

斑点追踪技术评价健心颗粒对心衰大鼠左室功能的影响

姚涵文, 欧阳秋芳*, 刘磊磊, 苏林丘, 肖凡, 林济钦

福建中医药大学附属第二人民医院, 福建 福州
Email: *torrent_100@163.com

收稿日期: 2021年2月1日; 录用日期: 2021年3月5日; 发布日期: 2021年3月15日

摘要

目的: 探讨斑点追踪技术评价健心颗粒对心衰大鼠左室功能的影响。方法: 42只SD大鼠, 随机分为假手术组、模型组、健心颗粒组和苯那普利组进行干预。假手术组游离腹主动脉后不结扎, 生理盐水灌胃。模型组和药物干预组缩窄腹主动脉法制备心力衰竭大鼠模型。对造模成功大鼠于给药前及给药12周行常规超声心动图检查; 采用斑点追踪技术分析左室心肌收缩期整体纵向应变(global longitudinal strain, GLS)和周向应变(global circumferential strain, GCS)峰值。酶联免疫吸附试验法测定血浆血管紧张素II (AngII)、N末端前脑钠肽(NT-proBNP)水平; 原位缺口末端标记检查左室肌细胞凋亡; MASSON染色分析左室肌纤维化。结果: 与假手术组比较, 模型组左室射血分数降低, 左室扩大, GLS和GCS应变值增高, 血AngII、NT-proBNP增高, 差异具有统计学意义($p < 0.05$)。健心颗粒或苯那普利治疗后, 上述指标均改善。结论: 斑点追踪技术能定量评价心衰大鼠左室功能, 为健心颗粒治疗心力衰竭提供了新的理论依据。

关键词

二维斑点追踪技术, 心衰, 健心颗粒, 左室功能

Two-Dimensional Speckle Tracking in Evaluation of Effect of Jianxin Granule on Left Ventricle Cardiac Function in Rats with Heart Failure

Hanwen Yao, Qiufang Ouyang*, Leilei Liu, linqiu Su, Fan Xiao, Jiqin Lin

The Second People's Hospital Affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou Fujian
Email: *torrent_100@163.com

*通讯作者。

文章引用: 姚涵文, 欧阳秋芳, 刘磊磊, 苏林丘, 肖凡, 林济钦. 斑点追踪技术评价健心颗粒对心衰大鼠左室功能的影响[J]. 医学诊断, 2021, 11(1): 24-29. DOI: 10.12677/md.2021.111004

Abstract

Objective: To observe the effect of Jianxin Granule on left ventricle cardiac function in rats with heart failure by using two-dimensional speckle tracking (STI). **Methods:** Forty-two SD rats were randomly divided into sham operation group, model group, Jianxin Granule group, benazepril group. In the sham operation group, the abdominal aorta was free without ligation, and normal saline was given by gavage. Heart failure was induced by abdominal aorta constriction in model group and drug intervention groups. On the 8th day after operation, the rats were administered with normal saline, Jianxin granules, benazepril. After 12 weeks, left ventricular function was detected by ultrasound; the longitudinal strain and circumferential strain of left ventricular was monitored with STI. The levels of angiotensin II (AngII) and N-terminal pro brain natriuretic peptide (NT-proBNP) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in plasma; the apoptosis of left ventricle myocytes and fibrosis was analyzed by TdT-mediated dUTP nickend labeling and Masson staining respectively. **Results:** Compared with the sham operation group, the model group showed reduced left ventricular ejection fraction (LVEF), enlarged left ventricle, increased GLS and GCS, higher AngII and NT-ProBNP in plasma. The difference was statistically significant ($p < 0.05$). After treatment with Jianxin Granule or benazepril, all the above indicators were improved. **Conclusion:** STI technology can quantitatively evaluate left ventricle function of rats; Jianxin Granule can improve left ventricle function of rats with heart failure and provides a new theoretical basis for Jianxin Granule in treating heart failure.

