

引用:王铭,马立旭,王秀萍,等.消饮化痰方对慢性心力衰竭大鼠 NT-proBNP 及 GPR35mRNA 水平的影响[J].现代中医药,2023,43(5):113-117.

消饮化痰方对慢性心力衰竭大鼠 NT-proBNP 及 GPR35mRNA 水平的影响^{*}

王铭^{1,2} 马立旭³ 王秀萍^{1,2} 韩金荣^{1,2} 徐建虎^{1,2**}

(1. 宁夏区域高发病中西医结合防治研究重点实验室,银川 750004;2. 宁夏医科大学回医药现代化教育部重点实验室,银川 750004;3. 宁夏回族自治区人民医院,银川 750002)

摘要:目的 探讨消饮化痰方干预慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF)大鼠的可能作用机制。前体脑钠肽(N-terminal pro-brain natriuretic peptide, NT-proBNP)及 G 蛋白偶联受体(G protein-coupled receptor 35, GPR35mRNA)水平的影响。方法 72 只 SD 大鼠随机分成空白组和 A 组, A 组采用腹腔注射阿霉素 6 周复制 CHF 模型。随后将 A 组大鼠随机分为模型组、中药低剂量组($7\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、中药中剂量组($14\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、中药高剂量组($28\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)及美托洛尔组($10\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 分别给与对应的药物, 每日一次, 连续 4 w。苏木精-伊红染色(Hematoxylin-eosin stain, HE)染色观察心肌组织的形态学变化, 酶联免疫吸附试验(Enzyme Linked Immunosorbent Assay, Elisa)检测血清中前体脑钠肽(N-terminal pro-brain natriuretic peptide, NT-proBNP)的含量, 实时荧光定量 PCR(Real Time PCR, RT-PCR)检测心肌组织中 GPR35mRNA 表达水平。结果 与空白组相比, 模型组 NT-proBNP 含量、GPR35mRNA 表达水平明显上升($P < 0.01$); 治疗后, 与模型组相比, 各治疗组 NT-proBNP 含量、GPR35mRNA 表达水平明显下降($P < 0.01, P < 0.05$)。结论 消饮化痰方对 CHF 大鼠的防治作用可能与抑制 GPR35 表达, 改善心肌缺血缺氧有关。

关键词:消饮化痰方;慢性心力衰竭;GPR35mRNA

中图分类号:R256.22 文献标识码:A

文章编号:1672-0571(2023)05-0113-05

DOI:10.13424/j.cnki.mtem.2023.05.021

慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF)是由于体循环和肺循环瘀血从而出现心动过速、呼吸困难、下肢水肿等一系列症状^[1-2], 其中体循环和肺循环瘀血导致心脏缺血缺氧是 CHF 发生发展的关键。研究发现 G 蛋白偶联受体 35(G protein-coupled receptor 35, GPR35)是治疗心血管疾病的新兴靶点^[3], 抑制 GPR35 可减轻心肌缺血缺氧损伤^[4]。中医认为心气虚是 CHF 发病的根本, 瘀血为发病的中心环节, 水停为发病的必然结果^[5-6]。《慢性心力衰竭中医诊疗专家共识》也指出痰饮和瘀血是 CHF 的病理因素^[7]。本研究通过观察消饮

化痰方对 CHF 大鼠前体脑钠肽(N-terminal pro-brain natriuretic peptide, NT-proBNP)及 GPR35mRNA 的影响, 探讨其可能作用机制。

1 仪器与材料

1.1 仪器 RM2016 切片机(上海徕卡仪器有限公司);酶标仪(芬兰公司);洗板机(芬兰公司);centrifuge5417R 低温高速离心机(Eppendorf 公司);BioPhotometer 生物分光光度计(Eppendorf 公司);DS-II 核酸蛋白定量仪(美国丹诺尔);CFX Connect 荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-RAD)。

1.2 试剂 消饮化痰方中所有药材均购自宁夏

* 基金项目:宁夏自然科学基金项目(2020AAC03128)

** 通讯作者:徐建虎,副教授。E-mail:xjh98@qq.com

医科大学附属回医中医院门诊部,经宁夏医科大学药学院中药教研室检验合格;美托洛尔(批号:H32025391,阿斯利康药业有限公司);盐酸阿霉素(批号:S17092,源叶生物公司)。苏木素染液(北京百灵威科技有限公司);伊红染液(源叶生物,R20594);NT-proBNP Elisa 试剂盒(上海信裕生物科技有限公司,XYR903292);2 * SYBR Mixture 荧光定量试剂盒(北京天根,Cat# FP-205-2);HiFiScriptT 快速去除基因组 cDNA 第一条链合成试剂盒(康为试剂,Cat# CW2582M)。

