

太空养心丸对模拟失重大鼠心血管功能的影响

尤金枝¹, 范雪梅², 王义明^{1,2*}, 梁琼麟², 罗国安^{1,2}, 李勇枝³

(1. 广东药科大学中药学院, 广东 广州 510006; 2. 清华大学化学系, 北京 100084; 3. 中国航天员科研训练中心, 北京 100094)

摘要: **目的** 考察在地面模拟太空舱环境内, 太空养心丸对模拟失重模型大鼠心血管功能的影响。**方法** 在地面模拟太空舱环境内建立尾吊失重模型大鼠, 太空养心丸低、高剂量给药 28 d, 另设舱外、舱内对照组作为对照。每周观察大鼠活动状态, 并测定饮食量和体质量。实验结束测定心、肝、肾功能相关血清指标, 并进行心脏超声检测。**结果** 与舱外对照组比较, 舱内对照组大鼠饮食量增加, 谷丙转氨酶 (ALT)、乳酸脱氢酶 (LDH) 水平上调 ($P<0.05$); 造模后大鼠体质量增长速率、脑钠肽 (BNP) 水平均下调 ($P<0.05$, $P<0.01$), 尿素 (UREA)、LDH、超氧化物歧化酶 (SOD) 水平上调 ($P<0.05$, $P<0.01$), 左心室舒张末期容积 (LVEDV)、左心室收缩末期容积 (LVESV)、每搏输出量 (SV)、心输出量 (CO) 指标降低 ($P<0.05$, $P<0.01$); 太空养心丸干预组大鼠 UREA、肌酐 (CREA)、肌酸激酶 (CK)、肌酸激酶同工酶 (CK-MB)、SOD、总抗氧化能力 (T-AOC) 水平下调 ($P<0.05$, $P<0.01$), BNP 水平则上调 ($P<0.01$)。**结论** 模拟太空舱环境及模拟失重均对大鼠心血管系统、肝肾功能存在影响, 模拟失重的影响更为显著, 太空养心丸给药能够有效改善模型大鼠心血管功能异常, 并保护肝、肾功能。

关键词: 太空养心丸; 模拟失重; 地面模拟太空舱环境; 心血管系统

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2021)04-1041-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.04.041

随着现代航天事业的蓬勃发展, 伴随而来的是对宇航员健康的维护问题。已有研究发现, 经中医理论指导组方而成的太空养心丸能够有效缓解“太空病”, 且已被运用于航天过程。但是现有太空养心丸的药理药效研究中, 研究者采用后肢去负荷法、头低位法等建立动物模型模拟失重效应。后肢去负荷法能够模拟航天员在太空时机体发生的改变, 比如对心血管系统、免疫系统、肌肉骨骼等的影响^[1], 且存在可实现以较小的代价及时调整实验方案和多次重复实验、可在实验过程中随时麻醉取材等优势^[2], 但单纯的后肢去负荷法只模拟了失重状态, 却忽略了空间环境的压强、噪音、温湿度等影响因素, 从而导致了模型研究的限制性。针对此问题, 本研究在地面模拟太空舱环境内采用尾吊法建立大鼠模拟失重模型, 即在传统的单纯模拟失重基础上增加空间环境模拟, 使模型更接近真实的航天环境。借助该模型研究太空养心丸对模型大鼠心血管系统功能的影响, 可更真实、合理地评价该方药效。

1 材料

1.1 动物 60 只健康雄性成年 SD 大鼠, 8~10 周龄, 体质量 (200±20) g, SPF 级环境饲养, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物生产许可证号 11400700313178。本实验经中国航天员中心伦理委员会审定 (伦理号 ACC-

IACUC-2018-005)。

1.2 药物 太空养心丸由中国航天员科研训练中心研制, 由北京勃然制药有限公司生产, 批号 170603, 规格 6 g/袋。

1.3 试剂 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na, 北京索莱宝科技有限公司, 批号 521K022); 生理盐水 (0.9% NaCl, 石家庄四药有限公司, 批号 1805101907); 大鼠心钠肽 (Atrial natriuretic peptide, ANP) ELISA 试剂盒 (批号 20180620)、大鼠脑钠肽 (Brain natriuretic peptide, BNP) ELISA 试剂盒 (批号 20180620)、大鼠内皮素-1 (Endothelin-1, ET-1) ELISA 试剂盒 (批号 20180620)、大鼠去甲肾上腺素 (Nor-epinephrine, NE) ELISA 试剂盒 (批号 20180620)、大鼠超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD) 试剂盒 (批号 20180612)、大鼠总抗氧化能力 (Total antioxidant capacity, T-AOC) 试剂盒 (批号 20180612) 均购自南京建成生物工程研究所。

