

## 淫羊藿总黄酮对大鼠急性心肌梗死后缺血心肌血管新生作用的影响

白晓君<sup>1</sup>, 任建勋<sup>2</sup>, 张卫萍<sup>1\*</sup>

(1. 西安交通大学第一附属医院, 西安 710061; 2. 中国中医科学院西苑医院, 北京 100091)

**[摘要]** **目的:**研究淫羊藿总黄酮在大鼠急性心肌梗死后对缺血心肌血管新生的促进作用,探讨其在抗心肌缺血,改善心功能方面的分子生物学机制。**方法:**采用大鼠冠状动脉左前降支结扎的方法建立大鼠急性心肌梗死模型。雄性SD大鼠随机分为假手术组、心肌梗死模型组,地尔硫卓组(10 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)和淫羊藿总黄酮高、低剂量组(200, 100 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>),每组8只。模型组、假手术组均给予同体积生理盐水干预。手术成功后开始每天灌胃1次,共7 d。给药结束后,采用小动物超声影像系统检测各组大鼠心脏结构与功能;苏木素-伊红(HE)染色法观察大鼠心肌缺血区病理改变;免疫组化法检测大鼠缺血心肌组织CD31与 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)表达变化;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠心肌组织血管内皮生长因子受体2(VEGF-R2)表达和蛋白激酶B磷酸化(p-Akt)水平;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)法检测心肌缺血部位血管内皮生长因子(VEGF)与碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)mRNA的表达变化。**结果:**与假手术组比较,模型组大鼠心脏左室收缩末期内径(LVIDs),左室舒张末期内径(LVIDd),左室收缩末期容积(LVEVs)和左室舒张末期容积(LVEVd)均显著增加,而左室前壁收缩末期厚度(LVAWs),左室前壁舒张末期厚度(LVAWd),左室后壁收缩末期厚度(LVPWs),每搏输出量(SV),射血分数(EF),短轴缩短率(FS)和心输出量(CO)显著下降,心肌缺血组织出现显著病理性改变,而CD31与 $\alpha$ -SMA表达显著降低( $P<0.01$ );同时p-Akt水平,VEGF-R2蛋白表达,VEGF与bFGF mRNA表达也显著下降( $P<0.01$ )。与模型组比较,淫羊藿总黄酮高剂量组大鼠心肌缺血病理变化明显改善;心脏LVIDs, LVIDd, LVEVs和LVEVd均明显下降,而LVAWs, LVAWd, LVPWs, SV, EF, FS和CO明显增加,心肌缺血组织CD31与 $\alpha$ -SMA表达升高( $P<0.05, P<0.01$ );同时p-Akt水平,VEGF-R2蛋白表达以及VEGF与bFGF mRNA表达也明显增加( $P<0.05, P<0.01$ )。**结论:**淫羊藿总黄酮能够通过上调急性心肌梗死后缺血心肌bFGF, VEGF及其受体VEGF-R2表达,激活磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/Akt/VEGF细胞信号传导通路促使缺血心肌血管新生,从而改善心肌梗死区周边心肌有效灌注不足,减缓急性心肌梗死后心室重构和心力衰竭的发展。

**[关键词]** 淫羊藿总黄酮; 急性心肌梗死; 血管新生; 大鼠

**[中图分类号]** R2-0; R22; R285.5; R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)12-0040-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20211201

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210415.1041.001.html>

**[网络出版日期]** 2021-4-15 11:03

## Effect of Epimedii Folium Total Flavonoids on Angiogenesis of Ischemic Myocardium in Rats After Acute Myocardial Infarction

BAI Xiao-jun<sup>1</sup>, REN Jian-xun<sup>2</sup>, ZHANG Wei-ping<sup>1\*</sup>

(1. First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China;

2. Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effect of total flavonoids from Epimedii Folium (TEF) on the angiogenesis of ischemic myocardium in rats after acute myocardial infarction (AMI) and discuss its molecular biological mechanism of attenuating myocardial ischemia and improving cardiac function. **Method:** AMI in rats

**[收稿日期]** 20210220(005)

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(81973507)

