学校代码：10063 专业代码：100706

**二○一三届硕士研究生毕业暨学位论文**

**TY6052 抗心衰作用及作用机制研究**

Research on anti-heart failure effects and mechanism of action of TY6052

**专** 业：药**理学 学位类型：科学学位研 究 生：张丹丹**

**指导教师：赵专友** 研究员

**王维亭** 副研究员

天 津 中 医 药 大 学二**○**一三年五月

致 谢

时光荏苒，转眼间充实的三年研究生生活即将画上句号。研究生的生活紧张而忙碌，但却有身在其中，外人难以体会的充实的快乐，研究生三年让人充分体会到了成长的意义。

首先，感谢我的导师赵专友研究员，赵老师专业功底深厚，治学态度严谨，为人谦和。在学术方面对学生要求严格，这种态度极大的促进了我的专业水平的提高，也让我时刻坚持严谨认真的理念，不敢有所懈怠。赵老师也很关心我们的生活，尽可能的给予我们最大的帮助。师恩难忘，在此向赵老师致以深深的感谢及崇高的敬意。

感谢我的指导老师王维亭老师，三年来，王老师一直亲自指导我的学习，三年的时光，使我们形成了一种亦师亦友的深厚师生情谊。王老师思维敏捷，在实验中经常能提出创新性观点。跟随王老师学习的阶段，是我的科研思路和科研能力逐步形成和发展的时期。王老师为我的论文付出了很多，在此，向王老师三年来对我的辛勤栽培表示诚挚的谢意。

同时，感谢徐向伟、席文恭、于冰、郝春华等老师，孙双勇师兄，李亚丽师姐，梁艳、荆国晓、邵明香同学在我的学习和生活中给予的大力帮助。特别感谢梁艳同学同窗三年带给我的快乐。

向一直以来支持和理解我的父母及家人表达深深的谢意，谢谢你们为我的成长所付出的一切，在此祝你们身体健康。

最后，感谢参与此论文评审和答辩的各位老师，谢谢你们。

目 录

[中文摘要](#_Toc686850058) 3

[Abstract](#_Toc686850059) 3

[英文缩略词表](#_Toc686850060) 4

[综述](#_Toc686850061) 5

[1 大鼠心梗后心衰模型的建立](#_Toc686850062) 5

[2 大鼠心梗后心衰模型的评价方法](#_Toc686850063) 5

[3 大鼠心梗后心衰模型的心脏形态病理学变化](#_Toc686850064) 6

[4 大鼠心梗后心衰模型心衰形成的病理Th理机制](#_Toc686850065) 6

[5 结语](#_Toc686850066) 7

[综述参考文献](#_Toc686850067) 7

[前 言](#_Toc686850068) 8

[实验一TY6052正性肌力效应研究](#_Toc686850069) 9

[1 实验材料](#_Toc686850070) 9

[SCXK(京)2012-0001。](#_Toc686850071) 9

[2 实验方法](#_Toc686850072) 9

[3 实验结果](#_Toc686850073) 10

[4 小结](#_Toc686850074) 19

[1 实验材料](#_Toc686850075) 19

[2 实验方法](#_Toc686850076) 20

[3 实验结果](#_Toc686850077) 20

[4 小结](#_Toc686850078) 24

[1 实验材料](#_Toc686850079) 24

[2 实验方法](#_Toc686850080) 25

[3 实验结果](#_Toc686850081) 25

[4 小结](#_Toc686850082) 34

[1 实验材料](#_Toc686850083) 34

[2 实验方法](#_Toc686850084) 35

[3 实验结果](#_Toc686850085) 36

[4 小结](#_Toc686850086) 39

[1 实验材料](#_Toc686850087) 40

[2 实验方法](#_Toc686850088) 40

[3 实验结果](#_Toc686850089) 41

[4 小结](#_Toc686850090) 44

[讨论](#_Toc686850091) 44

[参考文献](#_Toc686850092) 45

表格目录

表 1 TY6052与ASI对+LVd*p*/d*t*max的影响(*x*-±*s*，n=6～8)组别假手术模型TY6052 ASI 10

表 2 西地兰对+LVdp/dtmax的影响(x-±s，n=6～8)组别假手术模型西地兰 11

表 3 多巴胺对+LVdp/dtmax的影响(x-±s，n=6～8)组别假手术模型多巴胺 13

表 4 米力农对+LVdp/dtmax的影响(x-±s，n=6～8)组别假手术模型米力农 14

表 5 黄芪注射液对+LVdp/dtmax的影响(x-±s，n=6～8)组别假手术模型黄芪注射液 16

表 6 TY6052与其他药物ED15、相对安全指数的比较 18

表 7 等效剂量下TY6052对-LVd*p*/d*t*max、LVEDP影响(*x*-±*s*，n=8～10) 20

表 8 等效剂量下TY6052对E峰、A峰、E/A比值影响(*x*-±*s*，n=8～10) 21

表 9 等效剂量下TY6052对呼吸功能的影响(*x*-±*s*，n=8～10) 21

表 10 等效剂量下TY6052对肺水肿的影响(*x*-±*s*，n=8～10) 22

表11 等效剂量下TY6052对利尿作用的影响（n=8-10） 23

表 12 TY6052对慢性心衰大鼠FS(%)的影响( *x*±s, n=10~11) 25

表 13 TY6052治疗2 w后对心衰大鼠±LVd*p*/d*t*max的影响( *x*±s, n=10～11) 26

表 14 TY6052对心衰大鼠舒张期和收缩期左室腔内径的影响( *x*±s, n=10～11) 27

表 15 TY6052对心衰大鼠舒张期和收缩期左室腔体积的影响( *x*±s, n=10～11) 28

表 16 TY6052对心衰大鼠舒张期和收缩期左室后壁厚度的影响( *x*±s, n=10～11) 30

表 17 TY6052对心衰大鼠舒张期和收缩期室间隔壁厚度的影响( *x*±s, n=10～11) 31

表 18 TY6052对心衰大鼠舒张期和收缩期室壁相对厚度的影响( *x*±s, n=10～11) 32

表 19 TY6052治疗2 w后对心衰大鼠血流动力学参数的影响( *x*±s, n=10～11) 33

表 20 TY6052治疗2 w后对心衰大鼠心肌肥厚(mg/mm)的影响( *x*±s, n=10～11) 33

表 21 TY6052治疗2 w后对心衰大鼠肺水肿的影响( *x*±s) 34

表 22 TY6052对大鼠心肌细胞膜Na+/K+-ATPase活性抑制率的影响(*x*-±*s*，n=6) 36

表 23 TY6052对犬心肌细胞膜Na+/K+-ATPase活性抑制率的影响(*x*-±*s*，n=6) 37

表 25 TY6052对大鼠心肌细胞膜Ca2+/Mg2+-ATPase活性抑制率的影响(*x*-±*s*，n=6) 38

表 26 TY6052对犬心肌细胞膜Ca2+/Mg2+-ATPase活性抑制率的影响(*x*-±*s*，n=6) 39

表27 TY6052对肥大心肌细胞(H9C2细胞株)蛋白含量的影响(*x-*±s，n=5) 41

表 29 TY6052对CaN的影响(*x-*±s，n=8) 43

# 中文摘要

目的：评价TY6052治疗慢性心力衰竭的有效性并探讨其作用机制，为临床研究提供实验依据。

方法：

（1）采用心肌梗死引起的大鼠慢性心衰模型，进行TY6052 正性肌力效应研究。

（2）采用心肌梗死引起的大鼠慢性心衰模型，利用血流动力、血气分析等方法研究

TY6052 短期治疗作用效果及特点。

（3）采用心肌梗死引起的大鼠慢性心衰模型，利用血流动力学、超声心动图等方法研究TY6052 长期治疗对心脏功能、心室重塑及其他相关参数的影响。

（4）采用酶学方法，研究TY6052正性肌力作用的机制。

（5）采用体外培养心肌细胞的肥厚模型及免疫组织化学方法评价TY6052 改善心脏功能的作用机制。

结果**：**

(1) TY6052剂量在0.1～2 mg/kg范围时，心脏收缩功能成剂量依赖性增强，2～8mg/kg范围内基本可达效应平台期。TY6052的ED15为1.04 mg/kg. TY6052同其他阳性药相比，药物最大效应由强到弱顺序为：西地兰>多巴胺> ASI> TY6052>米力农>黄芪注射液；相对安全度由强到弱顺序为：ASI> TY6052>多巴胺>米力农>西地兰。即从最大正性肌力作用来看，TY6052能达到ASI、多巴胺、米力农的治疗效果，优于黄芪注射液，弱于西地兰；从相对安全指数来看，TY6052 安全性优于西地兰、米力农。

（2）在ED15等效剂量下，TY6052静脉输注给药3 d，在血流动力学方面可明显改善

-LVd*p*/d*t*max，降低LVEDP，与ASI、西地兰、米力农以及黄芪注射液比较作用相似，对

LVEDP的改善优于多巴胺；彩超结果表明，TY6052可明显降低A峰值，增加E/A比值，与ASI、西地兰、多巴胺、米力农以及黄芪注射液比较作用相似，提示TY6052可改善心衰心脏的舒张功能。TY6052 可明显增加血氧分压与血氧含量，可明显减轻肺组织水肿，与ASI、西地兰、多巴胺、米力农以及黄芪注射液比较作用相似，提示TY6052可减轻肺水肿，改善心衰时的呼吸症状。TY6052 静脉输注给药，未表现出利尿作用。

(3) TY6052 长期给药(2w)治疗能剂量依赖性增强左室舒缩功能：0.5、1.0、2.0 mg/kg

使FS分别增加了32.5%、36.8%、37.3%，+LVd*p*/d*t*max分别增加了13.5%、19.7%、22.9%，

-LVd*p*/dt 分别增加了11.0%、15.2%、26.8%. TY6052 长期治疗能改善左室构型和重塑：

0.5、1.0、2.0 mg/kg使扩张的LVVs分别缩小了56%(*P*<0.01)、62%(*P*<0.01)、68%(*P*<0.01)；使扩张的LVIDs分别缩小了36.4%(*P*<0.01)、45.5%(*P*<0.001)、47.7% (*P*<0.001)；使变薄的RWTd分别增加15%(*P*<0.01)、21%(*P*<0.001)、24%(*P*<0.001). TY6052长期给药治疗

后能减轻心肌肥厚与肺水肿程度。

(4) TY6052能抑制大鼠和犬心肌细胞膜Na+/K+-ATP酶，其IC50分别为1.58×10-6 和

1.06×10-6 mol/L，约为西地兰的1/7～1/5. TY6052对Ca2+/Mg2+-ATP酶无明显抑制作用。

（5）体外AngⅡ诱导培养心肌细胞肥大实验表明，TY6052能抑制心肌细胞肥大，免疫组化研究表明，其作用与肥厚信号转导通路重要关键因子CaN的抑制有关。

结论：TY6052 具有温和的正性肌力作用，能有效改善心功能，抑制心室重塑，增强心衰动物心脏的收缩和舒张功能，并可改善肺水肿和呼吸功能等心衰症状，从实验学上可达到当前抗心衰药物的治疗效果。其作用机制与Na+/K+-ATPase抑制、抗心肌肥厚等有关。

关键词：心力衰竭；超声心动图；血流动力学； Na+/K+-ATP 酶；心肌肥厚

Abstract

**Objective:**

To evaluate the effects of TY6052 in the treatment of chronic heart failure and to investigate its mechanism of action, thus to provide experimental basis for clinical studies.

**Methods:**

(1) Using congestive heart failure (CHF) model induced by ligation of the left coronary artery in rats to study the positive inotropic effects of TY6052.

(2) Using congestive heart failure (CHF) model induced by ligation of the left coronary artery in rats and hemodynamic measurements, gas analysis to study the effects and features of TY6052 used for short-term treatment.

(3) Using congestive heart failure (CHF) model induced by ligation of the left coronary artery in rats and hemodynamic measurements, echocardiographic to study the effects of TY6052 to Cardiac function, ventricular remodeling used for long-term treatment.

(4) Using enzymology to study the mechanism of action on the positive inotropic effects of TY6052 .

(5) Using myocardial cell hypertrophy model cultured in vitro and immunohistochemistry to study the anti-heart failure mechanism of action of TY6052.

**Results:**

(1) The research on the positive inotropic of TY6052 suggested that: the dose of TY6052 in the range of 0.1 to 2 mg/kg, the cardiac systolic function inhanced with the dose. In the dose rang of 2 to 8 mg/kg, the effects of TY6052 basically reached the plateau. Compared with other positive drugs, The order of the maximum effects were: Cedilanid> Dopamine> ASI> TY6052> Milrinone> Astragalus injection; Relative safety order: ASI> TY6052> Dopamine> Milrinone> Cedilanid. In the respect of the maximum positive inotropic effects, TY6052 could achieve the therapeutic effects of the ASI, Dopamine, Milrinone, superior to Astragalus injection, weaker than Cedilanid; In the respect of the relative safety index, TY6052 was superior to Cedilanid and Milrinone.

(2) With the equivalent dose of ED15, intravenous infusion of TY6052 3d, -LVd*p*/d*t*max significantly increased, LVEDP reduced, the effects of TY6052 were similar to ASI, Cedilanid, Milrinone and Astragalus injection, superior to Dopamine in LVEDP improvement. TY6052 could reduce A peak value, increase the E/A ratio, the effects were similar to other positive drugs, it proved that TY6052 could improve the cardiac diastolic function in the heart failure rats. Intravenous infusion of TY6052 3d, The blood oxygen partial pressure and oxygen content significantly increased, pulmonary edema reduced and respiratory symptoms improved. But TY6052 did not exhibit a diuretic effect with intravenous infusion.

(3) Used for long-term treatment (2w), TY6052 enhanced left ventricular systolic and diastolic function in a dose-dependent relationship: with doses of 0.5, 1.0, 2.0 mg/kg, FS increased by 32.5%, 36.8%, 37.3%; +LVd*p*/d*t*max increased by 13.5%, 19.7%, 22.9% and -LVd*p*/d*t*max increased by 11.0%, 15.2%, 26.8%, respectively. Used for long-term treatment (2w), TY6052 improved left ventricular geometry and remodeling: with doses of 0.5, 1.0, 2.0 mg/kg, dilated LVVs reduced 56%(*P*<0.01), 62%(*P*<0.01),68%(*P*<0.01) and LVIDs reduced 36.4%(*P*<0.01),

45.5%(*P*<0.001), 47.7% (*P*<0.001), respectively; The thinned RWTd increased by 15% (*P*

<0.01), 21% (*P* <0.001), 24% (*P* <0.001), respectively. TY6052 could reduce the extent of myocardial hypertrophy and pulmonary edema after long-term treatment.

(4) TY6052 could inhibit Na+/K+-ATP enzyme of the myocardial cell membrane in rats and dogs, the IC50 was 1.58×10-6 and 1.06×10-6 mol/L, respectively, that was about 1/7～1/5 of Cedilanid. TY6052 had no significant inhibition to Ca2+/Mg2+-ATP enzyme.

(5) The experiment of myocardial cell hypertrophy induced by AngⅡcultured in vitro showed that TY6052 could inhibit cardiac hypertrophy. Immunohistochemical studies had shown that, its mechanism of action was related to the key factor CaN in the Hypertrophy signal transduction pathway.

**Conclusion:**

TY6052 had a moderate positive inotropic effect, could effectively improve cardiac function, inhibit ventricular remodeling, enhance systolic and diastolic function of the animals with cardiac failure, correct cardiac remodeling and relieve pulmonary edema, improve respiratory function, in experimental science it could reach the therapeutic effects of the anti-heart failure

Drugs. The mechanism was relevant to the inhibition of Na+/K+-ATPase and anti-myocardial hypertrophy.

**Keywords:**

Heart failure; echocardiography; hemodynamics; Na+/K+-ATPase; cardiac hypertrophy

# 英文缩略词表

缩写 英文全称 中文名称

AngⅡ AngiotensinⅡ 血管紧张素Ⅱ

BCA Bicinchoninic acid 2,2-联喹啉-4,4-二甲酸二钠

CaO2 Arterial oxygen content 动脉血氧含量

CaN Calcineurin 钙调神经磷酸酶

DAP Diastolic arterial pressure 舒张压

DMEM Dulbecco's modified eagle medium DMEM 培养基

+d*p*/d*t*max maximal slope of systolic pressure increment 左心室内压最大上升速率

-d*p*/d*t*max maximal slope of diastolic pressure decrement 左心室内压最大下降速率

ED15 15% effective dose 15%有效量

EF Ejection fraction 射血分数

FS Fractional shortening 左室短轴缩短率

HR Heart rate 心率

IVSd Interventricular septum in the diastolic phase 舒张末期室间隔厚度

IVSs Interventricular septum in the systolic phase 收缩末期室间隔厚度

IC50 Half maximal inhibitory concentration of a substance

半抑制浓度（半抑制率）

KHB Krebs-Henseleit bicarbonate buffer solution 克一亨氏液

LVIDd Left ventricular internal diameter in the diastolic phase

LVPWd Left ventricular posterior wall thickness in the diastolic phase

左室舒张末期内径

舒张末期左室后壁厚度

LVVd Left ventricular volume in the diastolic phase 舒张末期左室体积

LVIDs Left ventricular internal diameter in the systolic phase

LVPWs Left ventricular posterior wall thickness in the systolic phase

左室收缩末期内径

收缩末期左室厚后壁度

LVVs Left ventricular volume in the systolic phase 收缩末期左室体积 LVSP Left ventricular systolic pressure 左室收缩压 LVEDP Left ventricular end-diastolic pressure 左室舒张末期压 LA Left atrium 左心房

LV Left ventricle 左心室

MAP Mean arterial pressure 平均动脉压

PaO2 Arterial partial pressure of oxygen 动脉血氧分压

PDE Phosphodiesteras 磷酸二酯酶抑制剂

RA Right atrium 右心房

RV Right ventricle 右心室

RWTd Relative wall thickness in the diastolic phase 舒张末期相对室壁厚度RWTs Relative wall thickness in the diastolic phase 收缩末期相对室壁厚度SAP Systolic Arterial Pressure 动脉收缩压

SaO2 Arterial oxygen saturation 动脉血氧饱和度

TL Tibia length 胫骨长度

# 综述

冠脉结扎致大鼠心梗后心衰模型研究进展

心功能不全是心脏泵血功能降低，不能满足全身组织代谢需要的一种病理生理状态及临床综合症，慢性心力衰竭（CHF）属于心功能不全的一种[1]。其发生原因很多，各 种原因造成的心脏舒缩功能受损都可导致心衰，其结果是心脏前后负荷加重，心脏泵血功能出现障碍，不能满足全身组织的需要[2]。CHF 是一种全球性现象，是困扰人类健康的普遍难题，为常见疾病，具有高发生率和死亡率，预后差，其发病率还在逐年稳步增加[3, 4]。因此，我们需要进行不断的深入研究，来克服这一难题。

