

- crobiota: implications for kidney function and hypertension[J]. JASH, 2016, 10(12):954-961.
- [10] UFNAL M, JAZWIEC R, DADLEZ M, et al. Trimethylamine - N - Oxide: a carnitine - derived metabolite that prolongs the hypertensive effect of angiotensin II in rats[J]. Can J Cardiol, 2014, 30(12):1700-1705.
- [11] 杨宝, 黄丽娜, 杨传华. 补肾和脉法论治老老年高血压[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2017, 15(14):1803-1805.
- [12] 魏建梁, 戴洪, 陈兴娟, 等. 补肾和脉法治疗老年单纯收缩期高血压体会[J]. 中医杂志, 2014(20):1786-1787.
- [13] 陈兴娟, 冯继康, 曹新冉, 等. 补肾和脉方对 ApoE - / - 小鼠动脉粥样硬化斑块 P - 选择素和 VCAM - 1 表达的影响[J]. 山东中医杂志, 2015, 34(6):456-458.
- [14] 杨传华, 陆峰, 王震, 等. 补肾和脉方对老年单纯收缩期高血压左室向心性肥厚的影响[J]. 新中医, 2013, 45(12):29-31.
- [15] 牛文汇. 补肾和脉方治疗社区高血压的疗效评价: 动态血压研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2017.
- [16] 宫苏娜. 补肾和脉方治疗社区高血压的疗效评价: 诊室血压研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2017.
- [17] 王震. 补肾和脉颗粒干预高龄 SHR 肾损害的作用机制研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2017.
- [18] YANG T, SANTISTEBAN M M, RODRIGUEZ V, et al. Gut dysbiosis is linked to hypertension[J]. Hypertension, 2015, 65(6):1331-1340.
- [19] SANTISTEBAN M M, QI Y, ZUBCEVIC J, et al. Hypertension - linked pathophysiological alterations in the gut[J]. Circulation Research, 2017, 120:312-323.
- [20] 金华, 金钊, 张蕾蕾. 肠道菌群可能为高血压发病的环境因素[J]. 中国微生态学杂志, 2015, 27(1):121-124.
- [21] 吴园琳, 余国友, 卢雯雯. 中药复方对肠道微生态的调节作用研究现状[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(18):3534-3537.

(收稿日期: 2018-03-20)

(本文编辑 薛妮)

## 加味四逆汤对充血性心力衰竭大鼠血管紧张素Ⅱ、醛固酮及心功能的影响



杨震<sup>1</sup>, 李蜜蜂<sup>1</sup>, 曹劝省<sup>2</sup>

**摘要:**目的 探讨加味四逆汤对充血性心力衰竭大鼠血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)、醛固酮(ALD)及心功能的影响。方法 选取雄性大鼠 40 只, 随机分为空白组、假手术组、模型组及加味四逆汤处理组, 各 10 只。采用结扎大鼠左冠状动脉前降支制备心肌梗死后心力衰竭模型为模型组, 空白组为不经任何处理的正常大鼠, 假手术组为开胸不进行心脏血管手术处理大鼠, 加味四逆汤处理组给予加味四逆汤灌胃, 连续给药分别在心力衰竭早期和晚期应用超声心动图检测 4 组大鼠心功能, 放射免疫法测定 4 组大鼠 AngⅡ及 ALD 水平, RT-PCR 及 Western 印迹法分别检测 4 组大鼠心脏血管紧张素转化酶(ACE)及血管紧张素 1 型受体(AT1R)mRNA 和蛋白表达水平。结果 与空白组和假手术组比较, 模型组和加味四逆汤处理组大鼠左心室射血分数(LVEF)明显降低( $P < 0.05$ ), 而左心室收缩末期内径(LVESD)及左心室舒张末期内径(LVEDD)均明显增加( $P < 0.05$ ); 模型组和加味四逆汤处理组血浆 AngⅡ及 ALD、心脏 ACE 和 AT1R mRNA 及蛋白表达水平明显升高( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 加味四逆汤处理组 LVEF 明显升高( $P < 0.05$ ), LVESD 及 LVEDD 明显降低( $P < 0.05$ ); AngⅡ及 ALD 水平及心脏 ACE 和 AT1R mRNA 及蛋白表达水平明显降低( $P < 0.05$ )。结论 加味四逆汤通过抑制心力衰竭大鼠心脏 AngⅡ、增强 ALD 活性, 从而改善充血性心力衰竭大鼠心功能。

