

DOI:10.16305/j.1007-1334.2016.09.023

养心汤对慢性心力衰竭模型大鼠血清 BNP、LVEF 的影响

皇甫海全¹, 于海睿¹, 周亚滨², 孙 静²

1. 黑龙江中医药大学研究生学院(黑龙江 哈尔滨 150040); 2. 黑龙江中医药大学附属第一医院心血管科(黑龙江 哈尔滨 150040)

【摘要】 目的 观察养心汤对慢性心力衰竭模型大鼠血清脑钠肽(brain natriuretic peptide, BNP)水平和左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)的影响。**方法** 选取 SD 雄性大鼠 60 只, 随机选取 10 只大鼠作为空白对照组, 其余 50 只大鼠腹腔注射阿霉素(每周 4 $\mu\text{g/g}$), 6 周后全部大鼠测定心功能, 以 LVEF $\leq 60\%$ 为心力衰竭模型复制成功; 将成模大鼠随机分成模型对照组、养心汤组、卡托普利组, 每组 14 只。养心汤组予养心汤浸膏每日 2.34 g/kg; 卡托普利组予卡托普利每日 2.25 $\mu\text{g/g}$, 空白对照组、模型对照组予等体积的蒸馏水。4 周后, 全部大鼠测定 LVEF、血清 BNP 水平, 并采用苏木精-伊红(HE)染色观察心肌组织形态。**结果** 与空白对照组比较, 模型对照组大鼠 BNP、LVEF 差异有统计学意义($P < 0.01$); 与模型对照组比较, 养心汤组和卡托普利组大鼠 BNP、LVEF 差异有统计学意义($P < 0.01$); 养心汤组与卡托普利组比较, BNP、LVEF 差异无统计学意义($P > 0.05$)。HE 染色显示, 空白对照组心肌细胞形态、横纵纹、胞质正常, 肌纤维排列整齐, 胞质均匀, 心肌间质未见炎细胞浸润及纤维细胞增生。模型组心肌呈波浪状, 间隙增宽、肿胀, 炎细胞浸润, 部分空泡变性, 心肌纤维排列紊乱, 间质水肿, 甚至出血。养心汤组和卡托普利组可见心肌纤维轻度颗粒样变性, 两者间比较无明显差别。**结论** 养心汤能降低慢性心力衰竭模型大鼠血清 BNP 水平, 提高左室射血分数, 其疗效与卡托普利相当。

【关键词】 养心汤; 脑钠肽; 左室射血分数; 慢性心力衰竭; 阿霉素

Effects of “Yangxin Decoction” on serum BNP and LVEF of chronic heart failure model rats

HUANGFU Hai-quan¹, YU Hai-rui¹, ZHOU Ya-bin², SUN Jing²

1. School of postgraduate, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin, 150040; 2. Department of Cardiology, The First Hospital Affiliated to Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin, 150040

Abstract: Objective To observe the effect of “Yangxin Decoction” on the serum levels of brain natriuretic peptide (BNP) and left ventricular ejection fraction (LVEF) in rats with chronic heart failure (CHF). **Methods** 60 SD male rats were chose. Among which 10 rats were randomly selected as blank control group, the remaining 50 rats were treated with adriamycin by intraperitoneal injection at the dose of 4 $\mu\text{g/g/week}$. After 6 weeks the heart function of all rats were measured, and the model of CHF was established successfully with LVEF $\leq 60\%$. The successful model rats were randomly divided into the model control group, Yangxin decoction group and captopril group, 14 in each group. Yangxin Decoction group was treated with Yangxin decoction extract at the dose of 2.34 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$; the captopril group was treated with captopril at the dose of 2.25 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, and the blank control group and model control group were treated with equal volume of distilled water. After 4 weeks, the level of LVEF and serum BNP of all rats were measured, the morphology of myocardial tissue was observed by Hematoxylin-Eosin (HE) staining. **Results** For BNP and LVEF, the differences between the blank control and model control group were statistically significance ($P < 0.01$); the differences between the model control and Yangxin Decoction group or captopril group were statistically significance ($P < 0.01$); there were no statistically significant difference between the Yangxin decoction and captopril group ($P > 0.05$). HE staining showed that in the blank control group myocardial cell morphology, transverse longitudinal lines and cytoplasm were normal, muscle fibers arranged in neat, cytoplasm was homogeneous and no inflammatory cell infiltration and cell proliferation were in the myocardium; while in model group myocardial cells are wavy and the gap widened and swelled, inflammatory cell infiltration, part of the vacuole degeneration, myocardial fiber arrangement disorder, interstitial edema and even bleeding were observed. It can be seen mild myocardial fiber granular degeneration in the Yangxin decoction and captopril group, and there was no obvious difference between two groups. **Conclusion** “Yangxin Decoction” could reduce the level of serum BNP and improve LVEF of rats with CHF, the efficacy was comparable with captopril.

