

·基础研究·

本文引用:李欣春,梁昊,胡志希,胡思远,钟森杰,李琳,李杰,简维雄,郭志华.高血压心衰大鼠证候本质及药物干预研究[J].湖南中医药大学学报,2018,38(8):853-857.

高血压心衰大鼠证候本质及药物干预研究

李欣春^{1,2,3}, 梁昊^{1,2}, 胡志希^{1,2*}, 胡思远^{1,2}, 钟森杰^{1,2}, 李琳^{1,2}, 李杰^{1,2}, 简维雄^{1,2}, 郭志华¹

(1.湖南中医药大学中医诊断学国家重点学科,湖南长沙410208;2.湖南中医药大学中医诊断学湖南省重点实验室,湖南长沙410208;3.长沙金润中医院袁肇凯名师临床传承工作室,湖南长沙410014)

[摘要] **目的** 研究参附注射液和参麦注射液对高血压心力衰竭大鼠的疗效差异,通过“以方测证”理论推测高血压心衰大鼠所属中医证型。**方法** 将60只Dahl盐敏感性大鼠分为对照组、模型组、参附组和参麦组,每组15只,对照组使用低盐饲料,其余三组使用8%NaCl高盐饲料喂养大鼠20周并予以相应干预,检测大鼠血清氨基末端脑钠肽前体(n-terminal pro-brain natriuretic peptide, NT-proBNP),彩色超声多普勒检测大鼠左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)和左室短轴缩短率(left ventricular fractional shortening, LVFS)及观察HE染色心肌细胞。**结果** 与对照组比较,模型组LVEF和LVFS值均降低($P<0.05$),NT-proBNP值升高($P<0.01$);与模型组比较,参附组LVEF和LVFS值明显降低($P<0.05$),NT-proBNP值升高($P<0.01$);参麦组LVFS值升高($P<0.05$),NT-proBNP值降低($P<0.01$);与参附组比较,参麦组LVEF和LVFS值均升高($P<0.05$)。**结论** 参麦注射液对高血压心衰大鼠的疗效显著,参附注射液对高血压心衰大鼠无效;高血压心衰大鼠模型不属于心阳虚证,最可能是心气阴虚证;LVEF值保留及血压升高可能是应用参附注射液的禁忌指标。

[关键词] 高血压;心力衰竭;方证对应;大鼠动物模型;中医证型

[中图分类号] R285.5;R541.3

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.08.003

Study on the Essence of Syndrome and Drug Intervention in Rats with Hypertensive Heart Failure

LI Xinchun^{1,2,3}, LIANG Hao^{1,2}, HU Zhixi^{1,2*}, HU Siyuan^{1,2}, ZHONG Senjie^{1,2}, LI Lin^{1,2}, LI Jie^{1,2}, JIAN Weixiong^{1,2}, GUO Zhihua¹

(1. State Key Subject of TCM Diagnostics, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China;

2. Provincial Key Laboratory of TCM Diagnostics, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China;

3. Clinical Inheritance Studio of Famous Doctor Yuan Zhaokai, Jin-Run Institute of Traditional Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410014, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the traditional Chinese medicine (TCM) syndrome types in rats with hypertensive heart failure based on the theory of "Syndrome Differentiation Through Formula" by investigating the clinical efficacy of Shenfu injection versus Shenmai injection in rats with hypertensive heart failure. **Methods** A total of 60 Dahl salt sensitive rats were equally and randomly divided into control group, model group, Shenfu injection group (Shenfu group), and Shenmai injection group (Shenmai group). The control group was fed with low-salt feed, while the other three groups were fed with high-salt (8% NaCl) feed for 20 weeks and given respective interventions. The serum level of N-terminal-pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP)

[收稿日期] 2018-01-28

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81373550,81503627,81774208);湖南省教育厅实验平台开放基金项目(2017K070);袁肇凯名师工作室项目。