建立稳定可靠的实验动物模型是临床前研究的有效手段和方法，为了深入研究心力衰竭，可靠的心力衰竭动物模型的建立，对心力衰竭的发病机制、病理生理及疾病预防和治疗等方面的研究至关重要。心衰实验模型有许多种，曾贵云等曾大致将这些模型归为6类[5]。常用的有以下几种[6-11]：结扎冠状动脉造成心肌缺血；压力超负荷导致的心衰，其中主动脉缩窄较为常见；容量负荷型，包括瓣膜关闭不全，动静脉瘘，腔静脉缩窄；化学因素造成心衰。结扎大鼠冠状动脉，可以导致心肌梗死，进而造成心力衰竭，此方法与临床心衰的发生发展病理过程相似，因此被广大研究者所认同和采用，使用最为广泛、成熟[12, 13]。

# 1 大鼠心梗后心衰模型的建立

模型建立方法大致相同，但具体细节存在差异，根据文献进行比较[14-17]。过程大致为，大鼠麻醉，仰卧位固定于手术台上，前外侧胸壁去毛，手术区备皮消毒。切开皮肤、肌层，肌层行荷包缝合，切断第4 肋骨，将心脏以自制环形钩拉出胸外，距左心耳下缘3 mm处将冠脉前降支以6/0无损伤缝合丝线结扎（假手组不进行结扎，其它手术过程相同），抽出胸腔内空气，将荷包缝合扎紧，缝合皮肤。差异在于：（1）暴露心脏还有另外一种方法，即不用环形钩拉出，而是将心脏用手挤出胸腔外。（2）据文献报道，冠脉结扎位置具体描述略有差异。如，于左心耳下缘约2mm处进行结扎，在LAD起始点下约2-3mm处结扎，于左心耳与肺动脉圆锥间距离左心耳1~1.5 mm处结扎大鼠冠状动脉左降支等。具体方法需要实验者反复摸索，以提高造模成功率，并减少死亡率。

# 2 大鼠心梗后心衰模型的评价方法

## 2.1 超声心动图主要检测指标

全面、准确评价心脏功能尤其是左室收缩舒张功能对于心力衰竭的诊断和治疗非常重要。经胸壁超声心动图在临床实践中是一种很好的诊断手段，十年前开始用于评价大鼠心脏形态学和总体功能。超声心动图诊断心血管疾病的基础是室壁运动异常，具有较高的敏感性和特异性。左室射血分数（LVEF）及左室短轴缩短率（FS%）是描述总体 心脏功能最重要的参数，心衰状态下，EF和FS都会有明显的降低，通常认为EF下降

30%即可形成心衰，笔者认为30%是一个概括的标准，可以进一步深入研究将这项指标 进行量化。左心室舒张末期及收缩末期内径(LVIDd, LVIDs)及室间隔舒张末期及收缩末期厚度（IVSd, IVSs）和左心室舒张末期及收缩末期后壁厚度（LVPWd, LVPWs），都是评价心脏功能，特别是心室重构的指标。E/A（二尖瓣舒张晚期流速峰值比舒张早期 流速峰值）是反映心脏舒张功能的参数，E峰为左室舒张早期快速充盈的充盈峰，A 峰为左室舒张晚期（心房收缩）充盈的充盈峰，E/A> 1表示舒张功能正常，而E/A <1时则表示舒张功能减低。现在超声心动图新的特征如组织多普勒和2D strain成像可为局部心肌功能提供精确信息，对评价心脏疾病十分有用，在今后的应用会更加广泛[18-21]。

## 2.2 血流动力学主要测定指标

心力衰竭后会表现出心功能减退、心排血量减少、心脏前后负荷增加等血流动力学异常现象，所以心脏血流动力学的检测对评价心衰具有及其重要的意义。测定指标一般有心率（HR）、左室收缩压( LVSP)、左室舒张末期压( LVEDP)、左心室压力最大上升速( +d*p*/d*t*max)、左心室压力最大下降速率( -d*p* /d*t*max)。经文献报道，心梗后心衰大鼠LVSP均有明显的下降，LVEDP有显著上升，+d*p*/d*t*max减小而- d*p* /d*t*max升高[22-24]。

## 2.3 心肺重量，梗死面积及组织病理学检测

大鼠麻醉后处死，取出心脏，分离成左心房、左心室、右心房、右心室，肺也取出，称取各部分组织的重量，并用体重或者胫骨长度对组织重量进行校正（组织重量同体重或胫骨长度的比值）。也可将心脏以横截面切片，一般从心尖到心底切成厚度均匀的若 干片，通常取四片，用伊文斯兰和TTC染色后，可用相关测量软件测量并计算占左室的面积百分比。一般认为，梗死面积到达20%即可形成稳定的心衰模型。将左室组织用

10%的福尔马林缓冲液固定，用于进行组织学分析[21]。

## 2.4 脑钠肽(brain natriuretic peptide, BNP）

当心室充盈压力增大，心肌纤维细胞受牵张时，心室的心肌细胞会分泌脑钠肽

（BNP）。近年来大量研究表明，BNP可作为慢性心力衰竭严重程度的一种标志物。曾有人提出BNP水平随着CHF严重程度而增高，Maczewski M等用冠脉结扎法诱导大鼠心梗后心衰模型验证这一理论，却得到不同的结果。方法为大鼠冠脉结扎后，分别于结扎后1周、1个月、3个月、6个月追踪大鼠BNP的变化情况，发现BNP水平并未随着时间变化有所增加。最终得出结论，BNP 是心梗面积和左室扩张的一种标志物，但并不能用其追踪心梗后心室重塑的进展情况[25]。

# 3 大鼠心梗后心衰模型的心脏形态病理学变化

从外观来看，心梗造成的心衰大鼠心脏明显扩大，梗死区瘢痕组织粘连，伴有明显的纤维组织增生，并可观察到肺组织色泽暗淡，毛细血管充血，肺泡水肿。通过光镜可观察到心肌组织排列稀疏，肌束断裂，纤维组织大量增生。电镜下发现心衰大鼠心脏心肌细胞肌丝断裂，排列紊乱，肌膜水肿，肌膜下局部线粒体增多，但密度增高，崎消失，嵴间基质电子密度增高，内质网扩张，部分肌细胞崩解[26]。

# 4 大鼠心梗后心衰模型心衰形成的病理Th理机制

## 4.1 交感神经系统(SNS)兴奋性增强

心脏功能正常时，自主神经对心血管系统的调节处于平衡状态。心脏冠脉结扎造成心肌缺血，心脏受损，机体为适应这种症状，通过压力感受器等反射作用，致使迷走神经（副交感神经）优势下降，交感神经兴奋性增强，血浆肾上腺素(AE)和去甲肾上腺素(NE) 等儿茶酚胺(CA)类物质增高，CA浓度增高是SNS兴奋的最重要的指征。这是慢性心力衰竭的一种适应机制，为心脏功能代偿性增强，这种短暂性适应可使心肌的舒缩机能增强，血流动力学得到改善，心衰症状暂时缓解[27, 28]。

## 4.2 肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)激活

据文献报道，心衰患者肾素(PRA)、血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)和醛固酮(ALD)浓度均增高。这可能是由于交感神经系统长期过度兴奋，再加上心脏功能紊乱时机体其他生理机能的改变，导致肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)激活。然而RAAS激活，会更进一步的使交感神经兴奋性增强，从而形成恶性循环，造成一系列不良后果。例如：收缩血管，使心脏前后负荷加重；心肌耗氧量增加，加快心肌细胞损伤和死亡；醛固酮分泌增多可刺激成纤维细胞增生，导致心肌纤维化；AngⅡ水平升高刺激心肌细胞生长及正性

变时变力效应，加速心血管重构，诱发心律失常；AngⅡ刺激胶原蛋白合成，在心室扩 大尤其是心衰期间，胶原蛋白的过分沉淀可能引起异常的组织僵硬，改变心脏功能等。总而言之，RAAS的过度激活是加重心肌损伤、心肌重塑、促进心衰进展的重要因素[29, 30]。

## 4.3 心肌肥厚

RAAS过度激活最终可导致心肌重塑，而心肌重塑在近年来被证明是造成CHF的主要危险因素。心肌重塑表现为心肌质量、心室容量增加、心室形状的改变及细胞外基质-胶原网的组成发生变化。其本质是心肌细胞和细胞外机制发生变化，心肌组织发生 适应性增生性变化，心肌细胞体积增大，细胞内蛋白质合成增加以及心肌细胞外胶原沉积和纤维化，其结果为心肌肥厚。现在的研究已经深入到分子水平，下面介绍几种与心肌肥厚密切相关的一些靶点。

### 4.3.1 G蛋白偶联受体( G protein-coupled receptors, GPCRs)

G蛋白偶联受体(G protein-coupled receptors, GPCRs)是一类受激素作用并传递神经信号，作用于GTP结合蛋白，并能将神经信号级联放大的受体蛋白。G蛋白门控内向整流钾离子通道(G protein gated inwardly rectifying K channels, GIRK)是内向整流钾通道家族中的一员(Kir3)，它有四个亚型，分别为GIRK1、GIRK2、GIRK3、GIRK4. GIRK通道广泛分布于心脏和神经组织中。G 蛋白偶联受体可通过影响通道的开放与关闭进而影响心肌细胞、神经细胞以及神经内分泌细胞等的功能[31-33]。

### 4.3.2 Na+/H+交换体(Na+/H+ exchanger, NHE)

NHE 是多种因子介导的心肌肥大和心肌纤维化的信号转导通路上的共同途径。曾有研究者用大鼠冠状动脉结扎模型证明NHE抑制剂具有缓解心肌重塑（心肌肥厚）的作用。曾有人猜测NHE抑制剂减少Na+进入心肌细胞可能是其抑制心肌肥厚的机制，后来有研究证明，NHE抑制剂抗心肌肥厚的机制为其可通过GSK-3B的活化而抑制线粒体通透性转换孔( mitochondrial permeability transition pore, mPTP)开放而发挥作用

[34,35]。

### 4.3.3 钙调神经磷酸酶(Calcineurin，CaN)

研究表明，CaN是心肌肥大过程中的一个重要细胞内信号分子，在心肌肥大的发生、发展中起着重要的作用。研究表明血管紧张素Ⅱ、内皮素-1及儿茶酚胺等均可激活钙调神经磷酸酶(CaN)，进促心肌细胞的生长[36]。

另外，糖原合酶激酶3(glycogen synthase kinase-3, GSK3)，肌细胞增强因子2(myocyte enhancer factor -2, MEF2)，过氧化物酶体增生激活受体( peroxisome proliferator -activated recept or, PPAR)，小G蛋白( small G protein, sGp)等都是同心肌肥厚相关的靶点[37]。

## 4.4 细胞凋亡

心肌细胞的丧失与心衰的发生及其严重程度密切相关，其中心肌细胞凋亡是心肌细胞丧失的一种主要形式。心肌细胞过度凋亡会导致心肌细胞数量减少，这是心肌肥大由代偿转为失代偿（即转向心衰）的一个重要因素，同心衰时心室收缩功能不全，左室重构有密切关系。炎性细胞因子，可通过诱发心肌细胞凋亡，促进心肌重构，降低心肌收缩力。

### 4.4.1 炎性细胞因子

炎性细胞因子，是一类主要由免疫系统细胞生成的具有生物学效应的内源性多肽，可介导多种免疫反应， 主要有肿瘤坏死因子-α（TNF-α）、白细胞介素-1α（IL-1α）、白细胞介素-1β（IL-1β）。其中TNF-α是细胞因子中最关键的因子，因为TNF-α是最早表达的前炎性细胞因子，可以诱导、激活多种炎性细胞因子的表达。在心衰大鼠心脏发现有1型TNF-α受体且血清TNF-α水平升高。升高的TNF-α和IL-1β可协同性诱导心脏M2受体蛋白和mRNA的表达下调，从而导致M受体的功能性脱敏，进而造成肌收缩功能下降，心室重构，细胞凋亡，血管内皮功能损伤等[38-39]。

# 5 结语

大量文献资料表明，大鼠冠脉结扎后4周即可形成心衰模型。这种方法得到的动物 模型较为成熟，应用广泛，具有稳定可重复性好的特点。此模型能较理想地模拟临床上冠心病后心梗最终形成心衰这一生理过程，通过动物模型研究心衰发生发展的生理病理机制，对开发抗心衰药物及针对性采取治疗措施具有指导意义。结扎成功率、动物存活率是影响心梗后心衰模型成功与否的重要因素，另外，此模型存在评估标准不明确，缺乏统一性等问题。成功的动物模型是实验研究的首要条件，所以要熟练掌握技术，加强经验，改善实验中存在的问题，以提高模型成功率。另外，尽量地对模型评估标准进行统一和量化，让模型更加完善，更广泛地应用于临床前研究中，从而为临床治疗提供必要的依据。

# 综述参考文献

[1]李端. 药理学(M). 北京：人民卫生出版社（第六版）, 2007: 194-195.

[2] Maillet M, Lynch JM, sanna B, et a1. Cdc42 is an antihyperImphio molecular switch in the mouse heart [J]. J Clin Invest, 2009, 119(10): 3079-3088.

[[3] Abraham WT](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Abraham%20WT%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23229137), [Smith SA](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Smith%20SA%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23229137). Devies in the management of advanced, chronic heart failure [J]. Nat Rev Cardiol, 2013, 10(2): 98-110.

[4] Hőgye M, ForsterT. Chronic heart failure with impaired left ventricular function (systolic heart failure) [J]. Orv Hetil, 2012, 153(51): 2021-2029.

[5]曾贵云，徐向伟，刘厚孝. 心衰的实验模型[J]. 药学学报, 2002, 37(7): 579-585.

[6] Alexander R. Lyon, Mark L. Bannister, Tom Collins, et al. SERCA2a Gene Transfer Decreases SR Calcium Leak and Reduces Ventricular Arrhythmias in a Model of Chronic Heart Failure [J]. Circ Arrhythm Electrophysiol, 2011, 4(3): 362-372.

[7]朱丹，郭艳，于海奕.两种早期心衰大鼠模型的建立和心功能的比较 [J].中国比较医学杂志, 2009, 19(9)：20-24.

[8] Whelan RS, Kaplinskiy V, Kitsis RN. Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance [J]. Annu Rev Physiol, 2010, 72:19-44.

[9] Munagala VK, Hart CY, Burnett JC, et al. Ventricular structure and function in

Aged dogs with renal hypertension: model of experimental diastolic heart failure [J]. Circulation, 2005, 111(9): 1128-1135.

[10] Diego F. Alvarez, Judy A. King, Mary I. Townsley. Resistance to Store Depletion

-induced Endothelial Injury in Rat Lung after Chronic Heart Failure [J]. Am J Re spir Crit Care Med, 2005, 172(9): 1153-1160.

[11]张洁. 心力衰竭大鼠建模常用方法[J]. 临床与医疗, 2011(23): 412.

[12]喻斌，周静，吕高红. 心梗所致心衰大鼠模型复制的改良初探及评价[J].中国药理学通报, 2011, 27(4)：577-580.

[13] Calvert J W, Elston M, Nicholson C K, et al. Genetic and pharmacologic hydrogen sulfide therapy attenuates ischemia-induced heart failure in mice [J]. Circulation, 2010, 122(1): 11-19.

[14]杨杰，杨萍，怀淑君. 免疫球蛋白对心梗后心衰大鼠心功能及非梗死区胶原的影响

[J]. 中国老年学杂志, 2011, 31(3): 977-980.

[15]胡元会，吴华芹，张百舜. 心复康口服液对心梗后心衰大鼠心肌组织ATP ADP

AMP影响的研究[J]. 辽宁中医杂志, 2008, 36(8): 1141-1142.

[16]李佳彧，杨萍. 芪苈强心胶囊对心梗后心力衰竭大鼠periostin蛋白表达干预作用的研究[J]. 中国实验诊断学, 2009, 13(2)：170-172.

[17] Chun Li, Yong Wang, Yu-lin Ouyang, et al. Effects of a compound Chinese

Herbal medicine Yixin Jiedu Formula on haemodynamic in rats with heart failure of qi-deficiency and blood stasis syndrome [J]. Journal of Chinese Integrative

Medicine, 2012, 10 (5): 577-582.

[18] Langcland S, Dhooge J, Wouters PF, et al. Experimental validation of a new ultr

-asound method for the simultaneous assessment of radial and longitudinal myocar

-dial deformation independent of insonation angel. Circulation, 2005, 12(14): 2157

-2162.

[19]马晓燕，周旭. 彩色多普勒超声在慢性心力衰竭大鼠心功能测定的应用[D]. 宁夏：宁夏医学院, 2006: 1-50.

[20] Liu Q, Christen Anderson, Anatoly Broyde, et al. Glucagon-like peptide-1 and the exenatide analogue AC3174 improve cardiac function, cardiac remodeling, and survival in rats with chronic heart failure [J]. [Cardiovasc Diabetol.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Glucagon-like%2Bpeptide-1%2Band%2Btheexenatide%2Banalogue%2BAC3174%2Bimprove%2Bcardiac%2Bfunction%2C%2Bcardiac%2Bremodeling%2C%2Band%2Bsurvival%2Bin%2Brats%2Bwithchronic%2Bheart%2Bfailure) 2010 Nov 16; 9: 76. doi: 10.1186/1475-2840-9-76.

[21] Sebastian Holinski, Fabian Knebel, Georg Heinze, et al. Noninvasive monitoring of cardiac function in a chronic ischemic heart failure model in the rat: Assessment with tissue Doppler and non-Doppler 2D strain echocardiography [J]. [Cardiovasc Ultrasound.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Noninvasive%2Bmonitoring%2Bofcardiac%2Bfunction%2Bin%2Ba%2Bchronic%2Bischemic%2Bheart%2Bfailure%2Bmodel%2Bin%2Bthe%2Brat%3A%2BAssessment%2Bwith%2Btissue%2BDoppler%2Band%2Bnon-Doppler%2B2D%2Bstrain%2Bechocardiography) 2011 May 26; 9:15. doi: 10.1186/1476-7120-9-15.

[[22] Ahmet I](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Ahmet%20I%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19587314), [Morrell C](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Morrell%20C%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19587314), [Lakatta EG](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Lakatta%20EG%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19587314), et al. Therapeutic efficacy of a combination of a beta1-adrenoreceptor (AR) blocker and beta2-AR agonist in a rat model of post myocardial infarction dilated heart failure exceeds that of a beta1-AR blocker plus angiotensin-converting enzyme inhibitor [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2009, 331(1):1 78-185.

[23]李岩，武乾，林谦，等. 补气药党参黄芪对慢性心衰大鼠血流动力学的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2010, 16(7)：597-598.

