

## • 实验研究 •

## 参附强心丸增强 PRR/AQP2 的表达对大鼠心肾综合征的影响

李 旭, 郝 迪, 王 梓, 王 蕾\*

天津市医药科学研究所, 天津 300020

**摘要:** **目的** 探讨参附强心丸对心肾综合征模型大鼠心、肾、脑组织中肾素原受体 (PRR) /水通道蛋白 (AQP2) 表达的相互影响, 为其治疗心肾综合征提供可能的作用机制。 **方法** 采用腹主动脉缩窄合并肾脏急性缺血再灌注的方法建立心肾综合征大鼠模型, 除假手术组外, 术后 8 周将模型大鼠随机分为 4 组: 模型组、柄区肽 10 mg/kg 组、参附强心丸 13.2 g 生药/kg 和 6.6 g 生药/kg 组。检测血清中肌酐 (Cr)、尿素氮 (BUN) 和总三碘甲状腺原氨酸 (T3)、总甲状腺激素 (T4)、甲状腺刺激激素 (TSH); 并计算心室指数和左肾指数; 采用免疫荧光检测心、肾及下丘脑中 PRR、AQP2 蛋白的表达。 **结果** 与模型组比较, 参附强心丸 13.2 g/kg 组的 Cr、BUN 水平均明显降低 ( $P < 0.01$ ), T3 水平增加显著 ( $P < 0.01$ ), 大鼠全心指数、心室指数均显著减小 ( $P < 0.01$ ), 心室肌、肾脏 PRR 表达明显增强。 **结论** 参附强心丸不仅能改善心肌和肾脏功能, 还可升高甲状腺系统的激素分泌水平, 从而延缓心肾衰竭终端病变进程, 并证实了该药调控 PRR 与 AQP2 在下丘脑中同位点的共表达特点, 对心肾综合征治疗机制研究具有重要意义。

**关键词:** 参附强心丸; 心肾综合征; 肾素原受体; 水通道蛋白; 下丘脑

**中图分类号:** R285.5

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1674-5515(2020)04-0631-05

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-5515.2020.04.006

## Effects of Shenfu Qiangxin Pills on rats with cardiorenal syndrome by enhancing the expression of PRR/AQP2

LI Xu, HAO Di, WANG Zi, WANG Lei

Tianjin Institute of Medical and Pharmaceutical Sciences, Tianjin 300020, China

**Abstract:** **Objective** To investigate the effect of Shenfu Qiangxin Pills in regulating the expression of renin proreceptor (PRR) and water channel protein (AQP2) in rats with cardiorenal syndrome, so as to provide a basis for further elucidation of the mechanism. **Methods** Rat model of cardiorenal syndrome was induced by abdominal aortic coarctation with acute renal ischemia reperfusion. After operation, except the sham operation group, the rats with cardiorenal syndrome were randomly divided into four groups: model group, Shenfu Qiangxin Pills 13.2 and 6.6 g crude drug/kg groups, and handle region peptide 10 mg/kg group. Cr, BUN, T3, T4, and TSH in serum were detected. The ventricular index and left kidney index were calculated. The expressions of PRR and AQP2 proteins in heart, kidney, and hypothalamus were detected by immunofluorescence. **Results** Compared with the model group, Cr and BUN levels in the Shenfu Qiangxin Pills 13.2 g/kg group were significantly decreased ( $P < 0.01$ ), but T3 level was significantly increased ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, the ventricular index and left kidney index in the Shenfu Qiangxin Pills 13.2 g/kg group were significantly decreased ( $P < 0.01$ ). And PRR expression in ventricular muscle and kidney in the Shenfu Qiangxin Pills 13.2 g/kg group were significantly increased compared with the model group. **Conclusion** Shenfu Qiangxin Pills can not only improve cardiac and renal function, it also increases hormone levels in the thyroid system. It delayed the progression of end-terminal lesions in heart and kidney failure, and confirmed the co-expression of PRR and AQP2 in the hypothalamus, which has important significance for the study of the therapeutic mechanism of cardiorenal syndrome.

