

强心饮对心衰病模型大鼠心功能及心肌肥厚影响的实验研究*

郑晓丹¹, 姜卫东¹, 高 想¹, 倪卫兵¹, 陶志强¹, 蔡 娟¹, 任秀梅², 杨英俏³, 高俊杰⁴

(1. 江苏省南通市中医院, 江苏南通 226001; 2. 南通大学附属医院, 江苏南通 226001;

3. 辽宁省锦州市中医医院, 辽宁锦州 121014; 4. 上海中医药大学附属曙光医院, 上海 201203)

摘要: **目的** 观察强心饮对阿霉素诱导的心肌肥厚大鼠相关调控细胞生长与增殖蛋白表达的变化, 以探讨强心饮对心肌肥厚潜在的作用机制。**方法** 40只SD大鼠随机分为5组: 模型组、正常组、雷帕霉素组、强心饮大剂量组、强心饮小剂量组。采取腹腔注射阿霉素复制大鼠心肌肥厚模型, 观察大鼠心肌形态学、血流动力学、心衰指标及调控心肌肥厚相关蛋白表达的变化。**结果** 与模型组比较, 强心饮治疗组明显改善心肌肥厚大鼠心脏结构及功能, 降低心肌组织BNP含量, 抑制调控细胞生长蛋白mTOR及p70S6K的磷酸化($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。**结论** 强心饮能改善心肌肥厚大鼠心功能及抑制心肌肥厚, 其机制可能调控p-mTOR及p-p70S6K的表达有关。

关键词: 强心饮; 心肌肥厚; p-mTOR; p-p70S6K

中图分类号: R285.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2013)06-0015-04

心肌肥厚是心肌细胞由于损伤或牵拉而发生肥厚性生长应答, 其特征是细胞增大、蛋白质合成增加、肌原纤维聚集以及胚胎基因再活化, 进而导致心肌重构。尽管心肌肥厚是一种适应性反应, 但持续的心肌肥厚会导致失代偿而发生扩张型心脏病、心衰和猝死, 被认为是心血管病的独立危险因素^[1]。心肌肥厚本质是蛋白质合成速度的加快, 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)的激活是心肌细胞蛋白合成的直接因素, 通过调控下游靶分子真核细胞翻译起始因子4E结合蛋白1(the eIF4E-binding protein 1, 4E-BP1)和核糖体40S小亚基S6蛋白激酶(ribosomal protein S6 kinases, p70S6K)来促进翻译起始和增加蛋白合成^[2]。强心饮(QXY)是上海中医药大学严世芸教授治疗心衰的经验方, 临床应用多年, 疗效确切。前期实验研究证明, 该方能有效抑制心肌病大鼠心肌细胞凋亡^[3]。本研究采用阿霉素诱导大鼠心肌肥厚模型, 探讨QXY对心肌肥厚大鼠心肌p-mTOR及p-p70S6K表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

40只SPF级健康雄性SD大鼠, 体重(150±20)g, 购于中国科学院上海实验动物中心, 实验动物质量合格证号: SYXK(沪)2007-2008。将动物按每笼5~6只分笼饲养, 饲养于上海中医药大学实验动物中心, 合格证号SYXK(沪)2009-0069。

1.2 仪器

ML785型生物信号处理和分析系统, MLT1050型高精度压力换能器, 产地澳大利亚; SPECTRA-max190型Molecular Device酶标仪, 产地美国; S450D型BRANSON超声组织破碎仪, 产地美国; HP图像扫描仪, 产地日本; Smart View图像分析软件, 上海复日科技有限公司产品。

1.3 药品与试剂

QXY由制附子、茯苓、白术、白芍、淫羊藿、补骨脂、川芎、炙鳖甲等药物组成, 全方173g, 按处方比例称取中药材, 加水煎煮、浓缩, 制备浸膏, 调整浓度为1:3, 相当于每mL浸膏含生药量3g。阿霉素, 深圳万乐药业有限公司生产(批号: H44024359), 雷帕霉素(福建科瑞药业有限公司, 090601); p-mTOR抗体(Ser 2448); p-p70S6K抗体(Thr 421/Ser 424)购于Cell Signaling Technology公司; 兔抗GAPDH