[24]吴美平，熊旭，董耀荣，等. 玉竹乙醇提取物对心梗后心力衰竭大鼠血流动力学的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(11)：67-70.

[[25] Maczewski M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Maczewski%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17317540), [Mackiewicz U](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Mackiewicz%20U%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17317540). Plasma brain natriuretic peptide correlates with infarct size but not with subsequent remodeling in the rat heart[J]. Cardiovasc Pat hol. 2007, 6(2): 79-84.

[26]庄海舟，沈潞华. 万爽力对心梗后心衰大鼠心功能、自由基代谢、心肌纤维化及心肌超微结构的影响[J]. 中华心血管病杂志, 2003, 31(10)：219-224.

[27] Olshansky B, Sabbah HN, Hauptman PJ, et al. Parasympathetic nervous system

And heart failure: pathophysiology and potential implications for therapy [J]. Circu

-lation, 2008, 118(8): 863-871.

[28]胥晓丽，曾菊绒，于晓江，等. 多柔比星诱导的心衰大鼠心脏胆碱能神经分布及

TNF-α表达的变化[J]. 南方医科大学学报, 2012, 32(8): 1139-1142.

[29]徐健，郝文君，冯丰，等. 比索洛尔对慢性心衰病人心脏内分泌功能及预后的影响[J]. 中国老年学杂志，2007,27(3)：456-458.

[30]杨静，陈丽. 舒张功能不全性心力衰竭分子机制的研究进展[J]. 2010, 31(6): 916- 918.

[31]王迪，杨曙明，刘潇威，等. G蛋白偶联受体在不同表达系统中高水平表达的研究进展[J]. 2012, 12(6): 545-550.

[32] WANG XQ, ZHANG HG, CHENG YQ, et al. Inhibit ion of left ventricular rem odeling in spontaneously hypertensive rats by Gαq-protein carboxyl terminus imita

Te-on polypeptide GCIP-27 is not entirely dependent on blood pressure [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2008, 35(12): 1215-1221.

[[33]杨冀杰](http://search.cnki.com.cn/Search.aspx?q=author%3A%E6%9D%A8%E5%86%80%E6%9D%B0). 小鼠心肌细胞中的G蛋白门控内向整流钾通道及其功能[D]. 河北，河北医

科大学, 2009: 4-9.

[34]金振晓，辛梅，陈涛，等. NHE1在心肌肥大，心肌纤维化和心衰中的作用[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2005, 25(6)：536-538.

[ 35] GARC I ARENA CD, CALDIZ C I, PORT I ANSKY EL, et al. Chronic NHE-1 block

Adeinduces an antiapoptotic effect in the hypertrophied heart [J]. J Appl Physiol, 2009, 106(4): 1325 -1331.

[36]李巍. 钙调神经磷酸酶信号转到通路在介导尾加压素Ⅱ致心肌肥大中的作用及其机制研究[D]. 第三军医大学, 2009: 5-8.

[37]王维亭，赵专友，汤立达. 心衰治疗靶点与干预研究进展[J]. 中国新药杂志, 2010, 19(6)：486-493.

[38] Johnston GR, Webster NR. Cytokines and the immunomodulatory function of the vagus nerve [J]. Br J Anaesth, 2009, 102(4): 453-62.

[39] Kleinbongard P, Heusch G, Schulz R. TNF-α in atherosclerosis, myocardial ische

-mia/reperfusion and heart failure [J]. Pharmacol Ther, 2010, 127(3): 295-314.

前 言

心力衰竭(congestive heart failure, CHF)为多种心脏疾病最终共同结局，是一种全球性现象，是困扰人类健康的普遍难题，为常见疾病，具有高发生率和死亡率，预后差。有关东亚地区心衰状况的最新流行病学资料显示，东亚地区不同国家心衰的患病率为

1.3 %到6.7%，曾有调查资料显示引起心衰最常见的原因是冠状动脉疾病（约占70%）、各种心肌病（占10%）及心瓣膜病（占10%），而近年来，东亚地区心衰患者中心肌缺血引起的心衰所占比例升高，而瓣膜病引起心衰的比例有所下降。一旦出现症状，其5年生存率不足50%，死亡率与一些常见的恶性肿瘤相当，中国、台湾、新加坡、泰国和日本心衰总死亡率占死亡人口的2%到9%，随着人口老龄化的加速，以及高血压病、冠心病等心血管病发病率的上升，其患病率还在逐年增加[1-4]。心衰发病、进展过程及机制较为复杂，涉及代偿与失代偿过程，与神经内分泌过度兴奋、兴奋收缩偶联异常、心肌细胞肥大与凋亡等多种因素有关。近年来，随着心力衰竭治疗模式、生活质量需求的转变，对心衰治疗的策略与手段不断进展，新的理论、治疗观点更加受到重视，氧化应激、心肌重塑、细胞凋亡等新理论、新靶点、新干预措施为心衰治疗开辟了新途径[5-7]。

对于慢性心衰急性进展期、顽固性心衰，及心衰终末期患者，为改善症状，目前临床推荐方案为可短期静脉给予正性肌力药物，如磷酸二酯酶（PDE）抑制剂米力农、Na+/K+-ATPase 抑制剂西地兰、β受体激动剂多巴胺、多巴酚丁胺等[8]。米力农有头痛、室性心律失常、血小板减少、低血压、心动过速等不良反应；西地兰治疗窗较窄，治疗量与中毒量接近，有蓄积性，恶心、食欲不振、头痛等不良反应，并且会引起心肌肥厚反应等；多巴胺会引起心率增快和血压升高；多巴酚丁胺具有室性或房性心率失常、心动过速，加重心肌缺血等不良反应。针对心肌重构的神经内分泌抑制剂治疗心力衰竭是一重大的突破性的进展，使心力衰竭跨入了生物学治疗的新纪元，其中血管紧张素转换酶抑制剂（angiotensin-converting enzyme inhibitor, ACEI）和具有负性肌力作用的β-阻滞剂已成为治疗心力衰竭的主导的常规药物。血管紧张素抑制剂(ACEI)能有效治疗心力衰竭患者， 是第一类被证明能降低心力衰竭死亡率的药物，是心力衰竭治疗的基石，但存在两方面的不良反应：（1）与AngⅡ抑制有关的不良反应，包括低血压、肾功能恶化、钾潴留；（2）与缓激肽积聚有关的不良反应，如咳嗽和血管性水肿；β受体阻滞剂不良反

应主要为（1）低血压，（2）液体潴留和心衰恶化，（3）心动过缓和房室传导阻滞，（4）无力；血管紧张素Ⅱ受体拮抗剂(ARB) 不引起咳嗽副反应，但同样存在低血压、肾功能不全等不良反应；醛固酮抑制剂不良反应为致命性高钾血危象。其他正在开发的新靶标药物，如TNFα抑制剂、内皮素受体抑制剂类因未能得到临床支持而纷纷中止Ⅱ期临床研究，原寄予希望的精氨酸加压素受体阻断剂，近期研究证明其不能有效改善临床病死率、住院率，而且骤死病例较安慰剂组多而不适用于慢性心衰的长期治疗，新的钙增敏剂左西孟旦只能用于急性心衰，而其他新的作用于肌球蛋白的Na+/K+-ATP 酶抑制剂、心房利钠肽、心肌代谢调节剂等药物理论上虽各具优势，但尚未得到严格的临床验证。

2005年欧洲、2007年中国、2009年美国相继发表的心力衰竭指南进一步确立了以神经内分泌抑制剂为基础的治疗原则，在这一时期有关神经内分泌、细胞因子拮抗剂新药物的临床试验屡告失败，ACEI 和β受体阻滞剂作为神经内分泌抑制剂的根本未能被超越[9]。现有的一线治疗药物存在不同程度的局限性而影响治疗进程，并且因其单一靶点作用，需要联合用药，才能达到满意的效果。中药常具有多靶点作用，从祖国医药宝库中寻找创新药为一种有效途径。

黄芪为传统中药，具有补气升阳、利水消肿之功效。黄芪注射液用于心衰治疗，疗效明确。姚德金[10]将84例慢性心力衰竭患者作为研究对象，研究了黄芪注射液改善慢性心力衰竭患者心功能指标的效果，结果表明，黄芪注射液能显著改善患者LVEF等心功能指标，且显效快，在治疗1周后显示出明显效果，认为与改善淤血，加强心肌收缩力有关。另有多项研究表明黄芪注射液可有效治疗心衰，有利于改善临床症状，疗效确切[11-13]。黄芪含皂苷类、多糖类、黄酮类以及氨基酸等多种化学成分，其中黄芪甲苷(astragaloside, ASIV)是黄芪的主要有效成分，其在心血管方面的作用已经得到公认。药理实验表明ASIV 可以改善多种心衰模型动物的心脏舒缩功能，改善心衰（HF）症状

[14-16]。其通过抗氧化、增强免疫力、改善微循环、防止缺血再灌、增强心肌收缩力作用、

改善心肌细胞的异常放电、抑制心肌细胞磷酸二酯酶活性、钙拮抗等作用，发挥强心作用，用于治疗病毒性心肌炎、心衰[17-19]。文献报道ASIV对充血性心力衰竭有一定疗效，心衰病人每天给予5.64 mg，连续2 w可明显改善心衰症状，使左室构型及射血功能改善[20]。ASIV 水溶性较差，不利于成药性研究。TY6052 是天津药物研究院从黄芪主要活性成分黄芪甲苷经结构改造而来，改构后的TY6052水溶性明显提高，利于药理学及其成药性研究，其结构式见附图1。



O

O H

O H

·H2O

H O

O



O H

O

OH

O H

OH

附图 1 TY6052结构

TY6052 注射液拟用于慢性心衰急性加重及中、重度心衰治疗，尤其是症状不能控制者。本研究的目的是通过心梗后心衰模型评价TY6052治疗慢性心力衰竭的有效性，并初步探讨其作用机制，为其临床应用提供实验依据。

# 实验一TY6052正性肌力效应研究

慢性心力衰竭（CHF）是大多数心血管疾病的最终归宿，也是最主要的死亡原因。

TY6052 是黄芪甲苷的一种衍生物，本实验通过结扎大鼠冠脉造成心梗后心衰模型研究

TY6052 的最大作用效应，与其他药物的最大作用差异，研究本品与现有药物比较是否能达到相同的治疗效果。

# 1 实验材料

## 1.1 药品及试剂

### 1.1.1 受试药

TY6052，天津药物研究院制剂技术及研究中心提供，批号0903-1. MW 652，规格1 mL:5 mg，临用时用生理盐水配制成所需浓度的药液供动物给药用。

### 1.1.2 阳性药

黄芪甲苷（简称ASI），白色粉末，天津药物研究院新药创新中心提供，批号20090515。MW 784，用溶剂配成5 mg/mL，临用时用生理盐水配制成所需浓度的药液供动物给药用。

去乙酰毛花苷注射液（简称西地兰），上海旭东海普药业有限公司产品，批号110302。MW 943.09，规格2 mL:0.4 mg，临用时用生理盐水配制成所需浓度的药液供动物给药用。

米力农注射液（简称米力农），鲁南贝特制药有限公司产品，批号110501。MW 211.22，规格5mL:5 mg，临用时用生理盐水配制成所需浓度的药液供动物给药用。

盐酸多巴胺注射液（简称多巴胺），上海禾丰制药有限公司，批号120406。MW

189.64，规格2mL:20 mg，临用时用生理盐水配制成所需浓度的药液供动物给药用。黄芪注射液，黑龙江珍宝岛药业股份有限公司产品，批号A20111007。规格10 mL:20

g 生药，临用时用生理盐水配制成所需浓度的药液供动物给药用。

### 1.1.3 空白溶剂

无色透明液体，天津药物研究院制剂技术及研究中心提供，批号20120217，临用时用生理盐水配制成所需浓度的药液供动物给药用。

## 1.2 实验动物

Wistar 大鼠，SPF 级，北京维通利华实验动物技术有限公司提供，动物许可证号

# SCXK(京) 2012-0001。

## 1.3 实验仪器

Vivid 3 Pro彩色超声多普勒仪，美国GE公司产品。

MP150生理信号采集系统，美国BIOPAC产品。

i-STAT 血气分析仪，雅培公司产品。

# 2 实验方法

## 2.1 心衰模型制备

参照文献并稍加改进[21-22]. Wistar 大鼠，12%水合氯醛麻醉，仰卧位固定于手术台上。前外侧胸壁去毛，测量超声心动图后，手术野常规消毒，切开皮肤、肌层，肌层行荷包缝合，切断第4肋骨，将心脏以环形钩拉出胸外，于左心耳与肺动脉圆锥间距离左心耳下缘约3 mm处将冠脉前降支以6/0无损伤缝合丝线结扎（假手组不进行结扎，其它手术过程相同），抽出胸腔内空气，将荷包缝合扎紧，缝合皮肤。

冠脉结扎4 w后，测量超声心动图，以心脏左心室缩短分数（FS）较基础值下降

30%以上作为心衰形成标准。选取心衰造模成功者，按FS 随机分组。

## 2.2 分组与给药

造型成功的动物随机分为模型对照组、受试药物 TY6052，以及阳性对照黄芪甲苷

（ASI）、西地兰、米力农、多巴胺、黄芪注射液组。

采用累积给药法，静脉推注给药，每种药物5-7个剂量，给药体积为0.5 mL/kg，假手术组，模型对照组给予等体积的空白溶剂。研究受试药物TY6052的最大正性肌力效应，并与阳性药物进行比较，确定TY6052 的最大效应剂量、相对安全指数。

## 2.3 检测指标

### 2.3.1 血流动力学测定

血流动力学测定采用颈动脉逆向插管法，以AcqKnowledge v.3.8.2软件进行数据测量，通过左室内压的测定，计算+LVd*p*/d*t*max、-LVd*p*/d*t*max、LVEDP。

### 2.3.2 ED15、最大效应剂量、相对安全指数测定

根据+LVd*p*/d*t*max 计算各药的效应相对于模型组的增加百分率、效应增加 15%的剂量

（ED15，常用临床等效量）。

药物使心功能明显降低的剂量作为中毒量（最大效应剂量与心功能开始降低剂量的中间值）。

以中毒量与ED15剂量的比值表示相对安全指数，相对安全指数值越大表示药物越安全。

# 3 实验结果

## 3.1 累积给药对+LVdp/dtmax影响

模型对照组给予溶剂后，随溶剂体积增加，+LVd*p*/d*t*max 有轻微增加趋势，但与给药前比较差异不显著。TY6052 随剂量增加，心脏收缩功能增强，+LVd*p*/d*t*max 最大效应与给药前比较可增加395±86 mmHg/s, ASI最大效应可增加420±70 mmHg/s，二者作用相

似（*P*> 0.05）。西地兰最大效应可增加746±222 mmHg/s，多巴胺最大效应可增加400±94

mmHg/s，米力农最大效应可增加287±61 mmHg/s，黄芪注射液最大效应可增加257±62

mmHg/s。

以相对于模型组的增加百分率计算，TY6052最大效应与ASI、多巴胺、米力农相似（*P*> 0.05），较西地兰弱（*P*<0.01），强于黄芪注射液（*P*<0.05）。

TY6052剂量在0.1～2 mg/kg范围时，心脏收缩功能成剂量依赖性增强，2～8mg/kg范围内基本可达效应平台期，ASI作用与TY6052相似，剂量在0.1～4 mg/kg心脏收缩功能成剂量依赖性增强，4～8mg/kg 范围内基本可达效应平台期。结果见表1～5，图1～

6。

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 给药前 | 3798±550 | 2572±422 | 2591±617 |  | 2708±266 |  |
|  | 0.1 | 3753±613 | 2598±420 | 2678±650\* | （5.4%） | 2775±297\*\* | （4.2%） |
|  | 0.3 | 3850±610 | 2636±464 | 2782±664\*\* | （10.5%） | 2838±277\*\*\* | （5.5%） |
| 剂量 | 1 | 3774±591 | 2654±528 | 2831±647\*\* | （14.3%） | 2966±269\*\* | （16.8%） |
| （mg/kg） | 2 | 3769±612 | 2660±549 | 2954±652\*\* | （25.0%） | 3035±187\*\* | （22.7%） |
|  | 4 | 3857±575 | 2676±585 | 2985±642\*\*\* | （24.7%） | 3120±152\*\*\* | （26.5%） |
|  | 8 | 3896±601 | 2686±657 | 2972±598\*\*\* | （22.1%） | 3127±305\*\*\* | （25.3%） |
|  | 10 | 3777±573 | 2715±619 | 2865±505\* | （12.6%） | 2978±251\*\* | （13.7%） |

表 1 TY6052与ASI对+LVd*p*/d*t*max的影响(*x*-±*s*，n=6～8)组别假手术模型TY6052 ASI

注：1.括号内为相对模型组增加百分率；2.与给药前比较：\**P*<0.05, \*\**P*<0.01, \*\*\**P*<0.001.



TY6052

ASI

30

20

gain(%)

max

10

+LVdp/dt

0

1E-4 1E-3 0.01

剂量（mol/kg）

图 1 TY6052与ASI对+LVd*p*/d*t*max影响的对比

表 2 西地兰对+LVdp/dtmax的影响(x-±s，n=6～8)组别假手术模型西地兰

|  | 给药前 | 3798±550 | 2572±422 | 2703±760 |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 0.01 | 3753±613 | 2598±420 | 2813±774\* | （7.9%） |
|  | 0.02 | 3850±610 | 2636±464 | 2965±764\*\* | （16.4%） |
| 剂量 | 0.04 | 3774±591 | 2654±528 | 3058±712\*\* | （25.4%） |
| （mg/kg） |  |  |  |  |  |
|  | 0.08 | 3769±612 | 2660±549 | 3449±588\*\*\* | （60.4%） |
|  | 0.16 | 3857±575 | 2686±657 | 3131±828\*\* | （27.8%） |
|  | 0.32 | 3896±601 | 2715±619 | 2872±828\*\* | （4.7%） |

注：1.括号内为相对模型组增加百分率；2.与给药前比较：\**P*<0.05, \*\**P*<0.01, \*\*\**P*<0.001.