Keywords: Yangxin Decoction; brain natriuretic peptide; left ventricular ejection fraction; chronic heart failure; adriamycin

[基金项目] 黑龙江省博士后基金项目(LBH-Z08007)

[作者简介] 皇甫海全, 男, 博士生, 主要从事中医药防治心血管病方面研究工作

[通讯作者] 孙静, 硕士生导师, 副主任医师。

E-mail: hfhq890902@126.com

慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF)是多种器质性心脏病导致心肌结构和功能改变的终末阶段, 表现为心脏的泵血量减少, 从而使机体组织灌注不足, 静脉血液回流受阻, 引发血流动力学、神经体液等变化

的一种临床常见的危重症^[1]。本研究以慢性心力衰竭大鼠为模型,观察养心汤对心力衰竭大鼠血清脑钠肽(brain natriuretic peptide, BNP)水平和左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)的影响,探讨养心汤治疗慢性心力衰竭的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 采用 SD 雄性大鼠 60 只,体质量 180 ~ 220 g,由黑龙江中医药大学实验动物中心提供,动物合格证号:2014001XYXK。

1.1.2 药物与试剂 养心汤,由黄芪、党参、茯神、茯苓、五味子、半夏、川芎、远志、酸枣仁、柏子仁、肉桂、当归、人参、甘草等中药组成。养心汤浸膏由黑龙江中医药大学附属第一医院制剂室制备,每克养心汤浸膏含生药 5.39 g。称取养心汤浸膏 23.4 g,加水至 100 ml,配制成 0.234 g/ml 的养心汤药液,备用。

卡托普利(批号:20141125),中美上海施贵宝制药有限公司生产。取卡托普利 22.5 mg,加水至 100 ml 摇匀,配制 0.225 g/L 的卡托普利药液,备用。

阿霉素(批号:140625),海正辉瑞制药有限公司。取阿霉素 50 mg,加入 0.9% NaCl 溶液 25 ml,配制成浓度为 2 g/L 溶液,备用。

酶联免疫试剂盒(批号:20140514),上海卒瑞生物科技有限公司;蒸馏水(批号:20150207),北京屈臣氏蒸馏水有限公司;无水乙醇(批号:15080608),天津市津东天正精细化学试剂厂;生理盐水(批号:20141209),四川沱牌药业有限公司;水合氯醛(批号:20140902),石家庄森隆化工有限公司。

1.1.3 仪器 心脏多普勒超声机(SONOS5500),Agilnet 公司;低温高速离心机(CR21),日本日立公司;超低温冰箱(MDF-U50V),日本三洋公司;电热恒温水浴箱(CF-B),上海市跃进医疗器械厂;酶联免疫检测仪(DG5031),ANTHOS 公司。

1.2 造模、分组及给药 选取 SD 雄性大鼠 60 只,随机选取 10 只大鼠作为空白对照组,其余 50 只大鼠参照相关文献^[2],采用腹腔注射阿霉素的方法复制模型。将阿霉素用 0.9% NaCl 溶液配制成 2 g/L 溶液,腹腔注射阿霉素(4 μg/g),每周 1 次,每次 0.4 ml,共 6 周。造模结束后,实验大鼠称体质量后用 10% 水合氯醛进行腹腔内注射麻醉,仰卧于操作台上并固定,胸前区剃毛,经心脏彩超测定大鼠 LVEF 值。模型复制成功标准:LVEF ≤ 60% 为心力衰竭模型复制成功^[5]。

造模成功的大鼠随机分为 3 组,即养心汤组($n = 14$)、卡托普利组($n = 14$)、模型对照组($n = 14$)。

模型对照组和空白对照组大鼠予常规等容积蒸馏水灌胃。养心汤组、卡托普利组大鼠按人鼠剂量换算公式给药,剂量(g/kg) = 人的给药剂量(g) × 换算系数(0.018)/所求动物体质量(kg)。养心汤组,灌胃养心汤浸膏(2.34 g/kg),1 次/日,共 4 周。卡托普利组,灌胃卡托普利片(2.25 μg/g),1 次/日,共 4 周。

