

DOI:CNKI;11-3495/R. 20110321. 1135. 011

利心冲剂对心衰大鼠模型神经内分泌及炎症因子的影响

郁晓群¹, 高想^{1*}, 蒋凤荣², 姜卫东¹, 唐艳芬¹, 张锋莉¹

(1. 南通市中医院, 江苏南通 226001, 2. 南京中医药大学, 南京 210046)

[摘要] 目的:研究利心冲剂对心衰大鼠神经内分泌因子及炎症相关因子的影响。方法:实验分组:正常对照组、模型组、利心冲剂低剂量组(20 g·kg⁻¹)、利心冲剂高剂量组(40 g·kg⁻¹)、卡托普利阳性药组(16 mg·kg⁻¹)。ip 阿霉素(ADR)4 mg·kg⁻¹, 每 5 天 1 次, 共 3 次, 复制大鼠心衰模型, 左心室插管术测定血流动力学指标, HE 病理染色, Real time PCR 检测心肌细胞神经内分泌因子及炎症相关因子, 免疫组织化学检测基质金属蛋白酶组织抑制因子(TIMP-1)。结果:利心冲剂治疗组和模型组比较, 形态学显示心肌细胞变性坏死明显减轻;左心室收缩内压显著升高, 以高剂量最为明显($P < 0.01$); ADR 作用后心肌细胞神经内分泌因子相关指标 BNP, ANP 与 ETmRNA 明显升高($P < 0.01$), 利心冲剂治疗后 BNP, ANP 与 ETmRNA 明显降低, 以高剂量最为明显($P < 0.01$); ADR 作用后心肌细胞炎症相关因子 TNF- α 明显升高($P < 0.01$), 利心冲剂治疗后 TNF- α 明显降低, 以利心冲剂高剂量组最为明显($P < 0.01$); ADR 作用后心肌细胞 TIMP-1 表达明显减少($P < 0.01$), 利心冲剂治疗后 TIMP-1 表达明显增加, 以高剂量最为显著($P < 0.01$)。结论:利心冲剂调控神经内分泌因子及炎症相关因子, 改善心脏功能。

[关键词] 利心冲剂; 心衰大鼠模型; 神经内分泌因子; 炎症相关因子

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)10-0147-05

Effect of Lixin Granule on Neuroendocrine and Inflammation in Rats with Adriamycin-induced Heart Failure

YU Xiao-qun¹, GAO Xiang^{1*}, JIANG Feng-rong², JIANG Wei-dong¹, TANG Yan-fen¹, ZHANG Feng-li¹

(1. Nantong Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nantong 226001, China;

2. Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

[收稿日期] 20101210(003)

[基金项目] 江苏省中医药局科技研究专项项目(HZ07072)

[第一作者] 郁晓群, 学士, 副主任医师, 专业方向: 心血管内科及急诊

[通讯作者] * 高想, 学士, 主任医师, 专业方向: 心血管内科, Tel: 0513-85126191, E-mail: gaoxiang@medmail.com.cn

[网络出版时间] 2011-03-21 11:35

- [5] 连晓媛, 丁岩, 陈奇, 等. 急性应激雌性大鼠生殖内分泌紊乱模型的建立[J]. 中药新药与临床药理, 2004, 15(3):155.
- [6] 范红霞, 万立生. 去卵巢大鼠性皮素和骨钙素的含量变化及补肾中药对其影响[J]. 内蒙古中医药, 2000, 19(1):43.
- [7] 狄俊英, 张伯莉, 崔红英, 等. 补肾调冲药对去卵巢小鼠作用的实验研究[J]. 天津中医学院学报, 1998, 17(3):40.
- [8] 蔡立荣, 李大金, 孙晓溪, 等. 补肾活血方对小鼠实验性卵巢早衰防治作用的研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2001, 21(2):126.
- [9] 朱玲, 罗颂平. 卵巢早衰的病因病机及其证治[J]. 中医药学刊, 2003, 21(1):143.
- [10] 杨林芝. 应激与女性生殖内分泌疾病关系的研究进展[J]. 中国实用医药, 2008, 3(6):127.

