

连夏配方颗粒对心梗后大鼠心肌组织酪氨酸羟化酶 mRNA、乙酰胆碱酯酶 mRNA 表达的影响

李家立 李平 马洪皓 田辰 郝腾 白芳芳 刘卫宁 马娜娜

【摘要】 目的 观察连夏配方颗粒对心肌梗死后大鼠心梗周围区心肌组织酪氨酸羟化酶 (tyrosine hydroxylase, TH) mRNA 与乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterase, AchE) mRNA 表达的影响。**方法** 将 90 只健康雄性成年 Wistar 大鼠随机分为假手术组、模型组、美托洛尔组、连夏配方颗粒 189.00 mg/kg、94.50 mg/kg、47.25 mg/kg 组;假手术组只穿线,不结扎左冠状动脉前降支,余各组均结扎左冠状动脉前降支以建立急性心肌梗死大鼠模型;假手术与模型组大鼠予生理盐水灌胃,余各组均予相应实验药物;连续给药 30 天后,采用 Real-time RT-PCR 方法检测心梗周围区心肌 TH mRNA 与 AchE mRNA 表达水平。**结果** 与假手术组比较,模型组大鼠心梗周围区心肌组织 TH mRNA 与 AchE mRNA 表达均明显增高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与模型组比较,连夏配方颗粒 189.00、94.50、47.25 mg/kg 组大鼠心梗周围区 TH mRNA 与 AchE mRNA 表达均明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与美托洛尔组比较,连夏配方颗粒 189.00 mg/kg 组大鼠心梗周围区 TH mRNA 与 AchE mRNA 表达均明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** 连夏配方颗粒可显著降低心肌梗死后大鼠心梗周围区心肌组织 TH mRNA 与 AchE mRNA 的表达,达到改善心肌梗死后大鼠心梗周围区自主神经重构的作用。

【关键词】 连夏配方颗粒; 心肌梗死; 自主神经重构; 酪氨酸羟化酶; 乙酰胆碱酯酶

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2015.02.009

Effects of LianXia Formula Granule on TH mRNA and AchE mRNA expression level in rats after myocardial infarction LI Jia-li, LI Ping, MA Hong-hao, et al. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Corresponding author: LI Ping, E-mail: pearll2008@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of LianXia Formula Granule (LXFG) on TH mRNA and AchE mRNA expression level at infarcted border zone of rats after myocardial infarction (MI). **Methods** Ninety healthy adult male Wistar rats were randomly assigned to six groups: sham operated group, model group, metoprolol group, 189.00 mg/kg-dose of LXFG group, 94.50 mg/kg-dose of LXFG group, 47.25 mg/kg-dose of LXFG group. The sham operated rats were not ligated in the left anterior descending coronary artery except the rest groups. The sham operated group and model group were given with normal saline by intragastric administration, and the rest groups were given with medicine for testing by intragastric administration. Thirty days later, TH mRNA and AchE mRNA expression level were separately measured in all groups. **Results** Compared with the model group, TH mRNA and AchE mRNA expression level in the 189.00, 94.50, 47.25 mg/kg-dose of LXFG group decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Com-

基金项目:国家科技支撑计划(2007BAI10B02-07);北京中医药大学自主选题(2013-ZYLC-015);北京中医药大学自主选题(2013-JYBZZ-XS-170)

作者单位:100029 北京中医药大学[李家立(博士研究生)、田辰、郝腾、马娜娜(硕士研究生)];北京中医药大学第三附属医院心内科(李平、白芳芳、刘卫宁),重症监护室(马洪皓)

作者简介:李家立(1985-),2012 级在读博士研究生。研究方向:中医药防治心血管系统疾病。E-mail:lijiali5678@163.com

通讯作者:李平(1965-),女,博士,主任医师,博士生导师。研究方向:中医药防治心血管系统疾病。E-mail:pearll2008@126.com

pared with the metoprolol group, TH mRNA and AchE mRNA expression level in the 189.00 mg/kg-dose of LXFG group decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** Application of LianXia Formula Granule in rats after MI can significantly decrease the expression level of TH mRNA and AchE mRNA to improve cardiac autonomic neural remodeling.

