

自拟强心汤对心梗后心力衰竭大鼠心肌舒缩功能的实验研究

高占义¹ 魏月娟¹ 王彦敏² 李二娟¹ 张 珊¹ 王庆海³

(1 河北医科大学附属沧州中西医结合临床学院内科, 沧州, 061000; 2 河北医科大学附属沧州中西医结合临床学院超声科, 沧州, 061000; 3 河北医科大学附属沧州中西医结合临床学院科教科, 沧州, 061000)

摘要 目的:探讨自拟强心汤对心梗后心力衰竭大鼠心肌舒缩功能的作用机制。方法:采用结扎左冠状动脉法制备大鼠心梗后慢性心力衰竭动物模型;8 周后,给予药物灌胃治疗;经治疗 4 周后,采用通过颈动脉插管测定大鼠血流动力学状态,通过实时荧光定量 PCR(FQ-PCR)法和 Western Bolt 法检测心肌钙调控蛋白肌浆网钙泵(SERCA2a)、雷尼丁受体 2(RYR2)mRNA 水平及其蛋白表达量。结果:模型组大鼠的心功能显著下降,主要表现在血流动力学参数改变,其中左室舒张末期压(LVEDP)明显升高($P < 0.01$),左室收缩压(LVSP)、左室上升最大速率(+LVdp/dtmax)及左室下降最大速率(-LVdp/dtmax)绝对值均降低($P < 0.05$);心肌钙调控蛋白 SERCA2a、RYR2 mRNA 水平及其蛋白表达量均明显下降($P < 0.05$)。给予自拟强心汤干预后,能够有效的降低心力衰竭大鼠 LVEDP 水平($P < 0.05$),升高 LVSP、+LVdp/dtmax、-LVdp/dtmax 水平($P < 0.01$);能够升高心肌钙调控蛋白 SERCA2a、RYR2 mRNA 及其蛋白表达量的水平($P < 0.05$)。结论:自拟强心汤能够有效的改善心力衰竭大鼠的心功能,其机制可能与升高心肌钙调控蛋白 SERCA2a、RYR2 的蛋白表达量,改善钙循环有关。

关键词 自拟强心汤;慢性心力衰竭;心肌舒缩功能;血流动力学

Study on myocardial systolic and diastolic function of Qiangxin Tang on heart failure after myocardial infarction in rats

Gao Zhanyi¹, Wei Yuejuan¹, Wang Yanmin², Li Erjuan¹, Zhang Shan¹, Wang Qinghai³

(1 Department of Cardiology, Cangzhou integrated traditional Chinese and Western Medicine Clinical College, Hebei Medical University, Cangzhou 061000, China; 2 Department of ultrasound, Cangzhou integrated traditional Chinese medicine and Western medicine, Hebei Medical University, Cangzhou 061000, China; 3 Hebei Medical University affiliated Cangzhou integrated traditional Chinese and Western Medicine College of science and education, Cangzhou 061000, China)

Abstract Objective: To clarify myocardial systolic and diastolic function and possible mechanism of Qiangxin Tang on the model of heart failure. **Methods:** Model of heart failure after myocardial infarction was prepared by left coronary artery ligation. After 8 weeks, take a lavage treatment every day; After 4 weeks of continuous administration, cardiac hemodynamics parameters were recorded and SERCA2a, RYR2 mRNA level were detected by PCR (FQ-PCR) and SERCA2a, RYR2 protein expression were detected by Western bolt. **Results:** compared with control group, cardiac function of model group is lower; hemodynamic parameters LVEDP is increased obviously ($P < 0.01$), LVSP, +LVdp/dtmax and -LVdp/dtmax absolute values were all lower ($P < 0.05$), and the calmodulin SERCA2a and RYR2 mRNA and protein relative expression of model group rats was decreased ($P < 0.05$). Compared with model group, Qiangxin Tang group could reduce LVEDP levels ($P < 0.05$), increase LVSP, +LVdp/dtmax and -LVdp/dtmax levels ($P < 0.01$), and the calmodulin SERCA2a and RYR2 mRNA and protein relative expression of Qiangxin Tang were higher. **Conclusion:** Qiangxin Tang can effectively improves cardiac function in heart failure rats; Its mechanism is related with improving calmodulin SERCA2a, RYR2 and improving calcium cycle.

