

参葵通脉颗粒对慢性心衰心肌重塑及 TGF- β 1、p-Smad3 表达影响的实验研究

潘海敏 严士海 周仲瑛 李七一

(南京中医药大学附属医院, 江苏南京 210029)

摘要 目的:探讨参葵通脉颗粒治疗慢性心衰(CHF)的可能作用机制。方法:SD大鼠采用腹主动脉缩窄法制备慢性心衰模型,造模成功的大鼠随机分为模型组、阳性药(盐酸贝那普利)组和参葵通脉颗粒低、中、高剂量组,另以10只仅游离腹主动脉不缩窄的大鼠为假手术组。各组大鼠灌胃给予相应药物,模型组和假手术组灌胃等容积蒸馏水,每日1次,各组均干预4周。干预结束后采用生理多导仪检测各组大鼠血流动力学指标;分离大鼠左心室,称重,计算左心室指数(LVMI);马松(Masson)染色检测心肌纤维化情况;免疫印迹(western blot)检测各组大鼠心肌转化生长因子- β 1(TGF- β 1)、p-Smad3蛋白表达。结果:与假手术组比较,模型组大鼠左心室舒张期末压(LVEDP)显著升高,左心室内压最大上升及下降速率(\pm dp/dt max)显著降低($P<0.05$);与模型组比较,参葵通脉颗粒各剂量组LVEDP显著降低,+dp/dt max、-dp/dt max显著升高($P<0.05$);参葵通脉颗粒高剂量对上述指标的改善明显优于阳性药物($P<0.05$)。假手术组大鼠心肌细胞排列整齐,形态正常;模型组大鼠心肌纤维排列紊乱,大量条状、束状胶原纤维增生;各给药组大鼠心肌细胞轻度肥大,肌细胞排列较整齐,有少量胶原纤维增生。模型组LVMI和胶原容积指数明显高于假手术组;各给药组上述指标均较模型组显著降低($P<0.05$)。与假手术组比较,模型组大鼠心肌组织TGF- β 1、p-Smad3蛋白表达水平显著升高($P<0.05$);与模型组比较,参葵通脉颗粒各剂量组TGF- β 1、p-Smad3蛋白表达水平显著下降($P<0.05$)。结论:参葵通脉颗粒对CHF心肌重塑具有良好的改善作用,且可以减少心肌组织TGF- β 1、p-Smad3蛋白的表达,这可能是其治疗CHF的机制之一。

关键词 慢性心衰 参葵通脉颗粒 心肌 SD大鼠 实验研究 血流动力学 心肌转化生长因子- β 1、p-Smad3蛋白表达

中图分类号 R541.610.5 **文献标志码** A **文章编号** 1672-397X(2018)09-0075-04

基金项目 全国名老中医药传承工作室建设项目(2012);国家中医药管理局中医药科学技术研究专项(04-05-LP25);江苏省中医院博士基金项目(Y17019)

慢性心衰(chronic heart failure, CHF)是多种心脏疾病导致的心脏结构或功能异常,使心室充盈或泵血障碍,以乏力、呼吸困难和液体潴留为主要临床表现的复杂综合征。CHF发病率高、预后差,当前全世界CHF患者数量高达2250万,并且正以每年200万左右的速度快速增长^[1-2]。中医药在稳定CHF患者病情、降低住院率、提高生活质量等方面表现出越来越多的优势。参葵通脉颗粒是项目组传承国医大师周仲瑛教授治疗CHF的临床经验而创制的医院制剂,前期临床研究结果显示参葵通脉颗粒治疗CHF安全、有效,能改善心功能,抗氧化应激^[3]。本研究建立慢性心衰动物模型,观察参葵通脉颗粒对CHF模型大鼠心肌重塑的影响,探索其可能的作用机制,为其进一步开发应用提供实验依据。

1 实验材料

1.1 实验动物 12周龄SPF级雄性SD大鼠100只,体重(220 \pm 20)g,扬州大学实验动物中心提供。饲养环境:江苏省药理实验室SPF动物饲养室,室温(22 \pm 2) $^{\circ}$ C,常规饲料喂养,自由饮水,12h/12h光照/黑夜,室温22~24 $^{\circ}$ C,相对湿度40%~50%。适应性饲养1周后进行实验。

