

- [7] Oliveria DC, Lopes PG, Spader TB, et al. Antifungal susceptibilities of *Sporothrix albicans*, *S. brasiliensis*, and *S. luriei* of the *S. schenckii* complex identified in Brazil[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(8): 3047.
- [8] Rodrigues AM, De Hoog S, De Camargo ZP. Emergence of pathogenicity in the *Sporothrix schenckii* complex[J]. Med mycol, 2013, 51(4): 405.
- [9] 蔡晴, 宋洋, 沈永年, 等. 申克孢子丝菌菌丝相至酵母相转化的实验研究[J]. 中国真菌学杂志, 2010, 5(5): 273.
- [10] Trilles L, Fernández-Torres B, Dos Santos Lazéra M, et al. In vitro antifungal susceptibilities of *sporothrix schenckii* in two growth phases [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(9): 3952.
- [11] 蔡晴, 李珊山, 宋洋, 等. 量稀释法检测申克孢子丝菌酵母相体外抗真菌药物敏感性[J]. 中国皮肤性病学, 2011, 25(5): 355.
- [12] Kohler LM, Monteiro PC, Hahn RC, et al. In vitro susceptibilities of isolates of *Sporothrix schenckii* to itraconazole and terbinafine[J]. J clin microbiol, 2004, 42(9): 4319.
- [13] 赵景辉, 孙秋宁, 闫蓝, 等. 申克孢子丝菌双相体外药物敏感试验研究[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2007, 23(7): 575.
- [14] Aquino-Pinero E, Rodriguez-del Valle N. Characterization of a protein kinase C gene in *Sporothrix schenckii* and its expression during the yeast-to-mycelium transition[J]. Med Mycol, 2002, 40(2): 185.
- [15] 王晓慧, 刘伟, 李若瑜. 申克孢子丝菌体外药敏试验研究近况[J]. 中国真菌学杂志, 2009, 4(2), 120.
- [16] 张静, 黄怀球, 薛汝增, 等. 温度和培养基在申克孢子丝菌酵母相转化中的作用研究[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2010, 31(4): 491.
- [17] 薛汝增, 张静, 黄怀球. 申克孢子丝菌体外药敏试验研究进展[J]. 中国真菌学杂志, 2008, 3(6): 372.
- (编辑: 邓响潮)

毛冬青对心衰模型大鼠心功能及 miR133a 表达的影响

黄习文, 游志德, 陈洁, 冼绍祥(广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510405)

摘要: **目的** 观察毛冬青对心衰大鼠心功能及微小 RNA133a(miR133a)表达的影响。**方法** 腹主动脉缩窄术复制大鼠心衰模型, 随机分为毛冬青高、低剂量组, 卡托普利组, 心衰模型组和假手术组, 干预 2 周后抽血查 B 型尿钠肽(BNP)和行心脏彩超检查心功能, 并对大鼠心脏组织 miR133a 进行荧光 PCR 检测。**结果** 心衰模型组的心功能指标明显低于假手术组, 3 个药物干预组心功能指标均有较好的提高作用, 组间作用无显著性差异; 与假手术组比较, 心衰模型组 miR133a 的表达下调, 各药物干预组与心衰模型组比较, miR133a 的表达均显著上升, 其中以毛冬青低剂量组最为显著。**结论** 腹主动脉缩窄可成功复制大鼠慢性心力衰竭模型, 心力衰竭大鼠模型较假手术组大鼠 miR133a 的表达下调。不同剂量的毛冬青均能改善慢性心力衰竭大鼠模型的心功能, 并且能上调 miR133a 的表达, 但上调幅度与心功能改善情况未呈明显量效关系。

关键词: 慢性心力衰竭; 毛冬青; miR133a; 大鼠

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)01-0048-03

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.01.013

Effect of Radix Ilicis Pubescentis on Heart Function and the miR133a Expression in Chronic Heart Failure Rats

HUANG Xiwen, YOU Zhide, CHEN Jie, XIAN Shaoxiang(The First Affiliated Hospital of Guangzhao University of Chinese Medicine, GuangZhou 510405 Guangdong, China)

