

● 实验研究 ●

参桂保心方对心力衰竭大鼠 Caspase - 3 及心室重构的影响

卢玉俊¹, 杨建芳², 赵信科¹, 代晶晶¹

(1. 甘肃中医药大学附属医院, 甘肃 兰州, 730020;

2. 甘肃省第三人民医院, 甘肃 兰州, 730020)

[摘要] 目的: 通过观察参桂保心方对慢性心力衰竭(CHF)大鼠 Caspase - 3 蛋白表达及其对心电图、血流动力学及心室重量指数等的影响, 探讨该药保护心肌细胞、抑制心室重构的作用及其机制。方法: 将 90 只雄性 SD 大鼠随机分为对照组 15 只和造模组 75 只, 造模组腹腔注射 ISO 3mg/(kg·d) 制备 CHF 模型, 4 周后心脏彩超检测射血分数 $\leq 50\%$ 为造模成功。将其随机分为模型组, 芪苈强心组, 参桂保心高、中、低剂量组, 每组 15 只, 灌胃给药 8 周后记录各组大鼠心电图, 监测血流动力学指标, 测定心脏及心室重量指数, 采用免疫组化、蛋白印迹法检测心肌 Caspase - 3 蛋白表达。结果: 治疗后参桂保心方高剂量组 HR 低于中、低剂量组及芪苈强心组 ($P < 0.05$); 各组 HWI、VWI 均下降 ($P < 0.05$); 芪苈强心组和参桂保心方高、中剂量组 Caspase - 3 蛋白表达均降低, 其中高剂量组优于其余 2 组 (均 $P < 0.05$)。结论: 参桂保心方可能通过减少 Caspase - 3 蛋白表达, 抑制心肌细胞凋亡, 达到保护心肌细胞、抑制心室重构的作用。

[关键词] 心力衰竭; Caspase - 3; 心室重构; 参桂保心方; 实验研究

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **DOI:** 10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2018.05.078

Effect of Shengui Baoxin prescription on caspase - 3 and ventricular remodeling in rats with heart failure

LU Yu - jun¹, YANG Jian - fang², ZHAO Xin - ke¹, DAI Jing - jing¹

(1. The Affiliated Hospital of Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730020, Gansu, China;

2. Gansu Third People's Hospital, Lanzhou 730020, Gansu, China)

Abstract: Objective: To investigate the effect of Shengui Baoxin prescription on the protein expression of caspase - 3, electrocardiographic findings, hemodynamic parameters, and ventricular weight index in rats with chronic heart failure (CHF), as well as the role of Shengui Baoxin prescription in protecting cardiomyocytes and inhibiting ventricular remodeling and the related mechanism. Methods: A total of 90 male Sprague - Dawley rats were randomly divided into control group with 15 rats and modeling group with 75 rats. The rats in the modeling group were given intraperitoneally injected ISO 3 mg/kg/d to establish a model of CHF, and the model was considered to be successfully established when echocardiography performed 4 weeks later showed an ejection fraction of $\leq 50\%$. The rats in the modeling group were further randomly divided into model group, Qili Qiangxin group, and low -, middle -, and high - dose Shengui Baoxin groups, with 15 rats in each group. After the drugs were given by gavage for 8 weeks, electrocardiographic findings were recorded, hemodynamic parameters were monitored, and the heart weight index and ventricular weight index were measured. Immunohistochemistry and Western blot were used to measure the expression of caspase - 3 in the myocardium. Results: After treatment, the high - dose Shengui Baoxin group had a significantly lower heart rate than the middle - and low - dose Shengui Baoxin groups and the Qili Qiangxin group ($P < 0.05$). All groups had significant reductions in the heart weight index and ventricular weight index ($P < 0.05$). The Qili Qiangxin group and the high - and middle - dose Shengui Baoxin groups had a significant reduction in the expression of caspase - 3 ($P < 0.05$), and the high - dose Shengui Baoxin group had a significantly greater reduction than the other two groups ($P < 0.05$). Conclusion: Shengui Baoxin prescription can protect the car-

diomyocytes and inhibit ventricular remodeling by reducing the expression of caspase-3 and inhibiting cardiomyocyte apoptosis.

