引用:王芳婷,李茹,卿媛媛,张婷,胡兰,庄红,颜旭. 强心安神方对慢性心衰大鼠 NT-proBNP 及 GRP78 mRNA、CHOP mRNA 的影响[J]. 湖南中医杂志,2022,38(5):174-177.

强心安神方对慢性心衰大鼠 NT-proBNP 及 GRP78 mRNA、CHOP mRNA 的影响

王芳婷[1],李　茹[2],卿媛媛[2],张　婷[2],胡　兰[2],庄　红[2],颜　旭[2]
(1. 湖南中医药大学,湖南　长沙,410208;
2. 湖南省中医药研究院附属医院,湖南　长沙,410006)

[**摘要**]　目的:研究强心安神方对阿霉素性慢性心力衰竭大鼠 N 末端前体脑利钠肽(NT-proBNP)及葡萄糖调节蛋白 78(GRP78)mRNA、CCAAT/增强子结合蛋白(CHOP) mRNA 的影响,探讨该方的作用机制。方法:将 Wistar 大鼠分为正常对照组、模型组、卡托普利组及强心安神方大、小剂量组,每组 15 只,对除正常对照组外的其余组大鼠采用腹腔注射阿霉素法制备慢性心力衰竭模型,予药物干预 4 周,检测各组大鼠心衰指标 NT-proBNP 及内质网应激信号分子 GRP78 mRNA、CHOP mRNA 的表达。结果:强心安神方大、小剂量组 NT-proBNP 水平、GRP78 mRNA 及 CHOP mRNA 表达均低于模型组,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$),3 项指标与卡托普利组比较,差异无统计学意义($P>0.05$);强心安神方大、小剂量组组内比较,大剂量组 NT-proBNP 水平及 GRP78 mRNA 表达均低于小剂量组,差异有统计学意义($P<0.05$),CHOP mRNA 表达差异无统计学意义($P>0.05$)。结论:强心安神方可降低内质网应激信号分子 GRP78 mRNA、CHOP mRNA 的表达,减轻心肌细胞损伤,从而保护心肌,抑制心肌重构。

[**关键词**]　慢性心力衰竭;强心安神方;内质网应激;NT-proBNP;GRP78 mRNA;CHOP mRNA
[**中图分类号**]R285.5　[**文献标识码**]A　DOI:10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2022.05.043

Effect of Qiangxin Anshen prescription on N-terminal pro-brain natriuretic peptide, glucose-regulated protein 78 mRNA, and CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein mRNA in rats with chronic heart failure

WANG Fangting[1], LI Ru[2], QING Yuanyuan[2], ZHANG Ting[2], HU Lan[2], ZHUANG Hong[2], YAN Xu[2]
(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, Hunan, China;
2. The Affiliated Hospital of Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410006, Hunan, China)

[**Abstract**]　Objective: To investigate the effect of Qiangxin Anshen prescription on N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP), glucose-regulated protein 78 (GRP78) mRNA, and CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein (CHOP) mRNA in rats with chronic heart failure, as well as the mechanism of action of this prescription. Methods: Wistar rats were divided into normal control group, model group, captopril group, and high- and low-dose Qiangxin Anshen prescription groups. All rats except those in the normal control group were given intraperitoneal injection of adriamycin to establish a model of chronic heart failure, and after 4 weeks of drug intervention, the heart failure indicator NT-proBNP and the mRNA expression of GRP78 and CHOP were measured for each group. Results: Compared with the model group, the high- and low-dose Qiangxin Anshen prescription groups had significantly lower NT-proBNP level and mRNA expression levels of GRP78 and CHOP ($P<0.05$ or $P<0.01$), and there were no significant differences

基金项目:湖南省自然基金科卫联合基金项目(2019JJ80114);湖南省中医药科研计划重点项目(202024);湖南省中医药研究院科研计划重点项目(201703)

第一作者:王芳婷,女,2019 级硕士研究生,研究方向:中医药防治心血管疾病
通信作者:颜旭,男,医学博士,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:心血管疾病的防治,E-mail:13755069374@163.com

in these indicators between the high- and low-dose Qiangxin Anshen prescription groups and the captopril group ($P>0.05$). The high-dose Qiangxin Anshen prescription group had significantly lower NT-proBNP level and mRNA expression level of GRP78 than the low-dose Qiangxin Anshen prescription group ($P<0.05$), while there was no significant difference in the mRNA expression of CHOP between the two groups ($P>0.05$). Conclusion: Qiangxin Anshen prescription can reduce the mRNA expression of the endoplasmic reticulum stress signaling molecules GRP78 and CHOP and alleviate cardiomyocyte injury, thereby protecting the myocardium and inhibiting myocardial remodeling.

