

补阳还五汤对病毒性心肌炎模型小鼠心肌组织中MMPs和TIMPs表达的影响[△]

秦又发^{1*},周光辉²,潘春予¹,朱永坤¹,杨宇峰³,蒲荣⁴(1.东莞市第三人民医院药学部,广东东莞 523326;2.东莞市第三人民医院康复医学科,广东东莞 523326;3.东莞市第三人民医院病理科,广东东莞 523326;4.东莞市第三人民医院检验科,广东东莞 523326)

中图分类号 R965.1;R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)22-3084-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.22.12

摘要 目的:探讨补阳还五汤对病毒性心肌炎(VMC)模型小鼠心肌组织中基质金属酶(MMPs)、组织金属蛋白酶抑制因子(TIMPs)表达的影响。方法:将雄性BALB/c小鼠随机分为对照组、模型组、阳性对照组[卡托普利,100 mg/(kg·d)]和补阳还五汤低、中、高剂量组[6、18、36 g/(kg·d)],每组24只。除对照组外,其余各组小鼠均单次腹腔注射柯萨奇B3病毒以复制VMC模型。造模成功后,对照组和模型组小鼠均灌胃等容生理盐水,各给药组小鼠均灌胃相应药物,每日1次,连续30 d。观察各组小鼠的一般情况。以病毒接种当日为0 d,分别于4、10、20、30 d时检测小鼠心脏质量与体质量比值(HW/BW);采用苏木精-伊红染色法观察小鼠心肌组织形态学特征,并进行心肌病理组织学评分;采用苦味酸天狼猩红染色法观察小鼠心肌组织中I、Ⅲ型胶原蛋白的分布情况,并计算I/Ⅲ型胶原蛋白比值。于30 d时,采用Western blotting法检测小鼠心肌组织中MMP-1、MMP-3、MMP-9、TIMP-1的相对表达量,并计算MMPs/TIMPs。结果:与对照组比较,模型组小鼠出现烦躁、拱背、对刺激反应减轻、体质量减轻甚至精神萎靡等症状;其心肌组织可见典型的炎症性改变和局部间质细胞充血,并伴有大量淋巴细胞浸润和I、Ⅲ型胶原蛋白分布,其HW/BW(10~30 d各时间点)、心肌病理组织学评分(4~30 d各时间点)、I/Ⅲ型胶原蛋白比值(4~30 d各时间点)以及MMP-1、MMP-9的相对表达量和MMPs/TIMPs均显著升高,而MMP-3、TIMP-1的相对表达量均显著降低($P<0.05$)。与模型组比较,各给药组小鼠上述症状均有不同程度改善,其HW/BW[各给药组10~30 d各时间点(补阳还五汤低剂量组10 d除外)]、心肌病理组织学评分(各给药组10~30 d各时间点)、I/Ⅲ型胶原蛋白比值(阳性对照组和补阳还五汤高剂量组4~10 d各时间点和补阳还五汤低、中剂量组20~30 d各时间点)以及MMP-1(阳性对照组和补阳还五汤高剂量组)、MMP-9(各给药组)的相对表达量和MMPs/TIMPs(各给药组)均显著降低,而MMP-3(阳性对照组和补阳还五汤低、高剂量组)、TIMP-1(各给药组)的相对表达量均显著升高($P<0.05$)。结论:补阳还五汤可通过抑制心肌胶原蛋白增生,调节MMPs、TIMPs的表达,改善心肌MMPs/TIMPs的失衡状态等途径来发挥对VMC模型小鼠心肌纤维化的抑制作用。

关键词 补阳还五汤;病毒性心肌炎;心肌纤维化;基质金属蛋白酶;组织金属蛋白酶抑制因子;小鼠

Effects of Buyang Huanwu Decoction on the Expression of MMPs and TIMPs in Cardiac Tissue of Viral Myocarditis Model Mice

QIN Youfa¹, ZHOU Guanghui², PAN Chunyu¹, ZHU Yongkun¹, YANG Yufeng³, PU Rong⁴(1. Dept. of Pharmacy, Dongguan Third People's Hospital, Guangdong Dongguan 523326, China; 2. Dept. of Rehabilitation Medicine, Dongguan Third People's Hospital, Guangdong Dongguan 523326, China; 3. Dept. of Pathology, Dongguan Third People's Hospital, Guangdong Dongguan 523326, China; 4. Dept. of Clinical Laboratory, Dongguan Third People's Hospital, Guangdong Dongguan 523326, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the effects of Buyang huanwu decoction on the expression of MMPs and TIMPs in cardiac tissue of viral myocarditis (VMC) model mice. METHODS: Male BALB/c mice were randomly divided into control group, model group, positive control group [captopril, 100 mg/(kg·d)], Buyang huanwu decoction low-dose, medium-dose and high-dose groups [6, 18, 36 g/(kg·d)], with 24 mice in each group. Except for control group, other groups were given Coxsackie virus B3 once intraperitoneally to induce VMC model. After modeling, control group and model group were given constant volume of normal saline intragastrically; administration groups were given relevant medicine intragastrically; once a day, for consecutive 30 days. The general situation of mice in each group was observed. The day of inoculation was set at 0 d, heart mass to body mass ratio (HW/BW) was measured at 4, 10, 20, 30 d after inoculation. The morphological characteristics of myocardium were

