

黄剑,马晓彤,张亚杰,等. 真武汤对心肾阳虚型心力衰竭大鼠心肌细胞保护的自噬机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(8): 49-56.

Huang J, Ma XT, Zhang YJ, et al. Autophagy mechanism of Zhenwu decoction in myocardial cell protection of rats with heart-kidney and yang deficiency [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(8): 49-56.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.08.008

真武汤对心肾阳虚型心力衰竭大鼠心肌细胞保护的自噬机制研究

黄 剑,马晓彤,张亚杰,李丽静,韩 冬,刘 佳*

(长春中医药大学药学院,长春 130117)

【摘要】 目的 研究真武汤对心肾阳虚大鼠心肌细胞保护的自噬机制。方法 手术摘除甲状腺及腹腔注射阿霉素,建立大鼠心肾阳虚模型,灌胃给药 10 d。检测并记录各组大鼠的自然情况,采用 ELISA 法检测血清三碘甲状腺原氨酸(T₃)、甲状腺素(T₄)、促甲状腺激素(TSH)及心肌组织 BNP、LA 和 CaN 含量。Western blot 考察 LC3、ATG5、P62 蛋白表达。免疫组化法测定大鼠心肌组织 LC3 和 P62 表达。HE 染色观察心肌组织病理变化。结果 真武汤可以降低心肌组织 BNP 含量,升高心肌组织 LA 含量,降低 CaN 含量,升高心肌组织 LC3、ATG5、BECLIN1 含量,降低 P62 含量。结论 真武汤对心肾阳虚所致心力衰竭情况具有改善作用,并且能够改善心脏能量代谢,在心力衰竭初期可以通过调节自噬保护损伤的心肌细胞。

【关键词】 真武汤;自噬;心肌细胞;机制研究

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 08-0049-08

Autophagy mechanism of Zhenwu decoction in myocardial cell protection of rats with heart-kidney and yang deficiency

HUANG Jian, MA Xiaotong, ZHANG Yajie, LI Lijing, HAN Dong, LIU Jia*
(Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

【Abstract】 **Objective** To study autophagy as the protective mechanism of Zhenwu decoction in cardiomyocytes of rats with heart-yang deficiency. **Methods** After removal of the thyroid and intraperitoneal injection of doxorubicin, to establish the rat heart and kidney yang deficiency model, rats were administered with corresponding drugs for 10 days. We measured serum triiodothyronine (T₃), thyroxine (T₄), thyroid-stimulating hormone (TSH), and myocardial tissue BNP, LA, and CaN by ELISAs. LC3, ATG5, and P62 and protein expression was detected by western-blot. Inspected LC3 and P62 expression in rat myocardial tissue was examined by immunohistochemistry. The pathological changes of myocardial tissue were observed by HE staining. **Results** Zhenwu decoction reduced the BNP content in myocardial tissue of rats with heart-yang deficiency-induced heart failure, increased the LA content in myocardial tissue, decreased the CaN content, increased LC3, ATG5, and BECLIN1 contents, and decreased the P62 content in myocardial tissue of rats with heart failure. **Conclusions** Zhenwu decoction improves the heart failure condition and energy metabolism of the heart. In the early stage of heart failure, the damaged cardiomyocytes protected by regulating autophagy.

【Keywords】 Zhenwu decoction; autophagy; cardiomyocytes; mechanism research

【基金项目】 中国博士后基金(2018M631838);吉林省教育厅“十三五”科学技术项目(JJKH20190476KJ)。

【作者简介】 黄剑(1995—),男,硕士研究生,研究方向:中药药理学。E-mail: Huangjianccum@163.com

【通信作者】 刘佳(1982—),女,副教授,硕士生导师。E-mail: ccliujia1002@126.com

心力衰竭又叫充血性心力衰竭 (congestive heart failure, CHF), 现代医学研究表明, CHF 是心脏无法满足机体代谢所需要的血量进而引起的以循环功能障碍为主要表现的临床综合征, 包含身体多个方面改变, 最终出现心功能失代偿, 出现心力衰竭的症状^[1]。CHF 属于中医证候中的心肾阳虚证, 其具有本虚标实的特点, 表现为脾气虚、肺气虚、肾气虚和肝气虚, 以水停血瘀、阳虚水泛为发病机制, 以上表现属《伤寒论》中的真武汤证, 应以真武汤加以治疗。临床研究表明真武汤可以辅助西药进行慢性心力衰竭治疗, 可以辅助西药逆转心肌重构, 提高心脏供血能力, 改善心力衰竭患者心功能^[2-3]。因此, 本实验依据真武汤对心肌的保护作用, 通过注射阿霉素建立心肾阳虚型心力衰竭大鼠模型, 研究大鼠接受真武汤前后对心肾阳虚型心力衰竭大鼠行为体征、血流动力学以及相关自噬过程中蛋白表达水平的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康 2 月龄 SPF 级 SD 雄性大鼠 70 只, 体重 260~280 g 购自辽宁省长生生物技术有限公司 [SCXK(辽)-2016-0001]。甲状腺切除手术于长春中医药大学药学院中药药理实验室 [SYXK(吉)2016-0017] 进行。动物实验及操作流程严格遵守 3R 原则, 动物实验经长春中医药大学伦理委员会审查批准 (20190051)。动物饲养于清洁级动物室, 室温为 25℃, 相对湿度为 50%~70%, 饲喂大鼠维持饲料, 自由饮水。

