

· 基础研究 ·

次乌头碱、甘草苷及甘草次酸配伍对慢性心力衰竭大鼠的心肾保护作用研究

付楠¹ 周惠芬¹ 何昱² 万浩芳² 万海同¹ 虞立¹ 王利勤¹ 杨洁红³

摘要 目的 研究附子、甘草三种有效成分次乌头碱、甘草次酸、甘草苷配伍对慢性心力衰竭大鼠的心肾保护作用。**方法** 应用主动脉弓缩窄术(TAC)建立慢性心力衰竭模型,将大鼠随机分为假手术组、模型组、阳性对照组(1 mg/kg,地高辛组)、次乌头碱组(2.07 mg/kg)、次乌头碱(2.07 mg/kg) + 甘草苷(20 mg/kg) + 甘草次酸(25 mg/kg)配伍组(三药合用组),每组 8 只,各治疗组连续灌胃给药 1 周。干预结束 6 h 后检测各组大鼠的超声心动图指标室间隔的厚度(IVSd)、左室后壁厚度(LVPWd)、左心室质量(LVMass)、左室短轴缩短率(FS)、左室射血分数(EF);腹主动脉取血后,取心、肾称重。酶联免疫法检测血浆中血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)的含量变化;全自动生化检测仪检测血清 BUN、SCr 含量变化;HE 染色评估心脏病理损伤情况;HE 染色和 Masson 染色评估肾小球肾小管损伤情况以及肾间质纤维化程度。**结果** 与模型组比较,三药合用组超声心动图指标 IVSd、LVPWd、LVMass、FS、EF 降低($P < 0.01$, $P < 0.05$),BUN、SCr、AngⅡ浓度以及单侧肾比重降低($P < 0.01$, $P < 0.05$),心、肾组织的病理损伤有明显改善。与次乌头碱组比较,三药合用组 FS、EF、BUN、SCr、AngⅡ浓度降低($P < 0.05$),心、肾组织的病理损伤有改善。**结论** 慢性心力衰竭可导致肾脏损伤,次乌头碱、甘草次酸、甘草苷配伍对慢性心力衰竭引起的左心室肥大、心功能障碍以及肾功能损伤有拮抗作用,三药合用的保护作用显著强于次乌头碱。

关键词 慢性心力衰竭;次乌头碱;甘草苷;甘草次酸;配伍

Protective Effects of Hypaconitine Combined with Glycyrrhetic Acid and Glycyrrhizin on Heart and Kidney in Rats with Chronic Heart Failure FU Nan¹, ZHOU Hui-fen¹, HE Yu², WAN Hao-fang², WAN Hai-tong¹, Yu Li¹, Wang Li-qin¹, and YANG Jie-hong³ 1 Institute of Cardiovascular and Cerebrovascular Disease, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou(310053); 2 College of Pharmacy, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou(310053); 3 College of Basic Medicine, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou(310053)

ABSTRACT Objective To investigate the protective effects on heart and kidney of the combination of hypaconitine, glycyrrhetic acid and glycyrrhizin which are the active ingredients of *Aconitum car-michaelii* and *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. On chronic heart failure rats. **Methods** Chronic heart failure model was established by aortic arch narrowing (TAC). The rats were randomly divided into five groups ($n=8$), including sham-operated group, model group, positive control group (1 mg/kg), hypaconitine group (2.07 mg/kg) and the group of the combination of hypaconitine (2.07 mg/kg), glycyrrhetic acid (25 mg/kg) and glycyrrhizin (20 mg/kg), each treatment group was intragastrically administered for one week. The echocardiographic parameters of rats in each group, such as IVSd, LVPWd, LVMass, FS, and EF were detected at 6 hours after intervention. The heart and kidney were taken to weigh after removing the abdominal aortic blood. Enzyme linked immunosorbent assay was used to detect the content of plasma AngiotensinⅡ (AngⅡ), using the automatic biochemical detection instrumentation to detect the

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81473412);浙江省卫生高层次创新人才培养工程项目(No.浙卫发[2016]6号)

作者单位:1. 浙江中医药大学心脑血管病研究所(杭州 310053); 2. 浙江中医药大学药学院(杭州 310053); 3. 浙江中医药大学基础医学院(杭州 310053)

