黄连素抗慢性心力衰竭机制的动物实验研究

张恩浩,钟国强,黎庆捷,何 艳 (广西医科大学第一附属医院心内科,广西 南宁 530021)

[摘 要] **目的** 探讨黄连素抗慢性心力衰竭(CHF)的机制。**方法** 腹腔注射阿霉素(每周 2.8 mg/kg,共 10 周)以建立 SD 大鼠慢性心力衰竭模型;将建立慢性心力衰竭模型的 SD 大鼠(20 只)随机分为黄连素治疗组(10 只)与安慰剂对照组(10 只),并随机选取 10 只 SD 大鼠作为正常对照组。黄连素治疗组予以黄连素 21 mg·kg^{-1}·d^{-1},灌胃 4 周,正常对照组与安慰剂对照组予以等量蒸馏水。采用 ELISA、实时荧光定量 PCR 方法分别检测大鼠血清肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、血清脑钠肽(BNP)及 iNOS 基因表达。**结果** 黄连素治疗组的血清 BNP、TNF-α 的值均显著低于干预前和 CHF 安慰剂组的水平($P<0.05$);黄连素治疗组 iNOS 基因表达明显低于干预前和 CHF 安慰剂组($P<0.01$)。**结论** 黄连素抗心衰机制与其降低心衰大鼠的血清 BNP、TNF-α 水平和抑制 iNOS 基因的表达相关。

[关键词] 黄连素;慢性心力衰竭;肿瘤坏死因子-α;iNOS;大鼠

[中图分类号] R541.6 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2012)03-0258-03

Animal experimental study on the mechanism of berberine in treating chronic heart failure

ZHANG En-hao, ZHONG Guo-qiang, LI Qing-jie, HE Yan (Department of Cardiology, First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning Guangxi 530021, China)

Abstract: Objective To investigate the mechanism of berberine in treating chronic heart failure. **Methods** The Sprague-Dawley (SD) rat of experimental chronic heart failure (CHF) model was established by intraperitoneal injection of adriamycin 2.8 mg/kg per week for 10 weeks. The rats in CHF model ($n=20$) were divided into berberine treatment group ($n=10$) and CHF control group ($n=10$), and 10 randomly selected rats were as normal control group. The rats in berberine treatment group were given to berberine 21 mg·kg^{-1}·d^{-1} for 4 weeks while those in CHF control group and normal control group were administered with distilled water. Serum BNP and TNF-α were assessed by ELISA, iNOS gene expression was measured by real-time PCR. **Results** Serum BNP and TNF-α were significantly attenuated in berberine treatment group compared with those before the treatment and those in CHF group ($P<0.05$). The iNOS gene expressions were decreased in berberine treatment group compared with those before the treatment and those in CHF group ($P<0.01$). **Conclusion** The mechanism of berberine in treating chronic heart failure was associated with the down-regulation of serum TNF-α and iNOS gene expression.

Keywords: berberine; chronic heart failure; TNF-α; iNOS; rat

慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF)发生的机制复杂,有研究发现过量表达的肿瘤坏死因子-α(TNF-α)在心衰发生过程中具有重要作用[1-3],其可诱导心肌细胞凋亡,减少胞浆内钙离子流动,诱导诱生型一氧化氮合酶(iNOS)表达而产生大量一氧化氮(NO),同时可促进 IL-1β、IL-6、γ-干扰素等的分泌,从而诱发和加重心力衰竭。研究表明黄连素具有较好治疗心力衰竭的作用[4-6],但其作用机制尚不清楚。本研究以 SD 大鼠为研究对象,检测黄连素治疗大鼠慢性心力衰竭中的 TNF-α、血清脑钠肽(BNP)及 iNOS 基因表达,为阐明黄连素治疗心力衰竭机制提供依据。

[基金项目] 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科攻 0816004)

[作者简介] 张恩浩(1986 -),男,广西桂林市人,硕士,主要从事心力衰竭、心律失常方面的研究。E-mail:glyxyzh@163.com

[通讯作者] 钟国强(1958 -),男,教授,博士生导师。电话:(0771)5356375

[收稿日期] 2011-01-21 [修回日期] 2012-02-18

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

60 只健康、清洁级雄性 SD 大鼠,体重(220 ± 20)g,由广西医科大学实验动物中心供应,合格证号:桂检证字(2000)第 001 号。采用随机数字表法随机抽取 SD 大鼠 10 只作为正常对照组,其余 50 只用于慢性心力衰竭造模,其中造模成功的大鼠(20 只)再采用随机数字表法随机分为黄连素治疗组和安慰剂对照组,各组分别为 10 只。

