

基于氧化应激调控的芪参颗粒干预心力衰竭大鼠的机制研究

曾紫凡¹ 张惠敏¹ 任莹璐¹ 焦世红² 王 伟¹

(1 北京中医药大学中医学院, 北京, 100029; 2 北京中医药大学生命科学院, 北京, 100029)

摘要 目的: 探讨芪参颗粒干预心力衰竭大鼠的药效研究, 并基于氧化应激探讨其作用机制。方法: 制备左冠脉结扎诱导的心力衰竭大鼠模型, 随机分为假手术组、模型组、芪参颗粒组、福辛普利组。通过苏木精-伊红染色(HE)法、Masson 染色分别观察各组大鼠心肌病理变化, 并采用实时荧光定量 PCR(RT-PCR)和蛋白印迹(Western blotting)法分别检测大鼠心肌中氧化应激关键分子 p47^{phox}、RAC1 的含量。结果: HE 染色和 Masson 染色显示模型组大鼠心肌细胞排列紊乱, 丧失正常结构, 心肌间质出现大量炎细胞浸润, 胶原过度沉积, 纤维明显增生; 而芪参颗粒与假手术组排列整齐, 细胞形态基本无变化, 几乎没有沉积的胶原蛋白。RT-PCR 和 Western blotting 显示模型组 p47^{phox}、RAC1 在 mRNA 与蛋白层面显著增高; 而芪参颗粒可显著降低 p47^{phox}、RAC1 的含量。结论: 芪参颗粒能显著改善左冠脉结扎诱导诱导的大鼠心力衰竭, 其机制可能与抑制 p47^{phox}、RAC1 诱导的氧化应激效应有关。

关键词 氧化应激; 芪参颗粒; 心力衰竭; 大鼠; 调控; 机制

Mechanisms of Qishen Granules on Heart Failure Rats by Regulating Oxidative Stress

Zeng Zifan¹, Zhang Huimin¹, Ren Yinglu¹, Jiao Shihong², Wang Wei¹

(1 School of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

2 School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

Abstract Objective: To study the effect and mechanisms of Qishen granules (QSG) on heart failure rats based on oxidative stress. **Methods:** Heart failure rat model was established by ligation of left coronary artery (LAD). Rats were randomly divided into four groups including sham group, model group, QSG group and Fosinopril group. The pathological changes of heart were assessed by Hematoxylin-Eosin (HE) and Masson's staining. Real-Time PCR and Western blot were respectively used to detect the mRNA and protein levels of p47^{phox} and RAC1, the key molecules in oxidative stress in each group. **Results:** HE and Masson's staining showed that the myocardial cells of rats in model group were disorderly arranged, and a large number of inflammatory cells were infiltrated in the interstitium. The collagen was excessively accumulated and the fibrous tissue was proliferated. On the contrast, the myocardial cells of rats in QSG and sham group were arranged in an order way and the collagen deposition was hardly observed. Real-Time PCR (RT-PCR) and Western blotting results showed that mRNA and protein levels of p47^{phox} and RAC1 were increased in the model group, and QSG could significantly inhibit the expression of them. **Conclusion:** QSG may improve the heart function of heart failure rats induced by left anterior descending artery ligation, and its mechanisms is probably related to the inhibition of oxidative stress.

Key Words Oxidative stress; Qishen granules; Heart failure; Mechanism

中图分类号: R285.5 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2018.05.045

心力衰竭(Heart Failure, HF)是多种心血管疾病的终末阶段, 中医认为心力衰竭病大致归属于胸痹、心悸、水肿、等范畴, 心力衰竭辨证又可分为寒凝证、血瘀证、痰浊证、阴虚证等^[1]。在心力衰竭过程中, 氧化应激水平不断增加, 实验研究中也表明氧化应激的增加可能导致心脏结构和功能的改变, 从而

使心力衰竭患者病情加重。NADPH 氧化酶依赖的超氧化物的产生是心脏氧化应激的最重要来源。在 NADPH 氧化酶的众多亚型中, Nox2 型和 Nox4 型在心血管系统分布广泛且在心力衰竭中发挥重要作用。在终末期心力衰竭患者心肌 NADPH 氧化酶活性增加^[2]; 在急性心梗患者和大鼠梗死区心肌细胞

基金项目: 国家自然科学基金项目(81530100; 81470191); 北京中医药大学基本科研业务费自主选题项目(2017-JYB-XS-003; 2017-JYB-XS-017)