通讯作者:杨洁红, Tel: 0571-86613711, E-mail: whtong@126.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20180104.005

changes of BUN and SCr content in serum, Hematoxylin and eosin (HE) staining was used to evaluate the pathological changes of the heart, evaluating Glomerular and tubular damage as well as the degree of renal interstitial fibrosis through HE and Masson stain. Results Compared with the model group, three drug combined group could reduce the echocardiographic indexes IVSd, LVPWd, LVMass, FS, EF ($P < 0.01$, $P < 0.05$), the concentration of BUN, SCr, Ang II and the proportion of unilateral kidney decreased ($P < 0.01$, $P < 0.05$), the heart and kidney tissue pathological damage were significantly improved. Compared with the hypaconitine group, the three drug combined group could significantly reduce the FS, EF and BUN, SCr, Ang II concentration ($P < 0.05$), the heart and kidney tissue pathological lesions were improved. Conclusions Chronic heart failure can lead to kidney damage. The combination of hypaconitine, glycyrrhetic acid and glycyrrhizin has antagonistic effects on left ventricular hypertrophy, cardiac dysfunction and renal function impairment caused by chronic heart failure, the protective effects of the three drugs combination is significantly stronger than hypaconitine.

KEYWORDS chronic cardiac failure; hypaconitine; glycyrrhetic acid; glycyrrhizin; compatibility

慢性心力衰竭是各类心脏疾病的终末阶段,其主要表现为心脏收缩舒张功能不全、射血功能障碍、心脏结构改变等^[1],主动脉弓缩窄术(transverse aortic constriction, TAC)是通过压力超负荷引起的心脏肥厚常用的手术方法^[2],可以引起心脏机械性的压力超负荷,最终导致慢性心力衰竭等病理性疾病,具有良好的模型稳定性,故本实验采用 TAC 建立大鼠慢性心力衰竭模型进行研究。

附子因其回阳救逆之功备受名家青睐,然其药效峻猛,有大毒,故常配伍甘草入方,以缓其药性,解其毒性,该药对常出现在心力衰竭等心血管疾病的治疗方中。近年来对附子甘草药对研究很多,但对其主要有效成分研究较少,本实验选取两者的主要有效成分进行实验研究。实验研究表明附子中二萜生物碱类次乌头碱具有强心抗炎等作用^[3,4]以及甘草中的黄酮类甘草次酸和甘草苷具有保护心脏等作用^[5,6],本实验选取这三种主要有效成分对慢性心力衰竭的大鼠进行体内药效学研究,初步探讨附子甘草配伍“增效”药理学作用机制。

材料与方法

1 实验动物 SPF 级 6 周龄雄性 SD 大鼠,体重(190 ± 20) g,由浙江中医药大学实验动物中心提供;许可证号:SYXK(浙)2013-184。本实验方案经浙江中医药大学实验动物伦理委员会审核,符合动物福利伦理要求, No. ZSLL-2016-23。

2 药物与试剂 甘草苷(25 mg/瓶,批号:20150919,纯度 98%,宝鸡市金台区辰光生物有限公司);甘草次酸(25 mg/瓶,纯度 98%,批号:20160307,宝鸡市金台区辰光生物有限公司);次乌头碱(20 mg/瓶,纯度 98%,批号:20160331,宝鸡市

金台区辰光生物有限公司);地高辛片(0.25 mg/片,批号:020140206,上海信谊药厂有限公司);SCr 测试试剂盒(批号:16021601,宁波美康生物科技股份有限公司);BUN 检测试剂盒(批号:16011401,宁波美康生物科技股份有限公司);Ang II 试剂盒(批号:E20160401A,上海源叶生物科技有限公司)。

3 仪器 LDZ5-2 低温离心机(北京医用离心机厂);Millipore Simplicity 纯水仪(美国 Millipore 公司);Molecular Devices Spectra MAX Plus 384 酶标仪(美国 MD 公司);小动物麻醉呼吸机(美国 Hallowell 公司);Vevo2100 小动物超声影像系统(加拿大 VisualSonics 公司);3316 全自动生化分析仪(日本东芝公司)。