1.4 仪器 模拟太空舱 (中国航天员科研训练中心提供并维护运行); 大鼠吊尾饲养笼 (中国航天员科研训练中心提供); MIKRO 22R 高速冷冻离心机 (德国 Hettich 公司); arium® pro 超纯水系统 (德国赛多利斯公司); 2 000 g/0.01 g 电子天平 (杭州万特衡器公司); LC-MSH-Pro 磁力搅拌器 (上海力辰科技公司); XP205 十万分之一分析天

收稿日期: 2019-08-16

基金项目: 1226 重大基金资助 (AWS16J018); 国家重点研发计划项目 (2017YFC1700801)

作者简介: 尤金枝 (1995—), 女, 硕士生, 从事中药分析研究。Tel: 18351238676, E-mail: 18351238676@163.com

* **通信作者:** 王义明 (1945—), 女, 教授, 从事中医药系统生物学研究。Tel: (010) 62781688, E-mail: wangyim@mail. tsinghua.edu.cn

平(瑞士Mettler-Toledo公司); ELx800吸收光酶标仪(美国BioTek公司); IX71倒置荧光显微镜(日本奥林巴斯公司); Vero[®] 2100小动物超声成像平台(中国维胜有限公司)。

2 方法

2.1 模型建立、分组及给药 大鼠适应性培养1周后,随机分为舱外对照组(舱外正常饲养)、舱内对照组(舱内正常饲养)、模型组(舱内饲养+失重模型)、低剂量给药组(舱内饲养+失重模型+太空养心丸低剂量给药)、高剂量给药组(舱内饲养+失重模型+太空养心丸高剂量给药),每组12只,造模的同时给予太空养心丸给药28 d。模型组与给药组的模拟失重大鼠模型采用尾吊法建立^[3],将大鼠尾部吊到横梁上(用胶布缠绕尾部并固定于吊环上,调节高度使大鼠身体倾斜30°左右),后肢不可着地,前肢可360°范围自由活动。太空养心丸研磨成粉,用0.5% CMC-Na溶液混悬,每日灌胃给药1次,低剂量(1.5 g/kg)给药量相当于人临床用量,高剂量(3.0 g/kg)给药量相当于2倍人临床用量;模型组和对照组每天按体质量灌胃给等体积的0.5% CMC-Na溶液。

2.2 一般状态观察 每周观察大鼠的一般状态、自主活动,测定体质量、饮水量变化。

2.3 血清样本收集及指标检测 给药28 d后收集大鼠血清,测定指标。生化指标委托清华大学校医院检验科检测,其中包括反应肾功能的重要指标:尿素(UREA)、肌酐(CREA);急性肝细胞损伤的敏感标志:谷丙转氨酶(Alanine transaminase, ALT)、谷草转氨酶(Aspartate aminotransferase, AST);心肌疾病相关指标:乳酸脱氢酶(Lactate dehydrogenase, LDH)、肌酸激酶(Creatine kinase, CK)、肌酸激酶同工酶(Creatine kinase isoenzymes, CK-MB)和C-反应蛋白(C-reactive protein, CRP)。心血管系统相关指标 ANP、BNP、ET-1 和 NE 使用酶联免疫法按照试剂盒说明书进行检测;SOD 使用羟胺法按照试剂盒说明书进行检测;T-AOC 使用 ABTS 法按照试剂盒说明书进行检测。

