

通心络对心肌梗死模型大鼠心肌损伤保护作用及机制的研究

王思颖 李绍旦 刘毅 冯宇 张俊修 霍旺 高路 杨明会

【摘要】 目的 探索通心络对心肌梗死模型大鼠心肌损伤的保护作用及机制。**方法** 采用结扎前降支方法制作 30 只心肌梗死大鼠模型,随机分为模型组、通心络组、培哚普利组,每组 10 只;假手术组 9 只仅穿线不结扎。药物组大鼠分别以通心络、培哚普利灌胃,模型组和假手术组给予等量羧甲基纤维素钠溶液灌胃。2 周后测量 TUNEL 凋亡指数,以及血清超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、一氧化氮(nitrogen monoxide, NO)、内皮素-1(endothelin-1, ET-1)水平。**结果** 药物组大鼠的一般情况均有所改善。通心络组、培哚普利组的凋亡指数和 MDA、ET-1 水平较模型组均明显降低, SOD、NO 水平较模型组均明显升高($P < 0.05$)。**结论** 通心络可抑制心肌细胞凋亡,并通过升高 SOD、NO 水平,降低 MDA、ET-1 水平,改善氧化应激状态和内皮功能,保护心肌组织。

【关键词】 通心络; 心肌梗死; 模型大鼠; 凋亡; 氧化应激; 内皮功能

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2016.06.002

Protective effect and mechanism of Tongxinluo on myocardial injury in myocardial infarction model rats WANG Si-ying, LI Shao-dan, LIU Yi, et al. Dongzhimen Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China

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

【Abstract】 Objective To study the protective effect and mechanism of *Tongxinluo* on myocardial injury in myocardial infarction model rats. **Methods** The rat model of acute myocardial infarction was established by ligaturing the left anterior descending coronary artery. 30 model rats were randomly divided into the model group, *Tongxinluo* group, Perindopril group, 10 rats in each group. And 9 rats in sham group were punctured only without ligation. The rats in each medication group were intragastric administration respectively by *Tongxinluo* suspension and Perindopril suspension with corresponding dosage. And the model group and the sham group were intragastric administration by sodium carboxymethyl cellulose solution with corresponding dosage. All the rats were given continuously for 2 weeks. The apoptotic index and the level of SOD, MDA, NO and ET-1 were measured by corresponding methods. **Results** The general condition of rats in medication groups was better than model group. The level of SOD and NO in *Tongxinluo* group and Perindopril group was increased more significantly than that of the model group($P < 0.01$). The level of MDA and ET-1 in *Tongxinluo* group and Perindopril group was decreased more significantly than model group ($P < 0.05$). **Conclusions** *Tongxinluo* can inhibit myocardial apoptosis, and protect the cardiac muscle tissue by increasing the level of SOD and NO, decreasing the

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

作者单位:100700 北京中医药大学东直门医院[王思颖(博士研究生)];中国人民解放军总医院中医科[王思颖、李绍旦、刘毅、冯宇、张俊修、霍旺、高路、杨明会]

作者简介:王思颖(1986-),女,2013 级在读博士研究生。研究方向:中西医结合治疗老年病。E-mail: lucky18603@163.com

通讯作者:杨明会(1962-),博士,教授,主任医师,博士生导师。研究方向:中西医结合基础与临床。E-mail: ymh9651@sina.com

level of MDA and ET-1, and it also can improve the oxidative stress and perform protective effect on myocardial tissue endothelial function.

【key words】 Tongxinluo; Myocardial infarction; Model rat; Apoptosis; Oxidative stress; Endothelial function

心肌梗死是在冠状动脉病变的基础上,冠状动脉血供急剧减少或中断,使心肌发生严重而持久的缺血导致心肌坏死的一系列病理改变^[1],具有高发病率、高致残率、高病死率等特点,是严重威胁人类健康的难治性疾病,属于中医学“胸痹”“心痛”范畴。

通心络是一种中药复方制剂,以中医络病学理论为基础,具有益气通络止痛、活血化瘀的功效,研究证明其对急性心肌梗死具有较好的疗效。本研究从模型大鼠心肌的凋亡程度、氧化应激状态、内皮功能方面探讨通心络对心肌损伤的保护作用及机制。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只(购于军事医学科学院实验动物中心),体质量(240 ± 20) g,每笼 5 只饲养于独立通气笼具系统内。温度(22 ± 1)℃,湿度(50 ± 5)%,每天明暗交替 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、灌药等由专人负责管理。