4 动物造模与分组

4.1 慢性心力衰竭模型制备 造模方法参照参考文献[2],SD 大鼠术前禁食 12 h,自由饮水。将大鼠随机分为假手术组($n = 8$)和手术组($n = 32$)。将大鼠左胸前剃毛放入麻醉机,用戊巴比妥钠呼吸麻醉,在冷光源下进行气管插管后固定于恒温手术板上并连接呼吸机。碘伏消毒手术区,并于大鼠第二三肋间逐层开胸,分离主动脉弓后用 3-0 号手术缝合线穿过主动脉弓备用,将直径为 0.9 mm 的“L”型针平行置于主动脉弓上,并用缝合线系紧后轻轻抽出“L”型针。逐层缝合胸腔并消毒创口。术后 3 天每天肌肉注射 100 000 IU 青霉素,并记录动物的生理状况。1 个月后造模完成,手术期间以及术后 1~3 天共死亡 10 只,替补造模 10 只,成功率为 76.19%。假手术组除缩窄主动脉弓步骤外,其余操作同前。

4.2 实验分组及干预方法 将造模完成的大鼠根据随机数字表分成假手术组、模型组、地高辛组(地

高辛, 1 mg/kg)、次乌头碱组(次乌头碱, 2.07 mg/kg)和三药合用组(次乌头碱 2.07 mg/kg, 甘草酸 25 mg/kg, 甘草苷 20 mg/kg), 每组 8 只。干预方法参照文献[7], 在 TAC 4 周后, 各组大鼠按上述剂量连续灌胃给药 7 天, 假手术组和模型组每天灌胃等量生理盐水。

5 检测指标及方法

5.1 超声心动图检测 干预结束禁食 6 h 后称重, 将其放入动物麻醉机中用异氟烷进行呼吸麻醉, 胸前脱毛处理, 固定于超声检测台上进行超声心动图检测, 测量指标包括: 室间隔的厚度(left ventricular end-diastolic interventricular septal thickness, IVSd)、左室后壁厚度(left ventricular end-diastolic posterior wall thickness, LVPWd)、左心室质量(left ventricular mass, LVMass)、左室短轴缩短率(fractional shortening, FS)、左室射血分数(ejection fraction, EF)。

5.2 血清中 SCr、BUN 浓度测定 大鼠经超声测定 24 h 后用 10% 水合氯醛(3.5 mL/kg)进行麻醉, 腹主动脉取血 6 mL, 分别置于普通 EP 管和加入抗凝剂肝素钠的 EP 管, 4℃、3 000 r/min 条件下离心 10 min, 得上层血清和血浆, 全自动生化分析仪测定 SCr、BUN 含量。

5.3 血浆中 AngII 浓度测定 根据本实验 5.2 方法得到的血浆样本, 采用 AngII ELISA 试剂盒检测血浆中 AngII 的含量, 严格按照试剂盒说明书进行操作。

5.4 心、肾组织病理学观察 腹主动脉采血后, 10% 水合氯醛(5 mL/kg)过量麻醉处死大鼠, 立即摘取大鼠心、肾, 用 4℃ 生理盐水洗净并用吸水纸吸取多余水分, 电子分析天平称量后, 10% 中性福尔马林中固定。将固定好的心、肾组织石蜡包埋后切成 4~6 μm 的薄片。心脏组织切片 HE 染色, 400 倍镜下观察心肌细胞形态、心肌纤维等。肾脏组织切片进行 HE 和 Masson 染色, 400 倍镜下观察肾脏形态及结构的改变和胶原纤维沉积的情况。

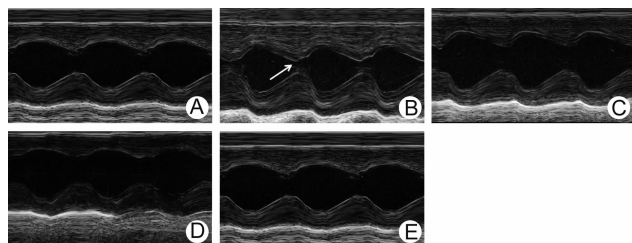
5.5 单侧肾比重 比较各组的单侧肾比重数值, 计算公式: 单侧肾比重(%) = (单侧肾重 × 10³/体重) × 100%

6 统计学方法 采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析, 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

