

· 基础研究 ·

益心化浊方对慢性心力衰竭大鼠肠道
TLR4/Treg 信号通路的影响陈 婵^{1,2} 娄 洋³ 吕铮天³ 李心怡³ 张露秋³ 毛 威^{3,4}

摘要 **目的** 探讨益心化浊方对慢性心力衰竭大鼠肠道 TLR4/Treg 信号通路的影响。**方法** 采用左冠状动脉结扎术制备心肌梗死后心力衰竭大鼠模型,将造模成功的 28 只大鼠随机分为模型组、中药高剂量组(含药量 9.58 mg/mL)、中药中剂量组(含药量 4.79 mg/mL)、中药低剂量组(含药量 2.40 mg/mL),每组 7 只,另设假手术组 7 只。中药各剂量组灌胃给药,假手术组和模型组给予等量生理盐水。干预 4 周后,观察各组动物心脏彩超指数、心肌及肠道组织病理变化。应用免疫组织化学技术和 Western Blot 检测 Toll 样受体 4 (TLR4)、髓样分化因子 88 (Myd88)、TIR 结构域接头分子 (Trif)、核因子 κ B (NF- κ B)、叉头框蛋白 P3 (Foxp3) 在肠道组织的表达,ELISA 法检测血清中脂多糖 (LPS) 和 IL-2 含量。**结果** 与假手术组比较,模型组左室收缩末内径 (LVIDs)、左室舒张末内径 (LVIDd)、绒毛高度/隐窝深度值 (VH/CD)、LPS、NF- κ B、Myd88 及 TLR4 水平升高 ($P<0.01$, $P<0.05$);左室射血分数 (LVEF)、左室短轴缩短率 (LVFS)、VH、CD 及 Foxp3 水平降低 ($P<0.01$, $P<0.05$)。与模型组比较,中药高、低剂量组 LVEF 增高,低剂量组 LVFS 升高 ($P<0.01$, $P<0.05$),中药中剂量组 LPS 含量降低 ($P<0.05$);中药各组 VH、CD 值增高 ($P<0.01$),VH/CD 降低 ($P<0.01$, $P<0.05$);中药高剂量组 Foxp3 表达上调 ($P<0.05$),中药中、高剂量组 TLR4 表达下调 ($P<0.05$, $P<0.01$),中药高剂量组 NF- κ B、Trif 及低剂量组 Myd88 表达下调 ($P<0.05$)。**结论** 益心化浊方具有通过心-肠轴改善心力衰竭的多靶点效应,其作用与该方调控肠道 TLR4/Treg 信号通路相关。

关键词 慢性心力衰竭; Toll 样受体 4; 调节性 T 细胞; 益心化浊方

Effect of Yixin Huazhuo Formula on Intestinal TLR4 /Treg Signaling Pathway of Chronic Heart Failure Rats CHEN Chan^{1, 2}, LOU Yang³, LU Zheng-tian³, LI Xin-yi³, ZHANG Lu-qiu³, and MAO Wei^{3, 4} 1 Department of Chinese Medicine Internal Medicine, Jiangnan Hospital Affiliated to Zhejiang Chinese Medical University Hangzhou Xiaoshan District Hospital of Chinese Medicine, Hangzhou (311201); 2 Postdoctoral Station of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou (310053); 3 Department of Cardiovascular Internal Medicine, the First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou (310006); 4 Key Laboratory of Integrative Chinese and Western Medicine for the Diagnosis and Treatment of Circulatory Diseases of Zhejiang Province, Hangzhou (310006)

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of Yixin Huazhuo Formula (YXHZF) on intestinal TLR4/Treg signaling pathway of chronic heart failure rats. **Methods** The heart failure rat model was established by left coronary artery ligation. Totally 28 successfully modeled rats were randomly divided into model group, low dose YXHZF group (2.40 mg/mL), medium dose YXHZF group (4.79 mg/mL), and high dose YXHZF group (9.58 mg/mL), 7 in each group. Besides, a sham group was set up consisting of 7 rats. YXHZF groups were given YXHZF by intragastric administration. The sham and model groups were given the equal volume of normal saline. After

基金项目: 杭州市科技计划引导项目 (No. 20181228Y90); 浙江省医药卫生科技计划 (No. 2020RC104)

作者单位: 1. 浙江中医药大学附属江南医院杭州市萧山区中医院中医内科 (杭州 311201); 2. 浙江中医药大学博士后流动站 (杭州 310053); 3. 浙江中医药大学附属第一医院心内科 (杭州 310006); 4. 浙江省中西医结合循环系疾病诊治重点实验室 (杭州 310006)

通讯作者: 毛 威, Tel: 0571-87077599, E-mail: maoweiliw@163.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20210831.059