Abstract: Objective To investigate the influence of Radix Ilicis Pubescentis(RIP) on the heart function and microRNA133a(miR133a) expression in chronic heart failure(CHF) rats. **Methods** CHF rat model was induced by abdominal aorta coarctation for 4 weeks. Rats were divided into high-dose RIP group, low-dose RIP group, Captopril group, CHF model group and sham operation group. After intervention for 2 weeks, blood brain natriuretic peptide

收稿日期: 2013-08-11

作者简介: 黄习文, 男, 主治医师, 研究方向: 中医药防治心脑血管疾病及脾胃病的研究。Email: uncleking@163.com。通讯作者: 冼绍祥, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中医药防治心脑血管疾病的研究。Email: zhongyfy@126.com。

基金项目: 广东省中医药局建设中医药强省科研课题(2010175); 广州中医药大学中医内科学特色重点学科建设项目。

(BNP) was detected, heart function was tested by cardiac color ultrasound, and myocardial miR133a expression was examined by fluorescence polymerase chain reaction (PCR). **Results** The heart function of CHF model group was lower than the sham operation group, and the heart function was improved in the three medication groups, the difference being insignificant. The expression level of miR133a was down-regulated in CHF model group in comparison with the sham operation group, and was up-regulated in the three medication groups, especially in low-dose RIP group (in comparison with CHF model group). **Conclusion** CHF rats can be induced successfully by abdominal aorta coarctation, miR133a expression in the CHF rats declines when compared to the sham operation group. High- and low-dose Radix Ilicis Pubescentis can improve the heart function of CHF rats and increase miR133a expression, and the up-regulation and heart function improvement are not dose-dependent.

Keywords: Chronic heart failure; Radix Ilicis Pubescentis; MicroRNA133a; Rats

毛冬青为冬青科冬青属植物毛冬青的根或叶，在南方尤其是广东常见，味辛、苦，性微寒，具有清热解毒、活血通脉之功效，临床常用于治疗心脑血管疾病及脉管炎等。本课题组近年来致力于其在慢性心力衰竭中的作用研究^[1-4]，发现其能有效防治慢性心力衰竭，改善炎症反应，改善血管内皮功能，可逆转慢性心力衰竭大鼠模型的心室重构和心肌纤维化。

微小 RNA (miR) 是一类近年备受重视的大小为 19~25 个碱基内源性非编码 RNA，参与细胞的转录后调节，从而参与许多重要的生物进程包括心血管系统生理和病理作用，研究发现 miR133 具有心肌组织特异性^[5]，上调 miR133 对心力衰竭起保护性作用^[6]。本研究旨在进一步验证毛冬青对心力衰竭的作用并观察其对心衰模型大鼠心肌组织 miR133a 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 动物 SD 大鼠，雄性，SPF 级，体质量(250±20)g，由广州中医药大学实验动物中心提供，动物合格证号：0043395。SPF 级鼠料，由广州中医药大学实验动物中心提供，合格证编号：0153718。

1.2 药品及试剂 毛冬青，康美药业股份有限公司；卡托普利片，中美上海施贵宝制药有限公司。TRIZOL，美国 invitrogen 公司；大鼠 miR133a 核酸扩增(PCR)荧光检测试剂盒，广州市达晖生物技术有限公司；大鼠血清 B 型尿钠肽(BNP)试剂盒，美国雅培公司。

1.3 仪器 PHILIPS IE33 彩色多普勒超声诊断仪，美国 PHILIPS 公司，小儿心脏探头(频率 3~8 MHz)；ABI PRISM 7000 荧光 PCR 检测仪；I2000 全自动化学发光免疫检测分析仪，美国雅培。

