

本文引用:颜旭,刘春华,庄红,陈琪,张婷,赵启,蔡雷.强心安神汤对慢性心衰大鼠 Ang II 及 AT1mRNA 表达的影响[J].湖南中医药大学学报,2018,38(4):393-396.

强心安神汤对慢性心衰大鼠 Ang II 及 AT1mRNA 表达的影响

颜旭¹,刘春华^{2*},庄红¹,陈琪¹,张婷¹,赵启¹,蔡雷³

(1.湖南省中医药研究院附属医院,湖南长沙 410006;2.湖南中医药大学,湖南长沙 410000;

3.浙江省台州市中医院,浙江台州 318000)

〔摘要〕目的 研究强心安神汤对 Wistar 慢性心衰模型大鼠 Ang II 含量及 AT1 mRNA 表达的影响,探讨其可能的作用机制。方法 除空白组外,将 Wistar 大鼠造模后分为模型组、西药组、强心安神汤高剂量组及强心安神汤低剂量组,干预 4 周后,抽静脉血以免疫组化法测定大鼠血清中 Ang II 的含量;处死大鼠,提取心肌组织,以 RT-PCR 法检测心肌组织 AT1 mRNA 的表达。结果 强心安神汤组大鼠血清 Ang II 含量及 AT1 mRNA 表达与模型组及西药组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 强心安神汤治疗心衰的机制可能与其抑制 Ang II 引起的 AT1 mRNA 表达上调有关。

〔关键词〕慢性心衰;强心安神汤;Ang II;AT1mRNA

〔中图分类号〕R285.5;R541.6

〔文献标志码〕A

〔文章编号〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.04.007

Effects of Qiangxin Anshen Decoction on the Expression of Ang II and AT1 mRNA in Rats with Chronic Heart Failure

YAN Xu¹, LIU Chunhua^{2*}, ZHUANG Hong¹, CHEN Qi¹, ZHANG Ting¹, ZHAO Qi¹, CAI Lei³

(1. Affiliated Hospital of Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410006, China; 2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410000, China; 3. Taizhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Taizhou, Zhejiang 318000, China)

〔Abstract〕 Objective To study the effect of Qiangxin Anshen decoction on the expression of Ang II and AT1 mRNA in the model of Wistar rats with chronic heart failure, and investigate its possible mechanism. **Methods** Except for the blank group, the model rats were randomly divided into model group, Western medicine group, high-dose Qiangxin Anshen decoction group and low-dose Qiangxin Anshen decoction group. After intervention treatment for 4 weeks, the content of Ang II of serum in rats was measured. The rats were killed and the AT1 mRNA expression in myocardial tissues were detected. **Results** Compared with the model and Western medicine groups, the content of Ang II in the rats serum and AT1 mRNA expression of myocardial tissues in Qiangxin Anshen decoction group was statistically significant ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** The mechanism of Qiangxin Anshen decoction in treating heart failure may be related with the up-regulation of AT1 mRNA expression caused by restraining Ang II.

〔Keywords〕 chronic congestive heart failure; Qiangxin Anshen decoction; Ang II; AT1 mRNA

〔收稿日期〕2017-04-05

〔基金项目〕湖南省教育厅资助(09C740);湖南省卫生厅中医药科研基金(2009038)。

〔作者简介〕颜旭,男,博士,副主任医师,硕士研究生导师,研究方向:心脑血管疾病防治。

〔通讯作者〕*刘春华,女,博士,教授,主任医师,硕士研究生导师,E-mail:amy12302006@126.com。

慢性心力衰竭 (congestive heart failure, CHF) 是一种常见的、多发的心脏疾病,现代医学的飞速发展,并没有降低慢性心衰的病死率。我院心内科在多年的中西医结合临床实践及实验中发现以“益气滋阴、强心安神”为法组方的“强心安神汤”治疗慢性心衰可以显著改善患者临床症状、体征及实验室指标,减轻心衰大鼠心肌细胞损伤^[1-2]。本文观察强心安神汤对慢性心衰大鼠血管紧张素 II (Ang II) 及 AT1mRNA 表达的影响,探讨其可能的作用机制,现将实验结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验药物 “强心安神汤”组成为:炙黄芪、制首乌、酸枣仁、阿胶、香加皮、葶苈子、三七、黄连、肉桂等,采用超微颗粒,由湖南春光九汇现代中药有限公司提供;盐酸阿霉素注射液(批号:1004E1),由浙江海正药业股份有限公司提供;生理盐水,由四川科伦大药厂生产;注射用水,由天津药业焦作有限公司生产;倍他乐克,由阿斯利康制药有限公司生产;卡托普利,由浙江南洋药业有限公司生产。