**Key words:** Shenfu Qiangxin Pills; cardiorenal syndrome; PRR; AQP2; hypothalamus

收稿日期: 2020-03-12

基金项目: 天津市卫生健康委中医中西医结合科研课题 (2017078)

作者简介: 李 旭, 女, 药理学专业。Tel: (022)27236137 E-mail: 187391856@qq.com

\*通信作者 王 蕾 (1979—), 女, 副研究员, 研究方向为心脑血管药理学。E-mail: zws9905@sina.com

心肾综合征是指其中一个器官心（或肾）发生慢性或急性功能损伤，从而导致另一个器官肾（或心脏）出现慢性或急性功能障碍的一种临床综合征<sup>[1]</sup>。流行病学研究调查显示，约40%慢性肾脏病患者因心血管疾病死亡，而约63%心衰患者存在心肾综合征。如何提高心肾综合征治疗效果、改善患者病情的关键<sup>[2]</sup>。祖国医学在治疗心肾综合征方面主要是结合其中医辨证的“心肾阳虚”病机<sup>[3]</sup>，从补气温阳角度实现对患者的治疗，从而延缓疾病的发展进程<sup>[4]</sup>。针对中医认为心与肾的密切关系。“从肾论治”为研究益气温阳、活血利水治疗中医临床心肾疾病提供了更多的作用靶点和机制<sup>[5]</sup>，本课题组已证实肾素原受体（PRR）的非血管紧张素II依赖环节（即MAPK信号通路磷酸化的使动因素）的生物效应<sup>[6-7]</sup>。而水通道蛋白2（AQP2）是已知调节肾脏水平衡的重要蛋白<sup>[8]</sup>。因此，本研究以腹主动脉缩窄合并肾脏急性缺血再灌注损伤制备心肾综合征大鼠模型。以参附强心丸为干预药物，观察其对心肾综合征大鼠心肾功能的改善作用，并通过其调控下丘脑中肾素原受体（PRR）/水通道蛋白（AQP2）的表达，判断PRR与AQP2在下丘脑中存在的潜在关系是心肾综合征机制研究的目标靶点，为中医益气温阳、活血利水治则研究提供启示。

## 1 材料

### 1.1 仪器

PL203精密电子天平[梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司]；ST360酶标仪（上海科华实验系统有限公司）；1B生物组织包埋机（BMJ）；21351切片机（LEICARM）；B071型显微摄影器材（日本OLYMPUS）；Epgiadients PCR仪（ependorf公司）；ABI7500fast荧光定量PCR仪（Life Technologies公司）。

### 1.2 药品与试剂

参附强心丸粉末（天津市中新药业集团股份有限公司达仁堂制药厂生产的棕褐色粉末，规格每克药粉相当于1g生药，产品批号为zj001；）枳实酮（上海强耀生物，相对分子质量1184.56）；肌酐检测试剂盒（日本积水化学工业株式会社，批号834RAP）；尿素氮检测试剂盒（中生北控生物科技有限公司，批号180881）；总三碘甲状腺原氨酸（T3，西门子，批号004202）；总甲状腺激素（T4，西门子，批号003185）；甲状腺刺激激素（TSH，西门子，批号114317）；Trizo（RNA分离试剂，Invitrogen，货号

15596026）；All-in-One™ First-Strand cDNA Synthesis Kit（逆转录试剂盒，GeneCopoeia，货号AORT-0050）；Platinum®SYBR®Green qPCR SuperMix-UDG（试剂盒染料，Life Technologies公司）。尿蛋白试纸（广州市花都高尔宝生物技术有限公司，规格20条/瓶，批号20170107）。

### 1.3 动物

SD种大鼠，60只，雄性，体质量280~320g，由北京维通利华实验动物技术有限公司提供，试验动物生产许可证号：SCXK（京）2016-0006。购入后动物活动正常，毛发柔顺，饮食、饮水均正常。

## 2 方法

### 2.1 造模、分组与给药

采用腹主动脉缩窄合并肾脏急性缺血再灌注损伤制备心肾综合征大鼠模型<sup>[9]</sup>。大鼠经戊巴比妥钠ip 45 mg/kg麻醉后，行腹部正中切开，沿腹白线进入腹腔，暴露分离左、右侧肾蒂，阻断结扎30 min后，解除阻断，恢复血流，造成急性缺血再灌注损伤。随后暴露分离后腹膜，在左肾动脉上方游离腹主动脉。沿游离腹主动脉长轴置一折弯的7号针头，以3-0的丝线绕腹主动脉后与7号针头一起结扎，随后立即抽出针头，使腹主动脉残留直径为0.7 mm的残腔，造成腹主动脉狭窄。假手术组只分离肌肉、血管，但不缩窄。术后腹腔内滴入青霉素预防感染，分层关闭腹腔。造模8周后，代谢笼收集24 h尿液，采用尿蛋白试纸检测>+；并测定造模动物II导联心电图，以心电图ST段改变作为心肾综合征大鼠模型纳入标准。

