);另外 42 只大鼠皮下注射异丙肾上腺素 2.4 mg·kg⁻¹,7 d 后存活 32 只,分为模型组(8 只),康心汤 10,5,2.5 g·kg⁻¹ 3 组(各 8 只)。药物剂量按大鼠与人体表面积转换系数计算。对照组及模型组给予注射用水灌

胃。给药 6 周后分别检测相关指标。

2.3 血清 25(OH)D₃, ANP, Renin 含量测定 大鼠经 3% 戊巴比妥钠(45 mg·kg⁻¹)腹腔麻醉后取股动脉血,离心,取上层血清,ELISA 法测定 25(OH)D₃, ANP, Renin 含量。严格按照试剂盒说明操作。

2.4 全心与左心室质量检测 大鼠称重后脱颈处死,摘取心脏,称取全心质量,沿房室交界处去除左右心房及大血管,在冰生理盐水中洗净血液,滤纸吸干,用电子天平称取心室质量,分离左心室(包括室间隔)湿重,以全心质量、左室质量与体重之比作为心脏质量指数、左心室质量指数,心肌组织常规 HE 染色。

2.5 统计学处理 采用 SPSS 18.5 软件,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差 q 检验。 $P < 0.05$ 为有统计意义。

3 结果

3.1 一般情况 造模过程中注射异丙肾上腺素死亡 10 只。造模后大鼠表现为行动迟缓,运动减少,脚爪苍白水肿,体重增加。康心汤干预后上述症状明显改善。

3.2 对心肌肥厚大鼠心脏质量指数、左心室质量指数的影响 模型组心肌质量指数较对照组明显增加($P < 0.05$),康心汤 10 g·kg⁻¹ 组较模型组心肌质量指数减低($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 康心汤对异丙肾上腺素诱导实验性心肌肥厚大鼠心脏质量指数、左心室质量指数的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	心脏质量指数	左心室质量指数
对照	-	3.16 ± 0.22	1.63 ± 0.38
模型	-	4.28 ± 0.30 ¹⁾	2.72 ± 0.47 ¹⁾
康心汤	10	3.45 ± 0.24 ²⁾	2.22 ± 0.32 ²⁾
	5	4.12 ± 0.29 ²⁾	2.55 ± 0.36 ²⁾
	2.5	4.23 ± 0.28	2.67 ± 0.41

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 2 同)。

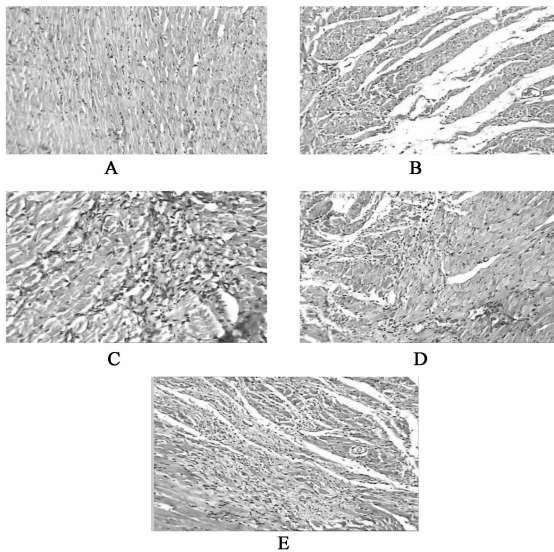
3.3 对心肌肥厚大鼠血清 25(OH)D₃, ANP, Renin 的影响 与对照组比较,模型组血清 25(OH)D₃ 明显降低,ANP, Renin 增高($P < 0.05$),与模型组比较,康心汤 10 g·kg⁻¹ 组血清 25(OH)D₃ 升高,ANP, Renin 降低($P < 0.05$)。见表 2。

3.4 对心肌肥厚大鼠心脏组织形态学的影响 显微镜下观察,HE 染色心肌病理组织学改变在 200 倍普通光镜下观察,正常组心肌排列正常,无坏死、水

表 2 康心汤对异丙肾上腺素诱导实验性心肌肥厚大鼠血清 25(OH)D₃, ANP, Renin 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	给药剂量/g·kg ⁻¹	25(OH)D ₃ /ng·mL ⁻¹	ANP/ng·L ⁻¹	Renin/pg·mL ⁻¹
对照	-	138.36 ± 22.10	248.44 ± 20.33	141.25 ± 28.84
模型	-	120.53 ± 32.37 ¹⁾	282.08 ± 21.87 ¹⁾	180.64 ± 35.42 ¹⁾
康心汤	10	134.16 ± 34.19 ²⁾	255.66 ± 20.12 ²⁾	152.56 ± 32.89 ²⁾
	5	129.20 ± 33.29	271.44 ± 20.65	170.56 ± 33.55
	2.5	123.12 ± 32.29	279.38 ± 21.72	178.59 ± 34.66