1.3 实验动物 SPF 级 SD 雄性大鼠,240 ~ 260 g,购买于宁夏医科大学动物中心,许可证号:SCXK(京)2019-0008。已通过宁夏医科大学实验动物伦理申请。

2 方法

2.1 分组与造模方法 用计算机随机数字法将 72 只大鼠随机分为空白组和 A 组,A 组参考文献^[8-9]复制 CHF 模型,选用 2 mg · kg⁻¹的剂量进行腹腔注射阿霉素,每周 2 次,共 6 w。将复制成功的 CHF 大鼠随机分为模型组、消饮化痰方(简称中药)高剂量组、中药中剂量组、中药低剂量组、美托洛尔组,每组 12 只。

2.2 药物制备及干预 按照《中国药典》制剂制备的相关要求,将消饮化痰方制成含 2 g · mL⁻¹生药的药液。给药剂量按照成人与大鼠体表面积换

算,分别给予中药高(28 g · kg⁻¹)、中(14 g · kg⁻¹)、低(7 g · kg⁻¹)及美托洛尔(10 mg · kg⁻¹)灌胃(高、中、低剂量分别相当于成人等效剂量的 2 倍、1 倍、0.5 倍),空白组和模型组灌胃给予等量的生理盐水,每日一次,连续 4 w。

2.3 指标检测

2.3.1 HE 染色观察心肌组织形态学变化 取心肌组织放入 4% 多聚甲醛固定,经冲水、梯度酒精脱水、透明、浸蜡、包埋等步骤后,制成切片,60 ℃ 烘片 2 h 后进行脱蜡、梯度酒精脱水、苏木精染色、盐酸酒精分化、伊红染色、透明、封片。显微镜下观察心肌组织形态学变化并拍照。

2.3.2 Elisa 检测血清中 NT-proBNP 含量 腹主动脉采血,4000 r · min⁻¹,离心 10 min,吸取上层血清,用酶联免疫吸附法检测各组大鼠血清中 NT-proBNP 的水平。按照试剂盒使用说明书中操作步骤进行操作。

2.3.3 Real Time PCR 检测心肌组织中 GPR35mRNA 表达水平 用 Trizol 提取心肌组织中总 RNA,逆转录为 cDNA,并进行实时荧光定量 PCR 检测。将样品放入实时定量 PCR 扩增仪中预变形 95 ℃ 15 min 后,95 ℃ 变形 10 s、退火 30 s、72 ℃ 延伸 30 s,40 个循环。用 GPR35mRNA 基因引物和 β-actin 内参基因引物进行扩增。同时在 60 ~ 95 ℃ 进行溶解曲线分析利用 PCR 仪绘出扩增曲线,进行结果分析。见表 1。

表 1 引物序列

基因	上游引物	下游引物	产物长度(bp)
GPR35	CTTGGCCGTGTTTATCATCT	GCATCCTGGAAGCTCTTTGG	192
β-actin	CTGAGAGGGAATCCTGCCTGA	AGGAAGAGGATGCCGCAGTGCC	93

2.4 统计学方法 采用 SPSS 26.0 统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示;多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),两两比较用最小显著性差异法(LSD)检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

实验过程中,模型组死亡 1 只(腹水),美托洛尔组死亡 4 只(腹水及麻药过量),中药低剂量组死亡 2 只(腹水及灌胃手法操作不当),中药中剂量组死亡 1 只(灌胃手法操作不当),中药高剂量

组死亡 2 只(灌胃手法操作不当)。

3.1 消饮化痰方对大鼠心肌组织形态学变化的影响 HE 染色结果显示:空白组可见心肌细胞横纹清楚,排列整齐,无肌纤维断裂,胞质均匀,表明心肌为正常结构;模型组可见心肌细胞排列紊乱,心肌间质水肿,肌纤维断裂,伴有大量的慢性炎症细胞浸润,出现明显的心肌纤维化特征;各治疗组与模型组相比,心肌细胞排列变整齐,无心肌纤维断裂。见图 1。

