

# 益气养心饮对实验性心力衰竭大鼠 TLR4 通路的影响

王萌 邓悦 刘美含 沈奕岑

**【摘要】 目的** 通过观察益气养心饮改善实验性心力衰竭大鼠心室重构、炎症状态相关指标,探讨中药对 TLR4 通路表达及炎症因子产生的影响和分子机制。**方法** 选择 4 月龄 Wistar 雄性大鼠 300 只随机分出假手术组 10 只,剩下 290 大鼠造模筛选出 30 只,按心脏彩色多普勒超声测心脏射血分数(ejection fraction, EF) <60% 随机区组分为模型组、中药组、缬沙坦组,每组各 10 只,以缬沙坦为阳性对照组,观察益气养心饮对慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF)大鼠 toll 样受体 4 (toll-like receptor 4, TLR4)、核转录因子- $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白介素-6(interleukin-6, IL-6)相关炎症因子表达的影响,并取心肌组织切片,采用 HE 在光镜下观察损伤程度。采用单因素方差分析对所有实验数据进行统计学处理。**结果** (1) 与 CHF 模型组相比,各给药组 CHF 大鼠 TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平均明显下降,有统计学意义( $P = 0.000 < 0.05$ );(2) CHF 模型组大鼠心肌 TLR4、NF- $\kappa$ B 蛋白表达明显高于假手术组( $P = 0.000 < 0.05$ );而各给药组 TLR4、NF- $\kappa$ B 蛋白表达较 CHF 模型组均明显下降( $P = 0.000 < 0.05$ );(3) 各给药组 CHF 大鼠心肌组织经 HE 染色观察,其损伤均有不同程度的减轻。**结论** 益气养心饮能够改善 CHF 大鼠的炎症状态,降低 CHF 大鼠血浆与心肌中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 的含量,抑制心肌组织 TLR4、NF- $\kappa$ B 炎症因子表达,可能是其抑制慢性心力衰竭进程的机制之一。

**【关键词】** 慢性心力衰竭; 炎症; 益气养心饮; 大鼠

**【中图分类号】** R541.6 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2015.02.008

**Effect of Yiqi Yangxin Decoction on TLR4 pathways in rats with chronic heart failure** WANG Meng, DENG Yue, LIU Mei-han, et al. The Affiliated Hospital to Changchun University Of Chinese Medicine, Changchun 130000, China  
Corresponding author: DENG Yue, E-mail: dyue7138@sina.com

**【Abstract】 Objective** We study effects of Chinese medicine on the expression of toll-like receptor 4 (TLR4) pathway and the molecular mechanisms of inflammatory factors by observing the ventricular remodeling and inflammatory states of rats with experimental heart failure improved by Yiqi Yangxin Decoction. **Methods** From the 300 4-month-old male Wistar rats, 10 rats were randomly assigned to the sham-operation group. 30 rats were selected from the rest of 290 rats by molding method, and then randomly assigned to the model group, the Chinese Medicine group and Valsartan group (10 in each group) according to the ejection fraction (EF) <60%. With Valsartan group as the positive control, we investigated the expression of TLR4, nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-6 (IL-6) of rats with chronic heart failure (CHF). Myocardial damage was observed by microscope. All the data were processed by one-way ANOVA. **Results** (1) Compared with the CHF model group, the levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 in each group were decreased significantly ( $P < 0.05$ ). (2) The proteins expression of TLR4 and NF- $\kappa$ B in myocardium of the CHF model group was significantly higher than which in sham operation group ( $P < 0.05$ ). The expression of TLR4 and NF- $\kappa$ B proteins in each group was significantly de-

作者单位:130000 长春中医药大学附属医院传统诊疗中心(王萌),心内科(邓悦);吉林大学第三医院中日联谊医院电诊科(刘美含);长春市南关区正一堂中医门诊(沈奕岑)

作者简介:王萌(1981-),女,硕士,医师。研究方向:心血管方向。E-mail: 793674799@qq.com

通讯作者:邓悦(1962-),博士,教授,博士生导师。研究方向:心血管方向。E-mail: dyue7138@sina.com

creased compared with the CHF model group ( $P < 0.05$ ). (3) The damage of myocardial tissue in each group of rats with CHF, observed by HE immunohistochemical staining, was alleviated to varying degrees.

