

益心解毒方对气虚血瘀证心衰大鼠心肌组织中血小板一内皮细胞黏附分子和血管内皮生长因子表达的影响研究

冯玄超 郭淑贞 武志黔 廉洪建 王伟

【摘要】 目的 从血管新生的角度,探讨益心解毒方对气虚血瘀证心衰大鼠心肌保护的作用机制。**方法** 利用左冠状动脉结扎术制备大鼠心梗后心衰动物模型,通过宏观表征判定该疾病模型的证候属性,将成模后存活大鼠随机分为 8 组:假手术组,模型组,益心解毒方高、中、低剂量组,中西医结合组,福辛普利组和芪苈强心组。治疗 4 周后取梗死边缘区组织进行 Western Blot 及 RT-PCR 法检测血小板一内皮细胞黏附分子(又称 CD31)和血管内皮生长因子的表达。**结果** Western Blot 结果显示:模型组大鼠心肌组织中 CD31 蛋白表达量较假手术组显著下降($P=0.004$),而高剂量组($P=0.042$)、低剂量组($P=0.027$)和芪苈强心组($P=0.015$)与模型组相比均可提高心肌组织中 CD31 的表达。PCR 结果显示:与假手术组相比,大鼠心肌组织的血管内皮生长因子表达在模型组($P=0.047$),高剂量($P=0.023$),中西医结合组($P=0.008$)均显著升高;而低剂量组大鼠心肌组织中血管内皮生长因子的表达显著低于模型组($P=0.004$)和其它治疗组($P<0.05$)。**结论** 益心解毒方对心梗所致气虚血瘀证心衰大鼠的心肌保护作用,可能是通过促进血管新生实现的,其机制可能与血管内皮生长因子有关,且具有剂量相关性。

【关键词】 益心解毒方; 慢性心力衰竭; 气虚血瘀证; 血管新生

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2015.04.009

Study on the influence of Yixin Jiedu Formula on CD31 and VEGF expression in myocardial tissue of chronic heart failure rats with *qi* deficiency and blood stasis syndrome FENG Xuan-chao, GUO Shu-zhen, WU Zhi-qian, et al. First Clinical Medical College, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China

Corresponding author: WANG Wei, E-mail: wangwei26960@126.com

【Abstract】 Objective To clarify myocardial protection mechanism of Yixin Jiedu Formula (YX-JDF) on chronic heart failure rats with *qi* deficiency and blood stasis syndrome based on angiogenesis. **Methods** Rat models of heart failure were established by using left coronary artery ligation. The syndrome of rats was evaluated by macroscopic symptoms. All the survival rats after model establishment were randomly divided into 8 groups: sham-operated group, model group, high, middle and low dose of YXJDF groups, combination therapy group, fosinopril group and *Qili Qiangxin* (QLQX) group. 4 weeks after treatment, western blot and RT-PCR were used to test the expression of CD31 and vascular endothelial growth factor (VEGF) in infarction border zone. **Results** The results of western blot showed that the expression of CD31 in cardiac muscle tissue of rats in model group was significantly decreased compared

基金项目:国家科技重大专项“重大新药创制”专项(2012ZX09103201-011);国家“十二五”科技支撑计划(2012BA129B07);国家自然科学基金(84170191)

作者单位:100700 北京中医药大学第一临床医学院[冯玄超(博士研究生)];北京中医药大学基础医学院[郭淑贞、武志黔、廉洪建(硕士研究生)、王伟]

