

苓桂术甘汤对急性心肌梗死后心室重构
模型大鼠 NF-κB 的影响

王靓,侯晓燕,黄金玲*,王桐生,施慧
(安徽中医学院,合肥 230038)

[摘要] 目的:观察苓桂术甘汤对急性心肌梗死(acute myocardial infarction,AMI)后心室重构模型大鼠心肌组织核因子-κB(nuclear factor-κB, NF-κB)及 NF-κB mRNA 表达,血清 NF-κB 含量的影响,探讨苓桂术甘汤干预 AMI 后心室重构(ventricular remodeling,VR)的作用机制。方法:采用冠状动脉结扎法复制心室重构大鼠模型,造模 2 周后将模型大鼠随机分为模型组,卡托普利 4.4 mg·kg⁻¹组,苓桂术甘汤(按生药量计)低、中、高剂量(2.1,4.2,8.4 g·kg⁻¹)组,另设假手术组,分别 ig 给药,连续给药 4 周,采用 Western blot,RT-PCR 及 ELISA 技术检测各组大鼠心肌组织 NF-κB,NF-κB mRNA 表达,血清 NF-κB 含量。结果:假手术组,模型组,苓桂术甘汤低、中、高剂量组,卡托普利组的心肌组织 NF-κB 相对表达量(NF-κB/β-actin)分别为:0.190±0.011,0.772±0.026,0.366±0.059,0.295±0.033,0.235±0.013,0.341±0.023;NF-κB mRNA 相对表达量分别为:1.000,26.875,6.574,4.340,1.194,5.540;血清 NF-κB 含量分别为(125.85±14.76),(196.98±17.79),(163.89±20.08),(131.73±10.47),(141.93±10.32),(133.93±9.27)ng·L⁻¹。模型组与假手术组比心肌组织 NF-κB,NF-κB mRNA 表达、血清 NF-κB 含量均显著升高(P<0.01);苓桂术甘汤各剂量组及卡托普利组能够显著抑制模型大鼠心肌组织 NF-κB,NF-κB mRNA 表达、降低模型大鼠血清 NF-κB 含量,与模型组比有显著性差异(P<0.01 或 P<0.05)。结论:苓桂术甘汤干预 AMI 后 VR 的机制与其抑制 NF-κB 有关。

[关键词] 苓桂术甘汤;心肌梗死;心室重构;核因子-κB
[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)20-0176-04
[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120813.1213.054.html>
[网络出版时间] 2012-08-13 12:13

Effects of Lingui Zhugan Decoction on NF-κB in Rats
with Ventricular Remodeling after Acute Myocardial Infarction

WANG Liang, HOU Xiao-yan, HUANG Jin-ling*, WANG Tong-sheng, SHI Hui
(Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230038, China)

[Abstract] Objective: To study the mechanism of Lingui Zhugan decoction (LGZGD) interference on ventricular remodeling (VR) in rats after acute myocardial infarction (AMI), through observing the expression of nuclear factor-κB (NF-κB) and NF-κB mRNA of myocardial tissue and the content of NF-κB in ventricular remodeling rats with AMI. Method: AMI model was produced by ligation of coronary artery. 2 weeks after modeling, rats were randomly classified into model, captopril, and low (2.1 g·kg⁻¹), middle (4.2 g·kg⁻¹) and high (8.4 g·kg⁻¹) dosage of LGZGD group. Control group and the other 5 groups were administered medications intragastrically for 4 consecutive weeks. The content of NF-κB in myocardial tissue and serum was detected by ELISA and the expression of NF-κB was assayed by RT-PCR and the expression of NF-κB mRNA by

[收稿日期] 20120424(004)
[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30973707);安徽省自然科学基金项目(070413262X);安徽省科技计划项目(10021303024)
[第一作者] 王靓,医学硕士,实验师,从事中药心血管药理研究,Tel:0551-5169318,E-mail:wangliang_01@163.com
[通讯作者] *黄金玲,博士,教授,硕士研究生导师,从事中药防治心血管疾病的作用及机制研究,Tel:0551-5169390,E-mail:jinling6181@126.com

