

强心方改善心肌梗死后心力衰竭大鼠心功能的实验研究

魏月娟 韩 琳 高占义

(河北医科大学附属沧州中西医结合临床学院心内科, 沧州, 061000)

摘要 目的:观察强心方对心肌梗死后心力衰竭大鼠心肌重构的影响,探讨其治疗心肌梗死后心力衰竭大鼠的作用机制。方法:选取结扎左冠状动脉法制备大鼠心肌梗死后慢性心力衰竭动物模型;将心肌梗死的 54 只大鼠随机分为强心方组、缬沙坦组、模型组,每组 18 只,另选 10 只为对照组,对照组大鼠穿线后不行冠脉结扎,其余操作同模型组。12 周后通过彩色多普勒超声心动图检测左室舒张末期内径(LVDd)、左室收缩末期内径(LVDs)、射血分数(EF);采用酶联免疫吸附试验法(ELISA)测定血浆钙调磷酸酶(CaN)的水平;采用 Western Blotting 法检测心肌钙调控蛋白肌浆网钙泵(SERCA2a)、雷尼丁受体 2(RYR2)、活化 T 细胞核因子(NFAT3)蛋白表达。结果:模型组即未经中药和西药灌胃治疗的大鼠心功能明显下降,心肌钙调控蛋白 SERCA2a、RYR2 表达均明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05$);CaN、NFAT3 的表达明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。给予强心方灌胃治疗后强心方组,大鼠的心功能得到明显的改善,心肌钙调控蛋白 SERCA2a、RYR2 的表达得到明显的升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),CaN、NFAT3 水平明显降低。结论:强心方能够有效的改善心力衰竭大鼠的心功能,改善钙回摄及钙释放,抑制心肌重构,其作用机制可能与抑制 CaN-NFAT3 信号通路相关。

关键词 强心方;慢性心力衰竭;钙循环;CaN-NFAT3 信号通路;心肌舒缩功能;心肌重构;肌浆网钙泵;心肌兴奋收缩耦联;慢性心力衰竭动物模型

Experiment Study on Myocardial Function of Qiangxin Recipe on Heart Failure after Myocardial Infarction in Rats

Wei Yuejuan, Han Lin, Gao Zhanyi

(Department of Cardiology, Cangzhou Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Hebei Medical University, Cangzhou 061000, China)

Abstract Objective: To observe the effects of Qiangxin Recipe on myocardial remodeling in rats with heart failure after myocardial infarction and to explore its mechanism of action in treating heart failure rats after myocardial infarction. **Methods:** Model of heart failure after myocardial infarction was prepared by left coronary artery ligation. Lavage treatment was given. The LVDd, LVDs and EF were measured by color Doppler echocardiography after 12 weeks. The level of plasma CaN was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The expressions of SERCA2a, RYR2 and NFAT3 in cardiac muscle were detected by Western-blot. **Results:** The cardiac function of model rats decreased significantly. The expression of SERCA2a and RYR2 in myocardium decreased significantly ($P < 0.05$), and the difference was statistically significant. The contents of CaN and NFAT3 were significantly increased, and the difference was statistically significant. After Qiangxin Recipe intervention, it can effectively improve the heart function of rats, and significantly increase the protein expression of SERCA2a and RYR2 ($P < 0.05$). The contents of CaN and NFAT3 were significantly decreased. **Conclusion:** Qiangxin Recipe can effectively improve cardiac function, improve calcium remission and calcium release, and inhibit myocardial remodeling in rats with heart failure, and its mechanism may be related to the inhibition of CaN-NFAT3 signaling pathway.