1.2 药物与试剂 参葵通脉颗粒,药物组成:炙黄芪20g,灵芝20g,仙灵脾10g,桂枝10g,丹参10g,黄蜀葵10g,茯苓10g,陈皮6g。先取桂枝、陈皮置减压浓缩罐中,加6倍量水,蒸馏提取,收集挥发液,备用。滤取多余煎液,另存备用。余下六味药,与上两味药渣合并,置多功能提取罐中,加水煎煮2次。第1次加10倍量水,浸泡0.5h,煎煮1h;第2次加8倍量水,煎煮1h。合并煎液,滤过,滤液浓

缩至相对密度为1.20~1.22 (70~75℃热测)的清膏,备用。挥发液二次蒸馏,收集挥发油。挥发油以乙醇溶解后,加入至 β -环糊精的饱和水溶液中,搅拌3h,0~4℃冷藏过夜,抽滤,收集滤饼,40℃干燥,即得包合物。另取糊精适量加入包合物,与清膏采用流化床制粒,70℃干燥,制成颗粒,即得,批号:20171012。阳性药:盐酸贝那普利(洛汀新),北京诺华制药有限公司生产,批号:X2632。全蛋白抽提试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司,GP250),Bradford蛋白含量检测试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司,KGA801),SDS-PAGE凝胶配制试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司,KGP113),二抗(羊抗兔IgG,南京凯基生物科技发展有限公司,KGAA35)。

1.3 主要仪器 成都泰盟HX-300S动物呼吸机;CS-SP5激光扫描共聚焦显微镜(德国LEI-CA);164-5051 Western电泳仪(美国Bio-Rad);UV-2540分光光度计(SHIMAZDH);66485NC(PALL),XBT-1医用X射线胶片(美国柯达),SH03014型低温离心机(美国科俊仪器公司)。

2 实验方法

2.1 造模、分组与给药 参考课题组前期实验方法^[4],采用腹主动脉缩窄法建立大鼠慢性心衰模型,使大鼠腹主动脉直径减少40%~60%。另取同源SD大鼠作为假手术组,该组仅游离腹主动脉但不缩窄,其他操作与造模组相同。各组大鼠手术后每日腹腔注射青霉素 8×10^4 U/只,1次/d,连续3d,预防感染。造模成功的大鼠随机分为模型组、阳性药(盐酸贝那普利)组和参葵通脉颗粒低、中、高剂量组。造模8周后,根据分组,每日给予相应药物灌胃,10mL/kg体重,给药周期4周。假手术组与模型组灌胃蒸馏水;参葵通脉颗粒低、中、高剂量组分别予参葵通脉颗粒4.32g生药/kg、8.64g生药/kg和17.28g生药/kg,剂量分别为人临床等效剂量的1/2、1和2倍;阳性药组灌胃盐酸贝那普利0.9mg/kg,剂量为人临床等效剂量。

2.2 指标检测

2.2.1 大鼠行为体征和死亡情况 每日定时观察大鼠的生存状态,如进食、进水、体重、呼吸、活动、精神、大小便和皮毛等。

2.2.2 心功能检测 禁食不禁水过夜,末次灌胃后2h,称重,1.0%戊巴比妥液(40mg/kg)腹腔内注射麻醉,仰卧且四肢固定于手术台,常规备皮、消毒。切开颈正中皮肤,分离气管并插管,连

接成都泰盟HX-300S动物呼吸机。钝性分离右颈动脉,插入充满肝素生理盐水的PE-50聚乙烯导管,缓缓插入至心室腔,另一端接压力换能器输入生理多道仪系统,记录大鼠左心室舒张期末压(LVEDP),左心室内压最大上升及下降速率($\pm dp/dt \max$)。

2.2.3 左室质量指数、心肌胶原容积分数 测完血流动力学后,迅速开胸取出心脏,冰生理盐水洗净,滤纸吸干,沿房室沟剪掉两心房,剪掉主、肺动脉,紧贴室间隔右侧剪下右心室游离壁,剩余部分即为左心室。称取左心室质量(mg),计算左心室质量/体质量,即左室质量指数(LVMI)。于左心室中部沿横轴切取0.5cm厚的心肌组织置于4%多聚甲醛中以备包埋,切片厚度 $4 \mu\text{m}$,用于染色。其余左心室组织切成小块包于无菌锡纸并立即放入液氮速冻24h后置-80℃贮藏,用于Western blot检测。标本应用改良的Masson三色套染法,观察心肌纤维化情况。随机选取5个不含血管视野,IPP 6.0图像分析系统计算每个视野中胶原组织所占面积百分比,取均数代表胶原面积,计算心肌胶原容积分数。

