

# 健心颗粒对慢性心衰大鼠心室肌 toll 样受体 4、肿瘤坏死因子- $\alpha$ 蛋白表达的影响

王永 曾凯 赵红佳 陈璐 邓志兵 陈美华

**【摘要】 目的** 探讨健心颗粒对慢性心衰大鼠心室肌 toll 样受体(toll-like receptors, TLR)4、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- $\alpha$  蛋白表达的影响。**方法** 将 15 周龄的自发性高血压大鼠 120 只随机分为培哌普利组、健心颗粒低剂量组、健心颗粒中剂量组、健心颗粒高剂量组、阴性对照组,每组 24 只。前四组分别予培哌普利 0.36 mg/(kg·d),健心颗粒 1.6 g/(kg·d)、3.2 g/(kg·d)、6.1 g/(kg·d),以 2 mL 生理盐水溶解,阴性对照组予生理盐水 2 mL,灌胃给药,每天 2 次。实验后每 7 天各组分别随机处死 6 只大鼠,采用免疫印迹检测上述各点心室肌组织 TLR4 蛋白表达,免疫组织化学显色检测上述各点心室肌组织 TNF- $\alpha$  蛋白表达。**结果** 第 7 天,对照组、健心颗粒低、中、高剂量组间比较,大鼠心室肌 TLR4、TNF- $\alpha$  蛋白表达无显著差异( $P > 0.05$ ),但培哌普利组明显下降( $P < 0.05$ );第 14 天、21 天,与对照组比较,其他各组大鼠心室肌 TLR4、TNF- $\alpha$  蛋白表达均显著下降( $P > 0.05$ ),但培哌普利组较其他组下降更明显( $P < 0.05$ );第 28 天,与对照组比较,其他各组大鼠心室肌 TLR4、TNF- $\alpha$  蛋白表达均显著下降( $P > 0.05$ ),但培哌普利组、健心颗粒中、高剂量组明显低于低剂量组( $P < 0.05$ )。**结论** 健心颗粒具有显著抗炎作用。

**【关键词】** 健心颗粒; 自发性高血压大鼠; 慢性心衰; toll 样受体 4; 肿瘤坏死因子- $\alpha$

**【中图分类号】** R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2015.04.007

**Effects of Jianxin Granule on the TLR4 and TNF- $\alpha$  of ventricular muscle in rats with chronic heart failure** WANG Yong, ZENG Kai, ZHAO Hong-jia, et al. Cardiovascular Internal Medicine Department, The Second Affiliated Hospital of Fujian University Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350001, China  
Corresponding author: ZHAO Hong-jia, E-mail: hongjiafz@163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of the Jianxin Granule (JG) in the expression of TLR4 (toll-like receptors 4) and TNF- $\alpha$  on ventricular muscle in rats with chronic heart failure. **Methods** rats (SHR-sp) 120 rats, which are 15-week-old with spontaneous hypertension, were randomly divided into five groups: perindopril group 0.36 mg/(kg·d), low dose JG group 1.6 g/(kg·d), median dose JG group 3.2 g/(kg·d), high dose JG group 6.1 g/(kg·d), and negative control group (with saline 2 ml). There are 24 rats for each group. The drugs, dissolved in 2 ml saline water, were administrated by ig twice a day. During the experiment (28 days), 6 rats in each group were randomly executed every 7 days. Meanwhile the expression of TLR was determined by Western blot and pro-TNF- $\alpha$  by immunohistochemical staining. **Result** On the seventh day, there were no significant difference ( $P > 0.05$ ) of the expression of TLR4 and TNF- $\alpha$  in ventricular muscle among the control group, low, medium and high dose groups, but the perindopril group decreased obviously ( $P < 0.05$ ). On the fourteenth and the twenty-first day, compared with the control group, the expression of TLR4 and TNF- $\alpha$  in ventricular muscle groups significantly decreased ( $P > 0.05$ ), furthermore, the perindopril group decreased more significantly than the other groups. On the twenty-eighth day, the expression of TLR4 and TNF- $\alpha$  in ventricular muscle groups de-

基金项目:福建省自然科学基金面上项目(2011J01195);福建省自然科学基金重大项目(2011Y4004)