4 weeks, the changes of color Doppler ultrasound index and myocardial tissue pathology were observed. The levels of toll-like receptor 4 (TLR4), myeloid differentiation factor 88 (MyD88), IR domain-containing adaptor protein inducing IFN β (Trif), nuclear factor kappa-B (NF- κ B) p65 and forkhead box P3 (Foxp3) were determined by immunohistochemistry and Western Blot. The levels of lipopolysaccharides (LPS) and IL-2 in serum were detected by ELISA. **Results** Compared with sham group, the levels of left ventricular end-systole diameter (LVIDs), left ventricular end-diastole diameter, LVIDd, villus height / crypt depth (VH/CD), LPS, NF- κ B, MyD88 and TLR4 increased ($P < 0.01$, $P < 0.05$), the levels of left ventricular ejection fractions (LVEF), left ventricular fractional shortening (LVFS), VH, CD, and Foxp3 reduced ($P < 0.01$, $P < 0.05$) in the model group. Compared with the model group, the levels of LVEF increased in high dose and low dose YXHZF group, LVFS increased in low dose YXHZF group ($P < 0.01$, $P < 0.05$). The LPS quantity decreased in medium dose YXHZ group ($P < 0.05$). The levels of VH, CD in all YXHZF groups increased ($P < 0.01$), while V/C reduced ($P < 0.01$, $P < 0.05$). The Foxp3 expression of high dose YXHZF group up-regulated ($P < 0.05$). The TLR4 expression of medium and high dose YXHZF groups decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The levels of NF- κ B and Trif in YXHZF high dose group decreased, and MyD88 expression of YXHZF low dose group down-regulated ($P < 0.05$). **Conclusion** YXHZF has the multi-target effect of improving heart failure through the heart-gut axis, and its mechanism might be related to the regulation of intestinal TLR4 / Treg signaling pathway.

KEYWORDS chronic heart failure; toll-like receptor 4; regulatory T cells; Yixin Huazhuo Formula

慢性心力衰竭（简称心衰）为各种心脏病发展的终末阶段，是大多数心血管疾病的最终归宿和死亡原因。该病是一种高发发病率的疾病，影响着全球 2 600 多万人^[1]。随着我国人口老龄化加剧、医疗水平的提高，高血压病、冠心病患者数量增加且生存期延长，我国心衰患病率呈上升趋势，心衰成为 21 世纪主要的心血管疾病之一^[2]。

心衰是多脏器受累的临床综合征，肠道功能的变化及其在心衰进程中的调控作用逐渐引起人们关注^[3]。目前研究表明，Toll 样受体 4 (toll-like receptor 4, TLR4) / 调节性 T 细胞 (regulatory T cells, Treg) 通路对于维持肠道免疫环境稳定具有重要作用。TLRs 是关键的天然免疫分子，被视为联系固有免疫和适应性免疫的重要桥梁^[4]。Treg 是一类细胞膜高表达 IL-2 受体 α 链 (CD25)，具有免疫抑制功能的 CD4⁺T 细胞亚群，Treg 通过分泌细胞因子 (TGF- β 、IL-10、IL-2、TNF- α 、IL-4、IL-13 等) 来调节抑制作用或抑制作用的微环境^[5]。

我国心衰的临床治疗中，中医药在改善患者临床症状和生活质量，维持心功能、减少再住院率等方面具有一定的优势^[6]。益心化浊方由中医经典方剂五苓散加减而成，方有党参、黄芪、丹参、三七、化橘红、桂枝、白芍、白术、茯苓和泽泻，该方主张从心、脾入手，治以益气活血，化湿利水，反映了中医学整体观和治病求本的基本治则。本研究拟采用慢性心衰大鼠模型，从心-肠轴角度，探讨益心化浊方对肠道 TLR4/Treg 信号通路的影响作用，这将为该方治疗心

衰提供理论依据和数据支持。

材料与方法

1 动物 健康雄性 SD 大鼠 70 只，鼠龄 6 周，SPF 级，体重 (160 $\pm$ 10) g，购于上海西普尔-必凯实验动物有限公司 [许可证号: SCXK (沪) 2013-0016]。动物饲养于浙江中医药大学动物实验研究中心 SPF 级动物房，动物实验条件合格证号: SYXK (浙) 2018-0012。造模前适应性饲养 2 周至体重 (220 $\pm$ 10) g，常规饲料饲养，自由饮水。本实验通过浙江中医药大学动物伦理委员会审核批准 (No. IACUC-20181022-06)。

2 药物 益心化浊方所用中药为颗粒制剂，其药物组成 (成人每日用量): 黄芪 7.5 g，每克颗粒相当于饮片 6.67 g (批号: K1806020); 党参 9 g，每克颗粒相当于饮片 3.33 g (批号: K1810067); 丹参 6 g，每克颗粒相当于饮片 5 g (批号: K1808018); 化橘红 2.7 g，每克颗粒相当于饮片 6 g (批号: K1808099); 三七 2 g，每克颗粒相当于饮片 3 g (批号: K1810001); 桂枝 2 g，每克颗粒相当于饮片 6 g (批号: K1805003); 白芍 1.2 g，每克颗粒相当于饮片 10 g (批号: K1805043); 茯苓 3 g，每克颗粒相当于饮片 10 g (批号: K1808029); 泽泻 2 g，每克颗粒相当于饮片 10 g (批号: K1804054); 炒白术 6 g，每克颗粒相当于饮片 3.33 g (批号: K1807066)，均购于浙江景岳堂药业有限公司。