作者简介: 曾紫凡(1992.09—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 中西医结合防治心脑血管疾病, E-mail: zeng_zif@163.com

通信作者: 王伟(1964.09—), 男, 博士, 研究员, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向: 中西医结合治疗心血管病、糖尿病并发症的作用机制与新药研究、心血管病的证治规律研究, E-mail: wangwei26960@126.com

Nox2 的表达显著升高^[3-4];Nox2-/-小鼠左冠脉前降支结扎术后 4 周心肌肥厚、凋亡、间质纤维化以及心功能等方面均优于野生型小鼠,进一步表明 Nox2 是心梗后心力衰竭氧化应激的重要参与因素^[5]。Nox2 型的 NADPH 氧化酶主要位于细胞膜,由膜结合的 Nox2(gp91^{phox})和 p22^{phox} 亚基组成,但是其活化需要 p67^{phox}、p47^{phox}、p40^{phox}、RAC1 参与组成完整的酶复合体^[6]。其中,p47^{phox}的磷酸化及易位和 RAC1 的易位在酶复合物的组装和激活过程中发挥着重要作用^[7]。

芪参颗粒是由黄芪、丹参、金银花等中药组成的复方制剂。前期研究^[8]发现,芪参颗粒具有心肌保护作用,且该药物能针对于 Nox2 型 NADPH 氧化酶有效的改善心力衰竭大鼠的心功能。本实验意在进一步研究芪参颗粒对心力衰竭大鼠心脏中 p47^{phox}和 RAC1 的影响,探讨其抗氧化应激的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 SPF 级正常雄性 Sprague-Dawley (SD)大鼠 90 只,体重(220 ± 10)g。购于北京维通利华实验动物中心。适应性喂养 1 周,恒温,恒湿,自由饮水,普通饲料。

1.1.2 药物 芪参颗粒由黄芪、丹参、金银花、甘草等 6 味中药组成,各药材饮片均购于北京同仁堂制药有限公司,按照课题组前期建立的方法制备^[9]。福辛普利由中美上海施贵宝制药有限公司提供,国药准字 H19980197。

1.1.3 试剂与仪器 TRIzol(Ambion,Thermo Scientific,美国),逆转录试剂盒(Thermo Scientific,USA,lot number:K1622),FastStart Universal SYBR Green Master(Roche,Germany,lot number:04913914001),引物(生工生物工程股份有限公司,上海),RIPA 裂解液(普利莱),蛋白酶抑制剂(Roche,Germany,lot number:04693116001),蛋白磷酸酶抑制剂(Roche,Germany,lot number:04906845001),Rac1(anti-Rac1 antibody,ab33186,Abcam,1:500)phospho-Rac1(anti-phospho Rac1 antibody,ab203884,Abcam,1:500);p47^{phox}(anti-p47^{phox} antibody,ab795,Abcam,1:500);phospho-p47^{phox}(anti-phospho-p47^{phox} antibody,PA5-36773,Thermo Fisher Scientific,1:500)

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 90 只 SPF 级 SD 大鼠常规饲料饲养,自由饮水。适应性饲养 1 周后,按照体重随机分为模型组 75 只和假手术组 15 只。模型组

进行左冠脉结扎(LAD),术后进行心电图检测,大鼠心电图标准 12 导联中出现 6 ~ 8 个导联 Q 波的模型组大鼠纳入研究范围。

1.2.2 干预方法 将其中 35 只造模成功大鼠随机分为 3 组,实验终末存活大鼠为:模型组 10 只,QSG 组 8 只和福辛普利组 6 只。10 只假手术组动物除穿线不结扎外,其余同模型组。QSG 组为等量临床等效剂量的两倍(18.66 g/kg);西药组给予福辛普利钠片 4.67 mg/kg,均以水溶方式每天灌胃给药,灌胃体积为 1.0 mL/100 g;假手术组和模型组动物给予同体积生理盐水,连续给药 28 d 后,摘取心脏,留取心脏组织进行 HE 与 Masson 染色。

1.2.3 检测指标与方法

1.2.3.1 荧光定量 PCR(Real-Time PCR,RT-PCR)法检测的 p47^{phox}、RAC1 表达 Trizol 法在冰上提取细胞总 RNA 逆转录逆转录为 cDNA。实时定量荧光 PCR;2^{-ΔΔCt} 法分析 mRNA 相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 RT-PCR 使用引物序列

