

## 苓桂术甘汤对慢性心衰模型大鼠心肌组织 TNF- $\alpha$ 及血清 NF- $\kappa$ B 和 IL-1 $\beta$ 的影响

王 靓, 侯晓燕, 黄金玲\*, 王桐生, 保永亮, 施 慧

安徽中医学院中西医结合临床学院, 安徽 合肥 230038

**摘要:** 目的 观察苓桂术甘汤对慢性心力衰竭模型大鼠心肌组织肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 蛋白及 mRNA 表达、血清核因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)、白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 水平的影响, 探讨苓桂术甘汤防治慢性心衰的作用机制。方法 采用冠状动脉结扎法制备慢性心衰大鼠模型, 造模 4 周后将模型大鼠随机分为模型组, 卡托普利 (4.375 mg/kg) 阳性对照组, 苓桂术甘汤低、中、高剂量 (生药 2.1、4.2、8.4 g/kg) 组, 另设假手术组, 每天给药 1 次, 连续给药 4 周。Western blotting、RT-PCR 法分别检测各组大鼠心肌组织 TNF- $\alpha$  蛋白及 mRNA 的表达, ELISA 法检测血清中 NF- $\kappa$ B、IL-1 $\beta$  水平。结果 与假手术组相比, 模型组大鼠心肌组织 TNF- $\alpha$  蛋白及 mRNA 表达增强, 血清 NF- $\kappa$ B、IL-1 $\beta$  水平显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组相比, 苓桂术甘汤及卡托普利均能显著抑制模型大鼠心肌组织 TNF- $\alpha$  蛋白及 mRNA 表达、降低模型大鼠血清 NF- $\kappa$ B、IL-1 $\beta$  水平 ( $P < 0.05$ 、0.01)。结论 苓桂术甘汤干预慢性心衰的机制与其调节细胞因子网络有关。

**关键词:** 苓桂术甘汤; 慢性心力衰竭; 肿瘤坏死因子- $\alpha$ ; 核因子- $\kappa$ B; 白细胞介素-1 $\beta$

中图分类号: R285.5; R972 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)05-0586-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.05.017

## Effect of Lingui Zhugan Decoction on TNF- $\alpha$ in myocardial tissue and NF- $\kappa$ B and IL-1 $\beta$ in serum of model rats with chronic heart failure

WANG Liang, HOU Xiao-yan, HUANG Jin-ling, WANG Tong-sheng, BAO Yong-liang, SHI Hui

Department of Integrated Traditional Chinese Medicine and Western Medicine, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230038, China

**Abstract: Objective** To study the mechanism of Lingui Zhugan Decoction (LZD) on chronic heart failure (CHF), through observing the expression of TNF- $\alpha$  and TNF- $\alpha$  mRNA in myocardial tissue and the levels of NF- $\kappa$ B and IL-1 $\beta$  in serum of model rats with CHF. **Methods** Model of CHF was produced by ligation of coronary artery. Four weeks after this procedure, rats were randomly classified into model, Captopril (4.375 mg/kg), and low-, mid-, and high-dose (2.1, 4.2, and 8.4 g/kg) of LZD groups. Sham group and the other five groups were ig administered once daily for consecutive 4 weeks. The expression of TNF- $\alpha$  and TNF- $\alpha$  mRNA in myocardial tissue was detected by Western blotting and RT-PCR and the levels of NF- $\kappa$ B and IL-1 $\beta$  in serum were detected by ELISA. **Results** The expression of TNF- $\alpha$  and TNF- $\alpha$  mRNA of myocardial tissue was enhanced and the levels of NF- $\kappa$ B and IL-1 $\beta$  in serum of model group were significantly increased compared with Sham group ( $P < 0.01$ ). The low-, mid-, and high-dose of LZD and Captopril groups could inhibit the expression of TNF- $\alpha$  and TNF- $\alpha$  mRNA in myocardial tissue and decrease the levels of NF- $\kappa$ B and IL-1 $\beta$  in serum significantly compared with the model group ( $P < 0.05$ , 0.01). **Conclusion** The mechanism of LZD interfering CHF seems to be related to the regulation of the cytokine network inflammatory factors.