1.2 药物及试剂

通心络超微粉(石家庄以岭药业股份有限公司,批号:20121215);培哚普利片[施维雅(天津)制药有限公司,批号:20120218];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);盐酸利多卡因注射液(北京益民药业有限公司,批号:20140609);TUNEL 凋亡检测试剂盒(Roche 公司,货号:11684817910)、总超氧化物歧化酶测试盒(南京建成生物工程研究所,货号:A001-1)、丙二醛测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,货号:A003-1)、一氧化氮测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,货号:A012)、内皮素-1 测试盒(南京建成生物工程研究所,货号:H093),均购于北京百傲厚德生物科技有限公司。

1.3 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)。

1.4 动物造模及分组

选取心电图正常大鼠 60 只,随机数字表法分为假手术组 9 只和造模组 51 只,假手术组只穿线不结扎,造模组采用结扎前降支方法制作急性心肌梗死模型。模型参照文献^[2],以 20% 乌拉坦按 5 mL/kg 腹腔注射麻醉后,使用面罩罩于鼻部连接呼吸机,仔细检查防止漏气,设定呼吸频率 80 次/分、潮气量 15 mL/kg、呼吸比 1:1。剃毛及碘伏消毒,于大鼠左侧胸壁 3~4 肋间横向开胸,钝性分离肌肉,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,不结扎),进针深度约 1.5 mm,宽约 2.0 mm,结扎后在心脏表面滴加 1 滴盐酸利多卡因注射液防止心律失常。心脏搏动稳定后立即逐层关闭胸腔,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或紫绀,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肌肉注射青霉素钠 40 万单位预防感染。

1.5 给药及取材

将造模成功后存活的 30 只模型大鼠随机分为模型组、通心络组、培哚普利组,每组各 10 只,假手术组 9 只。通心络组、培哚普利组分别以通心络超微粉 0.6 g/(kg·d)、培哚普利 2 mg/(kg·d)剂量灌胃,药物以等量羧甲基纤维素钠溶液溶解,模型组和假手术组以等量羧甲基纤维素钠溶液灌胃。术后第二天开始,每天上午 10:00 灌胃,每 5 天重新测量体质量计算灌胃量。连续给药 2 周后,麻醉大鼠,腹主动脉取血 5 mL;将导管沿主动脉根部逆行插入左心室,缝合线打结固定导管,剪开右心耳,先以生理盐水 150 mL 灌注心脏,再以 4% 多聚甲醛 300 mL 灌注,直至右心耳切口流出液无色时完成灌注,置入 4% 多聚甲醛固定。

1.6 观察指标及检测方法

将心脏用石蜡包埋,切成 6 μm 厚的切片。根据说明书使用 TUNEL 凋亡检测试剂盒检验凋亡阳

性细胞分布情况,切片置于 200 倍荧光显微镜下,随机选取 3 个视野,凋亡指数=凋亡细胞计数/(凋亡细胞计数+正常细胞计数)×100%,取平均值。使用总超氧化物歧化酶测试盒、丙二醛测定试剂盒、一氧化氮测定试剂盒、内皮素-1 测试盒,分别测量血清超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、一氧化氮(nitrogen monoxide, NO)、内皮素-1(endothelin-1, ET-1)水平。

1.7 统计学处理

数据采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析,所有结果均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,所有数据均进行正态性和方差齐性检验。各组样本之间的均数比较采用方差分析,数据方差齐时采用 LSD 法、Dunnett 法进行两两比较;方差不齐时,进行 Welch 近似方差分析,采用 Tamhane's T2 法进行两两比较。若数据不服从正态分布,则进行非参数检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠一般情况

实验前各组动物状态良好,皮毛光泽,反应灵敏,动作自如,目光有神,眼口鼻无分泌物。假手术组实验前后无明显变化,体质量稳定上升;其余组出现不同程度的皮毛干枯不光泽,眼口鼻不同程度红色分泌物,倦怠,以模型组最为明显,药物治疗组相对较轻。各组体质量变化无显著差异。

