

基于 RAAS/NF- κ B/炎症因子级联反应探究真武汤对慢性心力衰竭大鼠治疗作用

洪莉丽^{1,2,3,4}, 张 盛^{1,2,3,4}, 汪 倩^{1,2,3,4}, 赵亚婷^{1,2,3,4}, 朱 倩⁵, 彭 灿^{1,2,3,4}, 陈卫东^{1,2,3,4*}

1. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012
2. 中药复方安徽省重点实验室, 安徽 合肥 230012
3. 安徽省道地中药材品质提升创新协同中心, 安徽 合肥 230012
4. 安徽省中医药科学院药物制剂研究所, 安徽 合肥 230012
5. 安徽医科大学药学院, 安徽 合肥 230032

摘要: **目的** 探讨真武汤对慢性心力衰竭 (CHF) 大鼠的治疗作用, 并分析其潜在作用机制。 **方法** 建立真武汤的 HPLC 特征图谱; 雄性 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、阳性药卡托普利组 (10 mg/kg) 和真武汤低、中、高剂量 (2.187 5、4.375、8.75 g/kg) 组, 除假手术组外, 其余大鼠均通过结扎冠状动脉左前降支复制 CHF 大鼠模型, 8 周后 ig 给药, 共给药 4 周。实验末进行血流动力学、脏器指数、HE 染色检测, ELISA 试剂盒测定大鼠血清血管紧张素 II (Ang II)、醛固酮 (ALD)、核转录因子- κ B (NF- κ B)、氨基末端脑钠肽 (NT-proBNP)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6 (IL-6) 水平, Western blotting 检测心肌 NF- κ B 蛋白表达情况。 **结果** 真武汤 HPLC 图谱中指出 5 个化学成分去甲乌药碱、芍药苷、白术内酯 III、6-姜辣素、去氢土莫酸; 与模型组比较, 真武汤给药后能改善大鼠血流动力学相关参数 ($P < 0.05$), 降低脏器指数 ($P < 0.05$), 改善心肌损伤, 降低血清 Ang II、ALD、NF- κ B、NT-proBNP、TNF- α 、IL-6 水平及心肌 NF- κ B 蛋白表达水平 ($P < 0.05$)。 **结论** 真武汤能够改善 CHF, 其机制可能与抑制肾素-血管紧张素-醛固酮系统 (RAAS)/NF- κ B/炎症因子级联反应有关。

关键词: 真武汤; 慢性心力衰竭; 肾素-血管紧张素-醛固酮系统; 核转录因子- κ B 通路; 炎症因子; 去甲乌药碱; 芍药苷; 白术内酯 III; 6-姜辣素; 去氢土莫酸

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)05-1279-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.05.026

Effect of Zhenwu Decoction on chronic heart failure rats based on RAAS/NF- κ B/inflammatory factor cascade reaction

HONG Li-li^{1,2,3,4}, ZHANG Sheng^{1,2,3,4}, WANG Qian^{1,2,3,4}, ZHAO Ya-ting^{1,2,3,4}, ZHU Qian⁵, PENG Can^{1,2,3,4}, CHEN Wei-dong^{1,2,3,4}

1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China
2. Anhui Province Key Laboratory of Chinese Medicinal Formula, Hefei 230012, China
3. Synergetic Innovation Center of Anhui Authentic Chinese Medicine Quality Improvement, Hefei 230012, China
4. Institute of Pharmaceutics, Anhui Academy of Chinese Medicine, Hefei 230012, China
5. School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032, China

Abstract: Objective To investigate the therapeutic effect and potential mechanism of Zhenwu Decoction (ZWD) on chronic heart failure (CHF) rats. **Methods** HPLC fingerprint of ZWD was established. All male SD rats were randomly divided into the sham operation group, the model group, the low, medium and high dose ZWD group (2.187 5, 4.375, and 8.75 g/kg) and the captopril group (10 mg/kg). Except for the sham operation group, the rest of rats were all established into the CHF model rats by ligating the left anterior descending branch of the coronary artery, after 8 weeks, all rats were ig administration for 4 weeks. The hemodynamic, viscera

收稿日期: 2019-11-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81773988); 国家重点研发计划项目 (2017YFC1701600); 安徽省科技重大专项 (18030801131); 安徽省地方科技创新项目示范 (201907d07050002); 全国大学生创新创业训练计划项目 (2017043)

作者简介: 洪莉丽, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药复方物质基础。Tel: 18709864896 E-mail: 3193075140@qq.com

***通信作者** 陈卫东, 博士生导师, 教授, 研究方向为中药药剂学、药动学和临床药学。Tel: 15156091053 E-mail: wdchen@ahtcm.edu.cn

index, HE dyeing test were conducted at the end of experiments. Serum angiotensin II (Ang II), aldosterone (ALD), nuclear factor kappa B (NF- κ B), amino terminal brain natriuretic peptide (NT-proBNP), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin 6 (IL-6) were determined by ELISA, and myocardial NF- κ B protein expression was detected by Western blotting. **Results** Higenamine, paeoniflorin, atractylenolide III, 6-gingerol and dehydrotumulosic acid, the five constituents of Zhenwu Decoction, were identified by HPLC chart. Compared with the model group, the administration of the ZWD significantly improved the hemodynamic parameters ($P < 0.05$), reduced the organ index ($P < 0.05$) and improved myocardial injury, reduced the serum Ang II, ALD, NF- κ B, NT-proBNP, TNF- α and IL-6 levels and the myocardial NF- κ B protein expression ($P < 0.05$). **Conclusion** HPLC results provided an evidence for the quality control and pharmacodynamic substance of ZWD. ZWD can ameliorate CHF, which may be related to the inhibition of renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS)/NF- κ B/inflammatory factor cascade reaction.

