葶苈大枣泻肺汤通过ACE2-Ang-(1-7)-Mas轴对心梗后心衰模型大鼠心室重构的影响Δ

袁中杰[1*]，郝轩轩[2]，李　彬[3]，谢世阳[3]，王新陆[3]，王幼平[3]，常鑫迪[1]，包　宇[1]，朱明军[3#]（1.河南中医药大学第一临床医学院，郑州　450099；2.贵州中医药大学第一附属医院心内科，贵阳　550001；3.河南中医药大学第一附属医院心脏中心，郑州　450099）

中图分类号　R965　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408(2023)02-0161-07
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2023.02.07

摘　要　目的　探讨经方葶苈大枣泻肺汤对心肌梗死后心力衰竭模型大鼠心室重构的作用机制。**方法**　应用左冠状动脉前降支结扎术构建心肌梗死后心力衰竭大鼠模型，分8组：假手术组、模型组、A779组（1 mg/kg）、A779（1 mg/kg）+葶苈大枣泻肺汤等效剂量组（0.8 g/kg）、A779（1 mg/kg）+葶苈大枣泻肺汤高剂量组（1.6 g/kg）、葶苈大枣泻肺汤等效剂量组（0.8 g/kg）、葶苈大枣泻肺汤高剂量组（1.6 g/kg）和氯沙坦钾组（10 mg/kg），各组分别给予等体积蒸馏水或者相应的药物，灌胃4周。采用Masson染色法测定大鼠心肌组织中胶原纤维分布；采用碱水解法测定心肌组织羟脯氨酸（Hyp）含量；采用免疫组化法检测心肌组织中Ⅰ型胶原蛋白（COLⅠ）、Ⅲ型胶原蛋白（COLⅢ）的表达水平；采用酶联免疫吸附测定法检测大鼠血清中基质金属蛋白酶2（MMP-2）、MMP-9、金属蛋白酶组织抑制因子1（TIMP-1）、可溶性致瘤性抑制因子2（sST-2）等心肌纤维化相关指标；采用Western blot法检测心肌组织中血管紧张素转换酶2-血管紧张素-(1-7)-Mas[ACE2-Ang-(1-7)-Mas]轴相关蛋白的表达。**结果**　与假手术组比较，模型组、A779组心肌细胞排列紊乱，胶原纤维沉积明显增多，心肌纤维化明显，Hyp含量和MMP-2、MMP-9、sST-2水平显著升高，COLⅠ、COLⅢ阳性表达显著增强，TIMP-1水平和ACE2、Ang-(1-7)、Mas蛋白表达水平显著降低（$P<0.05$）。与模型组比较，葶苈大枣泻肺汤等效剂量组和高剂量组上述指标均可得到不同程度的改善。与A779组比较，A779+葶苈大枣泻肺汤等效剂量组及A779+高剂量组心肌排列及胶原分布可一定程度地改善，Hyp含量和MMP-2、MMP-9水平降低，COLⅠ、COLⅢ阳性表达显著减少（$P<0.05$），但Ang-(1-7)和Mas蛋白表达水平未显著升高。**结论**　葶苈大枣泻肺汤可通过提高ACE2-Ang-(1-7)-Mas轴蛋白的表达改善心肌梗死后心力衰竭模型大鼠的心室重构。

关键词　葶苈大枣泻肺汤；心力衰竭；心室重构；血管紧张素转换酶2-血管紧张素-(1-7)-Mas轴

Effects of Tingli dazao xiefei decoction on ventricular remodeling in model rats with heart failure after myocardial infarction through ACE2-Ang-(1-7) -Mas axis

YUAN Zhongjie[1], HAO Xuanxuan[2], LI Bin[3], XIE Shiyang[3], WANG Xinlu[3], WANG Youping[3], CHANG Xindi[1], BAO Yu[1], ZHU Mingjun[3] (1. The First Clinical Medical College, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450099, China; 2. Dept. of Cardiology, the First Affiliated Hospital, Guizhou University of Chinese Medicine, Guizhou 550001, China; 3. Heart Center, the First Affiliated Hospital, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450099, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE To explore the mechanism of Tingli dazao xiefei decoction on ventricular remodeling in model rats with heart failure after myocardial infarction. **METHODS** The rat model of heart failure after myocardial infarction was established by ligation of anterior descending branch of left coronary artery, which was divided into 8 groups: sham operation group, model group, A779 group (1 mg/kg), A779 (1 mg/kg)+Tingli dazao xiefei decoction equivalent-dose group (0.8 g/kg), A779 (1 mg/kg) +Tingli dazao xiefei decoction high-dose group (1.6 g/kg), Tingli dazao xiefei decoction equivalent-dose group (0.8 g/kg), Tingli dazao xiefei decoction high-dose group (1.6 g/kg) and losartan potassium group (10 mg/kg). Each group was given equal volume of distilled water or corresponding drugs intragastrically for 4 weeks. Masson staining was used to determine the distribution of collagen fibers in rat myocardium. The content of hydroxyproline (Hyp) in myocardium was determined by alkaline hydrolyzation. The expressions of type Ⅰ and Ⅲ collagen (COLⅠ, COLⅢ) in myocardium were detected by immunohisto-chemistry. Myocardial fibrosis-related indexes such as matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), MMP-9, tissue

Δ**基金项目**　国家自然科学基金资助项目（No.82074226）；国家重点研发计划重点专项课题（No.2019YFC1710003）；河南省中原千人计划-中原名医项目（No.豫财行〔2020〕140号）