* 基金项目: 江苏省南通市社会事业科技创新与示范项目(NO: HS12952)

收稿日期: 2013-11-24 修回日期: 2013-11-29

作者简介: 郑晓丹(1972~), 男, 江西九江人, 主治中医师, 博士研究生, 主要从事心血管疾病的中医药防治研究。

多克隆抗体 (Lot20121013), 大鼠 BNP ELISA (Lot40513)试剂盒, 购于妙通(上海)生物科技有限公司。

1.4 动物分组、模型的建立及给药方法

将 40 只 SD 大鼠适应性饲养 1 周后, 8 只腹腔注射同阿霉素等容积生理盐水, 其余 32 只用阿霉素造模。造模方法参照文献^[4], 用阿霉素 4mg/kg, 每 5d 注射 1 次, 共 3 次。继续饲养 4 周后, 超声心动图证实造模成功(舒张末期室间隔厚度、左室后壁厚度显著高于正常组, 左心室射血分数<45%), 将大鼠随机分为模型组、雷帕霉素组、强心饮大剂量组及强心饮小剂量组 4 组, 每组 8 只。药物干预剂量根据“人和动物按体重折算的等效剂量比值表”折算^[5]。正常组及模型组: 予以生理盐水 10mL/(kg·d)灌胃, 每天 1 次。雷帕霉素组: 予雷帕霉素 1mg/(kg·d)灌胃, 每天 1 次。QXY 大、小剂量组: 分别予以含 QXY 生药 17g/(kg·d)、4.25g/(kg·d)浸膏灌胃, 每天 1 次, 各组均连续灌胃 28d。给药结束后进行下述指标检测。

1.5 检测指标

1.5.1 形态学

经胸前壁彩超测定动物左心结构及功能, 应用超声心动描记左心室舒张末径(left ventricular end-diastolic diameter, LVEDD)、左心室收缩末径(left ventricular end-systolic dimension LVESD)、左心室射血分数 (Left ventricular ejection fraction, LVEF)、左室内径缩短率 (left ventricular fractional shorten-

ing, LVFS)。

1.5.2 血流动力学检测

给药结束后, 禁食 12h, 麻醉后手术游离右颈总动脉, 经右侧颈总动脉插入心室导管, 通过压力换能器, 连接至 ML785 型生物信号处理和分析系统, 记录左心室舒张末压 (left ventricular end diastolic pressure, LVEDP)、左心室收缩压 (left ventricular systolic pressure, LVSP)、左室内压最大变化速率 (peak positive and negative maximal derivation of left ventricular pressure, $\pm dp/dt_{max}$)。

心肌组织脑尿钠肽 (brain natriuretic peptide, BNP)含量的变化, 采用 ELISA 法测定。

血流动力学检测后, 取部分左室心肌予液氮速冻后于 -80℃ 冰箱保存, 用 Western blot 检测 p-mTOR、p-p70S6K 蛋白表达, 利用样本目的蛋白的光密度比内参照基因条带的光密度, 对比不同样本的相对表达率。

1.6 统计分析

采用 SPSS 19.0 统计分析软件处理。所有数据均以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 多组计量资料对比采用单因素方差分析, 多组间两两对比采用 LSD-t 检验。以 $P<0.05$ 为差别有统计学意义。