Key Words Qiangxin Tang; Chronic Heart Failure; Myocardial systolic and diastolic function; hemodynamic

中图分类号: R285.5 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2016.11.042

自拟强心汤是由附子、白术、茯苓等温阳、利水中药组成的复方制剂,临证治疗心肾阳虚型心力衰竭病。RyR2 是肌浆网上的钙离子释放通道,负责使

Ca^{2+} 从肌质网中释放出来,促进 Ca^{2+} 与肌钙蛋白 C 结合,使肌动蛋白和肌球蛋白结合,形成横桥,启动心肌收缩^[1]; SERCA2a 为肌浆网钙泵,负责将胞质

基金项目:河北省中医药管理局“自拟强心汤调控 CaN-NFAT 信号通路干预慢性心力衰竭的临床研究”(编号:2015287)

作者简介:高占义(1977.06—),男,学士,主治医师,研究方向:主要从事心血管疾病的临床、科研、教学及介入治疗工作, Tel: (0317) 2179083, E-mail: gaozhanyi1977@163.com

内大部分 Ca^{2+} 回摄入肌浆网内并储存,使 Ca^{2+} 浓度迅速下降,并与肌钙蛋白 C 解离,横桥解除,使心肌细胞舒张^[2]。二者分别负责 Ca^{2+} 的释放和摄取,进而保证正常的钙循环,而钙循环的紊乱可导致心肌舒缩功能的障碍。本实验旨在研究自拟强心汤对心力衰竭大鼠心肌钙调控蛋白 SERCA2a、RyR2 含量的影响,进而探讨自拟强心汤改善心梗后心力衰竭大鼠心肌舒缩功能的作用机制及干预环节。

1 材料与方法

1.1 动物 正常雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠,体重(200 ± 10)g,清洁级。

1.2 药物与试剂 自拟强心汤由附子、白术、茯苓等 11 味中药组成,均由沧州中西医结合医院提供,并于此院中药房完成制剂;缙沙坦胶囊(代文)由施维雅(天津)制药有限公司生产;PCR 试剂盒;cDNA 合成试剂盒;BCA 蛋白质定量试剂盒;

1.3 仪器 PowerLab/4SP 生物信号处理分析系统(澳大利亚 ADI 公司生产);MLT1050/D 型高精度压力换能器(澳大利亚 ADI 公司生产);Chart v 5.0 记录和分析软件(澳大利亚 ADI 公司生产);ALC-V8S 小动物呼吸机(奥尔科特科技生物有限公司生产)。

1.4 分组与给药 将清洁级 SD 大鼠常规饲料饲养,自由饮水。适应性饲养 1 周后,按照完全随机分为假手术组 10 只,模型组、缙沙坦组、自拟强心汤组各 18 只。对除假手术组外的其他各组行左冠脉结扎术,10 只假手术组动物除穿线不结扎外,其余操作同模型组。术后 8 周开始灌胃给药,根据“实验动物与人按体表面积等效量换算比率”折算^[3],模型组和对照组予同体积的蒸馏水灌胃;缙沙坦组予代文悬浊液灌胃,给药剂量为 8 mg/kg;自拟强心汤组予自拟强心汤水溶液灌胃,给药剂量为 0.9 g/kg。连续给药 4 周,给药 1 次/d。