除假手术组（ $n=10$ ）外，将造模动物按体质量随机分为4组，分别为模型组（ $n=10$ ）、参附强心丸高剂量组（ $n=10$ ；ig剂量为13.2 g生药/kg，相当于临床用量12倍）、参附强心丸低剂量组（ $n=10$ ；ig剂量为6.6 g生药/kg，相当于临床用量6倍）、枳实酮组（ $n=10$ ；iv剂量为10 mg/kg组）<sup>[10]</sup>。ig体积为10 mL/kg，假手术组和模型组ig同体积饮水。从手术后8周开始给药，1次/d，持续4周。

### 2.2 参附强心丸对大鼠肾功能指标的影响

于末次给药24 h后大鼠经麻醉，腹主动脉取血，3 500 r/min离心10 min，采用苦味酸法测定大鼠血浆中肌酐（Cr）的水平，采用放射免疫法测定大鼠血浆中醛固酮（ALD）的水平。

### 2.3 参附强心丸对大鼠甲状腺功能指标

于末次给药24 h后大鼠经麻醉，腹主动脉取血，

3 500 r/min 离心 10 min, 分别采用化学发光法进行总三碘甲状腺原氨酸 (T3)、总甲状腺激素 (T4)、甲状腺刺激激素 (TSH) 水平。

## 2.4 参附强心丸对大鼠心室和肾脏质量指数的影响

取血完成后, 分别将大鼠心脏及左肾脏取出, 分离心室, 称量心室湿质量、全心湿质量, 左肾脏湿质量, 计算心室指数、全心指数、左侧肾脏指数。计算公式如下:

心室指数 = 心室肌湿质量/体质量

全心指数 = 全心肌湿质量/体质量

左肾指数 = 左肾脏湿质量/体质量

## 2.5 参附强心丸对心脏、肾脏及下丘脑细胞免疫荧光检测结果的影响

取心脏、肾脏及下丘脑相应部位制作成组织切片, 玻片脱蜡至水, 在 PBS 中漂洗 3 次, 分别用一抗 (1:100) 于 4 °C 孵育过夜, 用 PBST 清洗切片 3 次 (每次 5 min)。采用荧光二抗 (1:100) 工作液孵育 37 °C、30 min、PBS 冲洗 3 次 (每次 10 min) 后, 在暗光下裱片, 待自然风干后进行封片, 所有的切片都在相同染色和拍照条件 (红光波长: 555 nm, 绿光波长: 488 nm)。

## 2.6 统计学处理

用 SPSS 17.0 统计学软件进行分析。实验数据

以  $\bar{x} \pm s$  表示。假手术组比较采用  $t$  检验, 模型组和给药各组之间比较采用方差分析。

## 3 结果

### 3.1 参附强心丸对大鼠肾功能指标的影响

与假手术组比较, 模型组大鼠血清中 BUN 和 Cr 水平均显著增加 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较, 参附强心丸 13.2 g/kg 组的 Cr、BUN 水平均明显降低 ( $P < 0.01$ ), 见表 1。

### 3.2 参附强心丸对大鼠甲状腺功能指标的影响

与假手术组相比, 模型组大鼠血清中 T3、T4 和 TSH 均有减少, 尤以 T3 为甚 ( $P < 0.01$ )。与模型组相比, 参附强心丸 13.2 g/kg 组 T3 水平增加显著 ( $P < 0.01$ )。说明参附强心丸对甲状腺功能减退具有调节作用, 见表 2。

### 3.3 参附强心丸对大鼠心室和肾脏质量指数的影响

与假手术组比较, 模型组大鼠全心指数、心室指数显著增加 ( $P < 0.05$ ), 左肾指数显著降低 ( $P < 0.05$ ), 说明该模型方法对心肾组织病理的发生进程均有影响。与模型组相比, 参附强心丸 13.2 g/kg 组大鼠全心指数、心室指数均显著减小 ( $P < 0.01$ ), 说明参附强心丸可明显改善心肌肥厚, 抑制心室重塑, 有增加左肾指数的变化趋势, 但无统计学意义。见表 3。