TY6052

西地兰

70

60

50

gain(%)

40

max

30

+LVdp/dt

20

10

0

1E-5 1E-4 1E-3 0.01

剂量（mol/kg）

图 2 TY6052与西地兰对+LVd*p*/d*t*max影响的对比

表 3 多巴胺对+LVdp/dtmax的影响(x-±s，n=6～8)组别假手术模型多巴胺

|  | 给药前 | 3798±550 | 2572±422 | 2620±834 |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 0.01 | 3753±613 | 2598±420 | 2735±852\*\*\* | (8.0%) |
|  | 0.03 | 3850±610 | 2636±464 | 2778±850\*\* | (7.8%) |
| 剂量 | 0.1 | 3774±591 | 2654±528 | 2883±829\*\*\* | (16.5%) |
| （mg/kg） |  |  |  |  |  |
|  | 0.3 | 3769±612 | 2660±549 | 3020±853\*\*\* | (28.6%) |
|  | 1 | 3857±575 | 2686±657 | 2747±1093 | (2.1%) |
|  | 3 | 3896±601 | 2715±619 | 2684±982 | (-4.1%) |

注：1.括号内为相对模型组增加百分率；2.与给药前比较：\*\**P*<0.01，\*\*\**P*<0.001。



TY6052

多巴胺

1E-4

1E-3

剂量（mol/kg）

0.01

30

gain(%)

20

max

10

+LVdp/dt

0

图 3 TY6052与多巴胺对+LVd*p*/d*t*max影响的对比

表 4 米力农对+LVdp/dtmax的影响(x-±s，n=6～8)组别假手术模型米力农

|  | 给药前 | 3798±550 | 2572±422 | 2721±726 |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 0.003 | 3753±613 | 2598±420 | 2866±834 | （11.0%） |
|  | 0.01 | 3850±610 | 2636±464 | 2964±781\* | （14.8%） |
| 剂量 | 0.03 | 3774±591 | 2654±528 | 3008±694\*\*\* | （19.4%） |
| （mg/kg） |  |  |  |  |  |
|  | 0.1 | 3769±612 | 2660±549 | 2837±773\* | （3.8%） |
|  | 0.2 | 3857±575 | 2686±657 | 2724±844 | (-8.1%) |
|  | 0.4 | 3896±601 | 2715±619 | 2599±863 | (-19.4%) |

注：1.括号内为相对模型组增加百分率；2.与给药前比较：\**P*<0.05，\*\*\**P*<0.001。



TY6052

米利农

1E-5

1E-4

1E-3

0.01

剂量（mol/kg）

30

20

+LVd p/d tmax gain(%)

10

0

-10

-20

图 4 TY6052与米力农对+LVd*p*/d*t*max影响的对比

表 5 黄芪注射液对+LVdp/dtmax的影响(x-±s，n=6～8)组别假手术模型黄芪注射液

|  | 给药前 | 3798±550 | 2572±422 | 2735±756 |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 0.4 | 3753±613 | 2598±420 | 2765±728 | （1.2%） |
|  | 0.8 | 3850±610 | 2636±464 | 2867±728\*\* | （5.7%） |
| 剂量 | 1.6 | 3774±591 | 2654±528 | 2905±790\*\*\* | （9.1%） |
| （g 生药/kg） |  |  |  |  |  |
|  | 2 | 3769±612 | 2660±549 | 2939±778\*\* | （11.9%） |
|  | 4 | 3857±575 | 2686±657 | 2992±797\*\*\* | （13.5%） |
|  | 8 | 3896±601 | 2715±619 | 2981±786\*\* | （11.1%） |

注：1.括号内为相对模型组增加百分率；2.与给药前比较：\*\**P*<0.01，\*\*\**P*<0.001。



黄芪注射液

15

10

+LVdp/dtmax gain(%)

5

0

1 10

剂量（g/kg）

图 5 黄芪注射液对+LVd*p*/d*t*max 增加百分率影响



TY6052

30

20

+LVdp/dt gain(%)

max

10

0

1E-4 1E-3 0.01

剂量（mol/kg）

图 6 TY6052 与黄芪注射液对+LVd*p*/d*t*max 影响的对比（黄芪注射液按0.12mg/mlASI

计算模拟）

## 3.2 累积给药对ED15、相对安全指数等影响

TY6052的ED15为1.04 mg/kg，ASI、西地兰、多巴胺、米力农的ED15分别为0.99、

0.02、0.08、0.01 mg/kg、黄芪注射液的ED15为4.48 g/kg. TY6052的最大效应剂量为2.0

mg/kg，ASI、西地兰、多巴胺、米力农的最大效应剂量分别为4.0、0.08、0.3、0.03 mg/kg、黄芪注射液的最大效应剂量为4.0 g/kg. TY6052的相对安全指数为8.63，ASI、多巴胺、米力农、西地兰的相对安全指数分别为9.11、7.82、6.86、5.86。结果见表6。

表 6 TY6052与其他药物ED15、相对安全指数的比较

最大

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | | 效应 | 应剂量 |  |
| TY6052 | 0.001599mol/kg | 25.0% | 0.003067 | 0.013804 |
|  | （1.04mg/kg） |  | (2mg/kg) | （9mg/kg） |
| ASI | 0.001260mol/kg | 26.5% | 0.005102 | 0.011480 |
|  | （0.99mg/kg） |  | (4mg/kg) | （9mg/kg） |
| 西地兰 | 0.000022mol/kg | 60.4% | 0.000085 | 0.000127 |
|  | （0.02mg/kg） |  | (0.08mg/kg) | (0.12mg/kg） |
| 多巴胺 | 0.000438mol/kg | 28.6% | 0.001582 | 0.003428 |
|  | （0.08mg/kg） |  | (0.3mg/kg) | （0.65mg/kg） |
| 米力农 | 0.000045mol/kg | 19.4% | 0.0001422 | 0.000308 |
|  | （0.01mg/kg） |  | (0.03mg/kg) | （0.065mg/kg） |
| 黄芪注射液 | 4.48g/kg | 13.5% | 4.00g/kg | - |

药物ED15

最大效

中毒量相对安全指数

8.63

9.11

5.86

7.82

6.86

-

# 4 小结

（1）以TY6052对心脏收缩功能的最大效应为基准1，则ASI、西地兰、多巴胺、米力农、黄芪注射液的最大效应分别为1.06、2.42、1.14、0.78、0.54，即最大效应顺序为：西地兰>多巴胺> ASI> TY6052>米力农>黄芪注射液。

（2）以TY6052相对安全指数为基准1，则ASI、西地兰、多巴胺、米力农的相对安全指数分别为：1.06、0.68、0.91、0.79，即相对安全度顺序为：ASI> TY6052>多巴胺

>米力农>西地兰。

实验二TY6052短期治疗对症状的改善及作用特点研究

实验一中得到了各药的效应相对于模型组效应增加15%的剂量（ED15，常用临床等效量），选用此等效作用剂量，研究TY6052对心脏舒张功能、呼吸症状、肺水肿的改善，并观察其是否具有利尿作用。

# 1 实验材料

## 1.1 药品及试剂

### 1.1.1 受试药

TY6052，天津药物研究院制剂技术及研究中心提供，批号0903-1. MW 652，规格1 mL:5 mg，临用时用生理盐水配制成所需浓度的药液供动物给药用。

### 1.1.2 阳性药

黄芪甲苷（简称ASI），白色粉末，天津药物研究院新药创新中心提供，批号20090515。MW 784，用溶剂配成5 mg/mL，临用时用生理盐水配制成所需浓度的药液供动物给药用。

去乙酰毛花苷注射液（简称西地兰），上海旭东海普药业有限公司产品，批号110302。MW 943.09，规格2 mL:0.4 mg，临用时用生理盐水配制成所需浓度的药液供动物给药用。

米力农注射液（简称米力农），鲁南贝特制药有限公司产品，批号110501。MW 211.22，规格5mL:5 mg，临用时用生理盐水配制成所需浓度的药液供动物给药用。

盐酸多巴胺注射液（简称多巴胺），上海禾丰制药有限公司，批号120406。MW

189.64，规格2mL:20 mg，临用时用生理盐水配制成所需浓度的药液供动物给药用。黄芪注射液，黑龙江珍宝岛药业股份有限公司产品，批号A20111007。规格10 mL:20

g 生药，临用时用生理盐水配制成所需浓度的药液供动物给药用。

### 1.1.3 空白溶剂

无色透明液体，天津药物研究院制剂技术及研究中心提供，批号20120217，临用时用生理盐水配制成所需浓度的药液供动物给药用。

## 1.2 实验动物

Wistar 大鼠，SPF 级，北京维通利华实验动物技术有限公司提供，动物许可证号

SCXK(京) 2012-0001.

## 1.3 实验仪器

Vivid 3 Pro彩色超声多普勒仪，美国GE公司产品。

MP150生理信号采集系统，美国BIOPAC产品。

i-STAT 血气分析仪，雅培公司产品。

BP310S型电子天平，德国Sartorius产品

# 2 实验方法

## 2.1 心衰模型制备

Wistar 大鼠，12%水合氯醛麻醉，仰卧位固定于手术台上。前外侧胸壁去毛，测量超声心动图后，手术野常规消毒，切开皮肤、肌层，肌层行荷包缝合，切断第4肋骨，将心脏以环形钩拉出胸外，于左心耳与肺动脉圆锥间距离左心耳下缘约3 mm处将冠脉前降支以6/0无损伤缝合丝线结扎（假手组不进行结扎，其它手术过程相同），抽出胸腔内空气，将荷包缝合扎紧，缝合皮肤。

冠脉结扎4 w后，测量超声心动图，以心脏左心室缩短分数（FS）较基础值下降

30%以上作为心衰形成标准。选取心衰造模成功者，按FS 随机分组。

## 2.2 分组与给药

造型成功的动物随机分为模型对照组、受试药物 TY6052，以及阳性对照黄芪甲苷

（ASI）、西地兰、米力农、多巴胺、黄芪注射液组。

采用等效剂量法，静脉输注给药，根据实验一的ED15给药剂量，确定给药剂量分别为TY6052 1.04 mg/kg, ASI 0.99 mg/kg，西地兰0.02 mg/kg，多巴胺0.08 mg/kg，米

力农0.01 mg/kg，黄芪注射液4.48 g/kg，每只动物给药体积为3 mL，假手术组给予等

体积的空白溶剂。给药持续时间为30min，每天给药1次，连续3 d。研究等效剂量下，

TY6052 与其他阳性对照药物比较，改善舒张功能、改善呼吸症状等作用的特点。

## 2.3 检测指标

### 2.3.1 血流动力学测定

血流动力学测定采用颈动脉逆向插管法，以AcqKnowledge v.3.8.2软件进行数据测量，通过左室内压的测定，计算-LVd*p*/d*t*max、LVEDP，观察药物对心脏舒张功能的改善。

### 2.3.2 彩色多普勒超声测定

采用VIVID 3 Pro彩色多普勒超声仪连8 MHz线性矩阵变频探头（2D扫描灰度为

60，帧速为130 f/s；M型扫描速度为50 mm/s）进行超声心动图测量。在左室长轴上作

2D与M型图像，测定FS。静脉输注实验中，连续给药3 d后，在脉冲多普勒（PW）模式下，测定左心室二尖瓣口血流速度，测定血流E峰、A峰，以及E峰与A峰的比值（E/A）值，研究其对心脏舒张功能的作用。

### 2.3.3 血气分析

静脉输注实验中，连续给药3 d后，采用血气分析仪，测定动脉血血氧分压（PaO2）、血氧饱和度（SaO2），并根据公式血氧含量（CaO2）=1.39×15×SaO2+0.00315×PaO2，计算每100 mL血液含的氧毫升数（mL/100 mL），研究药物对呼吸功能的改善作用。

### 2.3.4 肺水肿测定

静脉输注实验中，连续给药3 d后，采用干湿称重法，测定肺含水量，研究药物对肺淤血、肺水肿影响。

### 2.3.5 利尿作用测定

静脉输注实验中，连续给药2 d后，皮下注射生理盐水，体积2.5 ml/100 g体重，以代谢笼收集24 h尿液并测定尿液体积，观察药物对利尿作用影响。

# 3 实验结果

## 3.1 等效剂量静脉输注给药对舒张功能的影响

在ED15等效剂量下，TY6052静脉输注给药3 d，可明显增加-LVd*p*/dtmax，降低

LVEDP，与ASI、西地兰、米力农以及黄芪注射液比较作用相似（*P*> 0.05），改善LVEDP方面优于多巴胺（*P*<0.05）。结果见表7。在ED15等效剂量下，TY6052静脉输注给药3 d，可明显降低A峰值(*P*<0.01)，增加E/A比值(*P*<0.01)，与ASI、西地兰、多巴胺、米力农以及黄芪注射液比较作用相似（*P*> 0.05）。结果见表 8。

表 7 等效剂量下TY6052对-LVd*p*/d*t*max、LVEDP影响(*x*-±*s*，n=8～10)

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | （mg/kg） | (mmHg/s) | (mmHg) |
| 假手术 | - | -3362.7±285.8 | -3.9±6.7 |
| 模型 | - | -2024.3±224.4△△△ | 9.2±4.4△△△ |
| TY6052 | 1.04 | -2540.3±324.1\*\* | -1.5±3.1\*\*\*+ |
| ASI | 0.99 | -2503.9±323.2\*\* | 0.9±5.2\*\* |
| 西地兰 | 0.02 | -2727.8±343.0\*\*\* | -3.1±2.6\*\*\* |
| 多巴胺 | 0.08 | -2474.8±262.3\*\* | 2.2±2.5\*\* |
| 米力农 | 0.01 | -2726.4±293.6\*\*\* | -2.8±2.7\*\*\* |
| 黄芪注射液 | 4.48g/kg | -2443.8±181.2\*\* | -0.7±4.3\*\*\* |

组别剂量

-d*p*/d*t*max

LVEDP

注：1.与假手术组比较：△△△*P*<0.001; 2.与模型对照组比较：\*\**P*<0.01, \*\*\**P*<0.001;

3.与多巴胺比较：+*P*<0.05.

表 8 等效剂量下TY6052对E峰、A峰、E/A比值影响(*x*-±*s*，n=8～10)

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | （mg/kg） | （m/s） | （m/s） |  |
| 假手术 | - | 0.722±0.088 | 0.163±0.036 | 4.406±0.846 |
| 模型 | - | 0.606±0.101△ | 0.235±0.031△△△ | 2.653±0.697△△△ |
| TY6052 | 1.04 | 0.626±0.112 | 0.158±0.046\*\* | 4.058±0.788\*\* |
| ASI | 0.99 | 0.620±0.050 | 0.170±0.027\*\*\* | 3.710±0.474\* |
| 西地兰 | 0.02 | 0.683±0.097 | 0.184±0.060\* | 3.894±0.774\* |
| 多巴胺 | 0.08 | 0.615±0.092 | 0.153±0.030\*\*\* | 4.078±0.614\*\* |
| 米力农 | 0.01 | 0.655±0.155 | 0.153±0.044\*\*\* | 4.434±0.641\*\*\* |
| 黄芪注射液 | 4.48g/kg | 0.623±0.077 | 0.186±0.053\* | 3.539±0.846 |

组别剂量E 峰

A峰E/A比值

注：1.与假手术组比较：△△*P*<0.01，△△△*P*<0.001; 2.与模型对照组比较：\**P*<0.05, \*\**P*<0.01, \*\*\**P*<0.001.

## 3.2 等效剂量静脉输注给药对呼吸功能的影响

造型后，模型对照组动脉血氧分压、血氧含量均明显下降，与假手术组比较有显著性差异(*P*<0.01)。在ED15等效剂量下，TY6052静脉输注给药3 d，可明显增加血氧分压与血氧含量（*P*<0.05～0.01），与ASI、西地兰、多巴胺、米力农以及黄芪注射液比较作用相似（*P*> 0.05）。结果见表9。

表 9 等效剂量下TY6052对呼吸功能的影响(*x*-±*s*，n=8～10)

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | （mg/kg） | (mmHg) | （mL/100mL） |
| 假手术 | - | 96.4±6.0 | 20.570±0.147 |
| 模型 | - | 82.1±8.4△△△ | 20.066±0.378△△ |
| TY6052 | 1.04 | 93.8±6.5\*\* | 20.520±0.269\* |
| ASI | 0.99 | 95.1±6.9\*\* | 20.576±0.114\*\* |
| 西地兰 | 0.02 | 95.0±4.7\*\* | 20.628±0.233\*\* |
| 多巴胺 | 0.08 | 91.9±5.8\* | 20.410±0.240\* |
| 米力农 | 0.01 | 89.5±4.1\* | 20.376±0.117\* |
| 黄芪注射液 | 4.48g/kg | 92.1±8.0\* | 20.475±0.306\* |

组别剂量

PaO2

CaO2

注：1.与假手术组比较：△△*P*<0.01，△△△*P*<0.001；

2.与模型对照组比较：\**P*<0.05, \*\**P*<0.01.

## 3.3 等效剂量静脉输注给药对肺水肿的影响

造型后，模型对照组肺水肿明显，表现为肺组织含水量明显增加，与假手术组比较有显著性差异(*P*<0.01)。在ED15等效剂量下，TY6052静脉输注给药3 d，可明显减轻肺组织水肿，与模型对照组增加的水肿程度比较，降低了73.02%，与ASI、西地兰、多巴胺、米力农以及黄芪注射液比较作用相似（*P*> 0.05）。结果见表 10。

表 10 等效剂量下TY6052对肺水肿的影响(*x*-±*s*，n=8～10)

| 组别 剂量 | | 肺组织含水量 | 降低百分数 |
| --- | --- | --- | --- |
|  | （mg/kg） | (%) | （%） |
| 假手术  模型 | -  - | 78.01±0.85  80.16±1.16△△△ |  |
| TY6052 | 1.04 | 78.59±0.56\*\* | -73.0 |
| ASI | 0.99 | 78.84±0.91\* | -61.4 |
| 西地兰 | 0.02 | 78.47±0.46\*\* | -78.6 |
| 多巴胺 | 0.08 | 78.83±1.05\* | -61.9 |
| 米力农 | 0.01 | 78.60±0.85\*\*\* | -72.6 |
| 黄芪注射液 | 4.48g/kg | 78.83±0.76\* | -61.9 |

注：1.与假手术组比较：△△△*P*<0.001；

2.与模型对照组比较：\**P*<0.05, \*\**P*<0.01, \*\*\**P*<0.001.

