

# 益气活血利水法治疗心力衰竭水潴留机制的实验研究

## An experimental study on water retention mechanism of Heart Failure by the Yiqi Huoxue Lishui therapy

刘淑荣 张晓华\* 邸琳 刘新宇  
(吉林省中医药科学院, 吉林 长春, 130021)

中图分类号: R289.5 文献标识码: A 文章编号: 1674-7860(2015)18-0062-02 证型: DGBA

**【摘要】**目的: 探讨益气活血利水法治疗心衰水潴留的机制。方法: 选择健康 Wistar 大鼠, 应用腹腔注射阿霉素, 造成心衰大鼠模型, 然后分模型组、西药对照组, 中药对照组、中药高剂量、中剂量、低剂量 6 组, 给药 8 周后观察各组大鼠服药后血管加压素 (AVP) 浓度; 血管加压素 V2 受体 (V2R)、水通道蛋白 2 (AQP-2) 蛋白表达及 mRNA 表达情况。结果: 益气活血利水法可降低心衰大鼠血浆中 AVP 浓度, 减弱肾组织 V2R、AQP-2 蛋白表达, 降低 V2R、AQP2、mRNA 相对表达量。结论: 益气活血利水法通过作用于精氨酸血管加压素-V2 受体-水通道蛋白 2 系统的各个环节而起到改善水液潴留的作用。

**【关键词】**心力衰竭; 益气活血利水法; 血管加压素; 水通道蛋白 2

**【Abstract】**Objective: To investigate the Yiqi Huoxue Lishui therapy for the water retention mechanism of heart failure. Methods: Healthy Wistar rats, with intraperitoneal injection of doxorubi cin, resulting in a rat model of heart failure, and then were divide into the model group, western medicine group, TCM control group, high dose, medium-dose, low dose six groups administered 8 weeks after the rats after taking vasopressin (AVP) concentration; vasopressin V2 receptor (V2R), aquaporin -2 (AQP-2) protein and mRNA expression. Results Yiqihuoxue therapy can reduce heart failure in rat plasma AVP concentration, decreased kidney tissue V2R, AQP-2 protein, lower V2R, AQP2, mRNA relative expression. Conclusion: Yiqihuoxue therapy by acting on arginine vasopressin receptor -V2 - all aspects of aquaporin 2 system and play a role in improving water retention.

**【Keywords】**Heart failure; Yiqihuoxue therapy; Vasopressin; Aquaporin 2

doi:10.3969/j.issn.1674-7860.2015.18.031

因心力衰竭多伴有水肿、胸水、腹水等, 故心衰也属水液代谢障碍性疾病之一, 对于心衰水液潴留机制的研究, 很多学者从多个系统进行过研究, 包括 RAS 系统、加压素系统、交感神经系统、内皮素系统、利钠肽系统等等, 随着水通道蛋白 2 的发现, 使血管加压素-血管加压素 V2 受体-水通道蛋白 -2 系统在心衰水液潴留过程中的作用逐渐被学者们重视及研究, 前期我们观察益气活血利水中药对心衰大鼠用药 4 周后的精氨酸血管加压素-V2 受体-水通道蛋白 2 系统的蛋白表达及 mRNA 表达, 提示中药可降低心衰大鼠血浆中 AVP 浓度, 部分减弱肾组织 V2R、AQP-2 蛋白表达, 减弱 V2 受体、水通道蛋白 2、mRNA 相对表达量。因中药治疗疾病有一个延迟作用的特点, 即服药一段时间后才发挥其很好的疗效, 慢性心衰是逐渐形成的, 故本实验设计的疗程为 8 周, 观察 8 周后各组血管加压素-V2 受体-水通道蛋白 2 的蛋白、基因表达, 以期阐明中药治疗慢性心衰水潴留的机制。

### 1 研究对象与方法

#### 1.1 研究对象

Wistar 大鼠, 180~220 g, 购自吉林大学实验动物中心; 动物等级: II 级; 合格证编号为 SCXK-(吉)2008-0005。阿霉素按 3 mg/kg 的剂量溶于 1ml 生理盐水中, 腹腔注射, 1 次/w, 共 6 周, 同时对大鼠进行睡眠剥夺(连续 5 d, 每 0.5 h 闹钟响 1 次), 正常对照组注射等体积生理盐水, 共 6 周, 6 周后通过观察模型组大鼠的心衰症状(活动量、食欲、发绀、水

肿、尿量)及左室舒张末压等指标判断心衰是否造模成功, 以左室舒张末压 $\geq 15$  mmHg 为心衰造模成功的主要指标<sup>[1]</sup>。

#### 1.2 实验药物

益气活血利水胶囊, 内容为深棕色膏状, 5.5036 g 生药/1 g 膏。由吉林省中医药科学院资源所提供。益气活血利水胶囊: 由人参、黄芪、桂枝、丹参、葶苈子、车前子等药物组成。中药对照组: 芪苈强心胶囊, 石家庄以岭药业股份有限公司生产, 批号: 20120228, 西药对照组: 呋塞米片, 批号: B130501。