Key words: heart failure; caspase-3; ventricular remodeling; Shengui Baoxin prescription; experimental study

慢性心力衰竭(CHF)是多种心血管疾病的共同转归,整个过程伴随着心肌损伤和心室重构。心室重构是一系列复杂的变化,其中心肌细胞凋亡是心室重构的重要特征之一。半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)是参与凋亡最重要的蛋白酶之一,影响着心室重构的进程。中医学认为CHF的病因病机属本虚标实,临床应用益气温阳、活血利水等治法治疗CHF取得了良好的疗效。本研究通过观察参桂保心方对CHF大鼠Caspase-3水平及其对心电图、血流动力学及心室重量指数等的影响,拟探讨该药保护心肌细胞、抑制心室重构的作用及其机制,现将结果报告如下。

1 实验材料

1.1 动物 10周龄SPF级雄性SD大鼠90只,甘肃中医药大学实验中心提供,合格证号:SCXK(甘)2015-0002。

1.2 药物 芪苈强心胶囊,以岭药业股份有限公司生产,批准文号:国药准字Z20040141;参桂保心方,甘肃中医药大学附属医院煎药中心提取制备。

1.3 主要试剂 异丙肾上腺素(ISO),北京索莱宝生物科技有限公司,批号:20160722。

2 实验方法

2.1 动物分组、造模及给药 将90只大鼠随机分为对照组15只和造模组75只,造模组腹腔注射ISO,3mg/(kg·d),连续4周制备CHF模型^[1];应用心脏彩超(意大利百胜,MyLab Five,探头频率10MHz,深度3cm),测定5个心动周期的均值,检测左室射血分数,左室射血分数≤50%认为CHF模型造模成功^[2]。将造模成功的大鼠随机分为模型组,芪苈强心组,参桂保心高、中、低剂量组,每组各15只。芪苈强心组以芪苈强心胶囊灌胃0.42g/(kg·d),参桂保心组分别按高、中、低剂量(相当于成人每kg体质量用量的24、12、6倍)灌胃^[3];对照组及模型组以0.9%氯化钠注射液灌胃。时间为8周。观察其饮食、毛色、活动、水肿等一般性状,每周称体质量。

2.2 指标采集与检测

2.2.1 心电图检测 治疗结束后将6组大鼠用10%水合氯醛(天津北联精细化学品公司,批号:20131220)3mL/kg腹腔注射麻醉,待麻醉稳定(约15min)后仰卧固定于手术台上,四肢皮下连接心电图机(BL-420F生物机能实验系统,成都泰盟科技公司),记录标准肢体II导联心电图(走纸速度50mm/s)。测定心率(HR)、P波时限、P波振幅、QRS波时限、R波振幅、T波振幅。

2.2.2 血流动力学检查 将大鼠腹腔麻醉(同上),仰卧固定四肢,切开颈部,分离右颈总动脉约1.5cm,结扎远心端,

然后再经颈动脉插入充满肝素盐水的左心导管,连接压力换能器,将导管插入左心室腔。通过压力换能器输入BL-420F生物机能实验系统(成都泰盟科技公司),由实验系统软件处理获得左室舒张末期压力(LVEDP)、左室内压峰值(LVSP)、左室压力上升/下降最大速率($\pm dp/dt \max$)。

2.2.3 心脏及心室重量指数测定 将6组大鼠称重量(BW)后采用颈椎脱臼法处死,迅速打开胸腔摘取心脏,剪去周围大血管,在冰0.9%氯化钠注射液中洗净血液,滤纸吸干,用电子天平(赛多利斯PRACTUM124-1CN,德国)称取心脏重量(HW),沿房室交界处去除左右心房,称取心室重量(VW),分别计算心脏重量指数HWI(HW/BW)、心室重量指数VWI(VW/BW)。