## 3.4 等效剂量静脉输注给药对利尿作用的影响

在ED15等效剂量下，TY6052静脉输注给药3 d，对尿量无影响；多巴胺及黄芪注射液可使尿量增加。结果见表11。

表11 等效剂量下TY6052对利尿作用的影响（n=8-10）

| 组别 | 剂量  （mg/kg） | 尿量  (mL) |
| --- | --- | --- |
| 假手术 | - | 12.3±3.4 |
| 模型 | - | 10.6±3.3 |
| TY6052 | 1.04 | 12.8±2.4 |
| ASI | 0.99 | 13.7±3.7 |
| 西地兰 | 0.02 | 12.3±4.8 |
| 多巴胺 | 0.08 | 15.7±4.8\* |
| 米力农 | 0.01 | 12.8±5.1 |
| 黄芪注射液 | 4.48g/kg | 14.6±3.4\* |

注：1.与假手术组比较：*P*> 0.05；

2.与模型对照组比较：\**P*<0.05。

# 4 小结

（1）在ED15等效剂量下，TY6052静脉输注给药3 d，可明显增加-LVd*p*/d*t*max，降低

LVEDP，与ASI、西地兰、米力农以及黄芪注射液比较作用相似（*P*＞0.05），改善LVEDP

方面优于多巴胺（*P*＜0.05）。TY6052可明显降低A峰值（*P*＜0.01），增加E/A比值

（*P*＜0.01），与ASI、西地兰、多巴胺、米力农以及黄芪注射液比较作用相似（*P*＞0.05），提示TY6052可改善心衰心脏的舒张功能。

（2）在ED15等效剂量下，TY6052静脉输注给药3 d，可明显增加血氧分压与血氧含量，可明显减轻肺组织水肿，与模型组比较差异显著（*P*＜0.01），与黄芪甲苷、西 地兰、多巴胺、米力农以及黄芪注射液比较作用相似（*P*＞0.05），提示TY6052可减轻肺水肿，改善心衰时的呼吸症状。

（3）在ED15等效剂量下，TY6052静脉输注给药3 d，对尿量无影响，提示TY6052

在该剂量、该给药期限内未表现出利尿作用。

实验三TY6052用于长期治疗作用效果研究

目前临床正性肌力作用药物因其局限性，仅可短期静脉给药用于治疗心衰。实验一表明，TY6052 相对其他药物，具有更高的安全性。本实验通过结扎大鼠冠脉造成心梗后心衰模型研究TY6052长期应用治疗慢性心衰的有效性，包括其对左室结构和心功能的干预作用。

# 1 实验材料

## 1.1 药品及试剂

### 1.1.1 受试药

TY6052，天津药物研究院制剂技术及研究中心提供，批号0903-1。规格1 mL:5 mg，临用时用生理盐水配制成所需浓度的药液供动物给药用。

### 1.1.2 阳性药

盐酸喹那普利（简称喹那普利），上海医药工业研究院惠赠，批号CN051。白色粉末，临用时用生理盐水配制成所需浓度的药液供动物给药用。

### 1.1.3 空白对照溶剂

无色透明液体，天津药物研究院制剂技术及研究中心提供，批号 20120217，临用时用生理盐水配制成所需浓度的药液供动物给药用。

## 1.2 实验动物

Wistar 大鼠，SPF 级，北京维通利华实验动物技术有限公司提供，动物许可证号

SCXK(京) 2012-0001.

## 1.3 仪器

VIVID 3 Pro彩色多普勒超声仪，美国GE公司产品。

MP150生理信号采集系统，美国BIOPAC产品。

BP310S型电子天平，德国Sartorius产品。

# 2 实验方法

## 2.1 模型制备

参照文献并稍加改进。Wistar 大鼠，12%水合氯醛麻醉，仰卧位固定于手术台上。前外侧胸壁去毛，测量超声心动图后，手术野常规消毒，切开皮肤、肌层，肌层行荷包

缝合，切断第4肋骨，将心脏以环形钩拉出胸外，于左心耳与肺动脉圆锥间距离左心耳下缘约3 mm处将冠脉前降支以6/0无损伤缝合丝线结扎（假手组不进行结扎，其它手术过程相同），抽出胸腔内空气，将荷包缝合扎紧，缝合皮肤，肌注青霉素，回笼饲养备用。

## 2.2 超声心动图检测

采用VIVID 3 Pro彩色多普勒超声仪连8 MHz线性矩阵变频探头(2D扫描灰度为60，帧速为130 f/s；M型扫描速度为50 mm/s)进行超声心动图测量。在左室长轴与短轴解剖位上作2D与M型图像（见附图1、2），通过软件测定心率(HR)，舒张期左室的室间隔厚度(IVSd)、左室内径(LVIDd)、后壁厚度(LVSPWd)、腔体积(LVVd)和收缩期左室的室间隔厚度(IVSs)、左室内径(LVIDs)、后壁厚度(LVSPWs)、腔体积(LVVs)，射血分数(EF) 和缩短分数(FS)。



附图 1 彩色多普勒超声图像(长轴2D)



附图 2 彩色多普勒超声图像(长轴M型)

## 2.3 分组与给药

冠脉结扎4 w后，测量超声心动图，以FS较基础值下降30%以上作为心衰形成标准。选取55只按FS随机分成5组，开始尾静脉缓慢注射给药，给药时间5 min。假手术组和模型对照组给予空白溶剂，受试药组给予TY6052，剂量分别为0.5、1、2 mg/kg，阳性药组给予喹那普利，剂量为1 mg/kg；每日1次，连续2 w；给药体积均为5 mL/kg。

## 2.4 血流动力学测定

末次给药后15 min，12%水合氯醛(360 mg/kg, ip)麻醉，仰卧位固定与手术台上。超声心动图检测后，自右侧颈总动脉插入充满肝素生理盐水的BF3心导管，导管另一端连接压力换能器，经血压放大器测量收缩压(SAP)、舒张压(DAP)和平均动脉压(MAP)；将导管继续前移，经主动脉瓣进入左心室，测定左室内压(LVSP)和舒张末期压(LVEDP)，

LVSP 信号经微分处理测量左室内压最大变化速率（±LVd*p*/d*t*max）；四肢皮下插针状电极记录II导联心电图。上述模拟信号经MP-150系统采集、转换为数字信号存储于电脑中，以AcqKnowledge v.3.8.2软件进行数据测量。

## 2.5 组织标本处理

实验结束，取心脏，分别称量左心房(LA)、右心房(RA)、左心室(LV)和右心室(RV) 重量，以及梗死斑块(scar)重量。取肺，称重。取右侧胫骨，采用游标卡尺测定胫骨长度(Tibia length, TL) [23-24] 。

由于慢性心衰出现不同程度心肌肥厚与组织水肿，以LA、RA、LV、RV与TL

比值(mg/mm)，表示心肌肥厚程度；以梗死斑块重量与TL 比值表示左室梗死范围大小

（mg/mm）；以肺重量与TL 比值表示肺水肿程度(mg/mm)。

# 3 实验结果

## 3.1 心衰模型的成功率

本实验对121只大鼠进行了冠脉结扎手术，因严重急性心肌缺血及麻醉意外死亡的动物数为38只（占动物总数31%），存活83只（占动物总数69%）；存活的动物中EF符合心衰入选标准的为59只（占存活动物数71%，占动物总数49%）。所有动物在实验结束后，取心脏，均观察到瘢痕连结组织的存在，斑块大小为2.49±0.55(1.43～3.65) mg/mm，表明冠脉左前降支结扎成功，导致心肌缺血坏死、直至瘢痕连结组织形成，进一步确证了大鼠心衰模型制作的可靠性、稳定性。

## 3.2 对左室功能的影响

### 3.2.1 对缩短分数(FS)的影响

假手术组实验期间FS较为稳定，心衰形成后FS明显下降，约下降了52%。给予

TY6052治疗后，其下降的FS有所恢复，治疗1 w后0.5、1、2 mg/kg分别增加了25.6%

(*P*<0.01)、29.8%(*P*<0.001)、35.9%(*P*<0.001)；治疗2 w后分别增加了32.5%（*P*<0.001）、

36.8%(*P*<0.001)、37.3%(*P*<0.001). TY6052 1 mg/kg治疗1 w时其作用强度优于等剂量的喹那普利（*P*<0.01）. 结果见表12.

表 12 TY6052对慢性心衰大鼠FS(%)的影响( *x*±s, n=10~11)

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | (mg/kg/d) |  |  |  | 1 w | 2 w |
| 假手术 | - | 10 | 65.3±5.4 | 64.0±3.4 | 65.7±4.3 | 66.9±5.9 |
| 模型对照 | - | 11 | 64.3±6.7 | 31.1±6.0ΔΔΔ | (1.7±4.9)  29.8±7.2ΔΔΔ | (2.9±5.5)  27.5±9.0ΔΔΔ |
|  |  |  |  |  | (-1.3±2.5) | (-3.6±5.9) |
| TY6052 | 0.5 | 11 | 64.2±7.3 | 33.9±7.4 | 39.0±7.2 | 40.3±7.7 |
|  |  |  |  |  | (5.1±5.7\*\*) | (6.4±5.7\*\*\*) |
| TY6052 | 1.0 | 11 | 64.8±11.0 | 32.5±5.6 | 40.5±6.6  (8.0±3.0\*\*\*++) | 42.0±10.7  (9.5±8.5\*\*\*) |
| TY6052 | 2.0 | 11 | 63.7±6.6 | 33.0±6.6 | 42.7±7.9  (9.7±6.7\*\*\*) | 42.2±5.4  (9.2±4.7\*\*\*) |
| 喹那普利 | 1.0 | 11 | 63.7±7.7 | 33.4±7.6 | 37.1±5.3  (3.7±3.8\*\*) | 38.3±7.3  (4.9±7.1\*\*) |

组别剂量

n基础值治疗前治疗后

注：1.括号内为与治疗前的差值（下同）；2.与假手术组比较：ΔΔΔ*P*<0.001；

3.与模型对照组比较：\*\* *P*<0.01, \*\*\* *P*<0.001；4.与等剂量喹那普利组比较：++ *P*<0.01.

### 3.2.2 对左室内压最大变化速率(±LVd*p*/d*t*max)的影响

与假手术组比较，模型对照组±LVd*p*/d*t*max 明显降低，表明左室收缩功能及舒张功能均明显下降。经静脉给予TY6052治疗2 w后，其降低的收缩和舒张功能均有不同程度增加。TY6052 0.5、1、2 mg/kg能使下降的+LVd*p*/d*t*max分别增加了13.5%(*P*> 0.05)、19.7%

(*P*<0.01)、22.9%(*P*<0.01)；使下降的-LVd*p*/d*t*max 分别增加了 11.0%(*P*> 0.05)、15.2%(*P*<

0.05）、26.8%(*P*<0.001)；等剂量的TY6052 与喹那普利比较，作用强度相似。结果见表13。

表 13 TY6052治疗2 w后对心衰大鼠±LVd*p*/d*t*max的影响( *x*±s, n=10～11)

剂量＋LVd*p*/d*t*max

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | (mg/kg/d) | (mmHg/s) | (mmHg/s) |
| 假手术 | - | 3314±366 | -3043±484 |
| 模型对照 | - | 2336±423ΔΔΔ | -2163±347ΔΔΔ |
| TY6052 | 0.5 | 2651±389 | -2402±346 |
| TY6052 | 1.0 | 2796±180\*\* | -2491±331\* |
| TY6052 | 2.0 | 2870±328\*\* | -2743±326\*\*\* |
| 喹那普利 | 1.0 | 2742±189\*\* | -2459±242\* |

组别

-LVd*p*/d*t*max

注：1.与假手术组比较：ΔΔΔ*P*<0.001; 2.与等剂量喹那普利组比较：*P*> 0.05；

3.与模型对照组比较：\* *P*<0.05, \*\* *P*<0.01, \*\*\* *P*<0.001.



\*\*

\*\*

\*\*

\*

\*

\*\*\*

3000

2000

1000

LVd*p*/d*t*max

0

-1000

-2000

-3000

假手术模型对照TY6052 0.5 mg/kg TY6052 1.0 mg/kg TY6052 2.0 mg/kg喹那普利1.0mg/kg



图 7 TY6052 对慢性心衰大鼠左室内压最大变化速率的影响

### 3.2.3 对左室构型的影响

3.2.3.1对左室腔内径(LVIDd、LVIDs)的影响

心衰大鼠左室腔内径明显扩大，尤其是收缩期更明显。TY6052 0.5、1、2 mg/kg治疗1 w后能使扩张的LVIDd分别缩小了20.0%(*P*> 0.05)、30.0%(*P*> 0.05)、45.0% (*P*<0.05)；使扩张的LVIDs分别缩小了27.5%(*P*<0.001)、35.0%(*P*<0.001)、42.5% (*P*<0.001)；等剂

量的TY6052与喹那普利作用相似(30.0% vs 30.0%, 35.0% vs 27.5%). 治疗2 w后能使扩张的LVIDd分别缩小了24.0%(*P*> 0.05)、48.0%(*P*<0.01)、52.0% (*P*<0.001)；使扩张的

LVIDs分别缩小了36.4%(*P*<0.01)、45.5%(*P*<0.001)、47.7% (*P*<0.001)；等剂量的TY6052

较喹那普利作用稍强(48.0% vs 28.0%, 45.5% vs 31.8%). 结果见表14.

表 14 TY6052对心衰大鼠舒张期和收缩期左室腔内径的影响( *x*±s, n=10～11)

剂量

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | (mg/kg/d) |  |  | 1 w | 2 w |
| 假手术 | - | 0.66±0.08 | 0.69±0.05 | 0.70±0.05 | 0.65±0.05 |
| 模型对照 | - | 0.62±0.08 | 0.88±0.09ΔΔΔ | (0.007±0.022) 0.90±0.12ΔΔΔ (0.025±0.070) | (-0.039±0.059) 0.90±0.12ΔΔΔ (0.027±0.063) |
| TY6052 | 0.5 | 0.62±0.06 | 0.88±0.08 | 0.86±0.11 | 0.84±0.11 |
|  |  |  |  | (-0.015±0.086) | (-0.036±0.101) |
| LVIDd TY6052  (cm)  TY6052 | 1.0  2.0 | 0.67±0.07  0.64±0.06 | 0.85±0.06  0.86±0.08 | 0.84±0.07  (-0.015±0.067)  0.81±0.07 | 0.78±0.11  0.77±0.10 |
|  |  |  |  | (-0.054±0.065\*) | (-0.088±0.059\*\*\*) |
| 喹那普利 | 1.0 | 0.63±0.05 | 0.88±0.06 | 0.84±0.11 | 0.84±0.10 |
|  |  |  |  | (-0.044±0.099) | (-0.050±0.096\*) |
| 假手术 | - | 0.23±0.06 | 0.25±0.03 | 0.24±0.05 | 0.22±0.05 |
| 模型对照 | - | 0.22±0.06 | 0.61±0.10ΔΔΔ | (-0.011±0.038) 0.64±0.14ΔΔΔ (0.030±0.051) | (-0.032±0.042) 0.66±0.16ΔΔΔ (0.055±0.092) |
| TY6052 | 0.5 | 0.22±0.06 | 0.58±0.10 | 0.53±0.08 | 0.50±0.10 |
|  |  |  |  | (-0.059±0.048\*\*\*) | (-0.082±0.090\*\*) |
| LVIDs TY6052  (cm)  TY6052 | 1.0  2.0 | 0.24±0.09  0.23±0.06 | 0.57±0.08  0.58±0.10 | 0.51±0.09  (-0.069±0.039\*\*\*) 0.47±0.09 | 0.46±0.13  0.45±0.09 |
|  |  |  |  | (-0.111±0.071\*\*\*) | (-0.13±0.063\*\*\*) |
| 喹那普利 | 1.0 | 0.22±0.05 | 0.59±0.09 | 0.53±0.10 | 0.52±0.10 |
|  |  |  |  | (-0.063±0.068\*\*) | (-0.066±0.093\*\*) |

指标组别

基础值治疗前

治疗后

(-0.075±0.096\*\*)

(-0.109±0.093\*\*\*)

注：1.与假手术组比较：ΔΔΔ*P*<0.001; 2.与等剂量喹那普利组比较：*P*> 0.05；

3.与模型对照组比较：\* *P*<0.05, \*\* *P*<0.01, \*\*\* *P*<0.001.

3.2.3.2对左室腔体积(LVVd、LVVs)的影响

心衰大鼠左室腔体积明显增大。给予TY6052 治疗后增大的腔体积不同程度缩小；

TY6052 0.5、1、2 mg/kg治疗1 w后能使增大的LVVd分别缩小了22%(*P*> 0.05)、

35%(*P*> 0.05)、51%(*P*<0.05)；治疗2 w后能使增大的LVVd分别缩小了29%（*P*> 0.05）、

52%(*P*<0.05)、57%(*P*<0.001). TY6052 0.5、1、2 mg/kg治疗1 w后能使增大的LVVs分别缩小了46%(*P*<0.01)、52%(*P*<0.001)、62%(*P*<0.001)；治疗2 w后能使增大的LVVs分别缩小了56%(*P*<0.01)、62%(*P*<0.001)、68%(*P*<0.001). TY6052 1 mg/kg与等剂量喹那普利比较作用相当。结果见表15.

表 15 TY6052对心衰大鼠舒张期和收缩期左室腔体积的影响( *x*±s, n=10～11)

指标组别

剂量

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | (mg/kg/d) |  |  | 1 w | 2 w |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  | | | | | |

基础值治疗前

治疗后

LVVd

(cm3)

LVVs

假手术 - 0.68±0.23 0.75±0.16 0.77±0.14 0.65±0.15

(0.02±0.07) (-0.11±0.17)

模型对照 - 0.58±0.18 1.47±0.37ΔΔΔ1.60±0.55ΔΔΔ 1.61±0.58ΔΔΔ

(0.14±0.36) (0.15±0.36)

TY6052 0.5 0.55±0.15 1.48±0.37 1.42±0.47 1.33±0.46

(-0.06±0.36) (-0.15±0.44)

TY6052 1.0 0.69±0.21 1.32±0.26 1.31±0.31 1.11±0.40

(-0.01±0.27) (-0.22±0.33\*)

TY6052 2.0 0.63±0.16 1.40±0.36 1.18±0.27 1.06±0.36

(-0.22±0.30\*) (-0.35±0.22\*\*\*)

喹那普利 1.0 0.59±0.13 1.42±0.31 1.30±0.41 1.26±0.35

(-0.12±0.31) (-0.16±0.30\*)

假手术 - 0.04±0.02 0.04±0.02 0.04±0.02 0.03±0.02

(-0.01±0.02) (-0.01±0.02)

模型对照 - 0.03±0.02 0.55±0.23ΔΔΔ0.65±0.34ΔΔΔ 0.71±0.40ΔΔΔ

(0.10±0.15) (0.16±0.26)

TY6052 0.5 0.03±0.02 0.50±0.23 0.37±0.15 0.33±0.17

(-0.13±0.13\*\*) (-0.17±0.22\*\*) TY6052 1.0 0.05±0.04 0.46±0.16 0.33±0.16++ 0.29±0.18

(cm3)

(-0.12

\*\*\*

\*\*\*

±0.09 ）(-0.17±0.11 )

TY6052 2.0 0.04±0.03 0.50±0.26 0.27±0.13 0.25±0.14

(-0.22±0.18\*\*\*) (-0.25±0.18\*\*\*)

喹那普利1.0 0.03±0.02 0.51±0.22 0.38±0.19 0.35±0.17

(-0.12±0.13\*\*) (-0.15±0.14\*\*)

注：1.与假手术组比较：ΔΔΔ*P*<0.001; 2.与等剂量喹那普利组比较：*P*> 0.05；

3.与模型对照组比较：\* *P*<0.05, \*\* *P*<0.01, \*\*\* *P*<0.001.

