

益气活血方对心肌梗死后心力衰竭大鼠心功能的影响及其细胞凋亡机制

韩树山 吴爱明 张冬梅 吕唏滢 赵明镜 柴立民 聂波 金秋硕 赵一舟
王硕仁 娄利霞

【摘要】 目的 观察益气活血方对心肌梗死后心力衰竭大鼠心功能的影响并探讨其中的细胞凋亡机制。**方法** 将 50 只雄性 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、酒石酸美托洛尔组、益气活血小剂量组和益气活血大剂量组。所有组别均进行大鼠冠状动脉结扎术,假手术组不进行最后的冠状动脉结扎。益气活血方由人参、黄芪、当归按一定比例组成。酒石酸美托洛尔组按 12 mg/(kg·d) 给药剂量灌胃,益气活血小剂量组和大剂量组分别按 2 g/(kg·d) 和 20 g/(kg·d) 给药剂量灌胃,假手术组和模型组给予生理盐水灌胃。于造模后 24 小时开始,连续给药 8 周后进行小动物心动超声检测以及心脏组织取材 TUNEL 染色检测细胞凋亡。**结果** 小动物心动超声结果显示,与假手术组比,模型组大鼠的心脏 LVDd、LVDs 显著增加($P < 0.05$),LVEF%、LVFS% 显著降低($P < 0.05$)。与模型组比,给予益气活血方小剂量可以显著改善 LVEF%、LVFS% ($P < 0.05$),而大剂量益气活血方有改善 LVEF%、LVFS% 的趋势,但差异没有统计学意义($P > 0.05$)。大鼠心肌组织 TUNEL 染色表明,模型组大鼠心肌细胞 TUNEL 染色阳性细胞核显著增高(与假手术组比较, $P < 0.01$),益气活血小剂量和大剂量可以明显抑制冠状动脉结扎大鼠模型心肌组织细胞凋亡的发生($P < 0.05$; $P < 0.01$)。**结论** 益气活血方可以改善心肌梗死后心功能,抑制细胞凋亡的发生可能是其中重要的机制。

【关键词】 心力衰竭; 益气活血; 细胞凋亡; 心功能

【中图分类号】 R 541.6 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2013.07.003

Yiqi Huoxue Recipe on cardiac function in rats with heart failure after myocardial infarction and apoptotic mechanism in it HAN Shu-shan, WU Ai-ming, ZHANG Dong-mei, et al. Hebei tangshan fengrun district health epidemic prevention station, Tangshan 063000, China

Corresponding author: LOU Li-xia, E-mail: lixialou@163.com

【Abstract】 Objective To observe the effect of Yiqi Huoxue Recipe on cardiac function in rats with heart failure after myocardial infarction and to investigate the mechanism of the cell apoptosis. **Methods** 50 male SD rats were randomly divided into control group, model group, Betaloc group, Yiqi Huoxue low dose group and high dose group. All groups of rat were treated with coronary artery ligation operation, except control group without coronary artery ligation. Yiqi huoxue recipe composed of ginseng, astragalus and Angelica sinensis according to a certain proportion. Rats in Betaloc group were treated with 12 mg/(kg·d) Betaloc by gavage, and Yiqi Huoxue low dose and high dose group rats threatened respectively with 2 g/(kg·d) and 20 g/(kg·d) dosage Yiqi Huoxue Recipe by gavage. Control group and model group were given saline by gavage. All the treatment started after 24 hours after operation and for 8 weeks. Then the animals were detected with small animal heartbeat ultrasonic and the heart tissues were stained by TUNEL for apop-

基金项目:北京中医药大学自主选题(2011JYB22JS-010)

作者单位:063000 河北省唐山市丰润区卫生防疫站(韩树山);北京中医药大学东直门医院中医内科学教育部重点实验室和北京市重点实验室(吴爱明、张冬梅、吕唏滢、赵明镜、柴立民、聂波、金秋硕、赵一舟、王硕仁、娄利霞)

