

补肾活血方对心梗后心衰大鼠心室重构 及心脑血管组织 AVP、AQP_s 表达的影响

何晓腾¹, 许瑞¹, 张艳^{2*}

(1. 辽宁中医药大学, 沈阳 110847;

2. 辽宁中医药大学附属医院, 沈阳 110032)

[摘要] **目的:**探讨补肾活血方对心肌梗死后心力衰竭大鼠脑组织精氨酸加压素(AVP)、水通道蛋白(AQP1、AQP4)及心肌水通道蛋白(AQP1、AQP4、AQP7)表达的影响。**方法:**选取健康雄性SD大鼠60只,随机分为假手术组、模型组、补肾活血组与托伐普坦组,假手术组大鼠仅开胸冠状动脉(冠脉)挂线不结扎,其他各组采用结扎左冠状动脉前降支联合力竭式游泳、饥饿建立心肌梗死后心力衰竭模型。模型评价成功后,托伐普坦组与补肾活血组分别采用托伐普坦($1.35\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)及补肾活血方($15.75\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)进行干预,假手术组和模型组采用等体积生理盐水干预,持续4周。彩色多普勒心动超声测定大鼠左心室结构及功能变化,酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测血清N末端B型利钠肽前体(NT-proBNP)含量,苏木素-伊红(HE)染色观察大鼠脑组织、心肌组织形态,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠脑组织AVP、AQP1、AQP4和心肌组织AQP1、AQP4、AQP7蛋白表达变化,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测脑组织AVP、AQP1、AQP4 mRNA表达水平,检测心肌组织AQP1、AQP4、AQP7 mRNA表达水平。**结果:**与假手术组比较,模型组大鼠左心室内径(LVID)显著增加($P<0.01$)、射血分数(EF)、短轴缩短率(FS)显著减少($P<0.01$)、左心室室壁厚度(LVS、LVPW)显著增厚($P<0.01$);血清NT-proBNP含量显著增加($P<0.01$);大鼠脑组织神经细胞水肿、空泡样变,大鼠心肌梗死区心肌细胞坏死,心肌纤维断裂;脑组织AVP、AQP1、AQP4 mRNA及蛋白表达显著升高($P<0.01$),心肌组织AQP1、AQP4、AQP7 mRNA及蛋白表达显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,托伐普坦组和补肾活血组大鼠左心室内径(LVID)、射血分数(EF)、短轴缩短率(FS)、左心室室壁厚度(LVS、LVPW)均有不同程度改善($P<0.05$, $P<0.01$);血清NT-proBNP含量明显减少($P<0.05$);脑组织神经细胞水肿减轻,心肌纤维排列较整齐,部分心肌细胞坏死;脑组织AVP、AQP1、AQP4 mRNA及蛋白表达显著降低($P<0.01$),心肌组织AQP1、AQP4、AQP7 mRNA及蛋白表达均不同程度降低($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论:**补肾活血方能通过下调心肌梗死后心力衰竭大鼠脑组织AVP、AQP1、AQP4表达,下调心肌组织AQP1、AQP4、AQP7表达,来调节心脑血管液体代谢障碍,延缓心室重构,改善心功能。

[关键词] 心力衰竭; 补肾活血方; 水通道蛋白; 心功能; 心室重构

[中图分类号] R2-0;R22;R242;R541;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2024)21-0130-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20241424

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20240603.1050.004>

[网络出版日期] 2024-06-03 12:14:38

Effect of Bushen Huoxue Prescription on Ventricular Remodeling and Expression of AVP and AQP_s in Heart and Brain of Rat Model of Heart Failure after Myocardial Infarction

HE Xiaoteng¹, XU Rui¹, ZHANG Yan^{2*}

(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Shenyang 110847, China;

2. The Affiliated Hospital of Liaoning University of TCM, Shenyang 110032, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effects of Bushen Huoxue prescription on the expression of arginine vasopressin (AVP) and aquaporins (AQP)1 and AQP4 in the brain and AQP1, AQP4, and AQP7 in the

[收稿日期] 2024-03-24

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82174241);全国名老中医药专家传承工作室建设项目(2022-304)