**关键词:**充血性心力衰竭; 加味四逆汤; 大鼠; 血管紧张素Ⅱ; 醛固酮; 心功能

**中图分类号:** R541.6 R289.5 **文献标识码:** A **doi:** 10.12102/j.issn.1672-1349.2019.04.007

充血性心力衰竭的致残率和死亡率均较高, 严重

影响病人的生活质量。心力衰竭归属于中医学“心悸”“喘证”“水肿”等范畴, 其基本发病机制为阳气衰微、水瘀内停, 临床上采用温阳益气、活血利水治疗原则<sup>[1-2]</sup>。该病发生可降低病人心功能, 其中血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)和醛固酮(ALD)是引起该病发生的重要因子<sup>[3]</sup>。本研究探讨加味四逆汤对充血性心力衰竭大鼠 AngⅡ、ALD 及心功能的影响。

**作者单位** 1.河南省洛阳市第二中医院(河南洛阳 471000), E-mail: lyyangzhen@126.com; 2.河南科技大学第一附属医院

**引用信息** 杨震, 李蜜蜂, 曹劝省. 加味四逆汤对充血性心力衰竭大鼠血管紧张素Ⅱ、醛固酮及心功能的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2019, 17(4):511-514.

## 1 材料与方 法

1.1 实验动物与试剂 健康雄性大鼠 40 只,体重 220±12 g,购于河南科技大学第一附属医院实验动物中心。Ang II、ALD 兔抗鼠一抗,购于美国 Abcam 公司;Ang II、ALD 试剂盒,购于南京建成生物工程研究所;血管紧张素转化酶(ACE)及血管紧张素 1 型受体(AT1R)检测试剂盒,购于上海岚派生物科技有限公司。

1.2 加味四逆汤 组方:炮附子(先煎)15 g,赤芍 12 g,红参、吴茱萸、丹参、当归、官桂、甘草各 10 g,茯苓、干姜(炒)、益母草各 30 g,白术 18 g。混合后水煎煮,由本医院药剂科统一购入并制成颗粒剂,使用时 1 mL 含生药量按 4.0 g 计算,并溶解于生理盐水中<sup>[4]</sup>。

1.3 动物模型建立及实验分组 选取雄性大鼠 40 只,随机分为空白组、假手术组、模型组及加味四逆汤处理组,各 10 只。采用结扎大鼠左冠状动脉前降支制备心肌梗死后心力衰竭模型为模型组,空白组为不经任何处理的正常大鼠,假手术组为开胸不进行心脏血管手术处理的大鼠,加味四逆汤处理组给予加味四逆汤灌胃。4 组大鼠均于术后 4 d 开始灌胃给药,连续至检测当天,其中空白组、假手术组和模型组给予氯化钠注射液灌胃,加味四逆汤处理组给予加味四逆汤灌胃,灌胃量 16 mL/kg。

1.4 心功能测定 连续给药分别在心力衰竭早期和晚期应用超声心动图检测 4 组大鼠心功能<sup>[5]</sup>,采用心脏超声仪检测心功能情况,检测指标主要包括左心室舒张末期内径(LVEDD)、左心室收缩末期内径(LVESD)及左室射血分数(LVEF)。

1.5 Ang II 及 ALD 水平测定 采集大鼠血液时不加抗凝剂,室温静置 1~2 h,离心后取上清液,-80 °C 分装保存备用。采用放射免疫法定量测定血清 Ang II 和 ALD 浓度<sup>[6]</sup>。所有操作严格按照试剂盒说明书进行。