肿,间质无异常。模型组见心肌细胞排列紊乱、局部坏死,间质水肿,纤维增生,炎性细胞浸润;康心汤中剂量组见心肌细胞排列紊乱,间质水肿和增生;康心汤大剂量组心肌细胞排列较正常,少许纤维增生。见图 1。



A. 对照组;B. 模型组;C. 康心汤 10 g·kg⁻¹组;
D. 康心汤 5 g·kg⁻¹组;E. 康心汤 2.5 g·kg⁻¹组

图 1 康心汤对异丙肾上腺素诱导实验性心肌肥厚大鼠心脏组织形态学的影响(HE 染色, ×200)

4 讨论

心力衰竭发生发展的实质是神经内分泌激活和心肌重塑,异丙肾上腺素致心肌肥厚模型可引起心肌细胞表型改变,心肌细胞体积增大,间质细胞增殖纤维化^[7]。研究表明参与维生素 D 代谢的酶及维生素 D 受体与心血管疾病发生发展具有密切相关性。1 α ,25(OH)₂D₃ 作用于维生素 D 受体与细胞核环磷酸腺苷反应结合蛋白转录因子结合,干扰肾素启动子复合物形成,抑制肾素基因转录的启动,从而抑制肾素基因表达^[8]。维生素 D 受体基因敲除小鼠,肾脏肾素 mRNA 和蛋白质水平表达均增加,1 α ,25(OH)₂D₃ 水平与血浆肾素活性、Ang II 呈负相关,1 α ,25(OH)₂D₃ 是不依赖于血浆钙、磷及甲状

旁腺激素的肾素表达的负性调节子^[9]。临床研究表明肾功能不全透析病人心血管事件发生率与 25(OH)D₃ 呈明显负相关。心脏超声提示 25(OH)D₃ 缺乏伴随心力衰竭加重而出现心室扩张^[10]。维生素 D 缺乏导致肾素血管紧张素系统激活,在心力衰竭中发挥重要作用^[11]。维生素 D 补充疗法,能减缓心力衰竭的发生发展^[12]。

中医认为肾之阴阳为五脏阴阳之根本,也是心阴心阳之化源。心肾水火既济,心气功能正常发挥,有赖于肾气摄纳,精微不足、摄纳涣散可致胸痹心悸。肾阳不能温煦心阳,心阳不能下温肾阳,以致寒水不化而上凌于心,心阳进一步虚衰,“其位在心,其本在肾”。同时病程较长,迁延难愈,病性为本虚标实,以虚为主。中医认为“久病及肾”。肾虚精亏在心血管病中起到重要的作用^[13]。我们前期通过文献研究提出维生素 D 为肾藏精的物质基础^[14]。在此基础上,我们运用具有补肾益气功效的康心汤,该方由生脉散合保元汤化裁而成,用于治疗心力衰竭模型大鼠,发现本方具有调节肾素-血管紧张素系统的功能,改善心肌纤维化,逆转左室肥厚的作用。本实验研究发现异丙肾上腺素致心肌肥厚模型大鼠心肌病理表现为心肌细胞排列紊乱,纤维增生,炎性细胞浸润,血清 25(OH)D₃ 水平降低,血清心房利钠肽增高,与文献报道一致^[15]。经康心汤治疗后,心肌细胞排列与模型组比较,心肌细胞排列较正常,少许纤维增生,血清 25(OH)D₃ 水平升高,血清心房利钠肽降低。本方具有调节维生素 D 代谢的作用,能有效抑制心肌间质纤维化及心肌细胞肥大,逆转心室重构。

正常情况下,皮肤及饮食来源的维生素 D 前体需经肝脏 25-羟化酶(CYP27A)作用形成 25(OH)D₃,25(OH)D₃ 经肾脏 1 α -羟化酶(CYP27B)作用,形成具有活性的 1 α ,25(OH)₂D₃,作用于维生素 D 受体(VDR)发挥生理作用。肾外组织细胞(如心肌)内也具有 1 α -羟化酶,可合成 1 α ,25(OH)₂D₃,通过自分泌或旁分泌发挥生理作用^[16]。维生素 D