Key words: Zhenwu Decoction; chronic heart failure; RAAS system; NF- κ B pathway; inflammatory; higenamine; paeoniflorin; atractylenolide III; 6-gingerol; dehydrotumulosic acid

慢性心力衰竭 (CHF) 是由于心脏结构或功能异常导致心脏泵血不足, 以至于无法满足全身组织器官代谢需要的一组临床综合征^[1], 是各种心血管疾病的终末状态和主要死亡原因^[2]。现代医学认为血流动力学异常是 CHF 的病理生理基础和结果, 而神经内分泌系统过度激活引起的心室重构是其主要原因, 此外, 离子通道障碍、氧化应激与炎症反应等参与了 CHF 的发生发展。大量研究已经证明心肌缺血时会导致一系列级联反应的发生, 肾素-血管紧张素-醛固酮 (RAAS) 系统过度激活产生的血管紧张素 II (Ang II) 可以激活核转录因子- κ B (NF- κ B) 通路及由其介导的心肌肥厚、纤维化和细胞凋亡过程^[3-4], 其与醛固酮 (ALD) 均可通过激活该信号通路, 进而引起肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和白细胞介素-6 (IL-6) 的过表达及最终的炎症反应^[5-8], 是 CHF 发生发展的关键因素。因此, 调控这类级联反应可以在一定程度上达到改善 CHF 的作用。

目前, 临床上对于 CHF 患者的治疗药物包括血管紧张素转换酶抑制剂 (ACEI)、利尿剂、 β 受体阻断剂及洋地黄等^[9]。然而, 由于这些药物所带来的严重副作用及病情易反复现象, 其使用受到了限制^[10-11]。在几千年中医药理论指导下, 中药复方凭借其多组分、多靶点、多途径的作用特点, 不仅能实现对疾病的整体治疗, 而且与化学药物相比还能干扰炎症反应^[12], 在各种慢性疾病的治疗中占有重要地位。真武汤源于东汉医家张仲景的《伤寒论》, 由附子、茯苓、白术、生姜、白芍 5 味药组成, 方中附子温肾助阳以化气行水, 暖脾抑阴以温运水湿; 茯苓、白术补气健脾、利水渗湿; 生姜温阳散寒; 白芍利小便、柔肝缓急; 全方泻中有补, 标本兼顾, 共奏温阳利水之功效, 有强心利尿、增强心肌收缩力、改善心室功能、促进新陈代谢、抗衰老的作用,

临床常用于治疗肾病综合征^[13-14]、帕金森病^[15]、CHF 等慢性疾病^[16]。而目前有关真武汤治疗 CHF 的研究大多为临床报告或研究机制单一, 有研究者应用网络药理学表明真武汤治疗 CHF 主要与 RAAS 系统有关, 但尚未对此做进一步实验验证^[17]。因此, 为了阐释真武汤治疗 CHF 的作用机制及药效物质基础, 本实验围绕 RAAS/NF- κ B/炎症因子级联反应开展了研究, 为筛选其作用靶点、推进中医药现代化提供基础。

1 材料

1.1 药品

附子 *Aconitum carmichaeli* Debx., 茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf., 白芍 *Paeonia lactiflora* Pall., 白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz. 购于安徽普仁中药饮片公司, 批号分别为 160401、160506、160521、160613, 生姜 *Zingiber officinale* Roscoe. 自制, 所有药材均由安徽中医药大学俞年军教授鉴定为正品。

卡托普利 (批号 170209) 购于上海衡山药业有限公司; 去甲乌药碱 (批号 Q-078-150731) 购于北京中科质检生物技术有限公司; 芍药苷、白术内酯 III (批号 110736201539、73030-71-4) 购于国家食品药品监督管理局; 6-姜辣素 (批号 MUST-17120205) 购于成都曼西特药业有限公司; 去氢土莫酸 (批号 160102) 购于成都克洛玛生物科技有限公司, 所有对照品质量分数均大于 98%。

1.2 动物

健康雄性 SD 大鼠 240~280 g, 由常州卡文斯实验动物有限公司提供, 实验动物许可证号 SCXK (苏) 2016-001。所有动物均在相同环境下饲养, 室温 (22 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C, 湿度 (50 $\pm$ 5) %, 光暗循环 12 h, 自由饮食进水。所有动物实验均由安徽医科大学动物伦理委员会审核通过。

1.3 材料

大鼠 Ang II、ALD、氨基末端脑钠肽(NT-proBNP) ELISA 试剂盒购于上海谷研实业有限公司; 大鼠 NF- κ B、IL-6、TNF- α ELISA 试剂盒购于江苏酶免实业有限公司; 兔抗 NF- κ B 抗体购于 Santa Cruz Biotechnology 公司; 二抗(山羊抗兔 IgG-HRP 标记)购于北京中杉金桥公司。

1.4 仪器

Agilent 1290 Infinity 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); Milli-Q Gradient A10(美国 Millipore 公司); Power Lab 多导生理记录仪(上海然哲仪器设备有限公司); BL-420S 科研型生物机能实验系统(成都泰盟软件有限公司)。

2 方法

2.1 真武汤制备

按照处方附子-茯苓-白芍-生姜-白术 9:9:9:9:6 称取一定量的药材, 浸渍于 420 mL 蒸馏水中 30 min, 煎煮 1.5 h, 滤过, 滤渣再加 336 mL 水继续煎煮 1 h。合并 2 次滤液浓缩至 2.1 g/mL, -20°C 冻存。