3 主要试剂与仪器 主要试剂: 脂多糖

(lipopolysaccharides, LPS) 试剂盒 (货号: A054-2-1)、白细胞介素-2 (interleukin-2, IL-2) 试剂盒 (货号: H003) 均购自南京建成科浩生物科技有限公司; 兔抗鼠髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, Myd88) 抗体 (货号: 4283S, 购自美国 CST 公司), 兔抗鼠 TIR 结构域接头分子 (TIR domain-containing adaptor protein inducing IFN β , Trif) 抗体 (货号: ab13810, 购自英国 Abcam 公司), 兔抗鼠核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 抗体 (货号: 8242S, 购自美国 CST 公司), 兔抗鼠叉头框蛋白 P3 (Forkhead box P3, Foxp3) 抗体 (货号: ab22510, 购自英国 Abcam 公司), 重组兔单克隆抗体 TLR4 (货号: ER1706-43, 购自华安生物技术公司)。异氟烷 (批号: 236181101, 购自鲁南贝特制药有限公司), 盐酸利多卡因注射液 (批号: 18072011, 购自芜湖康奇制药有限公司), 呋塞米注射液 (批号: 180423, 购自吉林省华牧动物保健品有限公司)。主要仪器: 小动物麻醉呼吸机 (型号: AWS, 美国 Hallowell), 小动物多导生理监护系统 (型号: USB-AMP, 法国 EMKA), 小动物呼吸麻醉机 (型号: AS-01-0007, 美国 Summit 公司), 小动物超声成像系统 (型号: vevo1100, 日本 FUJIFILM 公司)。

4 动物模型制备 70 只大鼠随机分为 60 只模型组和 10 只假手术组。模型动物行左冠状动脉结扎术, 该造模方法参照汪菁峰等^[7]手术过程。术前连接小动物麻醉呼吸机, 采用异氟烷诱导麻醉浓度 3%~4%, 维持麻醉浓度 1.5%~3%, 并连接小动物多导生理监护系统, 于左胸第 3、4 肋间开口, 逐层开胸, 暴露心脏, 在左心耳及肺动脉圆锥间距离左心耳处结扎大鼠冠状动脉左室支, 结扎后心脏表面即刻给予盐酸利多卡因注射液心脏表面滴 3 滴, 常规缝合关胸, 关胸后腹腔注射呋塞米注射液, 0.2 mL/只腹腔注射。假手术组穿线不结扎, 其他步骤与模型组相同。造模过程中有 2 只模型大鼠死亡, 成功率为 97%。术后第 4 周行心脏彩超检测, 左室射血分数 (left ventricular ejection fractions, LVEF) 值 <50% 的模型大鼠为心梗后慢性心力衰竭模型成立并筛选入组。

5 分组及干预方法 经筛选后符合要求的模型大鼠共 28 只, 采用数字表法随机分为 4 组, 每组 7 只。模型组, 益心化浊方 (简称中药) 高剂量组、中药中剂量组、中药低剂量组, 分别给予益心化浊方高 (含药量 9.58 mg/mL)、中 (含药量 4.79 mg/mL)、低 (含药量 2.40 mg/mL) 灌胃 (分别相当于临床用药量的 2、

1、1/2 倍), 2 mL/只, 每天 1 次。假手术组大鼠随机筛选出 7 只, 假手术组和模型组动物给予等量生理盐水灌胃。干预周期均为 4 周。

6 检测指标及方法

6.1 一般情况 观察各组大鼠精神, 饮食, 毛色, 体重情况。

6.2 心功能评价 心脏彩超检测: 连接小动物呼吸麻醉机麻醉大鼠后, 于左胸上至锁骨下至肋骨下缘处备皮。采用小动物超声成像系统探头分别对大鼠的左室室间隔收缩期厚度 (interventricular septal thickness at end-systole, IVSs)、左室室间隔舒张期厚度 (interventricular septum thickness at diastole, IVSd)、左室收缩末内径 (left ventricular end-systole diameter, LVIDs)、左室舒张末内径 (left ventricular end-diastole diameter, LVIDd)、左室射血分数 (left ventricular ejection fractions, LVEF)、左室短轴缩短率 (left ventricular fractional shortening, LVFS) 及每搏输出量 (stroke volume, SV) 进行检测。动物处死前, 各组大鼠均行心脏彩超检测。

6.3 HE 染色 动物处死后将心肌和回肠组织浸泡在 4℃ 的 4% 多聚甲醛中固定 24 h, 逐级予乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋, 切片 (3 μ m) 行 HE 染色。经脱蜡、脱水、苏木素染色、伊红液染色、封片后, 置于 200 倍光学显微镜下观察。对回肠组织每张切片选取 2 个视野, 每个视野连续测定 7 根肠绒毛, 运用 NanoZoomer Digital Pathology Image 软件计算肠绒毛高度 (villus height, VH) 和隐窝深度 (crypt depth, CD), 并计算绒毛高度/隐窝深度值 (VH/CD)。