2.2.4 免疫组化心肌Caspase-3表达检测 取包埋过的左心室中段心肌组织,用免疫组化法检测Caspase-3。操作步骤严格按照试剂盒说明书(美国ImmunoWay公司,批号为YT5204)。胞膜、胞浆有黄至棕黄色颗粒者为蛋白阳性细胞。取组化切片于光镜下400倍放大,随机选取5个视野,用多功能彩色图像分析系统(美国Media Cybernetics公司)测量其灰度值,取其平均值。灰度值越低表明该浓度越高^[4]。

2.2.5 蛋白印迹法(Western-blot)检测心肌Caspase-3蛋白表达水平 心肌组织蛋白提取,称取心肌组织约100mg,加入冰预冷的适量细胞裂解液,制成心肌细胞均浆。冰上裂解40min,4℃,12000r/min,离心20min,收集上清,按照说明书进行蛋白定量测定,采用Western-blot法检测Caspase-3蛋白的表达(美国ImmunoWay公司,批号为YT5204),以 β -actin(1:200稀释)杂交作为内参照。目的蛋白条带与 β -actin蛋白条带灰度值的比值,即为Caspase-3蛋白的相对定量值^[5]。

2.3 统计学方法 采用SPSS 16.0统计软件包处理数据,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较应用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-t检验法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 一般情况 与对照组相比,模型组大鼠普遍出现纳食减少,体质量增加,运动缓慢,活动减少,呼吸时有气喘,足爪水肿,抓取反应差等,经治疗后各组上述表现均较模型组好转。

3.2 心电图检测结果 各组P波时限、P波振幅、QRS波时限、R波振幅、T波振幅比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。HR比较,参桂保心高剂量组低于参桂保心中、低剂量组及芪苈强心组。(见表1)

表 1 各组大鼠心电图检测结果比较

组别	n	HR(次/min)	P 波时限(S)	P 波振幅(mV)	QRS 波时限(S)	R 波振幅(mV)	T 波振幅(mV)
对照组	15	377.93 ± 16.72	0.016 ± 0.001	0.013 ± 0.001	0.016 ± 0.001	0.497 ± 0.015	0.161 ± 0.011
模型组	15	393.27 ± 9.67 ^a	0.015 ± 0.001	0.013 ± 0.001	0.015 ± 0.001	0.502 ± 0.010	0.156 ± 0.010
芪苈强心组	15	393.80 ± 9.11 ^a	0.016 ± 0.001	0.013 ± 0.001	0.016 ± 0.001	0.505 ± 0.014	0.162 ± 0.011
参桂保心高剂量组	15	384.60 ± 8.43 ^{bc}	0.016 ± 0.001	0.013 ± 0.001	0.016 ± 0.001	0.504 ± 0.013	0.160 ± 0.010
参桂保心中剂量组	15	394.33 ± 11.99 ^a	0.016 ± 0.001	0.013 ± 0.001	0.016 ± 0.001	0.499 ± 0.013	0.159 ± 0.009
参桂保心低剂量组	15	395.73 ± 11.05 ^a	0.016 ± 0.001	0.013 ± 0.001	0.016 ± 0.001	0.498 ± 0.016	0.160 ± 0.011

注:与对照组比较,^a*P* < 0.05;与模型组比较,^b*P* < 0.05;与芪苈强心组比较,^c*P* < 0.05。

3.3 血流动力学检查结果 各组 LVEDP、LVSP、± dp/dt max、- dp/dt max 比较,差异均无统计学意义(*P* > 0.05)。(见表 2)