2.2 真武汤 HPLC 特征图谱的建立

HPLC-UV 法色谱条件如下: SHIMADZU LC-15C UV HPLC C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 进样量 20 μL , 柱温 30°C , 体积流量 1 mL/min, 波长 230 nm, 流动相为 0.05%磷酸水(A)-乙腈(B), 洗脱梯度: 0~10 min, 91%~88% A; 10~20 min, 88%~85% A; 20~33 min, 85%~65% A; 33~38 min, 65%~60% A; 38~48 min, 60%~52% A; 48~58 min, 52%~57% A; 58~62 min, 57%~91% A。

2.3 CHF 大鼠模型制备、分组及给药

通过结扎冠状动脉左前降支复制 CHF 大鼠模型并进行评价^[18-19]: 大鼠正常饲养 1 周后, ip 25%乌拉坦 1 000 mg/kg 麻醉, 仰卧固定于手术台, 监测心电图。沿胸骨左侧第 4、5 肋间钝性分离并在二者之间扩大大鼠胸腔, 暴露心脏, 用 6-0 丝线在左心耳根部下方 2~3 mm 处结扎冠状动脉左前降支。结扎后即刻观察心电图变化, 显示 2 个及以上导联 ST 段抬高即可视为结扎成功。上述模型大鼠适应性饲养 8 周后, 随机抽取 6 只大鼠检测血流动力学参数, 以左室舒张末压 ≥ 15 mmHg 为模型复制成功指标。假手术组大鼠仅穿线不结扎, 其余等同于上述模型复制过程。

造模成功大鼠随机分为模型组、卡托普利组(10

mg/kg) 和真武汤低、中、高剂量组(2.187 5、4.375、8.75 g/kg), 另设假手术组, 每组 6 只。模型组及假手术组大鼠 ig 给予相同剂量生理盐水, 各给药组大鼠 ig 相应剂量药物, 给药 4 周。

2.4 血流动力学参数测定

所有实验大鼠于末次给药后, ip 25%乌拉坦麻醉, 颈部切开 1 cm 左右切口, 分离右颈动脉, 结扎远心端颈动脉, 用动脉夹夹住近心端, 将充满肝素的聚苯乙烯动脉管插入左心室, 另一端连接 BL-420S 科研型生物机能实验系统同步检测左室舒张末压(LVEDP)、左室收缩压(LVSP)及左室内压最大上升速率($+dp/dt_{\max}$)、左室内压最大下降速率($-dp/dt_{\min}$)并记录数值。

2.5 脏器指数的测定

大鼠麻醉后迅速取心脏、脾脏、肾脏, 生理盐水润洗后滤纸吸干, 称定质量, 计算脏器指数。

脏器指数=脏器质量/体质量

2.6 HE 染色

大鼠心脏润洗后用 4%多聚甲醛固定, 经过酒精脱水和石蜡包埋系列步骤, 制成 4 μm 切片, HE 染色后光镜下观察组织病理学变化。

2.7 ELISA 法测定血清 Ang II、ALD、NF- κ B、NT-proBNP、TNF- α 、IL-6 水平

大鼠末次给药后 30 min, 麻醉, 腹主动脉取血, 室温放置 20 min, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 于 -20°C 冻存, ELISA 试剂盒测定血清中 Ang II、ALD、NF- κ B、NT-proBNP、TNF- α 、IL-6 水平。

2.8 Western blotting 检测大鼠心肌 NF- κ B 蛋白水平

称取 50 mg 左心室心肌, 用 1 mL RIPA 缓冲液(含 1 $\mu\text{mol/L}$ 苯甲磺酰氟)制备成组织匀浆, 12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 用 5% SDS-PAGE 分离蛋白质(80 V, 浓缩凝胶 30 min; 120 V, 分离凝胶 60 min)。电泳结束后, 取出硝酸纤维素膜, 加入由 1 $\times$ TBST 配制的 5%的脱脂奶粉封闭液, 37°C 封闭 1 h, 弃去封闭液。置于一抗 NF- κ B(1:1 000)、 β -actin(1:1 000)溶液中 4°C 孵育过夜; 回收一抗稀释液, 1 $\times$ TBST 洗 NC 膜, 洗 3 次, 每次 10 min; 配制二抗稀释液, 二抗 37°C 封闭 1 h; 吸去二抗, 1 $\times$ TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min; 每条膜滴加适量显色液, 置于凝胶成像仪中避光显色。以内参蛋白校正目的蛋白表达量。

2.9 统计学分析

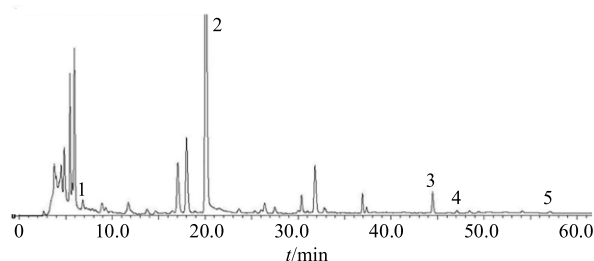
所有计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 软件

(IBM SPSS 23.0 software, 美国 IBM 公司) 进行统计分析, 各组间数据首先进行方差齐性和正态分布检验, 对于方差不齐和/或不符合正态分布的参数, 采用非参数检验 (Kruskal-Wallis test), 对于方差齐并且符合正态分布的参数, 采用 One-way ANOVA 单因素方差分析, LSD 检验进行组间两两比较。