1.4 毛冬青水提液制备 取毛冬青药材，第 1 次加 10 倍量水浸泡 4 h 后煎煮，水开后煮 40 min 将药液倒

出；再加 8 倍量水煎煮第 2 次，水开后煮 30 min 将药液倒出；合并两次水提液，浓缩至 2 kg·L⁻¹。

1.5 分组、模型复制及给药 采用腹主动脉缩窄术复制心衰大鼠模型。大鼠术前禁食 8 h，10 %的水合氯醛(300 mg·kg⁻¹)麻醉后，进行腹部常规消毒、开腹。在肾动脉分支梢上处找到腹主动脉并分离，腹主动脉平行放置七号注射针头，用医用 000 线结扎，使腹主动脉缩窄，缩窄面积为原来的 70 % (即直径为原来的 55 %)，结扎完毕关闭腹腔。术后给予青霉素钠腹腔注射 3 d 以防止感染，待大鼠苏醒后给予常规饲养。假手术组大鼠，同样行麻醉开胸关胸术，术后处理同模型组。术后均观察 30 d。然后将模型组大鼠随机分为毛冬青高、低剂量组、卡托普利组和心衰模型组。毛冬青低剂量组灌服毛冬青水提液 10 g·kg⁻¹·d⁻¹；毛冬青高剂量组灌服毛冬青水提液 20 g·kg⁻¹·d⁻¹；对照组灌服卡托普利 100 mg·kg⁻¹·d⁻¹；心衰模型组及假手术组灌服等量生理盐水，各组均持续给药 2 周。

1.6 心脏彩超测定 大鼠以 10 %的水合氯醛(300 mg·kg⁻¹)麻醉，左胸口脱毛，采用 PHILIPS IE33 彩色多普勒超声诊断仪，小儿心脏探头，在二维超声心动图(2DE)下于左室长轴切面、短轴二腔切面及四腔切面，左室长轴切面观察各腔室的大小及室壁运动情况，应用心脏功能测定软件包计算射血分数(EF)、短轴缩短分数(FS)。所有资料均存储图像后分析，计数资料连续测量 3 个心动周期取平均值。

1.7 BNP 检测 大鼠麻醉后打开腹腔，腹主动脉采血 5 mL/只，采血后处死大鼠。将动脉血离心取血清，放入-30 ℃冰箱保存，所有血清采集完成后用酶联免疫法(ELISA)大鼠血清试剂盒测定 BNP。

1.8 MiR133a 表达测定 取大鼠心脏组织样品置预冷的组织匀浆器，加入 1 mL TRIZOL，反复碾磨匀浆，

将匀浆后组织转移至灭菌 1.5 mL 离心管中, 然后通过分离、沉淀、洗涤和溶解来抽提 RNA, 接着 Poly A 加尾, 逆转录反应, 实时荧光 PCR 扩增获得荧光 PCR 数据。MiR133a 表达结果分析采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量分析方法:

$$F=2^{-(\text{样品目的 miR 平均 Ct 值}-\text{样品内参基因平均 Ct 值})-(\text{对照目的 miR 平均 Ct 值}-\text{对照内参基因平均 Ct 值})}$$

1.9 统计学处理方法 所有数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 SPSS 13.0 统计软件, 采用单因素方差分析及 LSD 检验进行组间比较, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠心功能指标比较 心衰模型组大鼠 EF 及 FS 明显低于假手术组($P < 0.01$)。毛冬青低剂量组和高剂量组以及卡托普利组 EFRFS 明显上升, 与心衰模型组比较差异均有统计学意义($P < 0.01$), 但 3 组间无统计学意义($P > 0.05$), 结果见表 1。

表 1 各组大鼠心功能指标比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of EF and FS in each group

组别	n	剂量 /g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	EF/%	FS/%
假手术组	8	-	91.62 ± 4.00 ^{△△}	59.38 ± 7.27 ^{△△}
心衰模型组	10	-	73.00 ± 4.37	37.20 ± 3.58
毛冬青高剂量组	9	20	82.88 ± 3.27 ^{△△}	46.88 ± 3.40 ^{△△}
毛冬青低剂量组	6	10	83.83 ± 6.97 ^{△△}	48.17 ± 7.05 ^{△△}
卡托普利组	8	0.1	85.78 ± 3.46 ^{△△}	49.56 ± 4.48 ^{△△}