【Key words】 LianXia Formula Granule; Myocardial Infarction; Cardiac Autonomic Neural Remodeling; Tyrosine hydroxylase; Acetylcholinesterase

在急性心肌梗死幸存的慢性人群中,仍有 50% 以上患者会死于致命性室性心律失常^[1]。研究证实,心肌梗死发生后,在伴随心肌发生缺血、损伤、坏死和重构的同时,相同及周围区域的包括心交感神经与心迷走神经在内的自主神经,也随之发生一定程度的损伤、坏死和重构,并在人体致命性心律失常的发生过程中起关键性作用^[2-4]。而心肌梗死周围区则是心梗后组织修复、神经再生的敏感地带,较梗死区和非梗死区更加明显^[5-6]。

本研究通过复制心肌梗死大鼠模型,连续灌胃给予实验药物,旨在观察中药小复方连夏配方颗粒对心肌梗死后大鼠心梗周围区酪氨酸羟化酶 (tyrosine hydroxylase, TH) mRNA 与乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterase, AchE) mRNA 表达的影响,探讨连夏配方颗粒对心肌梗死后大鼠心梗周围区自主神经重构的干预作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康雄性清洁级 42 ~ 49 日龄 Wistar 大鼠 90 只,购于北京华阜康生物科技股份有限公司,许可证号:SCXK(京)2009-0007。

1.2 主要药品与试剂

连夏配方颗粒由黄连、姜半夏中药免煎颗粒混合组成,均购买于北京中医药大学第三附属医院,均由北京康仁堂药业有限公司生产并提供质检报告。根据连夏配方颗粒原方比例(黄连:姜半夏 = 1:1)、黄连与姜半夏的煎煮浓缩工艺及人和动物间按体表面积折算的等效剂量比值表法计算得到:大鼠连夏配方颗粒等效剂量为 94.50 mg/kg,作为本研究连夏配方颗粒中剂量组大鼠每天灌胃剂量;以中剂量的 2 倍,即 189.00 mg/kg 作为高剂量;以中剂量的 0.5 倍,即 47.25 mg/kg 作为低剂量。酒石酸美托洛尔片,生产批号:1103070C,阿斯利康制药有限公司。超纯 RNA 提取试剂盒 (Cat#CW0581)、HiFi-MMLV cDNA 第一链合成试剂盒 (Cat#CW0744)、UltraSYBR Mixture

(With ROX) (Cat # CW0956)、DNase 1 (Cat # CW2090)、5xRNA Loading Buffer (Cat # CW0611A) 等均购自 CWbio. Co. Ltd。

1.3 主要仪器

涡旋振荡仪 (QL-902, 海门市其林贝尔仪器制造有限公司), 离心机 (Centrifuge 5415D, Eppendorf), 分光光度计 (NANODROP 2000, Thermo scientific), 荧光定量 PCR 仪 (ABI7500, Applied Biosystems)。

1.4 分组

将大鼠随机分为假手术组、模型组、美托洛尔组、连夏配方颗粒 189.00 mg/kg、94.50 mg/kg、47.25 mg/kg 组,每组 15 只。

1.5 模型建立

动物模型参照文献^[7]制备。用 3.5 % 水合氯醛 10 mg/kg 腹腔注射麻醉大鼠,仰卧固定于大鼠板上。在大鼠左侧第 4、5 肋间切口,打开胸腔,撕开心包,轻压胸廓挤出心脏,用 0 号手术线于肺动脉圆锥与左心耳下 2 mm 处结扎冠状动脉左前降支,立即将心脏放回胸腔,关闭切口,缝合皮肤,局部应用青霉素 8 万单位以防止感染。假手术组大鼠只穿线不结扎。

1.6 给药

假手术组、模型组均给予生理盐水 10 mL/kg 灌胃,美托洛尔组给予美托洛尔 100 mg/kg 灌胃,连夏配方颗粒 189.00 mg/kg、94.50 mg/kg、47.25 mg/kg 组分别给予相应剂量连夏配方颗粒灌胃;建模当天即给药;均每天 1 次,连续给药 30 天;每天每只大鼠给予生理盐水的量均为 10 mL/kg。

1.7 指标检测和方法

连续灌胃给药 30 天后,除假手术组外其余各组大鼠均于心肌梗死周围区相同部位取心肌组织 100 mg,假手术组大鼠于假手术操作处周围区相同部位取心肌组织 100 mg,保存于 -80℃。用 Real-time RT-PCR 方法检测心肌组织 TH 与 AchE mRNA 表达水平。引物序列见表 1,实验步骤参照试剂盒说明书及文献^[8-9]进行。

表 1 引物序列

| 引物名称(长度) | 碱基序列(5' to 3') |
|---------------|--|
| TH(115 bp) | F: GGAAGCTGATTGCAGAGATT P: CCCTTCAGCGTGACATATAC |
| AchE(106 bp) | F: AACCTTTGGCTTCTTGGCTCTAC P: GGCTGCGATATTTCTTGTACCCA |
| GAPDH(138 bp) | F: TGGAGTCTACTGGCGTCTT P: TGTTCATATTTCTCGTGTCA |

1.8 统计学处理

数据采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析。数据以($\bar{x} \pm s$)表示,各组数据先进行正态性检验和方差齐性检验,若数据符合正态分布,方差齐,则用单因素方差分析,组间比较用 LSD 法;若数据不符合正态分布或方差不齐,则用秩和检验,组间比较用 Mann-Whitney 法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对心肌组织 TH mRNA 及表达的影响