Keywords

Two-Dimensional Speckle Tracking, Heart Failure, Jianxin Granule, Left Ventricule Function

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 前言

充血性心力衰竭(congestive heart failure, CHF)是指各种原因导致心脏结构或/和功能异常,使心室射血或充盈能力受损的一种临床综合征。目前全球心力衰竭患者约有2600万,我国约有450万人,约60%的患者在确诊5年内死亡[1]。因此,心力衰竭是当今严重的公共卫生问题和临床医学亟待解决的难题。研究表明健心颗粒可以逆转左室肥厚[2],改善临床症状、中医证候疗效及左室射血分数,降低血浆脑钠肽(BNP)水平,改善心功能[3]。超声斑点追踪(two dimensional speckle tracking echocardiography, 2D-STE)技术通过相邻两斑点的距离随时间的变化反映心肌的形变[4],能准确、客观地评价心肌运动,动态观察心力衰竭的进展过程。本研究应用二维斑点追踪技术定量评价健心颗粒对慢性心衰大鼠左室功能的影响,从而为中医药防治CHF提供新的思路和方法。

2. 材料与方法

2.1. 药物的来源、组方及制备

健心颗粒原药材购于福建省药材公司,经鉴定后按照相关的制剂和质量标准由本院制剂室制成颗粒剂。

2.2. 动物模型及分组

将体重 200 g 左右的 SD 大鼠 42 只(雌性 20 只, 雄性 22 只), 随机分成假手术组、模型组、健心颗粒组(给予剂量 1.8 g/kg/d)、苯那普利组(给予剂量 10 mg/kg/d)。按孙庆怡等报道的方法[5], 采用缩窄腹主动脉法制备慢性心衰大鼠模型假手术组大鼠在游离腹主动脉后不结扎。于造模后第 7 天用多普勒超声测腹主动脉的狭窄程度, 判断模型是否成功。对造模成功大鼠于第 8 天开始按上述方案灌胃给药, 假手术组和模型组给予相同剂量的生理盐水。各组鼠分别于给药后第 12 周进行相关实验研究。

2.3. 应用斑点追踪技术分析心衰大鼠左室功能

所有实验动物于给药前及给药后 12 周用 10%水合氯醛(3 ml/kg)腹腔注射麻醉下, 采用 PHILIPS EQ 7c 超声仪进行常规超声心动图检查。剃掉大鼠胸前的毛, 铺声垫, M 型和二维超声心动图测量左室舒张末期内径(left ventricular end diastolic diameter, LVEDD)、室间隔舒张末期厚度(interventricular septal end diastolic thickness, IVST)、左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)与缩短分数(left ventricular shortening fraction, LVFS)。动态采集图像, 二维动态图像存储, 帧频大于 190 帧/s。采图时取心率稳定的 3 个心动周期的左心室胸骨旁长轴切面和乳头肌水平短轴切面的图, 采用仪器自带 CMQ 软件测量左室心肌收缩期整体周向应变(global circumferential strain, GCS)和纵向应变(global longitudinal strain, GLS)峰值。各指标均测量 3 次, 取平均值, 所有的数据由专门的人员分析(双盲)。

2.4. 采用 ELISA 法测血浆 AngII、ANF、BNP、NT-proBNP 水平

血浆检测血管紧张素 II (AngII)、心钠肽(ANP)、脑钠肽(BNP)、N 末端脑钠肽(NT-proBNP)。处死大鼠, 断头取血, 2 ml 血注入含 10%二乙胺四乙酸二钠 30 μ l 和抑肽酶 40 试管中, 混匀, 4 $^{\circ}$ C, 3000 r/min 离心 10 min, 分离血浆, -20 $^{\circ}$ C 存放。测定前冷水中复融, 再次 4 $^{\circ}$ C, 3000 r/min 离心 5 min 后, 取上清液, 采用非平衡法测定。将聚苯乙烯试管编号, 经过加液程序后混匀, 4 $^{\circ}$ C, 3500 r/min 离心 20 min, 吸取上清液, 采用免疫放射法测定。在半对数坐标纸上绘制标准曲线, 查出样品值。