保护心血管的机制可能包括影响肾素-血管紧张素系统,改善胰岛素分泌,调节血糖水平,抑制炎症反应,或直接作用于心肌细胞表现为抗心肌肥大和增生等。维生素 D 状态对心血管疾病的风险具有一定的范围,低于或超出这个范围都会增加心血管疾病风险^[17]。单纯补充维生素 D 可能引起钙、磷代谢紊乱,寻求高效的维生素 D 替代剂,利于减轻补充维生素 D 的不良反应。

本研究提示康心汤能改善异丙肾上腺素所致大鼠心肌肥厚模型血清 25(OH)D₃ 水平,改善模型大鼠心肌纤维化。其改善心肌纤维化的作用机制是否通过调节维生素 D 轴而调控肾素分泌对心血管起到保护作用有待进一步探讨。

[参考文献]

[1] Martins D, Wolf M, Pan D, et al. Prevalence of cardiovascular risk factors and the serum levels of 25-hydroxyvitamin D in the united states; data from the third national health and nutrition examination survey [J]. Arch Intern Med, 2007, 167(11):1165.

[2] Melamed M L, Michos E D, Post W, et al. 25-hydroxyvitamin D levels and the risk of mortality in the general population [J]. Arch Intern Med, 2008, 168(15):1630.

[3] Xiang W, Kong J, Chen S, et al. Cardiac hypertrophy in vitamin D receptor knockout mice; role of the systemic and cardiac renin-angiotensin systems[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2005, 288(1):E125.

[4] Zhou C, Lu F, Cao K, et al. Calcium-independent and 1, 25(OH)2D₃-dependent regulation of the renin-angiotensin system in 1 α -hydroxylase knockout mice [J]. Kidney Int, 2008, 74(2):170.

[5] 陈云志,王瑶瑶,吕建卫,等. 康心汤对充血性心力衰竭患者睾酮的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2007, 34(3):332.

[6] Song cang Chen, Denis J Glenn, et al. Expression of the vitamin D receptor is increased in the hypertrophic heart [J]. Hypertension, 2008, 52(6):1106.

[7] 胡志苹,黄志华,吴亮亮,等. 染料木素抗大鼠心肌肥厚作用及其与 ATPase 活性的关系[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(13):166.

[8] Weihua Yuan, Wei Pan, Juan Kong, et al. 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 suppresses renin gene transcription by blocking the activity of the cyclic AMP response element in the renin gene promoter[J]. J Biol Chem, 2007, 282(41):2982.

[9] Yan Chun Li, Juan Kong, Minjie Wei, et al. 1, 25-Dihydroxyvitamin D is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system [J]. J Clin Invest, 2002, 110(2):238.

[10] P Ameri, D Ronco, M Casu, et al. High prevalence of vitamin D deficiency and its association with left ventricular dilation: An echocardiography study in elderly patients with chronic heart failure [J]. Nutr Metab Cardiovasc, 2010, 20(9):635.

[11] Subba Reddy Vanga, Mathew Good, Patricia A. Howard, et al. Role of vitamin D in cardiovascular health [J]. Am J Cardiol, 2010, 106(6):798.

[12] Meems L M, Van der Harst P, Van Gilst W H, et al. Vitamin D biology in heart failure; molecular mechanisms and systematic review [J]. Curr Drug Targets, 2011, 12(1):29.

[13] 刘宾,王付,黄明宜. 基于灰色聚类方法的慢性心力衰竭中医证型文献分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(12):290.

[14] 陈云志,秦忠,王瑶瑶,等. 试论维生素 D 为“肾藏精”理论的物质基础[J]. 环球中医药, 2010, 3(6):447.

[15] Song cang Chen, Denis J Glenn, et al. Expression of the Vitamin D receptor is increased in the hypertrophic heart [J]. Hypertension, 2008, 52(6):1106.

[16] Cheng J B, Levine M A, Bell N H, et al. Genetic evidence that the human CYP2R1 enzyme is a key vitamin D 25-hydroxylase [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(20):7711.

[17] Sarkinen B E. Vitamin D deficiency & cardiovascular disease [J]. Nurse Pract, 2011, 36(3):46.

[责任编辑 李玉洁]