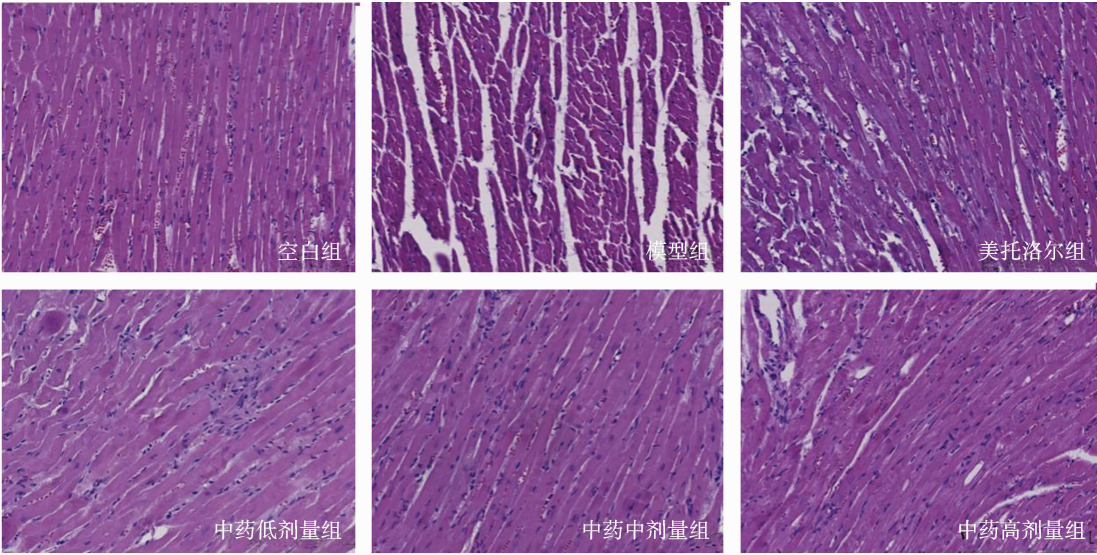


图 1 各组大鼠心肌组织形态学变化(HE 染色, ×200)

3.2 消饮化痰方对大鼠血清 NT-proBNP 含量的影响 与空白组相比,模型组 NT-proBNP 含量明显升高($P < 0.01$);治疗后,各组 NT-proBNP 含量均明显降低($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 各组大鼠血清 NT-proBNP 含量的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	NT-proBNP (pg · mL ⁻¹)
空白组	12	44.69 ± 1.83
模型组	11	54.69 ± 1.70 *
美托洛尔组	8	49.80 ± 2.33 **
中药低剂量组	10	50.70 ± 2.17 **
中药中剂量组	11	49.50 ± 1.98 **
中药高剂量组	10	48.37 ± 0.97 **

注:与空白组比较,* $P < 0.01$;与模型组相比,# $P < 0.01$

3.3 消饮化痰方对大鼠心肌组织 GPR35mRNA 表达水平 与空白组相比,模型组 GPR35mRNA 表达水平明显升高($P < 0.01$);治疗后各组 GPR35mRNA 表达水平明显降低($P < 0.01, P < 0.05$)。见表 3。

表 3 各组大鼠 GPR35mRNA 表达水平的比较($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	GRP35mRNA
空白组	1.13 ± 0.14
模型组	3.68 ± 0.53 *
美托洛尔组	1.93 ± 0.11 **
中药低剂量组	3.08 ± 0.22 ***
中药中剂量组	2.07 ± 0.14 **
中药高剂量组	1.75 ± 0.98 ***

注:与空白组比较,* $P < 0.01$,** $P < 0.05$;与模型组相比,# $P < 0.01$,## $P < 0.05$

4 讨论

中医并无“心力衰竭”这一病名,近代医家认为《金匱要略》中记载的“心水”“支饮”与 CHF 的症状十分相近,认为水饮是导致心衰发生的关键。唐宗海的《血证论》中提出“血病不离乎水,水病不离乎血”的观点,认为水饮和瘀血之关系密切。治法上根据“病痰饮者,当以温药和之”的治疗原则及《经方例释》曰“葶苈本治心水,故《千金》十水丸,用以治赤水之从心肿者”。故选用的消饮化痰方是以经方苓桂术甘汤合葶苈大枣泻肺汤为主方,加丹参、川芎、葛根组成,以化饮为主,兼以活血。2014 年《慢性心力衰竭中医诊疗专家共识》中也同样指出活血化痰利水的治法^[7]。史君等^[10]将近 20 年 CHF 的临床用药规律进行分析,发现也是以益气、活血、利水的药物为主。说明消饮化痰方与近代医家思路是一致的。