**Conclusion** could improve the inflammation of rats with CHF, decrease the content TNF- $\alpha$  and IL-6 in the plasma and myocardium of rats, inhibit the expression of TLR4, NF- $\kappa$ B in myocardial tissue e, which might be one of the mechanisms for *Yiqi Yangxin* Decoction to inhibit the developing of CHF.

**【Key words】** Chronic heart failure; Inflammation; Ventricular remodeling; *Yiqi Yangxin* Decoction; Rats

近年来,大量研究证明炎性反应是慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF)病理生理的重要机制之一,且对于其炎症通路及炎性细胞因子的研究也成为目前的研究热点。有报道指出心力衰竭时,内源性免疫应答作为心脏的内源性应急反应,通过心肌组织中 toll 样受体(toll-like acceptor, TLR)介导,激活核转录因子- $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B),促使致炎细胞因子:肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白介素-6(interleukin-6, IL-6)产生,引起心肌损害<sup>[1]</sup>。因此细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6、TLR4 受体和核转录因子 NF- $\kappa$ B 的检测可作为心力衰竭病例生理状态和预后评价的标记物。

## 1 实验材料与方法

### 1.1 实验动物

4 月龄清洁 Wistar 雄性大鼠 300 只,体质量为(250 $\pm$ 20) g,购进日期 2013 年 6 月 1 日,均由吉林大学药学院动物实验中心提供。

### 1.2 药物

药物益气养心饮:黄芪 25 g、丹参 15 g、川芎 10 g、红景天 12 g、葶苈子 20 g、莱菔子 15 g、枳实 12 g、白茅根 30 g。生药由长春中医药大学附属医院制剂中心提供,由中药房代煎,吉林大学医学院动物实验研究室浓缩而成,中药液含生药量为 3.36 g/mL, 4℃ 冰箱保存。成药:缬沙坦,北京诺华制药有限公司,规格:80 mg $\times$ 7 粒/盒,批号:201304。

### 1.3 试剂

兔抗鼠 TLR4 多克隆抗体,北京博奥森生物技术有限公司;兔抗鼠 NF- $\kappa$ Bp65 单克隆抗体(C-20):ZS-372,北京中杉金桥生物技术有限公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗,北京中杉金桥生物技术有限公司;TNF- $\alpha$ 、IL-6 ELISA 试剂盒,R&D system 公司。

### 1.4 主要仪器

漩涡混合器(上海 XW-80A),超声器(MODEL CV188),数显恒温水箱(金坛 HH-W-420),震荡培

养箱(哈尔滨 HZQ-X100)。

### 1.5 动物造模与分组

300 只 Wistar 雄性大鼠随机分出假手术组 10 只,仅穿线不结扎冠状动脉左前降支(全部存活);剩下 290 大鼠参照文献<sup>[2-3]</sup>采用结扎冠状动脉左前降支法来建立心肌梗死大鼠模型,按心脏彩色多普勒超声测心脏射血分数(ejection fraction, EF) < 60% 为造模成功,共 65 只,再按 EF 值筛选出最优的 30 只,最后按 EF 值随机区组分为模型组、中药组、缬沙坦组各 10 只。

### 1.6 给药

模型组和假手术组给予灭菌蒸馏水每只每天 2 mL;中药组给药量为 2.085 g/kg;缬沙坦组为 20 mg/kg。每天一次,连续灌胃 28 天。

### 1.7 观测项目

给药 28 天后,大鼠经眼球取血后摘取心脏,摘取其心尖部心肌组织,一部分组织在 10% 福尔马林溶液中固定;另一部分组织 -80℃ 低温保存。

取部分心肌组织采用 HE 染色法,观测心肌组织形态学改变。

Western blot 实验检测心肌 TLR4、NF- $\kappa$ B 的蛋白表达。取左室心肌 50 mg,提取总蛋白;起初用 60 V 电泳至溴酚蓝指示剂进入分离胶后,将再电压改为 120 V 至电泳结束。100 V 恒压转膜 60 分钟;随后将膜置于含 5% 脱脂奶粉的 0.1% Tween20 的 TBST 溶液的自封袋中,室温摇床封闭 1 小时;加一抗:TLR4(1:200)、NF- $\kappa$ B p65(1:500),4℃ 冰箱过夜;次日再用 TBST 洗膜 3 次;加二抗(1:5000):室温下摇床摇动 1 小时;TBST 洗膜 3 次;将 A、B 发光液以 1:1 的比例混匀 1 分钟后滴加在膜上,用保鲜膜包好;在暗室中用 X 光片曝光,并用常规方法显影、定影;运用 Image J 软件对其进行分析。