2.2 凋亡指数

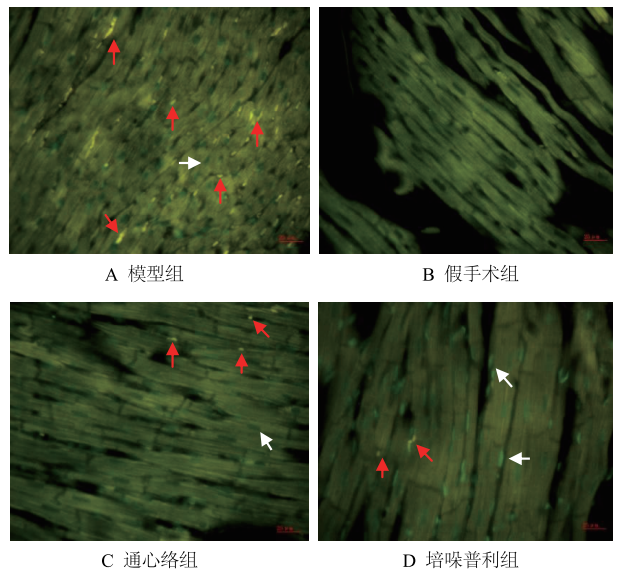
各组数据符合正态分布,方差不齐, Welch 分析 $P < 0.01$, 组间存在显著差异。Tamhane 两两比较:模型组较假手术组明显升高($P < 0.05$);通心络组、培哚普利组较模型组明显降低($P < 0.05$),药物组与假手术组、药物组之间均无显著差异。

2.3 氧化应激状态

2.3.1 SOD 各组数据符合正态分布,方差齐, ANOVA 方差分析 $P < 0.01$, 组间存在显著差异。LSD 两两比较:模型组较假手术组明显降低($P < 0.01$);通

心络组、培哚普利组较模型组明显升高($P < 0.01$),药物组与假手术组、药物组之间均无显著差异。

2.3.2 MDA 各组数据符合正态分布,方差齐, ANOVA 方差分析 $P < 0.01$, 组间存在显著差异。LSD 两两比较:模型组较假手术组明显升高($P < 0.01$);通心络组、培哚普利组较模型组明显降低($P < 0.05$),药物组与假手术组、药物组之间均无显著差异。



注:正常心肌细胞着蓝绿色荧光(白色箭头),凋亡细胞着黄色荧光(红色箭头)

图 1 各组凋亡程度(TUNEL 荧光染色, ×200)

2.4 血管内皮功能

2.4.1 NO 各组数据符合正态分布,方差齐, ANOVA 方差分析 $P < 0.01$, 组间存在显著差异。LSD 两两比较:模型组较假手术组明显降低($P < 0.01$);通心络组、培哚普利组较模型组明显升高($P < 0.01$),药物组与假手术组、药物组之间均无显著差异。

2.4.2 ET-1 各组数据符合正态分布,方差不齐,取对数后方差齐, ANOVA 方差分析 $P < 0.05$, 组间存在显著差异。LSD 两两比较:模型组较假手术组明显升高($P < 0.01$);通心络组、培哚普利组、较模型组明显降低($P < 0.05$),较假手术组明显升高($P < 0.01$),药物组之间无显著差异。

表 1 各组 TUNEL 凋亡指数、SOD、MDA、NO、ET-1 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TUNEL 凋亡指数(%)	SOD(μmol)	MDA(nmol/mL)	NO(μmol/mL)	ET-1(OD)
模型组	10	13.20±8.56 ^c	223.73±7.01 ^d	6.43±0.94 ^d	32.28±4.90 ^d	0.90±0.20 ^d
通心络组	10	2.20±1.52 ^a	232.98±6.15 ^b	5.70±0.54 ^a	40.64±6.00 ^b	0.72±0.06 ^{bd}
培哚普利组	10	2.76±1.79 ^a	231.72±2.57 ^b	5.38±0.58 ^b	39.71±6.12 ^b	0.77±0.07 ^{ad}
假手术组	9	2.14±1.56 ^a	232.38±6.06 ^b	5.08±0.90 ^b	39.92±6.10 ^b	0.59±0.07 ^b

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

3 讨论

随着人类社会的发展和人口老龄化的加重,心肌梗死已经成为严重威胁人类健康的急危重症,中国心肌梗死的发病率和死亡率逐年上升^[3]。心肌梗死是在冠脉不稳定斑块破裂、糜烂的基础上形成血栓,导致冠状动脉血管持续的完全的闭塞,引起心肌缺血缺氧、坏死、炎症等一系列病理改变,可导致室壁瘤、心脏破裂、猝死等严重并发症。

