

冠状动脉结扎(孙络疏失)模型大鼠血浆内皮细胞活性因子及微血管舒缩因子的动态变化研究

张俊修 霍旺 王朋 李绍旦 刘毅 杨明会

【摘要】 目的 探讨冠状动脉结扎(孙络疏失)模型大鼠血浆血管舒缩因子内皮素-1、血栓素 B_2 、6-酮-前列腺素 $F_{1\alpha}$ 、血管紧张素 II 的变化规律。**方法** 将心电图正常的 60 只雄性 SD 大鼠随机分为假手术组、造模 30 分钟组、造模 1 小时组、造模 6 小时组、造模 12 小时组、造模 24 小时组。通过结扎大鼠冠状动脉前降支的方法造成急性心肌梗死模型(“孙络疏失”模型),假手术组只穿线不结扎。放射免疫法检测血浆血管舒缩因子内皮素-1、血栓素 B_2 、6-酮-前列腺素 $F_{1\alpha}$ 、血管紧张素 II 水平。**结果** 经单因素方差分析 LSD 检验,与假手术组比较,血浆血管舒缩因子内皮素-1 水平在造模 1 小时组、造模 6 小时组、造模 12 小时组显著升高($P < 0.05$),并于 24 小时恢复正常;血浆 6-酮-前列腺素 $F_{1\alpha}$ 水平在各个模型组均显著下降($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),于 12 小时达到最低水平;血浆血栓素 B_2 水平在造模 6 小时组显著升高($P < 0.01$),而在造模 12 小时组、造模 24 小时组明显下降($P < 0.05$);血浆血管紧张素 II 在造模 30 分钟组、造模 1 小时组显著降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),于 1 小时达到最低,而造模 6 小时组、造模 12 小时组、造模 24 小时组则回升至正常水平。**结论** 微血管内皮细胞功能紊乱导致的微血管舒缩因子异常分泌、动态平衡遭到破坏,在“孙络疏失”急性期的病理变化过程中发挥重要作用。

【关键词】 孙络疏失; 心肌梗死; 内皮素-1; 血栓素 B_2 ; 6-酮-前列腺素 $F_{1\alpha}$; 血管紧张素 II; 大鼠

【中图分类号】 R542.22 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2014.02.001

Dynamic alterations of TXB_2 , 6-keto-PGF $_{1\alpha}$, ET-1 and Ang II in modeled rats with coronary artery ligation (the pattern of loosened and weakened minute collaterals in the domain of Chinese medicine): An observational study ZHANG Jun-xiu, HUO Wang, WANG Peng, et al. Traditional Chinese medicine department, People's Liberation Army General Hospital, Beijing 100853, China

Corresponding author: YANG Ming-hui, E-mail: ymh9651@sina.com

【Abstract】 Objective To explore the way how endothelin-1 (ET-1), thromboxane B_2 (TXB_2), 6-keto-prostaglandin 1α (PGF $_{1\alpha}$) and angiotensin II (Ang II) changes in modeled rats with coronary artery ligation (the pattern of loosened and weakened minute collaterals in the domain of Chinese medicine).

Methods A total of 60 male Sprague-Dawley rats with regular ECG performance were randomized into Sham-operation group, 30min-modeling group, a 1h-modeling group, a 6h-modeling group, a 12h-modeling group and a 24h-modeling group. The model of loosened and weakened minute collaterals in heart was established after ligation of the left anterior descending coronary artery, while the sham group was punctured

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划)(2012CB518601)

作者单位:100853 北京,中国人民解放军总医院中医内科学科[张俊修(硕士研究生)、霍旺(硕士研究生)、王朋(博士研究生)、李绍旦、刘毅、杨明会]

