

本文引用:孙涛,李雅,郭志华,龙云,曾英,王月.益心泰对慢性心力衰竭大鼠心室重构及 p-p38MAPK、 β -arrestin 蛋白表达的影响[J].湖南中医药大学学报,2020,40(9):1090-1093.

益心泰对慢性心力衰竭大鼠心室重构及 p-p38MAPK、 β -arrestin 蛋白表达的影响

孙涛¹,李雅^{2*},郭志华^{1,2},龙云¹,曾英¹,王月¹

(1.湖南中医药大学第一附属医院,湖南长沙 410007;2.湖南中医药大学,湖南长沙 410208)

[摘要] 目的 探讨 β -抑制蛋白(β -arrestin)、磷酸化 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p-p38MAPK)蛋白表达对慢性心力衰竭大鼠心室重构的影响及益心泰丸对其干预作用。方法 制备慢性心力衰竭大鼠模型。随机分成正常对照组、模型组、益心泰组和卡维地洛组。益心泰组 2.0 g/(10 mL·kg);卡维地洛组 10 mg/(10 mL·kg);正常对照组及模型组生理盐水等容积灌胃,用药 8 周后分别检测心室重量指数、左心室内径及 β -arrestin、p-p38MAPK 蛋白表达情况。结果 与正常对照组比较,模型组左、右心室重量指数明显增加,左室舒张末期内径、收缩末期内径明显增大,左室后壁、室间隔厚度明显降低, β -arrestin 蛋白表达下降,p-p38MAPK 蛋白表达增加,差异有统计学意义($P<0.01$)。与模型组比较,益心泰组和卡维地洛组左、右心室重量指数均降低,左室舒张末期内径、收缩末期内径缩小,左室后壁、室间隔厚度增加, β -arrestin 蛋白表达增加,p-p38MAPK 蛋白表达下降,差异有统计学意义($P<0.05$);益心泰组与卡维地洛组各项指标组间比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 益心泰可能通过激活 β -arrestin,进而抑制 p-p38MAPK 蛋白表达,从而在一定程度上干预了心室重构的进程。

[关键词] 慢性心力衰竭;益心泰;心室重构; β -抑制蛋白;p38 丝裂原活化蛋白激酶

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2020.09.009

Effects of Yixintai on Ventricular Remodeling and p-p38MAPK, β -arrestin Protein Expression in Rats with Chronic Heart Failure

SUN Tao¹, LI Ya^{2*}, GUO Zhihua^{1,2}, LONG Yun¹, ZENG Ying¹, WANG Yue¹

(1. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China;

2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of β -arrestin and p38 mitogen activated protein kinase (p-p38MAPK) on ventricular remodeling in rats with chronic heart failure and the intervention of Yixintai. **Methods** The rat model of chronic heart failure was established. The rats were randomly divided into a normal control group, a model group, a Yixintai group and a carvedilol group. The Yixintai group was given drug of 2.0 g/(10 mL·kg); the carvedilol group was given drug of 10 mg/(10 mL·kg); the normal control group and the model group were given normal saline by gavage with equal volume. Ventricular weights index, left ventricular diameter and β -arrestin, p-p38MAPK protein expression were measured after 8 weeks of treatment. **Results** Compared with the normal control group, the left and right ventricular mass indexes of the model group increased significantly, and the end-diastolic and end-systolic diameters of the left ventricle increased significantly. The thickness of the posterior wall of the left ventricle and the ventricular septum decreased significantly, and the expression of β -arrestin protein decreased. The expression of p-p38MAPK protein increased, and the difference was statistically significant ($P<0.01$). Compared with the model group, the left and right ventricular mass indexes of the Yixintai group and the carvedilol group were reduced, and the left ventricular end-diastolic

[收稿日期] 2019-11-05

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81673955);湖南省中医药科研计划项目(201833)。

[作者简介] 孙涛,男,硕士,研究方向:中医内科。

[通讯作者] *李雅,女,副教授,硕士研究生导师,E-mail:Guozhihua112@163.com。

and end-systolic diameters decreased. The thickness of the left ventricular posterior wall and ventricular septum increased, and β -arrestin protein expression increased. The expression of p-p38MAPK protein decreased, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). There was no significant difference between the Yixintai group and the carvedilol group in each index, and the difference was statistically significant ($P > 0.05$). **Conclusion** Yixintai may inhibit the expression of p-p38MAPK by activating β -arrestin, which may interfere with the process of ventricular remodeling to some extent.