NT-proBNP 主要由心室肌细胞释放,主要生理功能是舒张血管、利尿、抑制肾素-血管紧张素-醛固酮(RAA)和交感神经系统^[11]。在 CHF 发生时,心脏内压力增高,NT-proBNP 的分泌和合成增多,所以 NT-proBNP 的浓度反应了心衰的严重程度。在本研究中模型组的 NT-proBNP 含量明显高于空白组,提示 CHF 大鼠模型复制成功。治疗后各组 NT-proBNP 含量明显下降,提示消饮化痰方能够有效改善 CHF。这可能与消饮化痰方利尿、扩张血管的功能密不可分。现代药理学表明葶苈子有强心、利尿、拮抗肾素-血管紧张素系统(RAS)等作

用^[12]。苓桂术甘汤合葶苈大枣泻肺汤具有调节水液代谢的作用^[13-14]。葛根、丹参、桂枝等药具有扩张血管的作用^[15-17]。

G 蛋白偶联受体 (GPCR) 是最大和最多的基因家族之一,并构成最大的受体家族,很多临床药物都是通过此类受体来发挥作用^[18]。GPR35 是一种孤儿受体(尚未被内源性配体激活的受体),近年来被发现与心血管疾病关系密切,可作为治疗心血管疾病的新兴靶点^[19]。相关研究发现 GPR35 的基因表达在人类衰竭的心肌中增加,认为可以将 GPR35 基因用于诊断心力衰竭,并作为治疗心力衰竭的可能药物靶点^[20]。Ronkainen VP 等^[21]研究认为 GPR35 是一种新型的缺氧敏感基因,缺氧诱导因子 1 (HIF-1) 激活诱导 GPR35 过表达,导致肌动蛋白细胞骨架的排列,使心肌细胞发生形态学变化,从而介导心肌重塑。同时发现 GPR35 在缺氧导致压力负荷引起的心脏肥大、心肌梗死急性期及小鼠心衰模型中明显升高。贺磊^[4]等研究发现使用 GPR35 活性抑制剂 (CID2745678) 能够抑制低氧环境导致的心肌细胞凋亡,改善心肌梗死后的心肌重构。这些研究提示心肌缺血缺氧是导致 GPR35 上调的一个主要因素,在 CHF 的发病中起着重要作用。

不同的心血管疾病都存在一定程度的缺血缺氧^[22-24]。我们认为 CHF 的缺血缺氧与水饮、血瘀有密切关系。《素问·痿论》云:“心主身之血脉。”心脏健康,心气旺盛,血脉充盈,心主血脉功能正常,将血中的营养物质供给周身组织器官。反之,心脏受损,心主血脉功能失常,心阳不足,推动无力,则血行瘀阻;心阳不足,坐镇无权,不能镇摄寒水,则水饮邪气乘虚上逆凌心;心脏受损,水谷精微贯注心脉,不能顺利化赤为血,则致心血不足。血行瘀阻、水饮内停,阻滞了气血的运行,则心肌组织缺血缺氧,缺血缺氧又进一步加重了瘀血和水饮在体内的聚集,所以缺血缺氧与水饮瘀血形成一个恶性循环。在本研究中苓桂术甘汤合葶苈大枣泻肺汤消除了水饮,丹参、川芎、葛根祛除了瘀血,使气血运行通常,改善了心脏缺血缺氧的状态。现代药理研究证实丹参、葛根具有改善血液循环,抗心肌缺血缺氧的作用^[25]。结合本研究结