Key Words Qiangxin Recipe; Chronic heart failure; Calcium cycle; CaN-NFAT3 signal pathway; Myocardial contraction function; Myocardial remodeling; Myoplasmic reticulum calcium pump; Myocardial excitatory contraction coupling; Chronic heart failure animal model

中图分类号: R289.5; R541.4

文献标识码: A

doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2019.08.021

基金项目: 河北省中医药管理局科研计划项目(2015287)——自拟强心汤组方调控 CaN - NFAT 信号通路干预慢性心衰的临床研究及实验研究

作者简介: 魏月娟(1985.09—),女,硕士研究生,主治医师,研究方向:心血管疾病的中医药防治, E-mail: weiyuejuan0927@126.com

采用结扎左冠状动脉法制备大鼠心肌梗死后慢性心力衰竭动物模型^[1]。一般情况,在该手术结束后2周,大鼠即形成心力衰竭模型,心肌梗死后8周,大鼠已处于心力衰竭中晚期,在中医辨证上,属心肾两虚阶段;强心方由古方真武汤化裁而来,方药组成有:附子、白芍、白术、茯苓、淫羊藿等;具有温阳、利水、补肾、活血等功效;主要治疗心力衰竭之心肾阳虚证。临床治疗效果已被证实,其作用机制尚不明确。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 选取雄性SD大鼠54只,体质量(200±10)g。由河北省沧州中西医结合医院动物实验中心提供,饲养观察室温度:(20±2)℃,相对湿度:40%~50%,给予标准光照周期(12 h光照/12 h黑夜)。

1.1.2 药物 中药:熟附子、猪苓、茯苓、白术、白芍、鹿角、骨碎补、黄芪、川芎、桃仁、红花、甘草等12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;西药:缬沙坦胶囊(代文)由施维雅(天津)制药有限公司生产。

1.1.3 主要试剂与仪器 CaN试剂盒(美国R&B公司);由奥尔科特科技生物有限公司生产的ALC-V8S小动物呼吸机;上海光电医用电子仪器有限公司的心电图机;Philips iu22型彩色多普勒诊断仪;自制的小动物手术操作台。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 腹腔注射氯胺酮全麻SD大鼠,行气管插管,连接动物呼吸机。切开皮肤,逐层打开胸腔,使心脏暴露在视野下。在心脏左心耳下2~3 mm处结扎左冠状动脉前降支,结扎后左室壁的颜色变白,同时可见室壁运动减弱。心电监护显示Ⅱ导联R波振幅明显升高,或J点上移,或ST段明显抬高,证实心肌梗死模型制备成功。将心肌梗死的54只大鼠随机分为强心方组、缬沙坦组、模型组,每组18只,另选10只做对照组,对照组大鼠穿线后不行冠脉结扎,其余操作同模型组。制备模

型及灌胃给药术后8周。

1.2.2 给药方法 根据“实验动物与人按体表面积等效量换算比率”计算,对照组和模型组均给予等体积蒸馏水;缬沙坦组予以缬沙坦悬浊液灌胃,给药剂量为8 mg/kg;强心方组予以强心方水溶液灌胃,给药剂量为0.9 g/kg。给药1次/d,4周为1个疗程。

1.2.3 检测指标与方法 心脏彩超检测:灌胃治疗4周后,采用探头频率12.0MHz的多普勒超声诊断仪检测心脏的结构及功能的各项指标。大鼠经氯胺酮腹腔麻醉后,固定,胸前备皮,于左胸骨旁取左心长轴观和左室乳头肌短轴观。检测左室舒张末期内径(Left Ventricular End Diastolic Diameter, LVDd)、左室收缩末期内径(Left Ventricular End-systolic Diameter, LVDs)及射血分数(Ejection Fraction, EF)。

大鼠血浆CaN的测定:采用腹主动脉取血,将抽取的血液置于抗凝管内,用来分离血浆。使用酶联免疫吸附试验法(ELISA)分别测定血浆大鼠钙调磷酸酶(CaN)的含量,其检测步骤按照试剂盒使用说明书进行操作。

心肌相关蛋白表达的测定:提取心肌组织,采用Western blotting法测定SERCA2a、RYR2、NFAT3蛋白表达。

1.3 统计学方法 采用SPSS 16.0统计软件进行数据分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较均用单因素方差分析法;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 各组大鼠心功能比较 与对照组比较,模型组大鼠LVDd、LVDs水平明显升高,EF明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05$),表明结扎冠脉后大鼠心功能显著下降。与模型组比较,缬沙坦组能降低心力衰竭大鼠LVDd、LVDs水平,差异有统计学意义($P < 0.05$),升高EF水平,差异有统计学意义($P < 0.05$);强心方组亦能降低心力衰竭大鼠VDd、LVDs水平,升高EF水平,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