[责任编辑 聂淑琴]

[Abstract] **Objective:** To observe the protective effect of Lixin granule on the neuroendocrine and inflammation of rats with adriamycin-induced heart failure. **Method:** Sixty adult male Wistar rats were divided into 5 groups: normal control group (NC), adriamycin (ADR) group, L- Lixin granule group ($20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), H- Lixin granule group ($40 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), captopril group ($16 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). Then ADR of $4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ was given intraperitoneally once in every 5 days (total 3 times) to copy the model of heart failure. The biological signal collecting system was used to record and analyze the LVSP of the rats. The pathological changes in the cardiomyocytes were observed. Real time PCR was used to record and analyze the neuroendocrine and inflammation of rats. Immunohistochemistry staining was used to detect TIMP-1. **Result:** As compared with NC group, the LVSP of the ADR group was significantly lower ($P < 0.05$), but those of the H- Lixin granule group were markedly higher than those of the ADR group ($P < 0.01$). HE staining showed that the myocardial tissue in CHF group was injured, presenting in cardiomyopathy-like changes; in NC group, muscle fiber was arranged regularly with no injury muscle fibers; in the treatment group, Lixin granule partially normalized contractile function. Real time PCR and Serological detection staining showed that the neuroendocrine factors (ANP, BNP, ET) and inflammatory factor (TNF- α) of rats were increased by ADR, and those of the H- Lixin granule group were markedly lower compared with ADR group ($P < 0.01$). **Conclusion:** H- Lixin granule group treatment can relieve the neuroendocrine and inflammation induced by ADR in myocardium, and also obviously improve the cardiac contractility of heart failure rats.

[Key words] Lixin granule; adriamycin; heart failure; neuroendocrine; inflammation

慢性心力衰竭 (CHF) 是临床常见疾病, 是各种病因所致的严重心血管疾病的终末阶段和归宿。随着人口老龄化及高血压、冠心病等慢性疾病发病率的逐步增加, 心力衰竭的发病率及死亡率也在升高。近年来, 应用依据中医理论组建“利心冲剂”, 以益气温阳为主, 辅以活血通络, 兼以利水消肿, 治疗多种原因引起的心力衰竭, 能减轻症状, 提高患者生活质量, 疗效优于西药对照组^[1]。本实验采用已经得到公认的阿霉素 (ADR) 复制 CHF 模型^[2], 从细胞因子水平探讨利心冲剂对实验性 CHF 大鼠的作用机制。

1 材料

1.1 药品与试剂 利心冲剂由黄芪、黄精、补骨脂、葶苈子、益母草等组成, 制剂由南通市中医院制剂室提供^[3]; 盐酸阿霉素 (ADR), 深圳万乐药业有限公司生产 (批号 0308E2), 用无菌生理盐水配成 $2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 母液备用, 工作液为 $0.667 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; 卡托普利, 中美上海施贵宝制药公司生产 (批号 0505031)。抗体由美国 B&R 提供, 引物由上海生物工程公司提供。其他化学试剂均为分析纯。

1.2 动物 SPF 级 Wistar 大鼠 62 只, 雌雄各半, 体重 (350 ± 25) g, 由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供, 许可证号 SCXK (沪) 2007-0005。

1.3 仪器 RM6280C 多道生理信号采集处理系统 (成都仪器厂); 8453E 型紫外分光光度仪 (Agilent

公司, 美国); Light Cycler real-time PCR 仪 (罗氏公司, 美国)。

2 方法

2.1 动物分组及造模 62 只 Wistar 大鼠适应性喂养 7 d 后, 随机取 52 只大鼠 (雌雄各半) 用阿霉素 $4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, $6.0 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 造模: 随机取 10 只 (雌雄各半) 作为空白对照组, ip $6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 生理盐水。余 42 只大鼠用 ADR 造模, 用药量 $4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 每 5 天 ip 1 次, 共 3 次。末次给药 24 h 后, 随机选取模型鼠 2 只, 断头处死, 取出心脏, 用预冷 0.9% 生理盐水冲洗, 取左室心肌部分, 以 10% 甲醛固定, HE 染色, 光镜下观察及心脏动力学确认造模成功后, 再将所余大鼠随机分为心衰模型对照组, 卡托普利治疗组 ($16 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、利心冲剂低、高剂量治疗组 ($20, 40 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)。各组均精饲料喂养, 自由饮水。

2.2 给药方法 卡托普利治疗组、利心冲剂低、高剂量治疗组造模后次日开始 ig 给药, 连续给药 21 d。

2.3 观察项目及检测

2.3.1 心功能测定 实验结束后, 禁食 12 h, 麻醉后手术游离右侧颈总动脉, 经右侧颈总动脉插入心室插管 (充满 1% 肝素), 用多道生理信号采集处理系统描记记录血压曲线; 再继续插入, 通过左侧动脉瓣和房室瓣进入左心室, 描记记录左心室内压及微