表 2 各组大鼠血流动力学指标检测结果比较

组别	n	LVEDP(mmHg)	LVSP(mmHg)	± dp/dt max(mmHg/s)	- dp/dt max(mmHg/s)
对照组	15	5.26 ± 0.63	102.36 ± 2.51	3.54 ± 0.05	-3.68 ± 0.06
模型组	15	6.02 ± 0.75	110.52 ± 3.68	3.96 ± 0.06	-2.95 ± 0.08
芪苈强心组	15	5.95 ± 0.61	108.15 ± 1.96	3.28 ± 0.06	-3.05 ± 0.05
参桂保心高剂量组	15	5.12 ± 0.15	112.30 ± 2.25	3.82 ± 0.05	-3.17 ± 0.08
参桂保心中剂量组	15	6.32 ± 0.06	104.72 ± 3.50	2.96 ± 0.05	-2.86 ± 0.06
参桂保心低剂量组	15	6.25 ± 0.49	106.93 ± 1.52	3.08 ± 0.06	-3.29 ± 0.08

3.4 心脏及心室重量指数测定结果 与对照组比较,模型组 HWI、VWI 明显升高。与模型组比较,各药物组 HWI、VWI 均降低。各药物组间 HWI、VWI 比较,差异均无明显统计学意义(*P* > 0.05)。(见表 3)

表 3 各组大鼠 HWI、VWI 测定结果比较

组别	n	HWI	VWI
对照组	15	3.56 ± 0.28	2.60 ± 0.14
模型组	15	4.04 ± 0.21 ^a	3.13 ± 0.10 ^a
芪苈强心组	15	3.49 ± 0.26 ^b	2.57 ± 0.12 ^b
参桂保心高剂量组	15	3.48 ± 0.25 ^b	2.51 ± 0.13 ^b
参桂保心中剂量组	15	3.54 ± 0.21 ^b	2.53 ± 0.16 ^b
参桂保心低剂量组	15	3.54 ± 0.29 ^b	2.51 ± 0.16 ^b

注:与对照组比较,^a*P* < 0.05;与模型组比较,^b*P* < 0.05;与芪苈强心组比较,^c*P* < 0.05。

3.5 心肌 Caspase-3 蛋白表达免疫组化检测结果 对照心肌细胞仅有极少量标记,散在分布,胞浆呈淡黄色。模型组阳性心肌细胞胞浆染色程度较强,呈棕黄色或棕褐色,表达面积广泛,融合。各药物治疗组阳性细胞染色程度及面积低于模型组,高于对照组。(见图 1)

与对照组比较,模型组 Caspase-3 表达明显增高,故模型组灰度值明显低于对照组。与模型组比较,芪苈强心组和参桂保心高、中剂量组蛋白表达均降低,其中高剂量组优于芪苈强心组和中剂量组。(见表 4)