作者简介:韩树山(1975-),硕士,主治医师。研究方向:心血管内科。E-mail:hss77638@126.com

通讯作者:娄利霞(1975-),女,博士,副研究员。研究方向:中西医结合心血管。E-mail:lixialou@163.com

tos. **Results** Small animal heartbeat ultrasound results showed that model group rats cardiac LVDd, LVDs increased significantly ($P < 0.05$) and LVEF%, LVFS% decreased significantly ($P < 0.05$) compared with that of control group rats. Compared with model group, low dose Yiqi Huoxue Recipe can significantly improve LVEF%, LVFS% ($P < 0.05$), and high dose of Yiqi Huoxue Recipe can improve LVEF%, LVFS% trend, but the difference was not significant ($P > 0.05$). Rat myocardial tissue TUNEL staining showed that TUNEL positive myocardial cells of rats in the model group increased significantly compared with sham operation group, ($P < 0.01$), and low dose and high dose Yiqi Huoxue Recipe can inhibit the apoptosis of myocardial cells in rats with coronary artery ligation ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** Yiqi Huoxue Recipe composed of ginseng, astragalus and angelica can improve cardiac function after myocardial infarction in rats. Apoptosis inhibition is one of the most important mechanisms.

【Key words】 Heart failure; Yiqi Huoxue; Apoptosis; Heart function

心力衰竭是一个由于心脏结构或功能异常导致心室充盈或射血减少的复杂临床综合征。中医治疗心力衰竭具有一定的特色和优势。中医认为心力衰竭的病因病机为本虚标实、气虚阳虚为本,血瘀水泛为标。其中又以气虚血瘀为主。益气活血方以人参、黄芪、当归为组分,在以往的研究中证实可以降低心肌梗死的死亡率,提高冠状动脉粥样硬化性心脏病患者的运动耐量^[1]。为了进一步探讨益气活血方改善心功能的作用机制,本实验在在体的心力衰竭模型上,观察益气活血方处理对心力衰竭时心功能的影响及其细胞凋亡机制,以论证益气活血方对心力衰竭心脏的保护作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

雄性 SD 大鼠 50 只,体质量(200 ± 10)g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司。实验动物质量合格证号:SCXK(京)2009-0007。

1.2 药物的制备

益气活血方由人参 1 g、黄芪 13 g 和当归 6 g 组成,药物使用免煎颗粒,由北京康仁堂药业有限公司生产,购自北京中医药大学东直门医院。常温干燥保存。

1.3 仪器

RSP-1002 型呼吸机(Kent Scientific Corporation),心电示波仪(上海医学电子仪器厂 XJ-11 型),千分之一电子天平(上海精密科学仪器有限公司 JA1003N 型),中日合资 AloCa5000 彩色超声诊断仪,CL15-7 高频线阵探头(7-15MHz),BX60 荧光透射显微镜(日本 Olympus 公司),Spot II 数码成像系统(美国 Diagnostic Instruments 公司),IpWin5 图象分析软件。

1.4 动物模型制备^[2]

大鼠经 1% 戊巴比妥钠 50 mg/kg 体重腹腔麻醉后,背位固定,左胸前区备皮,消毒。经喉行气管插管术,连接呼吸机,80 次/分钟,潮气量 0.7~0.8 ml,在左侧第三四肋骨间横向切开皮肤约 1.5 cm,钝性分离肌层,沿第三四肋骨间隙打开胸腔,开胸器固定。打开心包,暴露心脏。在动脉圆锥左心耳之间下方约 2 mm 处用 5/0 线结扎左冠状动脉前降支。当心电图 I 导联显示 ST 段显著抬高后,重置心脏于胸腔,并立即分层缝合胸壁。术后注射青霉素(80 万单位/只)连续 3 天。假手术组手术过程同上,但只穿线不结扎左冠状动脉。模型组和假手术组动物术后常规饲养。