1.6 大鼠心脏 ACE 和 AT1R mRNA 水平表达 按照 ACE 和 AT1R 试剂盒说明书进行操作。首先制备电泳胶,之后按照操作要求将制备好的电泳胶放入电泳槽,按照逆转录试剂盒方法在 PCR 热循环仪中将其逆转

录为 cDNA,ACE 引物:上游 5'-GAAGTCAC-CCGCGTGCTAAT-3',下游 5'-TCACTGCTC-CGAATGTCT-3';AT1R 引物:上游 5'-GTGTGAT-GAGCCCAAGGA-3',下游 5'-GCAGTTGGCTCG-CATCATAG-3'。同时将 PCR 产物倒入,加入缓冲液(6×Loading Buffer),样本混匀后放入电泳胶孔<sup>[7]</sup>。PCR 反应条件<sup>[8]</sup>:95 °C 预变性 5 min,95 °C 变性反应 45 s,52 °C 条件下退火 45 s,72 °C 延伸反应 1.5 min,重复 35 个循环,72 °C 延伸反应 15 min,之后进行 PCR 扩增,扩增后采用 1.5% 琼脂糖电泳检测扩增产物。控制电泳电压 100 V,将电泳胶放入凝胶成像系统观察结果并照相。

1.7 蛋白免疫印迹(western blot)法检测大鼠心脏 ACE 和 AT1R 蛋白水平表达<sup>[9]</sup> 大鼠心脏细胞经过处理后,37 °C 孵育 24 h,弃去培养液,应用磷酸缓冲盐溶液冲洗 3 次,之后用蛋白裂解液使细胞裂解,放置于冰上保持 5 min 后,样品加入 1/4 体积的 4 组蛋白如上样缓冲液,沸水煮沸 5 min,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,之后转印至聚偏氧乙烯(PVDF)膜上,用含按约 0.1 mL/cm<sup>2</sup> 量加入封闭液封闭 1 h,一抗 4 °C 过夜。次日磷酸盐吐温缓冲液(PBST)漂洗 3 次,加入辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 2 h,ECL 显色。用 SDS-PAGE 进行电泳,并将其转膜到硝酸纤维素膜上。对抗体孵育处理,经化学发光法曝光后观察结果。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 23.0 统计软件进行数据分析,所有数据均符合正态分布,计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 t 检验。以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

2.1 4 组大鼠心功能指标比较 与空白组和假手术组比较,模型组和加味四逆汤处理组大鼠 LVEF 明显降低(P < 0.05),LVESD 及 LVEDD 均明显增加(P < 0.05);与模型组比较,加味四逆汤处理组 LVEF 明显升高(P < 0.05),LVESD 及 LVEDD 明显降低(P < 0.05)。详见表 1。

表 1 4 组大鼠心功能指标比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本量	LVEF(%)	LVESD(mm)	LVEDD(mm)
空白组	10	71.9±10.2	5.24±0.36	3.29±0.54
假手术组	10	70.2±12.3	5.26±0.68	3.32±0.87
模型组	10	39.9±10.3 <sup>1)2)</sup>	7.39±0.87 <sup>1)2)</sup>	5.36±0.54 <sup>1)2)</sup>
加味四逆汤处理组	10	59.9±10.5 <sup>1)2)3)</sup>	5.84±0.98 <sup>1)2)3)</sup>	4.25±0.85 <sup>1)2)3)</sup>

与空白组比较,1) P < 0.05;与假手术组比较,2) P < 0.05;与模型组比较,3) P < 0.05

2.2 4 组大鼠血浆 Ang II 及 ALD 水平比较 与空白组和假手术组比较,模型组和加味四逆汤处理组血浆

Ang II 及 ALD 水平明显升高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 加味四逆汤处理组血浆 Ang II 及 ALD 水平明显降低 ( $P < 0.05$ )。详见表 2。

表 2 4 组血浆 Ang II 及 ALD 水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本量	Ang II	ALD
空白组	10	109.9 ± 12.6	420.5 ± 26.3
假手术组	10	106.9 ± 15.6	418.6 ± 32.6
模型组	10	249.6 ± 26.6 <sup>1)2)</sup>	724.6 ± 29.8 <sup>1)2)</sup>
加味四逆汤处理组	10	145.9 ± 24.4 <sup>1)2)3)</sup>	268.6 ± 25.7 <sup>1)2)3)</sup>