[第一作者] 何晓腾,在读硕士,从事中西医结合防治心血管疾病研究,E-mail:xiaoteng0222@126.com

[通信作者] *张艳,博士,主任医师,博士生导师,从事中西医结合心血管内科疾病诊疗研究,E-mail:yanzhang1016@126.com

myocardial tissue of the rat model of heart failure after myocardial infarction. **Method:** Sixty healthy male SD rats were selected and randomized into sham surgery, model, Bushen Huoxue prescription, and tolvaptan groups. The rats in the sham surgery group only had their coronary arteries exposed without ligation, while those in the other groups were subjected to ligation of the left coronary artery combined with exhaustive swimming and starvation for the modeling of heart failure after myocardial infarction. After the successful modeling, the rats in the tolvaptan ($1.35 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) and Bushen Huoxue prescription ($15.75 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) groups were treated with corresponding drugs, and those in the sham surgery and model groups were treated with an equal volume of normal saline for 4 weeks. Color doppler echocardiography was employed to measure changes of the left ventricular structure and function in rats. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was employed to measure the serum level of N-terminal pro-B-type natriuretic peptide (NT-proBNP). Hematoxylin-eosin (HE) staining was conducted to reveal the pathological changes in the myocardial tissue. Western blotting was employed to measure the protein levels of AVP, AQP1, and AQP4 in the brain tissue and AQP1, AQP4, and AQP7 in the myocardial tissue. Real-time fluorescence quantitative PCR was conducted to determine the mRNA levels of AVP, AQP1, and AQP4 in the brain tissue and AQP1, AQP4, and AQP7 in the myocardial tissue. **Result:** Compared with the sham surgery group, the model group showed increased left ventricular internal diameter (LVID) ($P<0.01$), decreased ejection fraction (EF) and short axis fractional shortening rate (FS) ($P<0.01$), increased left ventricular septal and posterior wall thicknesses (LVS and LVPW) ($P<0.01$), elevated serum NT-proBNP level ($P<0.01$), edema and vacuolar degeneration of nerve cells in the brain tissue, necrosis of myocardial cells and rupture of myocardial fibers in the infarcted area, and upregulated mRNA and protein levels of AVP, AQP1, and AQP4 in the brain tissue ($P<0.01$) and AQP1, AQP4, and AQP7 in the myocardial tissue ($P<0.01$). Compared with the model group, tolvaptan and Bushen Huoxue prescription restored LVID, EF, FS, LVS, and LVPW ($P<0.05$, $P<0.01$), lowered the serum NT-proBNP level ($P<0.05$), alleviated the edema of nerve cells in the brain tissue, improved the arrangement of myocardial fibers, mitigated the necrosis of myocardial cells, and downregulated the mRNA and protein levels of AVP, AQP1, and AQP4 in the brain tissue ($P<0.01$) and AQP1, AQP4, and AQP7 in the myocardial tissue ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion:** Bushen Huoxue prescription can regulate cardiovascular and cerebrovascular fluid metabolism disorders, delay ventricular remodeling, and improve the cardiac function by downregulating the expression of AVP, AQP1, and AQP4 in the brain tissue and AQP1, AQP4, and AQP7 in the myocardial tissue in the rat model of heart failure after myocardial infarction.

[Keywords] heart failure; Bushen Huoxue prescription; aquaporins; cardiac function; ventricular remodeling

慢性心力衰竭(简称心衰)是各种心脏疾病因各种原因加重后,逐渐形成的慢性复杂临床综合征,是大多心脏疾病最终死亡原因,具有发病率高、生存率低的疾病特点,给社会造成了巨大的经济负担,是心血管领域亟待解决的医学难题^[1]。在心力衰竭心肌重构的病理发展过程中,随着全身的血流动力学障碍,往往造成脑灌注的失常及全身的体液代谢障碍,长期进展下,形成心脑血管双向病理障碍,甚至发展为心脑血管综合征,因此在临床中常常需要对患者进行心脑血管同治同调^[2]。精氨酸加压素(AVP)主要合成于下丘脑视上核和室旁核的神经元细胞体^[3],在脑垂体后叶中储存,是一种加重心肌重构的代表性神经内分泌介质,也是心衰过程中引起水钠潴留

的关键物质,如由AVP引起肾脏水通道蛋白(AQP)2异常表达而导致的心衰后水液代谢障碍已引起学界广泛的研究^[4]。AQPs是一类生物膜通道蛋白,生物膜透水性的变化调节与其关系密切,可以介导水的跨膜转运,是在机体水代谢稳态调控中的关键生物分子^[5]。AQPs广泛表达于哺乳动物的心肌及脑组织当中,且参与调控组织中的水代谢和离子平衡^[6],与组织水肿密切相关,因此其可能是治疗心衰水液代谢障碍及心脑血管同治的潜在作用机制^[7]。补肾活血方是张艳教授临床治疗心衰的经验方^[8],是从脑-心-肾轴的中医整体观念出发^[9],聚焦于三者之间神-气-血的互通互用的生理病理联系,通过补肾活血法来达到心脑血管同治的目的,临床中调治因慢

性心衰而出现的心脑双向病理症状时,常在此基础上进行辨证论治,疗效明显^[10]。基于此,为了进一步对其疗效机制进行探索,课题组认为补肾活血方治疗此类患者的过程,可能与脑组织及心肌组织蛋白调控相关,因此希望能够通过实验研究来明确其作用靶点,寻找其微观依据。

1 材料

1.1 动物 健康雄性SD大鼠60只,体质量(200±20)g,于辽宁中医药大学动物实验中心适应性饲养1周,室温20~25℃,相对湿度(50±20)%,12h/12h明暗周期,期间常规摄食,动物合格证号SCXK(辽)2020-0001,本实验经辽宁中医药大学伦理委员会审批,批号21000042022076。

1.2 药物 补肾活血方组成:黄芪40g、人参10g、菟丝子20g、益母草20g、黄精20g、龟板胶15g、红花15g、丹参10g、三七粉5g,购自辽宁中医药大学附属医院,饮片由该院主任中药师李亚秋完成鉴定,煎煮制备为质量浓度1.575g·mL⁻¹药液。托伐普坦片:浙江大冢制药有限公司,批号211107S,配制为质量浓度0.135g·L⁻¹溶液。

1.3 试剂 N末端B型利钠肽前体(NT-proBNP)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(上海酶联生物公司,批号ml003243-C),苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(碧云天生物技术有限公司,批号C0105),RNA提取(TransZol)试剂盒、反转录试剂盒、实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒(北京全式金生物技术公司,货号分别为ET111、AU341、AQ211),AVP抗体、 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(美国Affinity公司,货号分别为DF14629、AF7018),AQP1抗体、AQP4抗体(英国Abcam公司,货号分别为ab168387、ab259318),AQP7抗体(中国Servicebio公司,货号GB113079-100),羊抗兔(IgG)(北京博奥森公司,货号SP-0023)。