2.5. 左室肌标本的采集及左室肌细胞凋亡检测

采用原位缺口末端标记法, 对各组所取心肌组织用 10%中性缓冲福尔马林固定, 常规石蜡切片。按“原位细胞凋亡检测试剂盒”说明进行检测。

2.6. 左室肌纤维化检测

分离心脏, 切取左、右心耳并用 10%中性甲醛固定。左心耳经石蜡包埋, 取左心耳冠状面最大横径处切片, 行 MASSON 染色。胶原纤维染成蓝色, 胞浆、肌纤维呈红色, 而胞核为黑蓝色, 将染色标本用进行图像处理。每个标本选一个切片, 每个切片随机选 2 个无血管的视野, 计算每个视野中胶原组织所占百分比, 最后取平均值代表胶原容积分数(CVF)。

3. 统计学处理

本实验数据统计均用 SPSS Version 17.0 完成, 资料统计采用 One-Way ANOVA 法分析, 各组间的相互比较采用 q 检验。统计显著性水平为 $P < 0.05$ 。用 Pearson 进行各组数据相关性分析。

4. 结果

4.1. ELISA 法测血清 AngII 水平及 ANP、BNP、NT-proBNP 水平与斑点追踪应左室变值的关系

如表 1, 模型组和各治疗组的 AngII、ANP、BNP、NT-proBNP 水平均明显高于假手术组($P < 0.05$)。

与模型组比较,各治疗组上述指标均显著降低($p < 0.05$)。超声心动图结果显示:与假手术组比较,模型组左室射血分数(EF)、缩短分数(FS)减低,而室间隔厚度(IVST)、左室舒张末径(LVEDD)增加,说明腹主动脉缩窄所致心力衰竭建模成功。与假手术组相比,模型组左室心肌收缩期 GCS 和 GLS 峰值明显减低($p < 0.05$)。健心颗粒与苯那普利治疗后, GLS 和 GCS 应变值较模型组增高($p < 0.05$),健心颗粒组与苯那普利组比较,差异无统计学意义。

Table 1. Plasma AngII, plasma NT-proBNP, left ventricular ultrasound analysis and strain comparison in each group
表 1. 各组血浆 AngII、血浆 NT-proBNP、左室超声分析及应变比较

组别	假手术组	模型组	健心颗粒组	苯那普利组
AngII, pg/ml	250.83 ± 61.24	780.36 ± 90.45*	519.27 ± 62.18*#	328.93 ± 42.09*#
NT-proBNP, ng/ml	12.15 ± 2.29	51.63 ± 7.41*	27.97 ± 3.13*#	19.45 ± 2.82*#
IVST, mm	0.91 ± 0.08	1.32 ± 0.18*	1.17 ± 0.13*#	1.01 ± 0.12*#
LVEDD, mm	6.15 ± 0.41	10.87 ± 1.53*	9.62 ± 0.94*#	8.16 ± 0.82*#
LVEF, %	70.53 ± 7.65	32.69 ± 4.23*	47.46 ± 5.31*#	54.63 ± 4.87*#
LVFS, %	37.53 ± 4.05	14.15 ± 2.76*	17.65 ± 2.03*#	22.54 ± 2.91*#
GLS	3.93 ± 0.41	5.73 ± 0.84*	5.17 ± 0.72*#	4.45 ± 0.52*#
GCS	0.96 ± 0.07	1.95 ± 0.14*	1.65 ± 0.13*#	1.27 ± 0.15*#