1.5 大鼠模型制作 根据徐淑云^[3]的《药理实验方法学》采用冠状动脉结扎法(LAD)制备大鼠慢性心力衰竭模型,将雄性 SD 大鼠喂养一周,术前禁食 12 h,用 3% 的戊巴比妥钠行腹腔麻醉,按照每公斤 35 mg 注射,麻醉好后将大鼠于手术台上固定,于手术部位备皮,经气管插管,连接呼吸机保证呼吸功能,在大鼠四肢皮下连接心电监护。沿左侧胸前第 3、4 肋间部位将皮肤切开并逐层分离,打开胸腔,沿肋间切开,向上推开胸腺,扯开胸膜及心包膜,找到左心耳,在左心耳下方 2 ~ 3 mm 处用 5.0 号丝线穿过左冠状动脉前降支进行结扎。结扎后左室壁的颜色由红变白,同时会出现心室壁运动减弱等表现。

同时,心电监护显示 II 导联 R 波振幅明显升高,随后出现的 ST 段亦明显抬高,证实结扎手术成功。待稳定后,关闭胸腔并逐层缝合。对照组大鼠穿线后不行结扎术,术后均用青霉素(40 万 U/只)连续抗感染治疗 2 d^[4]。

1.6 血流动力学的测定^[5] 在灌胃给药 4 周后,采用生物信号处理分析系统测定大鼠血流动力学,术前予禁食不禁水,称重后先用肝素钠抗凝 30 min,按照每公斤体重 1200 μ/kg 注射,之后用戊巴比妥钠行腹腔麻醉。将麻醉好的大鼠仰卧固定于手术台上,从右侧颈部分离右侧颈总动脉,固定切口,用一根线结扎动脉远心端,在另一端插入心导管,通过生物信号处理和分析系统记录血流动力学参数;首先,将心导管在颈总动脉中观测心率,待心率稳定后,将心导管推入左心室,待稳定后,记录大鼠左心室收缩压(LVSP)、左室舒张末压(LVEDP)、左室压力上升和下降变化最大速度的参数值(±LVdp/dtmax)。

1.7 心肌钙调控蛋白 SERCA2a、RyR2 mRNA 表达及其蛋白相对表达量的测定 提取心肌组织,采用实时荧光定量 FQ-PCR 法检测 SERCA2a、RyR2 mRNA 水平,采用 Western blotting 法测定钙调控蛋白 SERCA2a、RyR2 的蛋白相对表达量(SERCA2a/GAPDH、RyR2/GAPDH)。

1.8 统计学方法 所得实验数据均以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用统计软件 SPSS 16.0 进行统计分析,数据经分析均符合正态分布,组间比较用单因素方差分析法(One-Way ANOVA),对于方差齐的数据,两两比较用最小显著差法(LSD 法),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血流动力学测定结果 与对照组相比,模型组大鼠 LVEDP 水平明显升高,LVSP 水平明显降低($P < 0.01$), + LVdp/dtmax 及 -LVdp/dtmax 绝对值亦均降低($P < 0.05$);提示心力衰竭时,大鼠心肌舒张和收缩功能减退。经治疗后,各用药组与模型组相比,缙沙坦组能降低心力衰竭大鼠 LVEDP 水平($P < 0.05$),升高 + LVdp/dtmax 及 -LVdp/dtmax 水平($P < 0.01$);自拟强心汤组能降低心力衰竭大鼠 LV-EDP 水平($P < 0.05$),升高 LVSP、+ LVdp/dtmax 水平($P < 0.01$),亦能升高大鼠 -LVdp/dtmax 水平($P < 0.05$)。各组间心率差异无统计学意义。见表 1、2。

2.2 各组大鼠心肌钙调控蛋白 SERCA2a、RyR2 mRNA 的测定 采用 FQ-PCR 法检测心肌钙调控蛋

白 SERCA2a、RyR2 mRNA 的相对表达量 (SERCA2a/GAPDH、RyR2/GAPDH)。结果显示:与对照组比较,模型组大鼠心肌钙调控蛋白 SERCA2a、RyR2 mRNA 的表达量均下降($P<0.01$),提示心力衰竭时心肌舒缩功能下降。经治疗后,与模型组比较,仅有自拟强心汤组心肌钙调控蛋白 SERCA2a 和 RyR2 mRNA 水平平均升高($P<0.05$);而缬沙坦组的差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 3。