**[第一作者]** 白晓君, 博士, 副主任医师, 从事冠心病的基础与临床研究, E-mail: 156422472@qq.com

**[通信作者]** \* 张卫萍, 博士, 副主任医师, 从事冠心病发病机制与临床诊疗研究, E-mail: doeping@qq.com

was induced through the ligation of left anterior descending coronary artery. All male SD rats were randomized into sham-operated group, model group, diltiazem group ( $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ), and TEF low-dose and high-dose groups ( $100$  and  $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ), with 8 rats in each group. After modeling, rats in the diltiazem group and TEF groups were given corresponding doses of diltiazem and TEF, respectively, and those in the model group and sham-operated group received normal saline of equivalent volume, once a day for 7 days. After the administration, VisualSonics Vevo2100 imaging system was used to detect the cardiac structure and function and hematoxylin-eosin (HE) staining to observe the histomorphological changes in myocardial ischemic area. Immunohistochemistry was employed to analyze the expression of CD31 and  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) in ischemic myocardium and Western blot to detect the expression of vascular endothelial growth factor-receptor 2 (VEGF-R2) and phosphorylation of protein kinase B (Akt) in ischemic myocardium. Real-time PCR was applied to quantify the mRNA levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF). **Result:** Compared with the sham-operated group, the model group demonstrated significant increase in left ventricular systolic diameter (LVIDs), left ventricular internal diameter at end-diastole (LVIDd), left ventricular end-systolic volume (LVEVs), and left ventricular end-diastolic volume (LVEVd), significant decrease in End-systolic thickness of left ventricular anterior wall (LVAWs), end-diastolic thickness of left ventricle anterior wall (LVAWd), end systolic thickness of left ventricular posterior wall (LVPWs), stroke volume (SV), ejection fraction (EF), fractional shortening (FS), and cardiac output (CO), obvious pathological changes in the ischemic myocardium, and plummet of the expression of CD31 and  $\alpha$ -SMA ( $P < 0.01$ ), Akt phosphorylation level, protein level of VEGF-R2, and mRNA levels of VEGF and bFGF ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). High-dose TEF significantly alleviated the pathological changes of ischemic myocardium as compared with the model group. Moreover, TEF high-dose group showed significantly lower levels of LVIDs, LVIDd, LVEVs, and LVEVd, significantly higher levels of LVAWs, LVAWd, LVPWs, SV, EF, FS, and CO, higher expression of CD31 and  $\alpha$ -SMA ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), and higher levels of VEGF-R2 protein, phosphorylated Akt, and VEGF and bFGF mRNA than the model group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** TEF can effectively improve myocardial perfusion in peri-myocardial infarction area and attenuate ventricular remodeling and heart failure after AMI by up-regulating the expression of bFGF, VEGF, and VEGF-R2 in ischemic myocardium following AMI and activating phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K)/Akt/VEGF signaling transduction pathway which can promote angiogenesis in ischemic myocardium.

[Key words] total flavonoids from *Epimedii Folium*; acute myocardial infarction; angiogenesis; rat

急性心肌梗死(AMI)是由于冠状动脉粥样硬化斑块破裂,促进动脉内血栓形成,导致血管腔严重狭窄或闭塞,冠状动脉的血流急剧减少或中断,心肌因急性、持续性缺血缺氧而出现的大量的、不可逆性坏死,多表现为心源性休克、恶性心律失常及心力衰竭,是心血管疾病死亡的首要原因。尽管包括经皮冠状动脉成形(PCI)与冠状动脉搭桥术(CABG)在内的侵入性治疗能够部分恢复心肌血流再灌注,有效地减少死亡率<sup>[1-2]</sup>;但是这些方法并不能抑制AMI后心肌坏死介导的心室重构和心力衰竭的发展<sup>[3]</sup>。因此进一步的改善AMI后缺血心肌的血供,促进缺血区域的血运重建成为临床缺血性心血管治疗和研究的重点关注领域。血管生成是心肌缺血后对心肌损伤反应修复的一种重要补偿

机制,而近年来采用多种手段促进血管新生在AMI治疗中的根本作用也逐渐得到认可。研究显示,治疗性血管新生作为一种潜在的治疗策略通过促使心肌梗死周边缺血区域血管新生,增加毛细血管密度,提高缺血心肌的血流,从而改善梗死后心室重构和心功能<sup>[4]</sup>。在AMI模型中给予外源性血管原性生长因子干预,间充质干细胞或诱导性多功能干细胞移植均能够促血管新生,加速缺血心肌的血运重建并改善心室重构<sup>[5-6]</sup>。

中药对心肌梗死后血管新生也具有一定的促进作用。既往研究显示,阿魏酸,丹酚酸B,丹参酮II<sub>A</sub>,红景天苷等中药单体及活血化瘀类方药均被证实能够促进血管新生,建立侧支循环,从而通过改善心脏血液供应,达到保护缺血心肌的作用<sup>[7-9]</sup>。淫