分等数据。

2.3.2 病理学检查 给药结束后,放血处死大鼠,取左室心肌部分,以10%甲醛固定,常规石蜡包埋,病理切片,HE染色,光镜观察心肌细胞的形态学变化。

2.3.3 Real-time PCR 定量检测 表达:内参 β -actin、A型利钠肽(ANP)、B型利钠肽(BNP)、内皮素(ET)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、引物经 Primer 5.0 设计。Real-time PCR 检测心肌细胞因子的表达:用 Trizol 试剂提取总 mRNA,8453E 型紫外分光光度仪(Agilent 公司,美国)测定 RNA 浓度,参照

SYBR Ex Script™ RT-PCR 试剂盒说明操作,用等量的总 mRNA 进行逆转录,然后以逆转录产物为模板在 Light Cycler real-time PCR 仪(罗氏公司,美国)上进行 PCR 反应,反应条件为:94 °C 预变性 10 s,94 °C 变性 5 s,60 °C 退火及延伸 20 s,共反应 40 个循环后,分析融解曲线,参照 Livak 等人的方法,以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析细胞因子的相对表达量^[4],引物列表见表 1。

2.3.4 免疫组织化学检测基质金属蛋白酶组织抑制因子(TIMP-1)的表达 采用 SABC 法,计算方法为半定量法,高倍镜下随机选 6 个视野,计算 100 个细胞中阳性细胞数。

表 1 实验所用引物序列

名称	上游引物	下游引物
ANP	5'-AACCTGCTAGACCACCTG-3'	5'-TTTTCAAGAGGGCAGATC-3'
BNP	5'-TGGGCAGAAGATAGACCGGA-3'	5'-AGAACCTCAGCCCGTCACAG-3'
ET	5'GCATCTTGCTCCTGTACCAG-3'	5'-CTC-CCTGACTTTTCATC-TGCA-3'
TNF- α	5'-GCCAATGGCATGGATCTCAAAG-3'	5'-CAGAGCAATGACTCCAAAGT-3'
β -actin	5'-ATCATGTTTGAGACCTTCAAC-3'	5'-TTCATCTTCATGCTGCTAGGA-3'

2.4 统计方法 用 SPSS 11.0 统计软件对所得结果进行处理,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异采用单因素方差分析,计量资料用 t 检验。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 心肌细胞病理学变化 空白对照组心肌细胞

形态正常,胞浆纹理清晰;模型组部分心肌细胞水肿,轻度脂肪变性,部分心肌细胞肌浆凝聚、核固缩、间质出血;利心冲剂高剂量组心肌细胞排列紧密、核大,多呈椭圆形深染,胞浆纹理清晰,无明显变性坏死。表明利心冲剂治疗后减轻了 ADR 对心肌细胞的毒性,心肌细胞的变性坏死明显改善(图 1)。

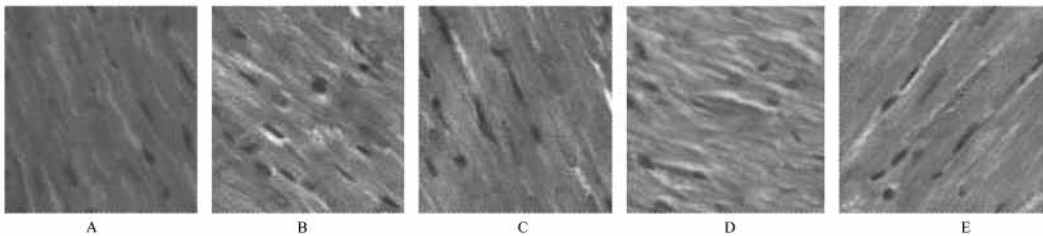


图 1 利心冲剂对心衰大鼠心肌细胞病理变化的影响(HE 染色, $\times 40$)

A. 正常对照组;B. 模型组;C. 卡托普利 $16 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;D. 利心冲剂 $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;E. 利心冲剂 $40 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组(图 2 同)

3.2 大鼠心衰各组血液流变学测定 ADR 作用后左心室收缩压、左室舒张末期压发生明显的改变,利心冲剂治疗后改善心脏的动力学,以阳性药物与高剂量最为明显($P < 0.01$)。见表 2。

3.3 利心冲剂对神经内分泌因子、炎症因子的影响 ADR 作用后 BNP, ANP 与 ET mRNA 明显升高($P < 0.01$),利心冲剂治疗后 BNP, ANP 与 ETmRNA 明显降低,以高剂量最为明显($P < 0.01$)。表明利心冲剂能抑制神经内分泌因子激活,从而减轻对细胞的损伤。ADR 作用后 TNF- α 明显升高($P <$