**Key words:** Lingui Zhugan Decoction; chronic heart failure; tumor necrosis factor- $\alpha$ ; nuclear factor- $\kappa$ B; interleukin-1 $\beta$

苓桂术甘汤出自张仲景的《伤寒论》, 由茯苓、桂枝、白术和甘草组成, 具有益气温阳、健脾化饮之功效。前期研究结果显示, 该方能有效干预心室

重构, 改善血流动力学, 对慢性心衰 (CHF) 有积极的防治作用<sup>[1-2]</sup>。本实验拟通过观察苓桂术甘汤对慢性心衰模型大鼠心肌组织中肿瘤坏死因子- $\alpha$

收稿日期: 2012-05-24

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (30973707); 安徽省自然科学基金资助项目 (070413262X); 安徽省科技计划项目 (10021303024)

作者简介: 王 靓 (1982—), 医学硕士, 实验师。Tel: (0551)5169318 E-mail: wangliang\_01@163.com

\*通信作者 黄金玲 Tel: (0551)5169390 E-mail: jinling6181@126.com

(TNF- $\alpha$ ) 蛋白及 mRNA 表达及血清中核因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)、白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 水平的影响, 进一步探讨苓桂术甘汤防治慢性心衰的机制, 为其临床应用提供实验依据。

## 1 材料

### 1.1 药品与试剂

苓桂术甘汤, 按原方比例(茯苓、桂枝、白术、甘草为 4:3:3:2), 参考文献方法<sup>[3]</sup>, 由安徽省亳州市兴和药业有限公司制备成含生药 4.8 g/g 的干浸膏粉末(含桂皮醛 9.945 mg/g、甘草酸 14.71 mg/g), 批号 2011020; 卡托普利, 中美上海施贵宝制药有限公司, 批号 009031。逆转录试剂盒、PCR 试剂和 Taq DNA 聚合酶, Fermentas 公司; 引物及探针、Trizol 试剂, Invitrogen 公司提供; 荧光定量试剂盒, TaKaRa 公司; 电化学发光 (ECL) 试剂盒, 美国 Pierce 公司; PVDF 膜, 美国 Millipore 公司; NF- $\kappa$ B、IL-1 $\beta$  试剂盒, 上海森雄科技实业有限公司。

### 1.2 动物

清洁级 SD 大鼠, 雄性, 体质量 180~220 g, 安徽医科大学实验动物中心提供, 合格证号: SCXK(皖) 2011-002。

### 1.3 仪器

HX-300S 型小型动物呼吸机, 成都泰盟科技有限公司; ABI2720 型普通 PCR 仪、ABI7500 型荧光定量 PCR 仪, 美国 ABI 公司; TGL-18R 型、TGL-16H 型冷冻离心机、UV 型紫外观察灯, 黑马仪器公司; Bio-pro CN-UV 型 GSM 凝胶图像分析管理系统, 美国 Sim 公司; Multiskan MK2 型酶标仪, Labsystem 公司; DYY-11 型电泳仪, 北京市六一仪器厂; Modulus 多功能光度计, 美国 Turner Bio Systems 公司。

## 2 方法

### 2.1 模型制备<sup>[1-2]</sup>

取 SD 大鼠 130 只, 戊巴比妥钠 (35 mg/kg) ip 麻醉, 背位固定, 小型动物呼吸机辅助呼吸, 潮气量 300 mL/kg, 无菌条件下胸部去毛, 沿左锁骨中线 3~5 肋处纵向切开皮肤约 2.5 cm, 于第 3、4 肋间钝性分离肋间肌, 打开胸腔, 剪开心包, 挤出心脏, 在距左冠状动脉根部 3 mm 处, 用眼科无创缝合丝线结扎冠状动脉左前降支。结扎后见左室壁颜色变浅, 心电图 S-T 段抬高伴肢体导联 R 波高尖, 即为结扎成功。迅速将心脏推回胸腔, 缝合胸壁。假手术组大鼠只穿线不结扎。大鼠自主呼吸恢复后