作者简介:冯玄超(1987-),女,2012 级在读博士研究生。研究方向:中医药防治慢性心力衰竭。E-mail: chaochao0318@126.com

通讯作者:王伟(1964-),博士,教授,博士生导师。研究方向:中医药防治慢性心衰临床和基础研究。E-mail: wangwei26960@126.com

with the sham operated group ($P=0.004$), while the protein expression of CD31 in myocardial tissue of rats in the high and low dosage of *Yixin Jiedu* formula group ($P=0.042$, $P=0.027$) and *Qili Qiangxin* capsule group ($P=0.015$) was increased significantly. The RT-PCR results indicated that, compared with the sham operated group, the expression of VEGF in myocardial tissue of rats in model group ($P=0.047$), high dose of *Yiqi Jiedu* formula group ($P=0.023$) and combination therapy group ($P=0.008$) were dramatically increased, while the expression of VEGF in myocardial tissue of rats in low dose of *Yiqi Jiedu* formula group was lower than that of rats in model group ($P=0.004$) and the other treatment groups ($P<0.05$). **Conclusion** *Yixin Jiedu* formula could protect the cardiac muscle of rats with *qi* deficiency and blood stasis syndrome induced by myocardial infarction through promoting angiogenesis possibly, and the mechanism might be relate to VEGF family, and the protective effect changes with different doses.

【Key words】 *Yixin Jiedu* Formula; Chronic heart failure; *Qi* deficiency and blood stasis syndrome; Angiogenesis

促血管新生的治疗方法对急性心梗患者是一种有效的治疗策略,新生的微血管具有挽救急性心梗早期缺血心肌的潜力,可以防止心力衰竭的产生^[1]。血小板—内皮细胞黏附分子(platelet endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1)又称为 CD31,可以标记内皮细胞,用于识别心梗组织中血管生成状况^[2]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)与其受体 VEGF 受体 2 结合后,可以促进内皮细胞存活,增殖并且迁移^[3]。

前期的研究显示益心解毒方可以从抑制凋亡、调节细胞外基质、抑制肾素—血管紧张素—醛固酮系统、抑制氧化应激的途径来对心肌发生良性作用^[4-5]。这些机制和心衰血管新生关系密切。本实验在前人的基础上,进一步明确其促进血管新生的药理作用。

1 材料与方法

1.1 动物

正常 SPF 级雌性 SD 大鼠 120 只,体质量(200 ± 10)g,10 周龄,购入时间 2013 年 10 月,购置于维通利华动物中心有限公司(北京,中国),许可编号:SCXK2013-0001。饲养于北京中医药大学 SPF 级动物房,整个实验室程序是在大学动物伦理委员会的许可和监督下进行的。实验程序通过北京中医药大学动物研究所的认可。

1.2 药物

益心解毒方的组成为:黄芪 15 g、丹参 15 g、金银花 9 g、黄连 6 g、玄参 9 g、甘草 6 g 组成,以上药物购于北京同仁堂制药有限公司;以上药材加适量水煎煮 2 次,合并提取液,收集滤液。浓缩至适宜体

积,放冷,边搅拌边缓慢加入酒精,过滤,收集滤液。再将滤液浓缩,减压干燥,粉碎成细粉,加适量糊精混匀,制粒,干燥,分装;芪苈强心胶囊,由石家庄以岭药业有限公司提供,批准文号:国药准字 Z20040141,生产批号:121103;福辛普利,由中美上海施贵宝制药有限公司提供,批准文号:国药准字 H19980197。

1.3 主要试剂

RIPA 裂解缓冲液(北京普利莱基因技术有限公司,货号:C1053);Bradford 法蛋白质定量试剂盒(北京普利莱基因技术有限公司,货号:P1510);CD31 抗体(Abcam,货号 ab109444);GoTaq® 2-Step RT qPCR System 试剂盒(promega 公司,美国,货号 A6010)。

1.4 主要仪器

心电图机:日本福田 FX7200 心电图机;美国 CWE 公司 SAR-1000 小动物呼吸机;凝胶成像仪及图像分析系统(BIO-RAD, Molecular Imager Chemi-Doc™ XRST with Image Lab™ software,美国);电泳及电转化系统(Miniin, Bio-Rad, Mini PROTEANR Tetra Cell 552BR 057972; Mini Trans-BlotR Cell 153BR 74593)。

