

心复力颗粒对阿霉素致心力衰竭大鼠 PPAR - α 及 ET - 1 的影响

郭彩霞 马丽红 沈启明 张晓丽 王少霞 李扬

摘要 目的 探讨心复力颗粒对阿霉素(adriamycin, ADR)致心力衰竭(heart failure, HF)大鼠 PPAR - α 及 ET - 1 的影响。**方法** 60 只雄性 SD 大鼠随机分为正常组,模型组,心复力颗粒低、中、高剂量组。除正常组外均给予 ADR2.5mg/kg 腹腔注射制备大鼠 HF 模型,正常组腹腔注射等量生理盐水,每周 1 次,持续 6 周。注射 ADR 第 5 周开始各组大鼠灌胃给药,将心复力颗粒用生理盐水配成 0.5g/ml 的混悬液,低、中、高剂量组的灌胃剂量分别为 0.675g/(kg · d)、1.350g/(kg · d)、2.700g/(kg · d),正常组和模型组给予与中剂量组等体积生理盐水,每天 1 次,持续 4 周。用酶联免疫吸附测定法(enzyme - linked immunosorbent assay, ELISA)测定血浆中内皮素 - 1(endothelin - 1, ET - 1)含量,半定量 RT - PCR 法检测过氧化物酶体增生物激活受体(peroxisome proliferator activated receptor - α, PPAR - α)mRNA 的表达。**结果** 与正常组比较,模型组 PPAR - αmRNA 表达明显降低($P < 0.05$),ET - 1 蛋白表达明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,心复力颗粒低、中、高剂量组 PPAR - αmRNA 显著升高($P < 0.05$);中、高剂量组 ET - 1 蛋白表达显著降低($P < 0.05$),但心复力低剂量组与模型组 ET - 1 蛋白表达无统计学差异($P > 0.05$)。**结论** 心复力颗粒能明显改善 HF 大鼠心肌能量代谢,其机制可能与调节 PPAR - α 及 ET - 1 的表达有关。

关键词 过氧化物酶体增生物激活受体 - α 心力衰竭 心复力颗粒 能量代谢

中图分类号 R2 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.05.011

Effects of Xinfu Granula on PPAR - α and ET - 1 in Rats with Heart Failure Induced by Adriamycin. Guo Caixia, Ma Lihong, Shen Qiming, et al. State Key Laboratory of Cardiovascular Disease, Fuwai Hospital, National Center for Cardiovascular Diseases, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100037, China

Abstract Objective To investigate the effects of Xinfu granula on PPAR - α and ET - 1 in rats with heart failure (HF). **Methods** Sixty male SD rats were randomly divided into 5 groups: normal control group, HF group, low - dose xinfu granula group, medium - dose xinfu granula group and high - dose xinfu granula group. All the groups were injected intraperitoneally with adriamycin except normal control group with isovolumic normal saline. All groups were given the corresponding drugs by intragastric injection every morning for 4 weeks since the fifth week. Xinfu granula was suspended by isovolumic normal saline with the concentration of 0.5g/ml, and the doses of xinfu granula groups were 0.675g/(kg · d), 1.350g/(kg · d) and 2.700g/(kg · d), respectively. Normal control group and HF group were perfused with isovolumic normal saline as the same volume of medium - dose xinfu granula group. Endothelin - 1 (ET - 1) was measured by enzyme - linked immunosorbent assay (ELISA), and the expressions of peroxisome proliferator activated receptor - α (PPAR - α) was measured by RT - PCR. **Results** Compared with the normal control group, The expression of PPAR - α decreased significantly and the expression of ET - 1 increased in the HF group ($P < 0.05$). Compared with the HF group, the PPAR - α expression was much higher in all three xinfu granula groups ($P < 0.05$). The ET - 1 expression was down - regulated obviously in medium - dose and high - dose xinfu granula groups compared with the HF group ($P < 0.05$). But the ET - 1 expression in low - dose xinfu granula group had no significant difference relative to the HF group ($P > 0.05$). **Conclusion** Our findings suggest that xinfu granula can improve the cardiac function and myocardial energy metabolism in the HF rats induced by adriamycin, and the underlying mechanism may be related to its effects on the expression of PPAR - α and ET - 1.