6.4 免疫组织化学技术检测回肠组织 TLR4 表达 石蜡包埋切片 (3 μ m) 在 60℃ 烤箱烘烤 2 h 后, 经二甲苯 I、II 脱蜡及梯度酒精水化, 热修复抗原、3% H₂O₂ 阻断内源性过氧化物酶、山羊血清工作液封闭后, 滴加适量一抗 (1:1 000), 4℃ 孵育过夜。次日, 通用型二抗孵育 60 min。DAB 显色, 镜下观察见棕黄色颗粒着色时, 立即终止反应。苏木素复染细胞核, 脱水, 透明, 中性树胶封片。采用 Carl Zeiss Imaging Systems 软件进行图片分形并测定单位体积的阳性表达率。

6.5 Western Blot 检测回肠 Myd88、Trif、NF- κ B、Foxp3 蛋白表达水平 依据常规方法提取回肠组织总蛋白, 采用 BCA 法测蛋白浓度。依据蛋白浓度计算出蛋白样品体积, 按照 3:1 的比例, 将蛋白样品

加入 $4 \times$ 蛋白上样缓冲液, 混匀, 100°C , 5 min 变性, 冷却至室温, -20°C 保存。依据常规配方配置凝胶和分离胶, 进行蛋白电泳后使用半干转印法将蛋白转至 PVDF 膜。经 5% 脱脂奶粉封闭, 加入 TBST 稀释的一抗, 4°C 孵育过夜; TBST 洗膜, $10\text{ min} \times 3$ 次, 加入 TBST 稀释的二抗, 避光条件下 37°C 孵育 1 h ; TBST 洗膜, $10\text{ min} \times 3$ 次 (避光), 用 Odyssey 双色红外荧光扫描系统采集图像并分析荧光条带灰度值。

6.6 ELISA 检测大鼠外周血 LPS 和 IL-2 含量 取出试剂盒, 室温放置 30 min ; 取出酶标板, 按照标准品次序分别加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 的标准品溶液, 空白孔中加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 待测样品, 空白对照加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ PBS ($\text{pH}7.0\sim7.2$); 各孔加入 $50\text{ }\mu\text{L}$ 的酶标记溶液 (不含空白对照孔); 将封闭膜密封酶标板, 37°C 孵育 1 h ; 充分清洗酶标板 5 次, 保持各孔有充足的水压 (浓缩洗涤液与蒸馏水为 $1:100$), 洗涤后用吸水纸彻底拍干; 各孔分别加入显色剂 $A50\text{ }\mu\text{L}$; 各孔分别加入显色剂 $B50\text{ }\mu\text{L}$; 37°C 避光反应 15 min ; 各孔分别加 $50\text{ }\mu\text{L}$ 终止液, 终止反应。 15 min 内, 酶标仪上测定各孔吸光度, 依据标准品数值计算标准曲线, 换算出样本中指标含量。

7 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件包对数据进行处理。所得数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组比较采用 t 检验或非参数检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

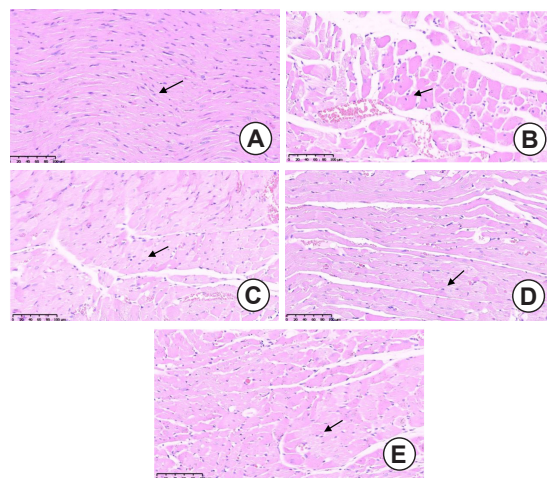
结 果

1 各组大鼠一般情况 各组大鼠均存活, 假手术组被毛光泽、动作灵敏、进食及饮水正常, 体重匀速增长。模型组逐渐出现皮毛凌乱、色枯无泽、甚有少量脱落、活动减少、蜷卧扎堆、后期体重增长缓慢甚至减低。中药各组情况均较模型组为轻, 毛色转亮、饮食量和活动量增加、体重增长稳定。

2 各组超声心动图检测指标比较 (表 1) 与假手术组比较, 模型组 LVIDs、LVIDd 增加 ($P < 0.01$,

$P < 0.05$), LVEF、LVFS 降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 中药低剂量组 LVEF 和 LVFS 值升高 ($P < 0.01$), 中药高剂量组 LVEF 值升高 ($P < 0.05$)。