[**Keywords**] chronic heart failure; Yixintai; ventricular remodeling; β -inhibitory protein; p38 mitogen activated protein kinase

随着多数心血管疾病得到良好的诊治,慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF)所带来的问题越来越突出,现已成为人类健康道路上最大的敌人之一,绝大多数心血管疾病发展到终末期都会并发心力衰竭。研究表明,心室重构在心力衰竭发生和发展的过程中扮演重要角色^[1]。而 β -arrestin 的偏向激活作用在心室重构中的发挥也得到了越来越多的关注。近期研究证实,成功抑制 β -arrestin 介导的 p38MAPK 信号通路对心肌有保护作用^[2]。中药复方益心泰长期应用于慢性心力衰竭患者的临床治疗,且疗效已得到充分肯定^[3-6]。本课题组前期研究已经证明,益心泰能够通过抑制 G 蛋白偶联受体,延缓心力衰竭^[7],但是否能够抑制 β -arrestin 介导的 p38MAPK 信号通路尚不清楚。本研究通过观察益心泰对慢性心力衰竭大鼠心室重构时 β -arrestin、p-p38MAPK 蛋白表达的影响,试图阐明益心泰抗心室重构的多重作用机制,为将其应用于临床提供充分的理论依据。

1 材料与方 法

1.1 动物

SD 大鼠 60 只,雄性,清洁级,体质量 200~230 g,由湖南省人民医院动物中心提供,许可证号:SCXK(湘)2016-0002。

1.2 药物、试剂与仪器设备:

益心泰由湖南中医药大学第一附属医院中成药制剂中心提供的医院制剂,主要由黄芪、红花、猪苓等组成;卡维地洛由山东齐鲁制药有限公司提供(批号:201800035),商品名:金络,10 mg/片; β -arrestin 蛋白表达试剂盒(湖南玉堂生物试剂公司);兔抗鼠 p38MAPK 抗体(北京博奥森公司);AEV-210 电子分析天平(长沙湘仪天平仪器厂);Vivid 7.0 彩色超声仪(美国 GE 公司);UV-365 型紫外分光光度计(日本岛津)。

1.3 模型制备与动物分组

60 只清洁级 SD 雄性大鼠中,随机数字表法选取 10 只设正常对照组,其余 50 只采用腹腔注射盐

酸阿霉素法建立心衰大鼠模型^[8],按第 1 次和第 2 次 1.0 mg/(kg·d)剂量给药,第 3 次和第 4 次 2.0 mg/(kg·d)剂量给药,第 5 次和第 6 次 1.0 mg/(kg·d)剂量给药,第 7 次和第 8 次 2.0 mg/(kg·d)剂量给药,累积剂量 12 mg/kg,隔天注射,共计 15 d,观察大鼠表征及行为改变。于第 16 天完成心脏彩超检查,以左室射血分数(LVEF)为参考指标,数值低于 40%作为心力衰竭模型成功的标志,同时大鼠出现体质量减轻、活动减少、精神萎靡、毛色黯淡无光泽,列入观察对象。在符合上述标准的大鼠中,随机选取 30 只,再随机分为 3 组:益心泰组 2.0 g/(10 mL·kg);卡维地洛组 10 mg/(10 mL·kg);正常对照组及模型组(生理盐水等容积),各组均为每日给药 1 次,连续灌胃给药 8 周,观察整个实验过程中大鼠一般情况。给药 8 周后,检测大鼠心室重构指标及 β -arrestin、p-p38MAPK 蛋白表达情况。