#### 1.3 实验方法

将造模成功的心衰大鼠, 随机分为模型组, 西药对照组, 中药对照组(芪苈强心胶囊)、中药高剂量、中剂量、低剂量, 与对照组共 6 组。连续灌胃给药 8 周后再测定所需指标。

#### 1.4 血管加压素浓度的测定

按精氨酸血管加压素 ELISA 试剂盒说明书操作。

#### 1.5 血管加压素 V2 受体及水通道蛋白 2 蛋白表达的测定 (Western blot 法)

Western blot 法: 先进行组织蛋白提取、蛋白定量、PAGE 胶的制备, 然后上样、电泳、转膜、膜上蛋白的检测、膜的封闭及抗体孵育, 最后显色 (ECL 化学发光检测), 显色可以根据条带强弱再次感光或减短感光时间已达到理想结果, 图片扫描保存为电脑文件, 并用分析软件将图片上每个特异条带灰度值数字化。

#### 1.6 水通道蛋白 2 mRNA 表达的测定

rt-PCR 引物采用 Gapdh 为内参照, 登陆 NCBI(美国国立生物技术信息中心)查询查找大鼠 V2R、AQP2 及 Gapdh 的基因序列, 用 CmSuite8 引物设计软件设计 V2 受体、AQP2 及 Gapdh 的上下游引物。Aqp2 上游引物 5' T TGGTCTGGGCATCGG CATC3', 下游引物 5' GC TGTGGCGTTGTTGTGGAG 3', 扩增片段长度 238 bps; V2R 上游引物 5' AGC AACAGCAGCC AGGAGGAAC 3', 下游引物 5' AAC AGAGCCACAGCCAGG TCAG 3', 扩增片段长度 212 bps; Gapdh 上游引物 5' GT C GGTGTGAACGGATTG 3', 下游引物 5' T CCCATTCTCAGC CTTGAC 3', 扩增片段长度 181 bps。

1.7 统计学处理

计量资料用 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用 SPSS13.0 分析软件, 组间比较用 *t* 检验, 多组间用单因素方差分析。

2 结果

2.1 对心衰大鼠血浆中精氨酸血管加压素浓度的影响

表 1 各组大鼠血浆精氨酸血管加压素 (AVP) 含量的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	精氨酸血管加压素 (ng/ml)
西药组	10	(6.231 ± 0.5207 <sup>*</sup> )
模型组	10	(9.621 ± 0.6432)
芪苈强心组	10	(7.127 ± 0.4997 <sup>△</sup> )
中药剂低剂量组	10	(7.757 ± 0.6985 <sup>*△</sup> )
中药中剂量组	10	(7.101 ± 0.4513 <sup>*△</sup> )
中药高剂量组	10	(6.768 ± 0.7989 <sup>*</sup> )

注: 与模型组比较, \**P* < 0.01, 与西药组比较<sup>△</sup>*P* < 0.05

与模型组比较, 各给药组均使 AVP 水平不同程度的降低 (\**P* < 0.01), 说明服用中药制剂及呋塞米片可有效降低 AVP 浓度; 与西药组比较, 中药低、中剂量组及芪苈强心胶囊组虽可降低 AVP 浓度, 但效果较呋塞米组差 (<sup>△</sup>*P* < 0.05), 有统计学差异, 中药高剂量组与呋塞米组疗效相当, 无统计学差异。与芪苈强心胶囊组比较, 中药中、高剂量组降低 AVP 水平较芪苈强心组略好, 但无统计学意义。

2.2 对心衰大鼠肾组织 V2R 及 AQP-2 蛋白表达的影响。

表 2 对心衰大鼠 V2R、AQP-2 蛋白表达影响 (Western blot 法) ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	AVP V2R	AQP2
西药组	10	(0.9235 ± 0.2011 <sup>△</sup> )	(0.5214 ± 0.0998 <sup>△</sup> )
模型组	10	(1.3913 ± 0.1465)	(0.8996 ± 0.1026)
芪苈强心组	10	(0.8012 ± 0.2997 <sup>△</sup> )	(0.5678 ± 0.1345 <sup>△</sup> )
中药低剂量组	10	(1.1001 ± 0.2984 <sup>#</sup> )	(0.7894 ± 0.1987 <sup>#</sup> )
中药中剂量组	10	(0.8993 ± 0.1967 <sup>#</sup> )	(0.5159 ± 0.0991 <sup>#</sup> )
中药高剂量组	10	(0.9114 ± 0.2039 <sup>#</sup> )	(0.4702 ± 0.2012 <sup>#</sup> )

注: 与模型组比较, <sup>△</sup>*P* < 0.01, ( $\bar{x} \pm s$ ) *P* < 0.05

上述统计结果可以看出, 与模型组比较, 各给药组均使 V2R 蛋白表达不同程度的下调, 有统计学差异 (<sup>△</sup>*P* < 0.01, <sup>#</sup>*P* < 0.05); 各给药组间无统计学差异。对于 AQP-2 蛋白表达的影响, 与模型组比较, 各给药组均可降低 AQP2 蛋白的表达, 有统计学差异 (<sup>△</sup>*P* < 0.01, <sup>#</sup>*P* < 0.05), 各给药组间无统计学差异。

