

参附益心颗粒对心衰大鼠心肌 c-fos, c-myc 表达的影响

王永霞^{1*}, 朱明军¹, 朱新峰², 李彬¹

(1. 河南中医学院第一附属医院心脏中心, 郑州 450000;

2. 河南弘大心血管病医院, 郑州 450000)

[摘要] 目的: 探讨参附益心颗粒对心衰大鼠心肌 c-fos, c-myc 表达的影响。方法: 随机将 150 只雄性 SD 大鼠分为造模组 130 只, 假手术组 20 只。造模组结扎左冠状动脉前降支, 假手术组手术方法同上, 仅在冠状动脉前降支下穿线不结扎。造模 8 周后, 经超声测定大鼠左室射血分数 (left ventricular ejection fraction, LVEF) < 50% 者随机分为 5 组 (模型组、卡托普利组、氯沙坦组、参附益心颗粒 (5.48, 21.90 g·kg⁻¹·d⁻¹) 2 个剂量组, 每组 10 只, 另选假手术组大鼠 10 只。假手术组及模型组以纯净水 ig, 药物干预组将药物溶于纯净水中 ig 给药, 每天 1 次, 疗程 4 周。4 周后超声测定 LVEF, 称重后, 处死测左室重量指数 (left ventricular mass index, LVMI), 免疫组化法检测大鼠心肌中 c-fos, c-myc 表达。结果: 21.90 g·kg⁻¹·d⁻¹ 参附益心颗粒可显著提高心衰大鼠 LVEF, 降低 LVMI, 抑制心衰大鼠心肌中 c-fos, c-myc 表达。结论: 参附益心颗粒能够通过抑制心衰大鼠心肌中 c-fos, c-myc 表达, 抑制心肌重塑。

[关键词] 参附益心颗粒; 心衰; c-fos 基因; c-myc 基因

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)03-0145-03

Effect of Shenfu Yixin Granule on Heart Failure Rats Myocardial c-fos, c-myc Expression

WANG Yong-xia^{1*}, ZHU Ming-jun¹, ZHU Xin-feng², LI Bin¹

(1. The First Affiliated Hospital of Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China;

2. The Hongda Cardiologic Hospital of Henan, Zhengzhou 450000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of the Shenfu Yixin Granule on heart failure rats myocardial c-fos, c-myc expression. **Method:** Heart failure rats were produced by left anterior descending coronary artery occlusion in one hundred thirty healthy male SD rats. Twenty rats obtained the surgery without ligation as sham control. After 8 weeks, rats with left ventricle ejection fraction (LVEF) < 50% were randomly Yixin assigned to 5 groups (n = 10 in each group): model group, captopril group, losartan group, two groups of Shenfu Yixin Granule (5.48, 21.90 g·kg⁻¹·d⁻¹). All the medicine was taken orally once a day for 4 weeks. The rats in model group and sham control (n = 10) were administered equivalent water. After 4 weeks, The LVEF was valued with Color Doppler Ultrasound again. The left ventricular mass index (LVMI) was checked. The expression of c-fos, c-myc were detected respectively by immune-histochemistry technique. **Result:** Shenfu Yixin Granule (21.90 g·kg⁻¹·d⁻¹) increased the LVEF, decreased LVMI and inhibited the expression of c-fos, c-myc. **Conclusion:** Shenfu Yixin Granules inhibit the expression of c-fos, c-myc in heart failure rats.

[Key words] Shenfu Yixin Granula; heart failure; c-fos; c-myc

[收稿日期] 20100705(009)

[基金项目] 河南省科技攻关项目(0624410031); 河南省教育厅自然科学基金(2006360006); 十一五国家科技支撑计划(2007BA120B075)

[通讯作者] * 王永霞, 副主任医师, 博士, 研究方向: 中医药防治心血管疾病的临床与实验研究, Tel: 0371-66262960, E-mail: wyxchzhq@yahoo.com.cn

参附益心颗粒是根据河南省名老中医孙建芝教授经验方开发,组方以人参益气,附子、桂枝温阳,丹参、益母草等活血化瘀,泽泻、葶苈子等利水去饮。前期实验及临床研究发现参附益心颗粒有明确的抗心力衰竭作用。本实验拟观察参附益心颗粒对心衰大鼠心肌 c-fos, c-myc 表达的影响,以探讨其在干预心肌重塑方面的部分作用机制。

1 材料

1.1 药品与试剂 参附益心颗粒(药物组成为:人参 6 g,制附子 10 g,桂枝 12 g,丹参 20 g,益母草 30 g,泽泻 15 g,葶苈子 15 g,大枣 12 g 等),由陕西咸阳步长集团提供,批号 20060822;卡托普利,常州康普药业有限公司,批号 H32023731;氯沙坦片,杭州默沙东制药有限公司,批号 H20030654;戊巴比妥钠,苏州市相城区鹏程化工有限公司,批号 H20063367;庆大霉素,武汉远大制药集团股份有限公司,批号 H20043476; c-fos, c-myc 抗体, Santa Cruz 公司提供; SP 试剂盒、DAB 试剂盒,北京中山生物技术有限公司提供。

