

附子与山茱萸配伍对慢性心力衰竭大鼠的影响

贾欢欢^{1,2}, 曾业文^{1,2}, 李航^{1,2}, 梁士^{1,2}, 郭扬清^{1,2}, 高洪彬^{1,2}, 吴玉娥^{1,2}, 关业枝^{1,2,3*}

1. 广东省实验动物监测所, 广东 广州 510663

2. 广东省实验动物重点实验室, 广东 广州 510663

3. 广州中医药大学, 广东 广州 510405

摘要:目的 探讨附子与山茱萸配伍对慢性心力衰竭大鼠增效减毒作用。方法 ip 盐酸阿霉素构建大鼠慢性心力衰竭模型, 分别给予附子提取物、山茱萸提取物和附子-山茱萸提取物 3 周后, 检测动物血清脑钠素 (BNP) 含量, 心肌细胞 Ca^{2+} -ATP 酶和 Na^+ , K^+ -ATP 酶活性, 镜下观察左心室组织病理学形态变化。结果 造模 3 周后, 模型组大鼠普遍出现腹水、消瘦、稀便、弓背等症候特征; 左心室射血分数 (EF) 和左心室短轴缩短率 (FS) 明显下降; 血清 BNP 水平显著升高; 左心室组织出现心肌纤维断裂及心肌细胞变性、坏死等病理改变。连续 ig 给予附子-山茱萸提取物 3 周后, 大鼠症状及体征明显改善, 血清 BNP 水平下降, 心肌细胞 Na^+ , K^+ -ATP 酶活性升高, 左心室组织病理学形态有明显改善。附子提取物和山茱萸提取物分别连续给药 3 周, 上述指标未见明显改善。结论 附子与山茱萸配伍可能通过提高心肌细胞 Na^+ , K^+ -ATP 酶活性, 改善慢性心力衰竭的心肌能量代谢障碍, 提高心力衰竭的心肌活性, 起到增效减毒作用。

关键词: 附子; 山茱萸; 配伍; 阿霉素; 脑钠素; Na^+ , K^+ -ATP 酶; 慢性心力衰竭

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)02-0418-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.02.021

Effect of compatibility of *Aconitum carmichaelii* and *Cornus officinalis* on chronic heart failure rats

JIA Huan-huan^{1,2}, ZENG Ye-wen^{1,2}, LI Hang^{1,2}, LIANG Shi^{1,2}, GUO Yang-qing^{1,2}, GAO Hong-bin^{1,2},
WU Yu-e^{1,2}, GUAN Ye-zhi^{1,2,3}

1, Guangdong Laboratory Animals Monitoring Institute, Guangzhou 510663, China

2, Guangdong Provincial Key Laboratory of Laboratory Animals, Guangzhou 510663, China

3, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

Abstract: Objective To study the efficacy enhancing and toxicity reducing effects of compatibility of *Aconitum carmichaelii* and *Cornus officinalis* on chronic heart failure (CHF) rats. **Methods** The CHF rats was established by ip injection of adriamycin (ADM), the CHF rats were administrated tested drugs for three weeks by means of ig administration, the tested drugs included extracts of *A. carmichaelii*, *C. officinalis*, and Compound. The serum brain natriuretic peptide (BNP) level, activity of Ca^{2+} -ATP and Na^+ , K^+ -ATP enzymes in cardiac myocytes, and cardiac histopathology were measured. **Results** After three weeks of modeling, the CHF rats showed signs of ascites, loss of weight, loose stool, hoggback, etc. The left ventricular ejection fraction (EF) and fraction shortening (FS) decreased significantly, and the level of BNP in serum was significantly improved; Pathological changes of ventricular tissue included rupture of myocardial fibers, degeneration and necrosis of cardiomyocytes, etc. After three weeks of gavage compatibility of *A. carmichaelii* and *C. officinalis*, the general state and cardiac histopathology of the animal was obviously improved, the level of BNP in serum was reduced significantly, the activity of Na^+ , K^+ -ATP enzymes was increased significantly. No notable improvement in the above indexes was obtained after administration of *A. carmichaelii* and *C. officinalis* alone. **Conclusion** The compatibility of *A. carmichaelii* and *C. officinalis* can increase the activity of Na^+ , K^+ -ATP enzyme in cardiac myocytes, and improve the energy metabolism and activity of cardiac myocytes in chronic heart failure. The compatibility of *A. carmichaelii* and *C. officinalis* play the key role of enhancing efficacy and reducing toxicity.