1.4 仪器 Vivid 7 Dimension型彩色多普勒超声机(美国通用电气公司),Roche型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)扩增仪(德国Rouche Diagnostics GmbH公司),Multiskan MK3型酶标仪(美国Thermo公司),JY300C型蛋白电泳仪、1704150型转膜仪(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 造模方法^[11] 先将大鼠进行1周适应性喂养,其间常规饮食饮水,结束后将其进行随机分组为假手术组(15只),手术组(45只)。术前12h禁食不禁水处理,3%戊巴比妥钠(50mg·kg⁻¹)腹腔注射麻醉,

待麻醉成功后于小动物手术台提前进行备皮处理,备皮后行气管插管,其间同时进行心电检测。大鼠呼吸基本保持平稳后,心前区充分碘伏消毒,切开皮肤后应用器械分离肌肉及胸膜,直到心脏充分暴露,挤压并托举心脏,找到左冠状动脉前降支处,结扎处理。结扎成功后对大鼠心前区进行逐层缝合,并注意抗感染处理。假手术组只挂线不结扎,其余步骤不变。观察术后大鼠心电变化,当ST段抬高 ≥ 0.1 mV时,表示急性心肌梗死发生^[12]。待大鼠呼吸稳定后撤离呼吸机,对存活大鼠腹腔注射青霉素6万单位,持续5d,以防止因伤口感染而大鼠意外死亡。术后大鼠进行分笼、禁食1d处理。禁食1d结束后,逐步添加饲料至正常组一半喂养量,待伤口基本愈合后,每日进行力竭式游泳1~2次持续28d。力竭式游泳结束后对存活大鼠进行心脏彩超检测,成模标准为左心室射血分数(EF)<45%。

2.2 分组及给药 术后模型判定成功大鼠共26只,采用随机分组法,分组为模型组9只、托伐普坦组8只、补肾活血组9只,假手术组大鼠存活12只。通过人鼠等效剂量换算^[13],托伐普坦组给予托伐普坦溶液1.35mg·kg⁻¹灌胃,补肾活血组给予补肾活血方药液15.75g·kg⁻¹灌胃(前期研究证实此等效剂量效果最佳,故不区分高、中、低剂量组^[11]),假手术组和模型组进行等体积生理盐水灌胃,共28d。

2.3 彩色多普勒心动超声测定大鼠左心室结构及功能变化 药物灌胃结束后,采用3%戊巴比妥钠(50mg·kg⁻¹)腹腔注射的方式麻醉大鼠,心前区脱毛备皮处理,进行心动超声检测,观察各组大鼠左心室的收缩末内径(ESD)、舒张末内径(EDD)、EF、短轴缩短率(FS)的变化,观察左心室收缩/舒张末期室间隔厚度(LVSs/LVSd)、收缩/舒张末期后壁厚度(LVPWs/LVPWd)的变化。

2.4 ELISA检测血清NT-proBNP含量 腹主动脉取血后4℃、3000r·min⁻¹离心5min(离心半径2.5cm,下同)以分离血清。按ELISA试剂盒操作测定血清NT-proBNP含量。

2.5 HE染色观察大鼠脑组织、心肌组织形态 取大鼠脑组织与心脏组织置于4%多聚甲醛溶液固定,按步骤进行脱水、石蜡包埋、切片、HE染色,对脑组织与心肌组织病理形态变化进行对比观察。

2.6 Real-time PCR检测脑组织AVP、AQP1、AQP4 mRNA及心肌组织AQP1、AQP4、AQP7 mRNA表达水平 取脑组织及心肌组织各100mg,

采用RNA提取试剂盒抽提总RNA;微量分光光度计测定其纯度及浓度;应用反转录试剂盒,以RNA为模板配制反应体系,条件为45℃孵育20 min,85℃加热5 s,反转录为cDNA;以cDNA为模板, β -actin为内参引物进行PCR扩增,扩增条件为94℃预变性30 s,反应循环(94℃变性5 s,60℃退火15 s,72℃延伸10 s),45个循环,按照 $2^{\Delta\Delta C_t}$ 法进行定量分析,PCR引物由生工生物工程(上海)有限公司设计合成,引物序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
AVP	上游 CATGATGCTCAACACTACGCTCTC	24
	下游 CCTCCTCTTGGGCAGTTCTGG	21
AQP1	上游 ATTGGCTTGTCTGTGGCTCTTGG	23
	下游 TGGTTTGAGAAGTTGCGGGTGAG	23
AQP4	上游 GAAGGCGGTCACAGCAGAGTTC	22
	下游 AGTCCAAAGCAGAGGGAGATGAGG	24
AQP7	上游 GCAGGTGGAGAAGTGTGGTGAC	23
	下游 AACTTGTCCGTGATGGCGAAGATAC	25
β -actin	上游 CCTGGCACCCAGCACAAT	18
	下游 GGGCCGGACTCGTCATAC	18

2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测脑组织AVP、AQP1、AQP4及心肌组织AQP1、AQP4、AQP7蛋白表达水平 心肌和脑组织置于组织破碎机中破碎,匀浆后4℃、12 000 r·min⁻¹离心15 min,取上清液,检测蛋白浓度,采用等体积等质量法计算后将其重新配制,配制后进行蛋白变性,将脑组织和心肌蛋白样品、Marker加入电泳槽中电泳1~1.5 h。