Key words PPAR - α; Heart failure; Xinfu granula; Energy metabolism

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81071177)

作者单位:100037 中国医学科学院/北京协和医学院国家心血管病中心、阜外心血管病医院、心血管疾病国家重点实验室(郭彩霞、马丽红、沈启明、张晓丽);100850 北京,中国人民解放军军事科学院放射与辐射医学研究所(王少霞、李扬)

通讯作者:马丽红,电子信箱:mlh4463@163.com

HF 是各种心脏疾病的终末阶段,严重威胁人类健康,5 年存活率与恶性肿瘤相仿,是导致心血管疾病患者死亡的主要原因,已成为严重的公共卫生问题^[1, 2]。研究显示,HF 与心肌能量代谢及缩血管因子内皮素 - 1(endothelin - 1, ET - 1)密切相关,ET -

1 能够诱导心肌损伤,心肌能量代谢紊乱在 HF 的发生、发展进程中起着关键的作用^[3,4]。因此,寻找一种有效改善心肌能量代谢及 ET - 1 表达的药物来治疗 HF 已受到广泛关注。心复力颗粒是施今墨传人丁鸣九先生创制的用于治疗 HF 的经验方改良制剂,研究发现该药能够保护大鼠内皮细胞和心肌细胞,改善心功能,延缓并逆转心室重构^[5]。但目前尚未有该药对心肌能量代谢的研究,为观察心复力颗粒对衰竭心脏心肌能量代谢的影响,本实验采用大鼠 HF 模型,观察 PPAR - α 及 ET - 1 表达的影响,探讨心复力冲剂治疗 HF 的相关作用机制。

材料与方法

1 材料:(1)实验动物:雄性健康 SD 大鼠 60 只,由军事医学科学院动物实验中心提供,实验动物许可证号:SCXK-(军 2007-004),体重 $200 \pm 20\text{ g}$,清洁级。将 60 只大鼠随机分为 5 组:模型组,正常组,心复力低[$0.675\text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$]、中[$1.350\text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$]、高[$2.700\text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$]剂量组,每组 12 只。(2)药物及试剂:阿霉素(adriamycin, ADR)由深圳万乐药业有限公司生产,10 毫克/瓶,4℃保存,产品批号:1103E2;心复力颗粒为笔者医院内部制剂,由黄芪、麦冬、木瓜、丹参、葶苈子等组成,用水煎煮、真空浓缩、喷雾干燥、干式制粒,每包 5g,含生药量 18.1g,使用生理盐水配成混悬液。试剂:ELISA 试剂盒购于上海研域生物科技有限公司;大鼠 PCR 试剂盒购自上海西唐生物科技有限公司;标准分子质量 DNA - marker 购自(北京)天根生化科技有限公司。(3)引物设计:大鼠 PPAR - α 基因 PCR 扩增的引物设计由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成,设计为:PPAR - α 上游引物:5' - CAGAAGTTGCAG-GAGGGGATTGTG - 3', 下游引物:5' - CAGAAGTTGCAG-GAGGGGATTGTG - 3';采用甘油醛 - 3 - 磷酸脱氢酶(glycer-aldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase, GAPDH)做内参照,上游引物:5' - TCA CCA TCT TCC AGG AGC GAG A - 3',下游引物:5' - GCA GGA GCC ATT CCT GAT GAT C - 3'。

2. 方法:(1)模型建立:腹腔注射阿霉素制备扩张型心肌病(dilated cardiomyopathy, DCM)引发 HF 模型:用生理盐水将 ADR 制成 $2\text{ mg}/\text{ml}$ 的溶液,48 只造模大鼠均需腹腔注射 ADR ($2.5\text{ mg}/\text{kg}$),12 只正常组大鼠注射等体积生理盐水,每周 1 次,共 6 次^[6]。造模成功标准:造模 6 周后:①随机选取两只大鼠处死取心肌组织固定包埋后切片,经苏木精 - 伊红(hematoxylin - eosin, HE)染色,光学显微镜下观察心肌组织,见心肌细胞明显变性、坏死、纤维化,符合 DCM 的心肌病理改变;②超声检测大鼠射血分数、左心室舒张末径及左心室收缩末径,如与正常组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)为造模成功^[7]。将造模动物分笼饲养,常规进食及饮水。(2)药物干预:用蒸馏水将心复力颗粒配成 $0.5\text{ g}/\text{ml}$ 的混悬液,为验证心复力颗粒对心力衰竭大鼠的预防及治疗作用,从注射 ADR 第 5 周开始灌胃给药,低、中、高剂量组的给药剂量分别为