Key words: *Aconitum carmichaelii* Debx.; *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc.; compatibility; adriamycin; brain natriuretic peptide; Na^+ , K^+ -ATP enzymes; chronic heart failure (CHF)

收稿日期: 2018-05-24

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (2016A030313646); 广东省科技计划项目 (2017A070702001)

作者简介: 贾欢欢 (1984—), 男, 助理研究员, 主要从事动物模型的制作及评价研究。Tel: (020)84106823 E-mail: jhh@gdiami.com

*通信作者 关业枝, 女, 副研究员, 硕士生导师, 主要从事药物非临床评价研究。E-mail: gyzz@gdiami.com

慢性心力衰竭(CHF)是由于多种原因导致的心室泵和(或)充盈功能下降的一种临床综合征,是多种心血管疾病的终末期表现^[1]。目前研究认为CHF主要表现为心肌收缩功能和心输出量下降,机体组织供氧和代谢的血液供应减少。附子作为温通心阳的常用药,具有增强心肌收缩力和增加心输出量的功能^[2],但附子大毒,临床主要表现为心脏毒性,如心律失常等。传统医学认为,附子味辛,甘,性热走窜;山茱萸味酸,善酸敛收涩。附子辛而能散,山茱萸酸而能敛,两者常配伍用于强心。本实验研究附子与山茱萸配伍前后对CHF大鼠模型的影响,探讨附子与山茱萸配伍对CHF大鼠增效减毒作用,为临床应用提供理论和实验依据。

1 材料

1.1 仪器

JCS-1000 电子天平(浙江凯丰集团有限公司); YD8001 电子天平、JA1003N 电子天平(上海佑科仪器仪表有限公司); TP1020 全自动组织脱水机、EG1150H+C 石蜡包埋机、RM2155 全自动轮转切片机、DM2500 生物显微镜(Leica 公司); Multiskan Spectrum 全波长酶标仪(Thermo Scientific 公司); Vevo 2100 超高分辨率小动物超声影像系统(Visualsonics 公司)。

1.2 药物及试剂

附子(四川好医生药业集团有限公司,批号16010205,经四川好医生药业集团有限公司刘彬高级工程师鉴定为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaeli* Debx. 的子根加工品); 山茱萸(四川新绿色药业科技发展股份有限公司,批号160712,经四川新绿色药业科技发展股份有限公司刘涛研究员鉴定为山茱萸科植物山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. 的干燥成熟果肉); 脑钠素(BNP)测试盒(CUSABIO 公司,批号 N260106); 蛋白定量测定试剂盒(批号 20170512)、超微量 Na⁺, K⁺-ATP 酶测定试剂盒(批号 20171017)、超微量 Ca²⁺-ATP 酶测定试剂盒(批号 20171017)均购自南京建成生物工程研究所; 阿霉素(MACKLIN 公司,批号 C10093768、C10088736)。

1.3 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠,53 只,体质量(200±20)g,购自广东省医学实验动物中心,生产许可证号 SCXK(粤)2013-0002。实验动物饲养于广东省实验动物监测所屏障环境动物房,室温 20~26℃,

相对湿度 40%~70%,12 h/12 h 昼夜明暗交替。

2 方法

2.1 提取物的制备

2.1.1 附子提取物的制备 取 1 kg 附子与 6 kg 水浸泡 0.5 h 后提取 4 h,滤过后药渣再提取 1 h,合并 2 次滤液进行减压浓缩(60℃, -0.08 MPa),浓缩至适量水浴蒸干,再次进行减压干燥(70℃, -0.08 MPa),得浸膏(1 g 浸膏相当于生药材 3.32 g,其中含新乌头碱 0.060 0%、次乌头碱 0.044 6%、乌头碱 0.156 4%、苯甲酰乌头原碱 0.120 9%)。