采用大鼠血清因子 ELISA 试剂盒测各组标本血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 的浓度。

### 1.8 统计学分析

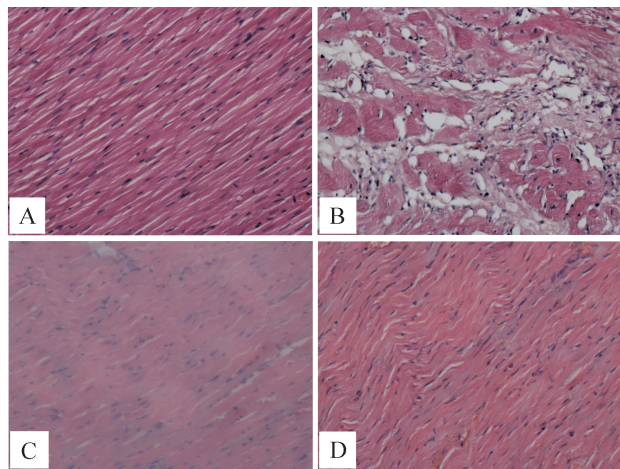
采用 SPSS 15.0 数据分析软件对上述所有实验

数据进行统计学处理。各组实验数据均为正态分布,且方差齐,以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用单因素方差分析(one-way ANOVA),两两比较采用LSD分析,以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 大鼠心肌组织形态学改变

假手术组:大鼠心肌细胞排列规整,心肌闰盘、肌纤维横纹清晰,心肌细胞核位于边缘,核大小、形态正常,心肌纤维未见断裂缺损及空白区,无炎性细胞浸润,并未出现细胞萎缩与肥大现象。模型组:CHF大鼠心内膜下层可见大片纤维化区域和散在的局部心肌坏死灶,心肌纤维数目减少,横纹变浅,形成疤痕组织,结缔组织增生明显;剩余的心肌细胞相互交织,无横纹、心肌闰盘,心肌纤维明显增粗,排列紊乱,肿胀、断裂、横纹肌消失,甚至溶解,心肌结构松弛,发生炎性细胞浸润及间质纤维化现象,细胞核增大,亦有部分核固缩,可见空白区,相邻细胞闰盘间隙明显增宽。给药组:与假手术组比较,心肌细胞排列稍紊乱,心肌细胞间隙间仍有部分纤维组织,有少量炎性细胞浸润;但与模型对照组相比较,心肌细胞排列较为整齐,纤维增生程度相对减轻,残余心肌细胞明显增多,横纹较清晰,疤痕组织增生明显减轻;中药组与阳性药对照组无明显差异。见图1。

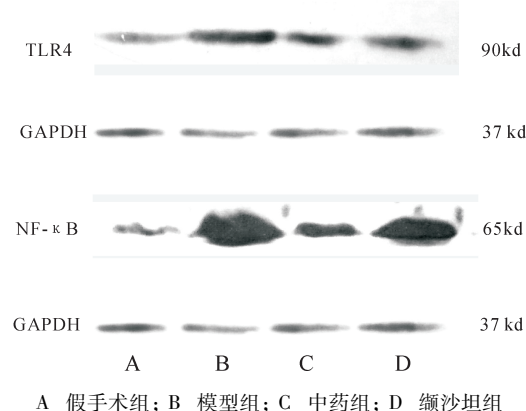


A 假手术组 B 模型组 C 中药组 D 缬沙坦组  
图1 中药益气养心饮对CHF大鼠心肌病理图  
(HE染色 $\times 200$ )

### 2.2 各组药物对CHF大鼠心肌TLR4、NF- $\kappa$ B表达的影响

在计算TLR4时,经单因素方差分析, $F = 1212.98$ ,

$P = 0.000$ ,  $P < 0.05$ ,有统计学意义,经LSD两两比较后发现,假手术组大鼠心肌表达的TLR4蛋白与中药组、缬沙坦组无统计学差异;显著低于模型组( $P < 0.01$ )。与模型组相比,中药组、缬沙坦组心肌TLR4蛋白的表达显著减少( $P < 0.05$ )。中药组与缬沙坦组相比有差异( $P < 0.05$ )。见图2、表1。