1.2 仪器 JY-1001 型电子天平,上海民桥电子仪器厂;FA-1104 型微量电子天平,上海精密科学仪器有限公司天平仪器厂;XDH-3 心电图机,上海医用电子仪器厂;TKR-200C 小动物呼吸机,江苏特力麻醉呼吸公司;ViVi7 型彩色多普勒超声诊断仪,美国 GE 公司;H. H. S11-2B 电热恒温水浴箱,上海医疗器械五厂;OlympusYL-080 显微镜,日本 Olympus 株式会社。

1.3 动物 SD 雄性大鼠 150 只,清洁级,体重(250 ± 10) g;由河南省动物实验中心提供,合格证号医动字 610032。

2 方法

2.1 动物模型的建立^[1] 随机将 150 只 SD 大鼠分为造模组 130 只,假手术组 20 只。以 1.5% 戊巴比妥钠(35 mg·kg⁻¹) ip 麻醉后,背部固定,经喉行气管插管,连接小动物呼吸机,行正压呼吸,频率 80 次/min,潮气量 0.7 ~0.8 mL(按体重调节)。胸部去毛,消毒,沿胸骨左缘第 3 ~5 肋间开胸,暴露心脏并打开心包,在左心耳和肺动脉圆锥之间结扎左冠状动脉前降支,心电示波器 I 导联和 II 导联出现明显 ST 段抬高后,可见左心室前壁及心尖部颜色变暗,搏动减弱,然后挤压胸腔以排出空气并逐层关闭胸腔。术后 ip 庆大霉素(2.4 ×10⁴ U·kg⁻¹·d⁻¹) 3 d,预防感染。假手术组方法同上,仅在冠状动脉下穿

线后打一松结。观察 8 周,以超声检测心功能判断模型是否成功。

2.2 试验分组和处理 造模 8 周后,经超声测定大鼠心功能,造模组符合心力衰竭标准者即左室射血分数(LVEF) < 50% 的大鼠随机分为 5 组:模型组、卡托普利组(0.05 g·kg⁻¹·d⁻¹)、氯沙坦组(0.03 g·kg⁻¹·d⁻¹)、参附益心颗粒(5.48, 21.90 g·kg⁻¹·d⁻¹) 2 个剂量组^[2-5],每组 10 只,另选择假手术组 10 只。假手术组及模型组以纯净水 ig,药物干预组将药物溶于纯净水中 ig,ig 体积 20 mL·kg⁻¹,每天 1 次,疗程 4 周。4 周后检测 LVEF、采血检测指标及称重。

2.3 观察指标

2.3.1 LVEF 使用 GE 公司的 ViVi7 型彩色多普勒超声诊断仪,探头选用 10S,图像深度调至 2.0 ~ 4.0 cm,频率为 11.4 MHz,尽量减小扇扫角度。利用 Teichholtz 公式法计算 LVEF。

2.3.2 左室质量指数(LVMI) 动物称重处死后,迅速取分离后的心脏除去心房和右室组织,称重左心室室间隔为左室质量(LVM),LVMI = LVM(mg) / 体重(g)。

2.3.3 心肌 c-fos, c-myc 表达值 取左室冠状切面心肌组织,10% 甲醛固定后做石蜡切片,采用 SP 免疫组化染色法:石蜡切片脱蜡至水,3% H₂O₂ 溶液处理 10 min 消除内源性过氧化氢酶活性,微波处理 10 min 行抗原热修复暴露抗原后,加 10% 正常山羊血清,置 37 °C 10 min,以消除非特异性免疫球蛋白受体,然后分别滴加第一抗体,置 4 °C 冰箱过夜,生物素标记第二抗体(羊抗鼠抗体或羊抗兔抗体,稀释浓度 1:200),置 37 °C 孵育 30 min, S-A/HRP(辣根过氧化酶标记链霉亲和素,稀释度为 1:200),置 37 °C

孵育 30 min,以上各步骤间均用 0.05 mol·L⁻¹ 的 PBS(pH 7.2 ~7.4) 浸洗切片 3 次,每次 3 min。最后用 DAB 显色液显色 5 min,自来水冲洗,苏木素复染,乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封固。用 Olympus YL-080 显微镜对每张玻片在 400 倍视野下任取 5 张,用图像分析软件(image proplus 6.0) 测量每张图片 c-myc 及 c-fos 平均吸光度(A),取其平均值表示该大鼠心肌细胞中 c-myc 及 c-fos 的表达量。

2.4 统计学方法 用 SPSS 13.0 For Windows 软件统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析;治疗前后比较采用配对 t 检验。P < 0.05 有统计学意义。

3 结果

3.1 参附益心颗粒对心衰大鼠 LVEF 和 LVMI 的影响 模型组 LVEF 显著低于假手术组,提示造模成功;参附益心颗粒 $21.90 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 、氯沙坦可显著增加模型大鼠 LVEF,治疗后氯沙坦组与模型组有显著差异($P < 0.05$)。除参附益心颗粒 $5.48 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 外,各组 LVMI 均显著低于模型组(表 1)。