1.5 动物分组及给药

大鼠左冠状动脉结扎手术死亡率 20%。成活的模型大鼠随机分为益气活血低剂量组、益气活血高剂量组、生理盐水对照组和西药对照组(酒石酸美托洛尔),每组 8 只。按如下方法给药:益气活血低剂量组按 2 g/(kg·d)给药剂量灌胃,益气活血高剂量组按 20 g/(kg·d)灌胃,酒石酸美托洛尔组按 12 mg/(kg·d)给药剂量灌胃,生理盐水对照组和正常组大鼠给以和治疗组同等容积的生理盐水灌胃,每日一次,于造模后 24 小时开始,连续给药 8 周后进行小动物心动超声检测以及心脏组织取材。

1.6 检测指标

1.6.1 大鼠超声心动图测定 大鼠连续给药 8 周后,1% 戊巴比妥钠 50 mg/kg 体重腹腔麻醉,仰卧位固定于鼠板,胸部备皮,应用超声诊断仪和高频线阵探头检测心脏结构和功能。心脏的检测:取胸骨旁左室长轴切面,由二维超声引导 M 型曲线进行测量。超声测定指标:(1)左室后壁舒张末期厚度(left ventricular posterior wall end-diastole thickness,

表 1 大鼠冠状动脉结扎后益气活血方干预 8 周心动超声检测的形态学指标($\bar{x} \pm s$)

组别	n	左室后壁舒张末厚度 (LVPWTd)(cm)	左室后壁收缩末厚度 (LVPWTs)(cm)	室间隔舒张厚度 (IVSTd)(cm)	室间隔收缩厚度 (IVSTs)(cm)	左室舒张末期内径 (LVDd)(cm)	左室收缩末期内径 (LVDs)(cm)
假手术组	8	0.17 ± 0.03	0.28 ± 0.04	0.15 ± 0.03	0.32 ± 0.05	0.70 ± 0.05	0.36 ± 0.05
模型组	8	0.19 ± 0.03	0.25 ± 0.03	0.17 ± 0.05	0.24 ± 0.07 ^a	0.81 ± 0.09 ^b	0.58 ± 0.07 ^b
酒石酸美托洛尔组	8	0.22 ± 0.06	0.27 ± 0.06	0.16 ± 0.04	0.21 ± 0.07	0.84 ± 0.09	0.60 ± 0.09
益气活血小剂量组	8	0.21 ± 0.04	0.29 ± 0.06	0.18 ± 0.02	0.27 ± 0.06	0.81 ± 0.11	0.51 ± 0.13
益气活血大剂量组	8	0.20 ± 0.03	0.26 ± 0.03	0.18 ± 0.03	0.25 ± 0.08	0.85 ± 0.04	0.59 ± 0.10

注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$

LVPWTd)、左室后壁收缩末期厚度(left ventricular posterior wall end-systolic thickness, LVPWTs)、室间隔舒张末期厚度(interventricular septum end-diastolic thickness, IVSTd)、室间隔收缩末期厚度(interventricular septum end-systolic thickness, IVSTs); (2)左室舒张末期内径(left ventricular end-diastolic diameter LVDd)、左室收缩末期内径(left ventricular end-systolic diameter LVDs); (3)左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)左室短轴缩短分数(left ventricular fractional shortening, LVFS)。以上每一项超声测定指标均取 3 个测量值后取平均值。

1.6.2 大鼠脏器比值的测定 大鼠连续给药 8 周,实验完毕后剪取大鼠心脏,用生理盐水冲洗残余的血液,轻轻挤出残余液体,用电子天平称量全心重量(HW),计算心脏脏器比值。心脏脏器比值(mg/g) = 全心重量(HW)/体重(g)

1.6.3 TUNEL 染色(参照武汉博士德生物制品公司试剂盒说明) 石蜡切片常规脱蜡至水,3%过氧化氢,室温处理 10 分钟后蛋白酶 K 37℃消化 10 分钟。新鲜配制标记缓冲液 37℃孵育 2 小时,封闭液室温封闭 30 分钟。生物素化地高辛抗体 37℃反应 30 分钟,0.01 mol/L TBS 洗。链霉亲和素-过氧化物酶(SABC)37℃反应 30 分钟,0.01 mol/L TBS 洗 5 分钟×4 次。加 3,3'-二氨基苯联胺(DAB)显色。轻度苏木素复染细胞核。脱水,透明,封片光镜检查。用 PBS 做阴性对照,阳性为棕黄色。选取非梗死区域进行 TUNEL 阳性细胞占总细胞的百分比计数。