A 假手术组; B 模型组; C 中药组; D 缬沙坦组  
图2 各组药物对大鼠心肌中TLR4、NF- $\kappa$ B表达的Western blot电泳条带

表1 各组药物对大鼠心肌TLR4、NF- $\kappa$ B的蛋白相对表达量的比较( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

组别	TLR4	NF- $\kappa$ B
假手术组	10620.91 $\pm$ 196.31 <sup>a</sup>	12993.38 $\pm$ 198.67 <sup>a</sup>
模型组	39378.46 $\pm$ 124.49 <sup>b</sup>	108335.01 $\pm$ 176.54 <sup>b</sup>
益气养心饮组	15234.16 $\pm$ 281.10 <sup>a</sup>	32244.94 $\pm$ 215.96 <sup>a</sup>
缬沙坦组	26806.79 $\pm$ 307.20 <sup>a</sup>	31463.57 $\pm$ 228.09 <sup>a</sup>

注:与模型组相比,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与假手术组相比,<sup>b</sup> $P < 0.01$

在计算NF- $\kappa$ B时,经单因素方差分析, $F = 31429.96$ ,  $P = 0.000$ ,  $P < 0.05$ ,有统计学意义,经LSD两两比较后发现,假手术组大鼠心肌表达的NF- $\kappa$ B p65蛋白与中药组、缬沙坦组无统计学差异;显著低于模型组( $P < 0.01$ )。与模型组相比,中药组、缬沙坦组心肌NF- $\kappa$ B p65蛋白的表达显著减少( $P < 0.05$ )。中药组与缬沙坦组相比有差异( $P < 0.05$ )。见图2、表1。

### 2.3 各组药物对CHF大鼠血清中TNF- $\alpha$ 、IL-6含量的影响

在计算TNF- $\alpha$ 时,经单因素方差分析, $F = 52.826$ ,  $P = 0.000$ ,  $P < 0.05$ ,有统计学意义,经LSD两两比较后发现,假手术组大鼠TNF- $\alpha$ 与中药组、缬沙坦组无统计学差异;显著低于模型组( $P < 0.01$ )。与模型组相比,中药组、缬沙坦组TNF- $\alpha$ 的含量显著减少( $P < 0.05$ )。中药组与缬沙坦组相比

无明显差异( $P > 0.05$ )。见表 2。

在计算 IL-6 时,经单因素方差分析, $F = 46, P = 0.000, P < 0.05$ ,有统计学意义,经 LSD 两两比较后发现,假手术组大鼠 IL-6 与中药组、缬沙坦组无统计学差异;显著低于模型组( $P < 0.01$ )。与模型组相比,中药组、缬沙坦组 IL-6 的含量显著减少( $P < 0.05$ )。中药组与缬沙坦组相比无明显差异( $P > 0.05$ )。见表 2。

表 2 ELISA 法检测各组大鼠血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 的比较( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	TNF- $\alpha$ (ng/L)	IL-6(ng/L)
假手术组	159.42 $\pm$ 3.17 <sup>a</sup>	88.35 $\pm$ 2.68 <sup>a</sup>
模型组	291.10 $\pm$ 5.25 <sup>b</sup>	141.03 $\pm$ 1.35 <sup>b</sup>
益气养心饮组	215.05 $\pm$ 7.75 <sup>a</sup>	110.51 $\pm$ 3.61 <sup>a</sup>
缬沙坦组	216.85 $\pm$ 7.86 <sup>a</sup>	111.04 $\pm$ 2.64 <sup>a</sup>

注:与模型组相比,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与假手术组相比,<sup>b</sup> $P < 0.01$

### 3 讨论

TLR4 信号转导通路是目前发现的重要的炎性通路之一,它与诸多疾病的发生及发展过程紧密相关,其下游炎症信号的级联式反应往往会令疾病朝不良的方向转归,因此阻断或抑制 TLR4 信号通路上各个节点便成为了目前医学领域研究的热点<sup>[4]</sup>。TLR4 通路的具体传导途经如下<sup>[5]</sup>:TLR4 高表达→激活 NF- $\kappa$ B→启动细胞因子 TNF- $\alpha$ 、CRP、IL-6→激活 TLR4。