1.3 取材 灌胃 4 周后,禁食不禁水 12 h 后麻醉大鼠,将大鼠仰卧于操作台上,固定四肢及头部。腹主动脉取血 4 ml,标号后,室温环境下血液自然凝固 15 ~ 20 min,用低温高速离心机离心 15 ~ 20 min(3 000 r/min)取上层清液,低温环境下保存。同时用锋利的手术刀切取心力衰竭大鼠模型的心肌组织,一般厚度约为 2 ~ 3 mm,大小约为 15 mm × 15 mm × 3 mm。将大鼠心肌组织置于 10% 福尔马林溶液固定 24 ~ 48 h,备用。

1.4 观测指标及方法

1.4.1 LVEF 测定 灌胃 4 周后,全部大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛进行麻醉,将麻醉的大鼠仰卧于操作台上并固定,胸前区剃毛,测定大鼠 LVEF。

1.4.2 血清 BNP 水平测定 采用酶联免疫法测定血清 BNP 水平,按试剂盒说明操作,具体操作步骤如下。①标准品的稀释:根据试剂盒的标准品稀释。②加样:除了空白对照孔不加样品及酶标试剂外,其余操作步骤与待测样本孔相同。③室温孵育:加样完成将酶标包被板封板后置 37 °C 孵育 45 min。④配制液体:将 20 倍浓缩洗涤液用蒸馏水稀释 20 倍后备用。⑤洗涤:用洗涤液洗涤酶标板,洗涤 5 次。⑥加酶:每孔加入酶标试剂各 50 μl,空白孔除外。⑦室温孵育:操作步骤同③。⑧洗涤:操作步骤同⑤。⑨显色:每孔先加入显色剂 A 50 μl,再加入显色剂 B 50 μl,待显色剂充分混合置 37 °C 避光显色 15 min。⑩终止:每孔加入终止液 50 μl,在酶标仪的波长 450 nm 处读吸光度,计算样品的实际浓度。

1.4.3 心肌组织 HE 染色 参照常规苏木精-伊红(HE)染色步骤。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 17.0 软件处理实验数据。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠血清 BNP、LVEF 变化 与空白对照组比较,模型对照组大鼠血清 BNP 水平增加,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与模型对照组比较,养心汤组、卡托普利组大鼠血清 BNP 水平降低,差异有统计学意义($P < 0.01$)。养心汤组与卡托普利组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

与空白对照组比较,模型对照组大鼠 LVEF 值降低,差异有统计学意义($P<0.01$)。与模型对照组比较,养心汤组、卡托普利组大鼠 LVEF 增加,差异有统计学意义($P<0.01$)。养心汤组与卡托普利组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠血清 BNP、LVEF 水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	BNP($\mu\text{g/L}$)	LVEF(%)
空白对照组	10	14.82 $\pm$ 2.27	74.99 $\pm$ 4.25
模型对照组	8	35.06 $\pm$ 3.89*	37.03 $\pm$ 4.39*
养心汤组	9	26.77 $\pm$ 2.18*#	56.62 $\pm$ 5.64*#
卡托普利组	9	25.76 $\pm$ 2.56*#	57.87 $\pm$ 3.72*#