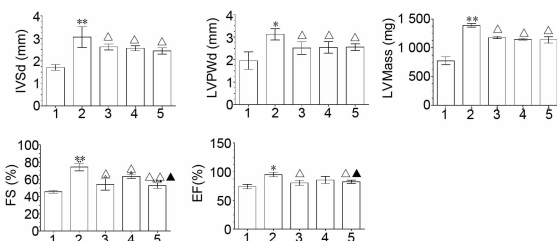
1 各组超声心动图检测结果比较(图 1、2) 与

假手术组比较, 模型组 IVSd、LVPWd、LVMass、FS、EF 均升高(P < 0.01, P < 0.05)。与模型组比较, 地高辛组及三药合用组 IVSd、LVPWd、LVMass、FS、EF 均降低(P < 0.01, P < 0.05); 次乌头碱组 IVSd、LVPWd、LVMass、FS 降低(P < 0.05)。与次乌头碱组比较, 三药合用组 EF 和 FS 下降(P < 0.05)。



注:A 为假手术组;B 为模型组;C 为地高辛组;D 为次乌头碱组;E 为三药合用组;白色箭头表示舒张期室间隔厚度减小

图 1 各组大鼠超声心动图比较



注:1 为假手术组;2 为模型组;3 为地高辛组;4 为次乌头碱组;5 为三药合用组;与假手术组比较,*P < 0.05,**P < 0.01;与模型组比较,△P < 0.05,△△P < 0.01;与次乌头碱组比较,▲P < 0.05;下同

图 2 各组大鼠超声心动图指标比较

2 各组 SCr、BUN 比较(图 3) 与假手术组比较, 模型组 SCr 和 BUN 含量升高(P < 0.01)。与模型组比较, 地高辛组、次乌头碱组及三药合用组 SCr、BUN 含量降低(P < 0.01, P < 0.05)。与次乌头碱组比较, 地高辛组及三药合用组 SCr 和 BUN 降低(P < 0.05)。

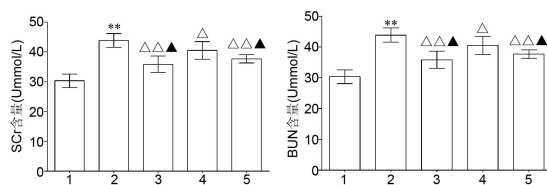


图 3 各组 SCr、BUN 比较

3 各组 Ang II 含量比较(图 4) 与假手术组比较, 模型组 Ang II 浓度升高(P < 0.01)。与模型组比较, 地高辛组、次乌头碱组和三药合用组 Ang II 含量

降低($P < 0.01$)。与次乌头碱组比较,地高辛组及三药合用组 Ang II 含量降低($P < 0.05$)。

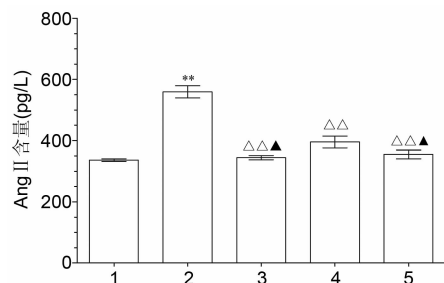
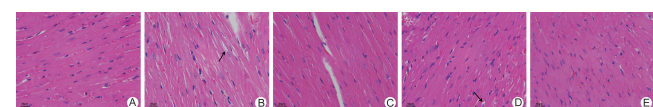


图4 各组 Ang II 含量比较

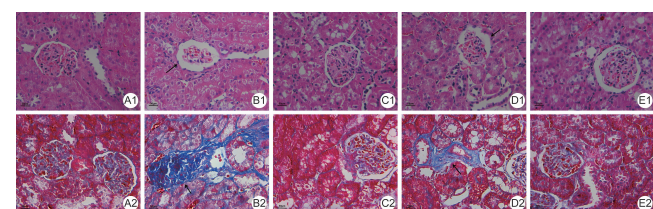
4 各组大鼠心肌组织病理形态结果比较(图5) 假手术组的心肌细胞排列整齐紧密,大小均匀,胞浆饱满,细胞核呈椭圆形位于细胞中间。模型组的心肌细胞排列紊乱,细胞变大,边缘模糊,细胞间质出现空泡,心肌细胞部分溶解。地高辛组与三药合用组均无明显病理性改变。次乌头碱组心肌细胞基本正常,偶见坏死心肌细胞。