＊**第一作者**　硕士研究生。研究方向：中西医结合防治心血管疾病。E-mail：15093079768@163.com

＃**通信作者**　教授，博士生导师，博士。研究方向：中西医结合防治心血管疾病。电话：0371-66233478。E-mail：zhumingjun317@163.com

inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) and soluble suppression of tumorigenicity-2 (sST-2) were detected by ELISA. The protein expressions of angiotensin converting enzyme 2-angiotensin-(1-7)-Mas [ACE2-Ang-(1-7)-Mas] axis were detected by Western blot. **RESULTS** Compared with sham operation group, myocardial cells in model group and A779 group were disordered, collagen fiber deposition was significantly increased and myocardial fibrosis was obvious; the Hyp content and MMP-2, MMP-9, sST-2 levels were increased, and COL Ⅰ and COL Ⅲ positive expressions were significantly enhanced; TIMP-1 level, protein expressions of ACE2, Ang-(1-7) and Mas were significantly decreased ($P<0.05$). Compared with model group, above indexes of Tingli dazao xiefei decoction equivalent-dose and high-dose groups were improved to different extents. Compared with A779 group, A779+Tingli dazao xiefei decoction equivalent-dose and A779+high-dose groups could improve myocardial arrangement and collagen distribution, reduce the Hyp content and MMP-2, MMP-9 levels, reduce positive expressions of COL Ⅰ and COL Ⅲ ($P<0.05$), but couldn't improve Ang-(1-7) and Mas protein expression. **CONCLUSIONS** Tingli dazao xiefei decoction can improve ventricular remodeling in myocardial failure model rats after myocardial infarction by improving the expression of ACE2-Ang-(1-7)-Mas axis proteins.

KEYWORDS Tingli dazao xiefei decoction; heart failure; ventricular remodeling; ACE2-Ang-(1-7)-Mas axis

心力衰竭(简称"心衰")是心血管疾病的严重和终末阶段,致残率和致死率均较高[1]。心肌梗死(简称"心梗")是当前心衰最常见、最重要的病因之一,心梗后心衰的发生与心肌细胞丢失、心室重构、神经内分泌系统激活及其他病理变化密切相关,其中心室重构是心衰发生的基本病理过程[2]。肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system,RAS)的激活、细胞外基质的成分改变和心肌纤维化的进展均会影响心室重构,加重心衰[3-4]。血管紧张素转换酶2-血管紧张素-(1-7)-Mas[angiotensin converting enzyme 2-angiotensin-(1-7)-Mas,ACE2-Ang-(1-7)-Mas]轴是一种RAS的非典型轴,被激活后可拮抗RAS系统对心脏产生的不良影响,改善心室重构[5]。ACE2是血管紧张素转换酶(angiotensin converting enzyme,ACE)的同系物,在心血管、肾脏、肠道和呼吸系统中发挥重要的生理和病理作用,可将血管紧张素Ⅱ(angiotensin,AngⅡ)转化为Ang-(1-7),后者可与Mas受体(Mas receptor,MasR)结合,从而形成ACE2-Ang-(1-7)-Mas轴。该轴可改善RAS中血管紧张素转换酶-血管紧张素Ⅱ-血管紧张素Ⅱ1型受体(angiotensin converting enzyme-angiotensin Ⅱ-angiotensin Ⅱ type 1 receptor,ACE-AngⅡ-AT1R)轴激活后对心脏的损害,具有舒张血管、抑制心肌肥大、调节心脏重塑等作用[6]。

葶苈大枣泻肺汤由炒葶苈子和大枣组成,是治疗心衰的经典复方,可通过多途径、多靶点改善心衰、缓解心室重构[7-8]。然而,葶苈大枣泻肺汤改善心室重构的作用机制尚未明确。为此,本研究拟使用葶苈大枣泻肺汤干预心梗后心衰模型大鼠,从Ⅰ型胶原蛋白(Ⅰ-type collagen,COLⅠ)、Ⅲ型胶原蛋白(Ⅲ-type collagen,COLⅢ)、羟脯氨酸(hydroxyproline,Hyp)、纤维化相关指标和ACE2-Ang-(1-7)-Mas轴相关蛋白等变化方面探讨其作用机制,以期为该方用于治疗心衰提供确切证据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括Micro Maxx型彩色多普勒超声诊断仪(美国SonoSite公司),164-5050型电泳仪电源、Mini-Protean型垂直电泳槽、Mini Trans-Blot型电泳转印仪(美国Bio-Rad公司),Multiskan GO型全波长酶标仪、Biofuge Stratos型台式高速冷冻离心机(美国Thermo Fisher Scientific公司),KZ-Ⅱ型高速组织研磨仪(武汉赛维尔生物科技有限公司),JB-P5型组织包埋机(武汉俊杰电子有限公司),KD-P型组织摊片机(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司),RM2016型病理切片机(德国Leica公司),DP71-BX41型显微观察摄像系统(日本Olympus公司)等。

1.2 主要药品与试剂

炒葶苈子饮片(产地安徽,批号1801123)购自安徽普仁中药饮片有限公司,大枣饮片(产地新疆,批号180901)购自河南辉煌草本药业有限公司,经河南中医药大学第一附属医院药学部陈天朝主任药师鉴定均为真品。

氯沙坦钾片(阳性对照,批号J009104,规格0.05 g)购自英国Merck Sharp & Dohme Limited公司;A779对照品(Mas受体拮抗剂,批号NJP90025-181225,纯度98.23%)购自南京肽业生物科技有限公司。兔COLⅠ多克隆抗体(货号AF7001)购自美国Affinity公司;兔COLⅢ多克隆抗体、兔甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)多克隆抗体、HRP标记的山羊抗兔IgG二抗(货号分别为22734-1-AP、10494-1-AP、SA00001-2)均购自武汉三鹰生物技术有限公司;苏木精染液、DAB显色剂、Masson染色试剂盒(货号分别为G1004、G1211、G1006)均购自武汉赛维尔生物科技有限公司;基质金属蛋白酶2(matrix metalloproteinase-2,MMP-2)、MMP-9、金属蛋白酶组织抑制因子1(tissue inhibitor of metalloproteinase-1,