1.1.2 实验动物 Wistar 大鼠 80 只,由湖南中医药大学动物中心提供,雌雄各半,体质量(200±20) g,随机分为造模组 68 只及空白组 12 只。饲料、垫料均由湖南中医药大学动物中心提供。动物实验室环境:温度 20~25 ℃,湿度 45%~55%。

1.1.3 主要试剂与仪器设备 血管紧张素 II (Ang II) 检测试剂盒由北京北方生物技术研究所生产;RT-PCR 试剂盒由宝生物工程(大连)有限公司生产。TC48/T/H(a)型 PCR 仪由杭州大和热磁电子有限公司生产;GE-100 型水平电泳仪由杭州大和热磁电子有限公司生产。

1.2 实验方法

1.2.1 Wistar 大鼠慢性心衰模型的复制 根据文献[3],造模组采用腹腔内注射阿霉素法,第 1~3 周按 3 mg/kg 剂量进行腹腔注射,第 4~6 周按 2 mg/kg 剂量进行腹腔注射;1 次/周,复制心力衰竭模型。空白组注射等容量生理盐水,每周 1 次,连续 6 周。每天观察记录大鼠的精神状态、活动、饮食、体质量的变化及呼吸频率等日常习惯的改变情况,6 周后,根

据大鼠行为方式的改变及心脏超声测量大鼠左室射血分数(LVEF)、左室收缩率(LVFS)及 ELISA 法检测大鼠血清脑利钠肽(BNP)水平的变化判断造模成功与否。

1.2.2 实验分组及干预 将复制心衰模型成功的 55 只大鼠,选取 48 只,随机分为模型组、西药对照组、强心安神汤高剂量组、强心安神汤低剂量组,另设一组作为空白组,每组 12 只,各组动物给予同等条件下饲养。空白组和模型组每日予以同等容量的生理盐水灌胃;西药组,将倍他乐克及卡托普利配制成水溶液,按 2.7 mg/(kg·d)灌胃;中药给药剂量按临床成人剂量×动物等效剂量系数换算后为强心安神汤低剂量组每日给药剂量,其 4 倍值为高剂量组每日给药剂量。具体为低剂量组按 6.93 g/(kg·d)灌胃;高剂量组按 27.72 g/(kg·d)灌胃,连续干预 4 周。

1.2.3 标本采集与检测 (1)血清 Ang II 测定:各组大鼠连续干预 4 周,于最后一次给药后禁食 12 h,麻醉后于股静脉处采血 6 mL,分别置于 EDTA、肝素抗凝试管中,4 ℃、3 000 r/min 离心,分离血浆,低温下保存待测,由湖南省中西医结合医院免疫生化室完成。(2)心衰大鼠 AT1 mRNA 的检测:处死大鼠,取心肌组织 75 mg 置于 DECP 处理过的研钵内,倒入液氮,迅速研磨成粉末状,加入 Trizol 反应液 1 mL 裂解细胞,室温孵育 5~10 min。加入氯仿 0.2 mL,剧烈震荡 15 s,室温孵育 3 min。12 000 r/min,4 ℃离心 15 min,收集无色上层水相于 1.5 mL 于另一离心管中,弃沉淀管,加入 0.5 mL 异丙醇,振荡混匀,室温孵育 5~10 min。12 000 r/min,4 ℃离心 10 min,弃上清,加入 1 mL 75%乙醇并振荡。9 000 r/min,4 ℃离心 5 min,弃上清,空气中干燥 5~10 min。加入 20 μL DEPC 处理的无 RNA 酶的水溶解 RNA,置-70 ℃保存。以 A260/280 法检测 RNA 纯度及浓度表示无严重 DNA 污染, RNA 纯度较高,样本无严重 RNA 降解,符合试验要求。按 M-MLV 逆转录酶说明书合成 cDNA。引物序列由上海生工生物工程技术服务有限公司合成(具体见表 1);扩增条件:94 ℃预变性 5 min;94 ℃变性 30 s;57 ℃退火 40 s;72 ℃延伸 40 s;35 个循环扩增后,72 ℃延伸 10 min。通过图像分析软件读取凝胶电泳条带光密度扫描