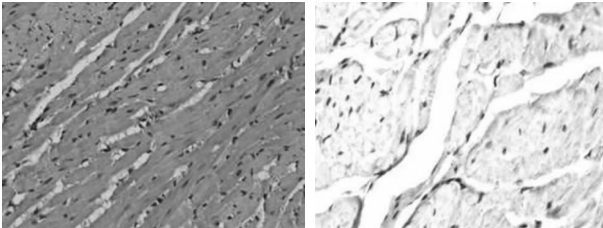


图 1-1 对照组

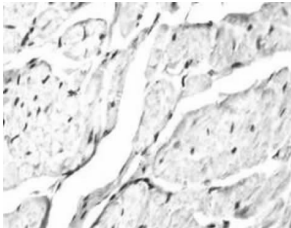


图 1-2 模型组

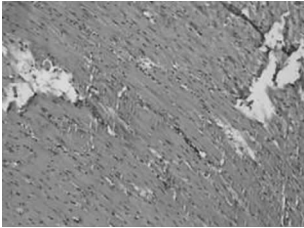


图 1-3 参桂保心高剂量组

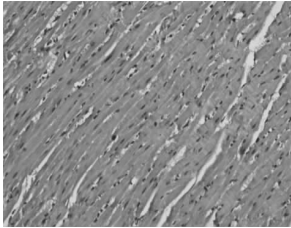


图 1-4 参桂保心中剂量组

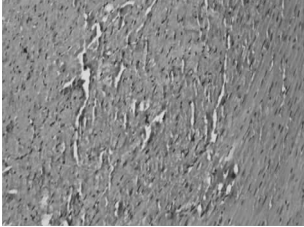


图 1-5 参桂保心低剂量组

图 1 各组心肌 Caspase-3 蛋白表达情况

表 4 各组大鼠 Caspase-3 表达的灰度值比较

组别	n	Caspase-3 灰度值
对照组	5	110.81 ± 5.82
模型组	5	60.21 ± 5.29 ^a
芪苈强心组	5	81.87 ± 12.55 ^{ab}
参桂保心高剂量组	5	112.09 ± 11.21 ^{bc}
参桂保心中剂量组	5	73.86 ± 5.34 ^{ab}
参桂保心低剂量组	5	64.48 ± 2.36 ^{ac}

注:与对照组比较,^a*P* < 0.05;与模型组比较,^b*P* < 0.05;与芪苈强心组比较,^c*P* < 0.05。

3.6 心肌 Caspase-3 蛋白表达 Western-blot 检测结果 与对照组比较,模型组 Caspase-3 表达水平明显增高。与模型组比较,芪苈强心组和参桂保心高、中剂量组 Caspase-3 表达水平均降低(*P* < 0.05),其中高剂量组优于芪苈强心组和中剂量组(*P* < 0.05)。(见图 2、表 5)

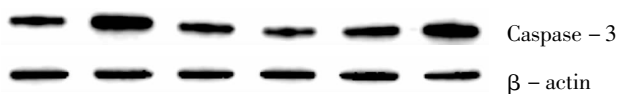


图2 各组大鼠心肌 Caspase-3 蛋白表达水平

表5 各组大鼠心肌 Caspase-3 蛋白表达水平比较

组别	n	Caspase-3 表达水平
对照组	5	0.51 ± 0.01
模型组	5	0.88 ± 0.05 ^a
芪苈强心组	5	0.59 ± 0.05 ^b
参桂保心高剂量组	5	0.48 ± 0.05 ^{bc}
参桂保心中剂量组	5	0.65 ± 0.11 ^{ab}
参桂保心低剂量组	5	0.90 ± 0.09 ^{ac}

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$;与芪苈强心组比较,^c $P < 0.05$ 。

4 讨 论

CHF 的主要发病机制是心室重构,其中心肌细胞凋亡是心室重构的重要方面,在 CHF 发生发展过程中起着重要作用^[6]。心肌细胞凋亡的信号传导通路主要有外源及内源 2 条,而这 2 条途径最终都要通过激活 Caspase-3 发挥作用,所以 Caspase-3 是参与凋亡的最重要的蛋白酶之一^[7]。Caspase-3 激活导致细胞凋亡,心肌细胞凋亡增多可促进心室重构,进而降低心功能。减少 Caspase-3 表达可抑制心室重构,对 CHF 的治疗具有重要意义^[8]。

中医学认为,阳气虚衰、血瘀水停是 CHF 的基本病机,因此益气温阳、活血利水为 CHF 的基本治法。参桂保心方药物组成为太子参 15g,桂枝 12g,茯苓皮 15g,白术 15g,猪苓 15g,泽泻 15g,红花 12g,丹参 15g,葶苈子 20g,大枣 12g,麦冬 15g,五味子 12g。方中太子参益气养阴;桂枝温阳化气行水;茯苓皮健脾渗湿利水;白术健脾助运燥湿;猪苓、泽泻利尿消肿;红花、丹参活血化瘀;葶苈子、大枣泻肺平喘、利水消肿、强心;麦冬养阴润肺;五味子敛肺补气。全方共奏益气温阳、活血利水之功效。

(上接第 163 页)