[△] 基金项目:广东省医学科研基金立项项目(No.B2017033);广东省中医药局科研项目(No.20171273)

* 副主任药师,硕士。研究方向:临床药理学、心血管药理学。电话:0769-81368123。E-mail:qinyoufaqwerty@163.com

observed by HE staining, and the myocardial histopathological scores of myocardium were evaluated. The distribution of type I and III collagen in myocardium was observed by Abcam picosirius red staining, and the ratio of type I to III collagen

was calculated. At 30 d, relative expressions of MMP-1, MMP-3, MMP-9 and TIMP-1 in cardiac tissue were detected by Western blotting assay, and the ratio of MMPs to TIMPs was calculated. RESULTS: Compared with control group, mice in model group suffered from irritability, arch back, alleviation of stimulation response, reduction of body mass and even mental depression. Typical inflammatory changes and local interstitial hyperemia were observed in the myocardium, accompanied by a large number of lymphocyte infiltration and distribution of type I and III collagen. HW/BW (at different time points of 10-30 d), myocardial histopathological score (at different time points of 4-30 d), ratio of type I and III collagen (at different time points of 4-30 d), the expression of MMP-1 and MMP-9, ratio of MMPs to TIMPs were increased significantly, while the expression of MMP-3 and TIMP-1 were decreased significantly ($P < 0.05$). Compared with model group, above symptoms of mice in administration groups were improved to different extents. HW/BW [at different time points of 10-30 d in administration groups (except for 10 d in Buyang huanwu decoction low-dose group)], myocardial histopathological score (at different time points of 10-30 d in administration groups), ratio of type I and III collagen (at different time points of 4-10 d in positive control group and Buyang huanwu decoction high-dose group, at different time points of 20-30 d in Buyang huanwu decoction low-dose and medium-dose groups), the expression of MMP-1 (positive control group and Buyang huanwu decoction high-dose group) and MMP-9 (administration groups), ratio of MMPs to TIMPs (administration groups) were decreased significantly, while the expression of MMP-3 (positive control group, Buyang huanwu decoction low-dose and high-dose groups) and TIMP-1 (administration groups) were increased significantly ($P < 0.05$). CONCLUSIONS: Buyang huanwu decoction can inhibit myocardial fibrosis of VMC model mice by inhibiting myocardial collagen hyperplasia, regulating the expression of MMPs and TIMPs, improving MMPs/TIMPs imbalance.

KEYWORDS Buyang huanwu decoction; Viral myocarditis; Myocardial fibrosis; MMP; TIMP; Mice

心肌纤维化是病毒性心肌炎(Viral myocarditis, VMC)最严重的并发症,而基质金属蛋白酶(MMPs)与组织金属蛋白酶抑制因子(TIMPs)失衡是引起VMC心肌纤维化的重要病理基础^[1-2]。药理研究证实,补阳还五汤具有抑制肺纤维化^[3]和肾间质纤维化^[4]的作用;同时本课题组前期研究也证实,该方对VMC模型小鼠心肌纤维化具有一定的抑制作用^[5],但具体的作用机制尚并不明确。为此,本研究以腹腔接种柯萨奇B3病毒(CVB3)致VMC模型小鼠为对象,通过检测其心肌I、III型胶原的含量以及MMP-1、MMP-3、MMP-9、TIMP-1蛋白的表达情况,初步探讨MMPs/TIMPs在补阳还五汤抑制VMC心肌纤维化中的作用,旨在为阐明该方抗VMC心肌纤维化的机制提供依据,为寻找中药方剂治疗VMC心肌纤维化的新靶点提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Eclipse TI-SR型倒置荧光显微镜、DS-U3型成像系统(日本Nikon公司);BX53-p型偏振光显微镜(日本Olympus公司);Trans-Blot® Sd Semi-Dry Transfer Cell型垂直电泳仪及转膜系统(美国Bio-Rad公司);Centrifuge5424型高速离心机(德国Eppendorf公司)。

1.2 药材、药品与试剂

补阳还五汤各组方药材颗粒均购自东莞市中医院,包括黄芪[批号:8012463,规格:24 g,颗粒当量(即颗粒剂与原药材质量的比值):0.2:1]、当归尾(批号:8056523,规格:1.5 g,颗粒当量:0.25:1)、赤芍(批号:7120253,规格:1.0 g,颗粒当量:0.22:1)、地龙(批号:7106023,规格:0.3 g,颗粒当量:0.1:1)、川芎(批号:8061673,规格:0.65 g,颗粒当量:0.22:1)、红花(批号:

