

· 基础研究 ·

参芪养心汤对扩张型心肌病大鼠
Ang II-ROS-HMGB1 通路的影响孔令晶¹ 沈丽娟² 陆 曙^{1,3} 徐 辰⁴ 周春刚⁴

摘要 目的 基于血管紧张素 II (Ang II) - 活性氧簇 (ROS) - 高迁移率族蛋白 1 (HMGB1) 通路探讨参芪养心汤对扩张型心肌病 (DCM) 大鼠心功能的影响。**方法** 选取 40 只 SD 大鼠腹腔注射阿霉素构建 DCM 模型,造模成功 32 只,随机分为模型组、培哌普利组、美托洛尔组、参芪养心汤组,每组 8 只,另选 8 只同龄正常 SD 大鼠作为正常组。各组相应给予培哌普利 3 mg/(kg·d),美托洛尔 50 mg/kg (2 次/d),参芪养心汤 1.87 g/(kg·d),模型组和正常组给予等量生理盐水,持续灌胃 8 周。各组小鼠行心脏超声检查左心室舒张末期内径 (LVEDD)、左心室收缩末期内径 (LVESD)、左心室射血分数 (LVEF)、短轴缩短率 (FS); 计算心脏重量指数 (HWI); 测定血清脑钠肽 (BNP)、TNF- α 、IL-1、C 反应蛋白 (CRP) 水平; 观察左室心肌组织形态学变化; 放射免疫法测定心肌组织 Ang II 水平; RT-PCR 法测定心肌组织血管紧张素原 (AGT)、Ang II 1 型受体 (AT1)、蛋白激酶 C (PKC)、HMGB1、核因子 κ B (NF- κ B) mRNA 表达水平; DCFH-DA 荧光法测定心肌组织 ROS 水平。正常组、模型组、参芪养心汤组行¹⁸F-FDG Micro-PET 心肌代谢显像检查。**结果** 与正常组比较,模型组大鼠 LVEDD、LVESD、HWI 升高,心肌组织 Ang II、ROS、AGT、AT1、PKC、HMGB1、NF- κ B mRNA 表达水平升高,血清 BNP、TNF- α 、IL-1、CRP 水平升高 (均 $P < 0.05$); LVEF、FS 下降 (均 $P < 0.05$),部分心肌摄取¹⁸F-FDG 降低 ($P < 0.05$)。与模型组比较,用药组大鼠 LVEDD、LVESD、HWI 下降,心肌组织 Ang II、ROS 以及 AGT、AT1、HMGB1、NF- κ B mRNA 表达水平下降,血清 BNP、TNF- α 、IL-1、CRP 水平下降 (均 $P < 0.05$),LVEF、FS 升高 (均 $P < 0.05$),用药组间比较; 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 培哌普利组、美托洛尔组心肌组织 PKC mRNA 表达水平下降 (均 $P < 0.05$); 参芪养心汤组部分心肌摄取¹⁸F-FDG 升高 ($P < 0.05$)。大鼠左室心肌组织 Ang II、ROS 水平、HMGB1 mRNA 之间呈正相关关系 ($P < 0.01$)。**结论** 参芪养心汤能缩小 DCM 大鼠左室内径,提高 LVEF,改善心功能,其作用机制可能与调节 Ang II-ROS-HMGB1 通路表达有关。

关键词 扩张型心肌病; 参芪养心汤; 血管紧张素 II; 活性氧簇; 高迁移率族蛋白 B1; 心功能

Effects of Shenqi Yangxin Decoction on Ang II-ROS-HMGB1 Singal Pathways in Rats with Dilated Cardiomyopathy KONG Ling-jing¹, SHEN Li-juan², LU Shu^{1,3}, XU Chen⁴, and ZHOU Chun-gang⁴ 1 Wuxi Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Jiangsu (214071); 2 Department of Critical Care Medicine, Wuxi Hospital of Traditional Chinese Medicine, Jiangsu (214071); 3 Department of Cardiovascular Medicine, Wuxi Hospital of Traditional Chinese Medicine, Jiangsu (214071); 4 Central Laboratory of Wuxi Gospital of Traditional Chinese Medicine, Jiangsu (214071)

ABSTRACT Objective To study the effects of Shenqi Yangxin Decoction (SQYXD) on rats with dilated cardiomyopathy (DCM) based on Ang II-ROS-HMGB1 signal pathways. **Methods** DCM model was induced by an intraperitoneal injection of adriamycin in 40 SD rats, 32 successful DCM model rats were randomly divided into 4 groups: model group ($n=8$), perindopril group ($n=8$), metoprolol group

基金项目: 江苏省中医药领军人才培养对象资助项目 (No. SLJ0217); 无锡市医学杰出人才培育对象资助项目 (No. JCRCPY005)

作者单位: 1. 南京中医药大学无锡附属医院 (江苏 214071); 2. 无锡市中医医院重症医学科 (江苏 214071); 3. 无锡市中医医院心血管科 (江苏 214071); 4. 无锡市中医医院中心实验室 (江苏 214071)