表1 各组大鼠心功能指标比较($\bar{x} \pm s$)

组别	LVDd (cm)	LVDs (cm)	EF (%)
对照组($n=10$)	0.567 ± 0.056	0.365 ± 0.021	65.617 ± 4.134
模型组($n=18$)	0.765 ± 0.027 *	0.625 ± 0.051 *	28.419 ± 4.297 *
强心方组($n=18$)	0.627 ± 0.047 Δ	0.516 ± 0.040 Δ	48.473 ± 6.507 Δ
缬沙坦组($n=18$)	0.630 ± 0.019 Δ	0.531 ± 0.046 Δ	47.764 ± 5.892 Δ

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

2.2 各组大鼠 SERCA2a、RyR2 蛋白相对表达比较

与对照组比较,模型组大鼠心肌钙调控蛋白 SERCA2a、RyR2 蛋白相对表达均下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。经治疗后,与模型组比较,强心方组心肌钙调蛋白 SERCA2a、RyR2 蛋白相对表达水平升高,差异有统计学意义($P<0.05$);而西药缬沙坦组的差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。

表 2 各组大鼠 SERCA2a、RyR2 蛋白相对表达比较($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	SERCA2a	RyR2
对照组($n=10$)	2.57±0.88	1.59±0.53
模型组($n=18$)	0.96±0.78*	0.90±0.34*
强心方组($n=18$)	1.99±1.03 Δ	1.45±0.74 Δ
缬沙坦组($n=18$)	0.99±0.69	0.77±0.30

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较, $\Delta P<0.05$

2.3 各组大鼠血浆 CaN、NFAT3 比较

与对照组比较,模型组大鼠血浆 CaN 活性明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,强心方组、缬沙坦组大鼠血浆 CaN 活性均明显下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。强心方组下调 CaN 水平优于缬沙坦组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 3。

与对照组比较,模型组大鼠 NFAT3 蛋白质表达明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,强心方组、缬沙坦组能降低心力衰竭大鼠心肌细胞 NFAT3 蛋白质表达,差异有统计学意义($P<0.05$);强心方组下调 NFAT3 水平优于缬沙坦组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 4。

表 3 各组大鼠血浆 CaN 活性比较($\bar{x}\pm s, \text{ng/L}$)

组别	CaN
对照组($n=10$)	128.54±10.12
模型组($n=18$)	250.43±15.01*
强心方组($n=18$)	129.93±10.84 $\Delta\blacktriangle$
缬沙坦组($n=18$)	159.97±12.07 Δ

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较, $\Delta P<0.05$;与缬沙坦组比较, $\blacktriangle P<0.05$

表 4 各组大鼠心肌细胞 NFAT3 蛋白质比较($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	蛋白质 NFAT3
对照组($n=10$)	0.57±0.44
模型组($n=18$)	1.87±0.73*
强心方组($n=18$)	0.61±0.37 $\Delta\blacktriangle$
缬沙坦组($n=18$)	0.98±0.60 Δ

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较, $\Delta P<0.05$;与缬沙坦组比较, $\blacktriangle P<0.05$