羊藿总黄酮是中药淫羊藿的主要有效部分。研究显示淫羊藿有效成分能够通过磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)与细胞外信号调节激酶1/2(ERK1/2)途径促进脑缺血后脑内微血管新生<sup>[10]</sup>;并可体外刺激内皮细胞增殖、迁移及微管形成,在体诱导血管生成<sup>[11]</sup>。前期研究显示,淫羊藿总黄酮抑制AMI过程中缺血再灌注导致的氧化应激反应,减轻心肌细胞不可逆性损伤,维护心肌组织正常功能<sup>[12]</sup>。但是对AMI后心肌缺血区域血管新生的影响未见报道。本研究通过建立大鼠AMI模型,观察淫羊藿总黄酮对心肌梗死后心功能变化及缺血心肌血管新生的作用,从蛋白激酶B(Akt)磷酸化依赖的血管内皮生长因子(VEGF)途径探讨其作用机制,为临床心肌缺血后心室重构及慢性心力衰竭病理生理过程的干预提供实验基础。

## 1 材料

**1.1 动物** SD大鼠50只,SPF级,雄性,体质量180~200 g,由斯贝福(北京)实验动物科技有限公司提供,合格证号SCXK(京)2019-0010。实验动物分笼饲养,昼夜循环12 h,室温22~25 °C,空气湿度60%~70%,动物自由进食和饮水。动物实验获中国中医科学院西苑医院实验动物伦理委员会批准,编号2019XLC014。

**1.2 药物与试剂** 淫羊藿总黄酮胶囊(0.35 g/粒,含有淫羊藿总黄酮提取物309 mg,江苏康缘阳光药业有限公司,国药准字Z20140012);盐酸地尔硫卓片(合心爽,50 mg/片,天津田边制药有限公司,批号1107050);戊巴比妥钠(北京化学试剂公司,批号020402);兔抗大鼠血管内皮生长因子受体2(VEGF-R2)多克隆抗体,兔抗大鼠CD31单克隆抗体,兔抗大鼠 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)单克隆抗体,兔抗大鼠Akt多克隆抗体,兔抗大鼠Akt磷酸化多克隆抗体(磷酸化Thr308)(美国Abcam公司,批号分别为ab39542, ab24590, ab32575, ab8805, ab38449);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体,辣根过氧化物酶标记羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(北京博奥森生物技术有限公司,批号分别为bs-0755R和bs-40295G);trizol试剂(美国Invitrogen公司,批号13719);PrimeScript™反转录试剂盒,PCR扩增试剂盒Premix EX Taq™ II(日本Takara公司,批号分别为AK3902, AKA1002);苯甲基磺酰氟(PMSF),高效RIPA组织/细胞快速裂解液,聚氰基丙烯酸正丁酯(BCA)蛋白测定试剂盒,牛血清白蛋白,苏木素-伊红(HE)染色液(北京索莱宝生物科技有限公司,

批号20191226, 20190617, 20190429, 913Z054, 20190125);十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)电泳缓冲液,转膜缓冲液,TBST冲洗液(北京酷来搏科技有限公司,批号分别为PM29171830, PM26153002, PM29202136);多聚甲醛(北京化学试剂公司,批号990106);超敏增强化学发光法(ECL)化学发光试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号P0018AS);聚偏氟乙烯(PVDF)膜(美国Millipore公司,批号IPVH00010)。

**1.3 仪器** ALC-V8型小动物呼吸机(上海奥尔科特生物技术有限公司);VisualSonics Vevo2100型小动物超声影像系统(日本富士胶片有限公司);Mini-PROTEAN型蛋白垂直电泳系统,GelDoc XR+凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司);Nikon 501型光学显微镜(日本Nikon公司);RM2235型石蜡切片机(德国Leica公司);ZKPJ-1A型展烤片机(天津天利航空机电有限公司);ABI 7500型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国Thermo科技公司)。