8040493,规格:0.48 g,颗粒当量:0.16:1)、桃仁(批号:8041503,规格:0.6 g,颗粒当量:0.2:1)。

卡托普利片(阳性对照,中美上海施贵宝制药有限公司,批号:AAS7080,规格:25 mg);乙二胺四乙酸(EDTA)抗原修复液、苏木精染液、伊红染液、苦味酸天狼猩红染液、RIPA总蛋白裂解液、兔抗小鼠MMP-9单克隆抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)二抗、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)上样缓冲液及相关试剂(武汉谷歌生物科技有限公司,批号分别为G1203、G1031、G1018、G1002、G2002、GB12132-1、GB23303、G2013、G2018);兔抗小鼠MMP-1、MMP-3、TIMP-1单克隆抗体[艾博抗(上海)贸易有限公司,批号分别为ab137332、ab52915、ab86482];兔抗小鼠 β -肌动蛋白(β -actin)单克隆抗体(内参,上海碧云天生物技术有限公司,批号:AF0003);二喹啉甲酸(BCA)蛋白含量测定试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号:PC0020);二氨基联苯胺(DAB)显色液(美国Hyclone公司,批号:35085);MEM培养基(美国Gibco公司,批号:12571048);其余试剂均为分析纯,水为去离子水。

1.3 动物

SPF级BALB/c小鼠,雄性,4周龄,体质量(17.2 ± 0.84)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物生产许可证号:SCXK(京)2016-0006。

1.4 病毒株

CVB3 Nancy标准株由广州呼吸健康研究院惠赠,在HeLa细胞上传代并冻融3次,病毒半数组织培养感染剂量(TCID₅₀)为 1×10^9 个/mL。

2 方法

2.1 药液的制备

补阳还五汤每剂的总质量为28.53 g(即黄芪、当归尾、赤芍、地龙、川芎、红花、桃仁药材颗粒各1袋,与该处方组成一致),溶解于温水(30~40 ℃,下同)7.9 mL中,配制成质量浓度约为3.6 g/mL(以颗粒剂总质量计,下同)的药液,再用温水分别稀释成1.8、0.6 g/mL的药液,备用。

2.2 分组、造模与给药

所有小鼠均适应性喂养1周后,随机分为对照组、模型组、阳性对照组[卡托普利100 mg/(kg·d),以温水为溶剂;剂量参考相关文献^[6-7]设置]和补阳还五汤低、中、高剂量组[6、18、36 g/(kg·d),将“2.1”项下相应质量浓度药液按10 mL/kg给药;剂量参考本课题组前期研究及相关文献^[3,5,8]设置],每组24只。

对照组小鼠单次腹腔接种不含病毒的MEM培养基0.2 mL;其余各组小鼠均单次腹腔接种TCID₅₀为1×10⁹个/mL的CVB3病毒液0.2 mL(以MEM培养基为溶剂)以复制VMC模型^[6,9]。待模型复制成功(即小鼠出现烦躁、拱背,对刺激反应减轻、觅食减少和体质量减轻,甚至精神萎靡等现象^[6,9])后,对照组和模型组小鼠均灌胃等容生理盐水,各给药组小鼠均灌胃相应药物;给药体积均为10 mL/(kg·d),每日1次,连续30 d。

2.3 小鼠一般情况

于实验过程中,观察各组小鼠的一般情况,包括体态、精神、活动、对刺激的反应、觅食和体质量等。

2.4 小鼠心肌标本的采集及处理

将病毒接种当日计为0 d,分别于4、10、20、30 d时称定小鼠体质量(BW)后,各时间点随机断颈处死6只,摘取心脏,滤纸吸干后,称定心脏质量(HW),计算两者比值(HW/BW, mg/g)。随后沿左室长轴将心脏分为3份,保存,备用。

2.5 心肌病理组织学检查和心肌病理组织学积分评价

分别于4、10、20、30 d时采用苏木精-伊红(HE)染色法检测。取“2.3”项下1/3心肌组织,行常规石蜡切片(厚度约为5 μm),经HE染色后,于倒置荧光显微镜下观察心肌细胞的浸润、坏死等情况。同时,每张切片随机取5个高倍视野,计算每个视野中炎症细胞浸润及坏死面积(即病变面积,其病理表现为:细胞间质充血,心肌细胞出现水肿且部分坏死崩解,血管周围伴大量淋巴细胞浸润)与整个视野面积的比例,并按如下标准进行心肌病理组织学积分:无病变计0分,病变面积比例<25%计1分,25%~50%计2分,50%~75%计3分,>75%计4分^[10]。

2.6 I、III型胶原蛋白检测

分别于4、10、20、30 d时采用苦味酸天狼猩红染色法检测。取“2.3”项下另1/3心肌组织,行常规石蜡切片(厚度约为5 μm),经0.1%苦味酸天狼猩红染液染色后,

使用偏振光显微镜观察(其中,I型胶原蛋白呈黄红色,排列紧密且具有较强的双折光性;III型胶原蛋白呈黄绿色,而双折光性较弱)。每张切片选择5个高倍视野拍照,并使用Image Pro Plus Software 6.0软件分析I、III型胶原蛋白面积占整个视野面积的比例,并计算I/III型胶原蛋白比值(即两者面积的比值)。