表2 补肾活血方对大鼠左心室结构及功能变化的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 2 Effect of Bushen Huoxue prescription on changes in left ventricular structure and function in rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ESD/mm	EDD/mm	EF/%	FS/%
假手术组		3.6±0.02	4.7±0.03	68.26±1.94	39.71±5.25
模型组		5.8±0.03 ¹⁾	6.5±0.05 ¹⁾	37.77±2.04 ¹⁾	21.17±4.10 ¹⁾
托伐普坦组	1.35×10 ⁻³	4.1±0.02 ³⁾	5.0±0.02 ²⁾	61.64±1.39 ³⁾	35.88±1.64 ²⁾
补肾活血组	15.75	4.0±0.03 ³⁾	4.8±0.08 ²⁾	59.31±3.40 ³⁾	36.68±3.51 ³⁾
组别	剂量/g·kg ⁻¹	LVSs/mm	LVSd/mm	LVPWs/mm	LVPWd/mm
假手术组		2.63±0.21	1.90±0.10	2.57±0.45	2.23±0.15
模型组		3.37±0.15 ¹⁾	2.57±0.06 ¹⁾	3.70±0.10 ¹⁾	2.93±0.15 ¹⁾
托伐普坦组	1.35×10 ⁻³	2.87±0.15 ²⁾	2.20±0.10 ²⁾	2.87±0.15 ²⁾	2.17±0.12 ²⁾
补肾活血组	15.75	3.10±0.10	2.23±0.15	2.67±0.17 ²⁾	2.21±0.15 ²⁾

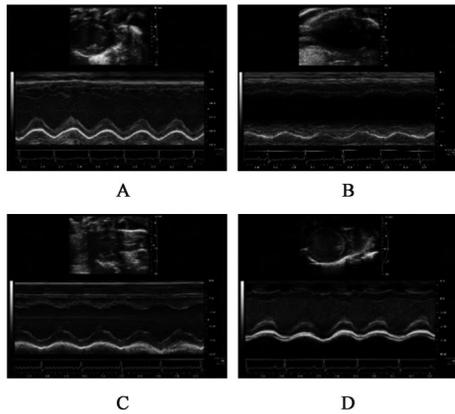
注:与假手术组比较¹⁾P<0.01;与模型组比较²⁾P<0.05,³⁾P<0.01(表3-表5同)

将胶取出,将电泳蛋白印记转印至PVDF膜上,进行电转60~90 min,将PVDF膜放置于5%脱脂奶粉中封闭2 h。用TBST稀释液洗膜,将内参蛋白(β -actin 1:5 000)及目的蛋白(AQP1 1:2 000、AQP4 1:1 000、AQP7 1:500、AVP 1:1 000)分别按比例进行稀释,将PVDF膜置于抗体中4℃孵育过夜。次日,回收抗体后,将PVDF膜用TBST稀释液清洗,将PVDF膜放入二抗(1:5 000)中室温孵育1 h。洗膜,滴加显色液曝光成像,用Image J1.8.0软件分析条带灰度值,以计算脑组织与心肌组织中AVP、AQPs的相对表达量。

2.8 统计学方法 采用SPSS 26.0统计软件进行分析。实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。如符合正态分布,多个样本均数比较采用单因素方差分析,两两比较采用最小显著性差异法(LSD)-*t*检验,若组间方差不齐,使用Dunnett *T*3检验,以P<0.05表示组间差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠左心室结构及功能变化的影响 与假手术组比较,模型组大鼠左心室ESD、EDD显著增加(P<0.01),左心室EF、FS显著减少(P<0.01),LVSs、LVSd、LVPWs、LVPWd显著增厚(P<0.01);与模型组比较,托伐普坦组左心室ESD显著减少(P<0.01),左心室EDD明显减少(P<0.05),EF显著增加(P<0.01),左心室FS明显增加(P<0.05),LVSs、LVSd、LVPWs、LVPWd厚度明显下降(P<0.05);与模型组比较,补肾活血组左心室ESD显著减少(P<0.01),左心室EDD明显减少(P<0.05),EF、FS显著上升(P<0.01),LVPWs、LVPWd明显减少(P<0.05)。见表2、图1。



注:A.假手术组;B.模型组;C.托伐普坦组;D.补肾活血组(图2-图4同)

图1 补肾活血方对大鼠左心室结构及功能变化的影响

Fig. 1 Effect of Bushen Huoxue prescription on changes in left ventricular structure and function in rats

3.2 对大鼠血清 NT-proBNP 含量的影响 与假手术组比较,模型组血清 NT-proBNP 含量显著增加 ($P<0.01$);与模型组比较,托伐普坦组与补肾活血组血清 NT-proBNP 含量明显减少 ($P<0.05$)。见表3。

3.3 对大鼠脑组织及心肌组织病理学的影响 假手术组大鼠脑组织神经细胞形态规则完整,排列整齐;模型组大鼠脑组织间质较疏松,排列较紊乱,部

表3 补肾活血方对大鼠血清 NT-proBNP 含量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effect of Bushen Huoxue prescription on content of NT-proBNP in serum of rats ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	NT-proBNP/pg·mL ⁻¹
假手术组		17.50±2.09
模型组		27.98±1.78 ¹⁾
托伐普坦组	1.35×10 ⁻³	22.89±1.76 ²⁾
补肾活血组	15.75	22.01±1.38 ²⁾