3.2.3.3对左室后壁(LVPWd、LVPWs)的影响

心衰大鼠收缩期左室后壁明显变薄，给予TY6052治疗后变薄的LVPWs有不同程度减轻；TY6052 0.5、1、2 mg/kg治疗1 w后LVPWs分别增加了40%(*P*<0.05) 、

70%(*P*<0.001)、70%(*P*<0.001)，TY6052 1 mg/kg与等剂量的喹那普利比较，作用稍强(70% vs 40%, *P*=0.0505)；TY6052 0.5、1、2 mg/kg治疗2 w后LVPWs分别增加了67%（*P*<0.05）、

89%(*P*<0.01)、78%(*P*<0.01)，TY6052 1 mg/kg 与等剂量的喹那普利比较，作用稍强（89% vs 44%）. 结果见表16.

3.2.3.4对室间隔壁(IVSd、IVSs)的影响

模型对照组造型后IVSd变厚，IVSs变薄，TY6052 2 mg/kg治疗后IVSd明显变薄

（*P*<0.05）, TY6052 1、2 mg/kg治疗2 w后可明显减轻IVSs的变薄。结果见表17.

3.2.3.5对室壁相对厚度(RWTd、RWTs)的影响

模型对照组造型后室壁相对厚度(RWTd、RWTs)均变薄，TY6052 0.5、1、2 mg/kg 治疗1 w后使变薄的RWTd分别增加16%(*P*<0.01)、19%(*P*<0.001)、21%(*P*<0.001)，TY6052 1

mg/kg与等剂量喹那普利作用相当(19% vs 15%)；治疗2 w后使变薄的RWTd分别增加

15%(*P*<0.01)、21%(*P*<0.001)、24%(*P*<0.001)，TY6052 1 mg/kg 与等剂量喹那普利比较作用稍强（21% vs 10%, *P*<0.05）. 结果见表18.

表 16 TY6052对心衰大鼠舒张期和收缩期左室后壁厚度的影响( *x*±s, n=10～11)

剂量

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | (mg/kg/d) |  |  | 1 w | 2 w |
| 假手术 | - | 0.155±0.042 | 0.148±0.017 | 0.158±0.019 | 0.155±0.029 |
|  |  |  |  | (0.010±0.025) | (0.007±0.031) |
| 模型对照 | - | 0.162±0.062 | 0.155±0.025 | 0.160±0.033 | 0.157±0.028 |
|  |  |  |  | (0.005±0.028) | (0.002±0.031) |
| TY6052 | 0.5 | 0.163±0.044 | 0.169±0.029 | 0.167±0.030 | 0.163±0.033 |
|  |  |  |  | (-0.002±0.042) | (-0.006±0.037) |
| LVPWd TY6052 | 1.0 | 0.142±0.030 | 0.176±0.019 | 0.165±0.025 | 0.178±0.026 |
| (cm) |  |  |  | (-0.012±0.029) | (0.002±0.036) |
| TY6052 | 2.0 | 0.151±0.025 | 0.151±0.025 | 0.153±0.019 | 0.154±0.024 |
|  |  |  |  | (0.002±0.029) | (0.003±0.029) |
| 喹那普利 | 1.0 | 0.131±0.025 | 0.153±0.022 | 0.166±0.019 | 0.156±0.023 |
|  |  |  |  | (0.014±0.020) | (0.004±0.017) |
| 假手术 | - | 0.302±0.023 | 0.312±0.044 | 0.319±0.035 | 0.305±0.012 |
| 模型对照 | - | 0.305±0.028 | 0.244±0.024ΔΔΔ | (0.007±0.054)  0.217±0.033ΔΔΔ | (-0.007±0.043)  0.223±0.044ΔΔΔ |
|  |  |  |  | (-0.026±0.035) | (-0.021±0.046) |
| TY6052 | 0.5 | 0.295±0.027 | 0.250±0.024 | 0.261±0.033  (0.011±0.028\*) | 0.275±0.045  (0.025±0.043\*) |
| LVPWs TY6052  (cm) | 1.0 | 0.298±0.035 | 0.252±0.031 | 0.286±0.017  (0.035±0.028\*\*\*) | 0.298±0.039  (0.046±0.056\*\*) |
| TY6052 | 2.0 | 0.295±0.025 | 0.258±0.033 | 0.287±0.017 | 0.289±0.026 |
|  |  |  |  | (0.029±0.024\*\*\*) | (0.031±0.027\*\*) |
| 喹那普利 | 1.0 | 0.277±0.034 | 0.231±0.034 | 0.260±0.038  (0.029±0.039\*\*) | 0.259±0.032  (0.028±0.042\*) |

指标组别

基础值治疗前

治疗后

注：1.与假手术组比较：ΔΔΔ*P*<0.001; 2.与等剂量喹那普利组比较： *P*> 0.05；

3.与模型对照组比较：\* *P*<0.05, \*\* *P*<0.01, \*\*\* *P*<0.001.

表 17 TY6052对心衰大鼠舒张期和收缩期室间隔壁厚度的影响( *x*±s, n=10～11)

剂量

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | (mg/kg/d) |  |  | 1 w | 2 w |
| 假手术 | - | 0.098±0.010 | 0.097±0.008 | 0.097±0.005  (0.000±0.007) | 0.097±0.007  (0.000±0.007) |
| 模型对照 | - | 0.098±0.009 | 0.108±0.015 | 0.110±0.018Δ | 0.115±0.019Δ |
| TY6052 | 0.5 | 0.099±0.008 | 0.105±0.016 | (0.002±0.012)  0.105±0.009 | (0.006±0.008)  0.102±0.015 |
| IVSd  (cm) TY6052 | 1.0 | 0.100±0.009 | 0.104±0.008 | (0.001±0.015)  0.105±0.016 | (-0.003±0.011)  0.107±0.009 |
| TY6052 | 2.0 | 0.098±0.008 | 0.106±0.016 | (0.002±0.017)  0.099±0.007 | (0.004±0.011)  0.098±0.006 |
|  |  |  |  | (-0.007±0.014) | (-0.008±0.016\*) |
| 喹那普利 | 1.0 | 0.093±0.005 | 0.105±0.009 | 0.102±0.008  (-0.004±0.009) | 0.101±0.009  (-0.005±0.014\*) |
| 假手术 | - | 0.207±0.023 | 0.224±0.028 | 0.229±0.036 | 0.232±0.029 |
| 模型对照 | - | 0.219±0.026 | 0.179±0.043Δ | (0.005±0.040)  0.176±0.042ΔΔ (-0.003±0.036) | (0.008±0.027)  0.161±0.034ΔΔΔ (-0.018±0.043) |
| TY6052 | 0.5 | 0.224±0.032 | 0.205±0.033 | 0.204±0.040 | 0.195±0.033 |
| IVSs  (cm) TY6052 | 1.0 | 0.227±0.049 | 0.170±0.028 | (-0.001±0.034)  0.204±0.031 | (-0.01±0.049)  0.198±0.037 |
| TY6052 | 2.0 | 0.213±0.017 | 0.166±0.019 | (0.034±0.023\*)  0.186±0.022 | (0.028±0.031\*\*)  0.185±0.016 |
| 喹那普利 | 1.0 | 0.210±0.034 | 0.182±0.038 | (0.020±0.023)  0.191±0.019 | (0.019±0.018\*)  0.182±0.031 |
|  |  |  |  | (0.009±0.025) | (0.000±0.043) |

指标组别

基础值治疗前

治疗后

注：1.与假手术组比较：Δ*P*<0.05,ΔΔ*P*<0.01,ΔΔΔ*P*<0.001; 2.与等剂量喹那普利组比较：*P*> 0.05;

3.与模型对照组比较：\* *P*<0.05, \*\* *P*<0.01, \*\*\* *P*<0.001.

表 18 TY6052对心衰大鼠舒张期和收缩期室壁相对厚度的影响( *x*±s, n=10～11)

指标组别剂量基础值治疗前治疗后

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | (mg/kg/d) |  |  | 1 w | 2 w |
| 假手术 | - | 39.6±13.2 | 35.7±3.6 | 36.7±2.8 | 38.9±5.9 |
|  |  |  |  | (1.0±3.7) | (3.3±7.8) |
| 模型对照 | - | 39.3±10.9 | 30.5±5.2Δ | 30.8±7.3Δ | 30.8±6.5ΔΔ |
| TY6052 | 0.5 | 43.4±11.1 | 31.4±4.5 | (0.3±4.0)  31.9±5.7 | (0.3±4.3)  31.7±4.9 |
| RWTd |  |  |  | (0.6±6.8) | (0.3±6.1) |
| (%) TY6052 | 1.0 | 37.0±8.1 | 32.8±2.6 | 32.2±3.8 | 35.0±5.0 |
|  |  |  |  | (-0.6±5.1) | (1.9±5.1) |
| TY6052 | 2.0 | 39.2±6.4 | 30.0±3.9 | 31.3±3.1 | 33.0±5.2 |
|  |  |  |  | (1.3±4.0) | (3.0±4.9) |
| 喹那普利 | 1.0 | 35.8±6.0 | 29.3±2.8 | 32.5±4.1 | 31.3±4.3 |
|  |  |  |  | (3.1±5.6) | (2.0±5.2) |
| 假手术 | - | 210.4±39.2 | 217.6±27.3 | 223.4±47.9 | 257.2±53.7 |
|  |  |  |  | (8.1±49.2) | (39.6±45.5) |
| 模型对照 | - | 211.5±34.46 | 72.1±18.2ΔΔΔ | 65.6±20.5ΔΔΔ | 61.9±18.8ΔΔΔ |
|  |  |  |  | (-6.5±8.9) | (-10.2±13.6) |
| RWTs TY6052 (%) | 0.5 | 228.3±51.5 | 80.1±15.9 | 91.6±23.8  (11.6±14.1\*\*) | 91.4±20.9  (12.9±17.6\*\*) |
| TY6052 | 1.0 | 198.7±68.8 | 72.0±11.0 | 96.1±17.6++ | 103.1±22.8 |
|  |  |  |  | (24.1±9.3\*\*\*) | (29.2±20.1\*\*\*+) |
| TY6052 | 2.0 | 238.0±72.8 | 75.4±15.0 | 98.6±18.6 | 108.8±20.6 |
|  |  |  |  | (25.0±10.0\*\*\*) | (33.4±12.9\*\*\*) |
| 喹那普利 | 1.0 | 211.0±41.9 | 72.0±19.0 | 88.7±21.1 | 81.9±13.2 |
|  |  |  |  | (16.7±18.2\*\*) | (2.4±32.4) |

注：1。与假手术组比较：Δ*P*<0.05，ΔΔ *P*<0.01，ΔΔΔ*P*<0.001;

2.与模型对照组比较：\*\* *P*<0.01, \*\*\* *P*<0.001；3.与等剂量喹那普利组比较：+*P*<0.05.

## 3.3 对血流动力学参数的影响

Y6052对心衰大鼠HR、BP无明显影响；TY6052 0.5、1、2 mg/kg能显著降低LVEDP. 结果见表19.

表 19 TY6052治疗2 w后对心衰大鼠血流动力学参数的影响( *x*±s, n=10～11)

剂量HR

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | (mg/kg/d) | (bpm) | (mmHg) | (mmHg) | (mmHg) | (mmHg) | (mmHg) |
| 假手术 | - | 443.3±59.0 | 114.0±9.6 | 69.1±10.1 | 86.2±10.6 | 126.7±12.6 | -4.8±3.6 |
| 模型对照 | - | 429.9±38.7 | 106.1±13.5 | 69.0±11.9 | 83.8±13.4 | 111.8±11.5Δ | 11.0±3.7ΔΔΔ |
| TY6052 | 0.5 | 415.5±42.7 | 106.6±5.7 | 62.8±13.1 | 80.9±13.9 | 112.9±9.4 | 1.9±5.0\*\*\* |
| TY6052 | 1.0 | 415.2±44.9 | 107.0±13.3 | 66.4±13.8 | 82.3±14.5 | 117.9±14.7 | 0.6±2.4\*\*\* |
| TY6052 | 2.0 | 398.9±56.2 | 99.3±8.5 | 63.1±8.7 | 77.5±7.9 | 113.2±8.2 | -0.1±3.8\*\*\* |
| 喹那普利 | 1.0 | 396.3±56.6 | 98.4±11.4 | 54.0±14.5\* | 70.5±14.4\* | 104.9±16.4 | 2.8±7.4\*\* |

组别

SAP

DAP

MAP

LVSP

LVEDP

注：1.与假手术组比较：Δ*P*<0.05，ΔΔΔ*P*<0.001；2.与模型组比较：\* *P*<0.05, \*\* *P*<0.01, \*\*\* *P*<0.001;

3.与等剂量喹那普利组比较：*P*> 0.05。

## 3.4 对心肌肥厚的影响

与假手术组比较，模型组LA、LV、RA重量明显增加，差异有显著性意义，表明心肌明显肥厚；TY6052 2 mg/kg治疗2 w后可使LA重量明显下降，1、2 mg/kg治疗2 w后均可使LV重量下降，表明对心肌肥厚有一定程度的抑制作用。TY6052 1 mg/kg与等剂量喹那普利比较无明显差异。结果见表20。

表 20 TY6052治疗2 w后对心衰大鼠心肌肥厚(mg/mm)的影响( *x*±s, n=10～11)

剂量

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | (mg/kg/d) |  | | | |
| 假手术 | - | 1.33±0.45 | 17.33±0.62 | 0.81±0.32 | 4.56±0.77 |
| 模型对照 | - | 1.95±0.34ΔΔ | 21.77±1.60ΔΔΔ | 1.19±0.33Δ | 4.89±0.66 |
| TY6052 | 0.5 | 1.83±0.29 | 20.76±2.54 | 1.15±0.21 | 4.88±0.47 |
| TY6052 | 1.0 | 1.74±0.34 | 19.92±1.71\* | 1.08±0.20 | 4.46±0.55 |
| TY6052 | 2.0 | 1.66±0.28\* | 19.30±2.17\*\* | 1.03±0.12 | 4.38±0.47 |
| 喹那普利 | 1.0 | 1.89±0.30 | 19.51±1.54\*\* | 1.10±0.24 | 4.64±0.51 |

组别LA/Tiba LV/Tiba RA/Tiba RV/Tiba

注：1.与假手术组比较：Δ*P*<0.05，ΔΔ*P*<0.01，ΔΔΔ*P*<0.001;

2.与模型对照组比较：\**P*<0.05, \*\* *P*<0.01; 3.与等剂量喹那普利组比较：*P*> 0.05.

## 3.5 对肺水肿的影响

与假手术组比较，模型组肺重量明显增加，差异有显著性意义，表明肺水肿较为严重；TY6052 2 mg/kg治疗2 w后可使肺重量明显减小，使增加的肺重量减轻69%(*P*<0.05)。结果见表21。

表 21 TY6052治疗2 w后对心衰大鼠肺水肿的影响( *x*±s)

剂量

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | (mg/kg/d) |  | (mg/mm) |
| 假手术 | - | 10 | 36.6±2.2 |
| 模型对照 | - | 11 | 43.1±4.5ΔΔΔ |
| TY6052 | 0.5 | 11 | 43.0±6.7 |
| TY6052 | 1.0 | 11 | 40.6±4.7 |
| TY6052 | 2.0 | 11 | 38.6±4.8\* |
| 喹那普利 | 1.0 | 11 | 40.4±5.1 |

组别n

Lung/Tiba

注：1.与假手术组比较：ΔΔΔ*P*<0.001；2.与模型组比较：\* *P*<0.05；

3.与等剂量喹那普利组比较：*P*> 0.05。

# 4 小结

(1) TY6052治疗2w后，0.5、1、2mg/kg使FS(%)显著升高；TY6052剂量1mg/kg治疗1w后，其作用强度优于等剂量的喹那普利（*P*<0.01），表明其可以改善慢性心衰大鼠的心功能。

(2) TY6052治疗2w后，1、2mg/kg可明显增高+LVd*p*，2mg/kg可使-LVd*p*显著改善（*P*<0.001），0.5、1、2mg/kg能显著降低LVEDP，表明其可以通过改善血流动力学达到强心目的。

(3) TY6052治疗2w后，可以改善左室内径、腔体积、收缩期左室厚壁厚度、室间隔、室壁相对厚度等彩超测定指标，表明其可以抑制心室重塑，进而改善心功能。

(4) TY6052治疗2w后，可使LV重量下降，表明其对心肌肥厚有一定程度的抑制作用。

(5) TY6052治疗2w后，可使肺重量明显减小，表明其可以改善心衰时的肺水肿。

实验四TY6052正性肌力作用机制研究

本实验通过研究TY6052对Na+/K+-ATPase、Ca2+/Mg2+-ATPase的影响，探讨其抗心衰的正性肌力作用机制。

# 1 实验材料

## **1.1** 药品及试剂

### 1.1.1 受试药

TY6052，天津药物研究院制剂技术及研究中心提供，批号0903-1。规格1 mL:5 mg，临用时用生理盐水配制成所需浓度的药液供试验用。

### 1.1.2 阳性药

去乙酰毛花苷注射液（简称西地兰），上海旭东海普药业有限公司产品，批号110302。规格2 mL:0.4 mg，临用时用生理盐水配制成所需浓度的药液供试验用。

### 1.1.3 空白溶剂

无色透明液体，天津药物研究院制剂技术及研究中心提供，批号20120217，临用时用生理盐水配制成所需浓度的药液供试验用。

### 1.1.4 试剂盒

BCA 蛋白定量试剂盒，北京盖宁金诺生物技术有限公司产品，批号PR101-01。

ATP 酶测试试剂盒（高速），南京建成生物工程研究所产品，批号20111012。

## 1.2 实验动物

Wistar 大鼠，SPF 级，北京维通利华实验动物技术有限公司提供，动物许可证号

SCXK(京) 2012-0001.

Beagle 犬，安徽省阜阳市维光实验动物中心提供，动物许可证号SCXK(皖) 12-001

号。

## 1.3 实验仪器

722 型光栅分光光度计，上海第三分析仪器厂产品。

BP310S型电子天平，德国Sartorius产品。

PK121R型低温冷冻离心机，意大利ALC公司产品。

HH-4 型数显恒温水浴锅，江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司产品。

# 2 实验方法

## 2.1 心肌细胞膜制备

参照说明书进行。

（一）试剂

试剂Ⅰ液：蔗糖0.1M，EDTA2Mm，咪唑1Mm, pH 7.4.

试剂Ⅱ液：尿素1.3M，咪唑12mM, EDTA 2mM，MgCl2·6H2O 0.1mM, (NH4) 2SO4

7.6mM，pH7.4.

试剂Ⅲ液：咪唑25mM，组氨基酸125mM, EDTA 13μM，pH6.8. 试剂Ⅲ液：咪唑25mM，组氨基酸50mM, EDTA 0.3μM，pH6.8.