与空白组比较, 1)  $P < 0.05$ ; 与假手术组比较, 2)  $P < 0.05$ ; 与模型组比较, 3)  $P < 0.05$

2.3 4 组大鼠 ACE 和 AT1R mRNA 比较 与空白组和假手术组比较, 模型组和加味四逆汤处理组心脏 ACE 和 AT1R mRNA 水平明显升高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 加味四逆汤处理组心脏 ACE 和 AT1R mRNA 明显降低 ( $P < 0.05$ )。详见表 3。

表 3 4 组大鼠 ACE 和 AT1R mRNA 比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本量	ACE mRNA	AT1R mRNA
空白组	10	0.54 ± 0.02	0.98 ± 0.08
假手术组	10	0.51 ± 0.09	0.95 ± 0.09
模型组	10	1.49 ± 0.21 <sup>1)2)</sup>	2.35 ± 0.69 <sup>1)2)</sup>
加味四逆汤处理组	10	0.89 ± 0.05 <sup>1)2)3)</sup>	1.69 ± 0.25 <sup>1)2)3)</sup>

与空白组比较, 1)  $P < 0.05$ ; 与假手术组比较, 2)  $P < 0.05$ ; 与模型组比较, 3)  $P < 0.05$

2.4 4 组大鼠 ACE 和 AT1R 蛋白水平比较 与空白组和假手术组比较, 模型组和加味四逆汤处理组心脏 ACE 和 AT1R 蛋白水平明显升高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 加味四逆汤处理组心脏 ACE 和 AT1R 蛋白水平明显降低 ( $P < 0.05$ )。详见表 4。

表 4 4 组大鼠 ACE 和 AT1R 蛋白水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本量	ACE	AT1R
空白组	10	1.05 ± 0.05	1.12 ± 0.09
假手术组	10	1.02 ± 0.06	1.09 ± 0.03
模型组	10	2.36 ± 0.25 <sup>1)2)</sup>	2.65 ± 0.39 <sup>1)2)</sup>
加味四逆汤处理组	10	1.59 ± 0.21 <sup>1)2)3)</sup>	1.69 ± 0.22 <sup>1)2)3)</sup>

与空白组比较, 1)  $P < 0.05$ ; 与假手术组比较, 2)  $P < 0.05$ ; 与模型组比较, 3)  $P < 0.05$

### 3 讨论

充血性心力衰竭的发病过程中,《伤寒论》主张真武汤治疗心力衰竭,心力衰竭肾阳虚不能制水,水气凌心,真武汤含炮附子、白术、茯苓、生姜和芍药 5 味<sup>[10]</sup>。

本研究采用加味四逆汤治疗,其中炮附子温壮肾阳,白术健脾燥湿,茯苓淡渗利水,生姜助附子温阳,芍药敛阴和营,温阳散水不伤阴;吴茱萸滋补肝脾,辅以滋补肾中之阴;以红参、丹参、当归温补肾阳,可微生少火以生肾气;官桂、甘草合用化阳以温通心阳<sup>[11-12]</sup>。

心力衰竭发生时,伴有不同程度的心功能和血流动力学改变,这是心脏从代偿阶段逐渐发展至失代偿的病理生理学变化<sup>[13-15]</sup>。这种病理变化与心脏 Ang II、ALD 活性有关。有研究显示,肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)在维持机体水、电解质及血压平衡方面发挥重要作用,RAAS 活性增强,参与慢性心力衰竭的发生发展<sup>[16]</sup>。因此,其中任何一个因素发生变化将导致心力衰竭发生,且随着活性增加,加重该病的发展。本研究结果显示,加味四逆汤处理可抑制大鼠心脏 Ang II、ALD 活性增强,而且抑制与之相关的 ACE 及 AT1R 蛋白活性,说明加味四逆汤可改善影响心力衰竭发病的病理因素变化。