1.5 心衰气虚血瘀证大鼠模型的复制

动物腹腔注射戊巴比妥钠麻醉(50 mg/kg)。高位结扎左冠脉前降支,于大鼠左胸第 3、4 肋间开口,逐层暴露心脏,用 5-0 的带针线于大鼠左冠脉前降支根部结扎;结扎后心脏表面立即给予 1~2 滴利多卡因注射液,关胸后腹腔注射利多卡因注射液 0.1~0.2 mL 和呋塞米注射液 0.1~0.2 mL。假手术穿线不结扎。其后根据游泳力竭实验结果、呼吸频率、爪颜色等,来确立术后 7~28 天模型大鼠主要

表现是否为气虚血瘀证。

1.6 分组与给药

大鼠适应性喂养 1 周后,按照体质量随机分为两组:模型组 110 只、假手术组 10 只。模型动物行左冠脉结扎术,术后进行心电图检测,大鼠心电图标准 12 导联中大于 6 个导联出现坏死性 Q 波的纳入模型组。将其中 70 只造模成功的大鼠按照体重分为 7 组:模型组,益心解毒方高、中、低剂量组,中西结合组,福辛普利组和芪苈强心组。10 只假手术组动物除穿线不结扎。

术后第 2 天开始给药,益心解毒方高剂量组每天给予生药 18.66 g/kg,相当于 2 倍临床等效剂量;益心解毒方每天给予生药 9.33 g/kg,相当于临床等效剂量;益心解毒方低剂量组每天给予生药 4.66 g/kg,相当于 1/2 临床等效剂量;中西结合组每天予临床等效剂量 9.33 g/kg + 福辛普利 1.2 mg/kg 中西药灌胃之间间隔 1 小时;福辛普利组每天予福辛普利钠片每天 1.2 mg/kg,芪苈强心组每天予芪苈强心药粉 1 g/kg,均以水溶,每天灌胃给药,灌胃体积为 1.0 mL/100 g;假手术组和模型组每日给予相同体积纯水灌胃,持续 4 周。

1.7 Western Blot 检测 CD31 的蛋白表达

(1) 蛋白质提取:应用 RIPA 裂解缓冲液提取总蛋白,应用 Bradford 法蛋白质定量,取适量样品加非还原性蛋白上样缓冲液,沸水煮 5 分钟,是蛋白充分变性;(2) 配制聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE);(3) SDS-PAGE 电泳;(4) SDS-PAGE 转膜印迹;(5) 用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 小时, TBST 冲洗 3 次,每次 7 分钟;(6) 免疫反应:加 CD31 一抗,按照 1:1000 比例,1 μ L 抗体加到 1 mL 封闭液中。一抗杂交袋中 4℃ 过夜, TBST 冲洗 3 次,每次 7 分钟。二抗按照 1:5000 比例,1 μ L 抗体加到 6 mL 封闭液中。二抗室温摇床 60 分钟, TBST 冲洗 3 次,每次 7 分钟;(7) 显影: ECL 发光液曝光显影, BIO-RAD XRS 凝胶成像仪分析,记录每条蛋白泳带的灰度值,进行定量分析。

1.8 RT-PCR 法检测 VEGF mRNA 的表达

(1) 荧光定量 PCR 引物、探针序列: VEGF 上游引物: 5'-ATGAACCTTCTGCTGTCTTGG-3', 下游引物: 5'-TCACCGCCTCGGCTTGTACACA-3'; β -actin 上游引物: 5'-CGTTGACATCCGTAAGACCTC-3', 下游引物: 5'-TAGGAGCCAGGGCAGTAATCT-3'。(2) 组织总 RNA 的提取;(3) 逆转录 cDNA;

(4) 定量 PCR 测定;(5) $2^{-\Delta\Delta CT}$ 分析基因相对表达量。

1.9 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据处理,所得数据均用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。经检验,两个指标数据呈正态性分布。各指标组间比较均采用单因素方差分析。CD31 蛋白表灰度值方差不齐,两两比较采用 Dunnet T3 检验; VEGF mRNA 表达量方差齐,两两比较采用 LSD 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