1.2 主要试剂与仪器

注射用盐酸多柔比星 (161108), 购置于山西普德药业股份有限公司; 芪苈强心胶囊 (20160412), 购置于石家庄以岭药业股份有限公司; 大鼠 BNP、LA、CaN、TSH、T₃、T₄ 试剂盒购置于上海源叶生物科技有限公司; 全蛋白提取试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、一抗二抗去除液、SDS-PAGE 凝胶快速制备试剂盒、Western 洗涤液、SDS-PAGE 电泳液 (干粉)、ECL 发光液购置于中国 wanleibio; LC3 (WL01506)、BECLIN 1 (WL02508)、P62 (WL02385)、ATG5 (WL02411)、羊抗兔 IgG-HRP (WLA023)、内参抗体 β -actin (WL01372) 购置于中国 wanleibio; 辣根酶标记链酶亲合素购置于中国碧云天生物技术有限公司; 山羊血清、DAB 显色液购

置于中国 Solarbio。

电子天平 (上海精密科学仪器有限公司); 台式低温高速离心机 (上海飞鸽仪器厂); 酶标仪 (伯乐生命医学产品 (上海) 有限公司); 水平摇床 (北京六一); 电泳装置 (北京六一); 凝胶成像系统 (北京六一); 石蜡切片机 (德国 Leica 公司); 显微镜 (日本 OLUMPUS 公司); 16 道生理记录仪 (美国 Biopac 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 建模及分组

腹腔注射 3% 的戊巴比妥钠溶液 (1 mL/kg) 麻醉大鼠, BL-420F 生物信号采集分析系统记录胸前导联或 II 导联心电图^[4], 筛选并弃去 ST 段有异常变化者和心律失常者。本实验动物模型的建立, 参考中医证候心肾阳虚证以及吴向东^[5]用大鼠建立的该种证候动物模型并改进。取符合要求的健康 SPF 级的雄性 SD 大鼠 70 只, 随机分为正常组 (Control, 10 只)、模型组 (CHF, 60 只)。大鼠腹腔注射 3% 戊巴比妥钠溶液 (1 mL/kg), 麻醉后摘除双侧甲状腺。空白对照组行假手术。术后第 15 天起, 模型组大鼠尾静脉注射盐酸阿霉素 (4 mg/kg), 空白对照组注射等剂量生理溶液, 每周注射 1 次, 持续 5 周。术后第 35 天将存活下来模型组动物再次随机分为 5 组, 即模型对照组 (CHF)、芪苈强心胶囊组 (QL, 0.37 g/kg)、真武汤高剂量组 (ZWG, 1.35 g/kg)、真武汤中剂量组 (ZWZ, 0.81 g/kg)、真武汤低剂量组 (ZWD, 0.41 g/kg) 各 12 只。次日灌胃相应药物, 空白对照组和模型对照组灌胃蒸馏水, 连续 10 d。

1.3.2 真武汤对心肾阳虚型 CHF 大鼠一般情况影响

给药后每周测定大鼠体温、体重, 详细记录进食数量和饮水情况。

1.3.3 真武汤对心肾阳虚型 CHF 大鼠心脏指数的影响

称取大鼠体重, 处死后, 迅速取出心脏组织, 以生理盐水清洗, 称取心脏重量, 公式如下: $CWI = \text{大鼠心脏重量} / \text{大鼠体重} \times 100\%$ 。

1.3.4 真武汤对心肾阳虚型 CHF 大鼠血流动力学影响

第 10 天给药完毕 30 min 后, 打开已定标好的十六道生理记录仪及软件后, 以 20% 乌拉坦 0.5 mL/100 g 腹腔注射麻醉大鼠, 通过十六导系统, 观

察并记录各组左室最大上升速率(+dp/dtmax)、左室最大下降速率(-dp/dtmax)等指标的变化情况。

1.3.5 真武汤对心肾阳虚型 CHF 大鼠血清 T₃、T₄ 和 TSH 含量影响

大鼠以 3% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,平均麻醉剂量为 30 mg/kg,等待大鼠被麻醉后,用手术剪切开动物的腹腔,迅速地剪断股动脉,进行采血,最后分离血清,使用大鼠 T₃、T₄、TSH 的 ELISA 试剂盒(上海源叶生物科技有限公司)测定大鼠血清中 T₃、T₄、TSH 含量^[6]。