作者单位:350001 福州,福建中医药大学附属第二人民医院内科(王永、曾凯、陈璐、邓志兵、陈美华);福建中医药大学护理学院(赵红佳)

作者简介:王永(1966-),博士,主任医师,硕士生导师。研究方向:心力衰竭的防治。E-mail: wangy83706912@aliyun.com

通讯作者:赵红佳(1969-),女,博士,教授,硕士生导师。研究方向:心力衰竭的防治。E-mail: hongjiafz@163.com

creased more significantly than the control group ( $P > 0.05$ ), however, the perindopril group, medium and high dose groups were significantly lower than those in the low dose group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Jiaxin granule has a significant anti-inflammatory effect.

**【Key words】** Jianxin Granule; Spontaneously hypertensive rat; Chronic heart failure; Toll-like receptors 4; Tumor necrosis factor  $\alpha$

慢性心力衰竭发生、发展的基本机制是心室重构。目前已明确,交感—肾上腺髓质系统及肾素—血管紧张素—醛固酮系统等神经、体液过度激活促进心室重构发生,应用  $\beta$  受体阻滞剂及拮抗肾素—血管紧张素—醛固酮系统药物可延缓心力衰竭进展,但不能完全逆转。研究显示,由免疫系统介导,激发炎症因子释放,进而引起心室重构,在心力衰竭的发生发展中起重要作用<sup>[1]</sup>。本研究显示健心颗粒可明显抑制心衰大鼠心肌细胞 toll 样受体(toll-like receptors, TLR)4、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- $\alpha$  的表达,从而具有抗炎作用,进而改善心功能。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

自发性高血压大鼠(SHR-sp)120 只,雄性,15 周龄,合格证号:2007000540394,由福建中医药大学动物实验中心提供。

### 1.2 实验药物

健心颗粒:黄芪 333 g、红参 167 g、丹参 167 g、猪苓 167 g、白术 167 g、葶苈子 167 g、蒲黄 100 g、桂枝 100 g,加水没药浸泡 1 小时,第 1 次煎煮 1.5 小时,第 2 次、3 次各煎煮 1 小时,滤液合并浓缩制成清膏并干燥成颗粒 1000 g,分装,每袋 10 g,由福建中医药大学附属第二人民医院制剂室提供,批号:Z20100010。培哌普利,每片 4 mg,由施维雅(天津)制药有限公司生产,批号:H20034053。

### 1.3 动物分组及处理

将 15 周龄的自发性高血压大鼠(SHR-sp)120 只随机分为培哌普利组、健心颗粒低剂量组、健心颗粒中剂量组、健心颗粒高剂量组、阴性对照组,每组 24 只。前四组参照等效剂量法分别予培哌普利 0.36 mg/(kg·d),健心颗粒 1.6 g/(kg·d)、3.2 g/(kg·d)、6.1 g/(kg·d),以 2 mL 生理盐水溶解,阴性对照组予生理盐水 2 mL,灌胃给药,每天 2 次,实验过程共 28 天。

### 1.4 观察指标及方法

1.4.1 免疫印迹法测定 TLR4 蛋白表达 抗体购自 Abcam 公司。分别于灌胃后第 7、14、21、28 天每

组随机抽取 6 只大鼠,以水合氯醛麻醉,取心室肌组织,溶于抽提液中,充分震荡混匀,离心,收集上清液;另取心室肌组织 50 mg 提取核蛋白;二喹啉甲酸法测定蛋白浓度后,取 50  $\mu$ g 蛋白;经转膜后把载有蛋白的 PVDF 膜迅速的投入装有封闭缓冲液中,4℃ 过夜;稀释一抗(鼠抗 TLR4)到工作浓度(1:1000),将膜置于一抗溶液中,4℃ 过夜,洗膜 3 次,10 分钟/次;稀释 HRP 标记的二抗(羊抗鼠 IgG)到工作浓度(1:1000),然后将膜置于二抗中,37℃ 摇床孵育 1 小时;洗膜 5 次,10 分钟/次。以  $\beta$ -actin 为内参,检测 TLR4 蛋白表达。