表 1 参附强心丸对大鼠肾功能指标的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Effects of Shenfu Qiangxin Pills on renal function indexes in rats ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别    | n/例 | 剂量/(g·kg <sup>-1</sup> ) | BUN/(mmol L <sup>-1</sup> ) | Cr/(μmol L <sup>-1</sup> )   |
|-------|-----|--------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| 假手术   | 10  | —                        | 4.184 ± 0.567               | 23.800 ± 4.315               |
| 模型    | 8   | —                        | 7.144 ± 1.478**             | 37.000 ± 4.751**             |
| 柄区肽   | 8   | 0.01                     | 5.173 ± 0.662               | 33.375 ± 2.825               |
| 参附强心丸 | 8   | 13.2                     | 5.504 ± 0.316 <sup>##</sup> | 26.750 ± 3.327 <sup>##</sup> |
|       | 8   | 6.6                      | 6.174 ± 0.353               | 34.125 ± 2.232               |

与假手术组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较: <sup>##</sup> $P < 0.01$

<sup>##</sup> $P < 0.01$  vs sham group; \*\* $P < 0.01$  vs model group

表 2 参附强心丸对大鼠甲状腺功能指标的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Effects of Shenfu Qiangxin Pills on thyroid function index in rats ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别    | n/例 | 剂量/(g·kg <sup>-1</sup> ) | T3/(ng mL <sup>-1</sup> )   | T4/(ng mL <sup>-1</sup> ) | TSH/(μIU·mL <sup>-1</sup> ) |
|-------|-----|--------------------------|-----------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| 假手术   | 10  | —                        | 0.754 ± 0.107               | 51.951 ± 10.142           | 0.380 ± 0.193               |
| 模型    | 8   | —                        | 0.249 ± 0.089**             | 38.732 ± 16.956           | 0.325 ± 0.186               |
| 柄区肽   | 8   | 0.01                     | 0.601 ± 0.209 <sup>##</sup> | 45.839 ± 6.523            | 0.285 ± 0.107               |
| 参附强心丸 | 8   | 13.2                     | 0.673 ± 0.194 <sup>##</sup> | 49.969 ± 24.185           | 0.300 ± 0.142               |
|       | 8   | 6.6                      | 0.384 ± 0.127               | 44.576 ± 13.331           | 0.333 ± 0.113               |

与假手术组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较: <sup>##</sup> $P < 0.01$

<sup>##</sup> $P < 0.01$  vs sham group; \*\* $P < 0.01$  vs model group

表3 参附强心丸对大鼠心室和肾脏质量指数的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )Table 3 Effects of Shenfu Qiangxin Pills on ventricular and renal mass index in rats ( $\bar{x} \pm s$ )