TIMP-1）酶联免疫吸附测定（ELISA）试剂盒（货号分别为E-EL-R0618c、E-EL-R0624c、E-EL-R0540c）均购自武汉伊莱瑞特生物科技公司；可溶性致瘤性抑制因子2（soluble suppression of tumorigenicity-2，sST-2）ELISA试剂盒（货号E2292r）购自武汉伊艾博科技有限公司；兔Mas多克隆抗体（货号PA5-43668）购自美国Invitrogen公司；兔ACE2多克隆抗体（货号GTX101395）购自美国GeneTex公司；兔Ang-（1-7）多克隆抗体（货号PAS085Ra01）购自武汉优尔生商贸有限公司；Hyp检测试剂盒（货号A030-2-1）购自南京建成生物工程研究所。

1.3 实验动物

健康SPF级雄性SD大鼠120只，6周龄，体质量（235±15）g，购自北京维通利华实验动物技术有限公司，动物生产许可证号为SCXK（京）2016-0006。本研究所有实验过程均遵循河南中医药大学实验动物伦理委员会指导规定进行，批件号为YFYDW2018004。

2 方法

2.1 葶苈大枣泻肺汤的制备

取炒葶苈子15 g、大枣约12枚，以水煎法提取，所得提取液经浓缩、干燥后粉碎，得葶苈大枣泻肺汤干粉（药物出膏率为7.69%，每1 g干粉相当于生药总量13 g）[7]。

2.2 大鼠心梗后心衰模型的建立

动物适应性喂养3 d后行左冠状动脉前降支结扎术：手术前12 h禁食不禁水，次日称定体质量，予1%戊巴比妥钠（50 mg/kg）腹腔注射进行麻醉，以仰卧位固定动物四肢，胸部备皮，酒精消毒后在心脏搏动最明显处开胸挤出心脏，于肺动脉圆锥与左心耳边缘交界下1 mm处结扎冠状动脉前降支，然后迅速将心脏放回胸腔，缝合皮肤后立即胸外按压数次。假手术组只穿线不结扎。所有大鼠术后3 d经腹腔给予庆大霉素注射液0.2 mL/d预防感染。术后24～72 h大鼠死亡率较高，剔除死亡动物，正常喂养4周，行心脏超声检测，若左室射血分数（left ventricular ejection fraction，LVEF）≤50%，则判定为心梗后心衰模型复制成功。具体手术过程参照课题组前期心梗动物模型的复制方法[9]。

2.3 分组与给药

术后4周LVEF≤50%的大鼠共63只（存活率约为52%），其中8只大鼠只穿线不结扎，将其纳入假手术组；剩余55只随机分为7组，分别为模型组（8只）、A779组（8只）、A779+葶苈大枣泻肺汤等效剂量组（7只，简称“A779+等效剂量组”）、A779+葶苈大枣泻肺汤高剂量组（8只，简称“A779+高剂量组”）、葶苈大枣泻肺汤等效剂量组（8只，简称“等效剂量组”）、葶苈大枣泻肺汤高剂量组（8只，简称“高剂量组”）、氯沙坦钾组（8只，简称“氯沙坦组”）。结合课题组前期研究[7]和药理学实验中动物与人体间的等效剂量换算要求[10]，本研究设定葶苈大枣泻肺汤的灌胃剂量分别为0.8 g/kg（等效剂量）、1.6 g/kg（高剂量），氯沙坦钾的灌胃剂量为10 mg/kg，A779组的腹腔注射剂量为1 mg/kg，假手术组和模型组平行灌胃蒸馏水，每日1次，干预4周后进行后续实验，期间A779组和等效剂量组大鼠因心衰过于严重各死亡1只。

2.4 大鼠血清和心肌组织的取材和保存

给药4周后，将大鼠用1%戊巴比妥钠（50 mg/kg）腹腔注射进行麻醉，待其麻醉后于腹主动脉取血，于4 ℃下静置2 h后，以3 000 r/min离心15 min，分离血清后置于－80 ℃冰箱保存。待完成取血后，取出大鼠心脏，用4 ℃生理盐水清洗并剥离多余组织，再次以生理盐水清洗2～3次后用刀片切取心室，部分放于4%多聚甲醛溶液中固定，部分置于－80 ℃冰箱保存。

2.5 大鼠心肌组织中胶原纤维分布的检测

采用Masson染色法进行观察。取各组大鼠心肌组织适量，常规石蜡包埋，切片，按照试剂盒说明书进行Masson染色，于显微镜下观察胶原纤维的分布情况（心肌组织呈红色，胶原纤维呈蓝色）并拍照。

2.6 大鼠心肌组织中Hyp含量的检测

采用碱水解法进行检测。取各组大鼠心肌组织约40 mg，加碱水解液1 mL混匀，于沸水浴中水解20 min（每10 min混匀1次），用Hyp检测试剂盒中提供的调pH试剂调节pH至6.0～6.8，以3 500 r/min离心后取上清液1 mL，按照试剂盒说明书进行处理，使用酶标仪于550 nm波长处检测大鼠心肌组织中Hyp的含量。

2.7 大鼠心肌组织中COLⅠ、COLⅢ蛋白表达水平的检测

采用免疫组化法进行检测。每组取6只大鼠的心肌组织适量，制作蜡块并切片，脱蜡后进行抗原修复；用0.3%过氧化氢甲醇溶液去除内源性过氧化物酶，以血清封闭，加COLⅠ、COLⅢ一抗（稀释度分别为1∶100、1∶300）于4 ℃孵育过夜；用PBS清洗，加HRP标记的IgG二抗（稀释度1∶200）于37 ℃下孵育1 h；用PBS清洗，以DAB显色、苏木精复染后，行梯度乙醇脱水，封片，于显微观察摄像系统下拍照，观察COLⅠ、COLⅢ蛋白的表达情况（细胞核为蓝色，阳性表达细胞为棕黄色），并利用Image-Pro Plus软件分析阳性细胞的平均光密度值，以表示COLⅠ、COLⅢ蛋白的表达水平。