1.3.6 真武汤对心肾阳虚型 CHF 大鼠心肌细胞 BNP、LA 和 CaN 含量影响

取心肌组织,加入适量的蛋白萃取剂,心肌组织标本匀浆化。300 r/min,离心 20 min。收集上清。同上述检测方法类似,经过稀释、加样、温育、洗涤等步骤,通过标准曲线回归分析计算浓度。

1.3.7 真武汤对心肾阳虚型 CHF 大鼠心肌 LC3、ATG5、P62 蛋白表达影响

称取心肌组织,通过全蛋白提取试剂盒(中国 wanleibio)进行组织匀浆,低温离心(4℃,12000 r/min,10 min)分离上清得到蛋白质抽提物。通过 BCA 蛋白浓度测定试剂盒(中国 wanleibio)测定蛋白含量。加入 20 μL 样品并在 10% 及 15% 聚丙烯酰胺凝胶上分离。转印至 PVDF 膜后用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h,用相应的抗体探测。使用对应的免疫球蛋白试剂通过凝胶成像系统(WD-9413B 型,北京六一)观察印迹,用凝胶图象处理系统(Gel-Pro-Analyzer 软件)分析目标条带的光密度值。

1.3.8 真武汤对心肾阳虚型 CHF 大鼠心肌组织 LC3 和 P62 表达影响

固定后的心肌组织依次进行包埋、透蜡、切片、抗原包被等程序,封片后于显微镜 40×10 观察染色效果并拍照。

1.3.9 真武汤对心肾阳虚型 CHF 大鼠心肌组织病理变化的影响

固定后的心肌组织进行脱水、透明、包埋、切片、染色等程序,封片后于显微镜 40×10 下观察染色效果并拍照。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 21.0 统计学软件,进行多组间差别用单因素方差分析(One-Way ANOVA)进行统计,组间两两比较用方差分析后的 LSD 检验。实验数据

以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,检验结果以 $P < 0.05$ 为具有统计学意义, $P < 0.01$ 为统计学有明显统计学意义。

2 结果

2.1 真武汤对心肾阳虚型 CHF 大鼠一般情况影响

2.1.1 真武汤对心肾阳虚型 CHF 大鼠自然情况影响

各给药组和模型对照组比较状态较好,活动较自如,症状有了明显改善,饮食、饮水基本恢复正常,皮毛相对柔顺而略有光泽,颜色由黄变淡,体重下降不明显,精神状态良好,较为活泼好动,生命体征总体好于模型对照组,结果见表 1。

2.1.2 真武汤对心肾阳虚型 CHF 大鼠体重、体温的影响

CHF 大鼠在造模后,体重下降趋势显著,与正常组比较有统计学意义($P < 0.05$),虽然芪苈强心胶囊和真武汤高中剂量可以改善体重的降低,但并无明显差别($P > 0.05$)。体温也随着静脉注射阿霉素时间的增加有所下降,但无统计学意义($P > 0.05$),结果见表 2。

2.1.3 真武汤对心肾阳虚型 CHF 大鼠心脏指数的影响

与空白组相比,心肾阳虚型心力衰竭大鼠心脏心脏指数虽有所增加,但无明显变化($P > 0.05$),结果见表 3。

2.2 真武汤对心肾阳虚型 CHF 大鼠血流动力学的影响

血流动力学方面,模型对照组与空白对照组比较±dp/dpmax 变化十分明显($P < 0.01$),+dp/dpmax 下降至空白对照组值的 35.5%,说明造模成功^[7]。芪苈强心胶囊和真武汤各剂量都能够显著抑制±dp/dpmax 变化($P < 0.05$),说明真武汤对心肾阳虚型心力衰竭大鼠心肌的收缩和舒张功能均有明显改善作用,结果如表 4。

2.3 真武汤对心肾阳虚型 CHF 大鼠血清 T₃、T₄、TSH 含量的影响

除空白组外,T₄ 的含量均较低($P < 0.05$),说明甲状腺清除完整,各给药组可提高血清中 T₄ 含量,证明各给药组可以改善心肾阳虚型 CHF 大鼠甲状腺功能;造模后大鼠血清 TSH 的含量高于空白组($P < 0.05$)。证明造模后甲状腺功能降低,机体需要通

过增加 TSH 来刺激 T₄ 产生。结果见表 5。

2.4 真武汤对心肾阳虚型 CHF 大鼠心肌 BNP、LA、CaN 含量的影响

与正常组比较,心肾阳虚型 CHF 大鼠心肌组织

LA 水平有所降低 ($P < 0.05$), CaN、LA 含量有所升高 ($P < 0.05$), 而各给药组均可对三个指标具有不同程度调节作用, 其中高剂量组作用最强 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 结果见表 6。

表 1 真武汤对心肾阳虚型心力衰竭大鼠自然情况影响 ($n = 10$)

Table 1 Physiological state of heart-kidney yang deficiency and heart failure rats by ZW