基因	引物	核苷酸序列 5'→3'
p47 ^{phox}	Forward	ACCTGTCTGGAGAAGGTGCT
	Reverse	TAGGTCTGAAGGATGATGGG
RAC1	Forward	TGCGTTCCCTGGAGAGTACA
	Reverse	AACACGTCTGTTTGGCGGTA
GAPDH	Forward	ATTCCATCCCAGACCCATAAC
	Reverse	GCAGCGAACTTTATTGATGGTAT

1.2.3.2 Western blotting 法检测蛋白含量 RIPA 裂解缓冲液提取总蛋白;BCA 法蛋白定量;蛋白上样量 50 μg/10 μL,电压 80 ~ 120 V,电泳 1 ~ 1.5 h。将凝胶上的蛋白电转移至 NC 膜,以 5% 脱脂奶粉 37 ℃ 封闭 1 h,一抗与膜封入杂交袋 4 ℃ 过夜。TBS-T 漂洗 NC 膜 3 次,10 min/次;取出 NC 膜加入二抗,常温孵育 1 h,TBS-T 洗膜 3 次后,滴上 ECL 发光液,曝光。记录每条蛋白泳带的灰度值进行定量分析。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析,所有结果均以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。数据符合正态分布者采用方差分析法进行多组间比较,反之采用非参数检验方法分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 病理切片 HE 染色结果:LAD 后,假手术组心肌细胞完整,排列整齐,细胞形态基本无变化;模型组大鼠心肌细胞排列紊乱,心肌间质出现大量炎细胞浸润,丧失正常结构。而芪参颗粒组心肌细胞形

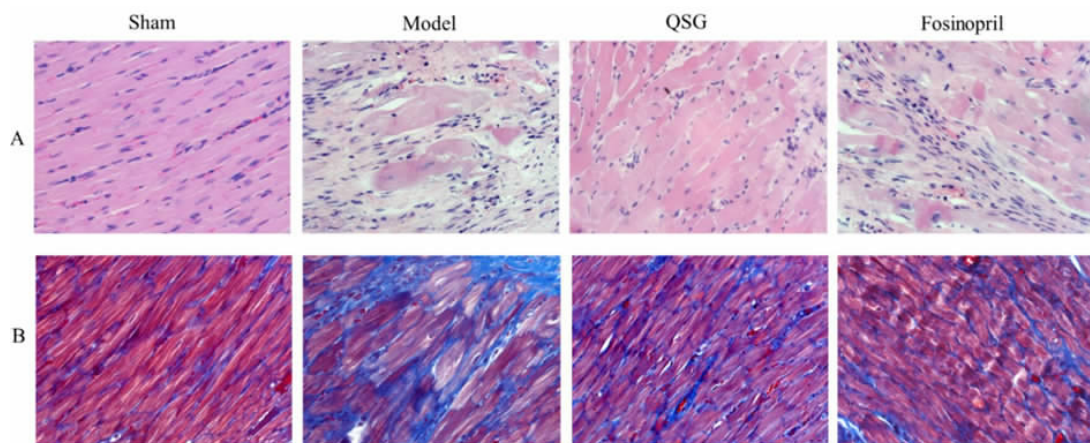


图 1 各组大鼠心肌组织病理切片 HE(A) 与 Masson 染色(B) (×400)

态均匀,较少发生炎细胞浸润,与阳性药福辛普利组一致。Masson 染色结果:光镜下观察,假手术组在心肌细胞中几乎没有沉积的胶原蛋白;而模型组心肌胶原过度沉积,纤维明显增生,呈网格状包绕心肌细胞。芪参颗粒组与阳性药组可显著减缓胶原沉积于纤维增生过程。

2.2 实时定量荧光 PCR 检测的 $p47^{phox}$ 、RAC1 的 mRNA 表达 与假手术组比较,模型组 $p47^{phox}$ 、RAC1 的 mRNA 表达升高;与模型组比较芪参颗粒组能降低心肌组织中 $p47^{phox}$ 、RAC1 的 mRNA 表达显著降低,与福辛普利组作用相似。