心功能减弱是充血性心力衰竭的一个重要表现,为改善心功能,多进行药物治疗。加味四逆汤治疗后可增强心肌收缩力,减慢心率,增加心肌血流灌注,抑制脂肪分解,减少游离脂肪酸的生成,降低心肌细胞对脂肪酸的利用,从而降低心肌耗氧量<sup>[17-18]</sup>,进而增强心脏的心功能。相关研究显示,无论采用何种药物进行干预处理后大鼠心功能指标 LVEF、LVESD 及 LVEDD 均会发生变化<sup>[17-20]</sup>。本研究结果显示采用加味四逆汤治疗后大鼠 LVEF、LVESD 及 LVEDD 明显改善。因此,加味四逆汤通过抑制心力衰竭大鼠心脏 Ang II、ALD 活性增强,从而改善充血性心力衰竭大鼠心功能。

#### 参考文献:

- [1] 李庆. 附子汤对慢性心力衰竭大鼠心室重构及肾素血管紧张素醛固酮系统的影响[J]. 新中医, 2015, 47(1): 222 - 224.
- [2] 朱继荣, 倪素丹, 卢章, 等. 阿托伐他汀对充血性心力衰竭患者肾素-血管紧张素-醛固酮系统及红细胞参数的影响[J]. 海南医学, 2013, 24(23): 3501 - 3503.
- [3] SCHROTEN N F, GAILLARD C A, VAN VELDHUISEN D J, et al. New roles for renin and prorenin in heart failure and cardiorenal crosstalk [J]. Heart Fail Rev, 2012, 17(8): 191 - 201.
- [4] 黄静文, 赛丽, 黄平东, 等. 益心补肾法对慢性心力衰竭大鼠心功能及血清去甲肾上腺素、血管紧张素 II、醛固酮水平的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2017, 15(3): 298 - 302.
- [5] 李艳, 金小军, 芪蒴强心胶囊对心力衰竭大鼠心脏肾素-血管紧张素-醛固酮系统活性的影响[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2016, 10(2): 238 - 242.
- [6] ULHAQ M A, WONG C, HARE D L. Heart failure with preserved ejection fraction: an insight into its prevalence, predictors, and implications of early detection [J]. Rev Cardiovasc Med, 2015, 16(1): 20 - 27.

- [7] 吴锦波,叶小汉,冼绍祥,等.泻肺利水中药对心力衰竭大鼠左室重构的影响[J].西安交通大学学报(医学版),2017,38(1):136-142.
- [8] CHANG S,DAVIDSON P M,NEWTON P J, et al .Composite outcome measures in a pragmatic clinical trial of chronic heart failure management: a comparative assessment[J].Int J Cardiol, 2015,185(5):62-68.
- [9] 吴帆.卡维地洛对充血性心力衰竭患者神经内分泌因子及心功能的影响[J].中国实用神经疾病杂志,2013,16(16):31-33.
- [10] TANG C H,CHEN T H,WANG C C, et al .Renin-angiotensin system blockade in heart failure patients on long-term haemodialysis in Taiwan[J].Eur J Heart Fail,2013,15(10):1194-1202.
- [11] 吴洁,尹涛,邹庆华,等.红景天苷对慢性心力衰竭大鼠心室重构及肾素血管紧张素醛固酮系统的影响[J].中国老年学杂志,2016,36(19):4728-4730.
- [12] SAYER G,BHAT G.The renin-angiotensin-aldosterone system and heart failure[J].Cardiol Clin,2014,32(1):21-32.
- [13] 陈震,孙欣,徐曙东.依那普利对心力衰竭患者血压及交感活性的影响[J].岭南心血管病杂志,2014,20(2):209-213.
- [14] DAMMAN K,PEREZ A C,ANAND I S, et al .Worsening renal function and outcome in heart failure patients with preserved ejection fraction and the impact of angiotensin receptor blocker treatment [J].J Am Coll Cardiol,2014,64(11):1106-1113.
- [15] 张人之,陈民.加味四逆汤治疗心肾阳虚型慢性充血性心力衰竭临床疗效[J].辽宁中医杂志,2015,42(5):989-991.
- [16] ROSSIGNOL P,ZANNAD F,PITT B, et al .Time to retrieve the best benefits from renin angiotensin aldosterone system (RAAS) inhibition in heart failure patients with reduced ejection fraction: lessons from randomized controlled trials and registries[J].Int J Cardiol,2014,177(3):731-733.
- [17] 祝智宇,应徐燕,黄胜强.加味四逆汤对慢性心力衰竭心肾阳虚证患者心功能和血清N末端脑钠肽前体水平的影响[J].浙江中医杂志,2016,51(10):735-736.
- [18] MENTZ R J,STEVENS S R,DEVORE A D, et al .Decongestion strategies and renin-angiotensin-aldosterone system activation in acute heart failure[J].JACC Heart Fail,2015,3(2):97-107.
- [19] 皇甫海全,孙静.养心汤对慢性心力衰竭模型大鼠血清PRA、AngII、ALD的影响[J].中国中医急症,2017,26(6):963-966.
- [20] PITT B,BAKRIS G L,BUSHINSKY D A, et al .Effect of patiromer on reducing serum potassium and preventing recurrent hyperkalemia in patients with heart failure and chronic kidney disease on RAAS inhibitors[J].Eur J Heart Fail,2015,17(10):1057-1065.