1.2 慢性心力衰竭造模方法

按照参考文献[7]的方法,造模组给予腹腔注射阿霉素每周 2.8 mg/kg,共 10 周,停药观察 1 周,采用超声心动图对存活大鼠检测诊断,判断是否造模成功。

1.3 大鼠慢性心力衰竭造模成功判断标准

参考美国心脏病学会/美国心脏学会(ACC/AHA)指南(2009 年),采用 Philips Sonos 7500 型超声显像仪(探头频率 12 MHz)连续测 3 个心动周期的左室舒张末内径(LViDd, mm)、左室收缩末内径(LViDs, mm)、左室舒张末容积(LVDV)、左室收

缩末容积(LVSV),取其平均值,经 Simpson 法换算左室射血分数及左室缩短分数(LVEF、LVFS),计算公式:LVEF = [(LVDV - LVSV)/LVDV] × 100%,LVFS = [(LVDD - LVSD)/LVDD] × 100%,结合大鼠血清 BNP 检测[8]结果综合判断是否造模成功。

1.4 给药方法

CHF 黄连素治疗组予以黄连素 21 mg · kg^{-1} · d^{-1},灌胃 4 周,正常对照组与 CHF 安慰剂对照组予以等量蒸馏水灌胃 4 周。

1.5 血清 TNF-α、BNP 的检测

大鼠分别于干预前及处死前,在全麻状态下,鼠股静脉处抽取血液标本,3 000 r/min 离心 10 min 分离血清,采用 ELISA 方法(试剂盒购自武汉华美公司)检测大鼠血清中 BNP、TNF-α 浓度,操作步骤参照试剂盒说明进行。

1.6 实时荧光定量 PCR 检测 iNOS 基因表达

1.6.1 总 RNA 的提取 处死大鼠后,剪取 50 ~ 80 mg 大鼠心脏组织放入研钵中,加入少量液氮,迅速研磨,按总 RNA 提取试剂盒(天根公司)步骤操作,提取总 RNA,并测定提取样品 RNA 的 OD260/OD280 比值。

1.6.2 引物设计与合成 以 β-actin 基因为内参照,参考相关文献中大鼠 β-actin[9]、iNOS[10]引物(表 1),由上海 Invitrogen 生命技术公司合成。

表 1 β-actin、iNOS 基因引物序列信息

基因名称	引物序列	扩增片段长度
β-actin Forward primer	5′AGGCCCCTCTGAACCCTAAG 3′	118 bp
β-actin Reverse primer	5′CCAGAGGCATACAGGGACAAC 3′	
iNOS Forward primer	5′TGGTCCAACCTGCAGGTCTT 3′	121 bp
iNOS Reverse primer	5′CAGTAATGGCCGACCTGATGT 3′	

1.6.3 基因扩增效率及 Ct 值计算 按逆转录试剂盒说明书操作合成 cDNA,按 TAKARA 试剂盒说明书采用 ABI 7500 PCR 仪进行实时荧光定量 PCR(扩增条件为:95 ℃ 预变性 30 s,95 ℃ 5 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,40 个循环),绘制标准曲线,比较内参照基因(β-actin)与 iNOS 基因的扩增效率,β-actin 标准曲线的 M 值即斜率与 iNOS 基因 M 值的差值小于 0.1,提示 β-actin 和 iNOS扩增效率相同,可采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$法进行相对定量,测定各标本的 Ct 值,并对 PCR 产物进行电泳鉴定。

1.7 统计方法

使用 SPSS 13.0 软件包,对不同组间 LViDd、LViDs、LVEF 的比较采用 t 检验分析;对组间血清 BNP、TNF-α 及荧光定量检测数据的比较采用单因素方差分析。$P < 0.05$ 有统计学差异。

2 结果

2.1 慢性心力衰竭造模

与正常对照组相比,造模组 50 只 SD 大鼠腹腔注射阿霉素后,均出现毛疏松、易脱,饮食量减少,体重增加缓慢,口鼻紫绀,呼吸频率增加、活动减少等症状体征。慢性心力衰竭造模组存活 20 只,存活造模大鼠的 LViDd、LViDs、LVEF 及血清 BNP 均显著高于正常对照($P < 0.05$),结果见表 1。提示慢性心力衰竭造模成功。

表 1 大鼠心脏超声心动图及血清 BNP 检查结果($\bar{x} \pm s$)