3 结果

3.1 真武汤 HPLC 特征图谱

本研究建立的特征图谱各峰峰形及分离度良好 (图 1), 通过与对照品比对, 明确并定量真武汤中 5 种化学成分去甲乌药碱 (峰 1)、芍药苷 (峰 2)、白术内酯 III (峰 3)、6-姜辣素 (峰 4)、去氢土莫酸 (峰 5), 各组分质量浓度分别为 0.346 8、23.310 0、1.011 0、0.128 9、0.085 5 mg/mL。经方法学验证, 5 种成分的精密密度 (峰面积 RSD 分别为 3.81%、1.04%、1.62%、2.20%、3.07%)、重复性 (峰面积 RSD 分别为 2.74%、4.90%、2.89%、4.64%、3.74%)、稳定性 (峰面积 RSD 分别为 3.15%、1.13%、3.55%、2.76%、2.55%) 均符合要求 ($RSD < 5\%$)。为真武



1-去甲乌药碱 2-芍药苷 3-白术内酯 III 4-6-姜辣素 5-去氢土莫酸

1-higenamine 2-paeoniflorin 3-atractylenolide III 4-6-gingerol 5-dehydrotumulosic acid

图 1 真武汤 HPLC 特征图谱

Fig. 1 Specific HPLC chromatogram of ZWD extract

汤的质量控制提供了依据。

3.2 真武汤对 CHF 大鼠血流动力学的影响

如表 1 所示, 与假手术组比较, 模型组大鼠 LVEDP 及 $-dp/dt_{min}$ 显著升高 ($P < 0.01$), LVSP 及 $+dp/dt_{max}$ 显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 真武汤能显著降低大鼠 LVEDP, 升高 LVSP 及 $+dp/dt_{max}$ ($P < 0.05$ 、 0.01)。

3.3 真武汤对 CHF 大鼠脏器指数的影响

如图 2 所示, 与假手术组比较, 模型组大鼠心脏、脾脏、肾脏指数显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 真武汤各剂量和卡托普利均能显著降低大鼠心脏、脾脏、肾脏指数 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

3.4 真武汤对 CHF 大鼠心脏组织病理学的影响

如图 3 所示, 假手术组大鼠心肌细胞排列有序, 细胞间隙正常, 细胞核位于细胞中央。模型组大鼠心肌细胞核固缩, 细胞排列紊乱, 心肌纤维断裂扭曲, 梗死区周围大量炎性细胞浸润。真武汤给药后, 可见大鼠心肌细胞纤维断裂扭曲现象有所改善, 梗死面积及炎性细胞浸润减少。

3.5 真武汤对 CHF 大鼠血清 ALD、Ang II、NT-proBNP、TNF- α 、IL-6 及 NF- κ B 水平的影响

如图 4 所示, 与假手术组比较, 模型组大鼠血清中 ALD、Ang II、NT-proBNP、TNF- α 、IL-6 及 NF- κ B 水平显著增加 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 真武汤各剂量给药后, 大鼠血清中 ALD、Ang II、NT-proBNP、TNF- α 、IL-6 及 NF- κ B 水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

3.6 真武汤对 CHF 大鼠心肌 NF- κ B 蛋白表达的影响

如图 5 所示, 与假手术组比较, 模型组大鼠心肌 NF- κ B 蛋白表达水平显著性增加 ($P < 0.01$), 而真武汤各剂量及卡托普利均能够显著降低模型鼠心肌 NF- κ B 蛋白水平 ($P < 0.01$)。

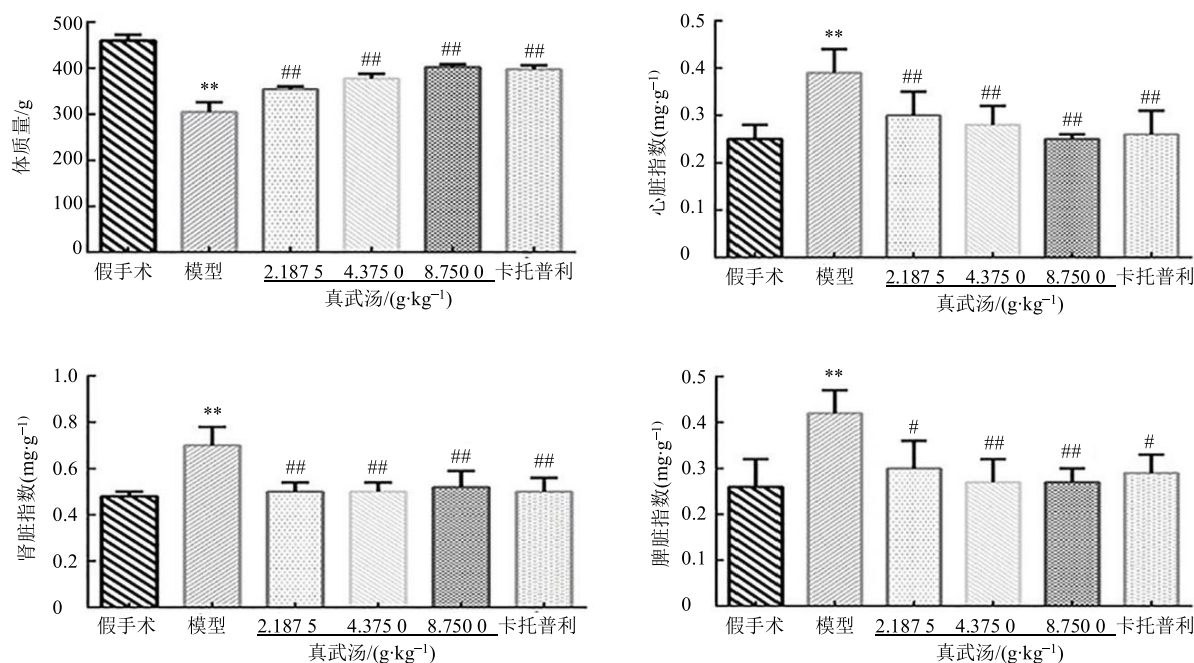
表 1 真武汤对 CHF 大鼠血流动力学的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effects of ZWD on hemodynamics parameters of CHF rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	LVEDP/mmHg	LVSP/mmHg	$+dp/dt_{max}/(mmHg \cdot s^{-1})$	$-dp/dt_{min}/(mmHg \cdot s^{-1})$
假手术	—	9.86 ± 3.45	105.60 ± 3.13	4.91 ± 0.47	-3.55 ± 0.16
模型	—	32.81 ± 0.97**	69.41 ± 1.95**	0.83 ± 0.06**	-0.85 ± 0.04**
卡托普利	0.010 0	21.50 ± 3.17##	79.66 ± 6.96##	1.06 ± 0.14##	-0.95 ± 0.16
真武汤	2.187 5	28.99 ± 1.20##	73.23 ± 5.08#	0.90 ± 0.07	-0.84 ± 0.05
	4.375 0	20.20 ± 3.89##	82.20 ± 9.78##	1.04 ± 0.27##	-0.98 ± 0.26
	8.750 0	20.23 ± 3.91##	79.96 ± 5.90##	0.98 ± 0.09##	-0.92 ± 0.08