2 结果

2.1 QXY 对大鼠心脏结构及心肌组织 BNP 含量的影响 (见表 1)

2.2 QXY 对大鼠心脏血流动力学的影响 (见表 2)

表 1 QXY 对大鼠心脏结构及心肌组织 BNP 含量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	LVEDD/mm	LVESD/mm	LVEF/%	LVFS/%	BNP/(ng/L)
正常组	3.5 $\pm$ 0.46 [*]	1.62 $\pm$ 0.18 [*]	74.25 $\pm$ 5.52 [*]	45.38 $\pm$ 6.20 [*]	197.07 $\pm$ 28.25 [*]
模型组	5.73 $\pm$ 0.53	5.4 $\pm$ 0.56	34.37 $\pm$ 3.62	12.5 $\pm$ 2.44	501.39 $\pm$ 125.92
雷帕霉素组	3.65 $\pm$ 0.37 [*]	2.21 $\pm$ 0.28 [*]	67.4 $\pm$ 4.69 [*]	40.30 $\pm$ 6.14 [*]	240.29 $\pm$ 50.53 [*]
QXY 大剂量组	3.82 $\pm$ 0.32 [*]	2.56 $\pm$ 0.53 [*]	60.13 $\pm$ 5.76 [*]	31.01 $\pm$ 3.16 [*]	314.93 $\pm$ 93.18 [*]
QXY 小剂量组	4.62 $\pm$ 0.43 [*]	3.87 $\pm$ 0.43 [*]	48.37 $\pm$ 5.31 [*]	24.62 $\pm$ 4.24 [*]	367.09 $\pm$ 37.14 [*]

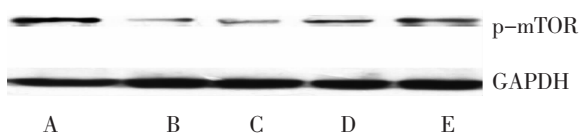
注: 与模型组比较, ^{*} $P<0.01$

表 2 QXY 对大鼠心脏血流动力学的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	+dp/dt/(mmHg/s)	-dp/dt/(mmHg/s)	LVSP/(mmHg)	LVEDP/(mmHg)
正常组	6367.00 $\pm$ 274.13 [*]	4440.37 $\pm$ 141.37 [*]	164.87 $\pm$ 8.35 [*]	4.25 $\pm$ 1.90 [*]
模型组	4353.75 $\pm$ 234.66	2778.75 $\pm$ 183.84	106.25 $\pm$ 8.71	15.87 $\pm$ 3.13
雷帕霉素组	5769.75 $\pm$ 360.18 [*]	4169.37 $\pm$ 178.29 [*]	142.25 $\pm$ 8.48 [*]	8.25 $\pm$ 1.90 [*]
QXY 大剂量组	5209.25 $\pm$ 134.66 [*]	3534.12 $\pm$ 208.63 [*]	133.25 $\pm$ 7.24 [*]	10.12 $\pm$ 1.45 [*]
QXY 小剂量组	4705.00 $\pm$ 402.13 [△]	3089.00 $\pm$ 183.98 [*]	116.30 $\pm$ 11.26 [△]	13.12 $\pm$ 2.58 [△]

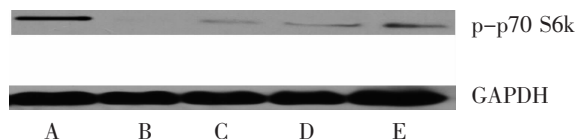
注: 与模型组比较, ^{*} $P<0.01$; 与模型组比较, [△] $P<0.05$

2.3 QXY 对大鼠心肌组织 p-mTOR、p-p70S6K 蛋白的变化(见图 1-2)



A:模型组, B:正常组, C:雷帕霉素组,
D:QXY 大剂量组, E:QXY 小剂量组

图 1 各组 p-mTOR 及 GAPDH 表达



A:模型组, B:正常组, C:雷帕霉素组,
D:QXY 大剂量组, E:QXY 小剂量组

图 2 各组 p-p70S6K 及 GAPDH 表达

2.4 各组 p-mTOR、p-p70S6K 蛋白的光密度比内参照基因条带的光密度的相对表达率(见图 3-4)