注:A 为假手术组;B 为模型组;C 为地高辛组;D 为次乌头碱组;E 为三药合用组;箭头表示心肌细胞部分溶解,细胞间质出现空泡

图5 各组大鼠心肌组织病理形态结果 (HE, × 400)

5 各组肾脏组织病理学结果比较(图6) 假手术组肾小球基底膜完整,系膜基质无增生,间质未见炎细胞浸润;肾小球肾小管均正常,未见纤维化病变。模型组肾小球基底膜增厚,系膜基质增生,少数伴有局灶性坏死,肾小管上皮细胞水肿,并有部分脱落;出现大量的肾小管间质纤维化现象,肾小管间质出现大量胶原纤维沉积。次乌头碱组略见少量肾小球基底膜增厚;少量胶原纤维沉积。三药合用组无明显病理学改



注:A 为假手术组;B 为模型组;C 为地高辛组;D 为次乌头碱组;E 为三药合用组;1 为 HE 染色;2 为 Masson 染色;B1 黑色箭头表示肾小球基底膜增厚;D2 黑色箭头表示肾小管间质胶原纤维沉积

图6 各组大鼠肾脏组织病理学结果 (×400)

变;肾小球肾小管基本完整,未见明显间质纤维化现象。

6 各组大鼠单侧肾比重比较(图7) 与假手术组比较,模型组的单侧肾比重升高($P < 0.05$)。与模型组比较,地高辛组及三药合用组单侧肾比重降低($P < 0.05$)。

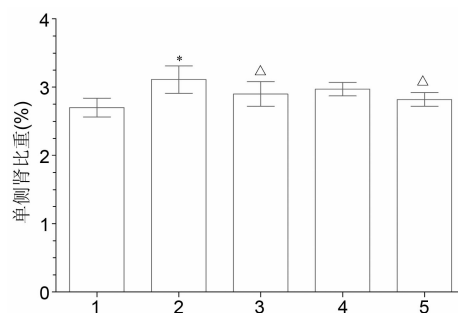


图7 各组大鼠单侧肾比重比较

讨 论

中医学认为慢性心力衰竭属于“怔忡”、“水肿”、“痰饮”等范畴,周宜轩认为该病为本虚标实之证,以心肾阳虚为主^[8],景岳有言:“心本乎肾,所以上不宁者,未有不由乎下,心气虚者,未有不因乎精”,心阳久虚,不能下温肾水,肾水不温则气化失司,不能上济以濡养心阳,而肾阳衰虚则不能温煦心阴,心肾阴阳失衡,则气血凝滞,故该病应以温补心肾阳气为主,方能标本兼治。中医药在慢性心力衰竭的治疗上有着显著优势^[9,10],附子、甘草具有显著的强心作用^[11],现代临床^[12]以及实验研究^[13]发现肾功能指标在慢性心力衰竭的疾病发生过程以及治疗过程中有重大的意义,本实验也是基于这一点展开,意在通过这三种有效成分对于慢性心力衰竭大鼠的心肾功能的影响来探讨附子甘草配伍“增效”的药理学机制。

实验中应用超声心动图以及病理组织学检查等手段检测其心脏结构改变以及评估心功能受损程度^[14,15],而慢性心力衰竭的病理过程机制与肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)密切相关^[16],Ang II 则是 RAAS 系统主要效应物。血清 SCr 和 BUN 的含量是反映肾功能损伤的标志物,在一定程度上可以反映肾小球滤过功能的损害程度以及作为基础肾功能的评估^[17],而肾脏的 HE 和 Masson 染色可以直观反映肾脏组织的病理变化。