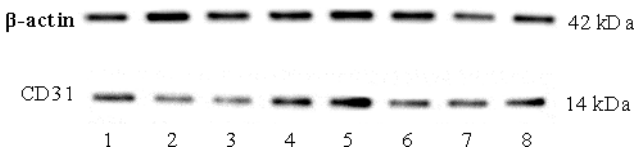
2 结果

2.1 Western Blot 检测 CD31 的蛋白表达

如图 1 所示,在蛋白质相对分子量为 14 kDa 和 42 kDa 处有条带,分别是 CD31 和 β -actin 蛋白表达;大鼠心肌组织中 CD31 蛋白电泳带的灰度值比较见表 1。样本灰度值服从正态分布,但方差不齐,故单因素方差分析读取 Welch 值 ($P = 0.006$),显示总体差异有统计学意义。各组间两两比较经 Dunnet t3 检验显示:模型组大鼠心肌组织中 CD31 蛋白表达量较假手术组显著下降 ($P = 0.004$),而高剂量组 ($P = 0.042$)、低剂量组 ($P = 0.027$) 和芪苈强心组 ($P = 0.015$) 与模型组相比均可提高心肌组织中 CD31 的表达。见表 1。

2.2 RT-PCR 检测 VEGF mRNA 的表达

样本 VEGF mRNA 表达量服从正态分布,且方差齐,经单因素方差分析 ($F = 3.441, P = 0.011$),总体差异有统计学意义。各组间两两比较经 LSD 检验显示:与假手术组相比,大鼠心肌组织的 VEGF 表达在模型组 ($P = 0.047$),高剂量 ($P = 0.023$),中西结合组 ($P = 0.008$) 均显著升高;而低剂量组大鼠心肌组织中 VEGF 的表达显著低于模型组 ($P = 0.004$) 和其它治疗组 ($P < 0.05$)。见表 1。



1 假手术组;2 模型组;3 益心解毒方高剂量组;
4 益心解毒方中剂量组;5 益心解毒方低剂量组;
6 中西结合组;7 福辛普利组;8 芪苈强心组

图 1 各组大鼠心肌组织中 CD31 的 Western Blot 电泳条带

表 1 各组大鼠心肌组织中 CD31 的 Western Blot 和 VEGF 的 RT-PCR 检测结果($\bar{x} \pm s$)

分组	CD31 蛋白表达	VEGF 基因表达
假手术组	0.873 ± 0.048 ^b	0.941 ± 0.173 ^a
模型组	0.31 ± 0.097 ^d	1.174 ± 0.193 ^c
益心解毒方高剂量组	0.68 ± 0.097 ^a	1.209 ± 0.211 ^c
益心解毒方中剂量组	0.66 ± 0.298	1.147 ± 0.086
益心解毒方低剂量组	0.72 ± 0.31 ^b	0.824 ± 0.227 ^b
中西结合组	0.65 ± 0.227	1.263 ± 0.12 ^d
福辛普利组	0.58 ± 0.054	1.072 ± 0.087
芪苈强心组	0.76 ± 0.27 ^a	1.119 ± 0.054

注:与模型组相比,^a $P < 0.05$;与模型组相比,^b $P < 0.01$;与假手术组相比,^c $P < 0.05$;与假手术组相比,^d $P < 0.01$

3 讨论

过去的 30 年里,人类在心血管疾病的用药以及相关手术领域取得了惊人的进步。高收入国家中,与急性冠脉综合症、瓣膜及先天性心脏病、高血压和心律失常相关的早期死亡率明显降低。但是,许多罹患上述疾病的患者的心脏损伤已经产生,而且虽然他们的生存年限得到延长,但是他们的心脏疾患并没有治愈;发展为心衰的潜在人群数量不断攀升,这可能是抵御上述疾病成功的代价,而且对于多数患者来说这是一个颇高的代价^[6]。促血管新生的治疗方法对急性心梗患者是一种有效的治疗策略,新生的微血管具有挽救急性 MI 早期缺血心肌的潜力,可以防止心力衰竭的产生^[1]。