注:数据表示为 $\bar{x} \pm s$, $n = 10$ 。与假手术组比较, * $p < 0.05$; 与模型组比较, # $p < 0.05$ 。AngII, 血管紧张素 II; NT-proBNP, N 端前脑钠肽; IVST, 室间隔厚度; LVEF, 左室射血分数; LVFS, 左室缩短分数; LVEDD, 左室舒张末径。

4.2. 左室肌细胞凋亡

与假手术组相比,模型组左室肌细胞凋亡细胞数明显增加($p < 0.01$)。尽管健心颗粒治疗后的左室凋亡细胞数仍较假手术组严重(各治疗组均 $p < 0.01$),但与模型组比较,健心颗粒治疗后,细胞凋亡明显减少($p < 0.01$),与苯那普利组比较,差异无统计学意义。

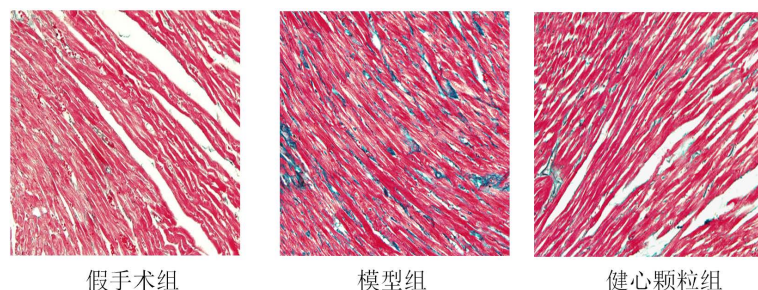
4.3. 左室间质纤维化

胶原容积分数(CVF)代表左室纤维化的严重程度,Masson 染色时胶原纤维呈蓝色,肌纤维和纤维素呈红色,蓝色染色面积的百分比为胶原容积分数。与假手术组相比,模型组左室 CVF 显著增加($p < 0.01$)。尽管健心颗粒治疗后的左室肌纤维化仍较假手术组严重(各治疗组均 $p < 0.05$),与模型组相比,健心颗粒组和苯那普利组 CVF 显著降低($p < 0.001$),两组治疗均达到显著性差异。健心颗粒组与苯那普利组间差异无统计学意义($p > 0.05$) (见图 1)。

5. 讨论

心力衰竭根本病机为心之阳气虚衰,导致血脉瘀滞、水饮内停。我们前期研究显示按照温阳益气活血法配制的院内制剂——健心颗粒,由黄芪 10 g、红参 5 g、蒲黄 3 g、丹参 5 g、猪苓 5 g、白术 5 g、桂枝 3 g、葶苈子 5 g 组成。以黄芪、红参为君,益气通阳以治其本;臣以生蒲黄、丹参活血化瘀,通利血脉;佐以猪苓、桂枝通阳化饮利水;泽泻、葶苈子宣肺利水为使药。该方剂防治慢性心衰已通过福建省药检所复核,取得省药监局颁发的医院制剂批准文号(闽药制字 Z20100010),并已获得专利(专利号 ZL201310116303.5)。

心力衰竭心室重构表现为结构重构、离子重构和电重构。有研究表明,细胞内的钙超载是引起细胞凋亡和心肌重构的重要因素。因此,调节 Ca^{2+} 的动态平衡是治疗慢性心力衰竭的重要途径。本研究发现,与模型组相比,健心颗粒组的胶原容积分数(CVF)及左室肌细胞凋亡细胞数都明显减少。表明健心颗粒改