2.7 相关蛋白表达情况检测

于30 d时采用Western blotting法检测。各组取“2.3”项下余下1/3心肌组织,剪碎,研磨,以RIPA总蛋白裂解液1 mL在冰浴中裂解,于4 ℃下以10 000×g离心15 min,取上清液采用BCA法进行蛋白定量。取蛋白70 μg,加至上样缓冲液中,煮沸5 min变性,并进行SDS-PAGE电泳(浓缩胶浓度:5%,电压:90 V;分离胶浓度:10%,电压:120 V;电流:300 mA,时间:60 min);电泳后转移至PVDF膜上,以5%脱脂牛奶室温封闭2 h,加入相应一抗(稀释度均为1:1 000),4 ℃孵育过夜;TBST溶液清洗8 min×3次,加入二抗(稀释度均为1:3 000),37 ℃孵育1 h;TBST溶液清洗15 min×4次,以DAB显色显色后,置于成像系统中成像并采用Image J 1.48软件处理。以相应蛋白与内参β-actin的灰度值比值表示该蛋白的相对表达量,并计算MMPs与TIMPs相对表达量的比值(即MMPs/TIMPs)。上述试验重复6次。

2.8 统计学方法

采用SPSS 20.0软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用Levene法进行方差齐性检验;多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用Tukey检验(方差齐)或Dunnett's T3检验(方差不齐)。P<0.05为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 动物一般情况

实验过程中,模型组小鼠于造模当日死亡1只,随后补足。接种病毒后,对照组小鼠无明显异常,模型组和各给药组小鼠均出现烦躁、拱背、对刺激反应减轻、觅食及体质量减轻甚至精神萎靡等症状。经药物干预后,各给药组小鼠上述症状均有所缓解。

3.2 HW/BW

4 d时,各组小鼠HW/BW组间比较差异均无统计学意义(P>0.05)。10、20、30 d时,与对照组比较,模型组小鼠HW/BW均显著升高(P<0.05);与模型组比较,各给药组(补阳还五汤低剂量组10 d时除外)小鼠HW/BW均显著降低(P<0.05),详见表1。

3.3 心肌病理组织学特征及心肌病理组织学积分

对照组小鼠心肌细胞排列整齐,间质未见充血及炎症细胞浸润;模型组小鼠心肌组织可见典型的炎症性改变,局部细胞间质充血,并伴大量淋巴细胞浸润,其心肌病理组织学积分(4~30 d各时间点)均显著升高(P<0.05);各给药组小鼠心肌组织上述病理改变均较模型组

有所减轻,其心肌病理组织学积分(10~30 d各时间点)均显著降低($P<0.05$),详见图1[以纤维化早期(10 d)为例]、表2。

表1 各组小鼠不同时间点HW/BW比较($\bar{x}\pm s, n=6, \text{mg/g}$)

Tab 1 Comparison of HW/BW in each group at different time points ($\bar{x}\pm s, n=6, \text{mg/g}$)

组别	4 d	10 d	20 d	30 d
对照组	4.35±0.03	4.36±0.03	4.37±0.04	4.36±0.06
模型组	4.36±0.05	4.80±0.05*	5.99±0.07*	5.98±0.08*
阳性对照组	4.35±0.03	4.62±0.05 [#]	5.14±0.04 [#]	5.11±0.04 [#]
补阳还五汤低剂量组	4.37±0.04	4.77±0.03	5.36±0.04 [#]	5.42±0.06 [#]
补阳还五汤中剂量组	4.35±0.03	4.63±0.05 [#]	5.05±0.04 [#]	5.10±0.10 [#]
补阳还五汤高剂量组	4.35±0.03	4.62±0.03 [#]	4.94±0.05 [#]	5.00±0.08 [#]

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

Note: vs. control group, * $P<0.05$; vs. model group, [#] $P<0.05$

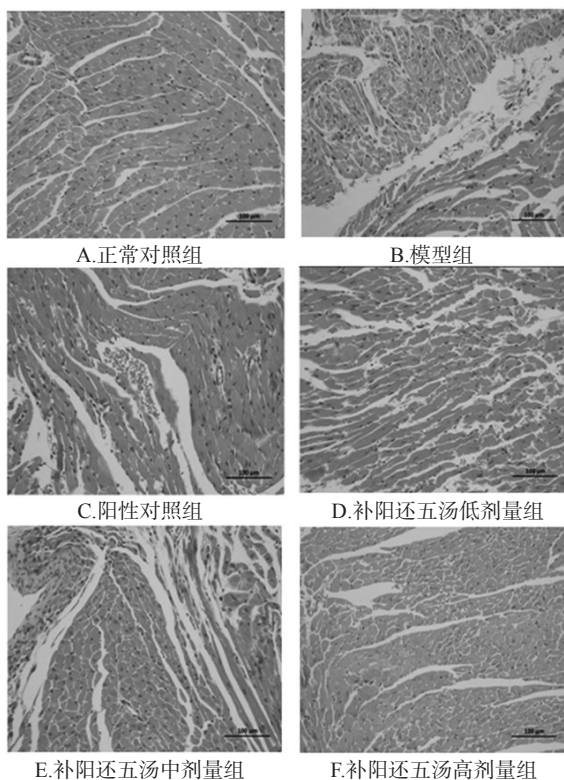


图1 各组小鼠心肌组织形态学观察的显微图(10 d; HE染色, ×200)