注:与空白对照组比较,* $P<0.01$;与模型对照组比较,# $P<0.01$

2.2 心肌组织形态学观察 空白对照组心肌细胞形态、横纵纹、胞质正常,肌纤维排列整齐,胞质均匀,心肌间质未见炎细胞浸润及纤维细胞增生。

模型组心肌呈波浪状,间隙增宽、肿胀,炎细胞浸润,部分空泡变性,心肌纤维排列紊乱,间质水肿,甚至出血。

养心汤组和卡托普利组可见心肌纤维轻度颗粒样变性,两者间比较无明显差别。见图 1。

3 讨论

养心汤出自王肯堂所著的《证治准绳·类方·惊》,主治心虚血少、惊惕不宁。其组成包括黄芪、党参、

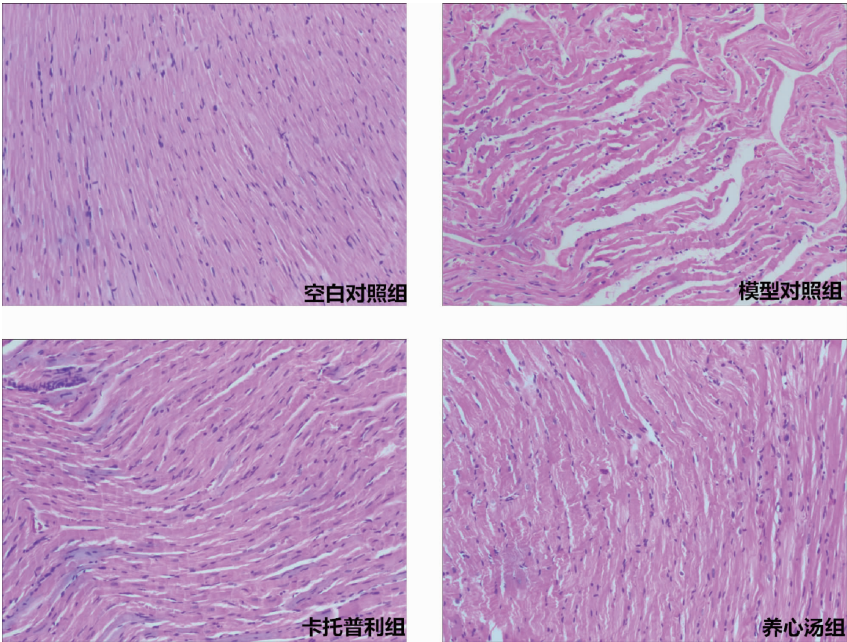


图 1 各组大鼠心肌组织形态(HE 染色, $\times 100$)

清半夏、川芎、远志、酸枣仁等十三味中药^[3]。方中重用黄芪为君药,性甘微温,归肺脾两经,以补益心气,使气行血脉通畅,与人参合用共奏大补元气之功。臣药半夏、茯苓、茯神、远志、陈皮健脾安神。柏子仁、酸枣仁、五味子养心神而敛心气。佐药为川芎、当归行气活血化痰,使药为炙甘草,益气复脉、调和诸药,与肉桂合用鼓舞心阳。全方共奏益气养血、宁心安神之功,可用于心悸、胸痹等辨证属于气血亏虚、心神不安证的临床疾病。气为血帅,血为气母,血液的正常运行主要依赖于心气的鼓动、心阳的温煦,心气充足,血液运行通畅,脏腑得以濡养。心气虚是导致心力衰竭的主要病理因素,多见于心力衰竭早期或慢性心力衰竭,贯穿于 CHF 的始终。心力衰竭是由于心脏泵血功能减弱,组织灌注不足,不能满足机体代谢需要,日久则产生痰浊、水饮、瘀血等病理产物,反过来加重心气不足证^[4]。大量临床试验及药理研究发现,养心汤具有扩张冠状动脉、增加冠脉血流量、改善心肌微循环、保护血管内膜、清

除血管斑块、增加 SOD 活性清除氧自由基,抗血小板凝集等作用,从而从本质上提高了机体抗致病因素的能力^[5-6]。

BNP 在急慢性心力衰竭的诊断中具有极高的敏感性和特异性,明显优于 LVEF^[7]。因 BNP 能更敏感地反应心脏的舒缩功能,所以 BNP 既可以用于心功能不全的筛选,也可以用于心力衰竭的诊断、鉴别诊断及心功能的分级^[8]。在心力衰竭患者中,经过积极治疗后 BNP 水平明显下降,提示病情好转或治疗有效;若较高的 BNP 水平持续不降往往提示预后较差^[9]。因此,BNP 可作为心力衰竭治疗效果预后的评价指标。本实验结果显示,与空白对照组比较,模型对照组、养心汤组和卡托普利组心力衰竭大鼠 BNP 水平升高,其中以模型对照组大鼠 BNP 水平最高,说明模型对照组心力衰竭程度最重。与模型对照组比较,养心汤组与卡托普利组大鼠血清 BNP 水平降低,说明养心汤组和卡托普利组大鼠心力衰竭程度好转,药物治疗有效。据此

推测养心汤治疗心力衰竭的机制可能与抑制神经-体液-内分泌系统,降低心室壁压力,延缓心室重构,恢复心肌的收缩功能,减少 BNP 的释放有关,体现了中医药多靶点、多方位干预的优势。