[作者简介] 李欣春,男,硕士,研究方向:心血管疾病证本质与诊治规律。

[通讯作者] *胡志希,男,教授,博士,博士研究生导师,E-mail:5471313@sohu.com。

was measured. The left ventricular ejection fraction (LVEF) and the left ventricular fractional shortening (LVFS) were determined by color Doppler ultrasound. And the myocardial cells with HE staining was observed under an electron microscope. **Results** Compared with the control group, the model group had significantly decreased LVEF and LVFS ($P<0.05$) and a significantly increased serum level of NT-proBNP ($P<0.01$). Compared with the model group, the Shenfu group had significantly decreased LVEF and LVFS ($P<0.05$) and a significantly increased serum level of NT-proBNP ($P<0.01$); the Shenmai group had a significantly increased LVFS ($P<0.05$) and a significantly decreased serum level of NT-proBNP ($P<0.01$). Compared with the Shenfu group, the Shenmai group had significantly increased LVEF and LVFS ($P<0.05$). **Conclusion** In rats with hypertensive heart failure, Shenmai injection has significant clinical efficacy, while Shenfu injection has no effect. The rat model of hypertensive heart failure is not identified as heart-Yang deficiency syndrome and is most likely to be heart-Qi and Yin deficiency syndrome. The preserved LVEF and increased blood pressure may be the contraindications for Shenfu injection.

[**Keywords**] hypertension; heart failure; syndrome differentiation through formula; rat model; traditional Chinese medicine syndrome type

心力衰竭(心衰)是多种心脏病的终末期阶段,发病率高^[1-2],随年龄增加呈明显上升趋势,5年存活率与恶性肿瘤相仿,是严重威胁老年人健康的危重病、多发病^[3]。尽管医疗技术飞速发展,但心衰的病死率和住院率依然居高不下^[4]。

临床研究表明^[5]参附注射液治疗舒张性心力衰竭疗效显著,并提出治疗机制可能与改善心肌重构、抑制神经内分泌过度激活有关;然而又有临床研究提出^[6],参麦注射液治疗气阴两虚型舒张性心力衰竭有确切的疗效;且多项研究表明二者在心力衰竭治疗上均表现出一定优势,比单纯西药治疗效果更佳^[7-8]。

但是,参附注射液在临床上常用于治疗阳虚证、阴竭阳脱证患者;参麦注射液临床上广泛用于气阴两虚型患者;参附注射液和参麦注射液适应中医证型不同。因此,我们推测由不同病理机制导致的心衰大鼠模型存在中医证型上的差异。为此,我们以高血压心衰大鼠为研究对象,对比两种注射液的疗效差异,推测其中医证候与病理本质。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级雄性Dahl盐敏感性大鼠60只,体质量(220±10)g,由北京维通利华动物公司提供,动物合格证编号为:11400700134072,饲养于湖南中医药大学动物实验中心SPF级实验室内。

1.2 仪器与主要试剂

超低温冰箱 Forma 900series,美国 Thermo 公司; 5417R型小型高速冷冻离心机,德国 Eppendorf 公司;

SonoScope-S2N型彩色多普勒超声诊断仪,深圳开立科技有限公司;智能无创血压计 BP-2010A,北京 Soft-ron公司;大鼠 NT-proBNP ELISA 试剂盒 96T,CUS ABIO公司,产品批号:CSB-E08752r;参麦注射液 20 mL/瓶,正大青春宝药业有限公司,批号:1402225;参附注射液 10 mL/瓶,雅安三九药业有限公司,批号:140205010。

1.3 造模方法

将60只Dahl盐敏感性大鼠随机分为对照组、参附注射液组(简称参附组)、参麦注射液组(简称参麦组)和模型组。每组15只,每3只老鼠一笼。对照组大鼠喂养0.3%NaCl低盐饲料,其余3组大鼠喂养8%NaCl高盐饲料,每笼每天喂养饲料60g,自由取水,每2天换洗笼子1次。

1.4 模型评价

与对照组比较,参附注射液组、参麦注射液组和模型组3组大鼠血压和血清 NT-ProBNP 含量显著升高($P<0.01$),LVEF、LVFS 显著下降($P<0.01$),心肌 HE 染色病理检查结果也有显著变化,成功建立高血压心力衰竭模型^[9]。