2.8 大鼠血清中纤维化相关指标含量的检测

采用ELISA法进行检测。取“2.4”项下血清，按照ELISA试剂盒说明书操作，使用酶标仪于450 nm波长处检测血清中纤维化相关指标（MMP-2、MMP-9、TIMP-1、sST-2）的含量。

2.9 大鼠心肌组织中ACE2-Ang-（1-7）-Mas轴相关蛋白表达的检测

采用Western blot法进行检测。取冻存于－80 ℃的心肌组织，加入组织裂解液，匀浆，离心后取上清液，用BCA法测定蛋白浓度。取变性后的蛋白样品40

μg，进行10%SDS-PAGE凝胶电泳分离并以湿转法转到PVDF膜上；用5%脱脂奶粉封闭2 h，加入ACE2、Ang-(1-7)、Mas、GAPDH一抗（稀释度分别为1∶1 000、1∶500、1∶800、1∶5 000），4 ℃孵育过夜；用TBST溶液漂洗，加入HRP标记的IgG二抗（稀释度为1∶1 000），37 ℃孵育1 h；以ECL化学发光法显影，使用Image J软件进行分析，以目的蛋白与内参蛋白GAPDH的灰度值表示目的蛋白的表达水平。每组取3个样本进行检测。

2.10 统计学方法

采用SPSS 23.0软件对数据进行统计分析。实验数据以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，进一步两组间的比较采用LSD-t检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 大鼠心肌组织中的胶原纤维分布

各组大鼠心肌组织中的胶原纤维分布如图1所示。与假手术组比较，模型组和A779组大鼠心肌细胞排列紊乱，胶原纤维沉积明显增多，心肌纤维化明显；与模型组比较，等效剂量组、高剂量组和氯沙坦组大鼠心肌细胞排列规整，蓝色胶原纤维分布明显减少，心肌纤维化减轻；与A779组比较，A779+等效剂量组和A779+高剂量组大鼠心肌细胞排列有所改善，蓝色胶原纤维分布不同程度减少，心肌纤维化减轻。

3.2 大鼠心肌组织中的Hyp含量

各组大鼠心肌组织中Hyp含量如表1所示。与假手术组比较，模型组和A779组大鼠心肌组织中的Hyp含量显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，等效剂量组、高剂量组和氯沙坦组的Hyp含量显著降低（$P<0.05$）；与A779组比较，A779+等效剂量组和A779+高剂量组的Hyp含量均显著降低（$P<0.05$）。

3.3 大鼠心肌组织中的COLⅠ、COLⅢ蛋白表达水平

各组大鼠心肌组织中COLⅠ、COLⅢ表达如图2、图3、表2所示。与假手术组比较，模型组和A779组大鼠心肌组织中COLⅠ、COLⅢ阳性着色程度均显著增强，平均光密度值显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，等效剂量组、高剂量组和氯沙坦组大鼠心肌组织中COLⅠ、COLⅢ阳性着色程度均显著减弱，平均光密度值显著降低（$P<0.05$）；与A779组比较，A779+等效剂量组、A779+高剂量组的COLⅠ、COLⅢ阳性着色程度均显著减轻，平均光密度值显著降低（$P<0.05$）。

3.4 大鼠血清中纤维化相关指标水平

各组大鼠血清中MMP-2、MMP-9、TIMP-1、sST-2等纤维化相关指标水平如表3所示。与假手术组比较，模型组和A779组的MMP-2、MMP-9、sST-2水平显著升高，TIMP-1水平显著降低（$P<0.05$）；与模型组比较，等效剂量组的TIMP-1水平显著升高、sST-2水平显著降低（$P<0.05$），高剂量组和氯沙坦组的MMP-2、MMP-9、sST-2水平显著降低以及TIMP-1水平显著升高（$P<0.05$）；与A779组比较，A779+等效剂量组MMP-2、MMP-9水平显著降低（$P<0.05$），A779+高剂量组的MMP-2、MMP-9、sST-2水平显著降低（$P<0.05$）。