Western blot. **Result:** For sham-operation, model, low, middle and large dosage of LGZGD group and captopril group, the content of NF- κ B of myocardial tissue was 0.190 ± 0.011 , 0.772 ± 0.026 , 0.366 ± 0.059 , 0.295 ± 0.033 , 0.235 ± 0.013 , 0.341 ± 0.023 . The relative expression of NF- κ B mRNA were 1.000, 26.875, 6.574, 4.340, 1.194, 5.540. The content of serum NF- κ B were (125.85 ± 14.76), (196.98 ± 17.79), (163.89 ± 20.08), (131.73 ± 10.47), (141.93 ± 10.33), (133.93 ± 9.27) $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$. The content of NF- κ B in serum and the expression of NF- κ B, NF- κ B mRNA of myocardial tissue of model group increased significantly compared with control group ($P < 0.01$). Low, middle and high dosage of LGZGD and captopril group could decrease the content of NF- κ B in serum and inhibited the expression of NF- κ B, NF- κ B mRNA in myocardial tissue of model rats significantly compared with model group ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). **Conclusion:** The mechanism of LGZGD interference VR of post-AMI seems to be related to the inhibition of NF- κ B.

[**Key words**] LGZGD; myocardial infarction; ventricular remodeling; nuclear factor- κ B

苓桂术甘汤(Lingguì Zhugan decoction, LGZGD)出自汉·张仲景的《伤寒论》,由茯苓、桂枝、白术和甘草组成,主要用于脾阳虚弱、水饮内停、痰饮及微饮等证,具有益气温阳、健脾化饮之功效。我们前期研究结果显示该方能够显著改善慢性心衰竭(chronic heart failure, CHF)模型大鼠的血流动力学、阻抑心室重构(ventricular remodeling, VR)^[1-2]。为了深入研究苓桂术甘汤干预心室重构的机制,本实验在前期研究基础上,进一步观察苓桂术甘汤对心肌梗死(myocardial infarction, MI)后心室重构模型大鼠核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)的影响,探讨其干预心室重构的作用机制,为苓桂术甘汤的临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 清洁级 SD 大鼠,雄性,体重 180 ~ 220 g,由安徽医科大学实验动物中心提供,许可证号 SCXK(皖)2011-002。

1.2 药品 苓桂术甘汤,按原方比例(茯苓:桂枝:白术:甘草4:3:3:2)参考文献[3]方法,由安徽省亳州市兴和药业有限公司提取制成含生药 $4.8 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ 的干浸膏粉末,密封,4 ℃ 冰箱保存备用;卡托普利,由中美上海施贵宝制药有限公司生产,批号 009031。

1.3 试剂 Trizol Reagent(invitrogen 公司,批号 42801),逆转录试剂盒(批号 00097559),PCR 试剂盒(批号 00090703),Taq DNA 聚合酶(批号 00093869, Fermentas 公司产品),引物及探针由 invitrogen 公司提供(引物 Forward primer: NSO-512728-019, Reverse primer: NSO-512728-020, 探针 Primer: NSO-512728-021),荧光定量试剂盒(TaKaRa 公司产品,批号 BK7203),电化学发光试剂盒(美国 Pierce 公司产品,批号 MJ161901),PVDF 膜(美国

millipore 公司产品,批号 K1JA0907MK),NF- κ B p65 试剂盒(上海源叶生物科技有限公司产品,批号 APE448R)。

1.4 仪器 HX-300S 型小型动物呼吸机(成都泰盟科技有限公司),ABI2720 型普通 PCR 仪、ABI7500 型荧光定量 PCR 仪(美国,ABI 公司),TGL-18R 型和 TGL-16H 型冷冻离心机,UV 型紫外观察灯(黑马仪器公司);Bio-pro CN-UV 型 GSM 凝胶图像分析管理系统(美国 Sim 公司),Multiskan MK2 型酶标仪(芬兰 Labsystem 公司),DYY-11 型电泳仪(北京市六一仪器厂),Modulus 多功能光度计(美国,Turner Bio Systems 公司)。