通讯作者: 陆 曙, Tel: 0510-88859999, E-mail: lushu@medmail.com.cn

DOI: 10.7661/j.cjim.20190307.171

($n=8$), and SQYXD group ($n=8$). Another 8 age-matched normal SD rats were recruited as the normal group. Perindopril was administered by gavage with a dose of 3 mg/(kg · d) in perindopril group, metoprolol was administered by gavage with a dose of 50 mg/kg, bid, in metoprolol group, SQYXD solution was administered by gavage with a dose of 1.87 g/(kg · d) in SQYXD group, equal volume of distilled water was administered in the model and control group, all for 8 weeks. The left ventricular end diastolic diameter(LVEDD), left ventricular end systolic diameter(LVESD), left ventricular ejection fraction(LVEF) and fraction shortening(FS) were measured with echocardiography, cardiac weight index(HWI) was calculated, then rats serum levels of BNP, TNF- α , IL-1, CRP were measured by ELISA. Histopathological characteristics of left ventricular myocardial tissue were observed. Concentration of Ang II in myocardial tissue was determined by radioimmunoassay. Angiotensinogen(AGT), AT1, PKC, HMGB1, NF- κ B mRNAs in rats' myocardial tissue were determined by the methods of RT-PCR. Reactive oxygen species(ROS) was determined by dichlorofluorescein diacetate fluorescence. The 18 F-FDG Micro-PET myocardial metabolism imaging was performed in the SQYXD group, model group, and normal group. Results Compared with the normal group, the levels of LVEDD, LVES, HWI, and the expression of Ang II, ROS, and mRNA expression of AGT, AT1, PKC, HMGB1, NF- κ B in myocardium, and serum levels of BNP, TNF- α , IL-1 and CRP in model group significantly increased (all $P<0.05$), LVEF and FS significantly decreased ($P<0.05$), 18 F-FDG uptake in some myocardium in model group decreased significantly ($P<0.05$). Compared with the model group, the levels of LVEDD, LVESD, HWI, and the mRNA expression of Ang II, ROS, and the mRNA expression of AGT, AT1, HMGB1, NF- κ B, and serum levels of BNP, TNF- α , IL-1 and CRP in the medication group rats were significantly decreased (all $P<0.05$), while the levels of LVEF and FS were significantly increased ($P<0.05$). There was no significant difference among the three groups ($P>0.05$). The mRNA expression of PKC in myocardium of perindopril group and metoprolol group significantly decreased ($P<0.05$). 18 F-FDG uptake in some myocardium in SQYXD group increased significantly ($P<0.05$). There was a positive correlation between Ang II, ROS and HMGB1 mRNA in left ventricular myocardium of rats ($P<0.01$). Conclusions SQYXD can effectively reduce the dilated left ventricular diameter, and improve heart function and LVEF. The mechanisms of SQYXD on DCM might be associated with regulating the expression of Ang II-ROS-HMGB1 signal pathways.

KEYWORDS dilated cardiomyopathy; Shenqi Yangxin Decoction; angiotensin II; reactive oxygen species; high mobility group box 1; heart function

目前研究认为心室重构是扩张型心肌病(dilated cardiomyopathy, DCM)的重要病理生理环节,贯穿 DCM 发生发展的始终^[1]。DCM 患者肾素-血管紧张素-醛固酮系统(renin angiotensin aldosterone system, RAAS)激活,血管紧张素 II(angiotensin II, Ang II)水平显著升高^[2]。Ang II 与 Ang II 1 型受体(AT1 receptor, AT1)结合,可促进心肌细胞和内皮细胞的活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)产生^[3]。Ang II 可诱导高迁移率族蛋白 1(high mobility group box 1, HMGB1)分泌增加^[4], ROS 中的过氧化氢也可刺激巨噬细胞和单核细胞主动释放 HMGB1^[5]。前期研究发现, HMGB1 及其炎症信号通路在 DCM 大鼠中呈现高表达,并与心腔大小及心功能有关,提示其可能是 DCM 发生、发展

的病理生理机制之一^[6]。

目前缺乏有效的 DCM 西医治疗方法,中西医结合疗法可考虑作为治疗手段^[7]。我国 2007 年发布的《心肌病诊断与治疗建议》^[8]中指出黄芪、生脉饮、真武汤等可改善 DCM 患者的心功能。陆曙教授在临证中也发现 DCM 气阴两虚血瘀较常见^[9],基于此,他创制了参芪养心汤(由生脉饮加炙黄芪、丹参、白芍、炙甘草组成),该方具有益气养阴活血之功,被收录于国家中医药管理局医政司发布的心脏病(扩张型心肌病)中医诊疗方案^[10]。前期实验研究发现,参芪养心汤能通过调节 HMGB1 及其下游的炎症信号通路,可延缓 DCM 大鼠心腔扩大,改善心功能^[11]。但参芪养心汤是否从 HMGB1 的上游即 Ang II-ROS 水平发挥作用,目前暂不明确。本研究通过建立 DCM 大鼠模型,观察 DCM

大鼠心功能及 AngII-ROS-HMGB1 的变化,同时,进一步探讨参芪养心汤治疗 DCM 的作用机制。

材料与方法

1 实验动物 48 只 SPF 级健康 8 周龄雄性 SD 大鼠,由江苏省血吸虫病防治研究所动物中心购于北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物质量合格证:SCXK(京)2018-0001,体重 240~260 g。本研究通过南京中医药大学无锡附属医院伦理委员会审查, No. 2018011720。

2 药物 注射用盐酸多柔比星(阿霉素):10 mg/瓶,深圳万乐药业有限公司生产,批号:H44024359;培哌普利片(雅施达):4 mg/片,施维雅制药有限公司生产,批号:H20034053;美托洛尔片(倍他洛克):25 mg/片,阿斯利康制药有限公司生产,批号:H32025391;参芪养心汤:颗粒剂,江苏天江药业有限公司生产,炙黄芪颗粒 1.5 g/袋(生产批号:1211114)相当于生药 10 g,红参颗粒 1.5 g/袋(生产批号:1212125)相当于生药 10 g,麦冬颗粒 3 g/袋(生产批号:1210030)相当于生药 10 g,五味子颗粒 1 g/袋(生产批号:1211130)相当于生药 6 g,丹参颗粒 2 g/袋(生产批号:1203208)相当于生药 10 g,炒白芍颗粒 1 g/袋(生产批号:1211128)相当于生药 10 g,炙甘草颗粒 0.5 g/袋(生产批号:1212124)相当于生药 3 g。