[**Keywords**] chronic heart failure; Qiangxin Anshen prescription; endoplasmil reticulum stress; N-terminal pro-brain natriuretic peptide; glucose-regulated protein 78 mRNA; CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein mRNA

根据《中国心血管健康与疾病报告 2020 概要》[1]报道,心血管病病死率居首位,心血管病患病人数达 3.30 亿,而心力衰竭(简称为心衰)患病人数达 890 万。慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF)以心功能减退为主要临床特征,以不断进展的心肌重构为基础,是一组神经内分泌调节失衡的临床综合征。目前,CHF 患者治疗过程漫长,长期服用利尿剂、抗心室重构、扩血管等药物,不良反应多,预后较差。近年来研究表明,中医药治疗 CHF 疗效确切,具有毒副作用少、多途径、多靶点、可提高生存率等优势[2-3]。以益气养阴、强心安神为法组方的强心安神方在湖南省中医药研究院附属医院心内科进行了长期的临床实践及实验研究,其可以缓解 CHF 患者的水肿等临床症状,增加运动耐力及心脏射血分数,减轻心肌细胞损伤,显著改善心功能,提高生活质量,其作用机制与抑制神经内分泌因子及肾素-血管紧张素系统过度激活、改善心肌细胞能量代谢有关[4-6]。

研究表明,内质网应激通过诱导心肌重构在 CHF 的发生发展中占有重要位置[7-8]。CCAAT/增强子结合蛋白(CHOP)作为内质网应激途径的中间信号分子,在内质网应激状态下,其表达会显著升高,是内质网应激的标志[9]。葡萄糖调节蛋白 78(GRP78)是内质网的伴侣分子,其在内质网应激发生后被特异性激活,可以敏感感受到内质网应激[10]。N 末端前体脑利钠肽(NT-proBNP)是心衰的重要指标,可以灵敏反应心肌受损程度,对临床诊断、治疗效果、预后评估有关键意义,而且结合 GRP78 评估心衰预后更佳[11-12]。本实验观察强心安神方对 CHF 大鼠心衰指标 NT-proBNP 及内质网应激信号分子 GRP78 mRNA、CHOP mRNA 表达的影响,探讨其可能的作用机制,为临床应用提供依据。

1　实验材料

1.1　*动物*　健康雄性 Wistar 大鼠 75 只,体质量(180±20)g,由湖南中医药大学动物中心提供,动物许可证号:SCXK(沪)2018-0006。动物实验室环境:温度(22±2)℃,相对湿度 45%~55%。伦理审批编号:2019042901。

1.2　*药物及试剂*　强心安神方组成:炙黄芪 10 g,制何首乌 10 g,阿胶 6 g,三七 3 g,五加皮 10 g,葶苈子 5 g,酸枣仁 15 g,大黄 5 g,黄连 3 g,肉桂 2g。以上超微制剂购自湖南春光九汇有限公司,磨成细粉,配制成浓度分别为 0.139、0.554 g/ml。盐酸阿霉素注射液(深圳万乐药业有限公司,批准文号:国药准字 H10910092);卡托普利(华中药业股份有限公司,批准文号:国药准字 H42020384),加灭菌水配制成水溶液,浓度为 0.27 mg/ml;大鼠 N 端前脑钠素试剂盒(MM-0329R1);GRP78 试剂盒(ab21685)、CHOP 试剂盒(DF6025)均购自上海(江西)中洪博元生物技术有限公司。

1.3　*主要仪器*　多功能酶标仪[帝肯(上海)贸易有限公司,型号:S/N502000011];实时荧光定量 PCR 仪[伯乐生命医学产品(上海)有限公司,型号:CFX ConnectTM 实时]。