1.7 统计学处理

实验结果均以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多样本均数间比较采用 One-way ANOVA 检验,组间比较采用 Student-Newman-Keuls 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠术后给药 8 周心动超声检测

通过小动物超声心动图观察检测心脏结构变化及其收缩和舒张功能。在冠状动脉结扎术后 8 周,大鼠的心脏结构发生了重构,与假手术组比,模型组大鼠的心脏 LVDd、LVDs 显著增加($P < 0.05$),与模型组相比,各药物组对超声心动的各形态学指标没有影响($P > 0.05$)。与假手术组比,模型组大鼠的心脏 LVEF%、LVFS% 显著降低($P < 0.05$),与模型组比,给予益气活血方小剂量可以显著改善 LVEF%、LVFS% ($P < 0.05$),而大剂量益气活血方有改善 LVEF%、LVFS% 的趋势,但差异没有统计学意义($P > 0.05$)。见表 1、表 2。

表 2 大鼠冠状动脉结扎后益气活血方干预 8 周心动超声检测的功能学指标($\bar{x} \pm s$)

组别	n	左室射血分数 (LVEF)(%)	左室短轴缩短分数 (LVFS)(%)
假手术组	8	86.70 ± 3.03	51.33 ± 3.89
模型组	8	57.13 ± 13.53 ^a	28.35 ± 8.55 ^a
酒石酸美托洛尔组	8	61.16 ± 9.95	30.86 ± 5.31
益气活血小剂量组	8	72.74 ± 9.99 ^b	38.15 ± 8.26 ^b
益气活血大剂量组	8	63.60 ± 12.38	31.05 ± 8.51

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

2.2 大鼠脏器比值

术后给药 8 周,测定大鼠心脏的脏器比值作为评价心肌重构的指标。模型组脏器比值高于假手术组,但是两组之间差异无统计学意义($P > 0.05$),给予酒石酸美托洛尔及益气活血方都有降低大鼠脏器比值的趋势,但差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 3。

表 3 各组动物心脏脏体比值($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	脏体比值 (mg/g)
假手术组	8	0.29 ± 0.04
模型组	8	0.33 ± 0.04
酒石酸美托洛尔组	8	0.30 ± 0.05
益气活血小剂量组	8	0.29 ± 0.02
益气活血大剂量组	8	0.31 ± 0.03

2.3 TUNEL 染色方法检测给药 8 周后大鼠心肌组织的细胞凋亡

每组动物随机选取 6 只,做组织切片,进行 TUNEL 凋亡染色。假手术组(A)大鼠的心肌细胞细胞凋亡阳性染色很少,模型组大鼠(B)心肌细胞 TUNEL 染色阳性细胞核显著增高(与假手术组比较, $P < 0.01$),酒石酸美托洛尔可以明显抑制冠状动脉结扎大鼠模型心肌细胞凋亡的发生(与模型组比较, $P < 0.05$)。益气活血小剂量(C)和大剂量(D)也可以明显抑制冠状动脉结扎大鼠模型心肌组织细胞凋亡的发生($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$)。见图 1、表 4。

表 4 TUNEL 染色方法检测给药 8 周后大鼠心肌组织的细胞凋亡阳性率($\bar{x} \pm s$)