中医药对促进血管新生也有一些研究:郜俊清等^[2]应用黄芪瓜蒌薤白半夏汤治疗心肌梗死后大鼠,结果可见:补气化痰方可以有效提高心梗大鼠射血分数,并认为其机制是促进梗死后血管新生。胡国恒等^[7]应用益气活血方治疗冠脉结扎后大鼠,治疗后发现益气活血方能明显减小大鼠心肌梗死面积、促进缺血心肌血管新生。栾杰男等^[8-9]用通脉地仙丸干预心肌梗死后大鼠,发现其可以上调 bFGF、VEGF 蛋白表达,认为通脉地仙丸可以促进缺血心肌中的血管再生。

CD31 存在于血小板、中性粒细胞、单核细胞和某些类型的 T 细胞表面,以及内皮细胞间紧密连接处。在调控血管通透性、介导炎细胞渗入局部组织过程中起关键作用^[10]。本实验中用 Western Blot 法

检测梗死周围组织中 CD31 的蛋白表达,结果显示:模型组大鼠心肌组织中 CD31 蛋白表达量较假手术组显著下降,而高剂量组、低剂量组和芪苈强心组与模型组相比均可提高心肌组织中 CD31 的表达。可见益心解毒方和芪苈强心胶囊均可促进梗死周围区域的血管生成。

VEGF 家族生长因子在 MI 后的血管新生中起到主导作用。VEGF 与其受体 VEGF 受体 2 结合后,可以促进内皮细胞存活,增殖并且迁移^[3]。本实验中:与假手术组相比,大鼠心肌组织的 VEGF 表达在模型组,高剂量,中西结合组均显著升高;而低剂量组大鼠心肌组织中 VEGF 的表达显著低于模型组($P = 0.004$)和其它治疗组($P < 0.05$)。可见益心解毒方在剂量增加或与福辛普利合用时可通过 VEGF 通路促进心肌组织中血管的新生,而在剂量低时表现为对 VEGF 通路的抑制。

本研究提示,益心解毒方同芪苈强心胶囊都有促进血管新生的功效,此功效相比西药更有优势。在益心解毒方高剂量和与西药福辛普利合用的情况下可以促进 VEGF 的表达,此时的血管新生机制可能与 VEGF 通路相关,但在益心解毒方低剂量时却对 VEGF 有下调的作用。分析原因:有研究发现,VEGF 本身的刺激产生的血管不成熟,有漏洞,而且是无组织的血管^[11],而被 VEGF 激活的 VEGFR2 必须和血小板衍生生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)——受体 β 复合以阻止信号传导,这样才能募集壁细胞并且维持血管的稳定性。益心解毒方在低剂量抑制了 VEGF 产生的无功能的新生血管,而剂量的增加可能协助了新生血管的稳定性,进而促进了 VEGF 的生成。

综合上述实验结果可见:益心解毒方和芪苈强心胶囊均可促进梗死周围区域的血管生成,益心解毒方的作用机制可能与 VEGF 家族相关,在高剂量时是否促进了新生血管的稳定性,还需要进一步研究。

参 考 文 献

[1] Shah AM, Mann DL. In search of new therapeutic targets and strategies for heart failure: recent advances in basic science[J]. Lancet, 2011, 378(9792): 704-712.
[2] 郜俊清, 陈弢, 于宏梅, 等. 补气化痰方对心肌梗死模型大鼠心功能及血管新生的影响[J]. 吉林中医药, 2013, (8): 821-823.
[3] Besnier M, Galaup A, Nicol L, et al. Enhanced angiogenesis and increased cardiac perfusion after myocardial infarction in pro-

tein tyrosine phosphatase 1B-deficient mice[J]. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 2014, 28(8): 3351-3361.

[4] 李春. 心肌缺血心功能不全证候生物学基础与益心解毒方药理药效机制的实验研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2012.

[5] 李春, 欧阳雨林, 王勇, 等. 益心解毒方对心梗后心衰大鼠心肌保护作用的实验研究[J]. 中华中医药杂志, 2012, (11): 2966-2969.

[6] Ambrosy AP, Fonarow GC, Butler J, et al. The global health and economic burden of hospitalizations for heart failure: lessons learned from hospitalized heart failure registries[J]. Journal of the American College of Cardiology, 2014, 63 (12): 1123-1133.