分血管出现水肿,内皮细胞肿胀,神经细胞发生固缩、深染及水肿;经托伐普坦、补肾活血方治疗后,大鼠脑组织神经细胞和血管水肿状况较模型组有所改善,细胞排列更整齐,形态正常细胞密度更高。假手术组大鼠心肌结构基本正常,细胞整齐规则,没有观察到明显的肌原纤维破坏;模型组大鼠梗死区则有明显的心肌结构变化,心肌细胞排列不规则,观察到明显的肌原纤维断裂,大量心肌间质成分出现改变,细胞核有坏死现象发生;经托伐普坦、补肾活血方治疗后的大鼠,心肌组织同样观察到心肌细胞排列的紊乱,但相较模型组有所改善,细胞排列较整齐,细胞核与肌原纤维的病变相较模型组也有明显好转。见图2。

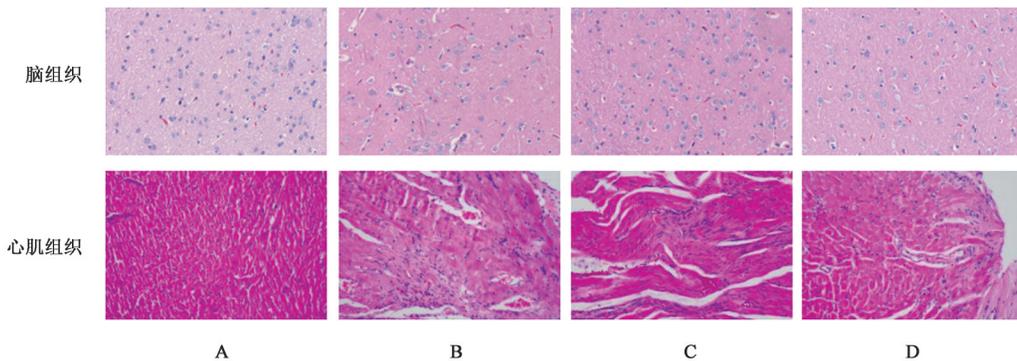


图2 各组大鼠脑组织及心肌组织形态 (HE, ×200)

Fig. 2 Effect of Bushen Huoxue prescription on pathology of brain and myocardial tissues in rats (HE, ×200)

3.4 对大鼠脑组织 AVP、AQP1、AQP4 mRNA 及蛋白表达的影响 与假手术组比较,模型组大鼠脑组织 AVP、AQP1、AQP4 mRNA 及蛋白表达均显著升

高 ($P<0.01$);与模型组比较,托伐普坦组和补肾活血组大鼠脑组织 AVP、AQP1、AQP4 mRNA 及蛋白表达显著降低 ($P<0.01$)。见表4、图3。

表4 补肾活血方对大鼠脑组织 AVP、AQP1、AQP4 mRNA 及蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of Bushen Huoxue prescription on mRNA and protein expression of AVP, AQP1 and AQP4 in rat brain tissue ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	AVP mRNA	AQP1 mRNA	AQP4 mRNA	AVP/ β -actin	AQP1/ β -actin	AQP4/ β -actin
假手术组		1.03±0.32	1.02±0.06	1.06±0.04	0.35±0.02	0.72±0.04	0.43±0.04
模型组		3.09±0.35 ¹⁾	4.56±0.33 ¹⁾	3.39±0.83 ¹⁾	0.91±0.02 ¹⁾	0.92±0.03 ¹⁾	0.77±0.03 ¹⁾
托伐普坦组	1.35×10 ⁻³	1.29±0.05 ³⁾	1.93±0.06 ³⁾	1.07±0.52 ³⁾	0.75±0.02 ³⁾	0.76±0.03 ³⁾	0.54±0.02 ³⁾
补肾活血组	15.75	0.93±0.19 ³⁾	1.85±0.57 ³⁾	1.47±0.42 ³⁾	0.74±0.02 ³⁾	0.53±0.04 ³⁾	0.46±0.03 ³⁾

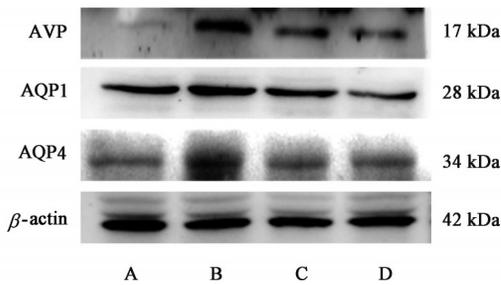


图3 各组大鼠脑组织AVP、AQP1、AQP4蛋白表达电泳
Fig. 3 Electrophoresis of AVP, AQP1 and AQP4 protein expression in brain tissues of rats in each group

3.5 对大鼠心肌组织AQP1、AQP4、AQP7 mRNA及蛋白表达的影响 与假手术组比较,模型组大鼠心肌组织AQP1、AQP4、AQP7 mRNA及蛋白表达均显著升高($P<0.01$);与模型组比较,托伐普坦组大鼠

心肌组织AQP1、AQP4、AQP7 mRNA表达及AQP4、AQP7蛋白表达显著降低($P<0.01$),AQP1蛋白表达明显降低($P<0.05$);补肾活血组大鼠心肌组织AQP1、AQP4、AQP7 mRNA及蛋白表达均显著降低($P<0.01$)。见图4、表5。