2.1.2 山茱萸提取物的制备 1 kg 山茱萸加入 6 kg 已煮沸的水中提取 1 h,滤过后药渣再次提取 1 h,合并 2 次滤液进行减压浓缩(温度不超过 60℃,真空度不低于 -0.08 MPa),浓缩至适量,水浴蒸干,再次进行减压干燥(70℃, -0.08 MPa),终得浸膏(1 g 浸膏相当于生药材 1.65 g)。

2.1.3 附子-山茱萸提取物的制备 1 kg 附子加入 12 份水浸泡 0.5 h 后,提取至 3 h 时加入 1 kg 山茱萸,继续提取 1 h,滤过后药渣再次提取 1 h,合并 2 次滤液后进行减压浓缩(70℃, -0.08 MPa),浓缩至适量后水浴蒸干,再次进行减压干燥(70℃, -0.08 MPa),终得浸膏(附子与山茱萸按 1:1 配伍,1 g 浸膏相当于生药材 2.21 g,其中含新乌头碱 0.063 7%、次乌头碱 0.092 0%、乌头碱 0.149 2%、苯甲酰乌头原碱 0.215 4%)。

2.2 CHF 大鼠模型的制备

大鼠适应性饲养 1 周后,53 只大鼠随机分为对照组(10 只)和造模组(43 只)。配制 2 mg/mL 阿霉素溶液,造模组以 4 mg/kg 剂量 ip 造模,每周 1 次,连续 3 周。对照组动物 ip 2 mL/kg 生理盐水。每天进行一般观察,末次注射后 2 组各随机抽取 3 只大鼠检测心功能、BNP 水平,并进行左心室组织病理学观察,综合判断 CHF 大鼠模型成功情况。

2.3 分组与给药

造模 3 周后的大鼠根据体质量随机分为 4 组,分别为模型组、附子提取物组、山茱萸提取物组和附子-山茱萸提取物组。对照组及模型组大鼠 ig 生理盐水,附子提取物组、山茱萸提取物组及附子-山茱萸提取物组分别 ig 附子提取物(0.972 g/kg,相当于生药量 3.227 g/kg)、山茱萸提取物(1.956 g/kg,相当于生药量 3.227 g/kg)及附子-山茱萸提取物(1.460 g/kg,相当于生药量 3.227 g/kg),每天 20 mL/kg,连续 3 周。每周根据体质量调整给药量。

2.4 一般观察

实验期间每天观察大鼠精神状态、眼睑分泌物、活动情况、皮毛状况、呼吸频率等。

2.5 血清 BNP 水平检测

给药结束后次日，大鼠经 2% 戊巴比妥钠 3 mL/kg 麻醉后，心脏采血，3 000 r/min 离心 15 min，取血清，根据 ELISA 试剂盒说明书方法测定 BNP 水平。

2.6 心肌 Ca^{2+} -ATP 酶及 Na^{+} , K^{+} -ATP 酶活性检测

给药结束后次日，心脏采血后，取左心室心肌于液氮中保存。测试前准确称取组织质量，考马斯亮蓝试剂测定组织蛋白浓度，根据 Ca^{2+} -ATP 酶及 Na^{+} , K^{+} -ATP 酶测试盒说明书进行检测。

2.7 心脏组织病理学观察

取左心室心肌组织，10% 的中性福尔马林固定，石蜡包埋，常规组织切片，HE 染色进行病理观察。

2.8 统计学处理

采用 SPSS 25.0 数据处理系统进行数据分析，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间差异采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 CHF 大鼠模型的评价

ip 4 mg/kg 阿霉素溶液 3 周后，造模组大鼠普遍出现腹水、消瘦、稀便、弓背、立毛等症状；与对照组比较，造模组大鼠左心室射血分数 (EF) 及左心室短轴缩短率 (FS) 均明显降低 ($P < 0.05$)；左心室舒张末期内径 (LVEDD) 和左心室收缩末期内径 (LVESD) 有减小趋势；血清 BNP 水平明显升高 ($P < 0.05$)；镜下观察造模组大鼠心脏组织出现部分心肌纤维断裂、心肌细胞空泡变性、萎缩等病理改变。综上判断 CHF 大鼠模型成功。结果见图 1 和 2。