1.4.2 免疫组织化学显色检测心室肌组织 TNF- $\alpha$  表达 抗体购自 Abcam 公司。分别于灌胃后第 7、14、21、28 天每组随机抽取 6 只大鼠,以水合氯醛麻醉,取心室肌组织,以 4% 中性多聚甲醛溶液固定 24 小时,经脱水、常规石蜡包埋,切片脱蜡后,以 PBS 冲洗,柠檬酸高压修复 2 分钟;PBS 冲洗,TNF- $\alpha$  一抗(1:200)过夜,加二抗 37℃ 孵育 2 小时,苏木素复染 10 秒,避光操作,具体步骤严格按照免疫组化试剂盒说明书操作。光学显微镜下观察、拍照,经 Motic Med 6.0 数码医学图像分析系统软件分析处理,研究大鼠心室肌组织 TNF- $\alpha$  的表达。

### 1.5 统计学处理

本组计量资料均符合正态分布,以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用单因素方差分析,本组数据均满足方差齐性检验,故采用 LSD 进行组间比较,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 大鼠心室肌 TLR4 蛋白表达情况

图 1、表 1 显示,第 7 天,对照组、健心颗粒低、中、高剂量组间比较,大鼠心室肌 TLR4 蛋白表达无显著差异( $P$  分别为 0.455、0.794、0.746,均  $> 0.05$ ),但培哌普利组明显下降( $P$  为  $7.72 \times 10^{-6} < 0.05$ );第 14 天,与对照组比较,培哌普利组、健心颗粒低、中、高剂量组大鼠心室肌 TLR4 蛋白表达均显著下降( $P$  分别为  $1.04 \times 10^{-7}$ 、0.001、0.001、 $5.83 \times 10^{-5}$ ,均  $< 0.05$ ),第 21 天,与对照组比较,培哌普利组、健心颗粒低、

中、高剂量组大鼠心室肌 TLR4 蛋白表达均显著下降 ( $P$  分别为  $1.10 \times 10^{-10}$ 、 $3.80 \times 10^{-7}$ 、 $3.66 \times 10^{-7}$ 、 $9.13 \times 10^{-9}$ , 均  $<0.05$ ), 培哌普利组较健心颗粒低、中、高剂量组下降更明显 ( $P$  分别为  $0.001$ 、 $0.01$ 、 $0.044$ , 均  $<0.05$ ); 第 28 天, 与对照组比较, 培哌普利组、健心颗粒低、中、高剂量大鼠心室肌 TLR4 蛋白表达均显著下降 ( $P$  分别为  $3.73 \times 10^{-11}$ 、 $8.60 \times 10^{-8}$ 、 $6.16 \times 10^{-10}$ 、 $2.22 \times 10^{-10}$ , 均  $<0.05$ ), 但培哌普利组、健心颗粒中、高剂量组明显低于低剂量组 ( $P$  分别为  $0.001$ 、 $0.034$ 、 $0.011$ , 均  $<0.05$ ); 以上差异均有统计学意义, 均采用单因素方差分析, 以 LSD 进行组间比较。见表 1、图 1。

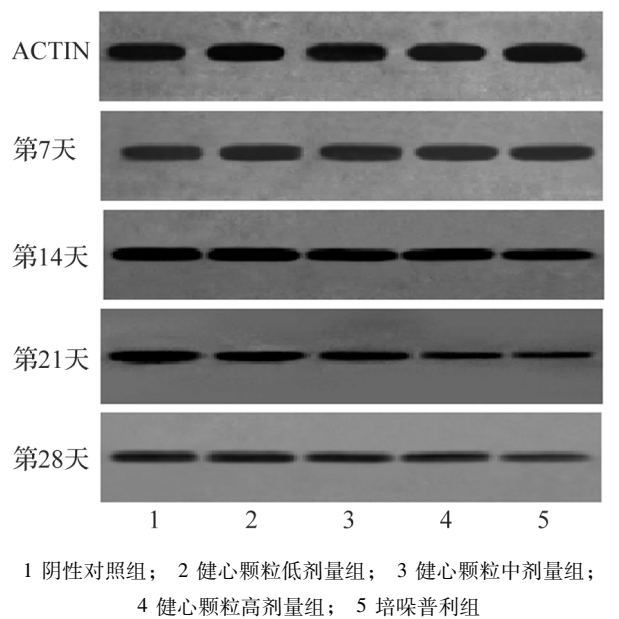


图 1 各组大鼠心室肌 TLR4 表达结果比较

**2.2 心衰大鼠心室肌 TNF- $\alpha$  蛋白表达情况**  
图 2、表 2 显示, 第 7 天, 对照组、健心颗粒低、中、高剂量组间比较, 大鼠心室肌 TNF- $\alpha$  蛋白表达无显著差异 ( $P$  分别为  $0.501$ 、 $0.239$ 、 $0.334$ , 均  $>0.05$ ), 但培哌普利组明显下降 ( $P$  为  $0.002 < 0.05$ ); 第 14