2 方法

2.1 模型复制 参考文献[1-2]方法,取 SD 大鼠 130 只,戊巴比妥钠($35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)ip 麻醉,背位固定,小型动物呼吸机辅助呼吸,潮气量 $300 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,大鼠胸部去毛、无菌操作,沿左锁骨中线 3 ~ 5 肋处纵行切开皮肤约 2.5 cm,于第三、四肋间,钝性分离肋间肌,打开胸腔,剪开心包,轻压右侧胸廓,挤出心脏,在距左冠状动脉根部 3 mm 处,用 6-0 眼科无创缝合丝线结扎冠状动脉左前降支。结扎后左室壁颜色变浅,心电图 S-T 段抬高伴肢体导联 R 波高尖,即为结扎成功,迅速将心脏推回胸腔,缝合胸壁。假手术组 12 只大鼠除只穿线不结扎冠状动脉外,其他手术过程与前相同。大鼠自主呼吸恢复后停止辅助呼吸,每日 ip 青霉素 8 万 U/只,连续注射 3 d,预防感染。

2.2 分组、给药剂量及方法 造模 2 周后除假手术组(蒸馏水)外,其余存活模型大鼠随机分为 5 组(每组 12 只):模型组(蒸馏水),苓桂术甘汤按生药量计低、中、高剂量($2.1, 4.2, 8.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)组(相当于临床成人等效量的 0.5, 1, 2 倍),卡托普利组

(4.4 mg·kg⁻¹, 相当于临床成人等效量), ig 给药 (容积为 10 mL·kg⁻¹), 假手术组与模型组 ig 等容积蒸馏水溶液, 连续给药 4 周。

2.3 检测指标与方法 末次给药后 30 min, 各组大鼠 ip 20% 乌拉坦 5 mL·kg⁻¹ 体重, 麻醉后腹主动脉取血, 摘取心脏, 进行相关检测。

2.3.1 心肌组织 NF-κB 表达 取左心室心肌组织 50 mg, 加入 RIPA 细胞裂解液 (含 1 μmol·L⁻¹ 的 PMSF) 1 mL 进行组织匀浆, 12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min; 收集上清液, 在收集的蛋白样品中加入等量的 2X SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液, 沸水浴加热 3 min, 以充分变性蛋白; 冷却到室温后取 15 μL 上样到 SDS-PAGE 胶加样孔, 浓缩胶所用电压为 80 V, 30 min, 分离胶所用电压为 120 V, 60 min; 经转膜, 封闭, 洗膜后使用 ECL 发光试剂盒来检测 NF-κB 表达, 并采用 Quantity one 灰度分析软件进行分析。

2.3.2 心肌组织 NF-κB mRNA 表达 取左心室心肌组织 50 mg, Trizol 一步法抽提总 RNA, 经逆转录合成 cDNA (其中 RNA 8 μL, 10 μmol·L⁻¹ 的 Oligo (dT) 1 μL, DEPC 水 3 μL), 大鼠 β-actin 引物探针序列: Forward Primer 5'-CGATGCCC TGAGGCTCTTT-3', Reverse Primer 5'-TGGATGCCACAGGATTCCA-3', Probe 5'-CC AGCCTTCCTTCTT-3'; 大鼠 NF-κB 荧光定量引物及探针 Forward Primer 5'-AAGAGTGAAA TCGGCTTAACAA-3', Reverse Primer 5'-CGCTCATT ACATAACCGGAACA-3', Probe 5'-A AGAGATCGCA TCATTC-3', 采用 relative quantification study 分析方法, 分析所采用的指标为: 2^{-ΔΔCt}。

2.3.3 血清 NF-κB 含量 血液静置 30 min 后, 3 500 r·min⁻¹ 离心 10 min, 分离血清采用 ELISA 法检测 NF-κB 含量。

2.4 统计方法 采用统计分析软件 SPSS 17.0 进行统计学处理。连续型变量用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多样本均数比较采用单因素方差分析, 多个均数比较用 LSD 法。P<0.05 有统计学意义。