Fig 1 Histopathology micrographs of cardiac tissue in each group (10 d; HE staining, ×200)

3.4 I/Ⅲ型胶原蛋白比值

对照组小鼠心肌细胞间隙可见少量胶原蛋白。模型组小鼠心脏细胞间隙可见I、Ⅲ型胶原蛋白,且增生粗大的I型胶原蛋白反复重叠、排列无序、直径不均匀,伴有较强的双折射光,其I/Ⅲ胶原蛋白比值(4~30 d各时间点)均显著升高($P<0.05$)。与模型组比较,各给药组小鼠心肌组织I、Ⅲ型胶原蛋白分布均有所减少,不同时间点I/Ⅲ型胶原蛋白比值(阳性对照组和补阳还五汤高剂量组4~30 d各时间点,补阳还五汤低、中剂量组

20~30 d各时间点)均显著降低($P<0.05$),详见图2[以纤维化晚期(20 d)为例;图中,细箭头为I型胶原蛋白,粗箭头为Ⅲ胶原蛋白]、表3。

表2 各组小鼠不同时间点心肌病理组织学积分比较($\bar{x}\pm s, n=6, \text{分}$)

Tab 2 Comparison of myocardial histopathological score in each group at different time points ($\bar{x}\pm s, n=6, \text{score}$)

组别	4 d	10 d	20 d	30 d
对照组	0	0	0	0
模型组	2.46±0.21*	2.87±0.10*	2.60±0.18*	2.46±0.24*
阳性对照组	2.43±0.29	2.50±0.17 [#]	2.03±0.15 [#]	1.93±0.10 [#]
补阳还五汤低剂量组	2.47±0.30	2.57±0.15 [#]	2.20±0.18 [#]	2.00±0.18 [#]
补阳还五汤中剂量组	2.40±0.28	2.50±0.11 [#]	2.07±0.27 [#]	1.93±0.16 [#]
补阳还五汤高剂量组	2.37±0.23	2.43±0.20 [#]	1.93±0.21 [#]	1.87±0.21 [#]

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

Note: vs. control group, * $P<0.05$; vs. model group, [#] $P<0.05$

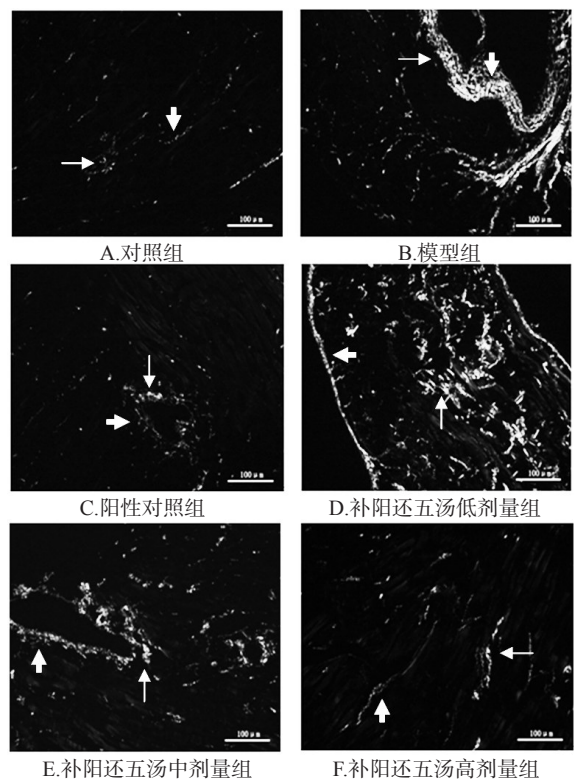


图2 各组小鼠心肌组织I、Ⅲ型胶原蛋白表达的显微图(20 d; 苦味酸天狼猩红染色, ×200)

Fig 2 Micrographs of type I and III collagen in myocardium of mice in each group (20 d; Abcam picosirius red staining, ×200)

3.5 MMP-1、MMP-3、MMP-9、TIMP-1蛋白的表达

与对照组比较,模型组小鼠心肌组织中MMP-1、MMP-9的相对表达量和MMPs/TIMPs均显著升高, MMP-3、TIMP-1的相对表达量均显著降低($P<0.05$)。与模型组比较,阳性对照组和补阳还五汤高剂量组小鼠心肌组织中MMP-1以及各给药组MMP-9的相对表达量和MMPs/TIMPs均显著降低,阳性对照组和补阳还五