停止辅助呼吸, 每日 ip 青霉素  $8 \times 10^4$  U/只, 连续 3 d, 预防感染。

### 2.2 分组与给药

造模 4 周后, 除假手术组 (12 只大鼠) 外, 其余存活模型大鼠随机分为 5 组 (每组 12 只): 模型组, 苓桂术甘汤低、中、高剂量 (生药 2.1、4.2、8.4 g/kg, 相当于成人临床等效剂量的 0.5、1、2 倍) 组, 卡托普利 (4.375 mg/kg, 相当于成人临床等效剂量) 阳性对照组。各给药组每天 ig 给予相应药物 1 次 (均 10 mL/kg), 连续给药 4 周, 假手术组与模型组 ig 等体积蒸馏水。

### 2.3 检测指标

末次给药后 30 min, 各组大鼠 ip 20%乌拉坦 5 mL/kg 麻醉, 腹主动脉取血, 摘取心脏, 进行相关检测。

**2.3.1 Western blotting 法检测心肌组织 TNF- $\alpha$  蛋白表达** 取左心室心肌组织 50 mg, 加 RIPA 细胞裂解液 (含 1  $\mu$ mol/L PMSF) 1 mL 进行匀浆, 12 000 r/min 离心 5 min, 收集上清液, 加入等量的 2 倍稀释的 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液, 沸水浴加热 3 min 以充分变性蛋白。冷却至室温后取 15  $\mu$ L 于 SDS-PAGE 胶加样孔上样, 浓缩胶用电压为 80 V、30 min, 分离胶用电压为 120 V、60 min; 转膜, 封闭, 洗膜后用 ECL 发光试剂盒检测 TNF- $\alpha$  蛋白表达, 采用 Quantity one 灰度分析软件进行分析。

**2.3.2 RT-PCR 法检测心肌组织中 TNF- $\alpha$  mRNA 表达** 取左心室心肌组织 50 mg, Trizol 一步法抽提总 RNA, 经逆转录合成 cDNA [其中 RNA 8  $\mu$ L、10  $\mu$ mol/L Oligo (dT) 1  $\mu$ L、DEPC 水 3  $\mu$ L]。大鼠  $\beta$ -actin 引物序列: 正向引物 5'-CGATGCCCTGAGGCTCTT-3', 反向引物 5'-TGGATGCCACAGGATTCCA-3', 探针 5'-CCAGCCTTCCTTCTT-3'; TNF- $\alpha$  引物序列: 正向引物 5'-CTGGC AATGGCATGGAT-3', 反向引物 5'-GGTACAGCCCATCTGCTGGTA-3', 探针 5'-TCAAAGACAACCAACTGGT-3'。采用相对定量研究分析法, 以  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  作指标进行分析。

**2.3.3 ELISA 法检测血清中 NF- $\kappa$ B 和 IL-1 $\beta$  水平** 血样静置 30 min 后, 3 500 r/min 离心 10 min, 酶标仪检测血清中 NF- $\kappa$ B、IL-1 $\beta$  水平。

### 2.4 统计学处理

采用统计分析软件 SPSS 17.0 进行统计学处理。连续型变量以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多样本均数比较采用单因素方差分析, 多个均数比较用 LSD 法。

### 3 结果

#### 3.1 对慢性心衰大鼠心肌组织 TNF-α 蛋白表达的影响

模型组大鼠心肌组织中 TNF-α 蛋白表达显著升高, 与假手术组相比差异显著 ( $P < 0.01$ ); 连续给药 4 周后, 苓桂术甘汤各剂量组及卡托普利组大鼠心肌组织 TNF-α 蛋白表达显著降低, 与模型组相比差异显著 ( $P < 0.01$ ), 表明苓桂术甘汤、卡托普利均能有效抑制慢性心衰大鼠心肌组织 TNF-α 蛋白的过度表达。结果见表 1 和图 1。

表 1 苓桂术甘汤对慢性心衰大鼠心肌组织 TNF-α 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量 / (g·kg <sup>-1</sup> )	TNF-α 蛋白相对表达量
假手术	—	0.149 ± 0.014
模型	—	0.786 ± 0.056 <sup>△△</sup>
苓桂术甘汤	2.1	0.615 ± 0.035 <sup>**</sup>
	4.2	0.552 ± 0.048 <sup>**</sup>
	8.4	0.384 ± 0.056 <sup>**</sup>
卡托普利	0.004 375	0.550 ± 0.037 <sup>**</sup>