1.5 干预方法

均通过腹腔注射方式给药。查表得知以人的注射剂量作为参照系数($A1=36$)换算大鼠用药剂量系数($A2=6$),按照人体质量($W1=60$ Kg),大鼠体质量($W2=0.2$ Kg),人体每日静脉注射参附或参麦注射液($D1=60$ mL)计算^[10-11],200g大鼠参麦注射液与参附注射液每天的给药剂量 $D2=(D1/W1) \times (A1/A2) \times W2$ 为 1.2 mL,每天1次,共给药15d。模型组大鼠

注射等容量的注射灭菌用水。

1.6 检测方法与指标

1.6.1 超声心动图检测 用 SonoScape-S2N 型彩色多普勒超声诊断仪,在二维超声引导下用 M 型超声经胸骨左心室长轴切面测量左室舒张末期内径(LVEDD),左室收缩末期内径(LVESD),求 3 个心动周期的平均值,并按照 Teichholtz 公式计算左心室射血分数(LVEF)及左室短轴缩短率(LVFS)。

1.6.2 血压检测 将大鼠放入一端用网状铁丝封住的加热套筒内,套筒温度设置在 38 ℃,用特制帆布裹住大鼠臀部并露出尾巴。加热 3~5 min 后,将测压仪套入距离尾根部 3~5 cm 处,开始测压。选取 3 min 内连续测得收缩压波动范围不超过 5 mmHg 的 3 组血压值,并取 3 组收缩压平均值做为每只大鼠的血压监测值。在饲养的 20 周内,每 15 天测量大鼠血压 1 次。

1.6.3 血清样本制备及微观指标检测 在取材前大鼠经 10%水合氯醛按 4 mL/kg 计量腹腔注射麻醉后,使用采血针和采血管给大鼠腹主动脉取血,采血完毕常温静置 20 min 后,以 3 500 r/min 离心 10 min,立即提取上清液分装在离心管里,置-80 ℃冰箱里保存。待测时,先将血清室温放置 2 h 后,1 000 r/min 离心 15 min,使用酶联免疫吸附测定法(ELISA)对血清样本进行 NT-proBNP 含量检测。

1.6.4 心肌细胞染色 取出大鼠心脏后经固定、脱水、包埋以及切片后,将心脏切片用苏木精-伊红染色法染色,在光镜下以 400 倍观察各组心肌细胞形态学变化。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 22.0 统计软件分析,数据以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,经正态性检验,方差齐性检验,当满足方差齐性时,两两比较采用 LSD 法;方差不齐则采用 Dunnett's T3 法; $P < 0.05$ 表明差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠存活情况

造模期间,对照组 15 只大鼠全部存活,无一死亡;模型组 15 只大鼠死亡 5 只,剩余 10 只;参附组死亡 8 只,剩余 7 只;参麦组死亡 7 只,剩余 8 只;治疗期间,各组大鼠均无死亡。

2.2 血压监测图

从图 1 可以看出,模型组、参附组和参麦组大鼠血压从低于 140 mmHg 开始逐步上升至 200 mmHg,最终模型组稳定在此阶段,而从第 120 天开始参附组和参麦组组内平均血压有所下降,或与饲养后期大鼠因死亡数量下降有关;而对照组大鼠血压一直稳定在 140 mmHg 左右。因此,可确定该模型组大鼠长期存在高血压,可能对心脏有损害。