2.4 心脏超声检测 给药28 d后对大鼠(每组各6只)进行心脏超声检测,根据LVM型图像依此测量:左心室舒张末期内径(Left ventricular end-diastolic dimension, LVEDD)、左心室舒张末期后壁厚度(Left ventricular end-diastolic posterior wall thickness, LVEDPWT)、左心室收缩末期内径(Left ventricular end-systolic dimension, LVESD)、左心室收缩末期后壁厚度(Left ventricular end-systolic posterior wall thickness, LVESPWT)、左心室舒张末期前壁厚度(Left ventricular end-diastolic anterior wall thickness, LVEDAWT)、左心室收缩末期前壁厚度(Left ventricular end-systolic anterior wall thickness, LVESAWT)。所有测量数值均为连续3个心动周期的平均值。由Visual Sonics系统计算以下指标:左心室舒张末期容积(Left ventricular end-diastolic volume, LVEDV)、左心室收缩末期容积(Left ventricular end-

systolic volume, LVESV)、左心室射血分数(Left ventricular ejection fraction, LVEF)、左心室短轴缩短率(Left ventricular fractional shortening, LVFS)。由Aortic Valve模式依次测量每搏输出量(Stroke volume, SV)、心输出量(Cardiac output, CO)。

2.5 统计学方法 采用IBM SPSS Statistics 21软件进行统计分析,数据均用($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较,方差不齐时采用Dunnett's T3,方差不齐时采用LSD检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠一般状态观察结果

3.1.1 大鼠前自主活动与精神状态 舱内、舱外对照组大鼠状态基本一致,饮食、排泄正常,体质量增长较快,情绪稳定,毛发有光泽;模型组大鼠尾部充血肿胀,少部分存在腐烂情况,消瘦,毛色泛黄且掉毛,情绪焦躁;低剂量给药组大鼠尾部充血肿胀,消瘦,情绪温和,活动力强;高剂量给药组大鼠尾部充血肿胀,消瘦,精神较萎靡。由此可见,模拟太空舱环境对大鼠表观状态并无显著影响,而尾吊模型则对大鼠状态影响较大,除了尾吊时间过长导致的尾部充血、溃烂现象^[2],还会由于造模后的去负荷状态导致其产生情绪焦躁、毛发光泽度降低且掉毛、消瘦等明显变化。太空养心丸低剂量给药后能够有效增强大鼠活动力,缓解其情绪,但继续增高给药剂量并没有明显的改善。

3.1.2 饮水量及体质量变化 每周测得的各组大鼠饮水量、体质量增长值变化无组内差异,因此计算4次所测各组数据的平均值,见表1。相较于舱外对照组,舱内对照组大鼠平均饮水量虽然增加($P < 0.05$),但其体质量变化并不明显($P > 0.05$);模型组大鼠饮水量减少,体质量增加速度减缓($P < 0.01$);给药组大鼠饮水量进一步减少($P < 0.05$),体质量增加更为缓慢($P < 0.01$),其中高剂量给药组大鼠饮水量($P < 0.05$)、体质量增长值($P < 0.01$)较之低剂量组更小。结果显示,模拟太空舱内微重力环境可能增加大鼠能量消耗,致其饮水量增加;失重模型下的大鼠由于体位的变化,在一定程度上阻碍了进食;在此基础上再进行太空养心丸给药,尤其是高剂量给药组,药液的浓度与口感等都会影响大鼠的食欲,进而抑制体质量增长,致其消瘦。

表1 各组大鼠平均饮水量及体质量增长值($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	饮水量/g	体质量增长值/g
舱外对照组	22.00±0.82	164.00±43.26
舱内对照组	24.75±1.71 [#]	174.00±25.34
模型组	22.50±1.29	115.00±14.04 ^{**}
低剂量给药组	21.50±1.29 [*]	95.00±14.01 ^{ΔΔ}
高剂量给药组	19.50±1.91 ^Δ	64.00±22.16 ^{ΔΔ}