汤低、高剂量组 MMP-3 以及各给药组 TIMP-1 的相对表达量均显著升高 ($P < 0.05$), 详见图 3、表 4。

表 3 各组小鼠不同时间点心肌组织 I/III 型胶原蛋白比值比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 3 Comparison of the ratio of type I and III collagen of mice in each group at different time points ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	4 d	10 d	20 d	30 d
对照组	1.31 ± 0.02	1.32 ± 0.14	1.29 ± 0.21	1.21 ± 0.21
模型组	2.41 ± 0.03*	2.64 ± 0.10*	2.87 ± 0.18*	2.46 ± 0.24*
阳性对照组	2.27 ± 0.05*	2.47 ± 0.11*	2.03 ± 0.15*	1.93 ± 0.10*
补阳还五汤低剂量组	2.38 ± 0.06	2.58 ± 0.09	2.20 ± 0.18*	2.00 ± 0.18*
补阳还五汤中剂量组	2.36 ± 0.04	2.57 ± 0.09	2.07 ± 0.27*	1.93 ± 0.16*
补阳还五汤高剂量组	2.25 ± 0.03*	2.41 ± 0.07*	1.93 ± 0.21*	1.87 ± 0.21*

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, * $P < 0.05$

Note: vs. control group, * $P < 0.05$; vs. model group, * $P < 0.05$

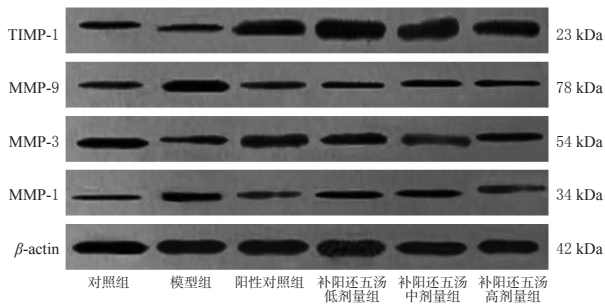


图 3 各组小鼠心肌组织中 MMP-1、MMP-3、MMP-9、TIMP-1 蛋白表达的电泳图

Fig 3 Electrophoregrams of protein expression of MMP-1, MMP-2, MMP-9 and TIMP-1 in cardiac tissue of mice in each group

表 4 各组小鼠心肌组织中 MMP-1、MMP-3、MMP-9、TIMP-1 蛋白的表达情况比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 4 Comparison of protein expression of MMP-1, MMP-3, MMP-9 and TIMP-1 in cardiac tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	MMP-1	MMP-3	MMP-9	TIMP-1	MMPs/TIMPs
对照组	0.202 ± 0.068	0.922 ± 0.202	0.232 ± 0.062	0.943 ± 0.152	1.527 ± 0.238
模型组	0.813 ± 0.124*	0.563 ± 0.152*	2.225 ± 0.186*	0.722 ± 0.059*	4.177 ± 0.813*
阳性对照组	0.207 ± 0.059*	1.765 ± 0.175*	0.553 ± 0.101*	0.910 ± 0.100*	3.103 ± 0.869*
补阳还五汤低剂量组	0.805 ± 0.139	1.175 ± 0.150*	1.013 ± 0.108*	1.007 ± 0.084*	3.258 ± 0.575*
补阳还五汤中剂量组	0.723 ± 0.133	0.555 ± 0.112	1.057 ± 0.116*	0.913 ± 0.099*	2.928 ± 0.523*
补阳还五汤高剂量组	0.643 ± 0.160*	1.033 ± 0.134*	0.622 ± 0.148*	1.077 ± 0.124*	2.163 ± 0.366*

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, * $P < 0.05$

Note: vs. control group, * $P < 0.05$; vs. model group, * $P < 0.05$

4 讨论

VMC 是由嗜心性病毒感染引起的急性炎症性心脏疾病, 其致病病毒以 CVB3 多见^[11]。约 21% 的急性 VMC 患者会出现心肌纤维化并进展为扩张型心肌病, 导致心力衰竭^[12], 其病理基础为胶原蛋白在心肌细胞外基质中过度沉积, 主要表现为胶原蛋白含量升高, 胶原纤维排列、构象紊乱以及 I/III 型胶原蛋白比例改变^[13]。I、III