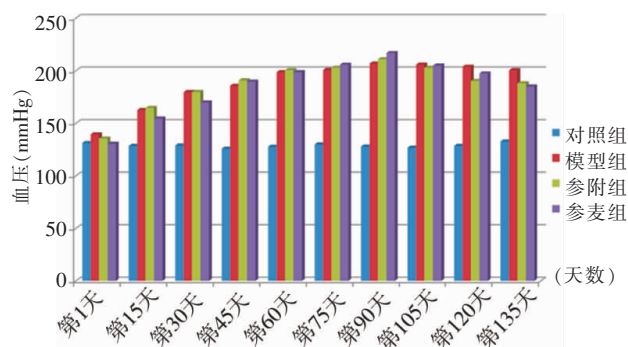
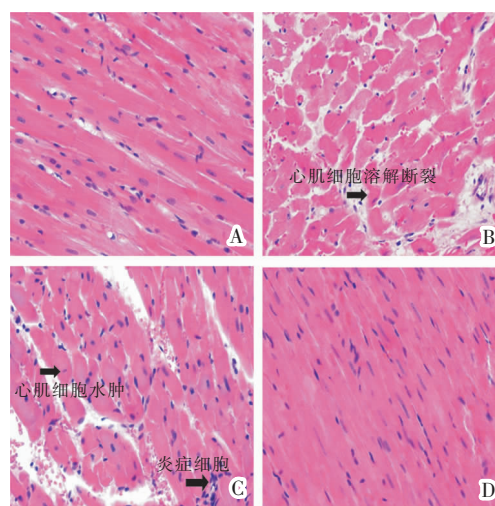


图 1 各组大鼠血压监测图

2.3 各组大鼠心肌细胞形态学观察

观察结果显示(图 2),对照组心肌结构清晰,心肌闰盘、横纹清晰,心肌细胞核位于边缘,核大小、形态正常;模型组心肌结构模糊,心肌闰盘不清,横纹消失,肌纤维呈波浪形排列,细胞间缝隙增大,心肌细胞水肿增大或溶解,出现大量的炎症细胞;与模型组比较,参附组改善作用不显著,而参麦组心肌细胞结构清晰,肌纤维排列整齐,无水腫等病理变化。



注:A.对照组;B.模型组;C.参附组;D.参麦组

图 2 各组心肌细胞显微观察光镜图(HE,×400)

2.4 各组大鼠 LVEF、LVFS 和 NT-proBNP 比较 与对照组比较,模型组 LVEF 和 LVFS 值均降

低($P<0.05$),说明成模质量较好;与模型组比较,参附组 LVEF 和 LVFS 值明显降低 ($P<0.05$),参麦组 LVFS 值升高($P<0.05$);与参附组比较,参麦组 LVEF 和 LVFS 值均升高($P<0.05$);与对照组比较,模型组大鼠 NT-proBNP 值升高($P<0.01$),提示造模方法较好,模型较为成功;与模型组比较,参附组 NT-proBNP 值升高($P<0.01$),参麦组 NT-proBNP 值降低 ($P<0.01$)。见表 1。

表 1 各组大鼠 LVEF、LVFS 和 NT-proBNP 比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	LVEF/%	LVFS/%	NT-proBNP/(pg·mL ⁻¹)
对照组	15	81.40±3.23	46.07±7.17	146.13±17.07
模型组	10	76.20±3.77*	36.30±6.40*	316.20±28.87**
参附组	7	63.57±8.22 [▲]	27.86±4.22 [▲]	398.14±72.34 ^{▲▲}
参麦组	8	76.63±3.29 [#]	47.25±5.90 [▲]	217.25±41.84 ^{▲▲}
F		24.20	17.73	79.84

注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,[▲] $P<0.05$,^{▲▲} $P<0.01$;与参附组比较,[#] $P<0.05$ 。

3 讨论

由于方剂与证型之间的多效性,一个证型可以用不止一首方治疗后有确切的疗效。又根据“以方测证”的理论,即依据方剂的功效或其组成药物的功效推测或反证其对应证候的属性。不管运用何种辨证方法,最后总要落实到一证和一个或几个与之相对应的方剂上,方剂乃是根据证而立立法选药、配伍组合而成,证与方剂之间愈是丝丝入扣,疗效就愈佳^[12]。为了更合理确定动物模型的中医证型,所以在选择治疗药物时,应从药物治疗功效上将其所治疗的中医证型区分开^[13]。因此,我们选择了参附注射液和参麦注射液作为对比治疗药物。参附注射液主要成分为红参和附子,具有益气温阳、回阳救逆的功效,在临床上常用于治疗阳虚证、阴竭阳脱证患者;参麦注射液源自古方生脉散,为红参和麦冬提取物,具有益气复脉、养阴生津的功效,临床上广泛用于气阴两虚型患者。有研究表明^[14-15],参附注射液能提高充血性心力衰竭患者心输出量、射血分数,增强心脏的收缩功能,改善心功能不全的临床症状和体征。参麦注射液则能改善心脏的舒张功能,同时也能改善心衰患者的射血分数。