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

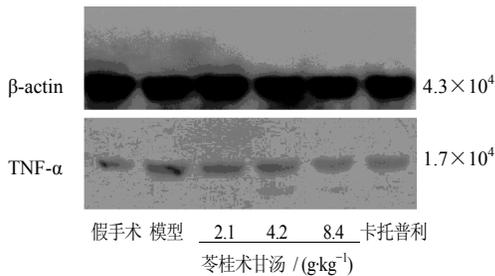


图 1 苓桂术甘汤对心衰大鼠心肌组织 TNF-α 蛋白表达的影响  
 Fig. 1 Effect of LZD on TNF-α protein expression in myocardial tissue of rats with CHF

#### 3.2 对慢性心衰大鼠心肌组织 TNF-α mRNA 表达的影响

模型组大鼠心肌组织中 TNF-α mRNA 表达显著增强, 与假手术组相比差异显著 ( $P < 0.01$ ); 连续给药 4 周后, 苓桂术甘汤各剂量组及卡托普利组大鼠心肌组织中 TNF-α mRNA 表达显著降低, 其中苓桂术甘汤中、高剂量组及卡托普利组与模型组相比差异显著 ( $P < 0.05, 0.01$ ), 表明苓桂术甘汤、卡托普利均能有效抑制慢性心衰大鼠心肌组织中 TNF-α mRNA 的过度表达。结果见表 2 和图 2。

表 2 苓桂术甘汤对慢性心衰大鼠心肌组织 TNF-α mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量 / (g·kg <sup>-1</sup> )	2 <sup>-△△Ct</sup>
假手术	—	22.498 ± 0.302
模型	—	25.872 ± 0.597 <sup>△△</sup>
苓桂术甘汤	2.1	24.908 ± 1.287
	4.2	23.972 ± 0.778 <sup>*</sup>
	8.4	23.292 ± 1.194 <sup>**</sup>
卡托普利	0.004 375	24.099 ± 1.110 <sup>**</sup>

与假手术组比较: <sup>△△</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较: <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ , 下同  
<sup>△△</sup> $P < 0.01$  vs control group; <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs model group, same as below

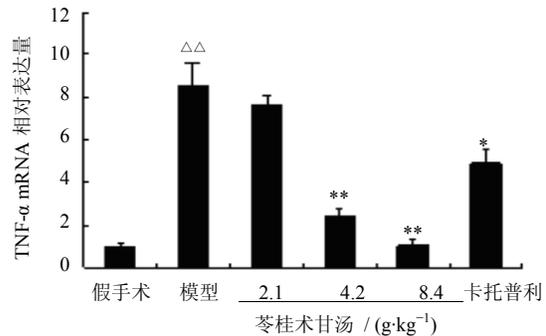


图 2 苓桂术甘汤对慢性心衰大鼠心肌组织 TNF-α mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 2 Effect of LZD on TNF-α mRNA expression in myocardial tissue of rats with CHF ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

#### 3.3 对慢性心衰大鼠血清 NF-κB 和 IL-1β 水平的影响

模型组大鼠血清中 NF-κB 和 IL-1β 水平显著增加, 与假手术组相比差异显著 ( $P < 0.01$ ); 连续给药 4 周后, 苓桂术甘汤各剂量组及卡托普利组大鼠血清中 NF-κB 和 IL-1β 水平显著降低, 与模型组相比差异显著 ( $P < 0.05, 0.01$ ), 表明苓桂术甘汤与卡托普利均能有效降低慢性心衰大鼠血清中 NF-κB 和 IL-1β 水平。结果见表 3。

### 4 讨论

慢性心衰是由多种原因诱发心肌损伤, 进而引起的心肌结构和功能的变化, 是多种心脏疾病发展的最终阶段, 其 5 年存活率与恶性肿瘤相仿, 已成为 21 世纪最重要的心血管病症<sup>[4]</sup>。研究表明炎症在慢性心衰的病理中起重要作用, 炎症细胞因子对心肌细胞的作用呈多效性, 其既可诱导心肌细胞肥