（二）操作方法

1、Wistar大鼠，体重180～200 g，大鼠击昏头部，迅速开胸，迅速摘取心脏；beagle犬，3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)静注麻醉，放血处死，取心脏。将心脏放入冰冷的生理盐水中洗净血液，滤纸吸干水分。

2、10%匀浆滤液的制备：取左心室前壁心肌，去掉心内、外膜，称重（1克左右），加入9 倍的Ⅰ液，在冰浴中剪碎，匀浆，二层纱布过滤。

3、将滤液以10000转/分离心20分钟。

4、在沉淀物及心肌细胞膜中加入5mL试剂Ⅰ洗两次（每次均需以10000转/分，离心20分钟）。

5、在沉淀物心肌细胞膜中加入10mL试剂Ⅱ混匀后于0℃放置48小时。

6、将沉淀物混悬液以10000转/分离心20分钟，然后将沉淀物用试剂Ⅲ洗两次。

7、将沉淀物即心肌细胞膜悬于约10mL试剂Ⅳ中，置0℃中保存，于48小时内测

ATP酶活性。

## 2.2 心肌细胞膜蛋白含量测定

根据蛋白定量试剂盒说明书，将蛋白标准品按稀释为 100、250、500、750、1000

µg/mL，各取20µL加入1 mL染液，室温静置10 min，分光光度计读取595 nm处OD

值。以浓度为横坐标，吸光度为纵坐标作标准曲线。取20µL心肌细胞膜混悬液加入1 mL

染液反应后，读取595 nm处OD值，根据标准曲线求出相应蛋白浓度。

## 2.3 酶活性测定

根据ATP酶测试试剂盒说明书，测定心肌细胞膜Na+/K+-ATPase和Ca2+/Mg2+-ATPase活性。70µL心肌细胞膜混悬液（约4U）和30µL不同浓度的药液(TY6052和西地兰浓度均为10-8、3×10-8、10-7、3×10-7、10-6、3×10-6、10-5 mol/L)混合，37℃温育5 min后，加入底物等试剂，37℃反应20 min，加TCA终止反应，4000rpm，离心10 min，取上清100µL加入2 mL定磷剂45℃反应20 min，冷却至室温后用分光光度计读取660 nm 处

OD值，并计算酶活力。定义每小时每毫克蛋白分解ATP产生1μmol无机磷的量为一个

ATP酶活力单位，即μmolPi/mgprot/hour。酶活力计算公式为：



\*反应时间为10分钟，乘以6为1小时。

\*\*毫克蛋白/毫升

根据下列公式计算药物抑制率。

酶活力抑制率(%) =(1-加药酶活力/无药酶活力)×100%

# 3 实验结果

## 3.1 对Na+/K+-ATPase的影响

TY6052能明显抑制大鼠心肌细胞膜Na+/K+-ATPase活性，IC50为1.58±0.27×10-6

mol/L；阳性药西地兰IC50为2.88±0.28×10-7 mol/L; TY6052抑制大鼠Na+/K+-ATPase作用强度约为西地兰1/5. TY6052也能明显抑制犬心肌细胞膜Na+/K+-ATPase活性，IC50为1.06±0.48×10-6 mol/L；阳性药西地兰IC50为1.41±0.16×10-7 mol/L; TY6052的强度约为后者的1/7. 结果见表22～24，图8、9.

表 22 TY6052对大鼠心肌细胞膜Na+/K+-ATPase活性抑制率的影响(*x*-±*s*，n=6)

| 组别 | 浓度(mol/L) | TY6052 | 西地兰 |
| --- | --- | --- | --- |
| 正常对照 | - | 0±0 | 0±0 |
| 溶剂对照 | - | -0.88±7.46 | -1.19±3.62 |

受试药10-8 3.41±0.37 6.20±0.75\*\*\*

受试药 3×10-8 6.00±1.94 12.90±2.26\*\*\*受试药 10-7 18.75±2.47\*\*\* 24.76±3.60\*\*\*受试药 3×10-7 30.70±5.51\*\*\* 47.10±6.35\*\*\*受试药 10-6 43.38±3.38\*\*\* 78.29±2.97\*\*\*受试药 3×10-6 54.81±5.06\*\*\* 76.76±5.87\*\*\*受试药 10-5 52.30±4.78\*\*\* 77.70±6.01\*\*\*

注：与溶剂对照组比较：\*\*\**P*<0.001。



T Y 6 0 5 2

西 地 兰

8 0

7 0

6 0

5 0

抑 制 率 ( % )

4 0

3 0

2 0

1 0

0

表 23 TY6052对犬心肌细胞膜Na+/K+-ATPase活性抑制率的影响(*x*-±*s*，n=6)

| 组别 | 浓度(mol/L) | TY6052 | 西地兰 |
| --- | --- | --- | --- |
| 正常对照 | - | 0±0 | 0±0 |
| 溶剂对照 | - | -0.39±3.41 | -0.64± 7.34\*\* |

受试药10-8 2.61±1.57 7.28±2.15\*\*受试药3×10-8 10.67±3.59\*\*\* 24.10±5.17\*\*\*受试药10-7 20.95±6.25\*\*\* 39.67±5.56\*\*\*受试药3×10-7 35.28±6.71\*\*\* 65.14±3.42\*\*\*受试药10-6 47.41±8.38\*\*\* 87.67±2.08\*\*\*受试药3×10-6 61.22±8.19\*\*\* 85.37±6.67\*\*\*受试药10-5 56.99±5.7\*\*\* 85.56±5.67\*\*\*

注：与溶剂对照组比较：\*\* *P*<0.01, \*\*\* *P*<0.001.

表 24 TY6052 对大鼠和犬心肌细胞膜 Na+/K+-ATPase 抑制作用(*x*-±*s*, n=6)种系 组别 IC20(mol/L) IC30(mol/L) IC50(mol/L) 大鼠 TY6052 1.84±0.25×10-7 4.24±0.59×10-7 1.58±0.27×10-6

西地兰 5.67±0.68×10-8 1.07±0.11×10-7 2.88±0.28×10-7

犬 TY6052 1.47±0.67×10-7 3.10±0.91×10-7 1.06±0.48×10-6

西地兰 2.98±0.41×10-8 5.72±0.42×10-8 1.41±0.16×10-7



T Y 6 0 5 2

西 地 兰

9 0

8 0

7 0

6 0

抑 制 率 ( % )

5 0

4 0

3 0

2 0

1 0

0

图 9 TY6052对犬心肌细胞膜Na+/K+-ATPase的抑制作用浓度（mol/L）

## 3.2 对Ca2+/Mg2+-ATPase的影响

TY6052在受试浓度范围(10-8～3×10-6 mol/L)内对大鼠和犬Ca2+/Mg2+-ATPase活性无影响。结果见表25、26.

表 25 TY6052对大鼠心肌细胞膜Ca2+/Mg2+-ATPase活性抑制率的影响(*x*-±*s*，n=6)

| 组别 | 浓度(mol/L) | TY6052 | 米力农 |
| --- | --- | --- | --- |
| 正常对照 | - | 0±0 | 0±0 |
| 溶剂对照 | - | 1.44±6.24 | 0.44±4.94 |

受试药 10-8 0.80±10.41 3.86±7.48

受试药 3×10-8 5.05±11.98 4.72±9.25

受试药 10-7 3.65±8.00 4.78±2.38

受试药 3×10-7 5.47±7.95 7.07±9.22

受试药 10-6 3.97±11.50 9.19±6.70\*

受试药 3×10-6 2.40±10.88 7.32±4.52\*

注：与溶剂对照组比较：\* *P*<0.05。

表 26 TY6052对犬心肌细胞膜Ca2+/Mg2+-ATPase活性抑制率的影响(*x*-±*s*，n=6)

| 组别 | 浓度(mol/L) | TY6052 | 米力农 |
| --- | --- | --- | --- |
| 正常对照 | - | 0±0 | 0±0 |
| 溶剂对照 | - | 0.86±5.65 | 1.32±4.18 |

# 4 小结

受试药 10-8 1.00±4.99 3.89±1.72

受试药 3×10-8 3.14±1.93 4.23±2.29

受试药 10-7 4.70±2.11 5.65±2.13\*

受试药 3×10-7 5.73±2.79 8.85±4.52\*

受试药 10-6 5.39±2.63 9.39±3.09\*\*

受试药 3×10-6 6.03±2.57 8.93±2.94\*\*

注：与溶剂对照组比较：\* *P*<0.05, \*\* *P*<0.01.

TY6052对大鼠和犬心肌细胞膜Na+/K+-ATPase均有抑制作用，其IC50分别为

（1.58±0.27）×10−6和（1.41±0.16）×10−7mol/L，在受试剂量下(10-8～3×10-6 mol/L)对Ca2+/Mg2+-ATPase活性无明显抑制作用，表明其主要通过对Na+/K+-ATPase的抑制，增加细胞内Ca2+的量，从而增强心肌收缩力。

实验五TY6052对心肌肥厚的干预机制

心肌肥厚是心衰发病的重要诱因，预防与逆转心肌肥厚是近年来心衰治疗的重要策略。本实验通过研究TY6052对血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)诱导心肌细胞肥大的影响，通过免疫组织化学法检测心肌肥厚信号转导通路的钙调神经磷酸酶（calcineurin, CaN）表达情况，探索TY6052对心肌肥厚的干预机制。

# 1 实验材料

## 1.1 药品及试剂

### 1.1.1 受试药

TY6052，天津药物研究院制剂技术及研究中心提供，批号0903-1。规格1 mL:5 mg，临用时用生理盐水配制成所需浓度的药液供试验用。

### 1.1.2 阳性药

盐酸喹那普利（简称喹那普利），上海医药工业研究院惠赠，批号CN051。白色粉末，临用时用生理盐水配制成所需浓度的药液供试验用。

黄芪注射液，黑龙江珍宝岛药业股份有限公司产品，批号A20111007。规格10 mL:20 g 生药，临用时用生理盐水配制成所需浓度的药液供试验用。

氯沙坦钾（losartan，简称氯沙坦），北京迈劲医药科技有限公司提供，批号 20110806。

### 1.1.3 空白溶剂

无色透明液体，天津药物研究院制剂技术及研究中心提供，批号20120217，临用时用生理盐水配制成所需浓度的药液供动物给药用。

### 1.1.4 试剂及试剂盒

胰蛋白酶(Trypsin-EDTA)，美国GIBCO公司产品，批号111021。DMEM HIGH培养基，美国GIBCO公司产品，批号720593.

血管紧张素Ⅱ(hunman AngiotensinⅡ, AngⅡ)，Sigma产品，批号CAS038K5106.

BCA蛋白定量试剂盒，北京盖宁金诺生物技术有限公司产品，批号PR101-01。免疫组化试剂盒，美国ZYMED公司产品，货号SP-9001/9002。

DAB 试剂盒，北京中杉金桥公司产品，货号ZLI-9017/9018/9019，批号k115622c。

## 1.2 实验动物及细胞株

Wistar 大鼠，SPF 级，北京维通利华实验动物技术有限公司提供，动物许可证号

SCXK(京) 2012-0001.

H9C2细胞株，购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

## 1.3 实验仪器

Vivid 3 Pro彩色超声多普勒仪，美国GE公司产品。

MP150生理信号采集系统，美国BIOPAC产品。

Nikon倒置显微镜，日本Eclipe公司产品。

PK121R型低温冷冻离心机，意大利ALC公司产品。

# 2 实验方法

## 2.1 对体外培养心肌细胞肥厚的干预

### 2.1.1 H9C2 细胞株培养

参照文献进行[25]。收集密度为2×105个／mL的H9C2心肌细胞液，接种于96孔板，培养48 h后换无血清的DMEM，再培养12 h后加入不同的药物和10-6 mol/L的AngⅡ诱导心肌细胞肥大。每隔3天换液并添加相应试剂，培养6天后备测。

### 2.1.2 实验分组

实验分8组，每组重复5次。（1）正常对照组：加入培养液；（2）溶剂对照组：加入

25%乙醇和 25%丙二醇的空白溶剂；（3）模型对照组：加入空白溶剂；（4）受试药组：加入

TY6052，终浓度分别为 10-7、10-6、10-5 mol/L；（5）阳性药组加入氯沙坦，终浓度为10-6

mol/L，或加入黄芪注射液，终浓度为150 mg/mL。

### 2.1.3 心肌细胞面积及直径测定

经各种处理培养6天的心肌细胞于倒置显微镜下观察心肌细胞形态，用0.25%的胰蛋白酶适量进行消化，镜下见细胞变圆即可，将胰蛋白酶吸弃，每孔加入100µL完培终止消化，在10×200的镜下拍照。每孔随机选择4个视野，每个视野选5个细胞用病理图像分析系统测量单个心肌细胞表面积及直径。

### 2.1.4 心肌细胞总蛋白含量测定

收集各组细胞，分别制成细胞悬液，计数每皿心肌细胞数约为2×105／mL，沉淀细胞后吸弃上清，每孔加入30µL细胞裂解液，吹打细胞使心肌细胞膜溶解，10000 rpm

×10 min离心后吸取上清，用BCA法测定心肌细胞蛋白含量。

## 2.2 对心肌肥厚信号转导通路的干预

### 2.2.1 标本采集

Wistar大鼠，经冠脉结扎引起心肌梗死，约4 w后，经超声心动图检测选取32 只

FS下降超过30%的慢性心衰大鼠。按FS随机分成4组，每组8只，另取8只假手术动物作正常对照，开始缓慢静脉给药，每日1次，连续2 w；给药体积均为1.0 mL/kg。假手术组和模型对照组给予空白溶剂，受试药组给予TY6052，剂量分别为0.5、1.0 mg/kg，阳性药组给予喹那普利，剂量为1.0 mg/kg。给药2 w后，动物经12%水合氯醛（360 mg/kg，

ip）麻醉，心脏用4%甲醛灌注，取左室室间隔，置4%甲醛中固定，切片。

### 2.2.2 钙调神经磷酸酶(Calcineurin，CaN)检测

采用生物素-链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶(biotin SP-HRP)法检测促肥厚相关蛋白

CaN的表达；显微镜下观察胞核呈棕黄色者为阳性细胞。显微镜下(10×40)计数3个视野，计算平均阳性细胞数占总细胞的比值。具体操作步骤按照免疫组化染色试剂盒进行：

试剂（无色液体）：3%H2O2去离子水3ml

试剂A（蓝色液体）：封闭用正常ft羊血清工作液3ml

试剂B（黄色液体）：生物素化二抗工作液（IgG/Bio）3ml

SP-9001:生物素标记ft羊抗兔IgG SP-9002:生物素标记ft羊抗小鼠IgG

试剂C（橙色液体）：辣根酶标记链酶卵白素工作液（S-A/HRP）3ml

标本染色：

1. 石蜡切片，常规脱蜡至水。

2. 3%H2O2去离子水（无色液体）孵育5~10 分钟，以消除内源性过氧化物酶活性。

PBS冲洗，3分钟×3次。

3. 滴加试剂A（蓝色液体）室温孵育10~15分钟，倾去，勿洗。

4. 滴加适当比例稀释的一抗，37℃孵育2~3小时或4℃过夜。

5. PBS 冲洗，3 分钟×3 次。

6. 滴加试剂B（黄色液体），室温或37℃孵育10~15分钟。

7. PBS 冲洗，3 分钟×3 次。

8. 滴加试剂C（橙色液体），室温或37℃孵育10~15分钟。

9. PBS冲洗，3分钟×3次。

10. 显色剂显色DAB或AEC。

11.自来水充分冲洗。

12. 用中性树脂进行封片。

# 3 实验结果

## 3.1 对血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)诱导心肌细胞肥大的影响

心肌细胞在AngⅡ作用下能诱导心肌肥大，表现为细胞蛋白含量增加，细胞直径及面积增大。TY6052 10-5 mol/L使蛋白含量增加抑制了93.5%、细胞直径及面积增大几乎完全抑制，效果与氯沙坦及黄芪注射液相当。见表27、28，图10。

表27 TY6052对肥大心肌细胞(H9C2细胞株)蛋白含量的影响(*x-*±s，n=5)

| 组别 | 浓度(mol/L) | 蛋白含量(µg/105 细胞) |
| --- | --- | --- |
| 正常对照 | - | 635.0±92.0 |
| 溶剂对照 | - | 609.0±181.0 |
| 模型对照 | - | 779.2±98.1Δ |
| TY6052 | 1×10-7 | 724.6±154.0 |
| TY6052 | 1×10-6 | 666.5±88.1 |
| TY6052 | 1×10-5 | 620.0±89.7\* |
| 氯沙坦 | 1×10-6 | 658.2±60.9\* |
| 黄芪注射液 | 150 g/L | 652.4±65.1\* |

注：1.与溶剂对照组比较，Δ*P*<0.05; 2.与模型对照组比较，\**P*<0.05。

表28 TY6052对肥大心肌细胞直径及面积的影响(*x-*±s，n=5)

| 组别 | 浓度(mol/L) | 直径(µm) | 面积(µm2) |
| --- | --- | --- | --- |
| 正常对照 | - | 18.87±1.01 | 263.84±30.69 |
| 溶剂对照 | - | 18.90±0.98 | 262.10±32.16 |
| 模型对照 | - | 20.16±0.73\* | 303.74±20.26Δ |
| TY6052 | 1×10-7 | 20.23±1.67 | 306.27±52.67 |
| TY6052 | 1×10-6 | 19.55±1.14 | 284.05±35.32 |
| TY6052 | 1×10-5 | 18.75±1.12\* | 261.00±29.57\* |
| 氯沙坦 | 1×10-6 | 18.84±0.81\* | 263.99±23.09\* |
| 黄芪注射液 | 150 g/L | 18.24±0.73\*\* | 249.2±22.09\*\* |

注：1.与溶剂对照组比较，Δ*P*<0.05; 2.与模型对照组比较，\**P*<0.05，\*\**P*<0.01。



图10 TY6052对肥大H9C2 细胞株细胞直径及表面积的影响(10×20)

### 3.3.2 对心肌肥厚信号通路信号转导因子CaN影响

TY6052 0.5、1.0mg/kg可显著降低CaN比率，与模型对照组比较，可分别下降

73.1%(*P*<0.01)、78.0%(*P*<0.001). 提示，TY6052 对促心肌肥厚信号转导通路关键因子

CaN有明显抑制，是其抗心肌肥厚的机制之一。结果见表29、图11。

表 29 TY6052对CaN的影响(*x-*±s，n=8)

| 组别 | 剂量(mg/kg/d) | CaN(%) |
| --- | --- | --- |
| 假手术 | - | 0.88±1.06 |
| 模型对照 | - | 4.28±2.02ΔΔΔ |
| TY6052 | 0.5 | 1.15±1.23\*\* |
| TY6052 | 1.0 | 0.94±0.84\*\*\* |
| 喹那普利 | 1.0 | 1.96±1.71\* |

注：1.与假手术组比较，ΔΔΔ*P*<0.001; 2.与模型对照组比较，\**P*<0.05, \*\**P*<0.01，\*\*\**P*<0.001.