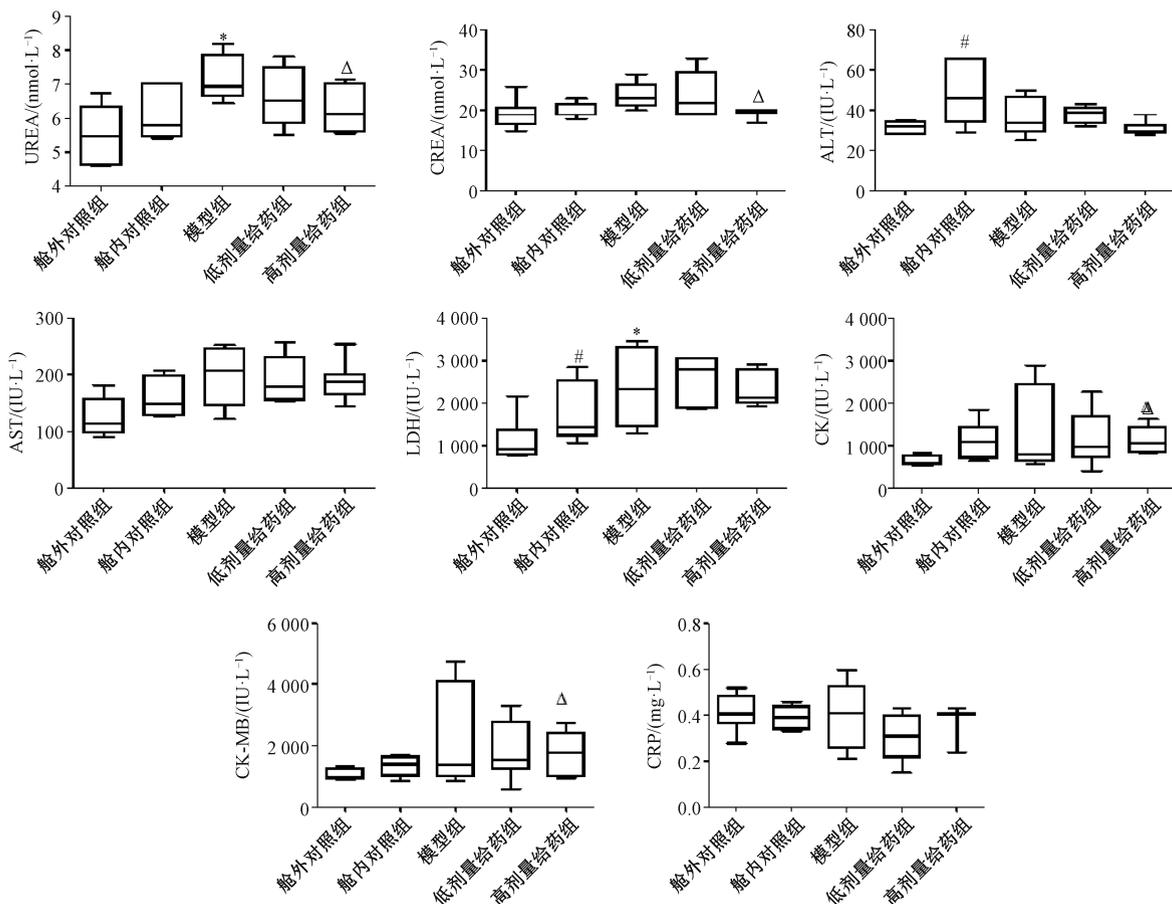
注:与舱外对照组比较,[#] $P < 0.05$;与舱内对照组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$;与模型组比较,^Δ $P < 0.05$,^{ΔΔ} $P < 0.01$ 。

3.2 大鼠血清指标测定结果

3.2.1 生化指标 实验28 d后,大鼠生化指标如图1所示。模拟太空舱内大鼠的ALT、LDH这2个指标的水平上

调 ($P < 0.05$), 即模拟太空舱环境对大鼠的肝功能、心脏功能存在一定影响; 模型组 UREA、LDH 水平上调 ($P < 0.05$), 提示尾吊模型对大鼠肾功能、心脏功能有明显的损伤; 太空养心丸给药后下调了 UREA、CREA、CK、CK-

MB 这 4 个指标的水平 ($P < 0.05$), 其中 CK、CK-MB 的显著变化已被证明是心肌缺血的敏感标志, 对急性心肌梗死有诊断价值, 说明太空养心丸给药可改善模型大鼠对心脏功能的影响, 同时还可改善肾功能。



注: 与舱外对照组比较, # $P < 0.05$; 与舱内对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

图 1 各组大鼠生化指标测定结果 (n=6)