$0.675\text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 、 $1.350\text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 、 $2.700\text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$,模型组及正常组分别给予与中剂量组等体积的生理盐水,每天 1 次,持续到第 8 周^[8]。(3)指标检测:末次给药后禁食禁水 24h,5% 水合氯醛麻醉($4\text{ ml}/\text{kg}$),仰卧固定,开胸取出心脏,冰浴生理盐水冲洗,用滤纸将水分吸干,取一部分左心室前壁心肌组织浸泡于 10% 甲醛溶液中留待做病理检测,余组织切片后存放于液氮中待用。①病理学观察:取待测左心室前壁组织放于 10% 甲醛溶液中固定 12h 后脱水包埋,切片 $3 \sim 4\mu\text{m}$ 厚,经 HE 染色,光镜下(10×20)进行观察;②RT - PCR 方法测定 PPAR - α mRNA 的表达:取大鼠左心室部分心肌组织,常规方法提取 RNA,按 RT - PCR 试剂盒要求进行反转录反应和 PCR 扩增 PPAR - α 目的片段,PCR 反应条件为 94°C 3min,预变性后, 94°C 1min, 60°C 1min, 72°C 1min,30 个循环后, 72°C 延伸 5min。反应结束后取 $5\mu\text{l}$ 反应产物,用 1% 琼脂糖凝胶电泳分离,扫描成像,用 CMAS-II 图像分析软件进行光密度分析,测定电泳带的积分光密度值(integral optical density, iOD)。以 GAPDH 作为内参照,以目的片段与 GAPDH 的 iOD 比值($\text{PPAR} - \alpha/\text{GAPDH}$)作为 PPAR - α mRNA 的相对表达水平;③测定血浆中 ET - 1 含量:采 ISA 法测定血浆中 ET - 1 含量:操作按说明书进行。

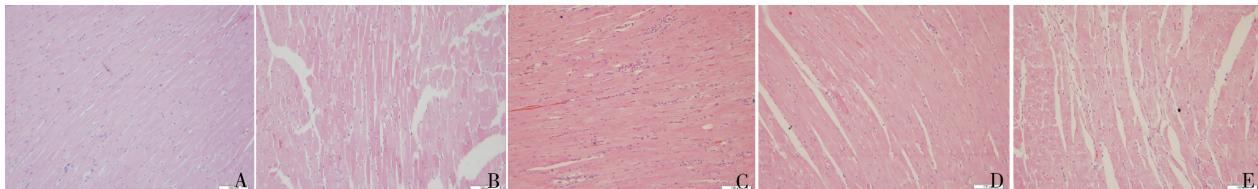
3. 统计学方法:采用 SPSS 16.0 软件进行统计学处理,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,使用单因素方差分析比较组间差异,LSD 检验法进行两两比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 一般情况:造模过程中,正常对照组大鼠毛色有光泽,对周围变化反应灵敏,行动敏捷;其余组大鼠逐渐出现懒动,少食,毛色枯槁、散乱竖起、脱毛,口唇发绀,腹泻等症状,体重逐渐下降,从第 4 周开始部分大鼠出现腹腔积液和死亡;第 6 周时症状更加明显;第 8 周实验结束时,模型组 4 只死亡,心复力低、中、高剂量组分别有 4 只、2 只、3 只死亡(除外第 6 周每组随机选取两 2 处死判断模型成功与否)。