本实验结果显示:与模型组相比,益气养心饮组和缬沙坦组均明显抑制了 TLR4、NF- $\kappa$ B 的表达,虽然与假手术组比较,没能完全抑制其表达至正常水平,但足以说明各给药组在一定程度上抑制了 TLR4 通路的激活,进而抑制了 NF- $\kappa$ B 的激活,有效的抑制其进一步启动下游炎症因子的活力。

有研究显示<sup>[6]</sup>,NF- $\kappa$ B 和 TNF- $\alpha$  之间也存在着正反双向反馈机制,如炎症刺激时可以使内皮细胞的 NF- $\kappa$ B 活化,进而促进内皮细胞分泌 TNF- $\alpha$ ,然而 TNF- $\alpha$  又是 NF- $\kappa$ B 的激活剂,通过其正反馈作用,再进一步激活 NF- $\kappa$ B,以增加其它细胞因子的分泌,最终引起级联反应。

所以,在心力衰竭的致病机制中,各通路、各环节相互交织,互为促进,因而只要抑制其中任一因素,均能在一定程度上阻断其传导,有效的控制心力衰竭的发展。本实验显示:与模型组相比较各给药组 TNF- $\alpha$ 、CRP、IL-6 含量水平均呈明显下降趋

势,特别是各给药组 BNP 水平的降低,不仅证明益气养心饮、缬沙坦、补益强心片对于 CHF 大鼠的治疗有效,更印证了此次实验模型复制成功。

综上所述,益气养心饮,抑制了 CHF 大鼠 TLR4 通路的各个环节,从而实现了保护心肌,逆转心室重构,改善心力衰竭的作用。

该方用黄芪益气固表、敛汗固脱、利水消肿,有强心之作用,使心脏收缩振幅增大,输出量增加,对久病或疲劳衰竭的心脏作用更为明显,此为本方之君药;丹参现代研究可扩张冠状动脉,与黄芪配伍血瘀随气壮而开,气虚随血和而利,直中病机<sup>[7]</sup>,且能更好的改善心肌缺血、梗塞及心脏功能;红景天益智养心,现代研究可稳定心率,具有抗疲劳,抗神经衰弱之功效,共为本方之臣药;佐以川芎、莱菔子、葶苈子、白茅根四药,共奏其化瘀利水消肿之功效。川芎活血行气,增加冠脉血流量,改善心肌缺氧状况,而且还能增肾血流量,并能利尿。川芎乃血中气药,配伍黄芪可增其益气之功,配丹参可助其活血之力<sup>[7]</sup>;莱菔子消食除胀,降气化痰,有降压作用,同时还有降低血管阻力,改善心脏血流动力学的作用;葶苈子温肺豁痰利气,有显著的强心、利尿作用;白茅根则有清热生津,利尿通淋之效,实验指出白茅根水煎液具有一定的抗炎作用;使以枳实破气消积化痰,可用治多种气滞、痰凝等病证,且枳实配黄芪,相反相成;黄芪甘温,能够益气升阳,配合诸药,发挥其养心通络之功,起正性肌力作用。

### 参 考 文 献

- [1] 廖玉华. 心力衰竭治疗的新视野[J]. 临床心血管病杂志, 2005, 21(1): 1-2.
- [2] Fisbein MC, Melecan D, Marko PR. Experimental myocardial infarction in the rat: qualitative and quantitative changes during pathologic evolution[J]. Am J Pathol, 1978, 90(1): 57-70.
- [3] Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fisbein MC, et al. Myocardial infarct size and ventricular function in rats[J]. Circ Res, 1979, 44(4): 503-512.
- [4] 陈洁, 姜虹. TLR4 信号通路与炎症反应[J]. 医学综述, 2009, 15(19): 2902-2904.
- [5] Hall G, Hasday J D, Rogers T B. Regulating the regulator: NF- $\kappa$ B signaling in heart[J]. Journal of molecular and cellular cardiology, 2006, 41(4): 580-591.
- [6] 胡圣大. 外周血白细胞 NF- $\kappa$ B 系统活性变化对慢性心力衰竭的意义[D]. 苏州: 苏州大学, 2007.
- [7] 王萌. 邓悦教授运用养心汤加减治疗“双心”疾病[J]. 吉林中医药, 2013, 33(6): 553-554.

(收稿日期:2014-04-08)

(本文编辑:黄凡)