组别 Groups	活动量 Activity		饮食饮水 Diet		毛发 Hair		粪便 Faeces		精神状态 Mental state	
	造模后 After establishing model	给药后 After administrating	造模后 After establishing model	给药后 After administrating	造模后 After establishing model	给药后 After administrating	造模后 After establishing model	给药后 After administrating	造模后 After establishing model	给药后 After administrating
正常组 Control	多 More	多 More	增加 Increase	增加 Increase	有光泽 Glossy	有光泽 Glossy	正常 Common	正常 Common	活泼 Active	活泼 Active
模型对照 组 CHF		少 Less		减少 Reduce		枯槁 Withered		便溏 Loose stool		萎靡 Torpor
芪苈强心 胶囊组 QL		多 More		增加 Increase		光泽 Glossy		正常 Common		活泼 Active
真武汤高 剂量组 ZWG	少 less	多 More	减少 Less	增加 Increase	枯槁 Withered	有光泽 Withered	便溏 Loose stool	基本正常 Basically normal	萎靡 Torpor	正常 Common
真武汤中 剂量组 ZWZ		较多 Major		增加 Increase		欠光泽 Withered		正常 Common		基本正常 Basically normal
真武汤低 剂量组 ZWD		较多 Major		增加 Increase		欠光泽 Withered		基本正常 Basically normal		基本正常 Basically normal

表 2 真武汤对心肾阳虚型心力衰竭大鼠体重、体温的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Body weight and temperature of heart-kidney yang deficiency and heart failure rats by ZW

组别 Groups	体重(g) Weight	体温(°C) Body temperature
正常组 Control	304.43±17.78*	38.47±0.17
模型对照组 CHF	248.40±32.80	37.42±0.50
芪苈强心胶囊组 QL	275.24±57.30*	37.08±0.62
真武汤高剂量组 ZWG	248.67±32.01*	37.00±0.33
真武汤中剂量组 ZWZ	251.62±56.30*	36.97±0.66
真武汤低剂量组 ZWD	209.61±19.33*	37.45±1.18

注:与模型对照组比较, * $P < 0.05$

Note. Compare with model group, * $P < 0.05$.

表 3 真武汤对心肾阳虚型心力衰竭大鼠心脏指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Cardiac index of heart-kidney yang deficiency and heart failure rats by ZW

组别 Groups	剂量 Dose	心脏指数(g/kg) CWI
正常组 Control	—	2.6726±0.2064
模型对照组 CHF	—	2.8408±0.7152
芪苈强心胶囊组 QL	0.30 g/kg	2.8143±0.3638
真武汤高剂量组 ZWG	1.35 g/kg	2.9043±0.1667
真武汤中剂量组 ZWZ	0.81 g/kg	3.3972±0.1171*
真武汤低剂量组 ZWD	0.41 g/kg	3.0415±0.3002

注:与模型对照组比较, * $P < 0.05$ 。

Note. Compare with model group, * $P < 0.05$.

表 4 真武汤对心肾阳虚型心力衰竭大鼠血流动力学影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Hemodynamics of heart-kidney yang deficiency and heart failure rats by ZW

组别 Groups	剂量(g/kg) Dose	左室最大上升速率(mmHg/s) +dp/dtmax	左室最大下降速率(mmHg/s) -dp/dtmax
正常组 Control	—	5234.86±187.02**	-5219.60±194.21**
模型对照组 CHF	—	1859.85±163.13	-1764.93±182.27
芪苈强心胶囊组 QL	0.30	3786.41±181.17**	-3577.87±128.38**
真武汤高剂量组 ZWG	1.35	2943.28±153.96**	-2839.27±173.52**
真武汤中剂量组 ZWZ	0.81	2441.53±149.23*	-2521.64±160.86*
真武汤低剂量组 ZWD	0.41	2236.41±110.46	-2377.87±128.38

注:与模型对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.5 真武汤对心肾阳虚型 CHF 大鼠心肌自噬相关蛋白的影响

Western blot 结果表明,与对照组比较,心肾阳虚模型 CHF 大鼠心肌 LC3、ATG5、BECLIN1 水平明显降低,而各给药组均能提高大鼠心肌组织中 LC3、ATG5、

BECLIN1 蛋白表达量。与对照组比较,心肾阳虚模型 CHF 大鼠心肌 P62 水平变化不大,但各给药组均能降低 P62 蛋白表达量,其中真武汤各组降低作用明显,结果见图 1,由左至右依次为正常组,模型对照组,芪苈强心胶囊组,真武汤高、中、低剂量组,详见表 7。

表 5 真武汤对心肾阳虚型心力衰竭大鼠血液中 T3、T4、TSH 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 5 T3, T4, TSH of heart-kidney yang deficiency and heart failure rats by ZW

组别 Groups	剂量(g/kg) Dose	三碘甲状腺原氨酸 T3 (nmol/L)	血清总甲状腺素 T4 (nmol/L)	促甲状腺激素 TSH (nmol/L)
正常组 Control	—	0.04±0.01	0.75±0.09*	0.68±0.16*
模型对照组 CHF	—	0.05±0.01	0.51±0.01	0.80±0.12
芪苈强心胶囊组 QL	0.30	0.05±0.02	0.55±0.00*	0.82±0.09*
真武汤高剂量组 ZWG	1.35	0.05±0.01	0.57±0.02*	0.85±0.17
真武汤中剂量组 ZWZ	0.81	0.04±0.02	0.55±0.05*	0.83±0.19
真武汤低剂量组 ZWD	0.41	0.03±0.01	0.53±0.00*	0.83±0.19

注:与模型对照组比较,* $P < 0.05$ 。

Note. Compared with the model group, * $P < 0.05$.