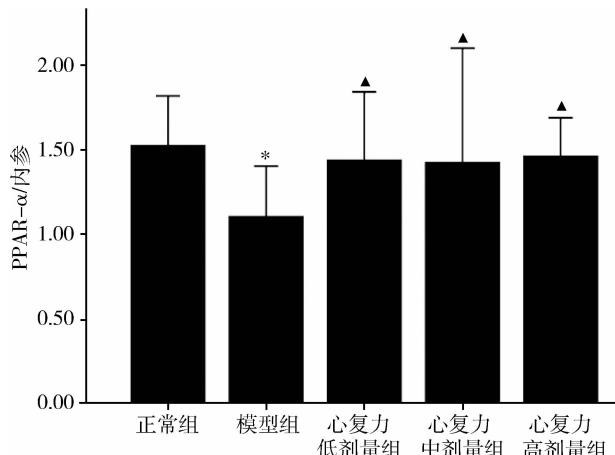
2. 各组大鼠心肌细胞病理形态变化(图 1):光学显微镜下观察,正常组心肌细胞纹理清晰,形态正常,未见纤维增生和心肌细胞坏死;模型组可见心肌呈片状坏死,透壁性,心肌纤维波浪形,空泡样变性、嗜酸性变性,甚至心肌细胞大片溶解消失伴间质纤维化,左心室修复反应差;低、中剂量组以条索状小灶性坏死与健存心肌交错、均质化嗜酸变性改变为主,无片状坏死;高剂量组可见纤维化和变性等改变,但较轻微。

3. 各组大鼠 PPAR - α mRNA 及 ET - 1 蛋白表达情况:与正常组比较,模型组心肌组织 PPAR - α mRNA 的表达明显降低($P < 0.01$);与模型组比较,心复

图 1 各组大鼠心肌细胞病理形态学变化比较(HE 染色, 10×20)

A. 正常组; B. 模型组; C. 心复力低剂量组; D. 心复力中剂量组; E. 心复力高剂量组

力低、中、高剂量组 PPAR- α mRNA 的表达明显升高 ($P < 0.05$), 但治疗组之间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 2、表 1)。与正常组比较, 模型组 ET-1 含量明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 心复力中、高剂量组 ET-1 含量明显下降 ($P < 0.01$), 但心复力低剂量组与模型组差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 治疗组之间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 3、表 1)。

图 2 心复力冲剂对各组大鼠 PPAR- α mRNA 表达的影响与正常组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$ 表 1 各组大鼠心肌组织 PPAR- α mRNA 表达及血浆 ET-1 水平 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | PPAR- α /GAPDH (iOD) | ET-1 (pg/ml) |
|---------|----|-----------------------------|---------------------------------|
| 正常组 | 12 | 1.53 ± 0.12 | 9.87 ± 1.33 |
| 模型组 | 8 | $1.10 \pm 0.12^*$ | $15.92 \pm 1.97^*$ |
| 心复力低剂量组 | 8 | $1.44 \pm 0.16^\Delta$ | 13.77 ± 1.50 |
| 心复力中剂量组 | 10 | $1.42 \pm 0.27^\Delta$ | $10.37 \pm 2.32^{\Delta\Delta}$ |
| 心复力高剂量组 | 9 | $1.46 \pm 0.09^\Delta$ | $10.53 \pm 0.94^{\Delta\Delta}$ |