本实验研究显示,大鼠在通过 TAC 成功建立了慢性心力衰竭模型后,其肾脏有一定的病理性损伤表现,说明慢性心力衰竭的病程发展与肾功能有关联。实验

结果表明附子甘草有效成分次乌头碱、甘草次酸及甘草苷配伍使用相对于次乌头碱单体使用能更为有效改善慢性心力衰竭大鼠的 IVSd、LVPWd 等超声心动图指标,以及保护心肌组织的病理学病变,有拮抗左心室肥大以及保护心肌组织的作用。能有效降低血浆中 Ang II 浓度,对 RAAS 有调节作用。能有效降低血清中肾功能生化指标 SCr 和 BUN 含量,降低单侧肾比重,拮抗肾小球肾小管病变以及肾间质纤维化,对肾脏有保护作用。次乌头碱与甘草苷、甘草次酸配伍相较于次乌头碱单用对慢性心力衰竭大鼠的心肾具有更强的保护作用,尤其是对慢性心力衰竭引起的肾损伤有显著保护作用,是附子甘草配伍“增效”作用的体现和可能的作用机制,而其对于 RAAS 系统的调控以及对肾脏保护作用的机制,则是有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 周亚滨, 郭慧美, 孙静, 等. 慢性心力衰竭中医治疗进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2016, 18(1): 8-10.
- [2] 廉洪建. 主动脉弓缩窄术制备小鼠心力衰竭模型的中医证候评价研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2015.
- [3] 王利勤, 张宇燕, 何昱, 等. 附子、甘草有效成分不同配伍比例对 H9c2 心肌细胞缺氧缺糖损伤的影响[J]. 中医杂志, 2016, 57(15): 1327-1331.
- [4] 周娟. 次乌头碱在大鼠体内药代动力学及心脏分布研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2010.
- [5] Yin X, Xia G, Li Z, et al. Glycyrrhetic acid attenuates lipopolysaccharide-induced fulminant hepatic failure in d-galactosamine-sensitized mice by up-regulating expression of interleukin-1 receptor-associated kinase-M[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2017, 320: 8-16.
- [6] Sun B, Zhang M, Zhang Q. Metabonomics study of the effects of pretreatment with glycyrrhetic acid on mesaconitine-induced toxicity in rats[J]. J Ethnopharmacol, 2014, 154(3): 839-846.
- [7] Wang L, He Y, Zhang Y, et al. Effects of active components of Fuzi and Gancao compatibility on Bax, Bcl-2 and caspase-3 in chronic heart failure rats[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2016: 1-12.
- [8] 张叶祥. 周宜轩教授以心肾同治法治疗难治性心力衰竭经验[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2016, 14(7): 798-799.
- [9] 姚成增, 王肖龙. 心脉隆注射液治疗慢性心力衰竭气阳两虚、瘀血内阻证的开放、多中心临床研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2017, 37(3): 277-282.
- [10] 杨金龙, 刘昕烨, 李晓. 参芪营心饮治疗慢性心力衰竭心脏自主神经病变的疗效观察[J]. 中国中西医结合杂志, 2017, 37(2): 247-249.
- [11] 王律韵, 杨洁红, 张宇燕, 等. 附子与甘草配伍减毒增效的物质基础初探[J]. 中国中医急症, 2011, 20(2): 248-250.
- [12] Kamal FA, Travers JG, Schafer AE, et al. G protein-coupled receptor-G-protein $\beta\gamma$ -subunit signaling mediates renal dysfunction and fibrosis in heart failure[J]. J Am Soc Nephrol, 2017, 28(1): 197.
- [13] 傅晓霞, 吕健, 杨帆, 等. 壮肾灵方外敷联合西药治疗心肾阳虚、水瘀内阻型慢性心力衰竭的临床研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2014, 34(7): 808-811.
- [14] Soucy KG, Bartoli CR, Phillips D, et al. Continuous-flow left ventricular assist device support improves myocardial supply: demand in chronic heart failure[J]. Ann Biomed Eng, 2017, 45(6): 1-12.
- [15] 张清. 超声心动图综合参数对慢性心力衰竭的诊断及治疗评价[J]. 中国实用医药, 2016, (4): 75-76.
- [16] Brown K, Chee J, Kyung S, et al. Mineralocorticoid receptor antagonism in acute heart failure[J]. Curr Treat Options Cardiovasc Med, 2015, 17(9): 1-9.
- [17] 项光泽. 基础肾功能与心脏再同步化治疗在慢性心力衰竭患者中疗效的相关性[D]. 杭州: 浙江大学, 2015.

(收稿: 2017-05-19 在线: 2018-02-10)

责任编辑: 赵芳芳