组别	例数 (n)	LViDd (mm)	LViDs (mm)	LVEF	血清 BNP
正常对照组	10	5.16 ± 0.34	3.37 ± 0.22	0.781 ± 0.045	21.7 ± 8.2
造模成功组	20	6.03 ± 0.48*	4.23 ± 0.48*	0.661 ± 0.051*	62.6 ± 10.9*

*:与正常对照组比较,$P < 0.05$

2.2 黄连素对 CHF 大鼠血清 BNP、TNF-α 的影响

由表 2 可见,黄连素治疗组的血清 BNP、TNF-α 的值均显著低于干预前和 CHF 安慰剂组的水平($P < 0.05$),提示黄连素具有一定降低慢性心力衰竭大鼠血清 BNP、TNF-α 的作用。

表 2 黄连素对 CHF 竭大鼠血清 BNP、TNF-α 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	例数 (n)	BNP (ng/mL)	TNF-α (ng/mL)
正常对照组	10	21.7 ± 8.2	1.14 ± 0.45
心衰模型干预前	20	62.6 ± 10.9*	2.20 ± 0.39*
黄连素治疗组	10	60.0 ± 11.3*#	1.70 ± 0.23*#
CHF 安慰剂组	10	71.3 ± 7.1*	2.24 ± 0.28*

*:与正常对照组比较,$P < 0.05$;#:与 CHF 安慰剂组比较,$P < 0.05$

2.3 iNOS 基因表达

与正常对照组心肌细胞相比,慢性心力衰竭模型大鼠心肌细胞 iNOS 基因表达明显增高($P < 0.01$),黄连素治疗组 iNOS 基因表达明显低于干预前和 CHF 安慰剂组($P < 0.01$),同时 CHF 安慰剂组大鼠 iNOS 基因呈现持续高表达,提示黄连素可抑制慢性心力衰竭大鼠的 iNOS 基因表达。

3 讨论

有研究表明,内源性神经内分泌和细胞因子激活形成的调控网络在慢性心力衰竭发生发展中起着十分重要的作用[1-3]。TNF-α 具有多种生物学功能,可促使心肌肥大、细胞凋亡等,导致心肌收缩能力和顺应性下降,与心功能损害程度呈正相关,是 CHF 发生和发展的一关键因子。TNF-α 可诱导诱生型一氧化氮合酶表达而产生大量一氧化氮,激活蛋白激酶 G(protein kinaseG,PKG),诱导细胞膜超极化,导致电压门控式钙通道关闭,同时 PKG 可降低肌钙蛋白对钙离子的敏感性,抑制磷酸肌醇水解,从而导致心肌收缩力降低[11]。高浓度的 NO 还可增加 Bax/Bcl-2 比值、增加 Fas 表达、下调 X 相关凋亡蛋白抑制剂(XIAP)水平等通路诱导心肌细胞凋亡,引起迟发性心肌收缩力降低[12]。而 BNP 可通过鸟苷酸环化酶促进血管扩张和尿钠排泄,具有反向调节交感神经系统和肾素-血管紧张素-醛固

酮系统(RAAS)的作用,在 CHF 代偿过程中发挥重要作用,且 BNP 在早期 CHF 患者血浆中的含量就已增加,因此可将 BNP 作为诊断 CHF 的一个敏感指标[8]。

黄连素能增强心力衰竭模型动物的心肌收缩力及改善血管舒缩功能[4-6],但其抗心衰机制不明。因此本研究观察黄连素治疗慢性心力衰竭模型大鼠的血清 TNF-α、BNP 以及 iNOS 基因表达的变化,为阐明黄连素抗心衰机制提供依据。采用腹腔注射阿霉素以建立慢性心力衰竭大鼠模型,共 20 只 SD 大鼠心力衰竭模型建立成功。通过超声心动图及血清 BNP 检测证实,SD 大鼠左室舒张末径和左室收缩末径增大,左室射血分数降低,且血清 BNP 显著升高。

本研究显示,黄连素具有降低慢性心力衰竭大鼠血清 BNP、TNF-α 水平以及抑制 iNOS 基因表达的作用,推测黄连素抗心衰作用与该作用有关。由于血液 TNF-α 的升高可因心衰的发生引起,也可促进心衰的发展,黄连素可能通过降低 TNF-α 水平、抑制 iNOS 基因表达,减少 NO 促进心衰发展的作用,其可能是黄连素抗心衰的机制之一,该结论有待进一步研究证实。

[参考文献]

[1] Tziakas D, Chalikias G, Parissis JT, et al. Prolonged activation of tumor necrosis factor (TNF)-alpha and its soluble receptors in chronic heart failure patients both in the compensated and decompensated state. Interplay between their levels and metalloproteinase-3 [J]. Eur Cytokine Netw, 2004, 15(3): 231 – 239.