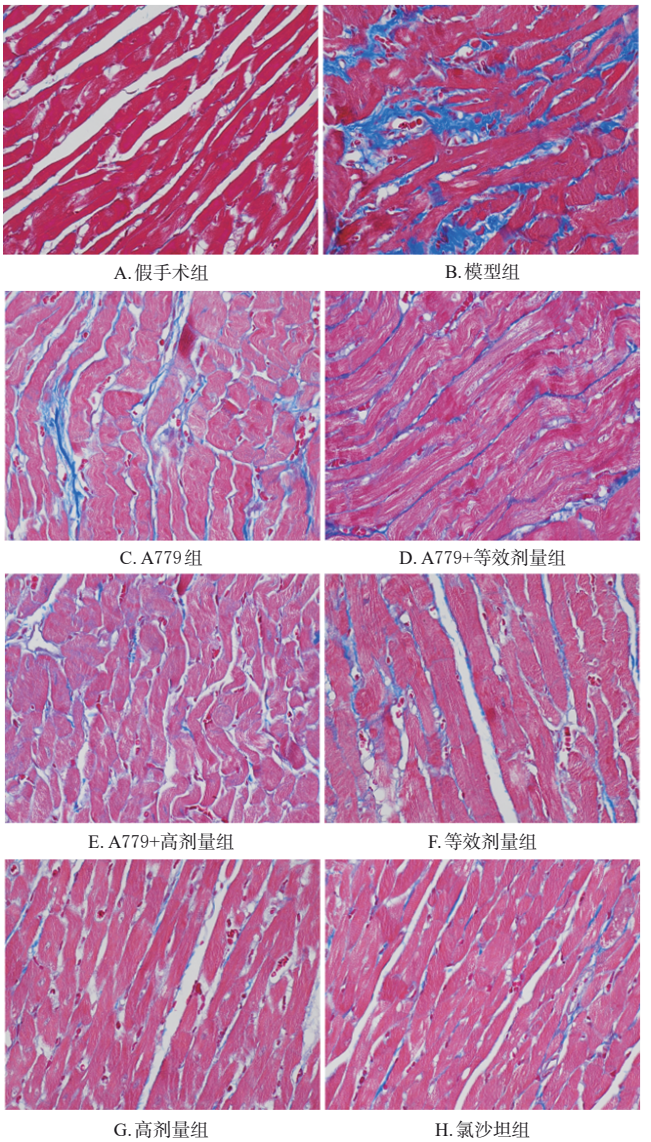


图1 各组大鼠心肌组织中胶原纤维分布显微图（×400）

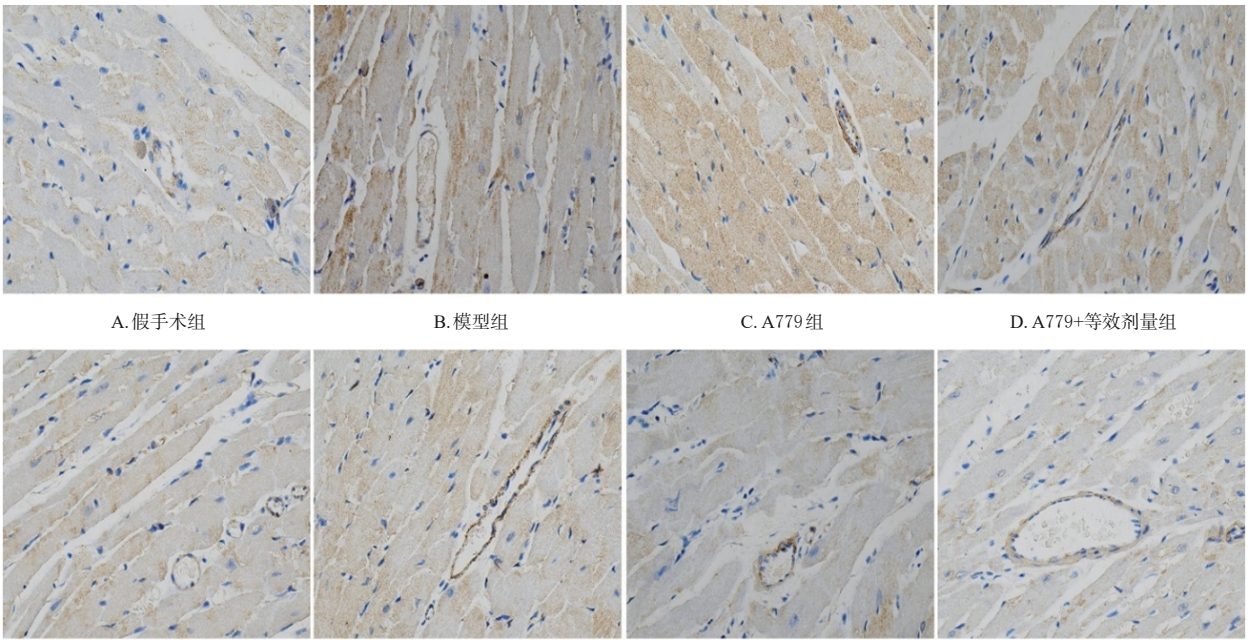
表1 各组大鼠心肌组织中Hyp含量

组别	n	Hyp/(μg/mg)	组别	n	Hyp/(μg/mg)
假手术组	8	3.63±0.85	A779+高剂量组	8	4.36±1.07[b]
模型组	8	6.40±0.61[a]	等效剂量组	7	3.89±0.97[c]
A779组	7	5.69±0.88[a]	高剂量组	8	4.06±0.69[c]
A779+等效剂量组	7	4.03±1.02[b]	氯沙坦组	8	4.12±0.87[c]