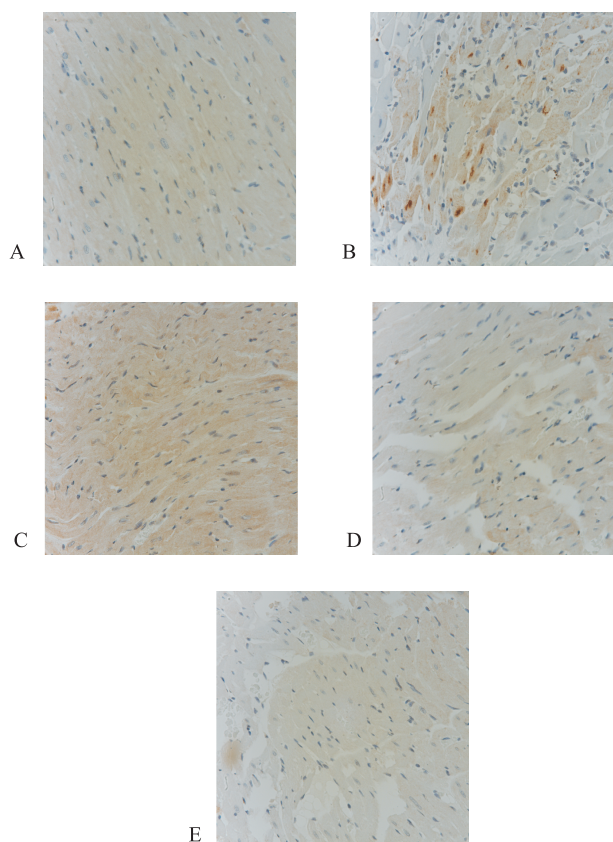
组别	<i>n</i>	心肌细胞凋亡阳性率 (%)
假手术组	6	1.97 ± 1.27
模型组	6	8.86 ± 2.35 ^a
酒石酸美托洛尔组	6	5.99 ± 1.70 ^b
益气活血小剂量组	6	5.96 ± 2.41 ^b
益气活血大剂量组	6	3.86 ± 1.55 ^c

注:与假手术组比较, ^a $P < 0.01$;与模型组比较, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$ 。由于每组有 2 只动物取材专门用做氧化应激损伤及分子生物学实验,故该检测指标样本量为 6。

3 讨论

细胞凋亡是生物体内一种与细胞坏死截然不同的自杀程序,是在基因控制下的主动死亡。研究表明心肌梗死后心室重构和心肌由代偿性肥厚到心力衰竭转变过程中存在心肌细胞凋亡现象。心肌细胞的缺失(死亡和凋亡)和心室重构是心功能下降的最主要的原因^[3]。中医针对心力衰竭气虚血瘀的基本病机,使用益气活血方可以改善心肌梗死后心功能^[4]。

本研究在大鼠冠状动脉结扎模型上,给以由黄芪、人参、当归组成的益气活血方,8 周后测定心功



A 假手术组;B 模型组;C 酒石酸美托洛尔组;
D 益气活血小剂量组;E 益气活血大剂量组

图 1 冠状动脉结扎大鼠模型给药 8 周后心肌组织 TUNEL 染色

能及心肌组织细胞凋亡。结果表明:此方药可以减轻心肌梗死后的心室重构,改善心功能。与模型组比,给予益气活血方小剂量可以显著改善 LVEF%、LVFS% ($P < 0.05$),大剂量益气活血方有改善 LVEF%、LVFS% 的趋势,但差异没有统计学意义($P > 0.05$)。这个结果可能与模型制备的手术操作较为复杂和实验动物的例数限制有关。心肌组织的 TUNEL 染色结果还显示此益气活血方抑制了细胞凋亡的发生,这可能是此方药减轻心肌梗死后的心室重构,改善心功能的重要机制。

本实验所用益气活血方的主要成分黄芪为益气药,大量研究表明黄芪对缺血心肌有多重保护作用。它保护线粒体及溶酶体的功能、能够增加 cAMP 的含量、降低心肌耗氧量,增加心肌抗缺氧能力,另外黄芪还具有消除自由基的作用^[5]。此方药的另一主要成分人参及其提取物人参皂苷被证实能改善心肌缺血、缩小梗死面积,对缺血再灌注损伤有明显的保护作用。有研究提示,人参可通过抑制缺血再灌注损伤诱导的心肌细胞凋亡而发挥其