表 1 参附益心颗粒对慢性心衰大鼠 LVEF 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	治疗前 LVEF/%	治疗后 LVEF/%	LVMI / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
假手术	9	-	55.75 \pm 3.99	52.75 \pm 4.06	1.95 \pm 0.16 ³⁾
模型	7	-	40.29 \pm 4.15	39.29 \pm 4.71	2.30 \pm 0.26
卡托普利	9	0.05	44.00 \pm 4.41	45.75 \pm 6.96	2.00 \pm 0.19 ³⁾
氯沙坦	9	0.03	41.33 \pm 7.15	48.11 \pm 8.86 ^{1,3)}	1.85 \pm 0.18 ³⁾
参附益心颗粒	8	21.90	38.25 \pm 7.85	46.13 \pm 7.29 ²⁾	1.97 \pm 0.23 ³⁾
	8	5.48	42.78 \pm 7.74	45.33 \pm 7.15	2.16 \pm 0.39

注 与治疗前比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较³⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 参附益心颗粒对心衰大鼠心肌 c-fos, c-myc 表达的影响 各组心肌 c-fos 表达均较模型组显著降低;卡托普利组、氯沙坦组比参附益心颗粒 $5.48 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 组下降更明显。除参附益心颗粒 $5.48 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 组,各组心肌 c-myc 表达较模型组也均有显著下降,参附益心颗粒 $21.90 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 和氯沙坦组与参附益心颗粒 $5.48 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 比较有显著统计学意义($P < 0.05$) (见表 2)。

表 2 参附益心颗粒对心衰大鼠心肌 c-fos, c-myc 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	c-fos/A	c-myc/A
假手术	9	-	0.2679 \pm 0.0048	0.2779 \pm 0.0079
模型	7	-	0.2943 \pm 0.0049	0.2948 \pm 0.0059
卡托普利	9	0.05	0.2716 \pm 0.0082 ^{2,3)}	0.2796 \pm 0.0072 ²⁾
氯沙坦	9	0.03	0.2744 \pm 0.0070 ^{2,3)}	0.2798 \pm 0.0053 ^{2,3)}
参附益心颗粒	8	21.90	0.2770 \pm 0.0073 ²⁾	0.2759 \pm 0.0117 ^{1,3)}
	8	5.48	0.2814 \pm 0.0060 ¹⁾	0.2875 \pm 0.0081

注 与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$, ²⁾ $P < 0.001$; 与 $5.48 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 参附益心颗粒比较³⁾ $P < 0.05$ 。

4 讨论

流行病学资料显示,心力衰竭发病率呈逐年递增趋势,5 年存活率与恶性肿瘤相仿。目前认为心力衰竭发生发展的基本机制是心肌重塑。心肌重塑成由于复杂的分子和细胞机制,包括心肌细胞大小、数量和分布的改建,心肌细胞外基质和组成的变化,胚胎基因和蛋白质的再表达等。导致心肌重塑的各

种细胞外信号,如压力负荷、血管紧张素、去甲肾上腺素等可以通过多条信号转导途径以引起细胞应答,而细胞对外界信号响应的一个共同环节是激活原癌基因编码的通用转录因子如 c-fos, c-jun, c-myc 等^[6]。c-fos, c-myc 是原癌基因家族的成员,具有生长调节作用,许多引起心肌肥厚的因素如压力负荷、血管紧张素、去甲肾上腺素等均能诱导原癌基因的表达。

参附益心颗粒其前期药效学研究发现对犬实验性心力衰竭有明显改善作用、可增加心肌张力和肾血流量;对正常大鼠有明显的利尿作用,能延长大鼠离体心衰模型心脏出现停搏的时间、缩短停搏心脏复跳时间、证实具有明确的抗心力衰竭作用。临床观察发现该方可有效的改善 CHF 患者的症状、体征和心功能^[2-4]。本实验结果表明参附益心颗粒 $21.90 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 有明显的改善 LVEF,降低 LVMI 的作用,并能够显著降低心肌梗死后心衰大鼠心肌中 c-fos, c-myc 的表达,减少了其对下游不良信号的传递,可减轻或延缓心肌梗死后心衰大鼠心肌重塑,对心衰大鼠心脏具有保护作用,随着疗程的延长可能会出现更加理想的干预效果。

[参考文献]

- [1] 李敏. 慢性心力衰竭病证模型的构建及活血方药对左室重构影响的实验研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2001: 1.
- [2] 晋献春, 孙建芝, 王显, 等. 心衰康冲剂对实验性兔心力衰竭心功能及心钠素的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 1996, 16(7): 424.
- [3] 晋献春, 孙建芝, 朱明军, 等. 心衰康治疗充血性心力衰竭的临床研究[J]. 中国中医药科技, 1997, 4(5): 266.
- [4] 王显, 朱明军, 孙建芝, 等. 心衰康对电镜下 CHF 模型心肌线粒体的影响[J]. 上海中医药大学学报, 2000, 14(1): 33.
- [5] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 179.
- [6] 毋巨龙, 李荟元, 李世荣. TGF-1 对增生性瘢痕成纤维细胞中 c-myc 和 c-fos 表达及胶原分泌的影响[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(5): 594.

[责任编辑 聂淑琴]