3 主要试剂及仪器 水合氯醛(青岛宇龙海藻药业有限公司,批号:H37922673);血清脑钠肽(brain natriuretic peptide, BNP)、TNF- α 、IL-1、C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP) ELISA 试剂盒(上海蓝基生物科技有限公司,批号分别为 E01B0452, E02I0364, E02T0008, E02I0006);Trizol RNA Isolation(美国 Invitrogen 公司,批号:15596026);ROS 检测试剂盒(江苏碧云天生物技术有限公司,批号:0402261212);Ang II 放免检测试剂盒(北京普尔伟业生物科技有限公司,批号:20080520);逆转录试剂盒及 SYBR Premix ExTaq II 试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司,批号分别为:RR047A, RR420A];引物序列[生工生物工程(上海)股份有限公司,批号:111113873]。电泳装置,型号:041BR111422Bio-RAD,美国 Bio-Rad 公司;Micro-PET 扫描仪,型号:Inveon,德国 SIMENS 公司;透射电子显微镜,型号:JEM-1010,日本 JEOL 电子公司;飞利浦 CX50 超声诊断及 12MHz 超声探头,美国 Philips 公司;酶联免疫分析仪,型号:Elx-800,美国

BioTek 公司;基因扩增仪,型号:LightCycler480,美国 Bio-Rad 公司;DCFH-DA 荧光探针流式细胞仪,型号:FACSCalibur,美国 BD 公司。

4 造模方法 40 只雄性 SD 大鼠,予腹腔注射阿霉素,每次 1 mg/kg,每周 2 次,连续 6 周,共 12 次,每次根据大鼠体重调整阿霉素剂量。6 周后停药观察 2 周。阿霉素诱导 DCM 大鼠模型的建立与成功标准参照文献[12]进行,模型复制后实验大鼠死亡 8 只,造模成功 32 只,死亡率为 20%,32 只大鼠进入药物干预实验。另设 8 只雄性 SD 大鼠为正常组,腹腔注射等量生理盐水。

5 动物分组及干预方法 32 只 DCM 大鼠采用数字表法随机分为培哌普利组、美托洛尔组、参芪养心汤组、模型组,每组 8 只。培哌普利组:以培哌普利 3 mg/(kg·d)^[13]灌胃。美托洛尔组:以美托洛尔 50 mg/kg,每天 2 次^[14]灌胃,第 1 周给予总剂量的 1/4,每周加量,第 2 周给予总剂量的 1/2,第 3 周加量至 3/4,第 4 周加至治疗量(50 mg/kg,每天 2 次)。参芪养心汤组大鼠中药用量按人的 7 倍计算^[15],人体重按 60 kg 计算,则大鼠每日用药量按照成人中药颗粒剂量 $\times 7/60 \text{ kg} \times \text{大鼠体重}(\text{kg})$ ^[15]计算,用蒸馏水充分溶解中药颗粒剂,配制成浓度为 187 mg/mL 颗粒剂溶液,按照 1.87 g/(kg·d)灌胃给药,每日 1 次。正常组和模型组大鼠于每日蒸馏水灌胃,每只大鼠每日灌胃液体量为 10 mL/(kg·d) $\times$ 大鼠体重(kg),每日 1 次。均灌胃 8 周。

6 取材 于实验结束 24 h 后,禁食 12 h,称重,按体重腹腔注射 10%水合氯醛(3 mL/kg)麻醉。下腔静脉采血后分离血清:将血液试管置于离心机中,3 000 r/min,离心 15 min,吸取上清液,储存于 -80℃ 冰箱备用。取血后处死,取出心脏,生理盐水冲洗干净,滤纸吸干水分。取部分左心室用多聚甲醛固定,用于 HE 染色。余左心室标本放入液氮中,转移到 -80℃ 冰箱。

7 观察指标及方法

7.1 一般性观察 实验过程中观察各组大鼠的体重、一般情况、死亡率。计算心脏重量指数(heart-weight index, HWI) = 心脏重量/体重(HW/BW, g/kg)。

7.2 超声检查测定大鼠心腔大小及心功能 造模后均行心脏超声检查,大鼠称重,腹腔注射 10%水合氯醛(3 mL/kg)麻醉,麻醉成功后将大鼠腹部朝上固定,左胸前部脱毛,将探头放置于大鼠胸骨旁,获得满意的左室长轴切面、心脏四腔切面和 M 型超声心动图,测量后获得大鼠左心室舒张末期内径(left ven-

tricular end diastolic diameter, LVEDD)、左心室收缩末期内径(left ventricular end systolic diameter, LVESD)、左心室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)、短轴缩短率(fraction shortening, FS)等数据。

7.3 ELISA 法测定大鼠血清 BNP、TNF- α 、IL-1、CRP 水平 取血清标本按照说明书测定浓度。

7.4 放射免疫法测定心肌组织 AngII 水平 称取 0.2 g 心肌组织,在 0℃生理盐水中漂洗数次,滤纸吸干,加入 0.86%冷生理盐水 1.8 mL 充分研磨,制备成 10%的心肌组织匀浆。参照试剂说明书每支试管中加入酶抑制剂,煮沸 10 min,3 000 r/min 离心 10 min,取上清液迅速放入 -20℃冰箱保存,按照说明书测定心肌组织 Ang II 的水平,换算成 pg/mg 心肌组织。