2.2.4 western blot检测心肌转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)、p-Smad3表达 严格按试剂盒提示提取心脏总蛋白,采用BCA法定量蛋白。取40mg蛋白,加入缓冲液变性,进行SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳,将蛋白转移至PVDF膜,染色观察条带,TBST洗膜,5%脱脂牛奶TBST封闭1.0h,分别加兔抗大鼠TGF- $\beta 1$ 、p-Smad3单克隆抗体室温孵育2h,TBST洗膜,加二抗反应1h,TBST洗膜,ECL发光试剂发光。采用凝胶图像分析软件进行吸光度扫描,将TGF- $\beta 1$ 、p-Smad3蛋白条带的吸光度与 β -actin比值作为信号强弱比较。

2.3 统计学方法 将所有数据输入SPSS 17.0分析软件包中,计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 动物大体状态 模型组大鼠一般情况差,表现为皮毛不洁,活动度差,呼吸急促,怕冷,挤作一团,足趾部皮肤颜色发紫,肢体头面部水肿。各用药组大鼠症状相对模型组减轻。

3.2 各组大鼠血流动力学参数比较 结果见表1。

3.3 各组大鼠LVMI、胶原容积指数比较 结果见表2。在对LVMI的改善方面,各给药组之间比较,差

异无统计学意义 ($P>0.05$);在对胶原容积指数的改善方面,阳性药物和参葵通脉颗粒中、高剂量明显优于参葵通脉颗粒低剂量 ($P<0.05$)。

3.4 各组大鼠心肌形态比较 结果见图1。假手术组大鼠心肌细胞排列整齐,形态正常,胶原容积指数低。模型组大鼠心肌纤维排列紊乱,大量条状、束状胶原纤维增生,胶原容积指数显著增加 ($P<0.05$)。各给药组大鼠心肌细胞轻度肥大,肌细胞排列较整齐,有少量胶原纤维增生。

3.5 各组大鼠心肌组织 TGF- β 1、p-Smad3 蛋白表达比较 见表3、图2。

4 讨论

参葵通脉颗粒方中炙黄芪与灵芝共为君药,补心气,安心神。炙黄芪益气养元、扶正祛邪、养心通脉、健脾利湿,为心衰之时补气之要药^[5]。灵芝补气安神、止咳平喘、延年益寿,用于心神不宁,失眠心悸,肺虚咳喘,虚劳短气,不思饮食^[6]。淫羊藿与桂枝共为臣药。《本草纲目》记载“淫羊藿味甘气香,性温不寒,能益精气……真阳不足者宜之”,正合心衰时心肾阳虚,失于温运的病机^[7]。桂枝既可温扶脾阳以助运水,又可温肾阳、逐寒邪以助膀胱气化,而祛水湿痰饮之邪^[8]。丹参、黄蜀葵花、茯苓养血活血利水为佐。心衰之时,心肾阳气亏虚,不能推动血液运行,血脉不利,水饮内停。丹参活血祛瘀、安神宁心,黄蜀葵花利尿通淋、活血、止血、消肿解毒;茯苓通过健运脾肺功能达到渗湿利水、宁心安神的功效。诸药合用有行瘀血而新血不伤,养新血而瘀血不滞之功效。陈皮功在理气健脾、

表1 各组大鼠血流动力学参数比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	LVEDP (mmHg)	+dP/dt Max (mmHg/s)	-dP/dt Min (mmHg/s)
假手术组	8	3.06±0.64	4065.96±187.31	3328.88±165.85
模型组	8	17.14±1.65*	2094.12±242.53*	1566.19±178.49*
阳性药组	8	7.95±0.49 [#]	2795.30±210.49 [#]	2749.80±200.10 [#]
参葵通脉颗粒低剂量组	8	14.67±2.49 ^{#Δ▲□}	2559.93±212.76 ^{#Δ▲□}	1995.88±152.63 ^{#Δ▲□}
参葵通脉颗粒中剂量组	8	7.34±1.01 [#]	3062.74±297.72 [#]	2890.43±221.48 [#]
参葵通脉颗粒高剂量组	8	6.48±1.14 ^{#Δ}	3286.44±112.90 ^{#Δ}	2992.60±163.48 ^{#Δ}