天, 与对照组比较, 培哌普利组、健心颗粒低、中、高剂量组大鼠心室肌 TNF- $\alpha$  蛋白表达均显著下降 ( $P$  分别为  $1.57 \times 10^{-11}$ 、 $2.92 \times 10^{-4}$ 、 $1.51 \times 10^{-8}$ 、 $5.03 \times 10^{-9}$ , 均  $<0.05$ ), 第 21 天, 与对照组比较, 培哌普利组、健心颗粒低、中、高剂量组大鼠心室肌 TNF- $\alpha$  蛋白表达均显著下降 ( $P$  分别为  $1.01 \times 10^{-13}$ 、 $7.00 \times 10^{-11}$ 、 $1.30 \times 10^{-11}$ 、 $7.71 \times 10^{-12}$ , 均  $<0.05$ ), 培哌普利组较健心颗粒低、中、高剂量组下降更明显 ( $P$  分别为  $0.001$ 、 $0.008$ 、 $0.015$ , 均  $<0.05$ ); 第 28 天, 与对照组比较, 培哌普利组、健心颗粒低、中、高剂量大鼠心室肌 TNF- $\alpha$  蛋白表达均显著下降 ( $P$  分别为  $3.60 \times 10^{-11}$ 、 $7.18 \times 10^{-9}$ 、 $3.30 \times 10^{-10}$ 、 $1.86 \times 10^{-10}$ , 均  $<0.05$ ), 但培哌普利组与健心颗粒中、高剂量组比较无明显差异 ( $P$  分别为  $0.267$ 、 $0.404$ , 均  $>0.05$ ); 以上差异均有统计学意义, 均采用单因素方差分析, 以 LSD 进行组间比较。见表 2、图 2。

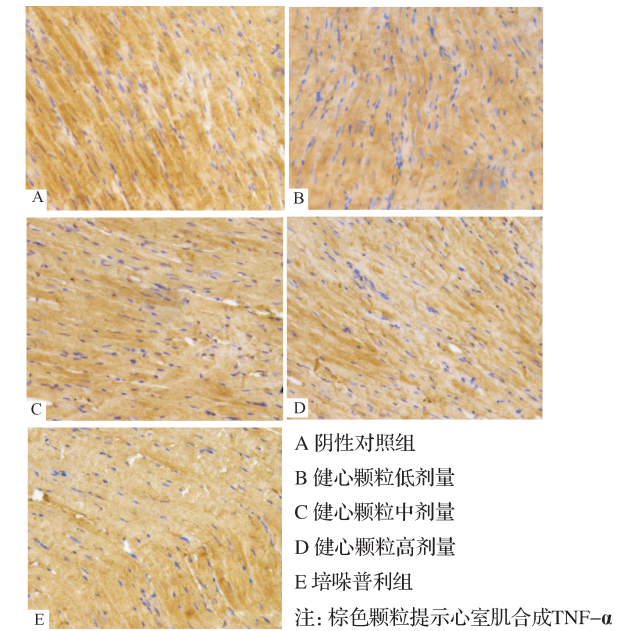


图 2 第 28 天大鼠心室肌 TNF- $\alpha$  表达结果比较 (免疫组化染色,  $\times 200$ )