(收稿日期:2017-10-13)

(本文编辑 薛妮)

## 脂联素对 2 型糖尿病大鼠心肌组织 TGF- $\beta_1$ /Smads 信号通路的影响



刘晶,武鸿儒,高晓芳,韩雪鸿,李兴

**摘要:**目的 观察球形脂联素(gAd)对 2 型糖尿病(T2DM)大鼠心肌组织转化生长因子- $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )/Smads 信号通路的影响,探讨 2 型糖尿病心肌病心肌纤维化的机制。方法 将 80 只雄性 SD 大鼠随机分为正常对照组(NC 组,  $n=24$ )、造模组( $n=56$ )。将成模大鼠再随机分为糖尿病心肌病组(DCM 组,  $n=26$ )、gAd 干预组(DA 组,  $n=26$ )。DA 组大鼠每日腹腔注射 gAd 10  $\mu$ g/kg, DCM 组和 NC 组注射同等剂量生理盐水。药物干预 4 周末、8 周末、12 周末,随机取 8 只大鼠,心脏超声评价心功能,腹主动脉采血测相关生化指标,HE 染色观察心肌组织形态,实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)法、蛋白免疫印迹(Western blot)法分别测定心肌组织 Smad3、Smad7、TGF- $\beta_1$  mRNA 和蛋白表达。结果 在各时间段中,与 NC 组比较,DCM 组大鼠心重指数增加,心功能减退,DA 组心功能好转( $P<0.05$ );与 NC 组比较,DCM 组心肌组织 TGF- $\beta_1$ 、Smad3 表达增加,Smad7 表达减少;应用 gAd 干预后,TGF- $\beta_1$ 、Smad3 表达较 DCM 组减少,Smad7 表达较 DCM 组增加,且呈时间依赖性( $P<0.05$ )。结论 gAd 通过抑制 TGF- $\beta_1$ /Smads 信号通路,改善心功能,延缓糖尿病心肌病的进展。

**关键词:**糖尿病;心肌病;球形脂联素;转化生长因子- $\beta_1$ /Smads 通路

**中图分类号:**R587.1 R255.4 **文献标识码:**A **doi:**10.12102/j.issn.1672-1349.2019.04.008

**基金项目** 山西省应用基础研究项目(No.201801D121214);山西省卫生计生委科研课题(No.2014040);山西医科大学校级科研基金资助项目(No.02201423)

**作者单位** 山西医科大学第二医院(太原 030001)

**通讯作者** 李兴, E-mail: 13503504180@163.com

**引用信息** 刘晶,武鸿儒,高晓芳,等.脂联素对 2 型糖尿病大鼠心肌组织 TGF- $\beta_1$ /Smads 信号通路的影响[J].中西医结合心脑血管病杂志,2019,17(4):514-518.