3 各组心肌组织 HE 染色结果比较 (图 1) 假手术组心肌组织形态正常, 结构清楚。模型组心肌组织排列紊乱, 出现断裂、溶解, 心肌细胞变性、坏死, 胞核固缩、破碎、甚至消失, 血管、纤维增生较为严重; 心肌纤维溶解断裂, 细胞间隙增宽, 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。中药各剂量组大鼠的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, 炎症细胞浸润及间质纤维化程度均较模型组有明显改善。



注: A 为假手术组; B 为模型组; C 为中药低剂量组; D 为中药中剂量组; E 为中药高剂量组; 箭头所指为心肌细胞

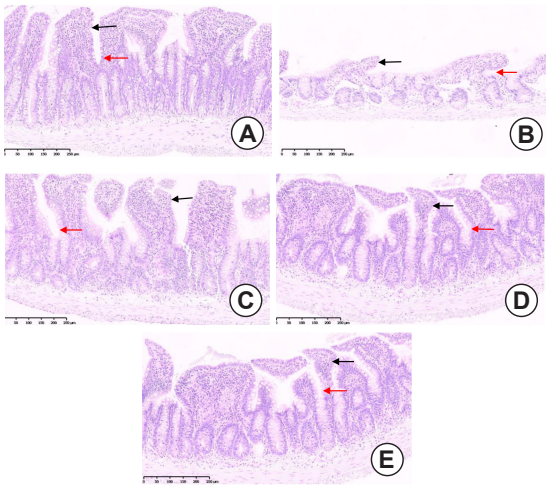
图 1 各组心肌病理结果 (HE, $\times 200$)

4 各组回肠组织 HE 染色结果比较 (图 2, 表 2) 假手术组组织结构完整, 肠绒毛排列整齐有序, 隐窝结构清晰。模型组回肠黏膜上皮细胞表面绒毛稀疏、减少、变短, 排列不规则, 部分断裂扭曲, 脱落明显, 隐窝结构受损。中药各组大鼠的肠黏膜损伤较模型组明显减轻, 隐窝结构清晰, 黏膜层及黏膜下层结构较正常。与假手术组比较, 模型组 VH、CD 值降低, VH/CD 值升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 中药各组 VH、CD 值升高 ($P < 0.01$), VH/CD 值降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

表 1 各组超声心动图检测指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IVSd (mm)	IVSs (mm)	LVIDd (mm)	LVIDs (mm)	LVFS (%)	LVEF (%)	SV (uL)
假手术	7	2.32 ± 0.19	3.10 ± 0.32	7.43 ± 0.56	4.81 ± 0.51	35.09 ± 6.17	62.37 ± 8.07	197.94 ± 50.54
模型	7	3.38 ± 1.33	3.83 ± 1.21	$8.76 \pm 1.86^{**}$	$6.61 \pm 1.58^{*}$	$20.41 \pm 5.86^{**}$	$40.19 \pm 10.18^{**}$	138.04 ± 60.70
中药低剂量	7	2.97 ± 1.14	3.65 ± 0.85	7.68 ± 1.68	5.39 ± 1.31	$32.12 \pm 5.76^{\Delta\Delta}$	$58.24 \pm 8.63^{\Delta\Delta}$	193.22 ± 74.39
中药中剂量	7	2.39 ± 0.29	3.01 ± 0.26	7.43 ± 0.68	5.61 ± 0.90	24.74 ± 5.44	46.80 ± 9.02	185.71 ± 32.23
中药高剂量	7	2.44 ± 1.45	3.08 ± 1.69	7.98 ± 2.03	5.87 ± 1.84	27.13 ± 6.95	$50.78 \pm 11.70^{\Delta}$	180.15 ± 67.73

注: 与假手术组比较, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$; 与模型组比较, $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$



注: A 为假手术组; B 为模型组; C 为中药低剂量组; D 为中药中剂量组; E 为中药高剂量组; 黑色箭头所指为肠绒毛; 红色箭头所指为肠隐窝

图 2 各组小肠病理结果 (×200)

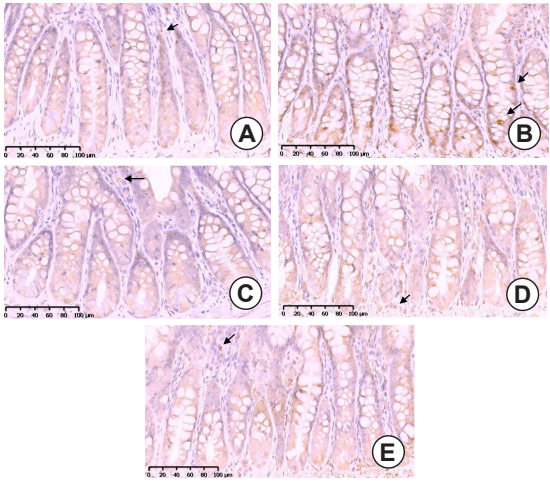
表 2 各组小肠 VH、CD 及 VH/CD 值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	VH (μm)	CD (μm)	VH/CD
假手术	7	447.63 ± 10.11	230.14 ± 6.10	1.96 ± 0.04
模型	7	373.86 ± 11.40*	172.17 ± 7.25*	2.24 ± 0.07*
中药低剂量	7	434.74 ± 12.47 ^{△△}	218.77 ± 7.00 ^{△△}	2.01 ± 0.04 ^{△△}
中药中剂量	7	435.23 ± 11.69 ^{△△}	219.63 ± 5.88 ^{△△}	2.01 ± 0.06 [△]
中药高剂量	7	436.83 ± 11.27 ^{△△}	223.34 ± 7.77 ^{△△}	1.99 ± 0.05 ^{△△}