7.5 RT-PCR 法测定大鼠左室心肌血管紧张素原(angiotensinogen, AGT)、AT1、蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC)、HMGB1、核因子 κ B(NF- κ B)mRNA 表达 将 50 mg 的冷冻心肌组织按照说明书提取总 RNA。-80℃保存。参考文献[16]方法采用 RT-PCR 两步法进行检测,通过溶解曲线、2%琼脂糖凝胶电泳确定产物的准确性,mRNA 表达程度采用相对定量计算,标准化比值计算公式采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法^[17]。采用 β -actin 作为内参基因,所有基因均由上海申能博彩生物有限公司合成。引物序列见表 1。

表 1 大鼠心肌目的基因和内参基因引物序列		
名称	序列	产物大小 (bp)
AGT	5'-AAGCAGGCGAGGAGGAGCAG-3'	98
	5'-GATGGCGAACAGGAACGGACTG-3'	
AT1	5'-GCTTCAACCTCTACGCCAGTGTG-3'	137
	5'-CAGCCAGATGATGATGCAGGTGAC-3'	
PKC	5'-GATCGGACGACACGGAATGACTTC-3'	80
	5'-CATCCACTGGCTGGCATCTTCATC-3'	
HMGB1	5'-ACCCGGATGCTTCTGTCAAC-3'	219
	5'-ACAAGAAGGCCGAAGGAGGC-3'	
NF- κ B	5'-GCAAACTGGGAATACTTCATGTGACTAAG-3'	123
	5'-ATAGGCAAGGTGAGAATGCACCAGAAGTCC-3'	
β -actin	5'-TCCGTAAAGACCTCTATGCCAACA-3'	104
	5'-GCTAGGAGCCAGGGCAGTAATCT-3'	

7.6 二氯化荧光素二酯(dichlorofluorescein diacetate, DCFH-DA) 荧光法检测心肌组织 ROS 水平 剪碎大鼠心肌组织,加入胰蛋白酶消化心室肌细胞成单细胞悬液,调整细胞密度为 1×10^7 个/mL,然后加入 DCFH-DA,37℃孵育 20 min,洗涤 3 次后

用酶标仪检测每组细胞的荧光强度(激发波长 488 nm,发射波长 525 nm)。

7.7 HE 染色及电镜观察左心室心肌组织 取左心室心肌组织用多聚甲醛固定,用于 HE 染色。另取部分左心室心肌组织用于电镜观察。

7.8 ^{18}F -FDG Micro-PET 心肌代谢显像检查参照参考文献[18],显像剂 ^{18}F -FDG 由无锡第四人民医院核医学科提供,产品经 TLC 法测定放化纯(RCP),使用 95%乙腈作为展开剂,薄层层析硅胶板 GF254 作为载体,比移值 0.427 处为 ^{18}F -FDG,放化纯大于 99%。正常组、模型组、参芪养心汤组每组随机选取 5 只大鼠进行扫描,扫描前大鼠禁食 12 h,称重记录,尾静脉注射 ^{18}F -FDG[剂量(250 ± 50) μCi ,注射体积约 0.2 mL] 60 min 后,俯位固定在扫描床上,静态扫描 10 min。Micro PET 扫描参数为:层厚 0.78 mm,矩阵 128×128 ,采集时间 10 min,采集能窗 350~650 keV。扫描采集结束后,将扫描的图像用 OSEM 3D 迭代重建,迭代 2 次,重建后利用西门子扫描仪自带数据处理软件 ASIPro VM 勾画心肌为感兴趣区域(region of interest, ROI),然后计算 ROI 的最大标准化摄取值(standard uptake value, SUV)。SUV = 局部感兴趣区放射性活度(MBq/mL) / [注射放射性活度(MBq) / 体重(g)]。

8 统计学方法 采用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示;多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 q 检验,方差不齐采用秩和检验。相关性分析采用 Pearson's 相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 一般观察情况比较(表 2) 各用药组大鼠较模型组活动增加,毛色转亮,饮食量增加,体重增长稳定且快。模型组、培哚普利组、美托洛尔组、参芪养心汤组分别死亡率分别为 37.5%(3/8)、12.5%(1/8)、25.0%(2/8)、12.5%(1/8)。模型组存活大鼠中 40.0%(2/5)有腹水形成。死亡大鼠尸体解剖显示心腔扩大,存在胸腹水,肝脏瘀血明显。与正常组比较,干预后模型组大鼠平均体重下降,HWI 升高($P < 0.05$);与模型组比较,参芪养心汤组、培哚普利组、美托洛尔组大鼠 HWI 及死亡率下降($P < 0.05$);各用药组间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2 各组大鼠体重心脏超声指标比较(表 3) 与正常组比较,模型组大鼠 LVEDD、LVESD 升高($P < 0.05$),LVEF、FS 下降($P < 0.05$);与模型组比较,用

表 2 各组大鼠体重及 HWI 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	体重(g)		HWI (g/kg)
		干预前	干预后	
正常	8	408.46 ± 15.65	495.43 ± 20.75	2.44 ± 0.21
模型	5	339.37 ± 20.36	368.54 ± 16.59 *	3.26 ± 0.38 *
培哚普利	7	340.14 ± 19.46	376.54 ± 17.54	2.61 ± 0.23 [△]
美托洛尔	6	337.42 ± 22.08	376.37 ± 25.18	2.59 ± 0.27 [△]
参芪养心汤	7	338.36 ± 21.32	375.27 ± 15.46	2.58 ± 0.23 [△]