与假手术组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs Sham group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group



与假手术组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$, 下图同
 ** $P < 0.01$ vs Sham group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group, same as below figures

图 2 真武汤对 CHF 大鼠脏器指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Effects of ZWD on organ indexes of CHF rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

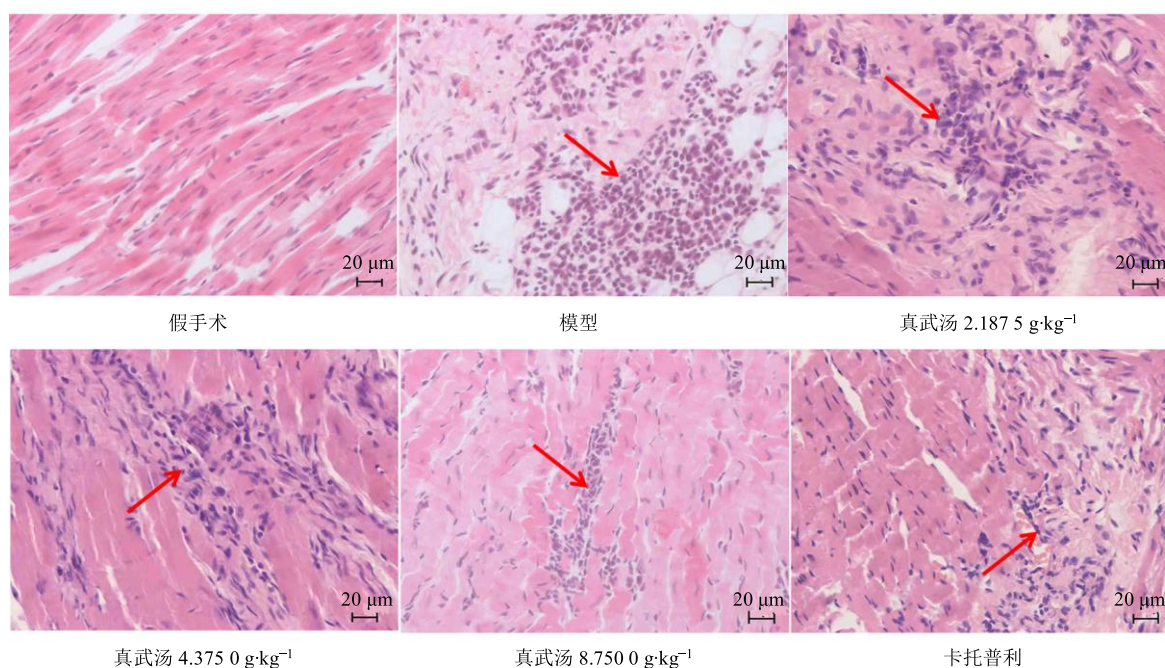


图 3 真武汤对 CHF 大鼠心脏组织病理学的影响 ($\times 400$)

Fig. 3 Effects of ZWD on heart tissue pathology of CHF rats ($\times 400$)

4 讨论

4.1 真武汤的质量控制及潜在药效物质基础

为保证真武汤质量可控, 本研究建立了 HPLC 图谱并通过对照品比对待指出了 5 种化学成分: 去

甲乌药碱、芍药苷、白术内酯 III、6-姜辣素、去氢土莫酸。研究表明, 君药附子及其有效成分去甲乌药碱可以增强心脏功能^[20-21], 而源于佐药生姜的活性成分 6-姜辣素与去甲乌药碱合用时能够增强其强