表 6 真武汤对心肾阳虚型心力衰竭大鼠血液中 LA、CaN、BNP 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 6 LA, CaN, BNP of heart-kidney yang deficiency and heart failure rats by ZW

组别 Groups	剂量(g/kg) Dose	乳酸 LA (nmol/L)	钙调神经磷酸酶 CaN (nmol/L)	脑钠肽 BNP (nmol/L)
正常对照组 Control	—	16.96±0.76*	1.35±0.30*	1.07±0.22*
模型对照组 CHF	—	16.30±0.37	1.83±0.29	1.31±0.22
芪苈强心胶囊组 QL	0.30	17.96±1.88*	1.45±0.30*	0.91±0.38*
真武汤高剂量组 ZWG	1.35	16.85±0.70*	1.33±0.29**	0.96±0.25**
真武汤中剂量组 ZWZ	0.81	16.57±0.57	1.49±0.25*	1.02±0.25**
真武汤低剂量组 ZWD	0.41	16.33±0.67	1.55±0.21*	1.26±0.24

注:与模型对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

表 7 真武汤对心肾阳虚型心力衰竭大鼠心肌自噬相关蛋白相对蛋白含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 7 Autophagy related protein of heart-kidney yang deficiency CHF rats by ZW

组别 Groups	剂量(g/kg) Dose	LC3	ATG5	Beclin1	P62
正常对照组 Control	—	1.00±0.00***	1.00±0.00***	1.00±0.00*	1.00±0.00*
模型对照组 CHF	—	0.66±0.11	0.71±0.23	0.95±0.07	1.13±0.18
芪苈强心胶囊组 QL	0.30	1.80±0.13***	1.69±0.23***	1.70±0.21***	0.97±0.13*
真武汤高剂量组 ZWG	1.35	2.77±0.15***	1.73±0.24***	1.73±0.18***	0.81±0.24**
真武汤中剂量组 ZWZ	0.81	2.83±0.13***	2.01±0.23***	1.20±0.22**	0.68±0.16***
真武汤低剂量组 ZWD	0.41	2.52±0.12***	2.02±0.28***	1.73±0.14***	0.81±0.17***

注:与模型对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。

Note. Compared with the model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

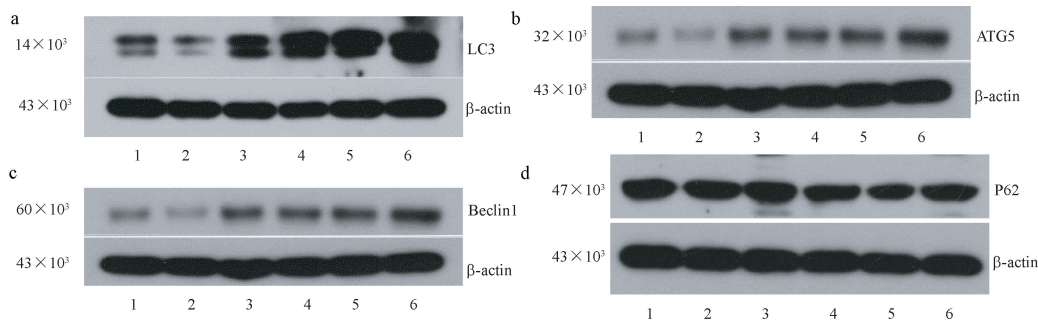


图 1 心肌组织 LC3(a)、ATG5(b)、BECLIN1(c)、P62(d) 表达结果

Figure 1 Results of LC3 (a), ATG5 (b), BECLIN1 (c), P62 (d) in myocardial tissue

2.6 真武汤对心肾阳虚型 CHF 大鼠心肌组织 LC3 和 p62 表达影响

免疫组织化学染色结果显示,与空白对照组比较,模型对照组心肌 BECLIN1、P62 表达量降低,各给药组可以升高心肾阳虚型 CHF 导致的 P62 表达量的降低,见图 2。