型胶原蛋白主要由心肌成纤维细胞分泌, 为心脏中主要的胶原蛋白, 分别约占 80% 和 11%。已有研究指出, 与 III 型胶原蛋白比较, I 型胶原蛋白的抗拉力更强, 而伸展性和回缩性更弱, 两者的比例决定了心脏的顺应性及僵硬程度^[14]。MMPs 是一组能特异性降解细胞外基质的 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 依赖性蛋白水解酶家族, 其重要成员 MMP-1、MMP-3、MMP-9 在正常心肌组织中的含量高于其他 MMPs, 主要降解心肌中含量较多的 I、III 型胶原蛋白^[6, 15]。TIMPs 是一组可抑制 MMPs 活性的多功能因子家族, 两者能以 1:1 的比例形成 MMP-TIMP 复合体, 发挥阻断 MMPs 与底物结合、抑制 MMPs 活性的作用, 其中 TIMP-1 能抑制除 MMP-2 和膜型-MMP 以外的大多数 MMPs 的活性。有研究显示, VMC 急性期大量炎症细胞因子可通过诱导 MMPs、抑制 TIMPs 的表达来增加心肌胶原蛋白的降解, 此时 MMPs/TIMPs 最高; VMC 恢复期至慢性期, TIMPs 逐渐上调, MMPs/TIMPs 持续降低, 心肌胶原蛋白的降解也随之减弱或停止, 但 MMPs/TIMPs 仍高于发病前, 表明 MMPs 与 TIMPs 平衡的失调贯穿于 VMC 发病的整个过程^[7, 16-18]。

本研究采用腹腔接种 CVB3 病毒液复制小鼠 VMC 模型。结果显示, 模型组小鼠出现烦躁、拱背、对刺激反应减轻、觅食减少、体质量减轻、精神萎靡等症状, 心肌细胞可见明显炎症性改变及大量淋巴细胞浸润, 其 HW/BW (10~30 d 各时间点)、心肌病理组织学积分 (4~30 d 各时间点)、I/III 型胶原蛋白比值 (4~30 d 各时间点)、MMP-1 和 MMP-9 的相对表达量以及 MMPs/TIMPs 均显著升高, 而 MMP-3 和 TIMP-1 的相对表达量均显著降低。这提示小鼠 VMC 病程以炎症性改变为主, 并逐渐出现纤维化现象, 模型复制成功。但上述结果与李秀清等^[19]研究结果不同的是, 本研究中 MMP-3 在 VMC 模型小鼠心肌组织中的表达明显降低, 推测可能与本研究检测的是 VMC 恢复期 (30 d) MMP-3 的表达有关, 但尚需进一步研究予以证实。

补阳还五汤出自清代名医王清任的《医林改错》, 由生黄芪 120 g、当归 6 g、赤芍 4.5 g、川芎 3 g、桃仁 3 g、红花 3 g、地龙 3 g 组成, 是治疗气虚血瘀证的代表方剂。其中, 黄芪为君药, 味甘、性温, 具有补气升阳、固表止汗、消肿生肌的功效; 当归为臣药, 具有补血的作用, 有祛瘀而不伤好血之妙; 川芎为佐药, 性温、味辛, 具有活血行气、祛风止痛的功效; 红花、桃仁为佐药, 用量较少, 但却有活血化瘀之效; 地龙为使药, 可通经活络; 诸药合用, 共奏补气活血通络之功, 主要用于治疗心脑血管梗死性疾病^[20-22]。有临床研究显示, 补阳还五汤可改善慢性阻塞性肺疾病合并肺间质纤维化患者的肺功能, 延缓肺组织纤维化^[23-24]。现代药理研究证实, 补阳还五汤可通过抑制转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)、细胞外调节蛋白激酶 (ERK) 信号通路来发挥抑制肺间质和肾间质胶原纤维增殖, 达到拮抗组织纤维化的目的^[3-4, 13]。为此, 本研

究以卡托普利作为阳性对照药物(该药具有较好的抑制VMC心肌纤维化的作用^[9]),初步探讨了不同剂量补阳还五汤对VMC模型小鼠相关指标的影响。结果显示,与模型组比较,各给药组小鼠烦躁、拱背等一般情况以及心肌组织纤维化症状均有不同程度的改善,其HW/BW[各给药组10~30 d各时间点(补阳还五汤低剂量组除外)],心肌病理组织学评分(各给药组10~30 d各时间点)、I/Ⅲ型胶原蛋白比值(阳性对照组和补阳还五汤高剂量组4~10 d各时间点以及各给药组20~30 d各时间点)以及心肌组织中MMP-1(阳性对照组和补阳还五汤高剂量组)、MMP-9(各给药组)的相对表达量和MMPs/TIMPs(各给药组)均显著降低,而MMP-3(阳性对照组和补阳还五汤低、高剂量组)和TIMP-1(各给药组)的相对表达量均显著升高。这提示补阳还五汤可降低VMC模型小鼠的HW/BW,改善其心肌病理组织学积分,抑制I、Ⅲ型胶原蛋白增生,改善心肌组织中MMPs/TIMPs失衡状态。但这种作用并非完全随用量剂量的增大而增强,特别是对MMP-3、MMP-9、TIMP-1等蛋白表达的影响,其具体原因还需进一步研究予以明确。

综上所述,补阳还五汤可通过抑制心肌胶原蛋白增生,调节MMPs、TIMPs的表达,改善VMC模型小鼠心肌MMPs/TIMPs的失衡状态等途径来发挥对VMC心肌纤维化的抑制作用。但该方在调控MMPs/TIMPs平衡的分子机制和信号通路上仍不明确,有待后续研究予以完善。

参考文献

[1] 翟淑波,刘仕成,孙景辉.病毒性心肌炎的发病机制、诊断和治疗[J].实用儿科临床杂志,2010,25(22):1762-1764.