心力衰竭是各种心脏结构或功能改变导致心脏舒缩功能异常而引起的一组临床症状^[10]。心脏彩超作为一种无创的诊疗手段不但能测出心脏大小,并且能动态显示心腔内结构(室壁、室间隔厚度,瓣膜结构^[11],室壁运动情况),心脏的射血分数以及异常结构等,为心力衰竭的分级及进一步监测心脏功能提供客观的临床依据。利用心脏彩超测定左室射血分数(LVEF),因其操作简单、安全、可重复性强、特异性及敏感性高,已经成为心力衰竭的诊断、疗效判定与预后评估的可靠指标,被公认为用于鉴别无症状性心力衰竭的有力工具。而且心脏负荷状态和心率对 LVEF 的影响较小,所以,LVEF 已经成为公认的用于评价心脏收缩力变化的敏感性和特异性的定量指标^[12]。本实验选用 LVEF 作为心功能观察指标,具体原因如下。其一,监测大鼠慢性心力衰竭的模型复制是否成功,与空白对照组比较,造模 6 周后大鼠的心功能明显降低 $\leq 60\%$,再结合大鼠的饮食、运动、呼吸、毛色等情况的改变认为本实验模型造模成功。其二,用于灌胃 4 周后评定养心汤组和卡托普利组的疗效;与模型对照组比较,养心汤组、卡托普利组大鼠心功能明显改善,养心汤组与卡托普利组比较,大鼠心功能改变相当。据此推测养心汤增加心力衰竭大鼠 LVEF 的机制可能是通过养心汤发挥益气养血、宁心安神的功效,从而补益心气,心气充足,则血脉运行通畅,增加心肌收缩力,增加 LVEF 值。

综上所述,养心汤能降低心力衰竭模型大鼠血清 BNP 水平,增加 LVEF 值,延缓心室重构,从而达到治

疗心力衰竭的目的,其疗效与卡托普利相当,值得临床应用和推广。

参考文献:

- [1] Vaz Pérez A, Doehner W, von Haehling S, *et al.* The relationship between tumor necrosis factor- α , brain natriuretic peptide and atrial natriuretic peptide in patients with chronic heart failure [J]. *Int J Cardiol*, 2010, 141(1):39-43.
- [2] 成忠煌,胡雪峰,彭敏,等.阿霉素诱导大鼠慢性心力衰竭模型给药剂量和频率的优化[J]. *湖北中医杂志*, 2011, 33(4):9-11.
- [3] 皇甫海全,于海睿,张文钊,等.养心汤临床应用研究进展[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2014, 16(7):129-131.
- [4] 谭丽娟,张悟棠,冷婧,等.慢性充血性心力衰竭预后评价及危险因素探讨[J]. *中国药物与临床*, 2015, 6(6):884-886.
- [5] 于晓红,周亚滨,孙静,等.养心汤对不稳定型心绞痛患者血浆代谢组学的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2013, 33(2):191-198.
- [6] 王艳芬,于晓红,周亚滨.养心汤的现代研究[J]. *河南中医*, 2013, 33(3):434-436.
- [7] Nishiyama K, Tsutamoto T, Yamaji M, *et al.* Biological variation of brain natriuretic peptide and cardiac events in stable outpatients with nonischemic chronic heart failure [J]. *Circ J*, 2011, 75(2):341-347.
- [8] Salerno D, Marik PE. Brain natriuretic peptide measurement in pulmonary medicine [J]. *Respir Med*, 2011, 105(12):1770-1775.
- [9] Coutance G, Le Page O, Lo T, *et al.* Prognostic value of brain natriuretic peptide in acute pulmonary embolism [J]. *Crit Care*, 2008, 12(4):R109.
- [10] 王雅君,陈晓虎,刘春玲.中医治疗慢性心力衰竭研究进展[J]. *中国中医急症*, 2013, 22(1):87-89.
- [11] 周自强,胡大一,陈捷,等.中国心高血压左室肥厚伴左心力衰竭的流行病学现状[J]. *中华内科杂志*, 2010, 43(7):491-494.
- [12] 陈健,张连生,祁正军,等.超声对慢性心功能衰竭患者左心功能的评价价值[J]. *河北医学*, 18(12):1740-1742.

编辑:季春来

收稿日期:2015-10-25

(上接第 76 页)

- [16] 靳波,徐盈斌,刘旭盛,等. aFGF, bFGF 和 EGF 对小鼠皮肤成纤维细胞生长及蛋白酶活化受体 1 的影响 [J]. *中国生化药物杂志*, 2011, 32(3):180-182, 186.
- [17] Zhang HY, Zhang X, Wang ZG, *et al.* Exogenous basic fibroblast growth factor inhibits ER stress-induced apoptosis and improves recovery from spinal cord injury [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2012, 19(1):

20-29.

- [18] Wang Z, Zhang H, Xu X, *et al.* bFGF inhibits ER stress induced by ischemic oxidative injury via activation of the PI3K/Akt and ERK1/2 pathways [J]. *Toxicol Lett*, 2012, 212(2):137-146.

编辑:季春来

收稿日期:2016-04-05