作者简介:张俊修(1988-),2012 级在读硕士研究生。研究方向:中西医结合基础。E-mail:zjx6373120@126.com

通讯作者:杨明会(1962-),博士,教授,主任医师,博士生导师,中华中医药学会副会长,解放军中医药学会会长,北京中医药学会副会长,北京市中西医结合学会副会长。研究方向:中西医结合基础与临床。E-mail:ymh9651@sina.com

without ligation. The level of plasma ET-1, TXB₂, 6-Keto-PGF_{1α} and Ang II were detected with radioimmunoassay. **Results** Compared with the sham group, the ET-1 levels in the 1h-modeling group, the 6h-modeling group and the 12h-modeling group were significantly increased ($P < 0.05$), then returned to normal states at 24h. The TXB₂ levels were obviously increased in the 6h-modeling group ($P < 0.01$), while decreased apparently at the 12h-modeling group and the 24h-modeling group ($P < 0.05$). The 6-keto-PGF_{1α} levels in all the model groups were significantly decreased ($P < 0.01$ or $P < 0.05$), then reached the lowest peak at 12h. The Ang II levels in the 30min-group and the 1h-group were obviously decreased ($P < 0.01$ or $P < 0.05$), then reached the low peak at 1h, while returned to normal level in the 6h-modeling group, the 12h-modeling group and the 24h-modeling group. **Conclusions** The abnormal expression of vasomotor activity factor accompanies with the dynamic equilibrium destruction, due to the dysfunction of microvascular endothelial cell, and it exerts an important effect during the process of pathological change in acute phase of loosened and weakened minute collaterals.

【Key words】 Decrease of minute collaterals; Myocardial ischemia; Endothelin-1; Thromboxane B₂; 6-keto-prostaglandin-Fl_α; Angiotensin II; Rat

中医的“脉”具有双重含义:既是经络系统中以运行血液为主要功能的重要组成部分,又是属于奇恒之腑的独立实体脏器。吴以岭院士提出“脉络—血管系统病”理论,确定了脉络与现代医学血液循环系统的相关性^[1],认为络气虚滞与血管内皮功能障碍是病变的基本病机,是脉络细急与血管痉挛、脉络瘀塞与血管闭塞、脉络瘀阻与动脉粥样硬化的共同病理环节^[2]。冠状动脉微循环障碍是急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)经皮冠状动脉介入治疗过程中常见的并发症,是影响冠状动脉微循环灌注的主要原因,是 AMI 患者远期预后不良和死亡率的独立预测因子^[3]。现代医学针对冠脉微循环障碍的药物治疗效果有限,课题组提出“营卫承制调平”理论,反映血管病变作为复杂性疾病在生理、病理、治疗、转归不同阶段的内在规律^[4],以期发挥中医药整体调节与多靶点的优势,在冠状动脉微循环障碍性疾病中做出一定的突破。本研究遵循课题组指导思想,通过结扎大鼠冠状动脉前降支的方法建立心肌缺血即“孙络疏失”模型,探讨血管内皮细胞活性因子及微血管舒缩因子的动态变化规律,为“脉络—血管系统病”理论和“营卫承制调平”理论认识、治疗冠状动脉微循环障碍提供理论依据。

1 实验材料

1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只,体重(220 ± 20)g,购自军事医学科学院动物中心,许可证号 SCXK-(军)2012-0004。每笼 5 只饲养于独立通气笼具系统内。温度(22 ± 1)℃,湿度(50 ± 5)%,每日明暗交替 12

小时。实验期间造模、取材等操作均在超净工作台内进行,添加饲料、换水等由专人负责管理。

1.2 主要试剂

乌拉坦(国药集团化学试剂有限公司,批号 T2011110);注射用青霉素钠(华北制药股份有限公司,批号 F3047216);血管收缩因子内皮素-1(endothelin-1, ET-1)、血栓素 B₂(thromboxane B₂, TXB₂)、6-酮-前列腺素 F_{1α}(6-keto-prostaglandin I_α, PGF_{1α})、血管紧张素 II(angiotensin II, Ang II)放射免疫试剂盒,均购自北京普尔伟业生物科技有限公司(批号 20131021)。