注:与假手术组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$;与阳性药组比较,Δ $P<0.05$;与参葵通脉颗粒中剂量组比较,▲ $P<0.05$;与参葵通脉颗粒大剂量组比较,□ $P<0.05$ 。

表2 各组大鼠LVMI、胶原容积指数比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	LVMI (mg/g)	胶原容积指数(%)
假手术组	8	1.93±0.15	1.65±0.73
模型组	8	2.52±0.24*	16.49±3.37*
阳性药组	8	2.01±0.10 [#]	4.31±1.12 [#]
参葵通脉颗粒低剂量组	8	2.09±0.14 [#]	6.10±0.68 [#]
参葵通脉颗粒中剂量组	8	2.01±0.18 [#]	4.83±1.20 [#]
参葵通脉颗粒高剂量组	8	1.97±0.15 [#]	3.92±0.52 [#]

注:与假手术组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$ 。

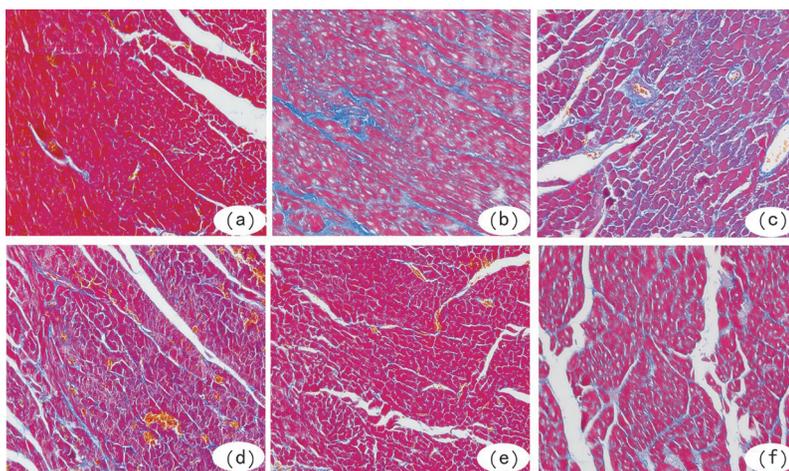


图1 各组大鼠心肌细胞形态(masson染色,×200)

(a.假手术组;b.模型组;c.参葵通脉颗粒低剂量组;d.参葵通脉颗粒中剂量组;e.参葵通脉颗粒高剂量组;f.阳性药组)

表3 各组大鼠心肌组织TGF- β 1、p-Smad3表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	TGF- β 1/ β -actin	p-Smad3/ β -actin
假手术组	3	0.29±0.07	0.19±0.05
模型组	3	1.11±0.15*	0.85±0.12*
阳性药组	3	0.26±0.08 [#]	0.31±0.06 [#]
参葵通脉颗粒低剂量组	3	0.51±0.08 [#]	0.42±0.08 [#]
参葵通脉颗粒中剂量组	3	0.48±0.05 [#]	0.40±0.05 [#]
参葵通脉颗粒高剂量组	3	0.25±0.09 [#]	0.32±0.07 [#]

注:与假手术组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$ 。

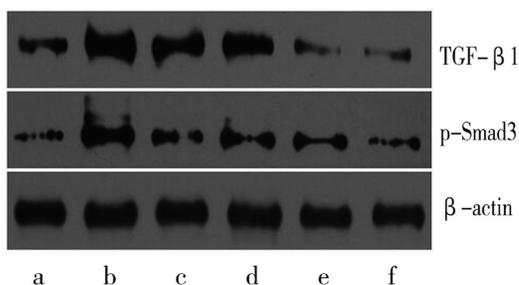


图2 各组大鼠心肌组织TGF-β1、p-Smad3表达

(a.假手术组; b.模型组; c.参葵通脉颗粒低剂量组; d.参葵通脉颗粒中剂量组; e.参葵通脉颗粒高剂量组; f.阳性药组)