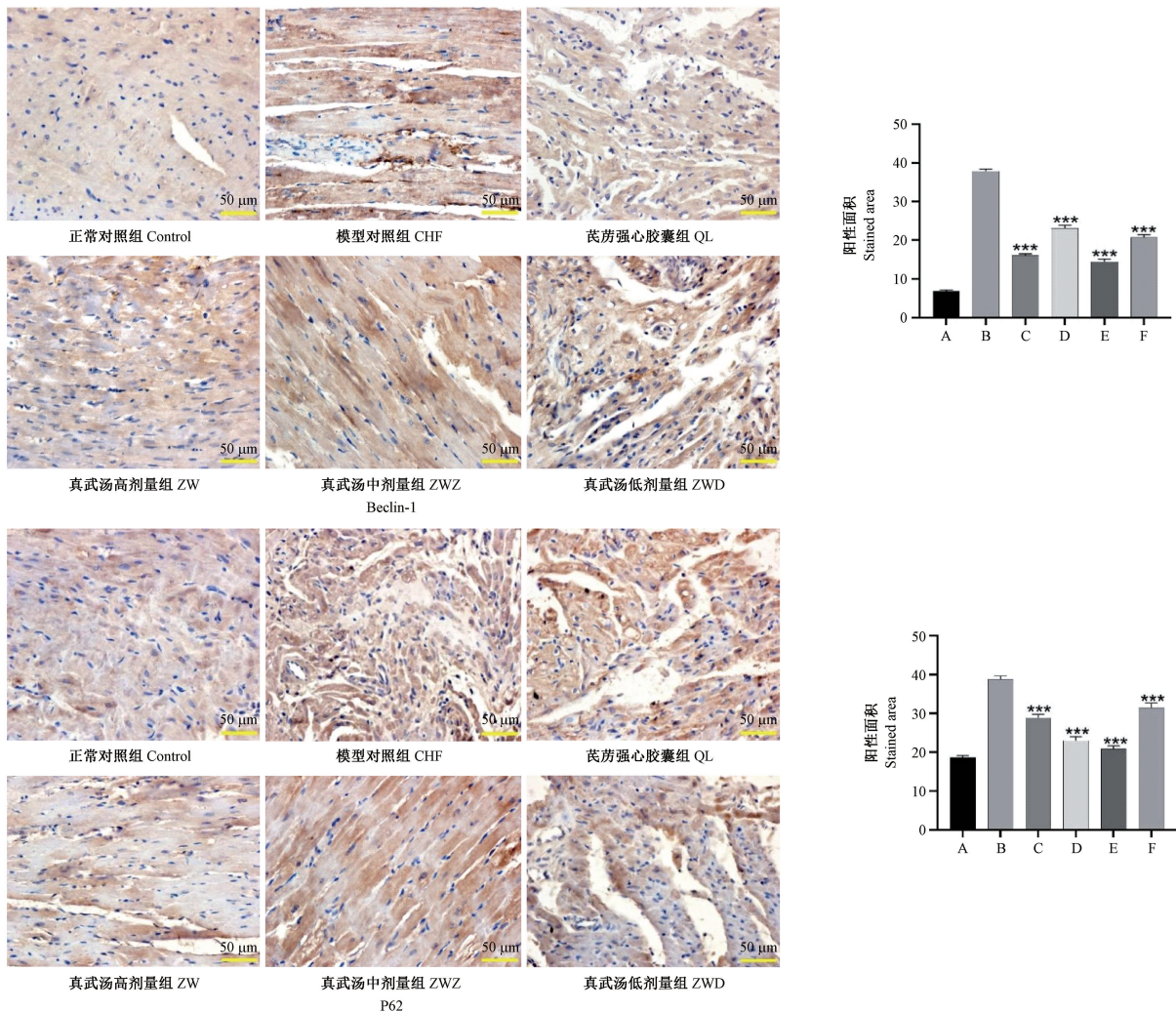
2.7 真武汤对心肾阳虚型 CHF 大鼠心肌组织影响

HE 染色结果可见:空白对照组心肌纤维间连接密集、纤维间分布平整,细胞与细胞之间距离正常;模型对照组心肌细胞边缘不整,大面积心肌纤维溶解,细胞间距加宽,心肌纤维排列混乱,存在局部炎性细胞浸润现象,心肌组织产生局部水肿;各

给药组可使模型对照组的心肌细胞得到好的治疗改善,结果见图 3。

3 讨论

慢性心力衰竭中医证型分类方式繁多各有侧重,目前还没有统一的标准。相对比较权威的《中医新药临床研究指导原则》^[8]辨证标准将本病分为 7 个证型。疾病的初期病理变化是心肺气虚。病情进一步进展则是气阴两亏、气虚血瘀。而慢性心力衰竭较严重的阶段则是心肾阳虚、阳虚水泛、痰饮阻肺。在实验的过程中,我们通过手术将实验用大鼠两侧甲状腺切除,再对它进行尾部静脉注射阿霉素之后,实验大鼠主要表现出毛皮灰黄、呼吸微弱、



注:A:正常对照组;B:模型对照组;C:芪苈胶囊组;D:真武汤高剂量组;E:真武汤中剂量组;F:真武汤低剂量组。与模型对照组比较,*** $P < 0.001$ 。

图 2 免疫组化检查结果

Note. A, Control. B, Model. C, QL. D, ZWG. E, ZWZ. F, ZWD. Compared with the model group, *** $P < 0.001$.