1.3 主要仪器

电子秤(长沙湘平科技发展有限公司, EPS-2001);小动物心电图机(北京福田电子医疗仪器有限公司, FX-211);动物呼吸机(上海奥尔科特生物科技有限公司, ALC-V9);高速离心机(Perkin Elmer VICTOR X5);超净工作台(北京长城空气净化工程公司);SN-697B 放射免疫计数器(上海原子核研究所日环仪器厂)。

2 研究方法

2.1 造模方法及分组

选取心电图正常大鼠 60 只,随机数字表法分成假手术组、造模 30 分钟组、造模 1 小时组、造模 6 小时组、造模 12 小时组和造模 24 小时组。“孙络疏失”大鼠模型参照文献^[5],大鼠以 20% 乌拉坦按 5 ml/kg 腹腔注射麻醉后,经口气管插管连接呼吸机,设定呼吸频率 80 次/分、潮气量 15 ml/kg、呼吸比 1:1。于大鼠左侧胸壁 3~4 肋间横向开胸,暴露心脏,撕开心包膜,在冠状动脉左侧主干处,左心耳

下方约 2 ~ 3 mm 处以左心耳与肺动脉圆锥间左冠状静脉主干为标志结扎(假手术组只穿线,不接扎),进针深度约 1 ~ 1.5 mm,宽约 2.0 mm,逐层关闭胸腔,待大鼠自主呼吸恢复后,移除呼吸机。以室壁运动减弱,结扎下部心肌组织颜色变白,心电图可见胸前各个导联的 ST 段抬高、T 波高耸为造模成功标志,造模后每只大鼠一次性注射青霉素钠 40 万单位预防感染。

2.2 指标检测与标本处理

各组大鼠于规定时间点腹主动脉取血 4 ml,均分为 4 分,分别以放射免疫法测定 ET-1、TXB₂、6-keto-PGF_{1α} 和 Ang II 水平。

2.3 统计学方法

计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用 SPSS 17.0 统计软件,各组资料经正态性检验 ($P > 0.05$),符合正态分布;方差齐性检验 ($P > 0.05$),具有方差齐性;满足方差分析的条件。两组间的均数比较采用单因素方差分析 LSD 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 血浆 TXB₂、6-keto-PGF_{1α} 水平变化

与假手术组比较,血浆 TXB₂ 水平在造模 6 小时组显著升高,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),而在造模 12 小时组、造模 24 小时组,则明显下降,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);血浆 6-keto-PGF_{1α} 水平,在各个组均较假手术组显著下降,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),并于 12 小时达到最低水平,见表 1。

3.2 血浆 ET-1、Ang II 水平变化

与假手术组比较,造模 1 小时组、造模 6 小时组、造模 12 小时组血浆 ET-1 水平显著升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),造模 30 分钟组与造模 24

小时组较假手术组无明显变化;与假手术组比较,造模 30 分钟组、造模 1 小时组血浆 Ang II 水平显著降低,在 1 小时组达到低峰,此后恢复正常水平,见表 1。

4 讨论

4.1 关于“孙络疏失”模型

“孙络疏失”是基于“脉络—血管系统病”理论提出的新概念,中医学认为,孙络是人体络脉的最小单位,对应现代医学的小血管、微血管,孙络与微循环在结构分布、生理功能、病理变化等方面具有同一性^[6]。“孙络疏失”的病变基础在微循环,“疏”指数量的减少,“失”是“疏”的进一步加重,造成了小范围内的孙络消失,同时“疏失”也指功能的缺失。大鼠冠状动脉前降支结扎制作的心肌缺血模型,已被广泛证实其微血管密度降低^[7],正与“孙络疏失”相对应,而孙络渗灌气血、濡养脏腑的功能受损,会导致“心主血脉”一系列正常生理功能受损,与心肌梗死后心功能各项指标的异常表现相一致^[8]。因此选择结扎大鼠冠状动脉前降支的方法来制作心之络病“孙络疏失”的大鼠模型。