3.2.2 心血管系统指标的变化情况 如图 2 所示, 模拟太空舱环境中正常大鼠心血管系统指标 ANP、NE 的水平虽有一定上调, 但变化无统计学意义 ($P > 0.05$); 模型组大鼠 SOD 水平上调 ($P < 0.01$), BNP 水平下调 ($P < 0.05$); 太空养心丸给药后下调了 SOD、T-AOC 水平 ($P < 0.01$), 上调了 BNP 水平 ($P < 0.01$), 同时调节 ANP 等指标的水平至正常状态。结果显示, 太空养心丸给药能够有效改善模拟失重大鼠心血管功能异常, 并缓解模型大鼠体内氧化应激状态。

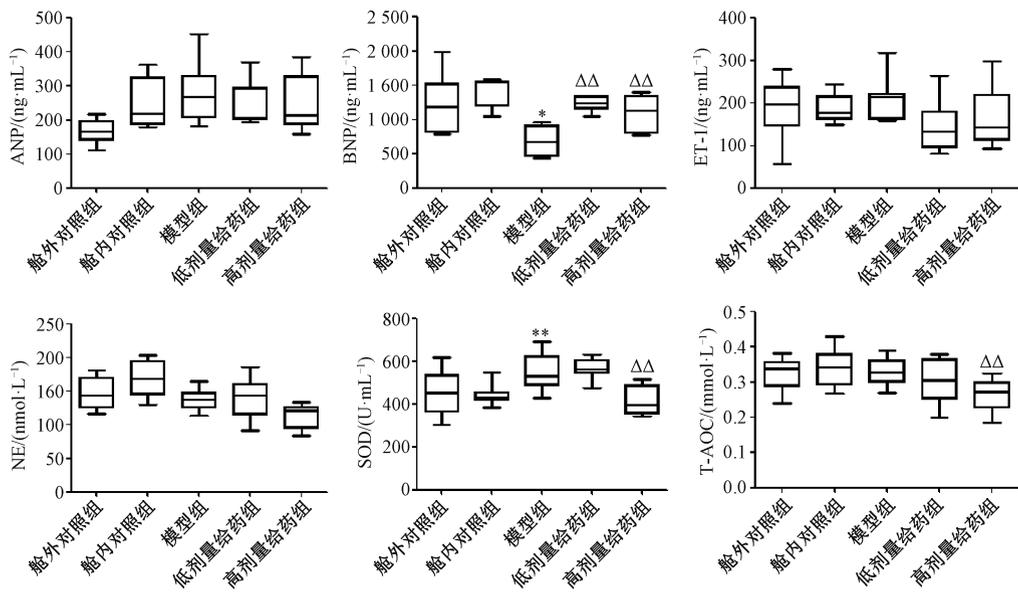
3.3 太空养心丸对模拟失重大鼠心脏功能的调节作用 LVEDV 水平反应心脏前负荷, 在一定范围内前负荷增加则代表心肌收缩力加强; LVEF 表示左心室收缩时的射血功能, 是 SV 与 LVEDV 的百分比, 心脏在正常工作范围内活动时, SV 始终与 LVEDV 相适应; LVFS 表示心肌的收缩功能, 在无其余病理现象存在的前提下, 其指标变化基本与 LVEF 一致; CO、SV 是衡量心脏射血功能的强弱与是否正常的指标。从图 3 来看, 模拟太空舱内的环境并不会抑制大鼠心肌收缩力、心脏射血功能; 尾吊模型下大鼠的心肌

收缩力与心脏射血功能则受到了抑制 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 同时 LVEF、LVFS 数值出现应激性上调, 显示微重力对心脏功能的影响更为直观, 是危害健康的重要因素之一。在此基础上进行太空养心丸给药, 低剂量组对模型组大鼠心脏功能有明显的改善作用, 尤其是 LVEDV 和 LVESV 水平在低剂量给药组与对照组间比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