燥湿化痰,用于心衰之时水湿困脾之脘腹胀满,改善胃肠蠕动,促进诸药吸收,为佐助药。纵观全方补气温阳,药力强劲,扶助正气,配合活血利水,因势利导,祛邪养正。诸药合用,攻补兼施,扶正不留邪,祛邪不伤正,为促进心衰之时泵功能恢复的重要药物。

本研究结果表明,与模型组比较,参葵通脉颗粒各组LVEDP显著降低,+dp/dt max、-dp/dt max显著升高,提示参葵通脉颗粒对CHF具有良好的治疗作用。参葵通脉颗粒中剂量、高剂量的改善作用优于低剂量,高剂量改善作用优于阳性药,中剂量与阳性药改善作用相当。LVMI结果显示,参葵通脉颗粒可以改善CHF大鼠的心肌重塑。进一步的Masson染色验证参葵通脉颗粒可以降低CHF大鼠的心肌纤维化程度。

CHF发生、发展的重要的病理学机制是心肌重塑,在组织水平上呈现出纤维化的病理改变^[9]。TGF-β1是一类功能广泛、作用复杂的生长因子,在心肌重塑过程中,TGF-β1通过Smad3信号途径调节细胞外基质等,促进心肌纤维化^[10-11]。本实验结果显示,参葵通脉颗粒能够显著抑制慢性心衰模型大鼠心肌组织中TGF-β1、p-Smad3的表达,降低心肌纤维化水平,减轻心肌重塑。后续研究将采用心肌细胞体外实验与基因沉默等方法进一步验证参葵通脉颗粒改善CHF心肌重塑的靶点。

参考文献

[1] SHIMOKAWA H, MIURA M, NOCHIOKA K, et al. Heart failure as a general pandemic in Asia[J]. Eur J Heart Fail, 2015, 17 (9): 884.
 [2] 秦晓毅, 卢新政. 2010年NICE慢性心力衰竭诊治指南更新的解读[J]. 心血管病学进展, 2011, 32 (4): 490.
 [3] 严士海, 王道成, 沈竹阳, 等. 参葵通脉颗粒治疗慢性心力衰竭310例临床观察[J]. 中医杂志, 2018, 59 (4): 316.

[4] 苗梦露, 李七一, 严士海, 等. 抗心衰颗粒对舒张性心衰大鼠RAAS及心肌细胞内TGF-β1的影响[J]. 南京中医药大学学报, 2013, 29 (3): 247.
 [5] 雍玉琴, 高军太. 黄芪在慢性心力衰竭治疗中的应用[J]. 中医临床研究, 2017, 9 (14): 48.
 [6] 张焱, 张盛健, 吴佳杰. 何立人冠状动脉粥样硬化性心脏病介入术后用药规律研究[J]. 河南中医, 2014, 34 (6): 1054.
 [7] 蔡辉, 蔡佳宇, 陆乐, 等. 淫羊藿总黄酮对心力衰竭大鼠心肌一氧化氮水平的影响[J]. 江苏医药, 2010, 36 (17): 2054.
 [8] 张艳, 礼海, 张文, 等. 桂枝在心血管疾病中的应用体会[J]. 中华中医药学刊, 2010, 28 (6): 1146.
 [9] BRIASOULIS A, ANDROULAKIS E, CHRISTOPHIDES T, et al. The role of inflammation and cell death in the pathogenesis, progression and treatment of heart failure[J]. Heart Fail Rev, 2016, 21 (2): 169.
 [10] ZHANG F, DANG Y, LI Y, et al. Cardiac Contractility Modulation Attenuate Myocardial Fibrosis by Inhibiting TGF-β1/Smad3 Signaling Pathway in a Rabbit Model of Chronic Heart Failure[J]. Cell Physiol Biochem, 2016, 39 (1): 294.
 [11] LU Y, LIU J J, BI X Y, et al. Pyridostigmine ameliorates cardiac remodeling induced by myocardial infarction via inhibition of the transforming growth factor-β1/TGF-β1-activated kinase pathway[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2014, 63 (5): 412.

第一作者: 潘海敏 (1982—), 女, 本科学历, 主管中药师, 中药药理学专业。

通讯作者: 严士海, 博士, 副主任中药师。 sea-y@qq.com

收稿日期: 2018-03-24

编辑: 吴宁