2.3 对心衰大鼠肾组织 V2R 及 AQP 2 mRNA 相对表达量影响

表 3 对心衰大鼠 V2R、AQP-2 mRNA 相对表达量影响 (rt-PCR 法) ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	AVP V2R	AQP-2
西药组	10	(0.0104 ± 0.0059 <sup>#</sup> )	(0.0101 ± 0.0099 <sup>#</sup> )
模型组	10	(0.0397 ± 0.0201)	(0.0467 ± 0.0167)
芪苈强心组	10	(0.0086 ± 0.0045 <sup>#</sup> )	(0.0234 ± 0.0189 <sup>#</sup> )
中药低剂量组	10	(0.0115 ± 0.0046 <sup>#</sup> )	(0.0238 ± 0.0074 <sup>#</sup> )
中药中剂量组	10	(0.0101 ± 0.0034 <sup>#</sup> )	(0.0160 ± 0.0059 <sup>#</sup> )
中药高剂量组	10	(0.0098 ± 0.0059 <sup>#</sup> )	(0.0146 ± 0.0053 <sup>#</sup> )

注: 与模型组比较, <sup>#</sup>*P* < 0.01, <sup>\*</sup>*P* < 0.05

从上述统计结果可以看出, 与模型组比较, 各给药组均使 V2R、AQP2 mRNA 相对表达量不同程度的下调, 有统计学差异 (<sup>#</sup>*P* < 0.01, <sup>\*</sup>*P* < 0.05)。各给药组间比较无统计学差异。

3 讨论

心衰属水液潴留性疾病之一, 利尿剂治疗心力衰竭的作用已毋庸置疑<sup>[2]</sup>, 但长期服用利尿剂存在很多弊端<sup>[3]</sup>, 目前已上市的治疗心衰的中成药虽然对水肿的消退有一定的疗效, 但缺少客观的实验证据, 可信度差。心衰古时称为“水”“心水”“赤水”, 目前中医学认为心衰非一脏之病, 乃五脏同病, 气虚血瘀水结是心衰发病的病机关键, 故益气活血利水法乃治疗心衰的大法, 临床取得很好疗效<sup>[4]</sup>。

1993 年水通道蛋白 2 的发现, 使精氨酸血管加压素 (AVP)-集合管 V2 受体-水通道蛋白 2 (AQP-2) 系统成为调控体内水代谢紊乱的一个重要的系统。已有多位学者<sup>[5-9]</sup>研究表明中药单药及中药复方可通过降低水通道蛋白 2 的表达来减轻水潴留, 促进尿液排出。本课题通过动物实验对心衰大鼠水液潴留机制进行了研究, 得出结论, 益气活血利水中药可能通过降低心衰大鼠血浆精氨酸血管加压素浓度, 减少血管加压素 V2 受体及水通道蛋白 2 的蛋白及 mRNA 表达来改善心衰大鼠的水潴留状态。

参考文献:

[1]张兴平, 陈庆伟. 慢性心力衰竭大鼠血清细胞因子的变化及其与左室舒张末压的相关性[J]. 中国老年学杂志, 2007, 27(7): 1348-1349.  
 [2]中华医学会心血管病学分会, 《中华心血管病杂志》编辑委员会. 中国心力衰竭治疗指南 2014[S]. 中华心血管病杂志, 2014, 42(2): 100-101.  
 [3]杜文民. 利尿剂的不良反应评价[J]. 上海医药, 2009, 30(7): 304-305.  
 [4]张广业, 张宪忠, 王学工, 等. 滋阴利水法治疗心衰的理论探讨[J]. 中医临床研究, 2013, (21): 43-44.  
 [5]郭真力, 许顶力, 赖文岩, 等. 猪苓和茯苓对心力衰竭大鼠尿液水通道蛋白 2 和心功能的影响[J]. 中华心血管病杂志, 2008, 36(6): 374.  
 [6]王怡, 郭志军, 徐强, 等. 加参方对 CHF 大鼠肾脏水通道蛋白(AQP)mRNA 表达的影响[J]. 天津中医药大学学报, 2007, 26(4): 188-191.  
 [7]孟繁蕴, 李慧, 杨洪军, 等. 强心通脉胶囊对充血性心力衰竭大鼠血流动力学、神经内分泌和水通道蛋白-2 的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2005, 12(6): 22-23.  
 [8]鲍军强, 李锋, 张文生, 等. 大黄对大鼠肾脏水通道蛋白 2、4 表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2008, 28(12): 1108-1111.  
 [9]王辉, 康白, 许莉莉, 等. 丝瓜络对慢性心力衰竭大鼠肾脏水通道蛋白 2 免疫荧光表达的影响[J]. 潍坊医学院学报, 2011, 33(4): 276-278.

作者简介:

张晓华\*, 通讯作者, E-mail: zzh\_0404@163.com.

编辑: 赵聪 编号: EB-15041412 (修回: 2015-04-20)