注: 与假手术组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$

5 各组大鼠肠道 TLR4 免疫组化结果比较 (图 3, 表 3) 假手术组 TLR4 鲜有表达。与假手术组比较, 模型组 TLR4 表达较多, 在肠细胞和胞浆中广泛表达, 呈强阳性 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 中药中、高剂量组 TLR4 表达减少, 于肠细胞和胞浆中散在表达, 呈弱阳性 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

6 各组 NF-κB、Trif、MyD88 及 Foxp3 蛋白表达比较 (表 4) 与假手术组比较, 模型组肠组织中 Foxp3 表达下调 ($P < 0.05$), NF-κB、MyD88 表达上调 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 中药高剂量组 NF-κB、Trif 及低剂量组 MyD88 蛋白表达下调 ($P < 0.05$), 中



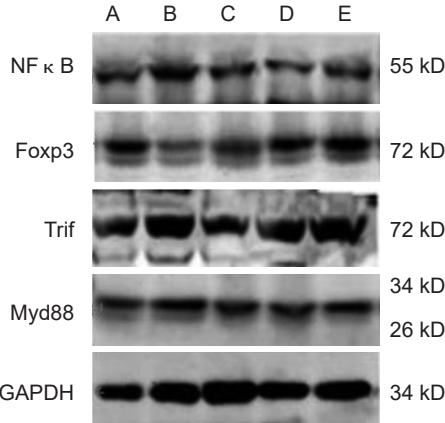
注: A 为假手术组; B 为模型组; C 为中药低剂量组; D 为中药中剂量组; E 为中药高剂量组; 箭头所指为 TLR4 阳性表达

图 3 各组小肠 TLR4 蛋白免疫组化结果 (×200)

表 3 各组心肌 TLR4 阳性率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TLR4 阳性率
假手术	7	2.36 ± 0.32
模型	7	6.52 ± 0.81*
中药低剂量	7	5.08 ± 0.43
中药中剂量	7	3.30 ± 0.55 ^{△△}
中药高剂量	7	3.58 ± 0.61 [△]

注: 与假手术组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$



注: A 为假手术组; B 为模型组; C 为中药低剂量组; D 为中药中剂量组; E 为中药高剂量组

图 4 各组 NF-κB、Trif、MyD88 及 Foxp3 蛋白表达比较

表 4 各组 NF-κB、Trif、MyD88 及 Foxp3 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	NF-κB/GAPDH	Foxp3/GAPDH	Trif/GAPDH	MyD88/GAPDH
假手术	7	0.0087 ± 0.0016	0.0095 ± 0.0027	0.0640 ± 0.1822	0.1101 ± 0.0338
模型	7	0.0107 ± 0.0062*	0.0072 ± 0.0009*	0.1078 ± 0.0222	0.1625 ± 0.0389*
中药低剂量	7	0.0090 ± 0.0026	0.0086 ± 0.0007	0.0666 ± 0.0114	0.1259 ± 0.0275
中药中剂量	7	0.0097 ± 0.0013	0.0079 ± 0.0020	0.0869 ± 0.0296	0.1260 ± 0.0325
中药高剂量	7	0.0088 ± 0.0018 [△]	0.0089 ± 0.0018 [△]	0.0641 ± 0.0227 [△]	0.1275 ± 0.0265

注: 与假手术组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, [△] $P < 0.05$

药高剂量组 Foxp3 蛋白表达上调 ($P<0.05$)。

7 各组 LPS、IL-2 表达比较 (表 5) 与假手术组比较, 模型组大鼠血清 LPS 含量升高 ($P<0.05$)。与模型组比较, 中药中剂量组 LPS 含量低 ($P<0.05$)。组间比较, IL-2 含量差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 5 各组 LPS、IL-2 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	LPS (EU/L)	IL-2 (ng/L)
假手术	7	207.39 ± 26.20	86.09 ± 12.52
模型	7	310.21 ± 30.51*	142.99 ± 26.28
中药低剂量	7	271.84 ± 28.22	105.84 ± 10.11
中药中剂量	7	227.37 ± 42.96 [△]	101.87 ± 6.71
中药高剂量	7	253.86 ± 21.15	94.64 ± 13.56