注:与正常组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

药组大鼠 LVEDD、LVESD 下降 ($P < 0.05$), LVEF、FS 升高 ($P < 0.05$);各用药组间比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 3 各组大鼠心脏超声比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	LVEDD (mm)	LVESD (mm)	LVEF (%)	FS (%)
正常	8	4.79 ± 0.24	2.10 ± 0.14	95.21 ± 7.54	67.22 ± 1.74
模型	5	6.75 ± 0.42 *	4.37 ± 0.59 *	70.65 ± 3.54 *	34.13 ± 8.43 *
培哚普利	7	5.56 ± 0.32 [△]	3.20 ± 0.54 [△]	81.05 ± 5.65 [△]	53.43 ± 6.41 [△]
美托洛尔	6	5.60 ± 0.51 [△]	3.05 ± 0.65 [△]	80.64 ± 4.56 [△]	52.96 ± 4.54 [△]
参芪养心汤	7	5.55 ± 0.28 [△]	2.99 ± 0.48 [△]	80.65 ± 8.97 [△]	52.54 ± 6.25 [△]

注:与正常组比较, * $P < 0.05$,与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

3 各组大鼠血清 BNP、TNF- α 、IL-1、CRP 水平比较(表 4) 与正常组比较,模型组大鼠血清 BNP、TNF- α 、IL-1、CRP 水平升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,各用药组大鼠血清 BNP、TNF- α 、IL-1、CRP 水平下降 ($P < 0.05$);各用药组间比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

4 各组大鼠心肌组织 Ang II 表达比较 正常组、模型组、培哚普利组、美托洛尔组、参芪养心汤组心肌组

织 Ang II 分别为(138.60 ± 8.16)、(201.31 ± 62.24)、(145.36 ± 18.22)、(153.92 ± 16.10)、(150.76 ± 35.32) pg/mg。与正常组比较,模型组大鼠左室心肌组织 Ang II 水平升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,用药组大鼠 Ang II 水平下降 ($P < 0.05$);各用药组间比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

5 各组大鼠左室心肌 AGT、AT1、HMGB1、NF- κ B、PKC mRNA 表达比较(表 5) 与正常组比较,模型组大鼠左室心肌组织 AGT、AT1、HMGB1、NF- κ B 及 PKC mRNA 水平升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较,用药组大鼠 AGT、AT1、HMGB1、NF- κ B mRNA 水平下降 ($P < 0.05$),培哚普利组、美托洛尔组心肌组织 PKC mRNA 表达水平下降 ($P < 0.05$);各用药组间比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

6 各组大鼠左室心肌组织 ROS 水平比较(图 1) 与正常组比较,模型组大鼠 ROS 水平升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,用药组大鼠 ROS 水平明显下降 ($P < 0.05$);各用药组间比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

7 大鼠左室心肌病理学光镜结果比较(图 2) 正常组大鼠心肌 HE 染色显示心肌纤维无断裂,排列整齐,肌细胞胞质均匀丰富,无心肌细胞破坏,细胞排列整齐,无间质纤维化,细胞间隙正常。模型组大鼠心肌纤维排列紊乱,心肌纤维溶解断裂,细胞间隙增宽、水肿,心肌细胞增大并有空泡变性,炎症细胞浸润,组织间质纤维化。用药组心肌组织较模型组有明显改善,心肌纤维排列紊乱轻微,心肌细胞肥大、空泡变性较模型组减少,血管充血和炎性细胞浸润及间质轻度纤维化程度较模型组有明显改善。

表 4 各组大鼠血清 BNP、TNF- α 、IL-1、CRP 水平比较 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

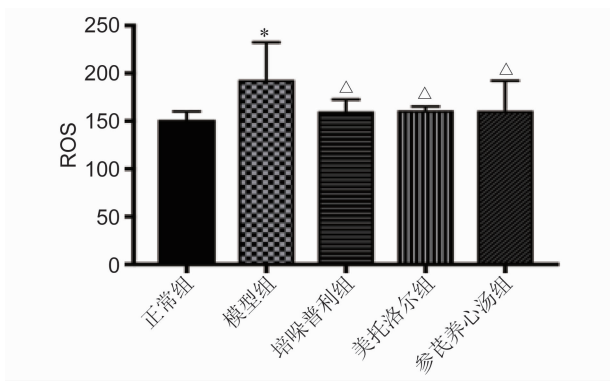
组别	n	BNP	TNF- α	IL-1	CRP
正常	8	413.65 ± 99.16	233.34 ± 55.35	9.30 ± 3.70	28.74 ± 3.89
模型	5	1 253.58 ± 115.26 *	372.55 ± 27.14 *	30.55 ± 3.57 *	43.65 ± 4.74 *
培哚普利	7	560.42 ± 101.35 [△]	267.15 ± 47.17 [△]	12.55 ± 2.76 [△]	25.87 ± 4.35 [△]
美托洛尔	6	587.81 ± 96.34 [△]	254.48 ± 31.09 [△]	12.74 ± 4.13 [△]	25.60 ± 5.11 [△]
参芪养心汤	7	554.72 ± 84.76 [△]	251.03 ± 14.48 [△]	12.33 ± 7.06 [△]	24.31 ± 3.84 [△]