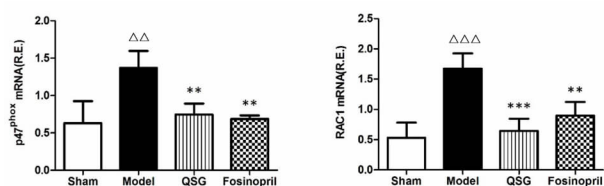


图 2 实时定量荧光 PCR 检测各组小鼠心肌组织中 $p47^{phox}$ 、RAC1 的 mRNA 表达

注:与模型组比较,^{*} $P < 0.01$;与模型组比较,^{***} $P < 0.001$;与正常组比较,^{△△} $P < 0.01$;与正常组比较,^{△△△} $P < 0.001$

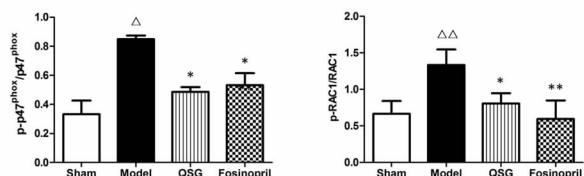


图 3 Western blotting 法检测各组小鼠心肌组织中 $p\text{-}p47^{phox}$ 、 $p47^{phox}$ 、 $p\text{-}RAC1$ 、RAC1 蛋白含量

注:与模型组比较,^{*} $P < 0.05$;与模型组比较,^{**} $P < 0.01$;与正常组比较,[△] $P < 0.05$;与正常组比较,^{△△} $P < 0.01$

2.3 Western blotting 检测 $p\text{-}p47^{phox}$ 、 $p47^{phox}$ 、 $p\text{-}$

RAC1、RAC1 的蛋白表达 模型组较假手术组 $p\text{-}p47^{phox}$ 、 $p\text{-}RAC1$ 蛋白表达明显升高,总 $p47^{phox}$ 、RAC1 蛋白无明显变化。治疗后芪参颗粒组和福辛普利组的 $p\text{-}p47^{phox}$ 、 $p\text{-}RAC1$ 蛋白表达均有下降且与模型组比较,差异有统计学意义。

3 讨论

心力衰竭是心血管系统疾病中的常见病,是多种器质性心脏病患者终末阶段时心脏功能代偿失调的综合征。随着对心力衰竭疾病病理过程认识的不断进步,西医对心力衰竭的治疗从短期地纠正血流动力学异常,逐步转变为长期地调控神经体液乃至试图逆转心肌异常着手。从“强心、利尿、扩血管”的心力衰竭常规治疗转变为“ACEI、利尿剂、 β 受体阻滞剂的联合应用,并用或不用地高辛”。前者可以迅速缓解呼吸困难、水肿等症状,提高心功能;而 ACEI、 β 受体阻滞剂治疗则可促使心力衰竭病死率的下降。

虽然西医治疗心力衰竭已取得可喜的进展,但仍存在安全系数低、适应范围窄、不良反应较大等问题^[10]。中医药采用益气温阳、活血利水等方法能够减轻心力衰竭患者症状、提高生命质量。芪参颗粒是本团队治疗心力衰竭的效方,以温阳益气、活血解毒配伍为特色,前期研究^[11]表明该方可有效改善心力衰竭大鼠心功能,调控 NADPH 氧化酶活性,干预氧化应激。本研究以 NOX2 型 NADPH 氧化酶活性为切入点,通过建立大鼠 LAD 模型,采用心脏病理切片技术、定量荧光 PCR 法及 western blotting 的检测技术,首次研究芪参颗粒对 NOX2 下游的 $p47^{phox}$ 、RAC1 基因和蛋白进行定量研究。

通过本研究可以明确的结论有芪参颗粒可显著提高 LAD 大鼠的心功能,减缓 LAD 大鼠心肌细胞

结构改变程度,抑制心肌胶原过度沉积与纤维增生。 $p47^{phox}$ 、RAC1 在模型组心肌细胞内的表达较假手术组升高即心力衰竭的确会促进氧化应激的发生这一点与国内外的研究结论一致。芪参颗粒用药 4 周后对 $p47^{phox}$ 和 RAC1 表达的确有影响,并与福辛普利作用相似,即调控氧化应激是芪参颗粒心肌保护作用的机制之一。