果,治疗后各组 GPR35mRNA 表达水平明显降低,提示消饮化痰方可能是通过抑制 GPR35 表达,改善心肌缺血缺氧,从而防治 CHF。

参考文献

- [1] 中华医学会心血管病学分会心力衰竭学组,中国医师协会心力衰竭专业委员会,中华心血管病杂志编辑委员会. 中国心力衰竭诊断和治疗指南 2018[J]. 中华心血管病杂志,2018,46(10):760-789.
- [2] 张广平,谢华宁. 从 2018 中国心衰诊疗指南看更新亮点[J]. 陕西中医药大学学报,2020,43(1):40-42,61.
- [3] 宋志平,杨永健. GPR35 在心血管疾病中的研究进展[J]. 心血管病学进展,2019,40(9):1304-1307.
- [4] 贺磊,杨怡,田玥,等. 抑制 G 蛋白偶联受体 35 对小鼠缺血性心肌损伤的保护作用[J]. 解放军医学杂志,2018,43(2):101-106.
- [5] 董晓斌,孔立. 慢性心力衰竭的中医病机演变探讨[J]. 环球中医药,2011,4(3):201-203.
- [6] 张军茹. 中西医视角治疗慢性心力衰竭合并高尿酸血症探析[J]. 现代中医药,2021,41(3):1-5.
- [7] 毛静远,朱明军. 慢性心力衰竭中医诊疗专家共识[J]. 中医杂志,2014,55(14):1258-1260.
- [8] 徐建虎,张琦,杨子庆,等. 阿霉素诱导大鼠慢性心衰模型的制备[J]. 宁夏医科大学学报,2016,38(3):348-351.
- [9] 杨嘉豪,徐建虎. 温阳消饮法对慢性心力衰竭模型大鼠血清 ANP、TNF- α 及 IL-6 水平影响[J]. 现代中医药,2019,39(2):92-95.
- [10] 史君,王星,赵慧辉,等. 近 20 年慢性心力衰竭中医现代临床用药规律分析[J]. 北京中医药大学学报,2020,43(10):841-848.
- [11] Kuwahara K, Nakagawa Y, Nishikimi T. Cutting edge of brain natriuretic peptide (BNP) research - the diversity of BNP immunoreactivity and its clinical relevance[J]. Circulation Journal: Official Journal of the Japanese Circulation Society,2018,82(10):2455-2461.
- [12] 李彬,谢世阳,王新陆,等. 葶苈大枣泻肺汤治疗心力衰竭现状探讨[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2018,16(2):238-240.
- [13] 杨子庆,张琦,徐路,等. 温阳消饮法对胸腔积液大鼠小肠 AQP4 及 cAMP-PKA 信号通路表达的影响[J]. 中华中医药杂志,2016,31(7):2765-2767.
- [14] 徐建虎,张琦,杨子庆,等. 温阳消饮法对 CHF 模型大

- 鼠肾脏水通道蛋白 2 表达的影响[J]. 北京中医药大学学报,2015,38(11):749-752.
- [15] 史晨旭,杜佳蓉,吴威,等. 葛根化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国现代中药,2021,23(12):2177-2195.
- [16] 单晓晓,洪帮振,刘洁,等. 丹参化学成分、药理作用、临床应用的研究进展及质量标志物的预测分析[J]. 中国中药杂志,2021,46(21):5496-5511.
- [17] 叶铁林,刘雪妮,史传奎. 桂枝汤药理作用研究进展[J]. 药物评价研究,2022,45(2):390-396.
- [18] Li HN,Nguyen H,Meda Venkata SP,et al. Novel role of GPR35 (G-protein-coupled receptor 35) in the regulation of endothelial cell function and blood pressure[J]. Hypertension,2021,78(3):816-830.
- [19] Quon T,Lin LC,Ganguly A,et al. Therapeutic opportunities and challenges in targeting the orphan G protein-coupled receptor GPR35[J]. ACS Pharmacology & Translational Science,2020,3(5):801-812.
- [20] Min KD,Asakura M,Liao YL,et al. Identification of genes related to heart failure using global gene expression profiling of human failing myocardium[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications,2010,393(1):55-60.
- [21] Ronkainen VP,Tuomainen T,Huusko J,et al. Hypoxia-inducible factor 1-induced G protein-coupled receptor 35 expression is an early marker of progressive cardiac remodelling[J]. Cardiovascular Research,2014,101(1):69-77.
- [22] 王士凯,张楠,孙平,等. 芪苈强心胶囊对心力衰竭大鼠心室重构及 HIF-1 和 VEGF 表达的影响[J]. 江苏医药,2021,47(10):984-987.
- [23] 王擎擎. 活血温通方联合 BMSCs 移植改善心肌梗后缺血缺氧微环境的机制研究[D]. 北京:中国中医科学院,2021.
- [24] 苏波. MiR-30e-3p 调控的自噬在缺血缺氧致心肌细胞损伤的作用及机制研究[D]. 南宁:广西医科大学,2020.
- [25] 孙小鑫,苗青,王瑞海,等. 丹参-葛根药对成分、药理及临床应用的研究进展[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2020,22(12):4308-4313.

(修回日期:2023-04-21 编辑:崔春利)