4.2 “孙络疏失”模型微血管疏缩因子的动态变化

心之络病“孙络绌急—孙络疏失—孙络瘀阻—孙络新生”作为“脉络—血管系统病”提出的孙络病变的演变过程,与“脉络—血管系统病”整体上具有一致性^[9],既往对“孙络绌急”的研究中,已证明微血管内皮功能紊乱是其发病基础^[10],本研究在此基础上继续探讨“孙络疏失”与微血管内皮功能紊乱的相关机制,以期通络药物及应用络病理论治疗“孙络疏失”^[11]提供更全面的机制研究,这对应用络病理论治疗心系疾病有重要参考价值。

血栓素 A₂ (thromboxane A₂, TXA₂) 与前列腺素 I₂ (prostacyclin, PGI₂) 是生物活性完全相反的血管

表 1 各组血浆 TXB₂、6-Keto-PGF_{1α}、ET-1、Ang II 水平 ($\bar{x} \pm s$) ($n = 10$)

组别	TXB ₂ (pmol/L)	6-Keto-PGF _{1α} (pmol/L)	ET-1 (pmol/L)	Ang II (pmol/L)
假手术组	582.67 ± 185.15	1949.68 ± 519.48	63.98 ± 11.04	8.71 ± 1.90
造模 30 分钟组	400.7 ± 101.32	1211.88 ± 517.59 ^b	59.68 ± 16.2	6.42 ± 1.44 ^a
造模 1 小时组	387.75 ± 216.06	1321.42 ± 328.52 ^b	78.84 ± 14.59 ^a	4.69 ± 2.78 ^b
造模 6 小时组	1999.2 ± 542.91 ^b	1325.2 ± 434.09 ^a	76.87 ± 12.67 ^a	7.13 ± 2.11
造模 12 小时组	292.67 ± 97.23 ^b	1070.24 ± 421.57 ^b	73.41 ± 7.49 ^a	6.09 ± 3.33
造模 24 小时组	336.5 ± 202.58 ^a	1191.33 ± 564.28 ^b	55.3 ± 8.86	14.4 ± 7.4

注:各组与假手术组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$

活性物质, TXA_2 具有很强的诱导血小板聚集和血管收缩作用, 而 PGI_2 是内皮细胞合成并分泌的血管舒张因子, 其主要作用是抑制血小板的黏附与聚集, 拮抗 TXA_2 , 使血管扩张。 TXA_2 和 PGI_2 的性质极不稳定, 不易检测, 而其相应的代谢产物 TXB_2 和 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ 则较稳定, 因此测定 TXB_2 和 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ 的浓度, 可反映 TXA_2 和 PGI_2 的含量^[12]。 Ang II 是肾素-血管紧张素-醛固酮系统 (renin-angiotensin-aldosterone system, RAAS) 中最重要的活性成分, 是强有力的内源性血管收缩剂。其通过兴奋醛固酮分泌、肾上腺髓质及其交感神经系统作用于其受体, 从而发挥增加血容量及升高外周阻力的作用^[13]。 ET-1 主要源于血管内皮, 具有很强的血管收缩功能, 并可引起血小板聚集、促进血管平滑肌细胞增生^[14]。

本研究结果显示, 血浆 TXB_2 在造模 6 小时显著增高, 而在造模 12 小时、24 小时则显著下降; 血浆 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ 在五个模型组中均显著下降; 血浆 ET-1 在造模 1、6、12 小时组显著升高。表明“孙络疏失”急性期血管舒张因子的变化更为明显, 提示“孙络疏失”急性期是通过减少血管舒张因子的分泌而导致内皮功能的紊乱。血浆 Ang II 在造模开始 30 分钟、1 小时组降低, 而后回升至正常水平, 这提示 RAAS 系统在“孙络疏失”急性期尚未被激活, 考虑综合其他 RAAS 系统作用因子, 进一步研究血浆 Ang II 及 RAAS 系统在“孙络疏失”中的作用规律及机制。以上结果表明“孙络疏失”急性期以微血管舒缩因子动态平衡的破坏, 从而导致内皮细胞功能紊乱为特点。