3 讨论

慢性心力衰竭是指因各种原因导致心脏结构和功能异常,如扩张型心肌病,缺血性心肌病,心包炎

性心肌病,肥厚型心肌病,风湿性心脏病,瓣膜性心脏病,心律失常性心肌病等,为各种病因所致的心脏病的终末状态,最终致使心脏充盈和射血能力受阻的一组临床综合征。研究显示,心肌重构是慢性心力衰竭发生发展的基本病理病机。当各种原因导致细胞内钙离子浓度的升高时能够激活 CaN-NFAT3 信号通路,该通路的活化是心室重构的最重要信号转导通路之一^[2-3];钙循环在心肌兴奋收缩偶联中占有主导地位,研究显示,Ca²⁺在心肌中的循环主要包括 Ca²⁺回摄、Ca²⁺释放及 Ca²⁺储存^[4],心肌细胞的舒张功能主要与胞质 Ca²⁺清除和交换相关,而胞质内 Ca²⁺清除主要是通过 SERCA2a 再摄取^[5];而心肌细胞的收缩性与 Ca²⁺释放密切相关,Ca²⁺释放是由胞质内 LTCC、RyR2 的状态以及肌浆网钙泵含量等因素决定^[6]。可见,其中每一个过程的异常都会导致心肌细胞内 Ca²⁺循环的破坏,促使 Ca²⁺的失去稳定的交换状态,这种破坏是心力衰竭心肌细胞舒张功能下降的最主要原因。

研究表明,目前临床上增强心肌收缩力的药物的主要是通过增加 Ca²⁺水平,进而增加心肌收缩功能,如洋地黄类药物;而研究显示,长期的 Ca²⁺水平增加可导致钙超载现象,这种现象会导致心肌收缩和舒张功能减退,如使用强心药早期会导致心肌细胞内 Ca²⁺水平的升高,加强心肌收缩力,增强心脏射血功能,但是 Ca²⁺的持续增高使 Ca²⁺与肌钙蛋白解离过程发生障碍,使心肌舒张功能发生障碍,心肌如果不能完全舒张,会直接导致心脏储存功能下降,间接影响心肌射血功能,使有效循环血量明显减少^[7]。再者,钙超载可诱导心肌肥厚信号通路 CaN-NFAT3 的激活,Ca²⁺增多可以 CaN 的活化,CaN 可以促使 NFAT3 去磷酸化,去磷酸化的 NFAT3 转位入细胞核,与心肌细胞核内的转录因子如锌指转录因子(GATA4)相互作用,能够活化多种导致心肌肥大及心肌肥厚的相关基因^[8],如可以调节心脏中 ANF、BNP、 β -MHC 等肥大基因特异性表达,导致心肌细胞蛋白核酸合成增加^[9],随而出现心肌肥厚,心腔扩大,心室重构等病理过程,最终导致心力衰竭。本实验从中医中药理论探讨中医中药对于心力衰竭的作用机制,研究其改善钙循环、善心肌舒缩功能、改善心肌重构的机制。

心力衰竭归属于中医学“喘证”“心悸”“水肿”等范畴;中医学讲心主血脉、为五脏六腑之大主,关于其病因病机的描述最早见于《黄帝内经》,《诸病源候论》亦有“心主血脉”之说,心主血脉是指心气

调节和推动血液运行于脉中,流注全身,循环不止,发挥营养和濡润五脏六腑、形体官窍的作用。由此可见,心气的推动对血液在脉中的正常运行起到关键的作用。因心气根于肾气,心之阳气全赖肾阳的温煦,久病心疾,久必及肾^[10],所以心肾常为一体。如张建伟^[11]提出治疗慢性心力衰竭可以从温补肾气、温补肾阳入手。资料表明,在近几年中医治疗慢性心力衰竭的中医治疗原则中,90%左右采用温肾利水、补气活血之法,临床效果显著^[12-14],所以本研究使用具有温补心肾作用的强心方治疗慢性心力衰竭,探讨其作用机制。

强心方组方主要有熟附子,猪苓,茯苓,白术,白芍,鹿角,骨碎补,黄芪,川芎,桃仁,红花,甘草 12 味中药;其中黄芪、附子、鹿角片有增强心肌收缩力、改善心肌缺血、抗血栓形成、抗休克等作用^[15]。白芍能明显延长常压缺氧,亦能延长异丙肾上腺素所致心肌缺氧动物存活时间,还能拮抗有垂体后叶素造成的急性心肌缺血,增加心肌血流量,延长失血性休克心脏停搏时间^[16]。茯苓、猪苓主要体现在利尿的作用上;白术能减慢心率、降低心肌耗氧及利尿作用^[17]。骨碎补能增加心肌营养性血流量,并对垂体后叶素所致小鼠急性心肌缺血有保护作用^[18]。西医药理学研究也显示,此方对心力衰竭的治疗有显著效果。