与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

讨 论

阿霉素属于蒽环类抗生素, 是临幊上常用的广谱抗肿瘤药物, 具有一定的心脏毒性^[9]。其不良反应

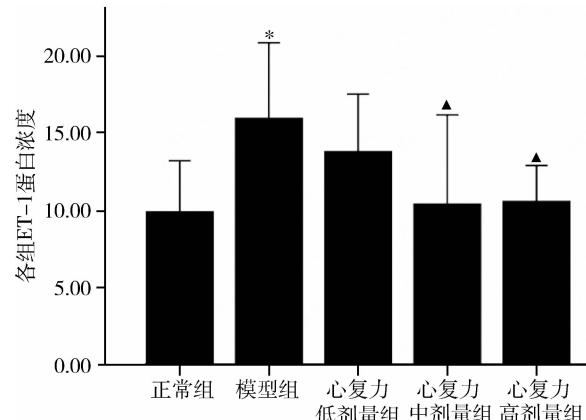


图 3 各组大鼠血浆 ET-1 水平比较

与正常组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

可引起心肌细胞和内皮细胞凋亡, 进而引起类似 DCM 样改变以及在此基础上发生 HF。研究表明, 腹腔注射阿霉素 2.5 mg/kg, 总量为 15 mg/kg 的方法可诱导大鼠心肌明显坏死、凋亡及纤维化, 符合人类 HF 的心肌病理改变^[10]。HF 是多种心脏疾病的终末阶段, 能量代谢在心衰进程中起着重要作用^[11]。正常情况下心肌由脂肪酸(fatty acid, FA) 和葡萄糖氧化代谢供能, 其中 FA 和葡萄糖分别占心肌能量需求的 60% ~ 80% 和 20% ~ 35%。HF 时心肌能量代谢底物利用变化, FA 代谢减少而葡萄糖利用增加^[12]。由于 FA 是心脏能量的主要来源, 因此 FA 氧化的改变较其他氧化途径对心脏功能的影响更重要。FA 代谢减少导致游离脂肪酸(free fatty acid, FFA) 堆积, FFA 能抑制线粒体、肌质网和胞质酶体系活力, 损伤线粒体功能和呼吸链, 同时, 心肌组织中 FFA 堆积可抑制糖酵解, 使心肌能量代谢进一步恶化, 这种代谢重构能够加重心肌重构, 加剧心功能的恶化。

近年研究表明, PPAR- α 与心血管疾病有着密切的联系。PPAR- α 属于过氧化物酶增生物激活受体 (peroxisome proliferator activated receptors, PPARs) 家族成员, 是 PPARs 家族第 1 个被发现也是目前唯一能够促进过氧化物酶增殖, 促进细胞内

FA 氧化代谢的受体,对 FA 氧化酶的基因表达具有重要调节作用,可促进细胞对 FA 的摄取和利用,增加心肌 FA 利用率^[13,14]。PPAR - α 在分解 FA 的组织细胞,如肝细胞、骨骼肌细胞和心肌细胞中广泛存在,其激活引起参与 FA 摄取和氧化及脂质代谢的蛋白的基因上调。Tian^[12] 在对左心室肥厚大鼠能量代谢的研究中发现,FFA 代谢减少可能与 PPAR - α 表达减少有关。临床研究表明,HF 患者心肌能量代谢障碍与心肌组织 PPAR - α 及其调节的目的基因表达减少有关,进而引起游离 FA 的氧化利用障碍,促进心力衰竭的发生^[15]。而在心力衰竭末期,PPAR - α 表达降低导致了脂肪酸代谢率下降,进而引起心肌能量代谢的恶化。本实验结果显示模型组大鼠 PPAR - α mRNA 表达水平明显下降,与上述论述相符。

心复力颗粒由黄芪、人参、丹参、三棱、葶苈子等组成,全方温阳益气,利水祛瘀,通调三焦。其中黄芪、人参补心气,温阳利水为君药;丹参、三棱活血祛瘀,疏通血脉之瘀滞,葶苈子可泻肺平喘,利水消肿,泻肺气之壅闭以通调水道,三者共为臣药;木瓜平肝消食和胃,槟榔行水消食、破积下气、祛痰,二药合用以通调三焦之气;麦冬养阴润肺为佐药。心复力颗粒在临床应用 50 余年,在全国享有盛誉。课题组前期研究证实,心复力颗粒能减轻由异丙肾上腺素所致的大鼠透壁性心肌梗死及左心室重构,可有效保护心肌细胞^[8];临床观察发现,该药能改善 HF 患者临床症状、增加活动耐量,并提高 HF 患者射血分数,改善心功能^[2]。为进一步探讨其相关作用机制,本实验选用 ADR 腹腔注射致大鼠 HF 模型进行实验研究,以验证心复力颗粒对 ADR 致 HF 大鼠 PPAR - α 及 ET - 1 的影响。