[7] 胡国恒, 胡哲, 盛望, 等. 益气活血方对大鼠缺血性心肌管新生及 HGF 影响的研究[J]. 中国中医急症, 2013, (9): 1478-1479, 1484.

[8] 栾杰男, 李根, 张大维, 等. 通脉地仙丸对大鼠缺血性心肌管生成及其相关基因表达的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2013, 20(2): 37-40.

[9] 栾杰男, 张大维, 焦燕, 等. 通脉地仙丸对大鼠缺血性心肌管新生的作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(11): 170-174.

[10] Kim SW, Houge M, Brown M, et al. Cultured Human Bone Marrow-Derived CD31 (+) Cells Are Effective for Cardiac and Vascular Repair Through Enhanced Angiogenic, Adhesion, and Anti-Inflammatory Effects[J]. Journal of the American College of Cardiology, 2014, 64(16): 1681-1694.

[11] Cao R, Eriksson A, Kubo H, et al. Comparative evaluation of FGF-2-, VEGF-A-, and VEGF-C-induced angiogenesis, lymphangiogenesis, vascular fenestrations, and permeability [J]. Circulation research, 2004, 94(5): 664-670.

(收稿日期:2014-02-17)

(本文编辑:黄凡)

百合知母汤配伍机理的红外光谱研究

孙冬生 王珠梅 金俊杰 迟宗良 陈丹妮 秦昆明

【摘要】 目的 利用傅里叶变换红外光谱技术对百合知母汤及其组方药味进行了研究。**方法** 实验测试了单味药百合、知母及百合知母汤剂的红外光谱。**结果** 在百合知母汤剂中保留了百合、知母单味药汤剂中的某些吸收峰,如百合知母汤光谱 2933 cm^{-1} 和 1059 cm^{-1} 处等;百合、知母单味药光谱中的某些吸收峰并未在百合知母汤光谱中出现,如百合光谱 1724 cm^{-1} 和知母光谱 1453 cm^{-1} 等;在百合知母汤剂光谱中出现了新的吸收峰,如百合知母汤光谱 1871 cm^{-1} 和 1522 cm^{-1} 处等。同时,因吸收峰位置的改变,说明各基团在百合、知母和百合知母汤中所处的化学环境不同或汤剂中化学物质的结构发生了变化。**结论** 百合知母汤及其组方药味的红外谱图特征具有一定的变化规律,根据对特征峰的指认和归属,可初步揭示百合知母汤及其组方药味的红外光谱差异;单味药的特征峰在百合知母汤中得到较好的显示,该方法可以用于百合知母汤的宏观质量控制,也为探索方剂的配伍规律提供了新思路。

【关键词】 红外光谱; 百合知母汤; 百合; 知母

【中图分类号】 R284 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2015.04.010

Infrared spectra research on compatibility mechanism of Baihe Zhimu Decoction SUN Dong-sheng, WANG Zhu-mei, JIN Jun-jie, et al. Department of Pharmacy Taizhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Taizhou 225300, China

Corresponding author: QIN Kun-ming, E-mail: qinkm123@126.com

【Abstract】 Objective The change in the mixed decoction was discussed to study the relationship

基金项目:国家自然科学基金(90709025);江苏省科技支撑计划(BE2012011);江苏省自然科学基金(BK2011135)

作者单位:225300 泰州市中医院药学部(孙冬生、王珠梅);南京中医药大学 国家教育部中药炮制规范化及标准化工程研究中心(陈丹妮、秦昆明);江苏海昇药业有限公司研发中心(金俊杰、迟宗良、秦昆明);南京海源中药饮片有限公司研发中心(金俊杰、迟宗良、秦昆明)

作者简介:孙冬生(1971 -),本科,主管中药师。研究方向:中药质量控制及药物分析。E-mail:1272813260@qq.com

通讯作者:秦昆明(1985 -),2012 级在读博士研究生,助理研究员。研究方向:主要从事中药质量标准研究。E-mail:qinkm123@126.com