表3 苓桂术甘汤对慢性心衰大鼠血清中NF-κB和IL-1β水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 3 Effect of LZD on levels of NF-κB and IL-1β in serum of rats with CHF ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 / (g·kg <sup>-1</sup> )	动物 / 只	NF-κB / (ng·L <sup>-1</sup> )	IL-1β / (ng·L <sup>-1</sup> )
假手术	-	10	137.800±23.811	172.729±21.057
模型	-	8	209.789±21.919 <sup>△△</sup>	245.430±15.451 <sup>△△</sup>
苓桂术甘汤	2.1	8	189.740±18.947*	228.301±13.117*
	4.2	10	156.526±16.520**	201.359±12.542**
	8.4	10	161.133±19.994**	191.671±16.369**
卡托普利	0.004 375	10	151.005±16.880**	190.154±26.085**

大,也可诱导心肌细胞凋亡,其中TNF-α是细胞因子网络的关键部分。正常心肌细胞不能产生TNF-α,但在慢性心衰时,心脏既是TNF-α生物合成的场所,也是其作用的靶器官,在心梗后的慢性心室重塑过程中,由于心肌损伤、室壁应力、氧化应激及局部神经内分泌激活等的作用,心肌细胞产生大量TNF-α,而TNF-α可进一步激活NF-κB诱导酶,使NF-κB进入细胞核,进而激活一系列细胞炎症、生长和存活所需基因的表达<sup>[5-7]</sup>。IL-1是炎症因子级联反应的始动因子,IL-1β作为其主要活动形式在维持正常内环境稳态和心血管系统疾病病理过程中发挥重要调节作用,其可通过诱发心肌肥大、心肌纤维化、心肌细胞凋亡等多种途径导致心肌细胞结构破坏和功能障碍,参与心衰的病理发展过程<sup>[8]</sup>。

本实验结果显示,苓桂术甘汤能够显著抑制慢性心衰模型大鼠心肌组织中TNF-α蛋白及mRNA的表达,降低血清中NF-κB和IL-1β水平,表明苓桂术甘汤可通过调节细胞因子网络,发挥益气温阳、健脾化饮的作用,进而干预慢性心衰的病理过程,达到防治慢性心衰的效果。下一步拟通过观察苓桂术甘汤在大鼠急性心梗后不同时间点给药对模型大

鼠心脏结构、心脏功能和细胞因子网络相关物质表达的影响,揭示苓桂术甘汤干预心力衰竭的最佳时机及机制,为其临床应用提供实验依据。

参考文献

- [1] 方海雁,黄金玲,桑方方,等. 苓桂术甘汤对慢性心衰大鼠AngII、ET-1、TNF-α和IL-β的影响[J]. 安徽中医学院学报,2010,29(2): 53-55.
- [2] 黄金玲,桑方方,王桐生,等. 苓桂术甘汤对充血性心衰大鼠心脏指数与血流动力学的影响[J]. 安徽中医学院学报,2009,28(5): 58-60.
- [3] 黄金玲,王慧慧,陈慧芳,等. 正交试验法优选苓桂术甘汤的提取工艺[J]. 安徽中医学院学报,2011,30(6): 65-67.
- [4] 朱雯晴,李觉. 慢性心力衰竭初级预防的研究进展[J]. 同济大学学报:医学版,2011,32(3): 120-123.
- [5] 李寰,靳立军. 心脏肥大细胞与心肌凋亡[J]. 岭南心血管病杂志,2012,18(1): 77-81.
- [6] 胡静,沙红. 心力衰竭发病机制的研究进展[J]. 医学综述,2011,17(17): 2636-2640.
- [7] 李彦华,王士雯,朱梅. 心力衰竭大鼠组织中核因子κB的活化与细胞因子的表达[J]. 中华老年多器官疾病杂志,2009,8(5): 448-450.
- [8] 何文俊,张涛,蒋学军,等. 炎症因子与慢性心力衰竭[J]. 中华临床医师杂志,2011,5(2): 457-460.