[2] 王娟,程志清.基质金属蛋白酶及其组织抑制剂与病毒性心肌炎心肌纤维化[J].中国心血管杂志,2007,12(6):476-479.

[3] 杨晗,王飞,杨昆.补阳还五汤对博莱霉素所致肺纤维化大鼠肺组织ERK表达的影响[J].中华中医药杂志,2017,32(4):1727-1730.

[4] 张选明,杨百京,叶学锋,等.补阳还五汤对肾间质纤维化大鼠模型胶原纤维和TGF-β₁的作用[J].中药药理与临床,2011,27(6):3-6.

[5] 秦又发,周光辉,潘春予,等.补阳还五汤对病毒性心肌炎小鼠心肌纤维化的作用[J].今日药学,2018,28(5):298-301.

[6] 郭春艳.慢性病毒性心肌炎胶原代谢变化及苦参素与卡托普利抗心肌纤维化作用比较研究[D].济南:山东大学,2010.

[7] 邓巍,江瑞,王世红,等.不同剂量卡托普利对病毒性心肌炎小鼠心肌线粒体的保护效应[J].实用儿科临床杂志,2007,22(13):1004-1005.

[8] 朱永坤,黄志恩,潘春予,等.补阳还五汤对脑缺血模型大鼠血清中CD40和CD40L含量的影响[J].中国药房,2015,26(25):3479-3482.

[9] 刘慧强.核因子κB在病毒性心肌炎小鼠发病中的作用[D].长春:吉林大学,2006.

[10] 文纯,谢圭,曾萍,等.曲尼司特抑制病毒性心肌炎小鼠心肌纤维化的作用[J].中国当代儿科杂志,2016,18(5):446-454.

[11] CAFORIO AL, PANKUWEIT S, ARBUSTINI E, et al. Current state of knowledge on aetiology, diagnosis, management, and therapy of myocarditis: a position statement of the European Society of Cardiology Working Group on myocardial and pericardial diseases[J]. *Eur Heart J*, 2013, 34(33):2636-2648.

[12] D'AMBROSIO A, PATTI G, MANZOLI A, et al. The fate of acute myocarditis between spontaneous improvement and evolution to dilated cardiomyopathy: a review[J]. *Heart*, 2001, 85(5):499-504.

[13] 吴岚,吕欣桐,张春艳,等.百令胶囊对病毒性心肌炎小鼠心肌纤维化及TGF-β₁-MAPK/ERK通路的影响[J].中国免疫学杂志,2017,33(10):1493-1497.

[14] 韩奇杰,罗斌,马艺列,等.病毒性心肌炎引起心肌纤维化机制探讨[J].国际内科学杂志,2009,36(9):512-513.

[15] IWANAGA Y, AOYAMA T, KIHARA Y, et al. Excessive activation of matrix metalloproteinases coincides with left ventricular remodeling during transition from hypertrophy to heart failure in hypertensive rats[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2002, 39(8):1384-1391.

[16] 杨敏,陈淳媛,蔡姿丽,等.病毒性心肌炎小鼠心肌基质金属蛋白酶-9的动态变化及意义[J].中国当代儿科杂志,2011,13(8):669-673.

[17] CHEUNG C, LUO H, YANAGAWA B, et al. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in coxsackievirus-induced myocarditis[J]. *Cardiovasc Pathol*, 2006, 15(2):63-74.

[18] 张召才,杨英珍,陈瑞珍,等.病毒性心脏病小鼠心脏胶原代谢的动态变化[J].中国病理生理杂志,2006,22(8):1529-1534.

[19] 李秀清,周娜丹,李岳春.卡维地洛对急性病毒性心肌炎小鼠TNF-α、MMP-3及TIMP-1表达的影响[J].中国新药杂志,2011,20(8):736-739.

[20] 陈宝华.补阳还五汤治疗慢性阻塞性肺疾病合并肺间质纤维化的临床观察[D].成都:成都中医药大学,2013.

[21] 汪强,谷惠敏,朱建中,等.补阳还五汤治疗气虚血瘀型冠心病心绞痛临床回顾性研究[J].南京中医药大学学报,2017,33(6):579-582.

[22] 董刚,贾洪刚.补阳还五汤联合重组人组织型纤溶酶原激活物静脉溶栓治疗脑梗死的研究[J].中华全科医学,2018,16(3):470-472.

[23] 杨昆,李勇华,王飞,等.补阳还五汤防治特发性肺纤维化的作用及机制探讨[J].北京中医药大学学报,2017,40(7):550-557.

[24] 姚玉兰.补阳还五汤对比沙美特罗对慢性阻塞性肺疾病稳定期合并肺间质纤维化患者临床疗效研究[J].四川中医,2017,35(8):77-79.

(收稿日期:2019-04-08 修回日期:2019-08-19)

(编辑:张元媛)