本模型通过长期维持大鼠高血压状态,最终导致大鼠心脏损伤,从而引起心力衰竭,与人类高血压心脏病造成的心力衰竭非常类似。多项研究表明高

血压心衰不同于普通心衰,它不仅伴随血压升高,而且多为射血分数保留的心力衰竭^[16-17]。NT-proBNP是当前诊断心力衰竭最为准确的生物学指标,半衰期时间长,体外稳定时间长达 24 h,在血液中有累积作用,且不受所选药物的影响,因此有较高的灵敏度和特异度^[18]。NT-proBNP 水平受心肌张力强度影响,能反映心衰的严重程度,对预后具有重要的参考价值^[19]。结合模型组大鼠血压一直保持在 180 mmHg 以上,并且心肌细胞溶解断裂情况严重,射血分数和左室短轴缩短率降低,NT-proBNP 水平升高,提示模型组大鼠存在因高血压导致的心肌细胞重塑,左室舒张功能减退,射血功能降低符合心衰的病理变化。

实验结果表明,参附注射液组治疗后 NT-proBNP 水平升高,LVEF 和 LVFS 降低,心肌细胞染色结果与模型组对比差异不明显,说明病情不但没有好转,反而比模型组加重;而参麦注射液组 NT-proBNP 比模型组降低,大鼠 LVEF、LVFS 和心肌组织形态学结果明显好转,证实参麦注射液对高血压心衰有良好的治疗效果而参附注射液没有,因此,我们从“以方测证”角度说明了该模型不属于心阳虚证,最可能是心气阴虚证;LVEF 值保留及血压升高可能是应用参附注射液的禁忌指标。结合本课题组前期研究结果^[20-22],说明通过不同方式造成的大鼠心衰模型确实存在中医证型的差异,为中医证候模型研究提供了新的思路,也是对我们课题组前期基于不同心衰模型的证本质研究的重要补充。

本次实验仍有不足之处。心衰后水液代谢明显障碍,或由于长期大量摄入钠盐极易引起肾小球滤过功能降低、近端小管及远端小管重吸收能力减弱导致大量蛋白丢失、血容量下降、肠道蠕动减弱^[23],以至于大鼠生命后期体格瘦小,腹部膨隆,经解剖发现明显肠梗阻,这也是饲养后期大鼠死亡的主要原因,与临床中肾衰竭合并肠梗阻的病理相符^[24],值得深入研究。

参考文献:

- [1] BUI A L, HORWICH T B, FONAROW G C. Epidemiology and risk profile of heart failure[J]. Nat Rev Cardiol,2011,8(1):30-41.
- [2] 王 文,朱曼璐,王拥军,等.《中国心血管病报告 2012》概要[J].中国循环杂志,2013,28(6):408-412.
- [3] STEWART S, EKMAN I, EKMAN T, et al. Population Impact