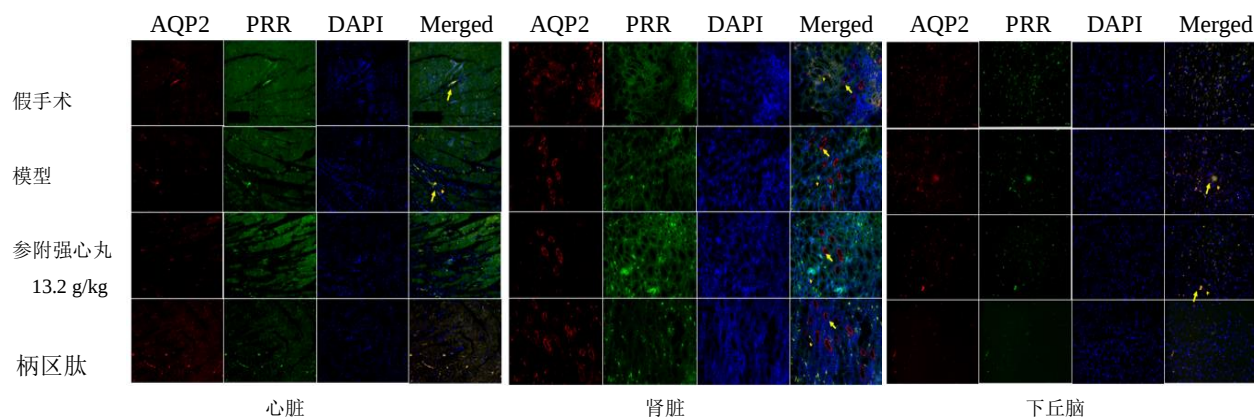
| 组别    | n/例 | 剂量/(g·kg <sup>-1</sup> ) | 全心指数/(g·100 g <sup>-1</sup> ) | 心室指数/(g·100 g <sup>-1</sup> ) | 左肾指数/(g·100 g <sup>-1</sup> ) |
|-------|-----|--------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 假手术   | 10  | —                        | 0.312±0.09                    | 0.243±0.006                   | 0.451±0.010                   |
| 模型    | 8   | —                        | 0.350±0.009*                  | 0.311±0.003**                 | 0.269±0.025**                 |
| 柄区肽   | 8   | 0.01                     | 0.299±0.018                   | 0.263±0.017                   | 0.332±0.017 <sup>#</sup>      |
| 参附强心丸 | 8   | 13.2                     | 0.271±0.005 <sup>##</sup>     | 0.231±0.012 <sup>##</sup>     | 0.298±0.009                   |
|       | 8   | 6.6                      | 0.288±0.009                   | 0.257±0.017                   | 0.277±0.030                   |

与假手术组比较: \* $P<0.05$  \*\* $P<0.01$ ; 与模型组比较: <sup>#</sup> $P<0.05$  <sup>##</sup> $P<0.01$ \* $P<0.05$  \*\* $P<0.01$  vs sham group; <sup>#</sup> $P<0.05$  <sup>##</sup> $P<0.01$  vs model group

### 3.4 参附强心丸对心脏、肾脏和下丘脑细胞中 PRR 和 AQP2 免疫荧光检测结果的影响

PRR 在假手术组大鼠心脏、肾脏、下丘脑均有表达; AQP2 在心室肌表达不明显, 在肾脏表达明显, 位于肾脏集合管主细胞的管腔侧, 与 PRR 表达

位点不同; 而在下丘脑中 PRR 和 AQP2 的表达位点相同, 说明在下丘脑中 PRR 和 AQP2 的表达具有明显的相关性。通过各组荧光强度的比较, 模型组大鼠心室肌、肾脏 PRR 表达均减弱; 参附强心丸 13.2 g/kg 组心室肌、肾脏 PRR 表达明显增强, 见图 1。

图1 参附强心丸对心脏、肾脏和下丘脑细胞中 PRR 和 AQP2 免疫荧光检测结果的影响 ( $\times 200$ )Fig. 1 Effects of Shenfu Qiangxin Pills on immunofluorescence expression of PRR and AQP2 in the heart, kidney, and hypothalamus in rats ( $\times 200$ )

## 4 讨论

2008 年 Ronco 等提出了心肾综合征的新定义, 即心肾功能在病理生理上的紊乱, 其中一个器官的急性或慢性病变可以导致另一器官的急性或慢性病变。本实验通过腹主动脉缩窄合并肾脏急性缺血再灌注损伤建立心肾共损模型, 观察模型大鼠出现肾功能明显减退, 心室肌肥厚等病理性改变, 与心肾综合征的临床表现基本一致。中医辨证该病一般基于心肾相关的理论基础, 其病机多为心肾阳虚或阳虚水泛, 临床治疗多以温阳利水为主。本实验中选择该治法的代表药参附强心丸, 对心肾综合征大鼠进行治疗作用观察, 结果发现其可以明显改善心肾综合征大鼠心室肌肥厚, 肾功能异常等情况。通过文

献报道发现在心衰患者终末阶段常伴低 T3 综合征, 特点为血清 T3 水平低, 而血清 T4 和 TSH 水平正常, 这也使 T3 成为预示心衰患者死亡风险及判断预后的又一新指标<sup>[11]</sup>。本研究结合心肾综合征模型的病变特点, 对模型大鼠血清 T3、T4 和 TSH 水平进行了检测, 结果发现参附强心丸不仅能改善心肾器官的功能, 对低 T3 水平具有明显的升高的效果, 这提示该药在治疗心肾衰竭性疾病中与刺激下丘脑-垂体-甲状腺素的激素分泌作用有关。这也为该药的治疗心肾疾病提供了新的研究方向。