- [5] 钟赣生. 中药学[M]. 北京:中国中医药出版社,2012.
- [6] 南宋·陈自明. 妇人大全良方[M]. 北京:中国医药科技出版社,2011.
- [7] 蔡锡潮,周海玲,覃军,等. 石见穿多糖注射液对 Lewis 肺癌小鼠肿瘤抑制率研究[J]. 亚太传统医药,2015,11(1):14-15.
- [8] 刘志华,何成. 白花蛇舌草提取物对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的抑制作用[J]. 四川生理科学杂志,2012,34(1):6-8.
- [9] 薛漫,李有怀. 中医扶正固本治疗对乳腺癌新辅助化疗者免疫功能的影响[J]. 中国社区医师:医学专业半月刊,2008(9):97.
- [10] 王承琳. 穿山甲王不留行汤治疗乳腺增生症 64 例效果观察[J]. 社区医学杂志,2010,8(14):57.
- [11] 张文芳,王昕光,孔秋梅,等. 健脾化痰方结合托烷司琼治

本研究结果显示,经治疗后参桂保心高剂量组 HR 低于中、低剂量组及芪苈强心组,提示经治疗后大鼠心衰症状改善,心肌耗氧减少,心率减慢;经治疗后各组 HWI、VWI 均有下降,提示该方可能具有减少心肌细胞凋亡、抑制心室重构、逆转心室肥厚的作用;在蛋白表达方面,经治疗后芪苈强心组和高、中剂量组蛋白表达均有减少,其中高剂量组优于其余各组。以上结果提示参桂保心方可能通过减少 Caspase-3 表达,抑制心肌细胞凋亡,从而起到抑制心室重构的作用。

参考文献

- [1] 罗时珂,李萍,程晓曙. 异丙肾上腺素诱导慢性心力衰竭大鼠模型的建立[J]. 重庆医学,2011,41(1):352-354.
- [2] 韩克,吴格如,席雨涛. 容量超负荷心力衰竭大鼠模型的制备及心脏功能的超声评价[J]. 中国循证心血管医学杂志,2013(5):507-509.
- [3] 徐叔云. 药理实验方法学(2 版)[M]. 北京:人民卫生出版社,1991:201-206.
- [4] 温凯,孙尧,张艳梅. Caspase-3 在慢性心力衰竭大鼠心肌重塑中动态表达及意义[J]. 中国循证心血管医学杂志,2009(1):96-98.
- [5] 龚明玉,杜超,苏玲. 灯盏花素对缺血再灌注大鼠心肌 Caspase-9 蛋白及 mRNA 表达的影响[J]. 中国老年学,2013,33(2):347-349.
- [6] 吴庆. 人参总皂苷对慢性心力衰竭大鼠血流动力学及 Caspase-3 表达的影响[J]. 中国临床药理学杂志,2016,32(5):418-420.
- [7] 马晓庆,钟栩,党娟娟. 参桂保心浓煎剂对心衰大鼠 NT-proBNP 及 Caspase-3 的影响[J]. 西部中医药,2016,29(7):8-11.
- [8] 金娟,马林沁,邹国良. 参芪益心方对慢性心力衰竭大鼠心肌组织 Caspase-3 及 Caspase-9 蛋白表达的影响[J]. 世界中西医结合杂志,2014,9(2):151-155.

(收稿日期:2018-01-24)

疗乳腺癌化疗后呕吐 60 例[J]. 环球中医药,2016,9(3):310-311.

- [12] 张梅庆,钟阳红,皮鹰. 疏肝健脾化痰利水方治疗乳腺癌术后上肢水肿 43 例[J]. 实用中医药杂志,2014,30(5):408.
- [13] 邓晓霞,李清宋,陈中,等. 黄芪抗肿瘤作用机制的研究进展[J]. 中药新药与临床药理,2016,27(2):307-312.
- [14] 李璐,张影,王宪龄. 柴胡、黄芩及小柴胡汤抗肿瘤研究[J]. 中医研究,2013,26(8):79-80.
- [15] 陈杏元,胡金辉. 疏肝消瘕丸合芥贝二陈汤加减治疗肿块期 GLM 40 例临床观察[J]. 湖南中医杂志,2017,33(6):66-68.
- [16] 张俐鹃. 白花蛇舌草用于乳腺癌术后辅助治疗[J]. 中医杂志,2007(5):435.

(收稿日期:2018-01-06)