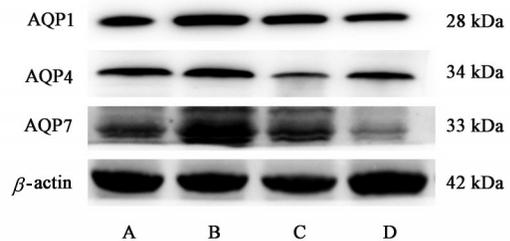


图4 各组大鼠心肌组织AQP1、AQP4、AQP7蛋白表达电泳
Fig. 4 Electrophoresis of protein expression of AQP1, AQP4 and AQP7 in myocardial tissue of rats in each group

表5 补肾活血方对大鼠心肌组织AQP1、AQP4、AQP7 mRNA及蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of Bushen Huoxue prescription on mRNA and protein expression of AQP1, AQP4, and AQP7 in rat myocardial tissue ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	AQP1 mRNA	AQP4 mRNA	AQP7 mRNA	AQP1/ β -actin	AQP4/ β -actin	AQP7/ β -actin
假手术组		1.01±0.20	1.06±0.07	1.06±0.07	0.62±0.18	0.90±0.13	0.71±0.20
模型组		2.99±0.38 ¹⁾	3.92±1.08 ¹⁾	7.07±0.56 ¹⁾	1.35±0.01 ¹⁾	1.20±0.01 ¹⁾	1.17±0.01 ¹⁾
托伐普坦组	1.35×10 ⁻³	1.30±0.11 ³⁾	1.60±0.33 ³⁾	1.92±0.39 ³⁾	0.98±0.06 ²⁾	0.58±0.01 ³⁾	0.55±0.03 ³⁾
补肾活血组	15.75	1.57±0.24 ³⁾	1.52±0.21 ³⁾	1.89±0.85 ³⁾	0.69±0.01 ³⁾	0.68±0.02 ³⁾	0.42±0.02 ³⁾

4 讨论

对于慢性心衰的认识,经历了从器官到细胞,从局部到整体的发展过程,其病理生理改变引起的体液滞留问题一直是主要探讨的问题之一,亦是临床中治疗的主要方向。不管是泵功能障碍还是神经内分泌的过度激活,血流动力学的异常改变都是引起心肌重构的主要病理学基础,而血流动力学的改变引起脑灌注的失常,使得心衰患者常常出现多器官多功能障碍,尤其是心脑双向的疾病表现^[14]。辽宁中医药大学张艳教授团队在临床观察中发现,慢性心力衰竭的患者临床发病中往往伴随着眩晕泛恶、头痛失眠、健忘神衰等心脑症状与疾病,考虑到整体的水液平衡与离子紊乱^[11],因此张艳教授在临床诊疗中,对慢性心衰伴随着脑血管病相关临床症状的患者,多强调从中医理论出发探索二者之间的联系“神明之体藏于脑,神明之用发于心”“注重心脑同治”^[10],兼顾多病共存状态下的病因病机。中医藏象阶层网络下,脑-心-肾轴是其中关键的机能轴,在中医整体观念的认识中,脑-心-肾三者之间具有髓-血-精互通互化的物质沟通基础,得以紧密联系在一起,因此张艳教授面对这类患者,采用补

肾活血方以达到心脑同治的目的。该方中黄精、菟丝子、龟板胶可补肾固精,丹参、红花、三七合用以活血化瘀,通利血脉,人参配伍黄芪,补益元气,益母草与黄芪补气利尿,诸药合用补肾活血,以气行水,改善整体水液障碍来发挥心脑同治的作用^[13]。研究团队已在前期研究中证实补肾活血方可以调控肾脏AQP2^[12]、心肌及结肠AQP4^[15]影响大鼠水液代谢的障碍。在此基础上,本研究希望能够通过研究该方对心肌梗死后心衰大鼠脑组织、心肌组织AVP、AQPs相关蛋白及mRNA表达的影响,进一步探索其可能的疗效机制。

AVP又被称为抗利尿激素,主要合成及储存于脑垂体后叶当中。可以通过中间受体来调控机体水通道蛋白,来促进水的重吸收^[16]。AVP作为一种神经内分泌介质,在慢性心衰发生过程中,被认为是引起水钠滞留的关键物质,因此对于AVP系统的研究是探究慢性心衰水液代谢障碍的关键点之一。AQPs是心肌细胞中水分子进行跨膜转运的主要方式之一,负责调节心肌组织的水液代谢平衡^[17]。因此当出现心肌水液平衡紊乱发生时,常常涉及到心肌AQPs的机制调节^[18],而在脑组织中,水的物质占