左室肌组织 Masson 染色, 胶原纤维呈蓝色, 肌纤维和纤维素呈红色, 模型组大鼠左室肌纤维化程度高于假手术组, 健心颗粒组纤维化程度轻。

Figure 1. Comparison of collagen volume fraction in each group

图 1. 各组胶原容积分数对比

善心功能的潜在机制可能是通过上调心肌肌浆网钙泵的表达, 减少心肌间质胶原浓度, 降解血管周围胶原纤维化, 改善心室重构[6]。

斑点追踪技术是近年研究的新热点, 它通过追踪心肌内回声斑点的运动轨迹, 分析出心肌的应变、应变率等相关指标[7]。左心室心肌收缩时, 在长轴方向产生纵向运动, 短轴方向产生圆周运动。左心衰大鼠心肌纤维变性、结构改变、胶原纤维增多, 从而表现为纵向和圆周方向运动功能异常[8]。本研究中大鼠腹主动脉结扎后, 出现室间隔增厚, 左室射血分数降低、左室扩大, GLS 和 GCS 应变值增高。表明模型鼠出现了室壁肥厚、左心衰竭、左室重构。运用健心颗粒治疗后, 左室腔回缩, GLS 和 GCS 应变值增高, 说明健心颗粒可抑制心肌纤维化, 增强左室舒缩功能, 从而改善心室重构。

肾素-血管紧张素系统(RAAS)参与心力衰竭的多种病理功能, 是一个多环节、多步骤、复杂的级联过程。如: 心脏重构、心肌细胞凋亡、间质纤维化等[9]。血管紧张素转化酶抑制剂苯那普利能降低血 AngII 水平, 抑制心肌细胞凋亡与间质纤维化。本研究表明, 与模型组比较, 苯那普利显著降低血 AngII ($p < 0.05$) 水平, 减少左室肌细胞凋亡数、降低 CVF [10]。健心颗粒发挥与苯那普利类似的作用, 可抑制血中 AngII 水平, 间接说明其作用机制可能与抑制 RAAS 系统有关。

总之, 健心颗粒可改善心衰大鼠左室功能、减轻左室肌细胞凋亡, 斑点追踪技术可无创定量评价大鼠左室功能; 本研究从新的视角为健心颗粒治疗心力衰竭提供了理论依据。

基金项目

福建省教育厅中青年教师教育科研项目(科技类)(JT180236)。

参考文献

- [1] 曹剑. 心力衰竭最新诊治进展[J]. 中华保健医学杂志, 2017, 19(5): 375-378.
- [2] 黄飞翔, 叶盈. 健心颗粒干预大鼠慢性心力衰竭左室重构的实验研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2006, 4(9): 780-782.
- [3] 赵红佳, 郭鹤晖, 欧阳秋芳, 等. 健心颗粒改善慢性心肾综合征患者肾功能的临床研究[J]. 福建中医学院学报, 2011(1): 1-3.
- [4] Artis, N.J., Oxborough, D.L., Williams, G., et al. (2008) Two-Dimensional Strain Imaging: A New Echocardiographic Advance with Research and Clinical Applications. *International Journal of Cardiology*, **123**, 240-248. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2007.02.046>
- [5] 孙庆怡, 等. 腹主动脉结扎大鼠心房纤维化的实验研究[J]. 中国心脏起搏与心电生理杂志, 1998, 12(3): 134-136.
- [6] 欧阳秋芳, 赵红佳, 曾凯, 等. 健心颗粒对慢性心衰大鼠心功能的影响及其可能机制[J]. 心脏杂志, 2013, 25(1): 31-34, 42.

-
- [7] 姚涵文, 赵红佳, 游涛, 等. 超声斑点追踪技术用于缺血心肌应变的研究[J]. 福建医药杂志, 2012, 34(3): 117-120.
- [8] 马红, 谢明星, 王新房, 等. 超声斑点追踪成像评价 2 型糖尿病患者左心室收缩功能早期改变[J]. 中华超声影像学杂志, 2009, 18(2): 96-100.
- [9] Sayer, G. and Bhat, G. (2014) The Renin-Angiotensin-Aldosterone System and Heart Failure. *Cardiology Clinics*, **32**, 21-32. <https://doi.org/10.1016/j.ccl.2013.09.002>
- [10] 叶盈, 黄飞翔, 蔡晶, 等. 健心颗粒干预慢性心力衰竭细胞凋亡的实验研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2007, 5(3): 209-211.