Figure 2 Results of IHC

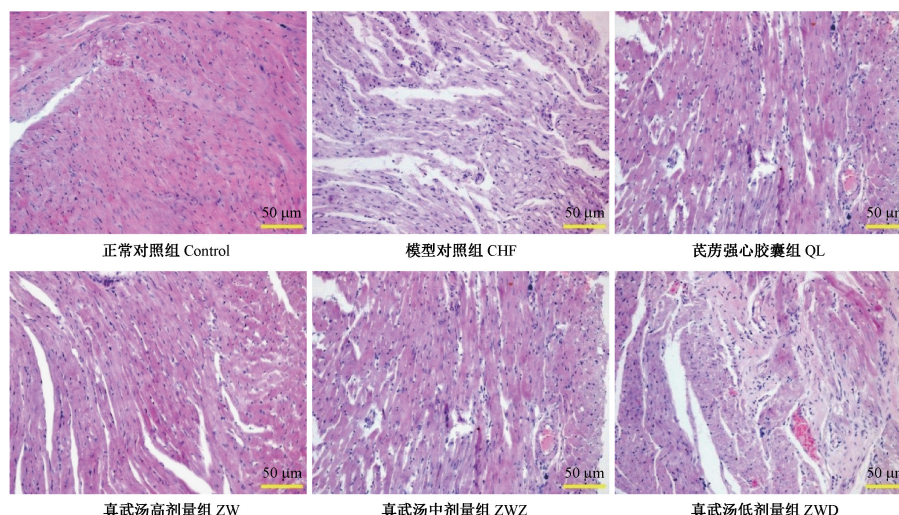


图 3 光镜检查结果

Figure 3 Results by light microscopy

精神萎靡、畏寒蜷缩、大便溏泻的症状,这些生命体征与人类中医证候心肾阳虚证型非常相像^[9]。基于此,我们认为这组大鼠的表现与模拟的心肾阳虚证候十分吻合,根据上述研究内容,我们在建立心肾阳虚证的动物模型时,可以参考上述方案。

经过大量的临床和动物实验已经证实,阿霉素在长期应用时可出现难以恢复的心脏毒性作用,而且由于阿霉素与心肌组织亲和力显著强于其他组织,因此可出现剂量不可逆的依赖性心肌损伤^[10],可能与其机制相关的因素有:基因突变^[10-11];核酸、脂质过氧化^[12];Ca²⁺超载^[13];能量代谢障碍^[14-15];自由基损伤^[16];产物的直接性损害^[17]等。目前,腹腔间断性注射阿霉素已经被广泛应用于慢性心力衰竭大鼠模型的建立^[18-19],并被认为能够高度模仿人体慢性心力衰竭的神经-内分泌机制和血流动力学的改变,与其它造模方法相比,该法具有方法简单和复制性高的优点。因此本研究认为尾静脉注射阿霉素造成的心力衰竭模型能更好地用于益气温阳抗心衰的治疗性研究。

本研究结果显示,真武汤可以降低心肾阳虚型心力衰竭大鼠心肌组 BNP 含量,说明其对心衰症状具有改善功能。LA 作为运动时物质代谢的产物,模型动物 LA 含量降低说明心肌细胞功能下降,而真武汤能够升高心肌组织 LA 含量,降低 CaN 含量,说明真武汤能够改善心脏能量代谢。心肾阳虚型 CHF 大鼠心肌自噬相关蛋白 LC3、ATG5、BECLIN1 含量降低,P62 含量升高,说明心力衰竭初期心肌细胞有大量细胞发生自噬,真武汤可以升高心力衰竭

大鼠自噬相关指标 LC3、ATG5、BECLIN1 含量,降低 P62 含量,说明真武汤在心力衰竭初期可以通过调节自噬保护损伤的心肌细胞。

综上所述,在进行有关针对心肾阳虚型 CHF 模型的构建的研究时,可以应用阿霉素尾静脉注射的方法,本研究认为尾静脉注射阿霉素造成的心力衰竭模型能更好地用于益气温阳抗心衰的治疗性研究,并且,在临床中针对本有不同程度符合心肾阳虚证型的慢性心力衰竭的患者,可以加以应用真武汤进行辨证论治。

参考文献:

- [1] 李立志,陈可冀. 治疗充血性心力衰竭经验 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2006, 4(2): 136-138.
- [2] 王金梁. 真武汤治疗心力衰竭临床观察 [J]. 光明中医, 2019, 34(14): 2110-2112.
- [3] 周蔓菁,唐其柱. 真武汤对老年慢性心力衰竭患者血流动力学、MMP-9 和心功能的影响 [J]. 世界中医药, 2019, 14(4): 926-930.
- [4] Pfisterer M, Buser P, Rickli H, et al. BNP-guided vs symptom-guided heart failure therapy: the trial of intensified vs standard medical therapy in elderly patients with congestive heart failure (TIME-CHF) randomized trial [J]. JAMA, 2009, 301(4): 383-392.
- [5] 邓文龙. 中医方剂的药理与应用 [M]. 重庆: 重庆出版社, 1990.
- [6] 李琰,李介鸣. 治疗心力衰竭经验 [J]. 中医杂志, 2001, 42(3): 14-15.
- [7] 刘俊保. 真武汤治疗慢性充血性心力衰竭 30 例 [J]. 中华实用中西医杂志, 2004, 17(12): 1794-1795.
- [8] Dunkern TR, Wedemeyer I, Baumgärtner M, et al. Re-sistance