注: 与假手术组比较, * $P<0.05$; 与模型组比较, [△] $P<0.05$

讨 论

现代医学认为心衰是多脏器受累的临床综合征, 心衰发生时, 其伴发的血流动力学改变导致肠道内低灌注和淤血可改变肠道的形态、通透性及功能^[8], 进而出现微生物或内毒素移位, 加剧全身炎症反应^[9]。如 Sandek A 等^[10]报道 HF 患者肠系膜上动脉和腹腔动脉血流较低, 肠道转运减少了 54%, 水肿型患者肠道运输减少最为显著, 且体内出现较高浓度的 TNF 和 STNF-R1^[11]。Pasini E 等^[12]证实随着心功能分级递增, 心衰患者致病性肠道菌属和肠道通透性指数显著增加, 伴随着右心房压力及血 CRP 数值上升。Trøseid M 等^[13]发现慢性心衰患者肠道微生物代谢产物三甲胺-N-氧化物 (trimethylamine N-oxide, TMAO) 水平升高, 并证实 TMAO 可作为预测心衰患者预后不良的一项独立的危险因素。研究表明, 改善肠功能、对肠道微生态进行调控与治疗, 能有效改善心衰症状、阻止心衰进程^[14]。如 Costanza AC 等^[15]报道, 口服益生菌能改善心衰患者左心房内径和左室射血分数。从心-肠轴角度探讨心衰发病机制、寻找药物治疗的有效靶点, 开辟新的治疗途径, 成为该领域的研究热点。

TLR4 在宿主肠黏膜的天然免疫反应中起重要作用。在正常情况下, 肠道黏膜上皮细胞不表达或低表达 TLR4, 从而维持对内毒素的不敏感性, 使机体免于内毒素损伤^[16]。当肠道微生物屏障损伤、菌群移位发生时, TLR4 可向下通过激活髓样分化因子/肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (MyD88/Trif) 通路, 活化 NF- κ B 参与机体的炎症反应和免疫应答等^[17]。iReg 细胞是由初始 T 细胞刺激 Treg 上游关键转录因

子叉头 / Foxp3 表达后分化而来。在正常个体中, 肠道菌群与肠道免疫处于动态平衡, 在此平衡中主要以 Treg 及 TGF- β 等主导的抑炎反应为主。然而在易感基因、环境等多种因素的作用下, 肠道动态平衡被破坏介由 TLR 启动免疫应答, Th17/Treg 失衡、产生相应炎症反应^[18]。TLR4/Treg 信号转导是肠道免疫炎症反应中的重要病理过程。

心衰分属中医学“心痹”“水肿”范畴, 其病位主要在心, 与肺、脾、肾等他脏密切相关, 气虚血瘀、阳虚、水停是常见证候^[19]。本研究在前期临床实践中发现心衰患者除出现乏力、气短、水肿等主症外, 还常见腹胀、齿痕舌等脾胃失和表现^[20]。在中医经典方剂“五苓散”的基础上, 结合临床实际形成益心化浊方, 方中党参、黄芪补益心气, 丹参、三七活血化瘀, 白术、茯苓健脾化湿, 化橘红理气化痰、桂枝、泽泻温阳利水, 芍药滋阴健脾, 全方具有益气活血、健脾利水、温阳化浊功效。本研究发现, 慢性心衰大鼠出现心功能不全、心肌纤维化等心肌损伤时, 伴有肠黏膜损伤、血清内毒素增高的表现, 这与 Zhou GF 等^[21]报道结果相符。本研究中模型组动物小肠组织中 TLR4、NF- κ B、Trif 及 MyD88 蛋白表达增高, Foxp3 蛋白含量明显降低, 外周循环中 LPS 升高。LPS 又称为内毒素, 是革兰氏阴性菌壁的重要组成部分。在 LPS 激活或启动集体免疫系统的过程中, 首先被病原体相关分子模式受体 TLR4 识别, 并激活细胞内信号转导通路, 继而产生炎症介质^[22, 23], LPS 含有脂质 A, 可以通过紧密连接或乳糜微粒的帮助穿过肠黏膜^[24]。结果提示心衰发生时, 模型大鼠肠道出现了与 TLR4/Treg 信号转导密切相关的免疫炎症反应。本研究显示, 经益心化浊方干预后, 与模型组比较, 中药组心肌细胞肥大、组织纤维化程度减轻, 心功能和肠黏膜受损情况得到明显改善 ($P<0.05$), 表明益心化浊方具有通过心-肠轴治疗心衰的多靶点效应。结果显示, 中药组肠道组织中 TLR4、NF- κ B、Trif 及 MyD88 蛋白表达明显下调 ($P<0.05$)、Foxp3 表达上调 ($P<0.05$), 外周血中 LPS 降低 ($P<0.05$), 提示该方可能通过调控 TLR4/Treg 信号通路有效抑制肠道内过度免疫反应、缓解炎症。

综上所述, 益心化浊方能有效改善慢性心衰大鼠的心肌和肠道功能, 同时还能下调肠道组织中 TLR4、NF- κ B、Trif 及 MyD88 蛋白表达程度, 上调 Foxp3 蛋白表达程度。推测其治疗慢性心衰的功效与调控肠道 TLR4/Treg 信号通路有关。