2　实验方法

2.1　*动物分组及模型制备*　选取 60 只实验大鼠,随机分为模型组、卡托普利组及强心安神方大、小剂量组,每组 15 只。参照文献[13]采用腹腔内注射阿霉素的方法建立 CHF 大鼠模型。具体方法:大鼠腹腔注射 3 mg/kg 剂量的盐酸阿霉素,每周 1 次,连续 8 周。依据大鼠日常习惯的变化、左室射血分数(LVEF)、左室缩短率(LVFS)及血清 NT-proBNP 水平,判断造模是否成功。剩余 15 只大鼠设为正常对照组,注射等容量 0.9%氯化钠注射液。每天观察记录大鼠的精神状态、体质量、运动能力、进食饮水量、呼吸频率及脉搏等情况。

2.2　*干预方法*　依据人体与动物等效剂量系数换算,动物给药剂量=临床成人剂量×动物等效剂量系数(以 200 g 大鼠计算,折合成人剂量的

0.018 倍)[14],此为小剂量。强心安神方小剂量组灌胃剂量为 6.93 g/kg;大剂量组灌胃剂量为小剂量组的 4 倍,即 27.72 g/kg;卡托普利组按 2.7 mg/kg 剂量灌胃;模型组、正常对照组予等体积灭菌水灌胃。以上各组均予同等条件喂养,每天灌胃 1 次,连续 4 周。

2.3 指标采集与检测 1)NT-proBNP 测定。于末次给药后禁食 12 h,麻醉,股动脉处采血,样本送至湖南省中医药研究院附属医院免疫生化室,采用 ELISA 法检测 NT-proBNP 水平。2)GRP78 mRNA、CHOP mRNA 检测。取血后处死大鼠,分离大鼠心脏,按照试剂盒说明书检测,提取大鼠心脏左心室游离壁中部的心室肌肉,制成组织切片,首先将切片置入 65℃烤箱中烤 2 h,放入二甲苯 10 min,更换二甲苯再放置 10 min,然后依次放入 100% 乙醇、100% 乙醇、95% 乙醇、80% 乙醇及纯化水中,各 5 min。将切片放入修复盒中,加入柠檬酸缓冲液,高压锅加热后等自然冷却,弃去柠檬酸缓冲液,用 PBS 缓冲液冲洗。将切片放置湿盒中,加入双氧水,室温孵育 10 min,再用 PBS 缓冲液冲洗,并浸泡 5 min,如此反复 3 次。用吸水纸吸干组织周围的 PBS 缓冲液,滴加 5% 牛血清白蛋白(BSA),37℃封闭 30 min。用吸水纸吸掉组织周围的 BSA,然后滴加足量稀释好的一抗:GRP78(1∶200);CHOP(1-200),置于湿盒中,4℃孵育过夜。取出湿盒,于室温下放置 45 min,再用 PBS 缓冲液浸泡冲洗玻片 3 次,每次 5 min,滴加辣根酶标记山羊抗兔 IgG(H+L)(1∶200),37℃孵育 30 min,再于 PBS 缓冲液下淋洗。用 DAB 显色,在显微镜下观察染色程度,自来水淋洗 1 min;苏木精复染,盐酸乙醇分化,返蓝;再次自来水冲洗 1 min,脱水、透明、封片、镜检。

2.4 统计学方法 使用 SPSS 22.0 软件进行数据处理及统计分析,计量资料采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。符合正态分布及方差齐性时,多组间数据分析采用单因素方差分析,组间比较采用最小显著差数法。不服从正态分布进行秩和检验;方差不齐时进行 Dunnett-t 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 大鼠一般情况及超声结果比较 正常对照组大鼠精神状态良好,体质量正常,呼吸频率无明显变化,二便正常;模型组、强心安神小剂量组大鼠精神萎靡,毛色逐渐干枯发黄,呼吸频率增快,进食较前减少;强心安神大剂量组以及卡托普利组大鼠精神不振,进食减少,二便正常。超声检测大鼠 LVEF 及 LVFS,结果显示:与正常对照组比较,模型组、强心安神方小剂量组、强心安神方大剂量组、卡托普利组的 LVEF、LVFS 均显著降低($P<0.05$)。

3.2 各组大鼠 NT-proBNP 表达比较 模型组 NT-proBNP 值显著高于正常对照组,差异有统计学意义($P<0.01$);各治疗组 NT-proBNP 值均较模型组降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);强心安神方大、小剂量组与卡托普利组相比,差异无统计学意义($P>0.05$);强心安神方大剂量组 NT-proBNP 值高于强心安神方小剂量组,差异有统计学意义($P<0.05$)。(见表 1)