综上所述,自拟强心组方能够改善心力衰竭大鼠的心功能,降低心力衰竭大鼠 LVDd、LVDs 水平,升高 EF 水平,能够增加 SERCA2a、RyR2 蛋白表达,增加 Ca^{2+} 回摄、 Ca^{2+} 释放功能,提高心肌细胞的舒张和收缩速率,改善钙循环,促进钙稳态,进而改善心肌舒张和收缩功能;再者,中药强心方能够降低 CaN 活性,下调 NFAT3 水平,抑制 CaN-NFAT3 信号通路,进而抑制心肌重构,其作用机制可能与改善钙循环有关。

参考文献

[1]王靓,黄金玲,施慧,等.对慢性心力衰竭实验动物模型制作方法

- 的研究进展[J].当代医药论丛,2014,12(10):291-293.
- [2]王术芳,王晓丽.钙调神经磷酸酶与心肌肥厚的研究现状[J].中国老年学杂志,2013,33(5):1235-1237.
- [3]郭志华,吴刚强,李雅,等.益心泰颗粒对慢性心力衰竭兔 Ca^{2+} -CaN-NFAT3 信号通路的影响[J].湖南中医药大学学报,2015,35(3):9-11,15,72.
- [4]朱蔚琳.心肌细胞钙循环调节机制的研究进展[J].医学综述,2013,19(14):2530-2532.
- [5]沈亚峰,袁青宁,汤莹,等.心力衰竭时大鼠心肌细胞肌浆网钙回摄的变化[J].电子显微学报,2015,34(1):55-61.
- [6]江西省科技厅成果处. FKBP12.6 对心肌肌质网钙释放通道(RyR2)的调节作用与心脏疾病[J].中国科技奖励,2014,22(9):56.
- [7]杨玉青,卢新政,曹佳莉,等.左西孟旦对去甲肾上腺素诱导的心肌细胞钙瞬变信号的影响[J].南京医科大学学报:自然科学版,2016,36(2):166-170.
- [8]邝素华,郭锻强,梁庆,等.甲状腺激素下调慢性心力衰竭大鼠心肌钙调神经磷酸酶通路的机制研究[J].岭南心血管病杂志,2017,23(3):314-318,346.
- [9]党万太.基于 CaN-NFAT3 信号转导通路探究四逆汤及附子有效成分治疗心力衰竭大鼠的分子机制[D].成都:成都中医药大学,2012.
- [10]刘中华,王晨睿.王治强论治难治性心力衰竭临床经验[J].光明中医,2015,30(8):1614-1615.
- [11]张建伟.从肾论治慢性心衰的体会[J].世界中西医结合杂志,2007,2(4):243-244.
- [12]白虎明,王云振.益气温阳、活血利水法治疗慢性心衰临床观察[J].中医临床研究,2016,8(35):47-49.
- [13]姚振海.益气温阳汤治疗心肾阳虚型心衰 50 例临床观察[J].中国民族民间医药,2016,25(2):98-99.
- [14]王晓蕊.益气温阳法治疗心衰病肾阳虚证临床疗效的 Meta 分析[D].济南:山东中医药大学,2015.
- [15]王淳,刘丽梅,宋志前,等.心血管疾病常用中药注射液及相关中药有效组分研究概况[J].中草药,2015,46(15):2315-2328.
- [16]夏颖,殷志爽,石晨,等.白芍提取物及其有效成分抗氧化活性的研究[J].首都医科大学学报,2013,34(1):120-125.
- [17]杨娥,钟艳梅,冯毅凡.白术化学成分和药理作用的研究进展[J].广东药学院学报,2012,28(2):218-221.
- [18]武爽.欣通胶囊对急性心肌梗死犬心肌细胞的保护作用[D].哈尔滨:黑龙江中医药大学,2013.

(2017-12-06 收稿 责任编辑:杨觉雄)