1.4 各项指标的测定

1.4.1 左室结构观测 采用 Vivid 7.0 彩色超声仪进行检测。分别取胸骨旁左室长轴切面和心尖两腔心切面,由二维超声引导 M 型曲线并进行测量。测量指标为左心室后壁厚度(posterior Wall thickness in diastole, PWD)、室间隔厚度(interventricular septal thickness at end diastole, IVSD)、左心室舒张末期内径(left ventricular end diastolic dimension, LVEDD)、左心室收缩末期内径(Left ventricular end-systolic dimension, LVESD),均记录连续 3 个心动周期数值,再取平均值。

1.4.2 心室重构指标检测 左心室重量指数(left ventricular weight index, LVWI)和右心室重量指数(right ventricular weight index, RVWI),左心室湿重/体重即左心室重量指数;右心室湿重/体重即右心室重量指数^[9]。

1.4.3 Western blot 检测 β -arrestin、p-p38MAPK 蛋白表达 采用 Western blot 检测 β -arrestin、p-p38MAPK 蛋白的相对表达,洗膜后用 GE AI600 多功能成像仪扫描条带,并用 Gel-Pro Analyzer 4.0 软件对结果

进行分析比对。

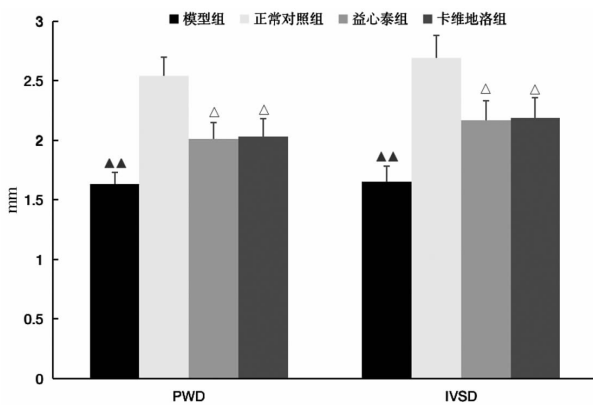
1.5 统计学方法

运用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析, 检验均采用双侧检验, $P < 0.05$ 即认为检验的差异具有统计学意义。结果以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示, 先行正态检验和方差齐性检验, 若满足正态性及方差齐性, 行单因素方差分析; 若不满足采用非参数检验。

2 结果

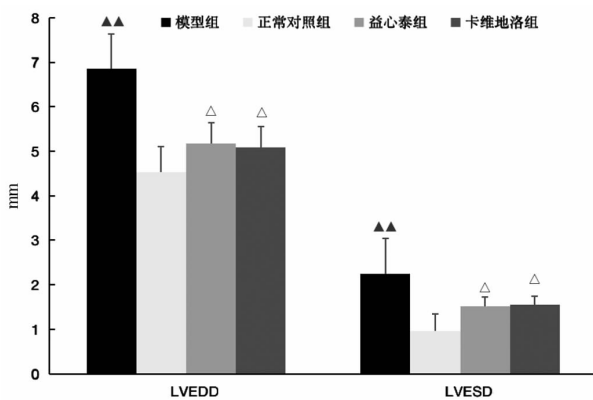
2.1 左室结构变化情况比较

与正常对照组比较, 模型组左室后壁、室间隔厚度明显降低, 左心室舒张末期内径及收缩末期内径均明显增加, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$); 与模型组进行比较, 益心泰组、卡维地洛组左室后壁、室间隔厚度增加, 左心室舒张末期内径及收缩末期内径减少, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 益心泰组与卡维地洛组各项指标组间比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 1 和图 2。



注: 与正常对照组比较, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$; 与模型组比较, $\triangle P < 0.05$

图 1 各组室间隔及左室后壁厚度变化情况



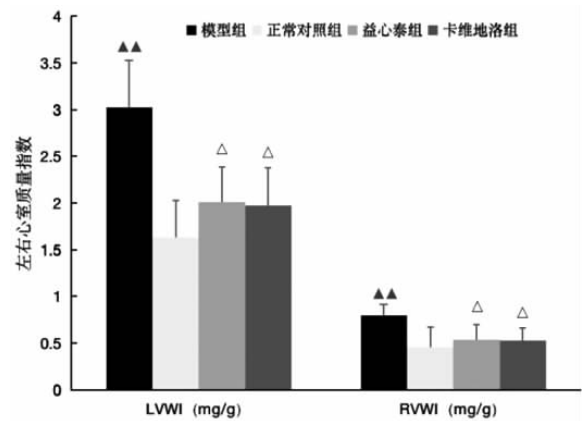
注: 与正常对照组比较, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$; 与模型组比较, $\triangle P < 0.05$