表 2 实验各组血液流变学的测定($\bar{x} \pm s, n = 6$) mmHg

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	左心室收缩压	左室舒张末期压
正常	-	169.33 ± 6.65	4.73 ± 0.35
模型	-	$109.50 \pm 5.09^{1)}$	$19.42 \pm 1.41^{1)}$
卡托普利	0.016	$163.17 \pm 9.99^{2)}$	$12.00 \pm 0.91^{2)}$
利心冲剂	20	148.33 ± 6.02	18.10 ± 0.45
	40	$153.67 \pm 6.56^{2)}$	$9.17 \pm 0.75^{2)}$

注:与正常组相比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组相比较²⁾ $P < 0.01$ (1 mm Hg = 0.133 kPa)。

0.01), 利心冲剂治疗后 TNF-α 明显降低, 以利心冲剂高剂量组最为明显 ($P < 0.01$)。见表 3。

3.4 利心冲剂对心肌细胞 TIMP-1 表达的影响 正常组心肌细胞 TIMP-1 相对表达量为 20.50 ± 1.97 , ADR 作用后 TIMP-1 相对表达量减少为 9.83 ± 1.47

($P < 0.01$), 利心冲剂治疗后 TIMP-1 相对表达量明显增加, 利心冲剂低、高剂量组分别为 12.67 ± 0.81 , 16.17 ± 1.94 , 以高剂量最为显著 ($P < 0.01$)。显示利心冲剂能调控心肌细胞的 TIMP-1 信号分子。见图 2。

表 3 实验各组心肌细胞 Real time PCR 测定神经内分泌因子、炎症因子的相对表达量 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	ANP	BNP	ET	TNF-α
正常	-	1	1	1	1
模型	-	$9.13 \pm 1.12^{1)}$	$2.10 \pm 0.91^{1)}$	$1.38 \pm 0.25^{1)}$	$1.25 \pm 0.03^{1)}$
卡托普利	0.016	3.34 ± 1.68	0.36 ± 0.08	0.56 ± 0.45	0.93 ± 0.03
利心冲剂	20	1.14 ± 0.21	0.52 ± 0.03	0.73 ± 0.32	1.20 ± 0.08
	40	$2.37 \pm 0.10^{2)}$	$0.16 \pm 0.02^{2)}$	$0.53 \pm 0.27^{2)}$	$0.62 \pm 0.14^{2)}$

注:与正常组相比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组相比较²⁾ $P < 0.01$ 。

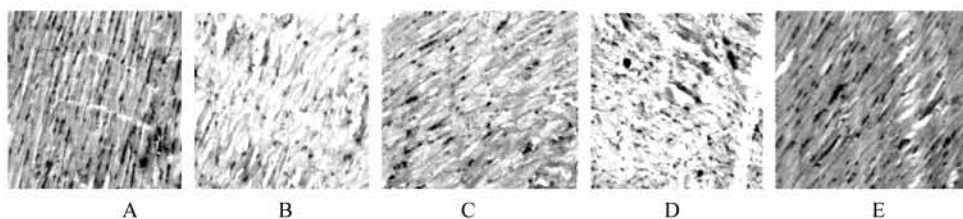


图 2 利心冲剂对心衰大鼠心肌细胞 TIMP-1 表达的影响(免疫组化, $\times 40$)

4 讨论

CHF 时由于交感神经的过度激活, 导致神经内分泌激素活性增强; 而神经内分泌系统的激活, 既是 CHF 的代偿机制之一, 又是加重心室重塑和促进心衰恶化的重要因素^[5]。CHF 的病理生理改变主要是由心肌细胞的变性、坏死引起心肌收缩单位的失调, 心室重塑, 导致心搏出量下降及由此引起的一系列神经体液因素的变化。

ANP 和 BNP 分别由心房和心室分泌, 刺激 ANP 和 BNP 释放的主要因素是心肌张力的增加。ANP 的分泌释放调节主要在心房储存水平, 新合成的很少; BNP 的合成、分泌释放调节主要在基因表达水平。ANP 或 BNP 的主要生理作用有: 抑制肾素-血管紧张素-醛固酮 (RAS) 系统活性; 抑制某些其他激素 (内皮素, 血管加压素等) 活性; 抗心肌细胞脂肪分解作用、抑制心肌细胞成纤维细胞 DNA 合成和细胞增殖、抑制心肌细胞肥大。现已清楚, ANP 升高与心力衰竭引起的心房内压增加而导致的 ANP 从心房的储藏颗粒中释放有关^[6-7]; BNP 是心室容积扩张和压力负荷增加时, 由心室释放的一种心脏神经激素, 主要反映心室功能, 左心室功能不全患者血浆 BNP 水平增高, 且增高的程度与心功能不全的程度