[2] Sola S, Mir MQ, Lerakis S, et al. Atorvastatin improves left ventricular systolic function and serum markers of inflammation in nonischemic heart failure[J]. J Am Coll Cardiol, 2006, 47(2): 332 – 337.

[3] Mousa SA, Goncharuk O, Miller D. Recent advances of TNF-alpha antagonists in rheumatoid arthritis and chronic heart failure[J]. Expert Opin Biol Ther, 2007, 7(5): 617 – 625.

[4] Na T, Dai DZ, Tang XY, et al. Upregulation of leptin pathway correlates with abnormal expression of SERCA2a, phospholamban and the endothelin pathway in heart failure and reversal by CPU86017[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2007, 375(1): 39 – 49.

[5] Zhang XD, Ren HM, Liu L. Effects of different dose berberine on hemodynamic parameters and $[Ca^{2+}]i$ of cardiac myocytes of diastolic heart failure rat model[J]. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 2008, 33(7): 818 – 821.

[6] Li Y, Chen X, Liu H, et al. Effects of ginseng total saponins with berberine on plasma brain natriuretic peptide and Ca^{2+} concentration in experimental rats with chronic congestive heart failure[J]. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 2009, 34(3): 324 – 327.

[7] 钟国强,马国添,刘唐威,等. 腹腔注射阿霉素建立扩张型心肌病大鼠模型的方法学改进[J]. 基础医学与临床, 2007, 27(11): 1289 – 1292.

[8] Clerico A, Fontana M, Ripoli A, et al. Clinical relevance of BNP measurement in the follow-up of patients with chronic heart failure[J]. Adv Clin Chem, 2009, 48: 163 – 179.

[9] Wheeler DG, Barrett CF, Groth RD, et al. CaMKII locally encodes L-type channel activity to signal to nuclear CREB in excitation-transcription coupling[J]. J Cell Biol, 2008, 183(5), 849 – 863.

[10] Tilleux S, Hermans E. Down-regulation of astrocytic GLAST by microglia-related inflammation is abrogated in dibutyryl cAMP-differentiated cultures[J]. J Neurochem, 2008, 105(6): 2224 – 2236.

[11] Razavi HM, Hamilton JA, Feng Q. Modulation of apoptosis by nitric oxide: implications in myocardial ischemia and heart failure[J]. Pharmacol Ther, 2005, 106(2): 147 – 162.

[12] Rastaldo R, Pagliaro P, Cappello S, et al. Nitric oxide and cardiac function[J]. Life Sci, 2007, 81(10): 779 – 793.

(编辑:余汇洋)

(上接第 257 页)

2 结果

术后 24 h 拆除绷带,术后 1 个月复查,一块羟基磷灰石(3 mm × 2 mm)游走至左眼右上方球结膜下,取出,余结膜切口愈合好,未见义眼台暴露,眼眶饱满,安置义眼后角膜突度计检查 15/14 mm(眶外缘距离 105 mm),左眼睑裂高 10 mm,患者满意。随访观察 1 年,未再发生义眼台后退,结膜无开裂。

3 讨论

本例患者在植入义眼台后,眶脂肪逐渐萎缩,导致植入的义眼台后退,影响外观,如果换用较大的义眼,则可能由于义眼过重,长期压迫下睑导致睑外翻,且手术损伤大更易发生并发症。因此,我们采用在原义眼台后另外再填充羟基磷灰石。手术切口应该选择在结膜囊较深的位置,以避免瘢痕收缩致浅结膜囊,也可以防止伤口愈合不良,使得原义眼台暴露。新植入物放在原义眼台后方或侧后方,可防止其与结膜接触使结膜开裂,另外,也可尽量保证结膜面的光滑平整,有利于安置义眼。由于植入的羟基磷灰石是数个碎块,早期未血管化时,可在眼内移动,此例患者再次手术后 1 个月复查,就发现一块羟基磷灰石游走至右上方球结膜下。眶脂肪是眼眶内的重要填充物,外伤、手术、植入的异物均可能导致其吸收,从而影响眼眶的饱满程度,手术时应尽量避免过度损伤眶脂肪。

[参考文献]

[1] 梁衍麟. 羟基磷灰石义眼台植入术后暴露原因分析[J]. 中国社区医师(医学专业), 2011, 13(12): 139 – 140.

[2] 林 伟,樊映川,罗又蓉. 羟基磷灰石义眼台植入后暴露原因分析及处理[J]. 眼外伤职业眼病杂志(附眼科手术), 2010, 32(6): 453 – 455

(编辑:周小林)