近几年来, 对肾素原受体治疗机制的研究热点集中在非 Ang-II 依赖的功能上<sup>[12]</sup>。本课题组已证实 PRR 在大鼠心肾综合征模型心室肌和肾脏中高表

达,从而激活 MAPK 信号通路,使 P38、ERK1/2、JNK 蛋白磷酸化,进而促进心肾组织纤维化和细胞凋亡,注射 PRR 抑制剂之后,MAPK 信号通路效应均被抑制<sup>[6]</sup>。AQP2 是调节肾脏集合管对水通透性的关键蛋白,在调节肾脏水平衡中起重要作用,并被认为是维持体内水平衡的必须物质,在各型肾小球疾病中 AQP2 主要在远端小管和集合管主细胞的顶膜面表达。可见 AQP2 在肾脏的正常表达是维持尿液正常浓缩功能的基础。

参附强心丸是天津中新药业集团股份有限公司达仁堂制药厂研制的国家中药保护品种,具有益气助阳、强心利尿功效,临床用于慢性心力衰竭<sup>[19]</sup>。本实验旨在对 PRR 与 AQP2 在心肾综合征大鼠模型的表达特点予以观察,进而对参附强心丸治疗心肾疾病的作用机制及靶点予以明示。本实验通过免疫荧光组织化学染色观察到在心脏、肾脏及下丘脑中 PRR 与 AQP2 的共表达情况,且在下丘脑中两者明显出现了表达位点的重合。这一特点为 PRR 与 AQP2 在下丘脑中的进一步作用机制研究奠定了数据基础,结果也证实了参附强心丸对模型大鼠下丘脑组织中的 PRR 与 AQP2 表达的位点重合强度明显增强。

实验中采用的 HRP 是一段人工合成的含有氨基酸的肽片段,主要的功能是影响肾素前体与肾素的结合,具有延缓蛋白尿和肾小球纤维化病情进展和抑制其心脏纤维化的作用。因此,我们选用了 HRP 来作对照,比较受试药物是否抑制 PRR 的表达,说明该药物的作用靶点及作用意义。

#### 参考文献

[1] 李彦,周胜元,李晴晴,等.从中西医结合角度探讨

心肾综合征的发病机制[J].云南中医中药杂志,2019,40(8):80-83.

[2] Dinanda J de Jager, Marc G Vervloet, Friedo W Dekker. Noncardiovascular mortality in CKD: an epidemiological perspective [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2014, 10(4): 208-214.

[3] 袁平,马静,贾承明,等.“心病治肾”在心血管病证治疗中的作用[J].中国中医基础医学杂志,2017,23(9):1208-1210.

[4] 张艳,杨继,冯伟,等.益气调心汤治疗心肾综合征患者疗效观察[J].现代中西医结合杂志,2018,27(35):3895-3897,3902.

[5] 冯伟,张晶,方芳.益气温阳活血利水方干预心肾综合征患者心肾功能的临床研究[J].中国循证心血管医学杂志,2019,11(9):1096-1103.

[6] 王蕾,王梓,袁玲,等.参附强心丸调控肾素原受体介导 MAPK 信号通路抑制肾细胞凋亡[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(3):121-126.

[7] 李旭,王梓,郝迪,等.参附强心丸对心肾综合征模型大鼠心肌细胞中 LC3b、Bax 表达的影响[J].中国药房,2016,27(19):2602-2605.

[8] 刘欣健,贾智明,文建国,等.水通道蛋白-2 及其在肾脏疾病中的研究进展[J].现代泌尿外科杂志,2015,20(12):914-918.

[9] 王蕾,郝迪,李旭,等.心肾综合征动物模型研究进展[J].中国药理学通报,2013,29(11):1496-1498.

[10] 王蕾,王梓,郝迪,等.心肾综合征模型建立及肾素原受体信使核糖核酸表达的研究[J].中国循环杂志,2015,30(9):895-899.

[11] 冯慧,廖亚云.心力衰竭患者血清甲状腺激素水平变化的临床意义[J].2019,19(43):230-233.

[12] 李丹,张强,王卓然,等.参附强心丸治疗肺源性心脏病最佳切入点量效关系研究[J].中草药,2018,49(13):3062-3068.