利益冲突: 本文不存在利益冲突。

参 考 文 献

- [1] Ponikowski P, Anker SD, AlHabib KF, et al. Heart failure: preventing disease and death worldwide[J]. ESC Heart Fail, 2014, 1 (1): 4-25.
- [2] 王华. 中国心力衰竭的防控回顾[J]. 中国心血管杂志, 2019, 24 (5): 397-398.
- [3] Hari Krishnan S. Diet, the gut microbiome and heart failure[J]. Card Fail Rev, 2019, 5 (2): 119-122.
- [4] Shizuo Akira. Innate immunity and adjuvants[J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2011, 366 (1579): 2728-2755.
- [5] Shizue T, Akihiro S, Keisuke W, et al. Interleukin-7 receptor controls development and maturation of late stages of thymocyte subpopulations[J]. PNAS, 2013, 110 (2): 612-617.
- [6] 中国中西医结合学会心血管病专业委员会, 中国医师协会中西医结合医师分会心血管病学专家委员会. 慢性心力衰竭中西医结合诊疗专家共识 [J]. 中国中西医结合杂志, 2016, 36 (2): 133-141.
- [7] 汪菁峰, 丁雪峰, 朱凌偶, 等. 芪苈强心对心肌梗死后心力衰竭大鼠 miRNA 表达的调控作用 [J]. 中国分子心脏病学杂志, 2017, 17 (4): 2174-2179.
- [8] Ramezani A, Raj DS. The gut microbiome, kidney disease, and targeted interventions[J]. J Am Soc Nephrol, 2014, 25 (4): 657-670.
- [9] Sandek A, Bjarnason I, Volk HD, et al. Studies on bacterial endotoxin and intestinal absorption function in patients with chronic heart failure[J]. Int J Cardiol, 2012, 157 (1): 80-85.
- [10] Sandek A, Swidsinski A, Schroedl W, et al. Intestinal blood flow in patients with chronic heart failure: a link with bacterial growth, gastrointestinal symptoms, and cachexia[J]. J Am Coll Cardiol, 2014, 64 (11): 1092-1102.
- [11] Schaufelberger M, Ekman I, Björnsson E, et al. Studies on bacterial endotoxin and intestinal absorption function in patients with chronic heart failure[J]. Eur J Heart Fail, 2007, 9 (6): 574-578.
- [12] Pasini E, Aquilani R, Testa C, et al. Pathogenic gut flora in patients with chronic heart failure[J]. JACC Heart Fail, 2016, 4 (3): 220-227.
- [13] Trøseid M, Ueland T, Hoy JR, et al. Microbiota-dependent metabolite trimethylamine-N-oxide is associated with disease severity and survival of patients with chronic heart failure[J]. J Intern Med, 2015, 277 (6): 717-726.
- [14] Gan XT, Ettinger G, Huang CX, et al. Probiotic administration attenuates myocardial hypertrophy and heart failure after myocardial infarction in the rat[J]. Circ Heart Fail, 2014, 7 (3): 491-499.
- [15] Costanza AC, Moscovitch SD, Faria Neto HC, et al. Probiotic therapy with *Saccharomyces boulardii* for heart failure patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot trial[J]. Int J Cardiol, 2015, 179: 348-350.
- [16] Villena J, Kitazawa H. Modulation of intestinal TLR4-inflammatory signaling pathways by probiotic microorganisms: lessons learned from *Lactobacillus jensenii* TL2937[J]. Front Immunol, 2014, 4: 512.
- [17] Zou J, Shanker N. Roles of TLR/MyD88/MAPK/NF- κ B signaling pathways in the regulation of phagocytosis and proinflammatory cytokine expression in response to *E. faecalis* infection[J]. PLoS One, 2015, 10 (8): e0136947.
- [18] Annie L, Leach ST, Romain B, et al. The microbiota and epigenetic regulation of T helper 17/regulatory T cells: in search of a balanced immune system[J]. Front Immunol, 2017, 8: 1-14.
- [19] 王娟, 陈婵, 张鹏, 等. 630 例慢性心衰患者中医证候分布规律研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2013, 36 (8): 567-571.
- [20] 陈婵, 张鹏, 陈建新, 等. 冠心病心衰患者心功能分级与中医四诊及证候要素分布的研究 [J]. 中华中医药杂志, 2011, 26 (4): 870-872.
- [21] Zhou GF, Jiang YH, Ma DF, et al. Xiao-Qing-Long Tang prevents cardiomyocyte hypertrophy, fibrosis, and the development of heart failure with preserved ejection fraction in rats by modulating the composition of the gut microbiota[J]. Biomed Res Int, 2019: 9637479.
- [22] Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity[J]. Cell, 2006, 124 (4): 783-801.
- [23] Poltorak A, He X, Smirnova I, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in TLR4 gene[J]. Science, 1998, 282 (5396): 2085-2088.
- [24] Neal MD, Leapheart C, Levy R, et al. Enterocyte TLR4 mediates phagocytosis and translocation of bacteria across the intestinal barrier[J]. J Immunol, 2006, 176 (5): 3070-3079.

(收稿: 2020-07-10 在线: 2021-09-27)

责任编辑: 白 霞