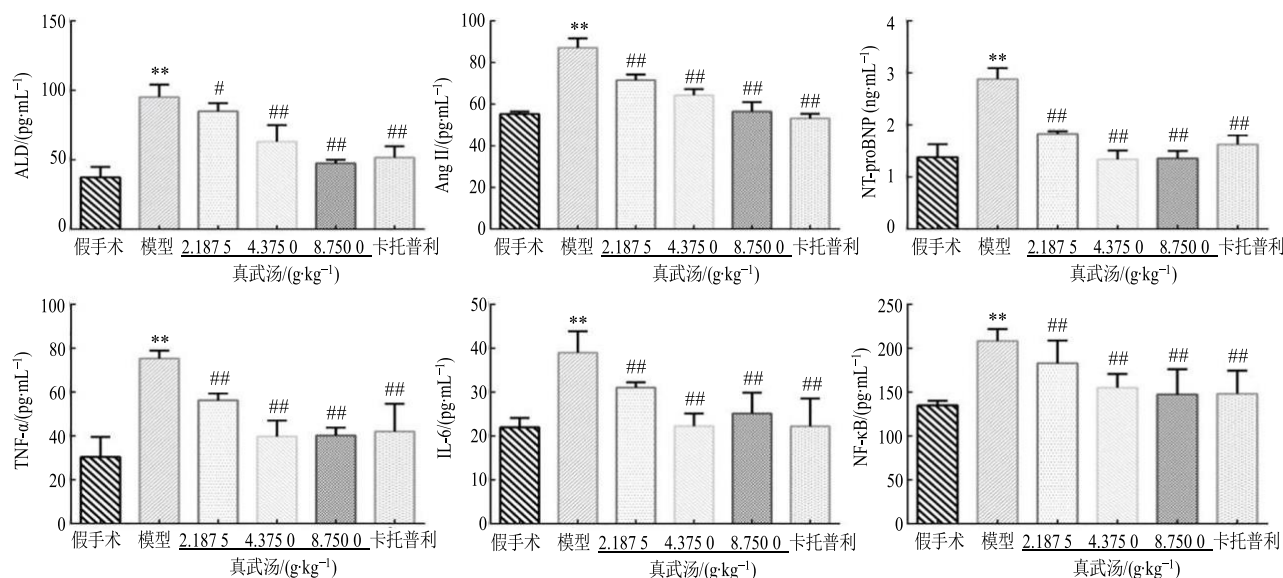


图 4 真武汤对 CHF 大鼠血清 ALD、Ang II、NT-proBNP、TNF-α、IL-6 及 NF-κB 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 4 Effects of ZWD on ALD, Ang II, NT-proBNP, TNF-α, IL-6 and NF-κB levels of CHF rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

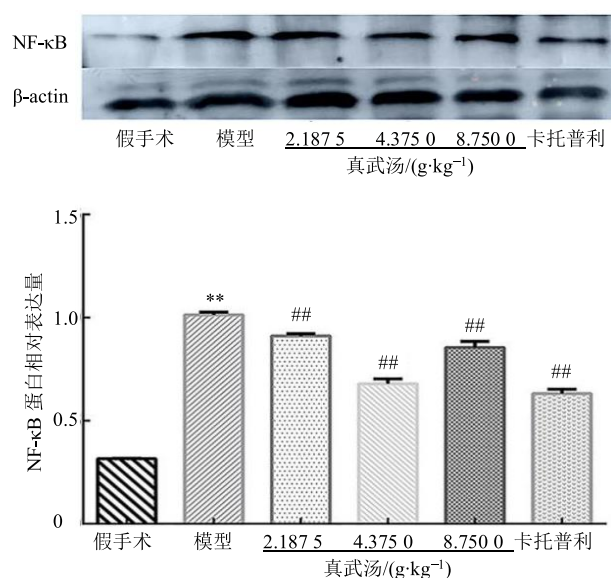


图 5 真武汤对 CHF 大鼠心肌 NF-κB 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effects of ZWD on myocardial NF-κB protein expression of CHF rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

心作用^[22-23], 且姜辣素可抑制胞浆 NF-κB p65 入核, 阻断 NF-κB 通路的激活^[24]。芍药中主要成分芍药苷亦可以通过 NF-κB 通路减轻压力超负荷引起的心室重构^[25], 白术中的白术内酯 III 具有抑制炎症因子作用^[26]。同时, 血流动力学等相关指标结果表明真武汤对 CHF 具有一定程度的治疗作用, 但这 5 种物质是否为真武汤主要药效物质基础还有待于进一步探索。

4.2 真武汤可能通过调节 RAAS 系统控制 NF-κB 通路

RAAS 在 CHF 的发展中发挥着重要作用, 且与 NF-κB 通路密切相关^[27]。NT-proBNP 是利钠肽 (NPs) 家族重要成员之一, 是由心肌细胞产生的血管肽类激素, 会导致心室壁扩张, 被认为是 CHF 发生发展的生物标志物^[28-29], 值得注意的是, NF-κB 可以诱导心房钠肽 (ANP) 和脑钠肽 (BNP) 基因启动, 导致心肌细胞肥大和基质金属蛋白酶活化, 最终导致心室重构^[30]。Ang II 是 CHF 患者 RAAS 激活时产生的血管活性物质, 能促进交感神经末梢释放去甲肾上腺素, 导致心室重构^[31]。ALD 是由肾上腺皮质 (Zg) 产生的一种类固醇激素, 能增加肾的重吸收和血容量, 参与 CHF 过程中心肌肥厚和纤维化, 进而导致炎症和纤维化^[32]。本研究结果表明, CHF 大鼠血清中 NT-proBNP、Ang II、ALD 及 NF-κB 水平显著增加, 而真武汤可以抑制这些因子的水平及 NF-κB 蛋白表达, 并表现出一定剂量依赖性。基于 RAAS 与 NF-κB 反应间级联性推测, 真武汤后能够降低 Ang II 及 ALD 水平, 进一步抑制 CHF 状态下 NF-κB 通路的激活, 导致 NT-proBNP 基因的启动处于失活状态, 改善心室重构, 从而减缓了 CHF 的进一步发展。