3 结果

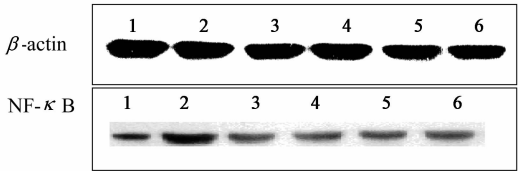
3.1 对心室重构模型大鼠心肌组织 NF-κB 表达的影响 心室重构模型大鼠心肌组织 NF-κB 表达显著升高, 与假手术组比有显著性差异 (P<0.01); 连续给药 4 周后, 苓桂术甘汤各剂量组及卡托普利组大鼠心肌组织 NF-κB 表达显著降低, 与模型组比有显著性差异 (P<0.01), 说明苓桂术甘汤、卡托普利能够有效地抑制模型大鼠心肌组织 NF-κB 的过度表达; 苓桂术甘汤中、高剂量组与卡托普利组比 NF-

κB 表达有显著性差异 (P<0.01), 见表 1, 图 1。

表 1 苓桂术甘汤对心室重构模型大鼠心肌组织 NF-κB 相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组 别	剂量/g·kg ⁻¹	NF-κB/β-actin
假手术	-	0.190 ± 0.011 ²⁾
模型	-	0.772 ± 0.026
苓桂术甘汤	2.1	0.366 ± 0.059 ²⁾
	4.2	0.295 ± 0.033 ^{2,4)}
	8.4	0.235 ± 0.013 ^{2,4)}
卡托普利	4.4 × 10 ⁻³	0.341 ± 0.023 ²⁾

注: 与模型组比¹⁾ P<0.05, ²⁾ P<0.01; 与卡托普利组比³⁾ P<0.05, ⁴⁾ P<0.01 (表 2~3 同)。



1. 假手术组; 2. 模型组; 3. 苓桂术甘汤 2.1 g·kg⁻¹ 组;
4. 苓桂术甘汤 4.2 g·kg⁻¹ 组; 5. 苓桂术甘汤 8.4 g·kg⁻¹ 组;
6. 卡托普利 4.4 mg·kg⁻¹ 组

图 1 苓桂术甘汤对大鼠左心室心肌组织 NF-κB 表达的影响

3.2 对心室重构模型大鼠心肌组织 NF-κB mRNA 表达的影响 心室重构模型大鼠心肌组织 NF-κB mRNA 表达显著增强, 与假手术组比有显著性差异 (P<0.01); 连续给药 4 周后, 苓桂术甘汤各剂量组及卡托普利组大鼠心肌组织 NF-κB mRNA 显著降低, 与模型组比有显著性差异 (P<0.01)。见表 2。

表 2 苓桂术甘汤对心室重构模型大鼠心肌组织 NF-κB mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	Ct	相对表达量
假手术	-	28.149 ± 0.337 ²⁾	1.000
模型	-	25.119 ± 0.524	26.875
苓桂术甘汤	2.1	26.258 ± 0.195 ²⁾	6.574
	4.2	26.164 ± 0.049 ²⁾	4.340
	8.4	27.670 ± 0.283 ²⁾	1.194
卡托普利	4.4 × 10 ⁻³	27.234 ± 0.313 ²⁾	5.540

3.3 苓桂术甘汤对心室重构模型大鼠血清 NF-κB 含量的影响 心室重构模型大鼠血清 NF-κB 含量显著增加, 与假手术组比有显著性差异 (P<0.01); 连续给药 4 周后, 苓桂术甘汤各剂量组及卡托普利组大鼠血清 NF-κB 含量显著降低, 与模型组比有显著性差异 (P<0.01)。见表 3。

表3 苓桂术甘汤对心室重构模型大鼠血清
NF- κ B 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/g·kg ⁻¹	NF- κ B/ng·L ⁻¹
假手术	10	-	125.85 ± 14.76 ²⁾
模型	8	-	196.98 ± 17.79
苓桂术甘汤	9	2.100	163.89 ± 20.08 ²⁾
	10	4.200	131.73 ± 10.47 ²⁾
	10	8.400	141.93 ± 10.32 ²⁾
卡托普利	10	0.004	133.93 ± 9.27 ²⁾

4 讨论

急性心肌梗死是严重威胁人类健康的心脏疾病。据世界卫生组织估计,全世界每年约有 700 万人患心肌梗死。随着溶栓、介入心脏病学的发展,大量心梗病人得以从心梗急性期存活,却因心梗后心室重构(ventricular remodeling, VR),心功能进行性恶化,最终导致心力衰竭和死亡,目前因心肌梗死所致的心力衰竭在我国致死性疾病排行榜中位列第三^[4]。