表 1 各组大鼠心率及左室内压测定结果($\bar{x}\pm s$)

组别	HR(次/min)	LVSP(mmHg)	LVDP(mmHg)
对照组	323.4±55.8	162.2±11.8	10.7±2.1
模型组	316.1±44.6	139.6±22.5**	21.5±5.1**
自拟强心汤组	326.1±27.1	162.5±13.6♦♦	16.8±4.0♦
缬沙坦组	305.1±22.6	153.1±18.1	17.1±4.6♦

注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,♦ $P<0.05$,♦♦ $P<0.01$ 。

表 2 各组大鼠 +LVdp/dtmax 测定结果($\bar{x}\pm s$,mmHg/s)

组别	+LVdp/dtmax	-LVdp/dtmax
对照组	9217.7±950.4	-8501.3±1266.1
模型组	10025.8±1429.7♦♦	-8197.0±1773.6♦
自拟强心汤组	10138.3±1650.7♦♦	-8174.1±1958.2♦
缬沙坦组	9841.4±1589.2♦♦	-8771.1±1698.9♦♦

注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,♦ $P<0.05$,♦♦ $P<0.01$ 。

表 3 各组大鼠 SERCA2a、RyR2 mRNA 的测定结果($\bar{x}\pm s$,%)

组别	SERCA2a	RyR2
对照组	23.3±4.6	15.2±9.0
模型组	11.0±1.9**	4.5±3.1**
自拟强心汤组	18.6±5.4♦	13.3±2.1♦
缬沙坦组	12.6±3.2	8.7±6.0

注:与对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,♦ $P<0.05$,♦♦ $P<0.01$ 。

表 4 各组大鼠 SERCA2a、RyR2 蛋白相对表达量的测定结果($\bar{x}\pm s$,%)

组别	SERCA2a	RyR2
对照组	2.51±0.98	1.57±0.59
模型组	0.95±0.88**	0.91±0.64**
自拟强心汤组	1.98±1.33♦	1.39±0.84♦
缬沙坦组	0.94±0.79	0.67±0.20

注:与对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,♦ $P<0.05$,♦♦ $P<0.01$ 。

2.3 各组大鼠心肌钙调控蛋白 SERCA2a、RyR2 蛋白相对表达量的测定 与空白对照组比较,模型组大鼠心肌钙调控蛋白 SERCA2a、RyR2 蛋白相对表达量均下降($P<0.01$),提示心力衰竭时心肌舒缩功能下降。经治疗后,与模型组比较,仅有自拟强心

汤组心肌钙调控蛋白 SERCA2a、RyR2 蛋白相对表达量水平升高($P<0.05$);而缬沙坦组的差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 4。

3 讨论

心力衰竭是最常见的心血管疾病之一,心功能的异常体现在舒张与收缩功能 2 个方面,在导致心肌舒缩功能异常的众多因素中,心肌兴奋收缩耦联障碍占有重要地位,其中,钙循环的异常是导致兴奋收缩耦联障碍发生的重要原因之一^[6]。研究显示,心肌细胞的舒张功能与胞质内 Ca²⁺ 清除相关,胞质内 Ca²⁺ 消除主要是经 SERCA2a 再摄取^[7],心肌细胞收缩性的强弱是由胞质内 LTCC、RyR2 的状态以及肌浆网钙含量等因素决定^[8]。总之,肌浆网中钙离子循环是心肌收缩和舒张的重要环节,而钙循环包括钙回摄、钙释放及钙储存 3 个过程,任一过程的异常都将导致心肌细胞内钙稳态的破坏,这种破坏是心力衰竭心肌细胞舒缩功能下降的主要原因^[9]。