保护作用^[6]。细胞凋亡发生的途径有多种,包括细胞外途径,线粒体途径和内质网途径。多种蛋白分子 Fas, bcl-2, Bax, CHOP 等参与其中^[7]。但是此益气活血方抑制心肌梗死后心肌细胞凋亡的具体分子机制还需要进一步的深入研究。

参 考 文 献

- [1] 廖家桢. 气血理论在冠心病辨证论治中的应用[J]. 天津中医, 1985, 2(1): 33-36.
- [2] Barr DJ, Green HJ, Lounsbury DS, et al. Na⁺-K⁺-ATPase properties in rat heart and skeletal muscle 3 mo after coronary artery ligation[J]. J Appl Physiol, 2005, 99(2): 656-664.

- [3] 吴立玲. 心血管病理生理学[M]. 北京: 北京医科大学出版社, 2000: 68.
- [4] 赵明镜, 王硕仁, 李敏, 等. 早期应用活血和益气中药抑制心衰大鼠左室重构和凋亡的对比研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(8): 710-714.
- [5] 吴发宝, 陈希元. 黄芪药理作用研究综述[J]. 中药材, 2004, 27(3): 232-234.
- [6] 曾和松, 刘正湘, 刘晓春. 人参对大鼠缺血再灌注后心肌细胞凋亡的抑制作用[J]. 中国临床康复, 2004, 8(9): 1784-1786.
- [7] Adams JM. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis[J]. Genes Dev, 2003, 17(20): 2481-2495.

收稿日期: 2013-05-27)

(本文编辑: 刘群)

丹参多酚酸盐对大鼠骨髓间充质干细胞增殖及血管内皮生长因子表达的影响

王晓娟

【摘要】 目的 观察中药丹参多酚酸盐对 SD 大鼠骨髓间充质干细胞的增殖及血管内皮生长因子(VEGF)表达的影响,以探讨其对促骨折愈合的可能机制。**方法** 将 0.5 mg/ml 浓度丹参多酚酸盐与大鼠骨髓间充质干细胞共培养,对照组为无药物单位培养的大鼠骨髓间充质干细胞。培养 48 小时镜下观察细胞情况,1、3、5、7 天行 MTT 检测细胞增殖情况。行实时荧光定量 PCR 检测方法,对培养 7 天的两组细胞的 VEGF mRNA 水平进行检测分析。**结果** 共培养 48 小时后骨髓间充质干细胞生长密集程度明显优于对照组;MTT 检测也显示实验组细胞增殖情况优于对照组;实验组 VEGF mRNA 表达高于对照组。**结论** 丹参多酚酸盐能促大鼠骨髓间充质干细胞增殖,并提高其 VEGF 的表达。可能是其促骨折愈合的作用机制之一。

【关键词】 丹参多酚酸盐; 骨髓间充质干细胞; 增殖; 血管内皮生长因子

【中图分类号】 R 285.6 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2013.07.004

Effect of salvianolate on cell proliferation and levels of VEGF of rat bone marrow mesenchymal stem cells Wang Xiao-juan. Department of pharmacy and apparatus, NO. 23 hospital of PLA, 830002 Urumqi, China

Corresponding author: Wang Xiao-juan, E-mail: wangxiaojuan491@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the possible fracture healing mechanism of salvianolate through improving of proliferation and vascular endothelial growth factor(VEGF) levels of rat bone marrow mesenchymal stem cells(BMSC). **Method** This experiment adopted the method of cell culture in vitro. Salvianolate(0.5mg/ml) was co-cultured with rat BMSCs, BMSCs was cultured without Salvianolate as the control. The growth of the cells was observed under the microscope after 48 hours after culture. 1, 3, 5, 7 days later, MTT was used to detect the cell proliferation. VEGF mRNA levels of BMSCs were detected and analysed by quantitative real time polymerase chain reaction(qRT-PCR) at 7 days after cell culture.

作者单位: 830002 乌鲁木齐, 解放军第 23 医院药械科

作者简介: 王晓娟(1972 -), 女, 本科, 主管药师。研究方向: 药理研究及临床应用。E-mail: wangxiaojuan491@126.com