心肌梗死后心室重构指 AMI 激活多种神经内分泌调节机制和细胞内相关信号转导机制,引起心肌细胞、非心肌细胞和细胞外基质基因表型变化,使心脏的结构和功能都经历一定模式的进行性改建过程^[5]。NF- κ B 作为一种重要的核转录因子,是一种普遍存在于细胞质中的体内快反应有核细胞的转录因子,位于 TLR 下游信号通路的枢纽位置,通过调节免疫和炎症相关因子及炎症递质之间的级联放大瀑布效应,合成与释放炎症细胞因子(IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α 和 IFN- γ 等)、环氧化酶-2 和诱导性一氧化氮合成酶、趋化粒细胞、巨噬细胞等,继而毛细血管通透性增加,引起淋巴细胞浸润等反应,完成炎症信号的传递,从而发挥早期免疫应答的效应,在炎症和免疫反应中起着枢纽作用^[6-7]。心肌缺血、缺氧可诱发心肌炎症反应, NK- κ B 亚单位 I κ B 磷酸化和降解使 NK- κ B 核易位是急性炎症发生发展的始动机制。NK- κ B 作为一种具有多向调控作用的转录因子,可以调控多种炎症细胞因子的表达,与炎症反应密切相关^[8]。心衰过程中 NK- κ B 不仅促使多种炎症因子基因的表达,同时也参与基因编码蛋

白的调控,而且可被多种引起心肌肥厚的刺激因子所活化。NK- κ B 的过表达还可启动心房利钠因子、B 型钠尿肽的表达且引起心肌细胞肥大,并激活金属基质蛋白酶-9,影响细胞外基质的降解平衡,促使心室重构、心腔扩大和心衰发生^[9-10]。

本实验研究结果显示,苓桂术甘汤能够显著抑制模型大鼠心肌组织 NK- κ B 及其 mRNA 的表达,降低血清 NK- κ B 含量,表明苓桂术甘汤通过益气温阳、健脾化饮干预 AMI 后 VR 的机制与其抑制 NK- κ B 有关。

[参考文献]

[1] 方海雁,黄金玲,桑方方,等. 苓桂术甘汤对慢性心衰大鼠 Ang II、ET-1、TNF- α 和 IL- β 的影响[J]. 安徽中医学院学报,2010,29(2):53.

[2] 黄金玲,桑方方,王桐生,等. 苓桂术甘汤对充血性心衰大鼠心脏指数与血流动力学的影响[J]. 安徽中医学院学报,2009,28(5):58.

[3] 黄金玲,王慧慧,陈慧芳,等. 正交试验法优选苓桂术甘汤的提取工艺[J]. 安徽中医学院学报,2011,30(6):65.

[4] 朱雯晴,李觉. 慢性心力衰竭初级预防的研究进展[J]. 同济大学学报:医学版,2011,32(3):120.

[5] 郁晓群,高想,蒋凤荣,等. 利心冲剂对心衰大鼠模型神经内分泌及炎症因子的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(10):147.

[6] 王永霞,任杰杰,朱明军,等. 参附益心颗粒对慢性心力衰竭大鼠血清心钠素、脑钠素的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(4):118.

[7] 李彦华,王士雯,朱梅. 心力衰竭大鼠组织中核因子 κ B 的活化与细胞因子的表达[J]. 中华老年多器官疾病杂志,2009,8(5):448.

[8] 朱茜,贾如意,高佩增. 冠心病心力衰竭患者血清 NF- κ B 水平变化及意义[J]. 山东医药,2010,50(23):7.

[9] 吴锦晖,张新军,吴琳娜. NF- κ B 在慢性心力衰竭发病机制中的研究[J]. 华西医学,2007,22(4):922.

[10] 王永梅,李婷,胡玉龙,等. 核因子- κ B 参与压力负荷性心力衰竭的发病机制研究[J]. 南京医科大学学报:自然科学版,2007,27(8):777.

[责任编辑 聂淑琴]