经心复力颗粒对 HF 大鼠干预后发现其可以明显提高 PPAR - α 的 mRNA 表达,改善 HF 大鼠的心肌能量代谢,并可显著降低大鼠血浆中 ET - 1 的含量,而 ET - 1 在充血性 HF 发生、发展的过程中起到重要作用。研究表明,ET 可引起 HF 患者的血流动学变化和循环阻力增加,对 HF 进程有直接的促进作用,血浆 ET - 1 水平与 HF 患者的心功能不全程度密切相关,在 HF 的复杂进程中起着重要作用^[16]。而本实验发现心复力颗粒可显著降低大鼠血浆中 ET - 1 的表达量并提高 PPAR - α 的水平,病理学分析显示治疗组心肌细胞坏死和纤维化程度明显减轻,表明心复力冲剂能明显改善 HF 大鼠的心功能。综上所述,心复力颗粒能够改善 HF 大鼠心肌能量代谢,延缓 HF 的发生、发展,其机制可能与调控

PPAR - α 及 ET - 1 表达有关。

参考文献

- Gaddam KK, Verma A, Thompson M, et al. Hypertension and cardiac failure in its various forms [J]. The Medical Clinics of North America, 2009, 93(3): 665 - 680
- 张常喜, 杨爱丽. 心衰汤治疗合并心律失常的慢性心力衰竭患者的疗效 [J]. 中国老年医学杂志, 2013, 11(33): 5259 - 5260
- Kalk P, Westermann D, Herzfeld S, et al. Additional lack of iNOS attenuates diastolic dysfunction in aged ET - 1 transgenic mice [J]. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 2008, 86(6): 353 - 357
- Chandler MP, Kerner J, Huang H, et al. Moderate severity heart failure does not involve a downregulation of myocardial fatty acid oxidation [J]. American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology, 2004, 287(4): H1538 - 1543
- 马丽红, 阮英茆, 焦增绵, 等. 心复力冲剂对慢性心功能不全患者循环内皮细胞的影响 [J]. 中国全科医学, 2004, 7(16): 1
- 沈启明, 马丽红, 王少霞, 等. 心复力颗粒对阿霉素致扩张性心肌病心力衰竭大鼠心肌细胞凋亡的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(6): 783 - 788
- 周岩, 赵丽蓉, 杨思睿. 阿霉素诱导大鼠扩张型心肌病模型的建立 [J]. 中国实验诊断学, 2010, 14(3): 4
- 马丽红, 焦增绵, 范理礼, 等. 心复力冲剂对大鼠实验性心肌损伤的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2004, 24(6): 10 - 12
- 夏洪娟, 王延鹏, 朱伟, 等. 白藜芦醇通过上调 SIRT1 抑制阿霉素诱导的 H9c2 细胞损伤 [J]. 中国药理学通报, 2014, 30(2): 220 - 224
- Lu L, Wu W, Yan J, et al. Adriamycin - induced autophagic cardiomyocyte death plays a pathogenic role in a rat model of heart failure [J]. International Journal of Cardiology, 2009, 134(1): 82 - 90
- Turer AT, Malloy CR, Newgard CB, et al. Energetics and metabolism in the failing heart: important but poorly understood [J]. Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care, 2010, 13(4): 458 - 465
- Tian R. Transcriptional regulation of energy substrate metabolism in normal and hypertrophied heart [J]. Current Hypertension Reports, 2003, 5(6): 454 - 458
- Jia Z, Xue R, Liu G, et al. HMGB1 is involved in the protective effect of the PPAR alpha agonist fenofibrate against cardiac hypertrophy [J]. PPAR Res, 2014, 2014: 541394
- Tuunananen H, Engblom E, Naum A, et al. Free fatty acid depletion acutely decreases cardiac work and efficiency in cardiomyopathic heart failure [J]. Circulation, 2006, 114(20): 2130 - 2137
- Morgan EE, Chandler MP, Young ME, et al. Dissociation between gene and protein expression of metabolic enzymes in a rodent model of heart failure [J]. European Journal of Heart Failure, 2006, 8(7): 687 - 693
- Ohmae M. Endothelin - 1 levels in chronic congestive heart failure [J]. Wiener Klinische Wochenschrift, 2011, 123(23 - 24): 714 - 717

(收稿日期:2014-11-17)

(修回日期:2014-12-01)