表 1 各组大鼠心室肌 TLR4 表达结果比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天
阴性对照组	0.722 $\pm$ 0.055 <sup>c</sup>	0.727 $\pm$ 0.081 <sup>c</sup>	0.735 $\pm$ 0.078 <sup>c</sup>	0.737 $\pm$ 0.075 <sup>c</sup>
健心颗粒低剂量组	0.693 $\pm$ 0.065 <sup>bc</sup>	0.615 $\pm$ 0.030 <sup>ac</sup>	0.519 $\pm$ 0.046 <sup>ac</sup>	0.463 $\pm$ 0.052 <sup>ac</sup>
健心颗粒中剂量组	0.733 $\pm$ 0.050 <sup>bc</sup>	0.609 $\pm$ 0.038 <sup>ac</sup>	0.502 $\pm$ 0.041 <sup>ac</sup>	0.381 $\pm$ 0.055 <sup>ad</sup>
健心颗粒高剂量组	0.710 $\pm$ 0.102 <sup>bc</sup>	0.582 $\pm$ 0.047 <sup>ac</sup>	0.468 $\pm$ 0.045 <sup>ac</sup>	0.362 $\pm$ 0.057 <sup>ad</sup>
培哌普利组	0.506 $\pm$ 0.048 <sup>a</sup>	0.506 $\pm$ 0.048 <sup>a</sup>	0.400 $\pm$ 0.036 <sup>a</sup>	0.329 $\pm$ 0.047 <sup>a</sup>

注: 与对照组相比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P > 0.05$ ; 与培哌普利组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P > 0.05$

表 2 各组大鼠心室肌 TNF-α 蛋白表达比较分析(  $\bar{x} \pm s$  )

组别	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天
阴性对照组	243. 60 ± 10. 89 <sup>e</sup>	244. 01 ± 8. 22 <sup>e</sup>	245. 61 ± 8. 18 <sup>e</sup>	244. 73 ± 5. 64 <sup>e</sup>
健心颗粒低剂量组	238. 99 ± 9. 68 <sup>bc</sup>	216. 50 ± 15. 58 <sup>ac</sup>	180. 81 ± 13. 16 <sup>ac</sup>	171. 09 ± 9. 86 <sup>ac</sup>
健心颗粒中剂量组	235. 45 ± 12. 98 <sup>bc</sup>	190. 41 ± 13. 41 <sup>ac</sup>	175. 39 ± 9. 28 <sup>ac</sup>	158. 51 ± 12. 11 <sup>ad</sup>
健心颗粒高剂量组	236. 94 ± 11. 10 <sup>bc</sup>	187. 17 ± 10. 67 <sup>ac</sup>	173. 67 ± 5. 88 <sup>ac</sup>	156. 03 ± 18. 62 <sup>ad</sup>
培哚普利组	219. 84 ± 13. 48 <sup>a</sup>	168. 34 ± 6. 12 <sup>a</sup>	157. 96 ± 9. 56 <sup>a</sup>	148. 70 ± 17. 49 <sup>a</sup>

注:与对照组相比较,<sup>a</sup> $P < 0. 05$ ,<sup>b</sup> $P > 0. 05$ ;与培哚普利组比较,<sup>c</sup> $P < 0. 05$ ,<sup>d</sup> $P > 0. 05$

3 讨论

TLRs 是一类保守的介导天然免疫的跨膜信号传递受体家族。TLR4 可在心肌细胞、内皮细胞<sup>[2-3]</sup>中表达。感染是公认的引起心力衰竭恶化的重要诱因之一。内毒素作为配体参与 TLR4 的激活,在心力衰竭中表达增高<sup>[2]</sup>。另外,心肌损伤后可释放热休克蛋白 HSP60、HSP70 等物质,作为内源性配体可被 TLR4 识别并使 TLR4 的激活<sup>[4]</sup>;激活 TLR4 信号系统后,表现为 TLR4 表达上调并向细胞膜聚集,使得 NF-κB 由细胞质转移至细胞核,进而引起 TNF-α、IL-6 等炎症因子表达升高<sup>[5-6]</sup>。研究表明,心衰时心肌细胞分泌 TNF-α 为其主要来源,TNF-α 可通过直接损伤心肌纤维、降低 β-肾上腺素能受体敏感性<sup>[7]</sup>、降低钙离子敏感度<sup>[8]</sup>、促进 IL-6 等其他炎症因子表达<sup>[9]</sup>等途径对心肌细胞发挥负性肌力作用;TNF-α 还可促使氧自由基生成<sup>[10]</sup>及诱导心肌细胞凋亡<sup>[11]</sup>参与心室重塑。