与假手术组比较,模型组大鼠心肌梗死周围区心肌组织 TH mRNA 明显升高($P < 0.05$)。给药 30 天后,与模型组比较,美托洛尔组大鼠 TH mRNA 明显降低($P < 0.05$);连夏配方颗粒 189.00、94.50、47.25 mg/kg 组大鼠 TH mRNA 均明显降低($P < 0.05$)。与美托洛尔组比较,连夏配方颗粒 189.00 mg/kg 组大鼠 TH mRNA 明显降低($P < 0.05$)。说明连夏配方颗粒可以改善心梗后大鼠心交感神经重构,上述差异均有统计学意义,见表 2。

表 2 连夏配方颗粒对心肌梗死大鼠心肌组织 TH mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | TH mRNA | AchE mRNA |
|------------|----------------------------|----------------------------|
| 假手术组 | 0.36 ± 0.02 | 0.48 ± 0.03 |
| 模型组 | 2.24 ± 0.11 ^a | 1.12 ± 0.06 ^b |
| 连夏配方颗粒高剂量组 | 0.45 ± 0.04 ^{ace} | 0.68 ± 0.04 ^{bd} |
| 连夏配方颗粒中剂量组 | 0.97 ± 0.05 ^{ac} | 0.95 ± 0.05 ^{bde} |
| 连夏配方颗粒低剂量组 | 1.53 ± 0.02 ^{ace} | 0.99 ± 0.05 ^{bd} |
| 美托洛尔组 | 0.95 ± 0.05 ^{ac} | 1.06 ± 0.06 ^b |

注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与模型组比较^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$;与美托洛尔组比较,^e $P < 0.05$,^f $P < 0.01$ 。

2.2 对心肌组织 AchE mRNA 表达的影响

与假手术组比较,模型组大鼠心肌梗死周围区

心肌组织 AchE mRNA 明显升高($P < 0.01$)。给药 30 天后,与模型组比较,美托洛尔组大鼠 AchE mRNA 变化不明显($P > 0.05$);连夏配方颗粒 189.00、94.50、47.25 mg/kg 组大鼠 AchE mRNA 均明显降低($P < 0.01$)。与美托洛尔组比较,连夏配方颗粒 189.00、94.50 mg/kg 组大鼠 AchE mRNA 明显降低($P < 0.01$)。说明连夏配方颗粒可以改善心梗后大鼠心迷走神经重构,上述差异均有统计学意义,见表 2。

3 讨论

心脏自主神经包括交感神经和迷走神经,在对心脏独立的局部调节作用中,两者相反相成,共同协调完成对心脏节律、传导和收缩力等的直接调控。同时,体内各种机制还可以通过心脏自主神经对心脏发挥调节作用。

心脏自主神经对于心肌缺血缺氧损伤十分敏感。心肌梗死发生后,相同及周围区域的心脏自主神经亦发生损伤或坏死,且在形态和功能学都发生了不均一性重构,集中表现为梗死区心肌自主神经支配状态与梗死周围区心肌自主神经高支配状态。而由此引发心电生理及复极离散系列性继发性紊乱,进而容易在人体发生致命性心律失常(如室速、室颤等),且成为心梗后发生室速和心脏性猝死的关键性因素^[2-4,10]。

TH 位于去甲肾上腺素能神经纤维内,是去甲肾上腺素合成的限速酶,参与全部儿茶酚胺代谢的限速环节,且具有高度地特异性,因此常作为交感神经标志物,用于标记交感神经,检测交感神经分布情况^[11-12]。AchE 在心肌梗死后不同部位心肌中具有不同的活性,其不仅是评价迷走神经活性的指标,也是评价迷走神经分布支配的指标^[13-16]。故二者常被分别用于标记心交感神经与迷走神经以探讨心梗后心律失常与神经重构的相关机制。

本实验结果表明,心肌梗死后,在心梗周围区心脏交感神经与迷走神经均发生了再生重构现象,形成了自主神经高支配状态;而中药小复方连夏配方颗粒可以显著降低心肌梗死后大鼠心梗周围区 TH mRNA 与 AchE mRNA 的表达水平,从而改善心肌梗死后大鼠心梗周围区交感神经与迷走神经的再生重构,但其具体作用机制尚需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Jardine DL, Charles CJ, Forrester MD, et al. A neural mechanism