图 2 各组左室舒张末内径及收缩末内径变化情况

2.2 心室重构指标变化情况

与正常对照组比较, 模型组左、右心室重量指数明显增大, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。与模型组

比较, 益心泰组、卡维地洛组左、右心室重量指数均降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 益心泰组与卡维地洛组各项指标组间比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 3。

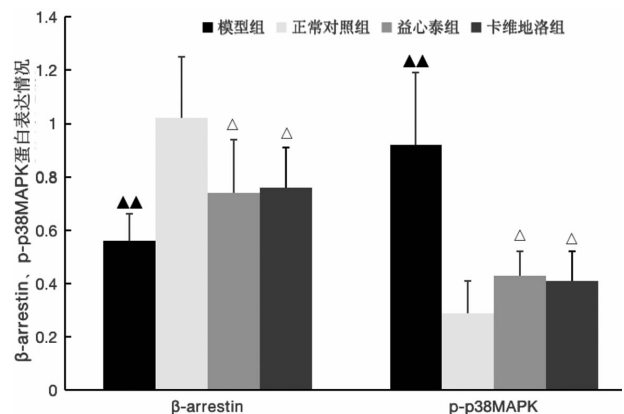
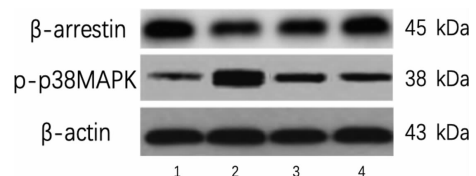


注: 与正常对照组比较, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$; 与模型组比较, $\triangle P < 0.05$

图 3 各组左右心室质量指数变化情况

2.3 β -arrestin、p-p38MAPK 蛋白表达情况

与正常对照组比较, 模型组 β -arrestin 蛋白表达明显下降, p-p38MAPK 蛋白表达显著增加, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 益心泰组、卡维地洛组 β -arrestin 蛋白表达增加, p-p38MAPK 蛋白表达减少, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 益心泰组与卡维地洛组各项指标组间比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结果见图 4。



注: 1. 正常对照组; 2. 模型组; 3. 益心泰组; 4. 卡维地洛组

图 4 各组 β -arrestin、p-p38MAPK 蛋白表达情况

3 讨论

前期研究表明, β -arrestin 蛋白家族属于一种脚

手架蛋白,多种信号蛋白可以被它募集,根据募集蛋白的不同, β -arrestin 会调节 7 次跨膜受体,产生不同的效应,如去磷酸化、泛素化、反式激活等^[10]。随着研究的深入, β -arrestin 越来越多的作用被发现,它作为脚手架蛋白的同时也是一类信号分子,且不依赖于 G 蛋白; β -arrestin 亦属于接头蛋白,可以与体内多种激酶与目标蛋白相互作用; β -arrestin 能够激活表皮生长因子,并在此过程中发挥关键作用^[2]。由于其作用靶点多样,功能丰富,已经成为药物研发的新目标。同时,p38MAPK 作为 β -arrestin 的下游重要靶点,也受到越来越多的关注。p38MAPK 广泛分布于人体细胞内,且可被多种因素激活,例如辐射、炎症、缺氧、细胞因子等^[11-12]。p38MAPK 的激活与心力衰竭的发生有着明确关系,研究已证明 p38MAPK 磷酸化后诱发心力衰竭的主要机制是启动心肌细胞凋亡,进而诱发心室重构^[13-15]。本研究已经证明益心泰和卡维地洛对大鼠心室重构有显著的抑制作用,如图 1、2 所示两治疗组均改善了左室结构,降低了左、右心室重量指数。从图 3 可知,益心泰组和卡维地洛组 β -arrestin 蛋白表达增加,p-p38MAPK 蛋白表达减少,与模型组及正常对照组比较,差异均具有统计学意义。综上结果可知,益心泰抑制心室重构作用显著,其作用机制可能是通过调节心肌细胞内的 β -arrestin、p-p38MAPK 蛋白表达实现的。