心肌梗死的缺血缺氧状态可诱导心肌细胞凋亡,存活心肌数量逐渐减少而出现左心室扩张、收缩功能减退以及左室重构^[4],加快心功能恶化进程,导致心力衰竭^[5]。氧化应激是导致心血管系统结构功能异常以及心力衰竭的重要因素,SOD 是生物体内重要的抗氧化酶,能够清除超氧阴离子自由基,心肌缺血时,SOD 的活性降低导致自由基堆积,氧自由基生成增加,又可导致 SOD 的消耗增加^[6];MDA 是体内脂质过氧化的代表产物之一,能够间接反映细胞氧化损伤的程度。NO 作为内皮细胞分泌的血管舒张因子,在神经信息传递、舒张血管、抑制血小板聚集、免疫应激等多方面发挥重要作用;ET-1 主要源于血管内皮,具有很强的血管收缩功能,维持血管基础张力,在心脑血管疾病中发挥重要作用^[7],并可引起血小板聚集、促进血管平滑肌细胞增生^[8]。

近年来研究发现,某些中药复方可通过多途径、多环节、多靶点影响疾病的进程,改善心肌梗死严重程度和预后。通心络是一种复方制剂,由水蛭、全蝎、蝉蜕、土鳖虫、蜈蚣、人参、赤芍、檀香、降香、制乳香、炒酸枣仁、冰片组成,具有益气通络止痛、活血化瘀的功效。研究证明,通心络可调节血管内皮功能^[9],减少缺血再灌注损伤^[10],改善心肌缺血,抑制左室重构,缓解症状,改善左心功能^[11],广泛应用于心血管疾病的防治。

本研究发现,通心络可抑制心肌细胞凋亡,并通过升高 SOD、NO 水平,降低 MDA、ET-1 水平,改善氧化应激状态和内皮功能,保护心肌组织。

参 考 文 献

- [1] 陆再英,终南山. 内科学[M]. 7 版. 北京:人民卫生出版社,2008:284.
- [2] 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.
- [3] 中华医学会心血管病学分会. 急性心肌梗死诊断和治疗指南[J]. 中华心血管病杂志,2001,29(12):710-725.
- [4] Prech M, Marszałek A, Schröder J, et al. Apoptosis as a mechanism for the elimination of cardiomyocytes after acute myocardial infarction[J]. Am J Cardiol, 2010, 105(9):1240-1245.
- [5] Yankey GK, Li T, Kilic A, et al. Regional remodeling strain and its association with myocardial apoptosis after myocardial infarction in an ovine model[J]. Thorac Cardiovasc Surg, 2008, 135(5):991-998.
- [6] Volkovova K, Chorvathova V, Jurcovicova M, et al. Antioxidative state of the myocardium and kidneys in acute diabetic rats[J]. Physiol Res, 1993, 42(2):251-254.
- [7] 庞洁,梁俊清. 津力达联合通心络对高糖诱导胰岛微血管内皮细胞损伤干预作用及机制研究[J]. 中国药理学通报, 2015, 31(3):430-435.
- [8] 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.
- [9] Liang JQ, Wu K, Jia ZH, et al. Chinese medicine Tongxinluo modulates vascular endothelial function by inducing eNOS expression via the PI-3 K/Akt/HIF-dependent signaling pathway[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2011, 133(2):517-523.
- [10] Li XD, Yang YJ, Geng YJ, et al. Tongxinluo reduces myocardial no-reflow and ischemia-reperfusion injury by stimulating the phosphorylation of eNOS via the PKA pathway[J]. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2010, 299(4):H1255-H1261.
- [11] 韩振祥,苏晓燕. 通心络胶囊对原发性肥厚型心肌病左室重构的疗效[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2005, 15(5):309.

(收稿日期: 2016-02-28)

(本文编辑: 董历华)

· 启事 ·

第三届全国悦读中医活动正式启动

在第二届全国悦读中医活动及首届全国“中医好声音”活动成功举办的基础上,由国家中医药管理局支持,中国中医药出版社、中华中医药学会、中国中医药报社、《生命时报》社、世界中医药学会联合会和中医科学院联合主办的第三届全国悦读中医活动已正式启动。欢迎广大作者和读者参加活动,从《第三届全国悦读中医活动推荐阅读精选作品目录》中选择作品进行阅读,创作自己的作品,并在 2016 年 7 月 20 日之前提交至邮箱:hqzyy@126.com,我刊将择优推荐至活动主办方。活动详情可登陆中国中医药出版社官网(www.cptcm.com)或关注活动官方微信平台“悦读中医”(ydzongyi)查看。咨询电话:010-64405912,64405392。

《环球中医药》杂志是本次活动的推荐阅读作品,读者可以在 www.hqzyy.com 网站下载本刊文章。