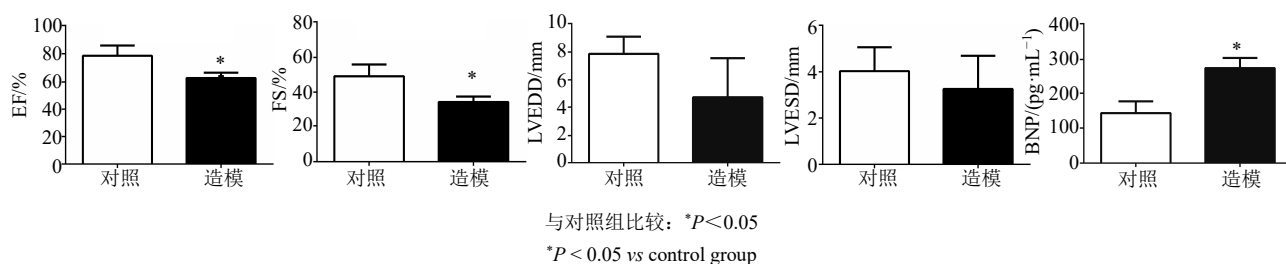


图 1 CHF 大鼠心功能参数及血清 BNP 水平 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 1 Cardiac function parameters and serum BNP levels in CHF rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.2 附子-山茱萸提取物对 CHF 大鼠的影响

3.2.1 一般观察 给药 3 周后对照组一般观察未见异常，模型组、附子提取物组和山茱萸提取物组大鼠普遍出现腹水、体形消瘦、稀便、弓背、立毛等症状，少数动物死亡（模型组与山茱萸提取物组各死亡 2 只，附子提取物组死亡 1 只），而附子-山茱萸提取物组个别大鼠出现轻微腹水、弓背等症状。

3.2.2 血清 BNP 水平 给药 3 周后模型组大鼠血清 BNP 水平显著高于对照组 ($P < 0.05$)，而附子-山茱萸提取物组 BNP 水平明显低于模型组 ($P < 0.05$)，附子提取物组、山茱萸提取物组大鼠血清中 BNP 水平与模型组比较，差异不显著 ($P > 0.05$)。结果见表 1。

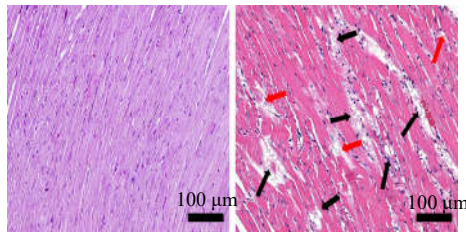
3.2.3 心肌细胞 Na^{+} , K^{+} -ATP 酶活性和 Ca^{2+} -ATP 酶活性 给药 3 周后，与对照组相比，模型组大鼠心肌细胞 Na^{+} , K^{+} -ATP 酶活性明显降低 ($P < 0.05$)；与模型组相比，附子-山茱萸提取物组 Na^{+} , K^{+} -ATP

酶活性显著升高 ($P < 0.05$)，而 Ca^{2+} -ATP 酶活性各组间均无统计学差异 ($P > 0.05$)。附子提取物组、山茱萸提取物组大鼠心肌细胞 Na^{+} , K^{+} -ATP 酶活性和 Ca^{2+} -ATP 酶活性与模型组比较，差异不显著 ($P > 0.05$)。结果见表 1。

3.2.4 心脏组织病理变化 给药 3 周后，与对照组比较，模型组大鼠出现心肌组织间隙增宽、断裂，心肌细胞空泡变性、水肿、坏死、萎缩等病理改变。与模型组相比，附子-山茱萸提取物组大鼠心脏病理有明显改善，仅个别大鼠出现心肌组织间隙增宽、心肌细胞轻度空泡变性。而附子提取物组和山茱萸提取物组除心肌组织间隙增宽有所改善外，其他组织病理未见明显改善，出现心肌组织间隙增宽、断裂，心肌细胞空泡变性、水肿、坏死、萎缩等。结果见图 3。