4 讨论

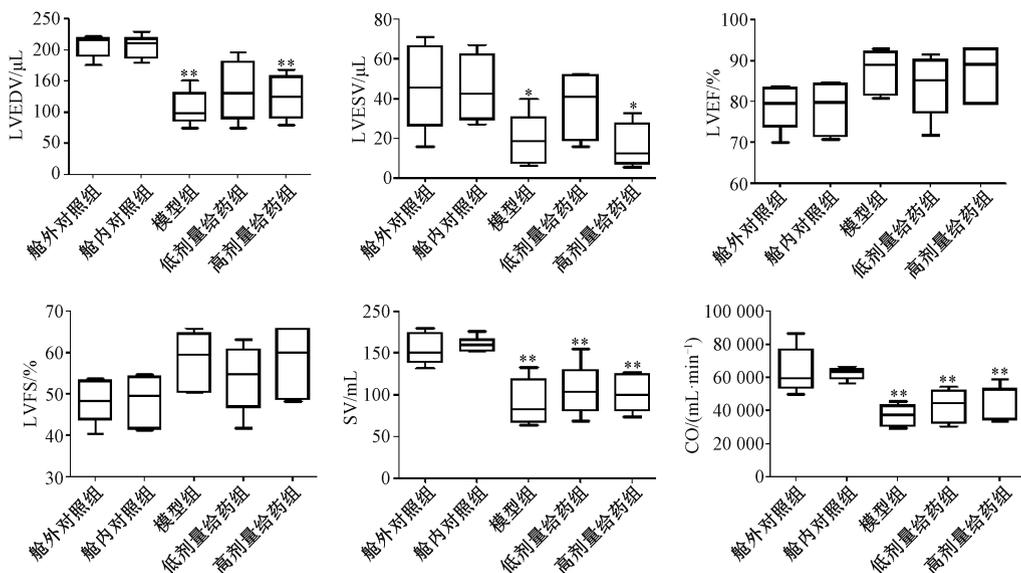
心血管系统作为失重效应下重要的靶器官之一, 其功能紊乱对航天工作中的宇航员影响极大^[4-5]。为了有效缓解微重力导致的心血管功能紊乱, 除了必要的体育锻炼措施^[6]、物理防护外^[7], 药物干预也必不可少^[8-9]。

中药复方太空养心丸是一种专门针对宇航员的中药复方, 在益气养心、补肾活血的基础上进行组方遣药, 主要成分包括人参、陈皮、山楂、五加皮以及动物的骨头粉等。在以往研究中研究者已分别借助大鼠尾吊模型、人体头低位模型验证了该方对失重模型心血管系统及心肺功能的调节、改善作用^[3,10], 但是皆未考虑到太空环境存在的特殊影响。



注：与舱内对照组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；与模型组比较， $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

图2 各组大鼠心血管系统相关指标测定结果 ($n = 12$)



注：与舱内对照组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

图3 各实验组大鼠心功能超声结果 ($n = 6$)

本次研究结合模拟太空舱与尾吊模型对太空微重力环境进行模拟，在模拟太空舱环境内建立了大鼠失重模型，更真实地模拟航天工作环境，考察此环境下饲养大鼠心血管系统的异常变化，并借此评价太空养心丸药效。实验结果表明，模拟太空舱环境内对照组大鼠饮食量显著增加，而分别作为急性肝细胞损伤、心梗敏感标志物的 ALT、LDH 水平上调，说明在模拟太空舱环境下大鼠体能可能消耗较大，且肝脏、心脏功能会受到较明显的影响。模型组大鼠饮食量、体质量增长率下调，UREA、LDH 水平上调，同时超声指标 LVEDV、LVESV、SV、CO 的水平下调，提示造模可能会对心脏收缩、供血等功能产生较严重的损伤。以上结果与已有研究结果一致，比如目前航天过程中氧化

应激水平的紊乱现象较为普遍，研究发现这可能与肾功能减弱存在一定联系^[11]；动物实验中检测到尾吊模型大鼠血清 LDH 水平升高，证实模拟微重力会增加心肌对缺血-再灌注损伤的易感性^[12]；更有实验发现失重后心脏超声各指标出现明显变化，即模拟失重会在一定程度上引起大鼠心功能下降^[3,13]。但是本次研究中发现模型组大鼠 BNP 水平下调，这与此前同样以尾吊模型评价所得结果存在差异^[14]；同时模型组大鼠的 SOD 水平却有上调，而在普遍的研究中，心脏受损时通常伴随着氧自由基大量产生，SOD 活性下降^[15]，据此提示太空舱环境、失重时间等因素的叠加可能对此二指标有特殊影响，具体情况还有待结合系统生物学进一步研究。对模拟失重大鼠进行太空养心丸给药，下