目前强心药物的主要作用机制是通过增加 Ca²⁺ 的浓度来增加心肌收缩力。而研究表明长期使用会产生钙超载现象,早期心肌细胞内 Ca²⁺ 浓度的升高,使心肌收缩力的加强,但是 Ca²⁺ 的持续增高使 Ca²⁺ 与肌钙蛋白解离过程发生障碍,造成心肌舒张功能的异常^[10]。再者,Ca²⁺ 急骤增多能够诱发持久而严重的肌丝挛缩,形成收缩带甚至发生肌丝断裂;在其过程中会消耗大量等能量物质,最终导致细肌丝横桥摆动无力,进而阻碍心肌收缩^[11]。此外,钙循环的异还可激活由 Ca²⁺ 为上游的信号分子,如蛋白激酶、钙调神经磷酸酶等,而这些信号分子能诱导心肌细胞肥厚和细胞死亡,最终导致心肌重构,此为发生心力衰竭的最基本机制^[12]。新型的强心药即钙离子敏感药(如左西孟旦),是通过增加肌钙蛋白对 Ca²⁺ 的敏感性而增加心肌收缩力。其过程不增加细胞内 Ca²⁺ 浓度,所以不会引起 Ca²⁺ 超载所致的心律失常的问题,也不需要增强 Ca²⁺ 转运时的能量消耗,不良反应较少^[13]。目前,许多临床试验已证实了左西孟旦的安全性和有效性,短期使用可以明显改善心力衰竭症状,但是对长期生存率的影响还有待进一步研究,而且亦没有提示改善心室重构的问题。因此,本实验从中医药角度探讨中医中药改善钙循环,进而改善心肌舒缩功能的作用机制。

本实验结果显示,与空白对照组比较,模型组大鼠心肌钙调控蛋白 SERCA2a 的相对表达量下降,提示心力衰竭时大鼠钙回摄能力减弱,影响了胞质内的钙清除,使舒张功能受损;RyR2 mRNA 及其蛋白表

达亦下降,影响了钙释放,导致钙储量减少,影响了心肌细胞的收缩,2者共同导致心肌兴奋收缩耦联过程障碍,导致心肌舒缩功能的下降。研究中血流动力学参数也发生改变,心力衰竭大鼠 LVEDP 水平上升、 $-dp/dt \max$ 水平的下降,可反映心肌舒张功能的减退;LVSP、 $+LVdp/dt\max$ 的下降可反映心肌收缩功能的障碍;与前者相符。从中医角度说明,在心力衰竭时,因心气推动无力,导致心输出量、心肌收缩力和心室顺应性明显下降,进而舒缩功能减退。经治疗后,采用温补心肾法可以增加 SERCA2a、RyR2 mRNA 及其蛋白表达量,增加钙回摄、钙释放能力,提高心肌细胞的收缩和舒张速率,改善钙循环,进而改善心肌舒缩功能。血流动力学测定结果亦显示,采用温补心肾法亦能降低 LVEDP 水平,升高-LVdp/dtmax、LVSP、 $+LVdp/dt\max$ 水平,进而改善心肌舒缩功能。

近年来,在治疗 CHF 的治法中,90% 左右采用益气温阳、活血利水之法,临床效果显著^[14-15]。自拟强心汤是通过采用温补心肾,温阳利水的方法改善心肌 SERCA2a、RyR2 的表达,进而改善钙循环。其治疗方式不是单纯以增加心肌细胞内钙离子浓度为目的,而是通过改善心肌细胞的舒张和收缩速率,进而改善心功能,为临床治疗提供新的思路。