4 讨论

传统医学认为 CHF 的病理基础主要为心阳不



对照 造模
红色箭头表示心肌纤维断裂, 黑色箭头表示空泡变性
Red arrow indicates rupture of myocardial fibers, black arrow indicates vacuolar degeneration of cardiac myocyte

图 2 CHF 大鼠左心室病理变化 (HE 染色)

Fig. 2 Pathological changes of left ventricle in CHF rats (HE staining)

足, 古今中医名家常用温通心阳之法治治疗心阳虚, 医籍记载附子为温阳圣药, 具有回阳救逆、益气固脱之功。现代研究表明附子对急性心衰具有明显的强心作用^[3]。附子大毒, 在古方中常与其他药配伍使用, 如山茱萸、甘草、人参、黄芪等, 以达到减毒增效的作用^[4]。现代研究发现当附子与山茱萸配伍使用时不仅明显减低了附子的心脏毒性, 而且明显增强了其温通心阳的功效^[5]。

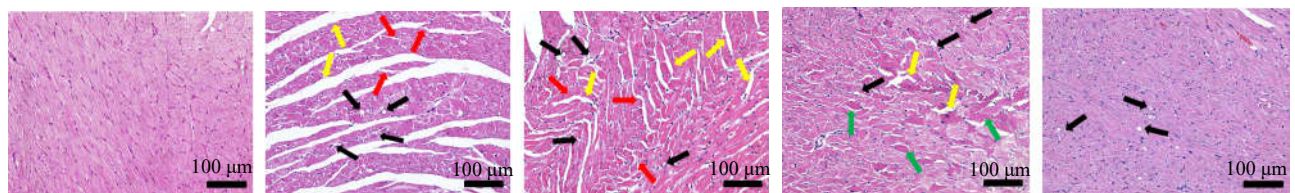
现代研究发现 CHF 主要是由于心脏泵功能损害导致机体出现相关症状与体征的复杂临床综合征^[6]。ip 阿霉素是构建 CHF 动物模型常用的方法, 因其更加接近人 CHF 临床表现而被广泛认可^[7]。EF 和 FS

表 1 附子-山茱萸提取物对 CHF 大鼠血清 BNP 水平及心肌细胞中 Ca^{2+} -ATP 酶活性及 Na^+ , K^+ -ATP 酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Effects of compatibility of extracts from *A. carmichaeli* and *C. officinalis* on serum levels of BNP, activity of Ca^{2+} -ATP and Na^+ , K^+ -ATP enzymes in cardiac myocytes in CHF rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	n/只	BNP/(pg·mL ⁻¹)	Ca^{2+} -ATP 酶/(U·mg ⁻¹)	Na^+ , K^+ -ATP 酶/(U·mg ⁻¹)
对照	7	170.8±29.4	0.149±0.155	0.561±0.236
模型	8	298.6±46.0*	0.219±0.110	0.226±0.120*
附子提取物	9	281.8±22.2*	0.143±0.024	0.158±0.132*
山茱萸提取物	8	266.1±34.7*	0.193±0.062	0.231±0.137*
附子-山茱萸提取物	10	185.0±45.8 [#]	0.215±0.064	0.472±0.231 [#]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group



对照 模型 附子提取物 山茱萸提取物 附子-山茱萸提取物
黄色箭头表示心肌间隙增宽, 红色箭头表示心肌纤维断裂, 黑色箭头表示空泡变性, 绿色箭头表示心肌细胞坏死
Yellow arrow indicates widening of myocardial space, red arrow indicates rupture of myocardial fibers, black arrow indicates vacuolar degeneration of cardiac myocyte, green arrow indicates necrosis of cardiac myocyte

图 3 附子-山茱萸提取物对 CHF 大鼠左心室病理变化的影响 (HE 染色)

Fig. 3 Effects of compatibility of extracts from *A. carmichaeli* and *C. officinalis* on pathological changes of left ventricle in CHF rats (HE staining)