有关^[8]。因此, ANP 和 BNP 是了解心脏功能的重要生物标志物。ET 主要由血管内皮细胞产生, 神经内分泌激素、细胞因子和其他血管活性因子以及机械应力均可刺激其合成, 具有促血管平滑肌增殖、纤维化、炎症等多种活性, 是一种潜在的心肌细胞生长因子和肥厚因子^[9], 与心肌细胞肥大、心室重塑和心力衰竭的发生密切相关。实验结果显示, 阿霉素模型后心肌细胞中 ANP, BNP, ET mRNA 明显增加, 利心冲剂作用后 ANP, BNP, ET mRNA 明显减少, 说明利心冲剂能抑制神经内分泌因子的合成与释放。

近年来随着对心衰发病机制研究的深入, 发现炎症在心衰发生与发展中起着重要作用。基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 是一组能特异地降解细胞外基质成分的 Zn^{+} 依赖的酶家族, 在心肌组织重构中起重要作用^[10]。TIMP1 能阻断 MMPs 与底物结合, 从而抑制其溶解胶原和明胶的活性, 延缓心室重塑的发展。TNF-α 是 MMPs 重要的调节因子, 通过激活部分 MMPs 并抑制部分 TIMPs 而使二者作用失衡, 导致胶原纤维网络破坏, 引起心肌细胞滑行, 室壁变薄和心室扩大, 心室重塑, 心功能下降^[11]。同时, TNF-α 能结合到 TNF-α 受体₁ (tumor necrosis factor receptor 1 TNFR₁) 和 TNFR₂

上,这种结合导致 TNFR 的四聚化,并募集许多接合蛋白,更进一步的信号传导导致转录因子 AP1 家族和氧化应激激活核因子- κ B (NF- κ B) 的活化,进而诱导心肌细胞的凋亡。Natsumi Kawamura 等^[12]用过表达 TNF- α 的转基因小鼠作为细胞因子诱导心肌病模型,该种模型小鼠会出现心肌功能下降,心肌肥大扩张,最后死于心力衰竭。实验表明,利心冲剂能减少阿霉素所致心衰模型中的炎性因子 TNF- α 的表达,增加 TIMP-1 的表达,抑制了心衰时的炎症反应。

综上所述,利心冲剂能改善神经内分泌因子以及炎性相关因子的表达,减轻对心肌细胞的损伤,保护心肌细胞,稳定心肌功能单位,减轻心脏压力,从而抑制心室重塑,改善心功能。对于利心冲剂改善神经内分泌因子以及炎性相关因子的信号通路有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] 高想,倪卫兵,陶志强,等. 中西医结合治疗慢性心力衰竭 60 例临床观察[J]. 江苏中医药,2007,39(6):32.
- [2] 阳冠明,孙胜涛,李树全. β 胡萝卜素对 ADR 致大鼠心肌组织的超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶 mRNA 表达改变的影响[J]. 中国药理学通报,2006,22(4):465.
- [3] 庄美芳,高想,张锋莉,等. 利心冲剂对心衰大鼠模型的治疗作用和毒理学研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(8):142.
- [4] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- σ CT method[J]. Methods,2001,25(4):402.
- [5] 卢永昕. 心力衰竭神经内分泌治疗的现代观念[J]. 中国医刊,2006,41(5):14.
- [6] Ngo L, Vesely D L, Bissett J K, et al. Acute and sustained release of atrial natriuretic factor with acute myocardial infarction [J]. Am Heart J, 1989, 118 (5 Pt1):893.
- [7] Fantana F, Bernadi P, Spagnolo N, et al. Plasma atrial natriuretic factor in patients with acute myocardial infarction[J]. Eur Heart J,1990,11(9):779.
- [8] 胡大一,马长生. 心脏病学实践:规范化治疗. 心力衰竭的预后评价[M]. 北京:人民卫生出版社,2002:102.
- [9] Beghetti M, Black S M, Fineman J R. Endothelin1 in congenital heart disease [J]. Pediatr Res,2005,57(5Pt2):16R.
- [10] Spinale F G, Coker M L, Bond B R, et al. Myocardial matrix degradation and metalloproteinase activation in the failing heart: a potential therapeutic target [J]. Cardiovasc Res,2000,46(2):225.
- [11] Gunasinghe H R, Coker M L, Thorp A J, et al. Increased matrix metalloproteinase/plasma levels in patients with congestive heart failure: relation to cytokine activation[J]. Circulation,2000,102(II):11403.
- [12] Kawamura N, Kubota T, Kawano S, et al. Blockade of NF- κ B improves cardiac function and survival without affecting inflammation in TNF- α -induced cardiomyopathy[J]. Cardiovasc Res,2005,66(3):520.

[责任编辑 聂淑琴]