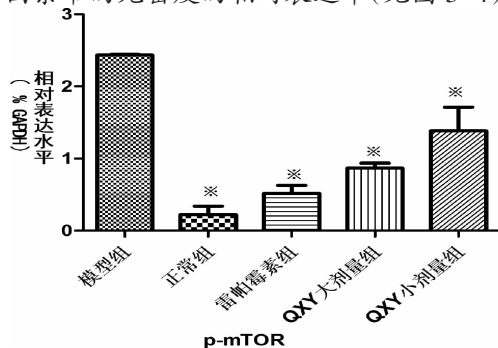


图 3 各组 p-mTOR 相对于 GAPDH 表达

注:与模型组比较,* $P < 0.01$

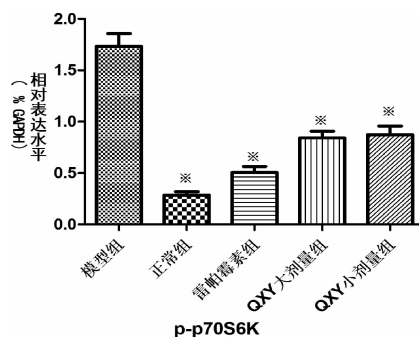


图 4 各组 p-p70S6K 相对于 GAPDH 表达

3 讨论

mTOR 是一种保守的丝/苏氨酸蛋白激酶,人类基因定位于 1 号染色体短臂,编码蛋白由 2549 个氨基酸组成,分子质量 289kD,人与小鼠的氨基酸有 95%的同源性。心肌肥厚本质是蛋白质合成速度的加快。mTOR 的激活是心肌细胞蛋白合成活跃的直接因素,通过调控下游靶分子 4E-BP1 和 p70S6K 来促进翻译起始和增加蛋白合成^[6]。在大鼠压力负荷过重导致的心肌肥厚中,mTOR 特异性抑制剂雷帕霉素可通过抑制 p70S6K 及 eIF-4E 的磷酸化,抑制促凋亡相关酶 caspase-3 活性,从而抑制大鼠心肌肥厚及心肌纤维化,改善肥厚大鼠心脏功能^[7]。中医学无心力衰竭的病名,根据其临床表现,属于中医学“水肿”、“喘证”等病范畴。其病理变化属本虚标实,本虚主要为心肾阳虚,标实有瘀、痰、水、湿。QXY 由制附子、茯苓、白术、白芍、淫羊藿、补骨脂、川芎、炙鳖甲等组成,是严世芸教授在长期的医疗实践中总结出的治疗慢性心衰的经验方。方中制附子补火助阳,温通心脉;白术甘苦而温,温运脾土以制水;淫羊藿、补骨脂温补肾气;白芍酸敛补阴;茯苓淡渗利水;川芎行气活血;严教授认为,慢

性心衰存在心肌重构、心肌纤维化的问题,故加炙鳖甲以软坚化结。诸药合用,起到温脾肾、利水湿、行心血、散瘀结之功,在临床上治疗慢性心功能不全患者疗效确切^[8]。本实验结果显示,大鼠经阿霉素注射造模后,左室心肌发生肥厚,心功能明显下降,心衰指标 BNP 明显升高,符合心衰病理生理特征。现代研究证明,附子具有有效的正性肌力作用^[9],鳖甲能有效防止心肌纤维化^[10],结论与中医理论不谋而合。经 QXY 治疗后,能显著改善心肌肥厚大鼠心功能,减轻大鼠心肌肥厚,抑制 mTOR 及 p70S6K 蛋白的磷酸化。结果提示,QXY 有望成为治疗心衰病改善心功能的同时抑制心肌重构的一种有效中药,该方不以单纯改善血流动力学和症状为目标,而是着眼于长期的心脏生物学修复,兼顾心肌重构,以改善临床症状,降低病死率为目标。其机制可能与阻断调控心肌细胞蛋白合成的 mTOR 及 p70S6K 蛋白的磷酸化有关。其具体作用机制,还有待进一步的探讨。

参考文献

- [1] Lakdawala NK, Givertz MM. Dilated cardiomyopathy with conduction disease and arrhythmia[J]. Circulation, 2010, 122