注:与正常组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

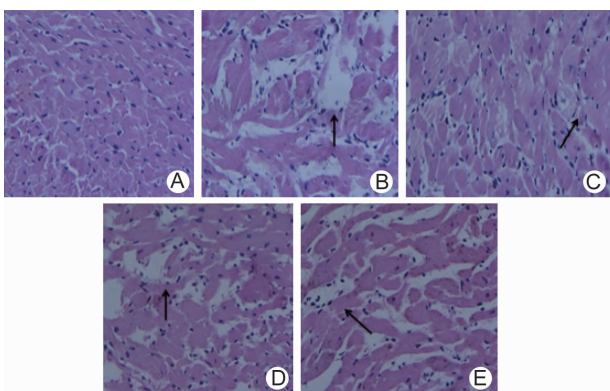
表 5 各组大鼠左室心肌 AGT、AT1、HMGB1、NF- κ B、PKC mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	AGT mRNA	AT1 mRNA	HMGB1 mRNA	NF- κ B mRNA	PKC mRNA
正常	8	0.86 ± 0.16	0.95 ± 0.16	0.56 ± 0.10	0.69 ± 0.21	0.87 ± 0.10
模型	5	1.42 ± 0.44 *	1.45 ± 0.52 *	1.01 ± 0.52 *	1.43 ± 0.52 *	1.35 ± 0.68 *
培哚普利	7	0.89 ± 0.16 [△]	0.95 ± 0.11 [△]	0.62 ± 0.08 [△]	0.91 ± 0.53 [△]	0.92 ± 0.31 [△]
美托洛尔	6	0.98 ± 0.37 [△]	0.98 ± 0.14 [△]	0.64 ± 0.09 [△]	0.92 ± 0.15 [△]	0.96 ± 0.26 [△]
参芪养心汤	7	0.90 ± 0.37 [△]	0.97 ± 0.35 [△]	0.61 ± 0.23 [△]	0.92 ± 0.18 [△]	1.27 ± 0.56

注:与正常组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$



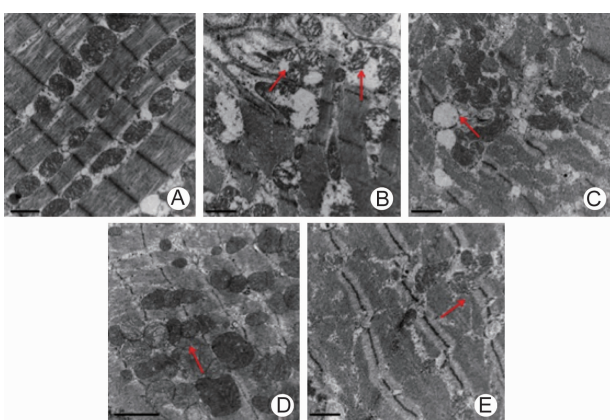
注:与正常组比较,* $P<0.05$,与模型组比较 $\triangle P<0.05$
图1 各组大鼠左心室心肌组织 ROS 水平比较



注:A 为正常组;B 为模型组;C 为培哚普利组;D 为美托洛尔组;E 为参芪养心汤组;箭头所指为心肌纤维溶解断裂,细胞间隙增宽、水肿

图2 各组大鼠左心室心肌病理学光镜结果 (HE,×200)

8 大鼠左心室电镜结果比较(图3) 正常组大鼠心肌纤维排列整齐,线粒体大小正常,分布均匀,无水肿,膜完整,内膜嵴密度正常。模型组大鼠心肌纤维溶解断裂,线粒体增多,肿胀,分布不均,空泡变性,内



注:A 为正常组;B 为模型组;C 为培哚普利组;D 为美托洛尔组;E 为参芪养心汤组;箭头所指为心肌纤维溶解断裂,线粒体增多,肿胀,分布不均,空泡变性

图3 各组大鼠左心室心肌电镜结果 (×20 000)

膜嵴消失,间质胶原增多。用药组心肌纤维无明显断裂,肌纤维走行基本规则,线粒体轻度肿胀,较模型组大鼠明显改善。

9 大鼠左心室心肌组织 Ang II、ROS 及 HMGB1 mRNA 相关性分析(图4) 大鼠左心室心肌组织 Ang II 与 ROS 水平,Ang II 与 HMGB1 mRNA 表达水平,ROS 与 HMGB1 mRNA 表达水平均呈正相关($r=0.972,P=0.000;r=0.954,P=0.000;r=0.936,P=0.000$)。

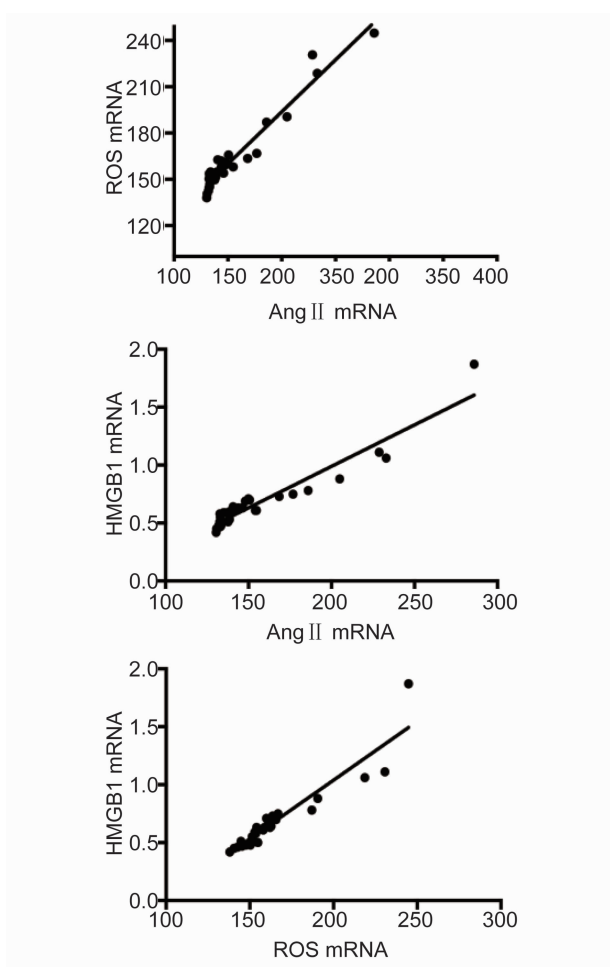


图4 大鼠左心室心肌组织 Ang II、ROS 及 HMGB1 三者相关性分析

10 各组大鼠 SUV 比较(图5) 正常组,模型组,参芪养心汤组 SUV 值分别为 6.67 ± 1.12 , 1.05 ± 0.32 , 5.96 ± 0.79 。与正常组比较,模型组大鼠 SUV 值下降($P<0.05$);与模型组比较,参芪养心汤组大鼠 SUV 值升高($P<0.05$)。