4.3 真武汤可能通过调节 NF-κB 通路减轻炎症反应

研究表明, TNF-α 可以激活 NF-κB 转录到细胞核并且诱导 TNF-α、IL-6、环氧化酶 (COX) 等炎

症因子的表达,该通路的激活又会加强上述细胞因子基因的转录从而再一次激活 NF- κ B,形成促进炎症反应的正反馈环,同时诱导其他炎症因子表达^[33-34]。在本研究中,真武汤可以逆转 TNF- α 和 IL-6 水平的增加,且与心肌 NF- κ B 蛋白表达具有一致性,同时与 HE 染色结果互为佐证,鉴于此,推测真武汤可能通过抑制 NF- κ B 通路,减少上述促炎因子的表达,减轻炎症反应。

4.4 NF- κ B 蛋白测定在级联反应过程中的生物学意义

NF- κ B 是一种具有基因转录多向调控功能的核转录因子,可以调节多种细胞因子的表达。其在心肌中表达丰富,作为 RAAS/NF- κ B/炎症因子级联反应的核心,是心肌炎症、心肌细胞凋亡和心脏重塑的关键,在 CHF 的进行性发展过程中扮演着承上启下的角色^[35-38],有效调控其表达,对于阻止疾病的进一步发展至关重要。因此,本研究在测定血清 NF- κ B 水平的基础上进一步测定了其蛋白表达。本研究中测定的是 NF- κ B p65 总蛋白,而 NF- κ B 的活化一般为其二聚体(主要是 p65/p50)游离后核移位从而启动靶基因的转录,引起下游反应。因此,本研究结果对该通路的作用起到方向性作用,为进行相应核 NF- κ B p65 蛋白检测提供理论依据及基础,相关研究有待于进一步探索。

鉴于中药复方多途径、多靶点的特点,即使单一系统之间存在这种反应级联性,同时作用于不同时间窗出现的病理反应也很可能是真武汤发挥疗效的关键。本研究阐述了可能的靶点和通路及各系统之间的级联性反应,为后期探讨真武汤治疗 CHF 的作用机制及药效物质基础提供了方向。

参考文献

- [1] Tuunanen H, Knuuti J. Metabolic remodeling in human heart failure [J]. *Cardiovasc Res*, 2011, 90(2): 251-257.
- [2] Akhmedov A T, Rybin V. Mitochondrial oxidative metabolism and uncoupling proteins in the failing heart [J]. *Heart Fail Rev*, 2015, 20(2): 2272-2249.
- [3] Chen X Q, Liu X, Wang Q X, et al. Pioglitazone inhibits angiotensin II-induced atrial fibroblasts proliferation via NF- κ B/TGF- β 1/TRIF/TRAF6 pathway [J]. *Exp Cell Res*, 2015, 330(1): 43-55.
- [4] Yao W, Wang N, Qian J, et al. Renal sympathetic denervation improves myocardial apoptosis in rats with isoproterenol-induced heart failure by downregulation of tumor necrosis factor- α and nuclear factor- κ B [J]. *Exper Ther Med*, 2017, 14(5): 4104-4110.
- [5] Frati G, Schirone L, Schirone L, et al. An overview of the inflammatory signalling mechanisms in the myocardium underlying the development of diabetic cardiomyopathy [J]. *Cardiovasc Res* 2017, 113(4): 378-388.
- [6] Dai W, Hale S L, Kay G L, et al. Cardioprotective effects of angiotensin II type 1 receptor blockade with olmesartan on reperfusion injury in a rat myocardial ischemia-reperfusion model [J]. *Cardiovasc Ther*, 2010, 28(1): 30-37.
- [7] Bosselmann H, Tonder N, Sölétormos G, et al. Influence of kidney impairment on aldosterone status, calcium metabolism, and vasopressin activity in outpatients with systolic heart failure [J]. *ESC Heart Fail*, 2017, 4(4): 554-562.
- [8] 刘 皆. 螺内酯对醛固酮诱导的大鼠肾小球系膜细胞氧化应激及 NF- κ B、MCP-1 表达的影响 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2012.
- [9] Li X, Zhang J, Huang J, et al. A multicenter, randomized, double-blind, parallel-group, placebo-controlled study of the effects of Qili Qiangxin Capsules in patients with chronic heart failure [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2013, 62(12): 1065-1072.
- [10] Guo N, Yang D, Wang X, et al. Metabonomic study of chronic heart failure and effects of Chinese herbal decoction in rats [J]. *J Chromatogr A*, 2014, doi: 10.1016/j.chroma.2014.08.028.
- [11] Parang P, Singh B, Arora R. Metabolic modulators for chronic cardiac ischemia [J]. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2015, 10(4): 217-223.
- [12] 张天庆, 顾健霞. 中医药对慢性心衰炎症细胞因子影响研究进展 [J]. *亚太传统医药*, 2015, 11(24): 58-59.
- [13] 宋业旭. 真武汤调控肾间质纤维化 NF- κ B 信号通路的实验研究 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2012.
- [14] Li X M, Xu C L, Deng J M, et al. Protective effect of Zhen-Wu-Tang (ZWT) through keeping DA stable and VMAT 2/DAT mRNA in balance in rats with striatal lesions induced by MPTP [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 134(3): 768-774.
- [15] Li X M, Ma H B, Ma Z Q, et al. Ameliorative and neuroprotective effect in MPTP model of Parkinsons disease by Zhen-Wu-Tang (ZWT), a traditional Chinese medicine [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, doi: 10.1016/j.jep.2010.03.020.
- [16] Tang Q, Wang Y. Zhenwu Decoction for chronic heart failure: Protocol for a systematic review and meta-analysis [J]. *Medicine*, 2018, 97(29): e11559.
- [17] 伍燕宏, 郑景辉, 朱梓铭, 等. 真武汤治疗慢性心力衰