图 11 TY6052抑制CaN表达的典型图例

# 4 小结

体外实验表明，TY6052 10-5 mol/L使蛋白含量增加抑制了93.5%、细胞直径及面积增大几乎完全抑制，效果与氯沙坦及黄芪注射液相当，表明其具有抑制心肌肥厚作用。免疫组化研究表明，TY6052 0.5、1.0 mg/kg可显著降低CaN表达，与模型对照组比较，其表达分别下降73.1%(*P*＜0.01)、78.0%（*P*＜0.001），提示其抗心肌肥厚机制与抑制心肌肥厚信号转导通路的重要关键因子CaN有关。

# 讨论

心肌肥厚是心衰发病的重要诱因，也是心衰的外在表征之一，心肌肥厚可引起心脏重塑，不仅导致心功能下降，而且还可引发恶性心律失常。预防与逆转心肌肥厚是近年来心衰治疗的重要策略。引起心肌肥厚的信号转导通路较为复杂，有部分靶点与心肌肥厚的治疗密切相关，其中信号分子钙调神经磷酸酶(Calcineurin, CaN)是重要的关键因子，也是一个颇有治疗潜力的靶点[26-29] (附图3)。



附图 3 心衰中的氧化应激、凋亡与心肌肥厚机制

钠钾激活的三磷酸腺苷酸酶(Na+/K+-ATPase)又叫钠泵，存在于大多数动物细胞的细胞质膜中。Na+/K+-ATPase由2～4个αβ亚基原体组成，亚基原体是由起催化作用的α亚基和起调节作用的的β亚基组成的一个低聚体。其中α亚基有α1、α2、α3、α4 亚型，有10个跨膜结构域(M1～M10)，并且氨基端和羧基端都位于细胞内，主要参与

ATP的催化，其胞外部分具有哇巴因(ouabain)的特异性结合位点；β亚基是一个分子量近60 kDa的高度糖基化质膜蛋白，有β1、β2、β3 亚型，其蛋白仅跨膜一次，氨基端在细胞内，主要参与帮助α亚基正确的折叠并从内质网转运到质膜，在质膜上稳定α亚基蛋白构型和调节α亚基的活性。此外，在某些组织如在肾小管各节段，Na+/K+-ATPase是由α 、β、γ亚基组成。γ亚基属于I型膜蛋白，它可能通过与α亚基羧基末端相互作用，调节钠钾ATP酶与ATP、钠钾离子的亲和力(见附图4)。Na+/K+-ATPase不仅是主动跨膜转运钠钾离子的载体蛋白，也是一种P2型ATP酶，通过水解ATP，释放ADP，并把 ATP 末端磷酸基团转移到该酶本身活性部位的天冬氨酸残基上，从而磷酸化自身

改变蛋白构型，实现把3个钠离子的胞外转运与2个钾离子胞内转运的偶联；同时，Na+/K+-ATPase 也是内源性洋地黄物质的受体，通过在质膜上与临近蛋白之间的相互作用，并在细胞内组装信号转导的复合物，引发信号转导的级联反应，从而介导内源性洋地黄物质增加心脏和血管的收缩性，促进正常细胞的肥大与增殖[30-32]。



附图4 Na+/K+-ATPase结构

强心甙类药物包括地高辛、哇巴因和其他类毛地黄化合物，属于强心烯羟内酯，均是源于自然界的外源性Na+/K+-ATPase抑制剂。它们均可与Na+/K+-ATPase的α亚基哇巴因特异性位点可逆性的结合，抑制Na+/K+-ATPase活性。1885年Ringer提出哺乳动物体内存在内源性洋地黄样物质(endogenous digoxin-like substances, EDLS)，以后的大量实验证明人体内确实存在 EDLS，主要包括哇巴因、二羟蟾毒二烯酸内脂(Bufalin)、海蟾蜍毒素(marinobufagenin)等（附图5），其分泌部位是肾上腺和下丘脑，胆固醇是其产生的 主要前体物质[33-34]。

近来研究表明，低浓度的 EDLS，不足以引起细胞内离子浓度的改变，却可以在体外引起正常细胞增殖或肥大。低浓度的EDLS与Na+/K+-ATPase结合后，通过活化磷脂酰肌醇-3激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)，激活蛋白激酶B(Akt, protein kinase

B，或PKB），使内皮型的一氧化氮合成酶(eNOS)磷酸化，刺激NO的生成，从而活化细胞增殖和生存的信号通路。EDLS促进ATPase与Src直接相关作用，启动Src-EGFr-ERK信号通路的活化与EDLS导致大鼠心肌和肾脏的肥大有关。EDLS抑制Na+/K+-ATPase后活化下列信号通路：（1）激活心肌细胞EGFr、Src和MAPKs的酪氨酸磷酸化。（2）EDLS抑制Na+/K+-ATPase后，引起内皮细胞膜去极化，降低细胞内Ca2+水平，现细胞内低频钙振荡，后者有利于Na+/K+-ATPase和IP3R联接，而抑制细胞凋

亡[33-34]。



附图5 EDLS与TY6052结构图

强心甙类与Na+/K+-ATPase的作用可归纳为两类，即高浓度时的心肌细胞收缩效应与低浓度时的细胞肥大效应（见附图6）。心肌细胞收缩效应由Na+/K+-ATPase抑制后细胞内Ca2+浓度升高介导，而细胞肥大效应由Src络氨酸蛋白激酶与EGFR受体信号转导通路介导。受体信号转导下游通路包括PKC、ERK、ROS、Akt等四条主要通路，这些通路最后均可通过转录因子诱导肥大相关基因的表达[33-34]。



附图 6 强心甙类信号转导通路

黄芪(Astragalus membranaceus Bge)是传统中药，始载于《神农本草经》，祖国医药认为黄芪有补气升阳、利水消肿、活血祛瘀、益气固表之功效。黄芪化学成分复杂，包括皂苷、多糖、各种氨基酸、微量元素、胆碱、β-谷甾醇、甜菜碱等。以黄芪为主要成分的黄芪注射液对病毒性心肌炎、心功能不全及脾虚湿困之肝炎有良好效果。近年来研究表明，黄芪甲苷(ASIV)是黄芪注射液的主要有效成分，不但对正常和心功能受抑制的大鼠表现出正性肌力作用，且对收缩舒张功能均有改善作用，并不增加心肌耗氧量，同时ASIV还可减轻缺氧／复氧和过氧化造成的心肌损伤、保护受病毒感染的心肌细胞、抑制心肌细胞凋亡 、减轻心肌纤维化等作用。体外培养心肌细胞研究表明，ASIV对Ang II所致心肌细胞肥大有保护作用，其机制可能与提高心肌SERCA的活力及抑制Ca2+/CaM-CaN信号通路有关[35]。而ASIV的正性肌力作用，可能是通过Na+/K+-ATPase的抑制实现，即ASIV 可能具有类洋地黄作用[36-38]。

造成心衰的原因很多，如心肌梗死、心肌病、血流动力学负荷过重、炎症等均可引起心衰。国外的流行病学研究结果显示，冠心病是慢性心衰的最常见病因，国内临床调查研究也证实了这一结果[39-40]。冠心病能造成心肌缺血，心肌梗死，最终导致心衰。心衰动物模型的制备方法很多，结扎冠脉造成心梗后心衰模型能较理想地模拟临床上冠心病后心梗最终形成心衰这一生理过程，所以本研究将此模型作为重点研究对象。可以利用心肌炎、心肌肥厚等心衰模型进行更深一步的研究。

TY6052为ASIV的改构体，其主体结构与EDLS相似，该化合物与ASIV相比，

水溶性增加。本研究通过心梗后心衰模型研究了其抗心衰作用，并对其作用机制进行了研究。对心肌梗死引起的慢性心衰大鼠，从最大正性肌力作用来看，TY6052能达到ASI、多巴胺、米力农的治疗效果，优于黄芪注射液，弱于西地兰；从相对安全指数来看，TY6052的安全性优于西地兰、米力农；TY6052用于短期治疗，即在等效剂量下连续给药三天，能显著改善心脏舒张功能，与ASI、西地兰、米力农以及黄芪注射液比较作用相似；能明显减轻肺水肿，改善呼吸症状，与ASI、西地兰、米力农以及黄芪注射液比较作用相似。

TY6052用于长期治疗，即TY6052 0.5、1、2 mg/kg给药两周，治疗后能改善其心脏功能，表现在其减少的射血分数、缩短分数、左室内压最大变化速率均有不同程度的增加，升高的左室舒张末期压有不同程度的下降；左室构型得到改善，心肌肥厚和肺水肿也得到缓解；体外Na+/K+-ATPase抑制试验表明，TY6052对Na+/K+-ATPase有抑制作用，大鼠和犬的IC50为1.58±0.27×10-6、1.06±0.48×10-6 mol/L, TY6052约为西地兰的1/7～1/5；TY6052在受试剂量下(10-8～10-5 mol/L)对Ca2+/Mg2+-ATPase活性无明显抑制作用。因此，TY6052在高浓度时，通过对Na+/K+-ATPase的抑制，增加细胞内Ca2+ 的含量，增强心肌收缩力，当TY6052浓度下降达pmol级时，对Na+/K+-ATPase具有结合作用，此时TY6052与内源性EDLS具有竞争性作用，由于TY6052对Na+/K+-ATPase抑制作用比内源性EDLS弱，此时发挥类似EDLS拮抗剂的作用，因此可能会通过抑制PKC、MEK、ROS、Akt等某一或几条通路抑制心肌肥厚。本研究TY6052通过抑制心肌重塑信号通路中关键信号因子 CaN，发挥抗心肌肥厚作用。

本研究结果显示，TY6052具有确切心衰治疗作用，通过Na+/K+-ATPase抑制发挥即时作用、而通过抗心肌肥厚等作用发挥远期效果，这与传统洋地黄类药物不同，同时与已知洋地黄类强心药的强心效应比较，TY6052在所用剂量范围内对心脏几无毒性，不增加心率，不导致心律失常，治疗窗较宽，应用安全。因此，TY6052能有效治疗慢性心衰。

参考文献

[[1] Guo Y](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Guo%20Y%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23597295), [Lip GY](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Lip%20GY%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23597295), [Banerjee A](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Banerjee%20A%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23597295). Heart failure in East Asia [J]. [Curr Cardiol Rev](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23597295), 2013 Apr 15. [Epub ahead of print].

[[2] Abraham WT](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Abraham%20WT%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23229137), [Smith SA](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Smith%20SA%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23229137). Devies in the management of advanced, chronic heart failure [J]. Nat Rev Cardiol, 2013, 10(2): 98-110.

[3] Hőgye M, ForsterT. Chronic heart failure with impaired left ventricular function (systolic heart failure) [J]. Orv Hetil. 2012, 153(51): 2021-2029.

[4]顾东风，黄广勇，何江，等. 中国心力衰竭流行病学调查及其患病率[J]. 中华心血管病杂志, 2003, 31(1)：3-6.

[5] Anne Garnier, Joffrey Zoll, Dominique Fortin, et al. Control by Circulating Factors of Mitochondrial Function and Transcription Cascade in Heart Failure A Role for Endothelin-1 and Angiotensin Ⅱ[J]. Circ Heart Fail, 2009, 2(4): 342-350.

[6] Arihiro Sumida, Mitsuru Horiba, Hisaaki Ishiguro, et al. Midkine gene transfer after myocardial infarction in rats prevents remodeling and ameliorates cardiac dysfunction [J]. Cardiovascular Research, 2010, 86(1): 113-121.

[7] Das M. Apoptosis as a therapeutic target in heart failure [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007, 293(3): H1322-H1323.

[8]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. 慢性心力衰竭诊断治疗指南[J]. 中华心血管病杂志, 2007, 35(12)：1076-1095.

[9]戴闺柱. 慢性心力衰竭治疗指南的演变—各国指南的亮点[J]. 中国医学前沿杂志

(电子版), 2010, 2(1): 26-28.

[10]姚德金. 黄芪注射液在改善慢性心力衰竭患者心功能指标中的效果观察[J]. 中国现代药物应用, 2012, 6(19)：58-59.

[11]刘爱明. 黄芪注射液治疗慢性心功能不全临床分析[J]. 社区中医药, 2012, 14(25)：199。

[12]周勇. 黄芪注射液治疗老年慢性充血性心力衰竭的疗效研究[J]. 时珍国医国药，

2012, 23(11): 2915-2916.

[13]魏海东. 黄芪注射液治疗慢性心功能不全研究概况[J]. 中国实用医药, 2012, 7(10)：171。

[14]王玉敏，马琰岩，高俊虹，等. 黄芪总提物及其有效成分改善阿霉素致心衰的研究

[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(7): 208-211.

[15]陈颖丽，李伟，付萍，等. 黄芪皂苷注射液对戊巴比妥钠所致心衰犬心脏舒缩功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(11)：79-81.

[16]李伟，陈颖丽，付萍，等. 黄芪皂苷注射液对心得安诱发心衰犬心脏舒缩功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(12)：81-79.

[17]李荣，张琴，易岂建. 卡维地洛和黄芪对心力衰竭兰尼碱受体的作用[J]. 2011, 49 (6): 433-438.

[18]杨庆有，陆曙，孙慧茹. 黄芪对慢性心力衰竭患者心功能与血清肿瘤坏死因子水平的影响[J]. 2010, 30(7): 699-701.

[19]关凤英. 黄芪甲苷对心肌缺血再灌注损伤的保护作用及机制研究[D]. 吉林：吉林大学, 2007, 20-73.

[20]罗海明，戴瑞鸿，李勇，等. 黄芪有效成分治疗充血性心力衰竭的核心脏病学研究

[J]. 中国中西医结合杂志, 1995, 15(12): 707-709.

[21] Oie E, Bjørnerheim R, Clausen OP, et al. Cyclosporine A inhibits cardiac hypertrophy and enhances cardiac dysfunction during post infarction failure in rats [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2000, 278(6): H2115-H2123.

[22] Zhao ZY, Wang WT, Wang F, et al. Effects of Astragaloside IV on heart failure in rats [J]. Chinese Herbal Medicines, 2010, 2(1): 48-53.

[23] Sebastian Holinski, Fabian Knebel, Georg Heinze, et al. Noninvasive monitoring of cardiac function in a chronic ischemic heart failure model in the rat: Assessment with tissue Doppler and non-Doppler 2D strain echocardiography [J]. Cardiovasc Ultrasound. 2011 May 26; 9: 15. doi: 10.1186/1476-7120-9-15.

[24] Tønnessen T, Christensen G, Oie E, et al. Increased cardiac expression of endothelin-1 mRNA in ischemic heart failure in rats [J]. Cardiovasc Res, 1997, 33(3): 601-610.

[25] Qin TC, Chen L, Yu LX, et al. Inhibitory effect of quercetin on cultured neonatal rat cardiomyocytes hypertrophy induced by angiotensin II [J]. Acta Pharmacol Sin, 2001, 22(12): 1103-1106.

[[26] Fiedler B](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&amp;Cmd=Search&amp;Term=%22Fiedler%20B%22%5BAuthor%5D&amp;itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DiscoveryPanel.Pubmed_RVAbstractPlus), [Wollert KC](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&amp;Cmd=Search&amp;Term=%22Wollert%20KC%22%5BAuthor%5D&amp;itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DiscoveryPanel.Pubmed_RVAbstractPlus). Interference of antihypertrophic molecules and signaling pathways with the Ca2+-calcineurin-NFAT cascade in cardiac myocytes [J]. Cardiov asc Res, 2004, 63(3): 450-457.

[27] Macdonnell SM, Weisserr-Thomas J, Kubo H, et al. CaMKII negatively regulates calcineurin-NFAT signaling in cardiac myocytes [J]. Circ Res, 2009, 105(4): 316-325.

[28] Hallhuber M, Burkard N, Wu R, et al. Inhibition of nuclear import of calcineurin prevents myocardial hypertrophy [J]. Circ Res, 2006, 99(6): 626-635.

[29] Vegs RB, Rothermel BA, Weinheimer CJ, et al. Dual roles of modulatory calcineurin-interacting protein 1 in cardiac hypertrophy[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(2): 669-674.

[30]文玉杰，李晓玫. 钠钾ATP酶的信号转导功能新进展[J]. 生理科学进展, 2005, 36

(2): 159-162.

[31] Xie Z, Askari A. Na+/K+-ATPase as a signal transducer [J]. Eur J Biochem, 2002, 269 (10): 2434-2439.

[32]雷蕾，胡节惠. 内洋地黄素的双重作用与心血管重塑[J]. 国际心血管病杂志, 2007，

34(6): 418-421.

[33] Bagrov AY, Shapiro JI, Fedorova OV. Endogenous cardiotonic steroids: physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets[J]. Pharmacol Rev, 2009, 61(1):9-38.

[34] Schoner W, Scheiner-Bobis G. Endogenous and exogenous cardiac glycosides: their roles in hypertension, salt metabolism, and cell growth [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2007, 293(2): C509-C536.

[35]沈利亚. 黄芪对高血压左室肥厚和左室功能作用的研究进展[J]. 中国医院药学，

2010, 30 (7): 596-597.

[36]王奇玲，李云义，齐辉，等. 黄芪皂苷对离体工作心脏的肌力作用及其可能机制[J].

中国中药杂志, 1992,17(9): 557-559.

[37]刘建勋，马晓斌，王杨慧，等. 黄芪注射液对离体大鼠心脏功能及Na+-K+交换ATP酶活性的影响[J]. 中国新药与临床杂志, 1999, 18(6)：370-372.

[38]伍伟培. 黄芪有效成分黄芪苷IV强心作用研究[J]. 中药材, 2005, 28(7): 591-592.

[39]马金萍，王林，党群，等. 慢性心力衰竭住院病例药物治疗的回顾性调查[J]. 中华流行病学杂志, 2007, 28(1)：78-82.

[40]童建军，柏建中. 307例慢性心力衰竭病因分析[J]. 承德医学院学报, 2010, 27(4): 383-384.

# 攻读学位期间发表论文情况

[1]罗文继，徐向伟，王维亭，梁艳，张丹丹．天麻钩藤复方提取物对Beagle犬血流动力学的影响[J]. 中草药, 2011, 42(11)：2287-2291.

[2] 张丹丹, 王维亭, 赵专友. 蛇毒类抗血栓蛋白酶的研究进展[J]. 现代药物与临床, 2012, 27(4): 409-413.

[3]张丹丹，王维亭，赵专友，汤立达. 他司曲洛(ASId)对实验性大鼠心衰模型的改善研究[J]. 现代药物与临床, 2013, 28(3)：315-320.