讨 论

国家中医药管理局医政司发布的心胀病(扩张型

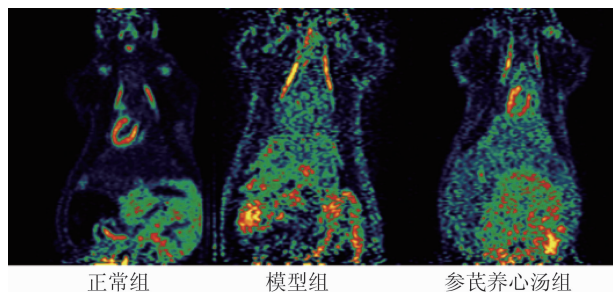


图5 各组大鼠¹⁸F-FDG Micro-PET 心肌代谢显像

心肌病)中医诊疗方案中认为气阴两虚证为 DCM 常见证型之一^[10],笔者也认为心胀病的病因是由禀赋不足、正气亏虚、饮食、情志、寒邪等引起,病机为心气、心阳、心阴、心血亏虚,邪毒乘虚而入,内舍于心,心气耗散,日久则心体胀大^[19]。临床观察中亦发现心胀病患者气阴两虚为本,血瘀为标者较常见^[9]。参芪养心汤由炙黄芪、红参、麦冬、五味子、丹参、白芍、炙甘草等组成,具有益气养阴活血之功,契合 DCM 气阴两虚为本,血瘀为标的病机。既往实验研究提示该方能改善 DCM 大鼠心肌活性,能有效治疗 DCM,其作用机制可能与调节 HMGB1 及炎症信号通路的基因和蛋白表达有关^[11]。

心室重构是 DCM 的重要病理生理环节,贯穿 DCM 发生发展的始终^[1]。RAAS 在 DCM 心室重构过程中起着关键作用,多方面参与心室重构^[20]。一方面,Ang II 促进心肌细胞从收缩型向合成表型转变,使心肌最大缩短速度减慢,心肌张力减小,导致心肌收缩力下降;另一方面,Ang II 可使心肌间质胶原合成增加,使细胞外基质成分改变及心肌间质纤维化^[1, 21, 22]。PKC 是介导心肌纤维化的重要成分,Ang II 促进心肌纤维化的过程依赖于 $\beta 1$ 整合素,而 PKC 是激活 $\beta 1$ 整合素的特异信号通路^[23]。同时,Ang II 与 AT1 结合,促进心肌细胞和内皮细胞的 ROS 产生^[3]。ROS 可通过多种途径影响心肌收缩和舒张功能,最终导致 DCM 及心力衰竭的发生发展^[24]。

HMGB1 是一种典型的核内非组蛋白,可以通过主动分泌和被动释放两种方式到达胞外,参与炎症反应,是一种重要的炎症介质和促炎细胞因子^[6]。前期研究发现,HMGB1 及其炎症信号通路[HMGB1-Toll 样受体 4 (toll-like receptors 4, TLR4) /糖基化终产物受体 (receptor for advanced glycation end-products, RAGE)-NF- κ B-细胞因子]在 DCM 大鼠中呈现高表达,并与心腔大小及心功能有关^[6]。高血压肾病时,Ang II 可诱导 HMGB1 分泌增加,导致 TLR4 过度活化,从而调节 NF κ B 诱导后续的细胞因

子产生^[4]。另有研究报道,氧化应激可能参与房颤患者 HMGB1 的释放^[25]。但在 DCM 中, HMGB1 的高表达是否是由 Ang II 和 ROS 共同作用的结果,目前暂无报道。

本研究发现,参芪养心汤能改善 DCM 大鼠心功能外,不仅能调节 HMGB1 及其炎症信号通路的水平,而且能降低 AGT、Ang II、AT1、ROS 水平,提示参芪养心汤可从 HMGB1 的上游即 RAAS 及氧化应激水平发挥其改善心肌重构、心肌代谢和收缩功能的作用。但同时,发现参芪养心汤对 PKC 并无抑制作用,提示参芪养心汤抑制心肌重构和纤维化的作用可能是直接抑制 Ang II 及 AT1,而不是通过抑制 PKC,降低 $\beta 1$ 整合素来实现的。当然,本实验研究纳入样本相对较少,未能进行不同剂量分组试验以说明其量效关系,这些需在今后研究中加以优化。

PET 心肌代谢显像是评估心肌存活的金标准^[26],前期研究证实¹⁸F-FDG PET 可以作为评价 DCM 模型的工具^[17],其优点是可以活体检测心肌的存活情况,故可以用于疗效的评价。本研究中,模型组大鼠 LVEDD、LVESD 水平较正常大鼠升高,HWI 增大,BNP 水平增高,大鼠心肌细胞病理组织形态学呈心肌病样改变,¹⁸F-FDG Micro PET 心肌糖代谢异常,说明模型组大鼠心腔明显扩大,心功能减退,心肌活性下降,因此认为此动物模型的复制是成功的。同时本研究发现,DCM 模型大鼠心肌组织 HMGB1、Ang II 和 ROS 呈现高表达,并且三者之间存在正相关关系,提示在 DCM 中, HMGB1 的高表达可能是由 Ang II 和 ROS 共同作用的结果。