a：与假手术组比较，$P<0.05$；b：与A779组比较，$P<0.05$；c：与模型组比较，$P<0.05$

3.5 大鼠心肌组织中ACE2-Ang(1-7)-Mas轴相关蛋白的表达情况

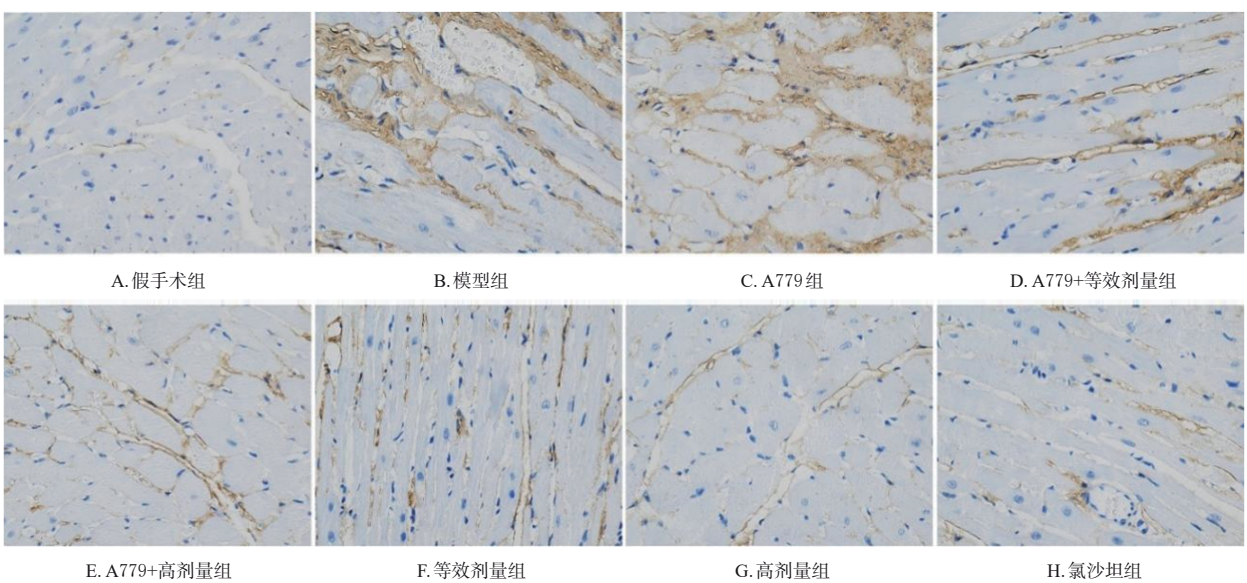
各组大鼠心肌组织ACE2、Ang(1-7)、Mas蛋白表达量如图4所示。与假手术组比较，模型组和A779组的ACE2、Ang-(1-7)、Mas蛋白表达均显著降低（$P<0.05$）；与模型组比较，等效剂量组的Ang-(1-7)蛋白表达显著升高（$P<0.05$），高剂量组和氯沙坦组的ACE2、Ang-(1-7)、



A. 假手术组　B. 模型组　C. A779组　D. A779+等效剂量组

E. A779+高剂量组　F. 等效剂量组　G. 高剂量组　H. 氯沙坦组

图2　各组大鼠心肌组织中COLⅠ蛋白表达的显微图（×400）



A. 假手术组　B. 模型组　C. A779组　D. A779+等效剂量组

E. A779+高剂量组　F. 等效剂量组　G. 高剂量组　H. 氯沙坦组

图3　各组大鼠心肌组织中COLⅢ蛋白表达的显微图（×400）

表2　各组大鼠心肌组织中COLⅠ、COLⅢ蛋白表达的平均光密度值

组别	n	COLⅠ	COLⅢ
假手术组	6	13.47±1.44	13.17±2.20
模型组	6	48.40±6.84[a]	55.07±7.15[a]
A779组	6	65.94±7.33[a]	66.16±6.40[a]
A779+等效剂量组	6	39.82±4.06[b]	50.51±4.99[b]
A779+高剂量组	6	35.18±4.41[b]	41.15±4.85[b]
等效剂量组	6	32.96±3.79[c]	38.90±3.47[c]
高剂量组	6	25.95±3.95[c]	28.71±5.04[c]
氯沙坦组	6	27.09±3.23[c]	26.11±4.86[c]

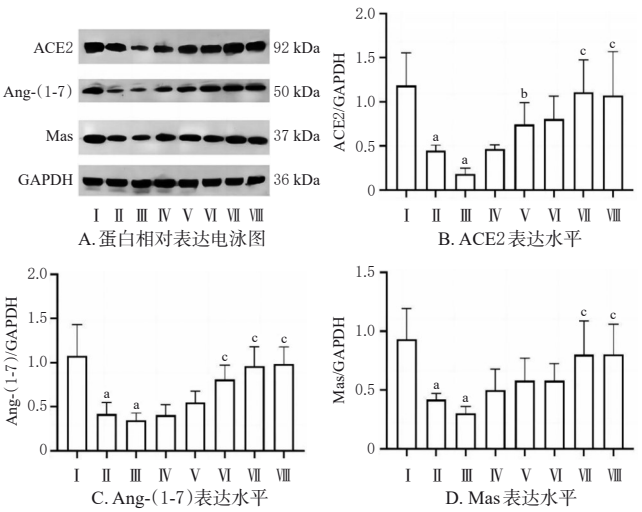
a：与假手术组比较，$P<0.05$；b：与A779组比较，$P<0.05$；c：与模型组比较，$P<0.05$

表3　各组大鼠血清中MMP-2、MMP-9、TIMP-1、sST-2水平

组别	n	MMP-2/(ng/mL)	MMP-9/(ng/mL)	TIMP-1/(ng/mL)	sST-2/(pg/mL)
假手术组	8	10.59±1.98	61.48±6.78	32.21±3.22	466.61±46.31
模型组	8	21.56±2.47[a]	100.88±13.18[a]	16.40±2.44[a]	1 948.13±203.60[a]
A779组	7	24.04±2.80[a]	102.21±7.82[a]	19.17±3.22[a]	1 881.36±187.38[a]
A779+等效剂量组	7	20.11±1.72[b]	84.25±12.47[b]	22.28±2.12	1 569.36±111.27
A779+高剂量组	8	14.89±3.24[b]	64.98±11.30[b]	27.11±5.73	1 170.48±176.14[b]
等效剂量组	7	19.45±2.60	91.26±9.70	23.03±2.53[c]	1 119.22±177.20[c]
高剂量组	8	11.69±2.56[c]	63.18±7.85[c]	28.58±5.25[c]	769.02±44.90[c]
氯沙坦钾组	8	13.28±2.53[c]	61.90±8.70[c]	35.06±6.81[c]	553.36±38.86[c]

a：与假手术组比较，$P<0.05$；b：与A779组比较，$P<0.05$；c：与模型组比较，$P<0.05$

Mas蛋白表达显著升高（$P<0.05$）；与A779组比较，A779+等效剂量和A779+高剂量组的Ang-（1-7）和Mas差异均无统计学意义（$P>0.05$），只有A779+高剂量组的ACE2蛋白表达显著升高（$P<0.05$）。