仍需进一步研究的问题:首先,我们没有检测不同剂量水平芪参颗粒对氧化应激的影响,所以剂量和效果之间的关系还有待进一步研究。其次,虽然芪参颗粒在我们以往的研究中的成分相对清晰,但有效成分和靶点之间的直接关系尚不清楚。最后,我们这次只关注芪参颗粒在 LAD 模型动物中 $p47^{phox}$ 、RAC1 表达情况。为了阐明整体情况,芪参颗粒对心力衰竭的其他模型,如主动脉弓缩窄术模型、过量异丙肾上腺素致大鼠心力衰竭模型等都需要验证。在后续实验中本课题组在已有实验结论的基础上进一步会根据不同的模型进行多方位的验证探索芪参颗粒改善心功能的作用。

参考文献

- [1] 曲扬,戎靖枫,杭宇,等.心力衰竭病的中医辨证论治[J].中西医结合心脑血管病杂志,2017,15(19):2497-2498,2512.
- [2] Krijnen PA, Meischl C, Hack CE, et al. Increased Nox2 expression in human cardiomyocytes after acute myocardial infarction[J]. J Clin Pathol, 2003, 56(3):194-199.

- [3] Fukui T. Expression of p22-phox and gp91-phox, essential components of NADPH oxidase, increases after myocardial infarction. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 281(5):1200-1206.
- [4] Looi YH. Involvement of Nox2 NADPH oxidase in adverse cardiac remodeling after myocardial infarction. Hypertension, 2008, 51(2):319-325.
- [5] Akki A, Zhang M, Murdoch C, et al. NADPH oxidase signaling and cardiac myocyte function[J]. J Mol Cell Cardiol, 2009, 47(1):15-22.
- [6] Li JM, Shah AM. Intracellular localization and preassembly of the NADPH oxidase complex in cultured endothelial cells[J]. J Biol Chem, 2002, 277(22):19952-19960.
- [7] Nediani C, Borch E, Giordano C, et al. NADPH oxidase-dependent redox signaling in human heart failure: relationship between the left and right ventricle[J]. J Mol Cell Cardiol, 2007, 42(4):826-834.
- [8] 冯玄超,郭淑贞,廉洪建,等.益心解毒方对气虚血瘀证心力衰竭大鼠心肌组织中 NOX2 和 NOX4 的影响[J].中华中医药杂志, 2015, 30(7):2535-2538.
- [9] Xia K, Wang Q, Li C, et al. Effect of QSKL on MAPK and RhoA Pathways in a Rat Model of Heart Failure[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2017, 2017(8):3903898.
- [10] 张碧华,杨莉萍,唐鹏.慢性心力衰竭与中医相关病证的渊源与发展[J/OL]. 中国中西医结合杂志, 1-3(2017-09-06). <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2787.R.20170906.1427.002.html>.
- [11] 解华.基于 NADPH 氧化酶活性调控的益心解毒方治疗心力衰竭的分子机制研究[D].北京:北京中医药大学,2015.

(2017-12-19 收稿 责任编辑:王明)

2018 年第二十七次全国中西医结合肝病学术会议征文通知(第一轮)

由中国中西医结合学会肝病专业委员会举办的 2018 年第 27 次全国中西医结合肝病学术会议拟于 2018 年 6 月 15-16 日在天津市召开。会议将以常见慢性肝胆疾病(慢性病毒性肝炎、肝纤维化、肝硬化、肝癌、脂肪性肝病、乙醇性肝病)的中西医结合防治研究进展和临床经验总结为重点展开交流与讨论,并将邀请国内知名专家做特邀报告。参会代表将获国家级继续教育学分。

征文要求:

(1)提交 500~1000 字中英文摘要。摘要须按照“目的、方法、结果、结论”格式撰写,用于会刊印刷(注意结果中提供重要的数据资料)。另提交中文论文全文(用于评审优秀论文)。写明作者姓名、单位名称、电子邮箱、地址及邮编。通过电子邮件发送至 zgzyjhgxbxh@126.com。本次征文不接受

纸质文稿。

(2)投稿论文文本格式如下:中文标题用黑体、小四号字体,作者姓名及单位用楷体小五,正文宋体五号,1.5 倍行距,英文及数字用 Times New Roman 字体。

(3)已在学术刊物公开发表过的论文,不再受理。

(4)征文截稿日期:2018 年 5 月 15 日。

会议筹备组联系人:

张 华 13524968650, 王 晓 柠 15121188831, 冯 琴 13764380682

邮箱:zgzyjhgxbxh@126.com

欢迎肝病防治领域的广大临床和科研工作者踊跃投稿!

中国中西医结合学会肝病专业委员会

2018 年 1 月 16 日