调了 UREA、CREA、CK、CK-MB、SOD、T-AOC 的水平,提示在一定程度上给药可以缓解大鼠的应激状态,改善心血管系统功能紊乱状态,同时增强心脏功能。同时,相较于高剂量而言,低剂量给药对各指标的调节更接近正常水平,再结合大鼠精神状态、自主活动等,可证实低剂量(即临床剂量)给药更为合理,为临床剂量有效性提供实验证据。

综上所述,本研究通过观察各组大鼠自主活动与精神状态、检测血清指标、心脏超声的方法对太空养心丸药效进行评价,初步探索了太空养心丸给药对模拟失重大鼠心血管系统的调节作用。后期可进一步从基因、蛋白质、代谢物水平探索太空舱内模拟失重模型对大鼠心血管系统的影响及太空养心丸给药的具体作用机制。

参考文献:

[1] Globus R K, Morey-Holton E. Hindlimb unloading: rodent analog for microgravity[J]. *J Appl Physiol*, 2016, 120(10): 1196-1206.

[2] 付子豪,王臻,吴洁,等.改良的大鼠模拟失重模型制备方法[J].*中国应用生理学杂志*,2019,35(02):189-192+6.

[3] 范全春,李勇枝,高建义,等.太空养心丸对模拟失重大鼠心血管系统的调节作用[J].*载人航天*,2013,19(1):64-70.

[4] Richard L H, Alexander H, Marco D. Heart in space: effect of the extraterrestrial environment on the cardiovascular system[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2018, 15(3): 167-180.

[5] Pastushkova L H, Rusanov V B, Goncharova A G, et al. Urine proteome changes associated with autonomic regulation of heart rate in cosmonauts [J]. *Bmc Syst Biol*, 2019, 13 (Suppl 1): 17.

[6] 刘炳坤,祝郁,李志利,等.30天-6°头低位卧床对男性有氧运动能力的影响及其防护策略[J].*航天医学与医学工程*,2014,27(4):235-240.

[7] 王林杰,曲丽娜,李英贤,等.我国失重生理学研究进展与展望[J].*航天医学与医学工程*,2018,31(2):131-139.

[8] Wang R, Diao Y, Kuang W, et al. Salvianolic acid B alleviate the osteoblast activity decreasing under simulated microgravity by Keap1/Nrf2/ARE signaling pathway[J]. *J Funct Foods*, 2018 (46): 288-294.

[9] Sun H Y, Ling S K, Zhao D S, et al. Panax quinquefolium saponin attenuates cardiac remodeling induced by simulated microgravity[J]. *Phytomedicine*, 2019(56): 83-93.

[10] Shi H, Li Y, Tang Z, et al. Impact of 60 days of 6° head down bed rest on cardiopulmonary function, and the effects of Taikong Yangxin Prescription as a countermeasure [J]. *Chin J Integr Med*, 2014, 20(9): 654-660.

[11] Paraskevi P, Evangelia D, Stefanos R, et al. Oxidative Stress and the Kidney in the Space Environment[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(10): 1-17.

[12] Lu Y M, Jiao B, Lee J, et al. Simulated microgravity increases myocardial susceptibility to ischemia-reperfusion injury via a deficiency of AMP-activated protein kinase[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2017, 95(1): 59-71.

[13] Martin D S, South D A, Wood M L, et al. Comparison of echocardiographic changes after short- and long-duration spaceflight[J]. *Aviat Space Envir Md*, 2002, 73(6): 532-536.

[14] Bradley J B, David C Z, Anatoliy A G, et al. Diminished mesenteric vaso- and venoconstriction and elevated plasma ANP and BNP with simulated microgravity[J]. *J Appl Physiol*, 2008, 104(5): 1273-1280.

[15] 薛丽娟,张文龙,李灵芝.白藜芦醇苷对心脏缺血再灌注损伤大鼠的保护作用[J].*中成药*,2019,41(2):451-453.