比达70%,水通道蛋白调控脑内物质的跨膜转运,与脑细胞内外环境间的平衡密切联系^[19]。AQP1在心肌组织中主要表达于心肌细胞膜及微血管内皮细胞^[20]。AQP1转运水量在心肌AQPs运输总水量比例中约占25%左右^[21]。心肌细胞水液代谢紊乱的病理生理过程,如心肌梗死后缺血再灌注等导致的一系列变化当中,均涉及到AQP1的调节^[22]。AQP1在脑组织中主要参与脑脊液的形成,平衡其内外水及离子的变化^[23]。有研究表明,因缺血造成的脑水肿大鼠模型中AQP1的表达显著升高,且利用中药活血利水法可以明显改善其异常表达^[24]。目前有学者认为,AQP1的调节可能与颈上神经节/环鸟苷酸信号通路或缺氧诱导因子-1 α 等机制有关^[25]。AQP4是哺乳动物脑内最重要的水通道蛋白,存在于星形胶质细胞足突、胶质界膜及室管膜细胞与室管膜下星形胶质细胞之间^[26]。有证据表明AQP4与心肌水肿的发生具有着强相关性^[27],其调节机制可能与TRPV4等机制有关^[28]。AQP7在心肌细胞中可以参与细胞能量代谢,在心脏中的表达量低于AQP1和AQP4,同时可以作为分子转运通道转运水、尿素、甘油、嘌呤等^[29]。在心肌组织中,目前发现只有AQP7可以作为转运甘油的通道,其提供三磷酸腺苷能量底物,与心肌的能量代谢有关^[30]。因此当AQP7表达下调,导致心脏能量下降,心肌功能受影响。心力衰竭中,心肌能量的不足后水液平衡紊乱,心肌也出现水肿^[31]。AQP7上调后,可能会增加水渗透性加重心肌水肿^[32]。

本实验通过结扎大鼠左冠状动脉诱导心肌梗死后慢性心力衰竭法,是目前冠状动脉结扎法造成急性心肌缺血模型中最为常用的方法^[33]。托伐普坦是一种口服活性的非肽类特异性V₂RA,属于新型排水利尿剂,可调节水钠代谢^[34],本研究将其作为西药对照药物。NT-proBNP不仅反映心室容量负荷,还可以反映心室的压力变化^[35]。上述,用药后发现补肾活血方具有改善心室结构、心功能的作用,与前期研究结果一致^[8,36]。本研究结果显示,当慢性心力衰竭发生时,模型组大鼠脑组织出现细胞水肿、细胞肿胀等形态学变化,可能是其脑功能出现变化的病理基础,补肾活血方用药后可以一定程度上改善脑组织病理变化,且模型组AVP、AQP1、AQP4表达均显著升高,应用补肾活血方干预后大鼠脑组织AVP、AQP1、AQP4表达降低,表明补肾活血方可以起到干预大鼠脑细胞水液平衡的作用;模型组大鼠心肌组织AQP1、AQP4、AQP7表达

上调,分别应用补肾活血方干预后,大鼠心肌组织AQP1、AQP4、AQP7表达下调,其中AQP4蛋白表达变化与前期研究结果一致^[15],表明补肾活血方可通过调节心肌组织相关AQPs影响其水液平衡变化。

综上所述,AQPs在大鼠脑组织及心肌组织中均有着广泛的表达,且与心脑血管组织的水液平衡关系密切,而AVP作为慢性心衰水钠潴留发生过程中的重要物质,表达可能与AQPs蛋白的调控具有一定的关系,因此生理上心脑二者的水液代谢可能具有一定的相关性,而在慢性心衰后出现水液代谢障碍时,从AVP、AQPs表达变化来看,心脑双方均有不同程度水液代谢病理改变,这或许是临床中慢性心衰患者出现心脑双向病理症状及病理相关性的微观基础之一,也可能是从中医整体观念出发的心脑互用互损理论,与现代医学结合,相互印证的一个方向。通过补肾活血复方的干预以调控慢性心衰大鼠心肌及脑组织AVP、AQPs来改善对应靶器官的水液转运及能量变化,证明了治疗过程中心脑同调的重要性。心脑之间的生理病理关系密切,但机制复杂,心脑AVP、AQPs之间和各自具体的调节通路尚不完全清晰,在此基础上,如何深度明晰中医药临床中脑心同治同调同防的生理机制,多样化中医药对心脑双向病理障碍的防治方案是研究的重点,亟待进一步研究探索。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] MURPHY S P, IBRAHIM N E, JANUZZI J L. Heart failure with reduced ejection fraction: A review [J]. JAMA, 2020, 324(5):488.
- [2] 万海同. 论缺血性心脑血管病的心脑互损病变与脑心同治的中医整体辨治观[J]. 中医杂志, 2022, 63(23):2223-2226.
- [3] HAGIWARA D, TOCHYIA M, AZUMA Y, et al. Arginine vasopressin-venus reporter mice as a tool for studying magnocellular arginine vasopressin neurons [J]. Peptides, 2021, 139(3/4):170517.
- [4] 屈培荣, 胡骏, 刘兰椿, 等. 基于“心肾相关”探讨水通道蛋白在心衰中的作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(10):216-223.
- [5] CALAMITA G. Advances in aquaporins [J]. Cells, 2023, 12(2):303.
- [6] 王沐晨, 单思, 刘红宁. 水通道蛋白与“肾主水”理论的关系探析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(18):205-212.
- [7] 何晓腾, 张艳, 张伟, 等. 基于“肾藏精主水”理论探析