综上所述, 在心之络病“孙络疏失”急性期内, 并未出现明显的血浆 Ang II 水平升高, 而是以微血管内皮细胞功能紊乱为主要病理机制, 其中微血管舒缩因子 TXA_2 、 PGI_2 及 ET-1 异常分泌, 伴随它们之间动态平衡遭到破坏, 从而诱发或加重“孙络疏失”, 多种源于血管内皮细胞的微血管调节因子在

“孙络疏失”急性期协同发挥作用, 更体现了微血管内皮细胞的功能状态对“心之络病”的重要性。

参 考 文 献

- [1] 吴以岭. 络论[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2010: 55
- [2] 贾振华, 吴以岭, 高怀林, 等. “络-血管系统病”辨证诊断标准[J]. 中医杂志, 2007, 48(11): 1027-1032.
- [3] Morishima I, Sone T, Okamura K. Angiographic no-reflow phenomenon as a predictor of adverse long-term outcome in patients treated with percutaneous transluminal coronary angioplasty for first acute myocardial infarction[J]. J Am Coll Cardiol, 2000, 36(4): 1202-1209.
- [4] 吴以岭, 魏聪, 贾振华, 等. 络论学说的核心理论——营卫承制调平[J]. 中医杂志, 2013, 54(1): 3-7.
- [5] 李贻奎, 宁可永, 梁嵘, 等. 大鼠冠状动脉结扎心肌缺血模型方法的改进[J]. 中国新药杂志, 2005, 14(4): 427-428.
- [6] 王朋, 杨明会, 李绍旦, 等. 孙络与微血管相关性探析[J]. 环球中医药, 2012, 5(10): 736-738.
- [7] 祝光礼, 陈启兰, 陈铁龙, 等. 冠心合剂对急性心肌梗死大鼠心肌 bFGF 表达及血管新生的影响[J]. 浙江中西医结合杂志, 2011, 21(11): 758-761, 750.
- [8] 林蔚, 白旭东, 刘美佳. Tei 指数评价大鼠超急性期心肌梗死左心功能[J]. 中国医学影像技术, 2012, 28(9): 1623-1626.
- [9] 吴以岭. 络病学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2006: 198.
- [10] 霍旺, 杨明会, 李绍旦, 等. 心之络病“孙络细急”模型大鼠血浆 ET-1 、 TXB_2 、6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ 及 ANG II 的动态变化研究[J]. 北京中医药, 2013, 32(10): 789-792.
- [11] 沈晓飞, 李佳川, 曾勇, 等. 益心通络颗粒对大鼠急性心肌梗死和血液流变学的影响[J]. 中药药理与临床, 2010, 26(5): 110-112.
- [12] 黄仕文, 戴启刚. 乌头赤石脂丸对寒凝胸痹大鼠血液黏度、 TXB_2 、6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ 、 ET 、 NO 、 SOD 及 MDA 的影响[J]. 山西中医学院学报, 2012, 13(3): 56-58.
- [13] Ohuchi H, Takasugi H, Ohashi H, et al. Echigo S: Abnormalities of neurohormonal and cardiac autonomic nervous activities relate poorly to functional status in Fontan patients[J]. Circulation, 2004, 110(17): 2601-2608.
- [14] 曹绍华, 王云, 井雷, 等. 肺内皮功能障碍与肺动脉高压病变研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2012, 32(2): 433-436.

(收稿日期: 2013-12-12)

(本文编辑: 蒲晓田)

· 信息之窗 ·

本刊核心影响因子为 0.603

据 2013 年 9 月 27 日中国科技信息研究所每年一次发布的《2013 年版中国科技期刊引证报告(核心版)》显示,《环球中医药》核心影响因子为 0.603(2011-2012), 比去年统计的 0.338 有较大的提升, 在 29 种中医药类中国科技核心期刊中排名第 5。在 1930 种中国科技核心期刊中,《环球中医药》影响因子排名从原来的 1149 位上升到 523 位, 综合评价总分从原来的 1358 位上升到 617 位。

同期, 本刊扩展影响因子 0.821, 扩展他引率 0.89, 扩展 H 指数 6(至少有 6 篇文章被引不低于 6 次)。