Ⅰ：假手术组；Ⅱ：模型组；Ⅲ：A779组；Ⅳ：A779+等效剂量组；Ⅴ：A779+高剂量组；Ⅵ：等效剂量组；Ⅶ：高剂量组；Ⅷ.氯沙坦组；a：与假手术组比较，$P<0.05$；b：与A779组比较，$P<0.05$；c：与模型组比较，$P<0.05$

图4　各组大鼠心肌组织中ACE2-Ang-（1-7）-Mas轴相关蛋白的表达情况

4　讨论

4.1　葶苈大枣泻肺汤可降低心肌Hyp、胶原蛋白含量，改善心室重构

心肌进行性纤维化是心梗后心衰的主要病理改变[11]。当心肌细胞受到应激损伤时，一方面肌成纤维细胞增殖、迁移和收缩能力增强，另一方面心肌细胞外基质主要成分COLⅠ、COLⅢ表达上调，且Ⅰ型比Ⅲ型上调更明显[12]。Hyp由多肽链上脯氨酸残基羟基化作用形成，对胶原蛋白的机械稳定性和热稳定性非常重要[13]，因此在心肌纤维化发生时，随着胶原蛋白水平升高，常伴有Hyp含量升高。本研究中，模型组心肌组织间有蓝色的胶原纤维沉积，心肌细胞排列紊乱；Hyp含量增多；COLⅠ和COLⅢ着色程度明显加重，表达增多，提示心肌发生纤维化。经葶苈大枣泻肺汤治疗后，蓝色胶原着色程度明显减轻，心肌组织中COLⅠ、COLⅢ、Hyp含量明显降低，表明心肌纤维化减轻。

4.2　葶苈大枣泻肺汤可调节血清MMP-2、MMP-9、TIMP-1、sST-2水平，减缓心室重构

MMP在心室重构过程中发挥着关键作用，可通过促进细胞外基质周转和炎症信号传导来调节该过程[14]。实验研究表明，心肌组成型活性MMP-2过度表达会造成肌钙蛋白水解、心肌线粒体功能障碍、左心室重塑和收缩性心衰；而MMP-9水平升高则会损害心脏代谢[15]。目前，一些用于治疗心衰的一线用药（如血管紧张素转化酶抑制剂、ACE受体抑制剂）的催化结构域与MMP相近，都可以间接抑制MMP，改善心梗后心室重构[14]。因此，本实验选择临床常用治疗心衰的药物氯沙坦钾片作为阳性对照药物，其抑制心肌纤维化、改善心功能的作用在本实验中也得到了验证。MMP活性受到内源性组织抑制剂（TIMPs）的严格调控，研究表明TIMP-1缺乏将导致MMP活性增加，将促进心室重构，加速心衰的发生[16]。sST-2可作为诱饵受体与白细胞介素33（IL-33）结合，减弱了IL-33/跨模型致瘤性抑制因子2信号通路对心肌的保护作用[17]。本研究中，模型组大鼠MMP-2、MMP-9、sST-2水平明显升高，TIMP-1水平下降，提示心梗后心衰模型大鼠发生了心肌纤维化改变。经葶苈大枣泻肺汤治疗后，各项指标得到改善，高剂量组MMP-2、MMP-9、sST-2水平明显降低，TIMP-1水平明显升高，提示心梗后心衰模型大鼠的心肌纤维化得到抑制，心室重构得到改善。

4.3　葶苈大枣泻肺汤可增强ACE2-Ang-（1-7）-Mas轴表达，改善心室重构

ACE2广泛表达于心肌细胞、心脏成纤维细胞和冠状内皮细胞，是一种重要的RAS调节因子，能减轻AngⅡ/AT1R介导的有害作用[18]。研究表明，ACE2活性的增加可导致ACE2/Ang-（1-7）轴的激活，从而起到预防心脏病的作用；ACE2过表达可改善心梗诱导的心脏重构[19]。Ang-（1-7）可以改善心功能和心室重构[20]，减轻心肌纤维化[21]。Mas作为Ang-（1-7）的受体蛋白，可以通过减少心肌炎症细胞浸润和酪氨酸羟化酶的表达，抑制心肌纤维化和肥大的进展[22]。因此，作为RAS系统的非典型轴，ACE2-Ang-（1-7）-Mas轴的激活可以改善心室重构，对心脏具有很好的保护作用。

本研究中，心梗后心衰模型大鼠LVEF降低，胶原纤维沉积，Hyp含量增多，MMP、TIMP-1发生改变，心肌组织中ACE2、Mas、Ang-（1-7）蛋白表达降低，心室重构明显。经葶苈大枣泻肺汤治疗后，心肌纤维化得到改善，ACE2、Mas、Ang-（1-7）蛋白表达显著增多，提示葶苈大枣泻肺汤可通过激活ACE2-Ang-（1-7）-Mas轴通路抑制纤维化，改善心室重构。

A779是Mas受体拮抗剂，对揭示ACE2-Ang-（1-7）-Mas轴的生理作用具有非常重要的意义[21]。给予A779后，大鼠心肌组织中ACE2、Ang-（1-7）、Mas蛋白表达均明显降低；给予A779+葶苈大枣泻肺汤后，A779+等效剂量组ACE2、Ang-（1-7）、Mas蛋白表达无明显改善，尽管A779+高剂量组ACE2蛋白表达呈现明显升高，但其余轴蛋白的表达改善并不理想，表明葶苈大枣泻肺汤对ACE2-Ang-（1-7）-Mas轴的激活作用被A779抑制，其改善心肌纤维化的作用减弱。

综上所述，ACE2-Ang（1-7）-Mas轴与心肌纤维化密切相关；葶苈大枣泻肺汤不仅可以降低心衰模型大鼠心

肌组织Hyp、胶原蛋白的表达，调节血清MMP-2、MMP-9、TIMP-1、sST-2水平，还可以通过提高ACE2-Ang-(1-7)-Mas轴蛋白的表达水平改善心肌纤维化，减缓心室重构，起到保护心肌的作用。

参考文献

[1] 王新陆，李彬，谢世阳，等. 参附益心方对心肌梗死后心力衰竭大鼠心功能及能量代谢相关因子的影响[J]. 中华中医药杂志，2021，36(5)：2521-2525.