参考文献

- [1] 杨泉,盖鲁粤,何昆仑. Ryanodine 受体与心力衰竭[J]. 现代诊断与治疗,2008,19(1):41-43,50.
 - [2] Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling[J]. Nature,2002,415(6868):198-205.
 - [3] 徐淑云. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2005:276.
 - [4] 喻斌,周静,吕高红,等. 心梗所致心衰大鼠模型复制的改良初探及评价[J]. 中国药理学通报,2011,27(4):577-580.
 - [5] 吕汝西,黄家卓,刘强. 冠状动脉结扎制备大鼠心肌梗死模型及血流动力学检测[J]. 广东医学院学报,2011,29(1):5-8,12.
 - [6] Thomas R. Shannon, Wilbur Y. W. Lew. Diastolic Release of Calcium From the Sarcoplasmic Reticulum[J]. Journal of the American College of Cardiology,2009,53(21):2006-2008.
 - [7] Periasamy M, Kalyanasundaram A. SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease[J]. Muscle Nerve,2007,35(4):430-442.
 - [8] Yano M, Ikeda Y, Matsuzaki M. Altered intracellular Ca^{2+} handling in heart failure[J]. J Clin Invest,2005,115(3):556-564.
 - [9] 胡淑婷. 慢性心衰大鼠心肌细胞钙调控异常及药物干预的研究[D]. 上海:第二军医大学,2011.
 - [10] 朱蕊,黄晶. 舒张性心力衰竭的发病机理与治疗进展[J]. 心血管病学进展,2006,27(2):170-172.
 - [11] 王娜,张建平,徐华洲,等. 补中益气汤对阿霉素诱导心衰大鼠的保护作用[J]. 中国中药杂志,2011,36(4):508-510.
 - [12] 史君,王静,王星,等. 肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素-6 在高血压心肌梗厚大鼠实验中的意义[J]. 中国医药导报,2012,9(6):23-25.
 - [13] 杜贺,史承勇,陈少萍. 左西孟旦的研究新进展[J]. 中国循环杂志,2014,29(7):555-557.
 - [14] 玛依努尔. 斯买拉洪,迟新栋,等. 益气温阳活血利水方治疗慢性充血性心力衰竭的疗效及对神经内分泌、炎性因子的影响研究[J]. 陕西中医,2015,36(7):804-805.
 - [15] 沈淑静,洗绍祥,黄衍寿,等. 益气温阳活血利水中药对心力衰竭兔的血流动力学影响和配伍研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2013(5):195-199.
- (2016-01-14 收稿 责任编辑:张文婷)
-
- (上接第 2362 页)
- [6] 高文艳,王长洪. 血瘀在溃疡性结肠炎发病机制中的研究现状[J]. 中国中西医结合消化杂志,2006,14(1):63-65.
 - [7] Sands BE, Kaplan GG. The role of TNF- α in ulcerative colitis[J]. Journal of Clinical Pharmacology,2007,47(8):930-941.
 - [8] 赵曼,高峰. 溃疡性结肠炎发病机制研究进展[J]. 现代生物医学进展,2010,10(16):3160-3165.
 - [9] 毛靖伟,唐海英,王英德. MMP-1、TIMP-1 和 TNF- α 在溃疡性结肠炎中表达的意义[J]. 胃肠病学和肝病杂志,2009,18(8):738-740,743.
 - [10] Yang L, Froio RM, Sciuto TE, et al. ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF- α -activated vascular endothelium under flow[J]. Blood,2005,106(2):584-592.
 - [11] Scaldaferrri F, Sans M, Vetrano S, et al. The role of MAPK in governing lymphocyte adhesion to and migration across the microvasculature in inflammatory bowel disease[J]. Eur J Immunol,2009,39(1):290-300.
 - [12] Scaldaferrri F, Vetrano S, Sans M, et al. VEGF-A links angiogenesis and inflammation in inflammatory bowel disease pathogenesis[J]. Gastroenterology,2009,136(2):585-595, e5.
 - [13] 王新月,王建云. 溃疡性结肠炎中医药治疗的关键问题与优势对策[J]. 中华中医药杂志,2012,27(2):263-266.
 - [14] 中华中医药学会脾胃病分会. 溃疡性结肠炎中医诊疗共识意见[J]. 中华中医药杂志,2010,25(6):891-895.
 - [15] 沈洪,张声生,王垂杰,等. 中药分期序贯治疗轻中度溃疡性结肠炎临床观察[J]. 中华中医药杂志,2012,27(2):1788-1791.
- (2015-09-21 收稿 责任编辑:张文婷)