- (5):527-534.
- [2] Fingar DC, Richardson CJ, Tee AR, et al. mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/Eukaryotic translation initiation factor 4E[J]. Mol Cell Biol, 2004, 24(1):200-216.
- [3] 严骅, 高俊杰. 强心饮对心肌病大鼠模型细胞凋亡因子的影响[J]. 中国医药指南, 2011, 9(16):71-72.
- [4] 解金洪, 姜卫东, 高想, 等. 利心冲剂对心衰大鼠血流动力学和凋亡相关基因表达的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2012, 10(11):1352-1353.
- [5] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002:203.
- [6] Zhou X, Tan M, Hawthorne VS, et al. Activation of the Akt/mammalian target of rapamycin/4E-BP1 pathway by ErbB2 overexpression predicts tumor progression in breast cancers [J]. Clin cancer Res, 2004, 10(20):6779-6788.
- [7] Clemente CF, Neto J X, Costa AP, et al. Focal adhesion kinase governs cardiac concentric hypertrophic growth by activating the AKT and mTOR pathways [J]. J Mol Cell Cardiol, 2012, 52(2):493-501.
- [8] 徐燕, 杨爱东, 唐靖一, 等. 严世芸治疗充血性心力衰竭的经验[J]. 上海中医药杂志, 2006, 40(10):10-11.
- [9] 阎爱荣, 张宏. 附子的药理研究 [J]. 中国药物与临床, 2008, 8(9):745-747.
- [10] 李绍生, 杨杰, 张荣庆, 等. 鳖甲和三七对心肌成纤维细胞增殖影响的实验研究[J]. 中国临床康复, 2004, 8(15):2878-2879.

(编辑:李平)

Experimental Study on the Effect of Qiangxin Decoction on the Cardiac Function and Cardiac Hypertrophy in Rats with Heart Failure

ZHENG Xiao-dan¹, JIANG Wei-dong¹, GAO Xiang¹, NI Wei-bing¹, TAO Zhi-qiang¹, CAI Juan¹, REN Xiu-mei², YANG Ying-qiao³, GAO Jun-jie⁴

(1. Nantong Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nantong Jiangsu 226001, China;

2. Hospital Affiliated to Nantong University, Nantong Jiangsu 226001, China;

3. Jinzhou Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Jinzhou Liaoning 121014, China;

4. Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200021, China)

ABSTRACT: Objective To observe the effects of Qiangxin decoction on protein expression of regulation cell growth and proliferation in Rats with Adriamycin (ADR)-induced cardiac hypertrophy, and to investigate potential molecular mechanisms of cardiac hypertrophy. **Methods** Forty Sprague Dawley rats were randomly divided as follows: ADR group, normal control group, rapamycin treatment group, high and low dosage Qiangxin decoction groups. The morphology, hemodynamic, brain natriuretic peptide, and relative protein expression of cardiac hypertrophy were observed. **Results** Compared with ADR group, Qiangxin decoction treatment significantly inhibited the extent of the cardiac hypertrophy, improved cardiac function, while the expression level of phosphorylated mTOR (p-mTOR) and phosphorylated p70S6K (p-p70S6K) significantly reduced. **Conclusion** The present study demonstrated that Qiangxin decoction significantly relieve the myocardial hypertrophy and improve the cardiac function, The protective effect of the derivatives could be due to the inhibition of the activities of p-mTOR and p-p70S6K.

KEY WORDS: Qiangxin decoction; cardiac hypertrophy; p-mTOR; p-p70S6K

(上接第 14 页)

the flow rate was 1 mL·min⁻¹, the column temperature was 20 °C and the wavelength of UV detector was 203 nm. **Results** With this method, 5 compounds showed a good linear relationship ($r \geq 0.9997$) with recovery range 97.6% -101.7%. There were differences among the contents of five saponins in raw and processed (steamed, fried and sand fried) *panax notoginseng*. Compared with the raw one, the contents of the 5 saponins in processed samples decreased and new components increased. Changes extent of both were relative with the heat temperature. The contents of 5 components decreased more, and newly produced components increased more in sand fried sample. **Conclusion** This chromatographic method can be used to content analysis and quality control of processed *panax notoginseng*. The processing method—sand fry is a promising method. The compositions and contents of raw and various processed *panax notoginseng* were both different, which may be the direct cause of the pharmacological differences among raw and various processed *panax notoginseng*, the more study about which is underway.

KEY WORDS: *Panax Notoginseng*; processing; Saponins; content analysis; HPLC