- of p53 knockout cells doxorubicin is related to reduced formation of DNA strand breaks rather than impaired apoptotic signaling [J]. *DNA Repair (Amst)*, 2003, 2(1): 49-60.
- [9] 郑筱英. 中药新药临床指导原则 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002.
- [10] Momparler RL, Karon M, Siegel SE, et al. Effect of adriamycin on DNA, RNA, and protein synthesis in cell-free systems and intact cells [J]. *Cancer Res*, 1976, 36(8): 2891-2895.
- [8] Dunkern TR, Wedemeyer I, Baumgärtner M, et al. Resistance of p53 knockout cells to doxorubicin is related to reduced formation of DNA strand breaks rather than impaired apoptotic signaling [J]. *DNA Repair (Amst)*, 2003, 2(1): 49-60.
- [11] Ferrans VJ, Clark JR, Zhang J, et al. Pathogenesis and prevention of doxorubicin cardiomyopathy [J]. *Tsitologiia*, 1997, 39(10): 928-937.
- [12] Muraoka S, Miura T. Free radicals mediate cardiac toxicity induced by adriamycin [J]. *Yakugaku Zasshi*, 2003, 123(10): 855-866.
- [13] Fu J, Yamamoto K, Guan ZW, et al. Human neuronal nitric oxide synthase can catalyze one-electron reduction of adriamycin: role of flavin domain [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2004, 427(2): 180-187.
- [14] Al-Nasser IA. *In vivo* prevention of adriamycin cardiotoxicity by cyclosporin A or FK506 [J]. *Toxicology*, 1998, 131(2-3): 175-181.
- [15] Zhou S, Heller LJ, Wallace KB. Interference with calcium-dependent mitochondrial bioenergetics in cardiac myocytes isolated from doxorubicin-treated rats [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2001, 175(1): 60.
- [16] Rabelo E, De Angelis K, Bock P, et al. Baroreflex sensitivity and oxidative stress in adriamycin-induced heart failure [J]. *Hypertension*, 2001, 38(3 Pt 2): 576-580.
- [17] 徐萌, 积仁, 许少珍. 阿霉素心脏毒性的发生机制及其防治 [J]. *第一军医大学学报*, 2001, 21(7): 532-534.
- [18] 杨建业, 张迎春, 唐俊明, 等. 阿霉素诱导大鼠心衰模型的建立 [J]. *郧阳医学院学报*, 2005, 24(5): 268-271, 321.
- [19] 李秀梅, 田国忠, 欧叶涛, 等. 大鼠阿霉素慢性心衰模型的制备与心衰指标的判定 [J]. *解剖学研究*, 2005, 27(3): 176-178.

〔收稿日期〕2020-04-10

(上接第 28 页)

- [18] White M, Courtemanche M, Stewart DJ, et al. Age and gender-related changes in endothelin and catecholamine release and in autonomic balance in response to head-up tilt [J]. *Clin Sci (Lond)*, 1997, 93(4): 309-316.
- [19] Reis Filho JR, Cardoso JN, Cardoso CM, et al. Reverse cardiac remodeling: a marker of better prognosis in heart failure [J]. *Arq Bras Cardiol*, 2015, 104(6): 502-506.
- [20] Wagner HR, Crutcher KA, Davis JN. Chronic estrogen treatment decreases beta-adrenergic responses in rat cerebral cortex [J]. *Brain Res*, 1979, 171(1): 147-151.
- [21] Khasar SG, Dina OA, Green PG, et al. Estrogen regulates adrenal medullary function producing sexual dimorphism in nociceptive threshold and beta-adrenergic receptor-mediated hyperalgesia in the rat [J]. *Eur J Neurosci*, 2005, 21(12): 3379-3386.
- [22] Chu SH, Goldspink P, Kowalski J, et al. Effect of estrogen on calcium-handling proteins, beta-adrenergic receptors, and function in rat heart [J]. *Life Sci*, 2006, 79(13): 1257-1267.
- [23] Grohé C, Kahlert S, Löbber K, et al. Cardiac myocytes and fibroblasts contain functional estrogen receptors [J]. *FEBS Lett*, 1997, 416(1): 107-112.
- [24] Klangkalya B, Chan A. The effects of ovarian hormones on beta-adrenergic and muscarinic receptors in rat heart [J]. *Life Sci*, 1988, 42(23): 2307-2314.
- [25] Mann DL, Bristow MR. Mechanisms and models in heart failure: the biomechanical model and beyond [J]. *Circulation*, 2005, 111(21): 2837-2849.

〔收稿日期〕2020-07-02