[2] 中国医师协会心血管内科医师分会，中国心血管健康联盟，心肌梗死后心力衰竭防治专家共识工作组. 2020心肌梗死后心力衰竭防治专家共识[J]. 中国循环杂志，2020，35(12)：1166-1180.

[3] FRANTZ S，HUNDERTMARK M J，SCHULZ-MENGER J，et al. Left ventricular remodelling post-myocardial infarction：pathophysiology，imaging，and novel therapies [J]. Eur Heart J，2022，43(27)：2549-2561.

[4] SYGITOWICZ G，MACIEJAK-JASTRZĘBSKA A，SITKIEWICZ D. microRNAs in the development of left ventricular remodeling and postmyocardial infarction heart failure[J]. Pol Arch Intern Med，2020，130(1)：59-65.

[5] SILVA A C S E，SILVEIRA K D，FERREIRA A J，et al. ACE2，angiotensin-(1-7)and Mas receptor axis in inflammation and fibrosis[J]. Br J Pharmacol，2013，169(3)：477-492.

[6] LIAO W，WU J P. The ACE2/Ang (1-7)/MasR axis as an emerging target for antihypertensive peptides[J]. Crit Rev Food Sci Nutr，2021，61(15)：2572-2586.

[7] 郝轩轩，谢世阳，王幼平，等. 葶苈大枣泻肺汤对心肌梗死后大鼠心肌纤维化的影响[J]. 中华中医药杂志，2020，35(5)：2649-2652.

[8] 赵洁，王欢欢，欧阳意，等. 基于网络药理学及质谱技术的葶苈大枣泻肺汤抗心力衰竭的有效成分发现及作用机制分析[J]. 中国实验方剂学杂志，2021，27(8)：151-160.

[9] 谢世阳，王幼平，王小晓，等. 参附益心颗粒对心力衰竭大鼠心肌ATP含量及解偶联蛋白-2的影响[J]. 中华中医药杂志，2017，32(10)：4412-4415.

[10] 黄继汉，黄晓晖，陈志扬，等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学，2004，9(9)：1069-1072.

[11] SCALISE R F M，DE SARRO R，CARACCIOLO A，et al. Fibrosis after myocardial infarction：an overview on cellular processes，molecular pathways，clinical evaluation and prognostic value[J]. Med Sci (Basel)，2021，9(1)：16.

[12] LI L，ZHAO Q，KONG W. Extracellular matrix remodeling and cardiac fibrosis[J]. Matrix Biol，2018，68/69：490-506.

[13] BELOSTOTSKY R，FRISHBERG Y. Catabolism of hydroxyproline in vertebrates：physiology，evolution，genetic diseases and new siRNA approach for treatment[J]. Int J Mol Sci，2022，23(2)：1005.

[14] DELEON-PENNELL K Y，MESCHIARI C A，JUNG M，et al. Matrix metalloproteinases in myocardial infarction and heart failure[J]. Prog Mol Biol Transl Sci，2017，147：75-100.

[15] BASSIOUNI W，ALI M A M，SCHULZ R. Multifunctional intracellular matrix metalloproteinases：implications in disease[J]. FEBS J，2021，288(24)：7162-7182.

[16] KREMASTIOTIS G，HANDA I，JACKSON C，et al. Disparate effects of MMP and TIMP modulation on coronary atherosclerosis and associated myocardial fibrosis[J]. Sci Rep，2021，11(1)：23081.

[17] IP C，LUK K S，YUEN V L C，et al. Soluble suppression of tumorigenicity 2 (sST2)for predicting disease severity or mortality outcomes in cardiovascular diseases：a systematic review and meta-analysis[J]. Int J Cardiol Heart Vasc，2021，37：100887.

[18] XIE J X，HU J，CHENG J，et al. The function of the ACE2/Ang (1-7)/Mas receptor axis of the renin-angiotensin system in myocardial ischemia reperfusion injury [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci，2022，26(6)：1852-1859.

[19] PATEL V B，ZHONG J C，GRANT M B，et al. Role of the ACE2/angiotensin 1-7 axis of the renin-angiotensin system in heart failure[J]. Circ Res，2016，118(8)：1313-1326.

[20] AIMO A，VERGARO G，PASSINO C，et al. Evaluation of pathophysiological relationships between renin-angiotensin and ACE-ACE2 systems in cardiovascular disorders：from theory to routine clinical practice in patients with heart failure[J]. Crit Rev Clin Lab Sci，2021，58(8)：530-545.

[21] SANTOS R A S，SAMPAIO W O，ALZAMORA A C，et al. The ACE2/angiotensin-(1-7)/MAS axis of the renin-angiotensin system：focus on angiotensin-(1-7)[J]. Physiol Rev，2018，98(1)：505-553.

[22] CASTOLDI G，CARLETTI R，IPPOLITO S，et al. Angiotensin type 2 and mas receptor activation prevents myocardial fibrosis and hypertrophy through the reduction of inflammatory cell infiltration and local sympathetic activity in angiotensin Ⅱ-dependent hypertension[J]. Int J Mol Sci，2021，22(24)：13678.

（收稿日期：2022-06-27　修回日期：2022-11-20）

（编辑：张元媛，曾海蓉）