心力衰竭临床上以呼吸困难、水肿、乏力等症状为主要表现,在中医学中属“喘证”“水肿”“虚证”等范畴。其共同病机为“本虚标实”,又以气虚为主,气虚则血虚,气虚则血瘀,气虚则水停。益心泰是遵从上述理论指导,结合导师多年临床经验总结而成的中药复方,由黄芪、红花、猪苓等药物组成,该复方主要针对的病机是气虚血瘀水停。方中黄芪用量最重,为君药,可补气之不足;红花为臣药,活血化瘀,因其入心经,在本方中兼作使药;猪苓为佐药,利水消肿,配合余药,共奏益气活血利水之功。

综上所述,本研究表明益心泰有效调节心肌细胞内的 β -arrestin、p-p38MAPK 蛋白表达,从而明显抑制心室重构。但 β -arrestin 介导的 p38MAPK 信号

通路作用机制具有多样性,且步骤非常复杂,仍需进一步深入研究。

参考文献

- [1] TANAI E, FRANTZ S. Pathophysiology of heart failure[J]. *Comprehensive Physiology*, 2015, 6(1): 187-214.
- [2] 刘周英,浦介麟. β -肾上腺素受体介导的 G 蛋白及 β -arrestin 依赖性通路[J]. *中国分子心脏病学杂志*, 2014, 14(4): 1035-1038.
- [3] 郭志华,李雅,毛以林,等.益心泰丸治疗慢性心力衰竭 60 例临床观察[J]. *中成药*, 2008, 30(3): 323-325.
- [4] 李庆.益心泰治疗慢性心力衰竭 160 例临床观察[J]. *实用预防医学*, 2010, 17(3): 557-558.
- [5] 郭志华,毛以林,郑爱华.益心泰治疗慢性心力衰竭 40 例临床观察[J]. *中医药导报*, 2010, 16(5): 30-31.
- [6] 郭志华,范红辉,李雅,等.益心泰治疗气虚血瘀水停型慢性心力衰竭[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2009, 12(1): 127-128.
- [7] 孙涛,郭志华,毛湘屏,等.益心泰对心肌梗死大鼠心室重构及 CaN、NFAT3 蛋白表达的影响[J]. *湖南中医药大学学报*, 2013, 33(7): 23-25.
- [8] 叶婷,张梦,张宇,等.阿霉素性慢性心衰大鼠模型不同方案的比较[J]. *哈尔滨商业大学学报(自然科学版)*, 2016, 32(02): 154-156.
- [9] 梁逸强,潘朝铎,何新兵,等.压力超负荷致心力衰竭动物模型的研究进展[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2013, 11(1): 76-78.
- [10] TILLEY D G, ROCKMAN H A. Role of beta-adrenergic receptor signaling and desensitization in heart failure: new concepts and 5. prospects for treatment[J]. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, 2006, 4(3): 417-32.
- [11] CUENDA A, ROUSSEAU S. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1773(8): 1358-1375.
- [12] CORRE I, PARIS F, HUOT J. The p38 pathway, a major pleiotropic cascade that transduces stress and metastatic signals in endothelial cells[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(33): 55684-55714.
- [13] CAO S, ZHU X, DU L. P38 MAP kinase is involved in oleuropein-induced apoptosis in A549 cells by a mitochondrial apoptotic cascade[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 95: 1425-1435.
- [14] ZHAO H G, ZHOU S L, LIN Y Y, et al. Toxicaricoid N induces apoptosis in human gastric cancer SGC-7901 cell by activating the p38MAPK pathway[J]. *Archives of Pharmacal Research*, 2018, 41(1): 71-78.
- [15] LEI J, XUE S, WU W, et al. Sdc1 overexpression inhibits the p38MAPK pathway and lessens fibrotic ventricular remodeling in MI rats[J]. *Inflammation*, 2013, 36(3): 603-615.