总之,该实验结果提示,参芪养心汤可能通过多环节、多靶点的干预效应,改善 DCM 大鼠心肌重构,抑制心肌炎症反应,改善收缩功能,从而起到减缓心腔扩大,改善心肌活性,改善心功能的作用。但尽管该方在 DCM 临床治疗中显示有一定的疗效,但尚无临床循证医学的有效证据,在今后的研究中还需进行严格的临床随机对照试验,以进一步证实其治疗 DCM 的临床疗效。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] 王振涛,韩丽华,惠玲,等.抗纤益心方对扩张型心肌病大鼠心肌血管紧张素Ⅱ表达的影响[J].中华中医药杂志,2011,26(3):563-565.
- [2] Cody RJ, HaasGJ, Binkley RF, et al. Plasma endothelin correlates with the extent of pulmonary hy-

- pertension in patients with chronic congestive heart failure[J]. *Circulation*, 1992, 85 (2): 504–509.
- [3] Privratsky JR, Wold LE, Sowers JR, et al. AT1 blockade prevents glucose-induced cardiac dysfunction in ventricular myocytes: role of the AT1 receptor and NADPH oxidase[J]. *Hypertension*, 2003, 42(2): 206–212.
- [4] Anand R, Nair a, Philip J, Ebenezer, et al. Angiotensin II-induced hypertensive renal inflammation is mediated through HMGB1-TLR4 signaling in rat tubulo-epithelial cells[J]. *Exp Cell Res*, 2015, 335(2): 238–247.
- [5] Tang D, Shi Y, Kang R, et al. Hydrogen peroxide stimulates macrophages and monocytes to actively release HMGB1[J]. *J Leukoc Biol*, 2007, 81(3): 741–747.
- [6] 沈丽娟, 陆曙, 周永华, 等. 高迁移率族蛋白 1 及其炎症信号通路在大鼠扩张型心肌病中的表达及意义[J]. *重庆医学*, 2017, 46(11): 1457–1462.
- [7] 杨英珍, 陈瑞珍, 张寄南, 等. 中西医结合治疗扩张型心肌病的临床观察[J]. *中国中西医结合杂志*, 2001, 21(4): 254–256.
- [8] 中华医学会心血管病分会, 中华心血管病杂志编辑委员会, 中国心肌病诊断与治疗建议工作组. 心肌病诊断与治疗建议[J]. *中华心血管病杂志*, 2007, 35(1): 5–16.
- [9] 沈丽娟, 陆曙, 任春, 等. 扩张型心肌病患者中医证素与抗心肌抗体的相关性[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(18): 152–156.
- [10] 国家中医药管理局. 24 个专业 104 个病种中医诊疗方案[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2012: 60–65.
- [11] Shen LJ, Lu S, Zhou YH, et al. Effect of Shenqi Yangxin decoction on high mobility group box 1 and inflammatory signal pathway in a rat model of dilated cardiomyopathy[J]. *J Tradit Chin Med*, 2018, 38(6): 862–871.
- [12] Shen LJ, Lu S, Zhou YH, et al. Developing a rat model of dilated cardiomyopathy with improved survival[J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2016, 17(12): 975–983.
- [13] 王礼春, 马虹, 何建桂, 等. 培哚普利对心力衰竭大鼠心肌细胞钙瞬变及其调控蛋白的影响[J]. *中华心血管病杂志*, 2005, 33(6): 513–517.
- [14] Ahmet I, Morrell C, Lakatta EG, et al. Therapeutic efficacy of a combination of a β 1-adrenoreceptor (AR) blocker and β 2-AR agonist in a rat model of postmyocardial infarction dilated heart failure exceeds that of a β 1-AR blocker plus angiotensin-converting enzyme inhibitor[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2009, 331(1): 178–185.
- [15] 陈奇主编. 中药药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993: 1103.
- [16] Zhou ML, Shi JX, Hang CH, et al. Expression of Toll-like receptor 4 in the brain in a rabbit experimental subarachnoid haemorrhage model[J]. *Inflamm Res*, 2007, 56(3): 93–97.
- [17] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408.
- [18] 沈丽娟, 陆曙, 周永华, 等. 18 氟-氟脱氧葡萄糖微型正电子发射断层扫描心肌代谢显像技术在大鼠扩张型心肌病模型评价中的应用[J]. *中国循环杂志*, 2016, 31(8): 802–806.
- [19] 戴飞, 陆曙. 陆曙教授治疗扩张型心肌病经验[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2012, 14(9): 156–157.
- [20] Cody RJ, Haas GJ, Binkley RF, et al. Plasma endothelin correlates with the extent of pulmonary hypertension in patients with chronic congestive heart failure[J]. *Circulation*, 1992, 85 (2): 504–509.
- [21] Willenheimer R. Left ventricular remodeling and dysfunction. Can the process be prevented[J]. *Int J Cardiol*, 2000, 72 (2): 143–150.
- [22] 周欣, 李玉明. 心肌梗死后创伤修复与心室重塑[J]. *中华心血管病杂志*, 2004, 32(4): 375–378.
- [23] 郝广华, 牛小麟, 韩振华, 等. 血管紧张素 II 对心脏成纤维细胞 Ets-1 表达的影响及机制研究[J]. *心脏杂志*, 2016, 28(3): 253–257.
- [24] 覃家锦, 赵定菁, 陶新智, 等. 扩张型心肌病与氧自由基关系的研究[J]. *广西医学*, 1998, 20(1): 8–10.
- [25] 吴超武, 江洪. 房颤患者血清 HMGB1 水平和氧化应激的关系[J]. *湖北科技学院学报(医学版)*, 2014, 28(2): 106–109.
- [26] Todica A, Brunner S, Böning G, et al. [^{68}Ga]-albumin-PET in the monitoring of left ventricular function in murine models of ischemic and dilated cardiomyopathy: comparison with cardiac MRI[J]. *Mol Imaging Biol*, 2013, 15(4): 441–449.

(收稿: 2018-09-28 在线: 2019-04-07)

责任编辑: 邱禹