值,将条带与内参电泳条带的比值作为目的基因 mRNA 的表达量。即:mRNA 相对表达=样品扫描值/内参扫描值。

表 1 引物名称及序列

引物	序列(5'-3')	长度
AT1 Forward	5'-TCCACCCAATGAAGTCTCGC-3'	348 bp
AT1 Reverse	5'-GCACAATCGCCATAATTATC-3'	
GAPDH Forward	5'-CGCTAACATCAAATGGGGTG-3'	600 bp
GAPDH Reverse	5'-ACAACCTGGTCTCTCAGTGA-3'	

1.3 数据处理及统计学分析

采用 SPSS 15.0 软件处理数据。计量资料采用“ $\bar{x}\pm s$ ”进行统计描述。多组数据分析采用单因素方差分析检验,方差齐时采用最小显著差数法(LSD)法;方差不齐时选用 Tamhane's T2 法。取 $P<0.05$ 为差异有统计学意义, $P<0.01$ 为差异有显著统计学意义。

2 结果

如表 2 和图 1-2 所示,模型组心衰大鼠 Ang II 水平及大鼠心肌组织 AT1 mRNA 表达显著高于空白组($P<0.01$);分别给予强心安神汤及西药干预后,各干预组 Ang II 水平及 AT1 mRNA 表达均较模型组显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);强心安神汤高剂量组及低剂量组与西药组比较,Ang II 水平及 AT1 mRNA 表达差异有统计学意义 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。而强心安神汤高、低剂量组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。

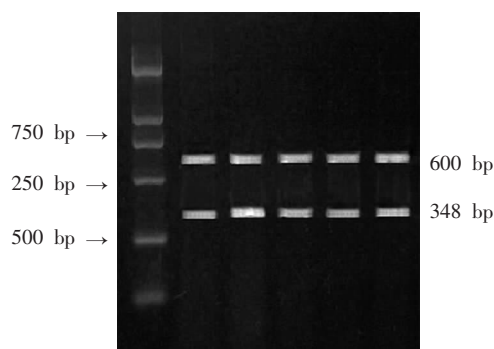
表 2 各组大鼠 Ang II 含量及 AT1 mRNA 表达比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	Ang II (pg/mL)	AT1/GAPDH mRNA
空白组	12	98.12±9.37	1.83±0.37
模型组	12	243.15±14.84**	3.96±0.54**
西药组	12	151.36±10.43 ^{##}	3.17±0.49 ^{##}
中药高剂量组	12	135.83±9.78 ^{△△#}	2.29±0.41 ^{△△#}
中药低剂量组	12	127.61±9.69 ^{△#}	2.45±0.47 ^{△#}
F 值		298.3	39.10
P 值		<0.01	<0.01

注:与空白组比较 ** $P<0.01$;与模型组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$;与西药组比较, △ $P<0.05$, △△ $P<0.01$ 。

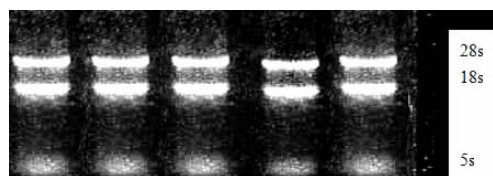
3 讨论

现代医学研究发现,慢性心衰的基本机制是神经内分泌介导的心室重构,肾素-血管紧张素系统的过度激活促进了心衰的发生与发展^[4]。肾素活性



注:左起各条带分别为空白组、模型组、西药组、中药高剂量组、中药低剂量组

图 1 AT1 mRNA 电泳条带



注:左起各条带分别为空白组、模型组、西药组、中药高剂量组、中药低剂量组

图 2 各组细胞的 RNA1.5%琼脂电泳

增加,作用于血管紧张素原,刺激血管紧张素 I (Ang I) 分泌增加,Ang I 被 ACE 分解为 Ang II, Ang II 通过自分泌和(或)旁分泌机制作用于 AT1 来活化心肌细胞 G 蛋白与磷脂酰肌醇特异性磷酸酯酶 C 耦联,引起心肌细胞钙离子内流和胞浆内钙离子贮存池释放增加,表现为收缩血管,增强心肌收缩力,并诱导相关蛋白激酶激活,继而诱导蛋白质合成的增加,触发心肌肥大、纤维组织和血管增生。郭志坤等^[5-7]研究证实,Ang II 通过其特异的 AT1 受体介导,参与细胞增殖、迁移,最终导致血管壁及心肌增生肥厚,心室重构。何松坚^[8]、徐建辉^[9]、LI M^[10]、杨艳峰^[11]等人的研究表明,通过抑制肾素-血管紧张素系统过度激活,从而抑制 Ang II 引起的 AT1 mRNA 表达上调,可以阻断心肌肥厚的发生,改善早期心肌纤维化、减轻早期心室重构、改善预后。