表 1 各组大鼠 NT-proBNP 表达比较($\bar{x}\pm s$,pg/ml)

组别	只数	NT-proBNP
正常对照组	15	93.47±27.13
模型组	15	152.55±25.23[a]
强心安神方小剂量组	15	132.08±9.32[b]
强心安神方大剂量组	15	113.85±24.99[cd]
卡托普利组	15	125.23±10.82[c]

注:与正常对照组比较,[a]$P<0.01$;与模型组比较,[b]$P<0.05$,[c]$P<0.01$;与强心安神方小剂量组比较,[d]$P<0.05$。

3.3 各组大鼠 GRP78 mRNA 及 CHOP mRNA 表达比较 模型组 GRP78 mRNA 及 CHOP mRNA 表达高于正常对照组,差异有统计学意义($P<0.01$);各治疗组 GRP78 mRNA 及 CHOP mRNA 表达均较模型组降低($P<0.01$);强心安神方大、小剂量组与卡托普利组相比,GRP78 mRNA 及 CHOP mRNA 表达差异无统计学意义($P>0.05$);强心安神方大剂量组 GRP78 mRNA 表达高于强心安神方小剂量组($P<0.05$),2 组 CHOP mRNA 表达差异无统计学意义($P>0.05$)。(见表 2)

表 2 各组大鼠 GRP78 mRNA 及 CHOP mRNA 表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	GRP78 mRNA	CHOP mRNA
正常对照组	15	1.00±0.00	1.00±0.00
模型组	15	1.81±0.17[a]	2.57±0.49[a]
强心安神方小剂量组	15	1.40±0.15[b]	1.47±0.14[b]
强心安神方大剂量组	15	1.25±0.10[bc]	1.21±0.11[b]
卡托普利组	15	1.29±0.15[b]	1.22±0.05[b]

注:与正常对照组比较,[a]$P<0.01$;与模型组比较,[b]$P<0.01$;与强心安神方小剂量组比较,[c]$P<0.05$。

4 讨 论

慢性心力衰竭归属于中医学“心痹”“心水”“心胀”等范畴,为本虚标实、虚实夹杂之证,气血阴阳的虚损存在于 CHF 病程发展的每一个阶段,首先

出现心气虚,逐渐发展到气阴两虚,后阴损及阳,心阳亏虚。故益气和养阴在心衰的治疗中尤为重要。强心安神方中炙黄芪补脾益气,为君药;制何首乌补肝肾益精血,阿胶补血滋肝,两者合用可滋阴补血;三七活血化瘀,在补血的同时可活血,通补兼施;五加皮利水泻湿,葶苈子利水泻肺平喘,两者合用可利水消肿;酸枣仁宁心安神,黄连清热燥湿,肉桂可补火助阳,阴中求阳。全方合用,共奏益气养阴、强心安神,达心气充沛,阴阳调达之功。

神经内分泌介导心肌重构是心衰进展的基石,而心肌细胞凋亡是心肌重构的重要表现之一,可导致心肌舒缩功能减退[15]。作为心肌细胞凋亡途径之一,内质网应激是近年来研究较热的调控途径,是对外界刺激的一种保护性反应。心肌细胞存在大量内质网,各种环境变化如缺血、缺氧、氧化应激等情况均可引起细胞内质网调节紊乱,引起大量未折叠或错误折叠蛋白堆积,伴随着内质网应激的发生,GRP78 与错误或未折叠的蛋白质结合,诱导激活未折叠蛋白反应(UPR),促进蛋白质的折叠以减少错误,然而严重的内质网应激反应长期存在,UPR 激活下游信号分子,从而激活调控细胞凋亡转录因子 CHOP 蛋白,促进或者诱导心肌细胞代偿性肥厚、纤维化直至心力衰竭[16-17]。