为反映心脏泵功能最主要的指标; 临床发现 CHF 患者血清 BNP 水平明显升高, 且升高程度与 CHF 的严重程度呈正相关, BNP 是评价 CHF 严重程度、药物疗效最敏感的生化指标; CHF 常会引起心肌空泡变性、心肌纤维断裂、心肌细胞肿胀及坏死等病理变化^[8-9]。本研究动物经过 3 周 ip 阿霉素造模后, 模型组大鼠普遍出现腹水、体形消瘦、稀便、弓背、立毛等症状体征, 且模型组与对照组比较 EF 和 FS 均明显降低, 血清 BNP 水平明显升高, 心脏普遍出

现空泡变性和心肌纤维断裂等病理变化。综上所述认为本研究 CHF 大鼠模型构建成功。

能量代谢是心肌细胞活动的物质基础, 与能量代谢障碍相伴的心室重构被认为是 CHF 的主要病理生理学机制, CHF 心肌中高能磷酸化合物检测已经证实这一点^[10]。 Na^+ , K^+ -ATP 酶, 又称钠泵或钾泵, 主要作用为能量供给、排除细胞内废物及维持细胞压力平衡。目前研究发现当心肌细胞上钠钾泵活性持续或严重下降, 会引起钠泵严重功能障碍, 导致

心肌能量代谢异常、心脏受损或心功能不全^[11]。本研究发现模型组 Na^+ , K^+ -ATP 酶活性明显低于对照组,而附子-山茱萸提取物ig给药3周后, Na^+ , K^+ -ATP 酶活性明显回升。此外与模型组比较,附子-山茱萸提取物组大鼠的一般状态显著改善,血清BNP水平明显降低,心脏病理改变有所好转,而单独ig附子提取物和山茱萸提取物上述指标与模型组无明显差异。

综上所述,本研究采用ip 4 mg/kg阿霉素3周构建CHF大鼠模型方法可靠,附子与山茱萸配伍对CHF大鼠有一定的治疗作用,其机制可能是两者配伍后可提高心肌细胞 Na^+ , K^+ -ATP酶活性,改善心肌能量代谢障碍,最终增强心肌细胞活动和心脏泵功能。本研究为附子配伍山茱萸治疗CHF提供了一定的实验参考。

参考文献

- [1] 中华医学会. 临床诊疗指南·心血管分册 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010.
- [2] 贾雪岩, 林 华, 沈玉巧, 等. 附子新型炮制品中乌头类生物碱测定及其强心作用研究 [J]. 药物评价研究, 2016, 39(2): 224-229.
- [3] 卢志强, 张艳军, 庄朋伟, 等. 附子对急性心力衰竭大鼠血流动力学影响及其机制研究 [J]. 中草药, 2015, 46(21): 3223-3227.
- [4] 李庆利, 曾贵荣, 谭志超, 等. 参附注射液对大鼠慢性心力衰竭的保护作用研究 [J]. 中南药学, 2017, 15(12): 1717-1721.
- [5] 汪 星, 孙 卫, 张铁军. 乌头类有毒中药配伍减毒增效的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(18): 327-331.
- [6] 舒 华. 温阳振衰颗粒联合运动训练对慢性心衰大鼠心肌能量代谢的影响 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2016.
- [7] Singal P K, Li T, Kumar D, *et al.* Adriamycin-induced heart failure: Mechanism and modulation [J]. *Mol Cell Biochem*, 2000, 207(12): 77-86.
- [8] Buja L M, Ferrans V J, Mayer R J, *et al.* Cardiac ultrastructural changes induced by daunorubicin therapy [J]. *Cancer*, 1973, 32(4): 771-788.
- [9] 徐建虎, 张 琦, 杨子庆, 等. 阿霉素诱导大鼠慢性心衰模型的制备 [J]. 宁夏医科大学学报, 2016, 38(3): 348-351.
- [10] Neubauer S. The failing heart—an engine out of fuel [J]. *N Engl J Med*, 2007, 356(11): 1140-1151.
- [11] 黄丹丹. 环维黄杨星 D 对大鼠心衰的治疗作用及其对心肌 Na^+ - K^+ -ATPase 亚基表达的影响 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2013.