- 慢性心衰与水通道蛋白的相关性[J]. 实用中医内科杂志, 2024, 38(3): 19-21.
- [8] 许瑞, 张艳, 何佳, 等. 补肾活血组方对心肌梗死后心衰大鼠心肌组织 β -catenin、Dvl1 蛋白及 Axin2、Cyclin D1、KV4. 3mRNA 的影响[J]. 中华中医药学刊, 2023, 41(2): 132-136.
- [9] 迟楠, 张艳. 基于“心-脑-肾轴”理论的慢性心力衰竭防治[J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(6): 2953-2955.
- [10] 张艳, 任建歌, 廖佳丹, 等. 基于“心主血脉”谈心脑同治[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2012, 10(11): 1378-1379.
- [11] 许瑞, 张艳, 何佳, 等. 补肾活血复方对慢性心衰大鼠肠道水液代谢与结肠 NF- κ B 及紧密连接蛋白 Occludin 的相关性影响[J]. 时珍国医国药, 2023, 34(2): 265-269.
- [12] 孔繁达, 张艳, 朱爱松等. 补肾活血方对慢性心力衰竭大鼠心功能及肾组织水通道蛋白 2 的影响[J]. 中医杂志, 2019, 60(6): 522-526.
- [13] 陈奇. 中药药理研究方法[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 1103.
- [14] 常梦丽, 许静, 张方博, 等. 脑心互损病理机制研究及中医药防治进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(12): 216-225.
- [15] 许瑞, 张艳, 何佳, 等. 补肾活血复方对心肌梗死后心力衰竭大鼠心室重构及心肌和结肠组织 AQP4 表达的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2023, 30(7): 81-87.
- [16] CHOU C L, YIP K P, MICHEA L, et al. Regulation of aquaporin-2 trafficking by vasopressin in the renal collecting duct [J]. J Biol Chem, 2000, 275 (47) : 36839-36846.
- [17] NIELSEN S, KWON T H, FRØKIAER J, et al. Regulation and dysregulation of aquaporins in water balance disorders[J]. J Intern Med, 2007, 261(1): 53-64.
- [18] 汪庆玲, 谭春江. 心脏水通道蛋白 1、4、7 参与心肌水液代谢的病理生理研究进展[J]. 岭南心血管病杂志, 2020, 26(3): 365-368.
- [19] FILIPPIDIS A S, CAROZZA R B, REKATE H L. Aquaporins in brain edema and neuropathological conditions[J]. Inter J Mol Sci, 2017, 18(1): 55.
- [20] DING F B, YAN Y M, HUANG J B, et al. The involvement of AQP1 in heart oedema induced by global myocardial ischemia[J]. Cell Biochem Funct, 2013, 31(1): 60-4.
- [21] RUTKOVSKIY A, VALEN G, VAAGE J. Cardiac aquaporins[J]. Basic Res Cardiol, 2013, 108(6): 393.
- [22] 李楠楠, 石月萍. 加减枳实薤白桂枝汤通过 AC/cAMP 通路对缺血再灌注大鼠心肌组织水通道蛋白表达的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2018, 26(3): 237-244.
- [23] CLÉMENT T, RODRIGUEZ-GRANDE B, BADAUT J. Aquaporins in brain edema[J]. Neurosci Res, 2020, 98(1): 9-18.
- [24] 何玲, 王键, 胡建鹏. 活水利水法对大鼠缺血性脑水肿脑组织内 AQP1 和 AQP9 表达的影响[J]. 中国中医急症, 2011, 20(4): 580-581.
- [25] TIE L, WANG D, SHI Y, et al. Aquaporins in cardiovascular system[J]. Advan Exp Med Biol, 2017 (969): 969.
- [26] 刘健锋, 丁艳平, 王建林, 等. 脑水通道蛋白的分布、功能及调控机制[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(2): 314-321.
- [27] WARTH A, ECKEL T, KÖ O, et al. Upregulation of the water channel aquaporin-4 as a potential cause of postischemic cell swelling in a murine model of myocardial infarction[J]. Cardiology, 2006, 107(4): 402-410.
- [28] FAROPOULOS K, POLIA A, TSAKONA C, et al. Correction to: Evaluation of AQP4/TRPV4 channel co-expression, microvessel density, and its association with peritumoral brain edema in intracranial meningiomas[J]. J Mol Neurosci, 2022, 72(3): 677.
- [29] MAEDA N. Implications of aquaporin 7 and 9 in glycerol metabolism and metabolic syndrome [J]. Molecular Aspects of Medicine, 2012, 33(5/6): 665-675.
- [30] IENA F M, LEBECK J. Implications of aquaglyceroporin 7 in energy metabolism [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(1).
- [31] HIBUSE T, MAEDA N, NAKATSUJI H, et al. The heart requires glycerol as an energy substrate through aquaporin 7, a glycerol facilitator [J]. Cardiovasc Res, 2009, 83(1): 34-41.
- [32] TAN C, ZENG J, WU G, et al. Xinsuitong capsule extract attenuates doxorubicin-induced myocardial edema via regulation of cardiac aquaporins in the chronic heart failure rats [J]. Biomed Pharmacother, 2021, 144: 112261.
- [33] 沈明, 郭志福, 鲍礼智, 等. 大鼠心梗后心衰模型的制备及心功能评价[J]. 实验动物科学, 2017, 34(2): 66-70.
- [34] MIYAZAKI T, FUJIKI H, YAMAMURA Y. Tolvaptan, an orally active non-peptide arginine vasopressin V2 receptor antagonist, reduces ascites in rats with chronic liver injury[J]. Hepatol Res, 2013, 43(11): 1224-1230.
- [35] SAFLEY D M, MCCULLOUGH P A. The emerging role of brain natriuretic peptide in the management of acute and chronic heart failure in outpatients[J]. Heart Fail Monit, 2003, 4(1): 13-20.
- [36] 吴俊鹏, 张艳, 张伟. 补肾活血组方对慢性心力衰竭大鼠 Wnt5a/CaMK II 信号通路调控及心肌重构的影响[J]. 时珍国医国药, 2023, 34(4): 774-777.

[责任编辑 张丰丰]