本实验研究结果显示,模型组大鼠 NT-proBNP 值明显高于正常对照组,予以强心安神方大、小剂量组干预后,心衰大鼠血清 NT-proBNP 水平均较前明显降低,表明强心安神方治疗心衰效果显著。喻正科等[18]在临床研究中发现,养心活血通脉汤治疗心衰作用机制与降低 NT-proBNP 相关,这与本实验结果相同,同时验证 NT-proBNP 指标的准确性。王智等[19]研究显示黄芩苷可通过抑制细胞内质网应激及细胞凋亡、提高肌电稳定性治疗心衰。本实验结果揭示,模型组大鼠 GRP78 mRNA 及 CHOP mRNA 表达明显高于正常对照组,表明体内内质网应激激活,心肌受损,心功能减退,予以方药大、小剂量治疗 4 周后,大鼠血清 GRP78 mRNA、CHOP mRNA 的表达量显著降低,与模型组比较,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$),与卡托普利组差异无统计学意义($P>0.05$),提示强心安神方降低内质网应激信号分子表达,减轻心肌细胞损伤,从而保护心肌,抑制心肌重构。上述结果无明显量效依赖关系。

本实验探讨了强心安神方治疗 CHF 的部分作用机制,为临床应用提供了一定的实验依据。

参考文献

[1] 中国心血管健康与疾病报告编写组. 中国心血管健康与疾病报告 2020 概要[J]. 中国循环杂志,2021,36(6):521-545.

[2] 彭玉霞,卢桂林,张斌霞. 中医药治疗慢性心力衰竭的研究进展[J]. 中国中医急症,2020,29(2):373-376.

[3] 姚久秀,戴国华. 中医药干预慢性心力衰竭系统评价的研究进展[J]. 中医药学报,2021,49(4):87.

[4] 颜旭,刘春华,蔡光先,等. 超微强心安神汤治疗慢性心力衰竭 48 例疗效观察[J]. 湖南中医杂志,2011,27(2):1-3.

[5] 颜旭,刘春华,庄红,等. 强心安神汤对慢性心衰大鼠 AngⅡ及 AT1mRNA 表达的影响[J]. 湖南中医药大学学报,2018,38(4):393-396.

[6] 李茹,颜旭,吴玉华,等. 强心安神方对阿霉素致大鼠心肌损伤模型心肌细胞能量代谢的影响[J]. 湖南中医杂志,2019,35(12):106-107.

[7] BINDER P,WANG S,RADU M,et al. Pak2 as a novel therapeutic target for cardioprotective endoplasmic reticulum stress response[J]. Circulation Research,2019,124(5):696-711.

[8] BLACKWOOD EA,HOFMANN C,SANTO DOMINGO M,et al. ATF6 regulates cardiac hypertrophy by transcriptional induction of the mTORC1 activator,rheb[J]. Circulation Research,2019,124(1):79-93.

[9] 李剑,罗子国. CHOP 在内质网应激介导凋亡中的作用[J]. 检验医学与临床,2011,8(2):208-211.

[10] SABIRLI R,KOSELER A,MANSUR N,et al. Predictive value of endoplasmic reticulum stress markers in low ejection fractional heart failure[J]. In Vivo,2019,33(5):1581-1592.

[11] 谢婷婷,邢若丹,顾歆韵,等. 葱白提取物对心梗后心衰大鼠心室重构及细胞凋亡的影响[J]. 中国中医基础医学杂志,2021,27(2):244-246,283.

[12] 倪婳,李从圣,杨静,等. 心力衰竭患者血清中内质网应激标志物 GRP78 的水平变化及其在评估近期预后中的价值[J]. 临床急诊杂志,2020,21(8):638-642.

[13] 张译心,纪凤兰,王鑫,等. 阿霉素致大鼠慢性心力衰竭模型建立[J]. 中国老年学杂志,2021,41(12):2576-2581.

[14] 徐叔云. 药理学实验方法[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社,2002.

[15] 董方,商建峰,方微,等. 坏死性凋亡在心血管疾病发生发展中的作用及其机制进展[J]. 中华心血管病杂志,2021,49(7):728-732.

[16] 吉登仁,齐永芬. 内质网应激与心血管疾病关系的研究进展[J]. 生理学报,2020,72(2):190-204.

[17] 王楷扬,李小丽,蔡永青. 内质网应激在心脏疾病中的研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学,2019,24(11):1310-1314.

[18] 喻正科,王国倩,张雯禹,等. 养心活血通脉汤对舒张性心衰患者左室舒张功能及 NT-proBNP 的影响[J]. 湖南中医药大学学报,2019,39(1):81-84.

[19] 王智,王娟,徐雷,等. 黄芩苷对心力衰竭大鼠心律失常及心室肌细胞内质网应激-肌电稳定性的影响[J]. 天津医药,2021,49(7):706-712.

(收稿日期:2021-10-12)