- 竭的网络药理学机制研究 [J]. 广州中医药大学学报, 2019, 36(10): 1617-1623.
- [18] Couto G K, Paula S M, Gomes-Santos I L, *et al.* Exercise training induces NOS coupling and restores relaxation in coronary arteries of heart failure rats [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2018, doi: 10.1152/ajpheart.00624.2017.
- [19] Pacheco D M, Silveira V D, Thomaz A, *et al.* Chronic heart failure modifies respiratory mechanics in rats: A randomized controlled trial [J]. *Braz J Phys Ther*, 2016, 20(4): 320-327.
- [20] Zhang N, Lian Z, Peng X, *et al.* Applications of Higenamine in pharmacology and medicine [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, doi: 10.1016/j.jep.2016.12.033.
- [21] Wang L Q, He Y, Zhang Y Y, *et al.* Effects of active components of Fuzi and Gancao compatibility on Bax, Bcl-2, and Caspase-3 in chronic heart failure rats [J]. *Evid Based Compl Alter Med*, 2016, doi: 10.1155/2016/7686045.
- [22] Zhang L, Lu X, Wang J, *et al.* Zingiberis Rhizoma mediated enhancement of the pharmacological effect of *Aconiti Lateralis Radix Praeparata* against acute heart failure and the underlying biological mechanisms [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, doi: 10.1016/j.biopha.2017.09.145.
- [23] Chen Y L, Zhuang X D, Xu Z W, *et al.* Higenamine combined with [6]-gingerol suppresses doxorubicin-triggered oxidative stress and apoptosis in cardiomyocytes via upregulation of PI3K/Akt pathway [J]. *Evid Based Compl Alter Med*. 2013, doi: 10.1155/2013/970490.
- [24] 金羊平. 生姜中姜辣素类成分对半夏、掌叶半夏毒性的解毒机制研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2016.
- [25] Zhou H, Yang H X, Yuan Y, *et al.* Paeoniflorin attenuates pressure overload-induced cardiac remodeling via inhibition of TGF β /Smads and NF- κ B pathways [J]. *J Mol Histol*, 2013, 44(3): 357-367.
- [26] Ji G Q, Chen R Q, Wang L. Anti-inflammatory activity of atractylenolide III through inhibition of nuclear factor- κ B and mitogen-activated protein kinase pathways in mouse macrophages [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2016, 38(2): 98-102.
- [27] Volpe M, Carnovali M, Mastromarino V. The natriuretic peptides system in the pathophysiology of heart failure: From molecular basis to treatment [J]. *Clin Sci*, 2016, 130(2): 57-77.
- [28] Gao P, Zhu Q, Bian S, *et al.* Prognostic value of plasma NT-proBNP levels in very old patients with moderate kidney insufficiency in China [J]. *Zgerontol Geriatr*, 2018, 51(8): 889-896.
- [29] McMurray J J, Adamopoulos S, Anker S D, *et al.* ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012 [J]. *Turk Kardiyol Dern Ars*, 2012, 40(Suppl 3): 77-137.
- [30] Ahokas R A, Sun Y, Bhattacharya S K, *et al.* Aldosteronism and a proinflammatory vascular phenotype: Role of Mg²⁺, Ca²⁺, and H₂O₂ in peripheral blood mononuclear cells [J]. *Circulation*, 2005, 111(1): 51-57.
- [31] Kerkelä R, Ulvila J, Magga J. Natriuretic peptides in the regulation of cardiovascular physiology and metabolic events [J]. *J Am Heart Assoc*, 2015, 4(10): e002423.
- [32] Xie Z X, Wang S Y, Liang Z J, *et al.* Effect of Zhenwu Tang Granule on pressure-overloaded left ventricular myocardial hypertrophy in rats [J]. *World J Emerg Med*, 2010, 1(2): 149-153.
- [33] Liu C, Cao F, Tang Q Z, *et al.* Alicin protects against cardiac hypertrophy and fibrosis via attenuating reactive oxygen species-dependent signaling pathways [J]. *J Nutr Biochem*, 2010, 21(12): 1238-1250.
- [34] Kumar S, Seqqat R, Chigurupati S, *et al.* Inhibition of nuclear factor κ B regresses cardiac hypertrophy by modulating the expression of extracellular matrix and adhesion molecules [J]. *Free Radic Biol Med*, 2011, 50(1): 206-215.
- [35] Deswal A, Petersen N J, Feldman A M, *et al.* Cytokines and cytokine receptors in advanced heart failure: an analysis of the cytokine database from the Vesnarinone trial (VEST) [J]. *Circulation*, 2001, 10(5): 52-53.
- [36] Yu Y, Kang Y M, Zhang Z H, *et al.* Increased cyclooxygenase-2 expression in hypothalamic paraventricular nucleus in rats with heart failure: The role of nuclear factor kappa B [J]. *Hypertension*, 2007, doi: 10.1161/01.HYP.0000257356.20527.c5.
- [37] Cai Y, Chen J, Jiang J, *et al.* Zhen-wu-tang, a blended traditional Chinese herbal medicine, ameliorates proteinuria and renal damage of streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 131(1): 88-94.
- [38] Blum A, Miller H. Pathophysiological role of cytokines in congestive in congestive heart failure [J]. *Annu Rev Med*, 2001, doi: 10.1146/annurev.med.52.1.15.