注: 与心衰模型组比较, ^{△△} $P < 0.01$ 。

2.2 各组大鼠 BNP 的比较 心衰模型组大鼠 BNP 水平明显高于假手术组($P < 0.01$)。毛冬青低剂量组和高剂量组以及卡托普利组与心衰模型组比较, BNP 明显下降, 均有非常显著性差异($P < 0.01$), 组间比较, 毛冬青低剂量组与卡托普利组 BNP 无显著性差异($P > 0.05$), 毛冬青高剂量组 BNP 下降幅度小于卡托普利组($P < 0.01$), 结果见表 2。

表 2 各组大鼠 BNP 水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of BNP level in each group

组别	n	剂量 /g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	BNP/ng·mL ⁻¹
假手术组	7	-	14.42 ± 3.39 ^{△△}
心衰模型组	6	-	42.10 ± 8.98
毛冬青高剂量组	6	20	29.65 ± 6.52 ^{△△**}
毛冬青低剂量组	5	10	20.94 ± 2.45 ^{△△}
卡托普利组	6	0.1	19.17 ± 3.32 ^{△△}

注: 与心衰模型组比较, ^{△△} $P < 0.01$; 与卡托普利组比较, ^{**} $P < 0.01$ 。

2.3 各组大鼠心肌组织 miR133a 相对表达水平的比

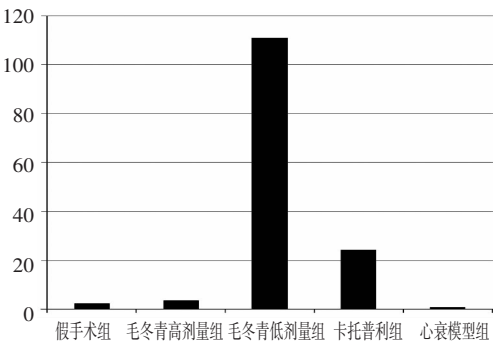


图 1 各组大鼠心肌组织 miR133a 相对表达量
Figure 1 The comparative expression of miR133a in each group

较 与假手术组比较, 心衰模型组 miR133a 表达下调, 各药物组与心衰模型组比较, miR133a 表达均显著上升, 其中, 以毛冬青低剂量组最为显著, 见图 1。

3 讨论

慢性心力衰竭(CHF)是由于各种心血管疾病长期负荷过重、心肌损害及收缩力减弱所致心功能不全(失代偿期)的一种复杂综合征, 是众多心脏疾病的终末阶段, 致残致死率高。目前仍欠缺理想的治疗手段, 对其发生发展的机理进行深入探讨, 寻求理想的治疗方案十分重要。miR 的发现以及其对心脏生长发育、分化、增殖与凋亡的调控作用, 为心脏各种疾病包括慢性心力衰竭在基因水平上的防治提供了新的作用靶点。研究^[7]认为 miR133a 是心脏特异性miR, 与慢性心力衰竭的发生发展有重要联系。

腹主动脉缩窄法是大鼠慢性心力衰竭模型复制的常用方法, 主要是通过缩窄主动脉管径, 导致主动脉压力升高, 后负荷压力增加, 当后负荷持续增高, 心肌细胞将加强收缩功能, 久之心肌逐渐发生肥厚、扩张, 泵血功能减退, 以致心力衰竭^[8], EF 和 FS 是心功能的重要指标, BNP 在评价心功能中也有重要价值^[9]。

从本研究结果可以看出, 心衰模型组心功能较假手术组明显下降, 各组药物干预后均能显著提高造模影响的心功能, 研究进一步证实了腹主动脉缩窄术可复制慢性心力衰竭模型, 毛冬青可以有效提高心衰模型大鼠的心功能。但本研究未能证实其作用的量效关系。研究发现, 心衰模型组的 miR133a 的表达较假手术组明显下调, 经药物干预治疗后能显著升高, 提示了 miR133a 的表达与心功能的相关性, 但药物干预后 miR133a 表达的升高与心功能恢复的程度未能

(下转第 92 页)