慢性心衰属于中医学“心衰”范畴,既往主要根据临床表现分别归属于“心悸、胸痹、喘证、痰饮、水肿”等病证范畴。“心衰”病位在心,与肺、肾、脾关系密切。本病基本病机为“本虚标实,虚实夹杂”,本虚指“心气虚、心阳虚”,标实主要是寒凝、气滞、痰浊、水饮、瘀血。其中,心气亏虚为本病之始,心气亏虚导致气阴两虚,渐至心阳亏虚,阳虚血瘀,心阳虚损,累及肾阳,从而心肾阳虚,阳虚则寒痰凝滞,水湿不行,

痰饮阻肺或阳虚水泛,阴竭阳脱。本病后期总是伴随心阴的损伤或心阴阳两虚。由此可见“益气”与“滋阴”是治疗心衰的两个重要方面,而且心衰患者在长期的治疗过程中因利水消肿及温壮心阳叠进更加耗气伤阴从而导致心气阴亏虚尤甚。心阴(血)亏虚,血不养心,滋生内热,扰动心神;肾阴(精)亏虚,不能上济以“滋心阴、涵心阳”,以致心火内动,扰动心神。所以,可以认为“气阴两虚、心神不宁”是“心衰”中的一个常见证型,故以“益气滋阴,强心安神”立法,组方“强心安神汤”,以期标本同治之功。

本实验研究结果表明:强心安神汤可显著降低大鼠血清的 Ang II 水平,抑制 AT1 mRNA 表达,与西药组及模型组比较差异有统计学意义($P<0.05$),其作用结果无明显量-效依赖关系。本实验为临床应用强心安神汤治疗慢性心衰提供了一定的实验依据,但是,中药复方汤剂组分复杂,煎煮后可能产生更多的变化,因此强心安神汤除了对肾素-血管紧张素系统的影响以外,是否还有更多更重要的作用机制和作用靶点,还有待于进一步临床及实验研究。

参考文献:

- [1] 颜旭,刘春华,蔡光先,等.超微强心安神汤治疗慢性心力衰竭48例疗效观察[J].湖南中医杂志,2011,27(2):1-3.
- [2] 颜旭,刘春华,庄红,等.超微养心安神汤对慢性心力衰竭大鼠神经内分泌因子及心肌组织结构的影响[J].北京中医药,2016,35(7):660-663.
- [3] 李梅秀,田国忠,欧叶涛,等.大鼠阿霉素慢性心衰模型的制备与心衰指标的判定[J].解剖学研究,2005,27(3):176-178.
- [4] RAM CV. Reappraisal of role of angiotensin receptor blockers in cardio-vascular protection[J]. Vasc Health Risk Manag, 2011,7:315-319.
- [5] 郭志坤,武俊芳,单卫华,等.异丙肾上腺素诱导的大鼠肥厚心肌组织中 I、III 型胶原蛋白的表达[J].解剖学报,2012,43(1):93-97.
- [6] 李雅,郭志华,郭慧芳,等.心痛泰对冠心病大鼠肾素-血管紧张素-醛固酮系统及血管重塑的调控作用[J].湖南中医药大学学报,2017,37(9):943-946.
- [7] LORENZO O, RAMIREZ E, PICATOSTE B, et al. Alteration of energy sub-strates and ROS production in diabetic cardiomyopathy[J]. Mediators of Inflammation, 2013,2013:461967.
- [8] 何松坚,吴铿,游琼,等.厄贝沙坦联合缺血后适应对糖尿病大鼠缺血再灌注损伤早期心肌纤维化及心室重构的影响[J].临床医学工程,2015,22(3):279-282.
- [9] 徐建辉,杨波.姜黄素对心力衰竭大鼠心脏 AT1 受体表达的影响[J].实用预防医学,2015,22(9):1069-1072.
- [10] LI M, ZHENG C, KAWADA T, et al. Adding the acetylcholinesterase inhibitor, donepezil, to losartan treatment markedly improves long-term survival in rats with chronic heart failure[J]. European Journal of Heart Failure, 2014, 16(10):1056-1065.
- [11] 杨艳峰,王献民,李焰,等.AT1受体拮抗剂和ACEI对大鼠心肌肥厚时 AT1 mRNA 表达的影响[J].中国当代医药,2013,20(27):4-6.

(本文编辑 杨瑛)