- for sudden death after myocardial infarction[J]. Clin Auton Res, 2003, 13(5):339-341.
- [2] 郭继鸿. 交感神经重构[J]. 临床心电学杂志, 2008, 17(4): 311-316.
- [3] Cao JM, Chen LS, KenKnight BH, et al. Nerve sprouting and sudden cardiac death[J]. Circ Res, 2000, 86(7):816-821.
- [4] 喜杨, 于彦伟, 曲秀芬, 等. 心肌梗死后迷走神经重构及普奈洛尔对其作用的研究[J]. 中华心血管病杂志, 2004, 32(supplement2):257-259.
- [5] Wong SS, Bassett AL, Cameron JS, et al. Dissimilarities in the electrophysiological abnormalities of lateral border and central infarct zone cells after healing of myocardial infarction in cats[J]. Circ Res, 1982, 51(4):486-493.
- [6] Cabo C, Boyden PA. Electrical remodeling of the epicardial border zone in the canine infarcted heart: a computational analysis[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003, 284(1):H372-384.
- [7] 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.
- [8] 杜金行, 李腾飞, 宋威江, 等. 血府逐瘀胶囊对 AMI 大鼠血清 ICAM-1 及肾脏组织 ICAM-1 mRNA 表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(11):3534-3536.
- [9] 刘亚坤, 何金波, 陈海娥, 等. 血必净注射液对缺氧/复氧大鼠心肌 TLR4-NF- κ B-TNF- α 通路的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2014, 34(12):1463-1468.
- [10] Zhou S, Chen LS, Miyauchi Y, et al. Mechanisms of cardiac nerve sprouting after myocardial infarction in dogs[J]. Circ Res, 2004, 95(1):76-83.
- [11] Chen PS, Chen LS, Cao JM, et al. Sympathetic nerve sprouting, electrical remodeling and the mechanisms of sudden cardiac death[J]. Cardiovascular Research, 2001, 50(2):409-416.
- [12] Chen LS, Zhou S, Fishbein MC, et al. New perspectives on the role of autonomic nervous system in the genesis of arrhythmias[J]. J Cardiovasc Electrophysiol, 2007, 18(1):123-127.
- [13] Paes AM, Carniato SR, Francisco FA, et al. Acetylcholinesterase activity changes on visceral organs of VMH lesion-induced obese rats[J]. Int J Neurosci, 2006, 116(11):1295-1302.
- [14] Cinca J, Bardají A, Carreño A, et al. Low incidence of ventricular arrhythmias induced by ischaemia at the borders of a chronic infarct in a model with local postinfarction denervation[J]. Cardiovasc Res, 1994, 28(7):1018-1024.
- [15] 张春, 喜斌. 急性心肌梗死大鼠心肌乙酰胆碱酯酶活性的变化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(43):8697-8699.
- [16] Chow LT, Chow SS, Anderson RH, et al. The innervation of the human myocardium at birth[J]. J Anat, 1995, 187(Pt1):107-114.

(收稿日期:2015-01-02)

(本文编辑:董历华)

· 理论探讨 ·

基于中医古籍研究的“肺与大肠相表里”理论源流及其内涵探讨

莫芳芳 马师雷 李鸿涛 赵丹丹 王柳青 倪金霞 田甜 林燕 高思华

【摘要】“肺与大肠相表里”理论历经千年发展,理论体系日臻完善,包含着丰富的内涵与外延。本文以梳理“肺与大肠相表里”的理论发展源流,探讨其理论内涵为目的,采用传统文献学的研究方法,对相关古籍进行系统整理与分析,得出“肺与大肠相表里”理论以《黄帝内经》的“脏腑相合”为源头,经秦汉、晋隋唐、宋金元和明清等各个时期医家的不断阐发和应用,其理论内涵得到不断丰富和发展。“肺与大肠相表里”理论所表达的基本内涵——肺与大肠之间通过互相观察彼此,可相互表征彼此,以体现相互配合的关系。这种肺与大肠关系的实现以经络为沟通联络基础,以气机升降为功能基础,以气血津液为重要物质基础,以阴阳五行学说为哲学基础。

【关键词】 藏象; 肺与大肠相表里; 源流; 内涵

【中图分类号】 R223 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2015.02.010

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划)(2009CB522700);北京中医药大学科研创新团队项目(2011-CXTD-01)

作者单位:100029 北京中医药大学糖尿病研究中心(莫芳芳、赵丹丹、高思华),期刊中心(马师雷),基础医学院(田甜、林燕);中国中医科学院文献所(李鸿涛、王柳青);北京中医药大学东直门医院针灸科(倪金霞)

作者简介:莫芳芳(1982-),博士,助理研究员。研究方向:脏腑相关理论研究,中医药防治糖尿病研究。E-mail:xiaofang.tcm@163.com

通讯作者:高思华(1957-),博士,教授。研究方向:运气学说研究,脏腑相关理论研究,中医药防治糖尿病研究。E-mail:gaosihua1216@163.com