- of Heart Failure and the Most Common Forms of Cancer A Study of 1162309 Hospital Cases in Sweden (1988 to 2004)[J]. *Circulation: Cardiovascular Quality and Outcomes*, 2010, 3(6): 573-580.
- [4] ROSS J S, CHEN J, LIN Z, et al. Recent national trends in readmission rates after heart failure hospitalization[J]. *Circulation: Heart Failure*, 2010, 3(1): 97-103.
- [5] 杨萍,李华,章永南,等.参附注射液治疗舒张性心力衰竭的临床疗效及机制研究[J].*中药药理与临床*,2014,30(4):116-119.
- [6] 褚庆民,李荣,张瑶,等.参麦注射液治疗气阴两虚型舒张性心力衰竭疗效观察[J].*山东中医药大学学报*,2013,37(4):305-307.
- [7] 陈弘东,谢雁鸣,王连心,等.参麦注射液辅助治疗慢性心力衰竭的有效性及安全性系统评价[J].*中国中药杂志*,2014,39(18):3650-3661.
- [8] 侯雅竹,毛静远,王贤良,等.参附注射液治疗心力衰竭的系统评价[J].*中国循证医学杂志*,2011,11(3):292-299.
- [9] 李欣春,梁昊,胡志希,等.高血压心力衰竭大鼠动物模型的研制[J].*湖南中医药大学学报*,2017,37(3):245-248.
- [10] 严治涛,罗文利,黄金梅,等.不同剂量参附注射液治疗慢性心力衰竭的临床疗效观察[J].*中华中医药杂志*,2015,30(2):636-640.
- [11] 杨靖,李霖,谢雁鸣,等.参附注射液治疗冠心病临床用药方案实效研究[J].*中国中药杂志*,2013,38(18):3099-3103.
- [12] 张兰凤,王永炎.方证对应研究[J].*中华中医药杂志*,2005,20(1):8-10.
- [13] 卢林竹,胡志希,李琳,等.“以方测证”法在动物模型研究中的运用[J].*湖南中医药大学学报*,2017,37(5):570-573.
- [14] 贺泽龙,邹晓玲.参附注射液对充血性心力衰竭患者血流动力学的影响及机理探讨[J].*中国中西医结合杂志*,2001,21(5):386-387.
- [15] 王燕丽,刘捷,张光泰.999参麦注射液治疗左室舒张功能不全60例[J].*辽宁中医杂志*,1999(11):508-509.
- [16] KLOTZ S, HAY I, ZHANG G, et al. Development of heart failure in chronic hypertensive Dahl rats: focus on heart failure with preserved ejection fraction[J]. *Hypertension*, 2006,47(5):901-911.
- [17] KOKUBO M, UEMURA A, MATSUBARA T, et al. Noninvasive evaluation of the time course of change in cardiac function in spontaneously hypertensive rats by echocardiography[J]. *Hypertens Res*, 2005,28(7):601-609.
- [18] 中华医学会心血管病学分会,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2014[J].*中华心血管病杂志*,2014,42(2):98-122.
- [19] GERGEI I, KRÄMER B K, SCHARNAGL H, et al. Propeptide big-endothelin, N-terminal-pro brain natriuretic peptide and mortality. The Ludwigshafen risk and cardiovascular health (LURIC) study[J]. *Biomarkers*, 2017,22(3/4):315-320.
- [20] 胡志希,吴涛,李欣春,等.基于中药制剂干预心肌梗死心衰大鼠的中医证型研究[A].中国中西医结合学会诊断专业委员会.中国中西医结合学会诊断专业委员会第十次全国学术会议论文集[C].河北秦皇岛:中国中西医结合学会,2016:107-114.
- [21] 胡思远,殷宏亮,李欣春,等.运动康复联合参附注射液对心肌梗死大鼠血流动力学的影响[J].*湖南中医药大学学报*,2017,37(7):715-718.
- [22] 董文波,胡思远,吴涛,等.参附注射液与参麦注射液对阿霉素诱导慢性心衰大鼠血流动力学指标的影响[A].中国中西医结合学会诊断专业委员会.第九次全国中西医结合诊断学术研讨会论文集[C].北京:中国中西医结合学会,2015:4.
- [23] NERBASS F B, PECOITS-FILHO R, MCINTYRE N J, et al. High sodium intake is associated with important risk factors in a large cohort of chronic kidney disease patients[J]. *Eur J Clin Nutr*, 2015, 69(7):786-790.
- [24] 洪汉利,陈统清,许玉燕,等.肾病综合征并发低位小肠梗阻1例报告[J].*吉林医学*,2014,35(2):444-445.

(本文编辑 杨 瑛)