研究发现,15 周龄 SHR 大鼠跟同龄 WKY 大鼠相比,血浆及心脏的 B 型尿钠肽已显著增高,说明已发生心力衰竭<sup>[12]</sup>。因此本实验采用 15 周龄 SHR 大鼠作为心力衰竭的动物模型。健心颗粒由红参、生黄芪、生蒲黄、丹参、葶苈子、桂枝、猪苓、白术组成,具有益气活血、温阳利水作用。前研究显示,其具有抑制肾素—血管紧张素—醛固酮系统活性<sup>[13]</sup>,并能降低血清基质金属蛋白酶 9 ( matrix metalloproteinases 9,MMP-9)和 MMP-9/TIMP-1 作用<sup>[14]</sup>;本研究显示,健心颗粒可降低心肌细胞 TLR4、TNF-a 表达,具有明显抗炎作用,其抗炎作用与培哚普利相当。因此,它可明显改善心衰患者心功能<sup>[15]</sup>。

参 考 文 献

[1] Satoh M, Shiomoda Y, Maesawa C, et al. Activated toll-like receptor 4 in monocytes is associated with heart failure after acute myocardial infarction[J]. Int J Cardiol,2006,109(2):226-234.

[2] Stefan F, Lester K, Young DK,et al. Toll (TLR4) expression in cardiac myoeytes in normal and failing myocardium [J]. J Clin

Invest, 1999, 104(3): 271-280.

[3] Hijiya N,Miyake K,Akashi S,et al. Possible involvement of toll-like receptors 4 in endothelial cell activation of larger vessels in response to lipopoly-saccharide [J]. Pathobiology, 2002, 70(1): 18-25.

[4] Satoh M, Shimoda Y, Akatsu T. Elevated circulating levels of heat shock protein 70 are related to systemic inflammatory reaction through monocyte Toll signal in patients with heart failure after acute myocardial infarction [J]. European Journal of Heart Failure, 2006, (8): 810-815.

[5] Sarah L, Luke A, Neil J. Toll-like receptors:From the discovery of NF-κB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity[J]. Immunity, 2006, (3): 1828-1831.

[6] Li T, Hu J, Thomas JA, et al. Differential induction of apoptosis by LPS and taxol in monocytic cells[J]. Molecular Immunology, 2005, (9): 1049-1055.

[7] Prabhu SD, Chandrasekar B, Murray DR. Beta-adrenergic blockade in developing heart failure: effects on myocardial inflammatory cytokines, nitric oxide, and remodeling[J]. Circulation, 2000, (17): 2103-2109.

[8] Rastaldo R, Pagliaro P, Cappello S. Nitric oxide and cardiac function[J]. Life Sciences, 2007, (10): 779-793.

[9] Sun M, Chen M, Dawood F. Tumor necrosis factor-alpha mediates cardiac remodeling and ventricular dysfunction after pressure overload state[J]. Circulation, 2007, (11): 1398-1407.

[10] Candia AM, Villacorta H Jr, Mesquita ET. Immune-inflammatory activation in heart failure[J]. Arqui-ivos Brasileiros de Cardiologia, 2007, (3): 183-190, 201-208.

[11] Razavi HM, Hamilton JA, Feng Q. Modulation of apoptosis by nitric oxide: implications in myocardial ischemia and heart failure [J]. Pharmacology & Therapeutics, 2005, (2): 147-162.

[12] 吴小盈, 宋建平, 李红霞, 等. 培哚普利和卡维地洛对自发性高血压大鼠 Ang II 和 B 型利钠肽的影响[J]. 高血压杂志, 2004, 12(1): 80-82.

[13] 陈永忠, 陈成, 陈国通, 等. 健心颗粒对心力衰竭患者心功能及肾素-血管紧张素系统的影响[J] 中国老年保健医学, 2012, 10(4): 62-63.

[14] 王永, 赵红佳, 曾凯. 健心颗粒对慢性心衰患者血清 MMP-9 及 TIMP-1 的影响[J]. 福建中医药大学学报,2012,22(4):5-7.

[15] 叶盈, 黄飞翔, 陈美华, 等. 健心颗粒治疗慢性心力衰竭 65 例临床观察[J]. 中医杂志, 2006, 47(1): 28-30.