## 2 方法

**2.1 大鼠AMI模型的建立** 参考文献[13]方法,采用大鼠冠状动脉左前降支结扎的方法建立大鼠AMI模型。大鼠采用1%戊巴比妥钠(45 mg·kg<sup>-1</sup>)尾静脉注射进行麻醉,大鼠仰卧位固定至鼠板。分离颈部正中皮肤、皮下组织,直视下由口腔将自制塑料气管导管插入大鼠气管4~5 cm,连接小动物呼吸机进行辅助呼吸。随后沿左侧第4肋间斜形切口开胸,钝性分离肌肉及肋骨,分开肋骨后小心挑开心包膜,暴露心脏并按压胸腹挤出心脏,在肺动脉圆锥和左心耳之间,于冠状动脉左前降支根部穿线(0号缝合线)以备结扎,待大鼠稳定5 min后行冠状动脉左前降支结扎。心脏直视下观察到心脏表面由红润变为苍白,同时大鼠心电图ST段显著上升或降低为心肌梗死模型成功。假手术组大鼠仅在冠状动脉左前降支根部穿线并抽出,不进行血管结扎。各组大鼠完成手术后观察大鼠的呼吸和心跳,随后逐层缝合胸壁,回笼正常饮食、饮水喂养。

**2.2 分组与给药** 将AMI模型成功大鼠随机分为4组,每组8只,分别为心肌梗死模型组,阳性药地尔硫卓组(10 mg·kg<sup>-1</sup>),淫羊藿总黄酮低剂量组(100 mg·kg<sup>-1</sup>)及淫羊藿总黄酮高剂量组(200 mg·kg<sup>-1</sup>),淫羊藿总黄酮给药剂量参考前期实验研究结果<sup>[12]</sup>。同时假手术组大鼠8只。以上各组采用的干预药物均以生理盐水配至所需浓度,给药

体积为 10 mL·kg<sup>-1</sup>,假手术组和模型组大鼠则给予等体积生理盐水。于手术成功后连续灌胃给药 7 d, 1次/d,灌胃期间各组大鼠饮水、饲料不限。7 d后进行各项指标检测。

### 2.3 指标检测

**2.3.1 心脏超声检测** 实验结束后,各组大鼠麻醉后仰卧固定,胸部左侧锁骨至肋骨下缘脱毛后将MS201探头定位在乳头肌水平长轴切面,频率设定为17.5 MHz,选用左室长轴切面M超测量检测心率(HR),射血分数(EF),短轴缩短率(FS),每搏输出量(SV),心输出量(CO),左室收缩末期容积(LVEVs),左室舒张末期容积(LVEVd),左室前壁收缩末期厚度(LVAWs),左室前壁舒张末期厚度(LVAWd),左室后壁收缩末期厚度(LVPWs),左室后壁舒张末期厚度(LVPWd),左室舒张末期内径(LVIDd),左室收缩末期内径(LVIDs),各项指标均连续测量3个周期,取平均值。

**2.3.2 HE染色观察心肌缺血组织病理变化** 各组大鼠在实验结束后麻醉,将左肋剪开,暴露并取出心脏,于心脏结扎线下远心端1/3处取心脏组织放入4%多聚甲醛固定。乙醇梯度脱水,石蜡包埋,连续切片,每片厚度为4 μm。切片用二甲苯、乙醇梯度脱蜡后苏木素染色5 min,蒸馏水冲洗后用盐酸乙醇分化30 s,温水浴浸泡5 min,伊红复染5 min,最后常规脱水,透明及中性树脂封片,光镜下观察。

**2.3.3 免疫组化检测心肌缺血区α-SMA与CD31的表达** 实验结束后,采用SP三步法进行心肌缺血区域α-SMA及VEGF-R表达的分析。包埋心肌组织的蜡块经过连续切片后,置烤箱60℃15 min使切片紧密黏附,在切片上滴加修复液,高压进行抗原修复2次,15 min/次,自然冷却至室温,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗3次,每次5 min;滴加3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液,37℃孵育20 min后PBS冲洗3次,每次5 min。随后加入细胞膜打孔剂(0.3% TritonX-100溶液),PBS冲洗,山羊血清封闭30 min,滴加一抗α-SMA(1:500)和VEGF-R(1:500)后置于湿盒4℃过夜,PBS冲洗。随后加入二抗(1:300)37℃孵育1 h,PBS洗涤3次。采用DAB法进行镜下显色,PBS漂洗终止染色。随后进行梯度乙醇脱水、二甲苯透明、中性树脂封片。各组分别随机选取切片,100倍光镜下拍照,并采用Image J分析软件进行定量分析,测定平均积分吸光度IA进行统计学分析。

**2.3.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测心肌缺血区VEGF-R2与Akt磷酸化(p-Akt)蛋白表达** 将

心肌缺血组织用生理盐水冲洗、称质量,加入含有PMSF的RIPA组织裂解液匀浆后进行冰上孵育30 min。4℃,1万r·min<sup>-1</sup>离心20 min(离心半径),取上清。采用BCA法进行样品蛋白浓度定量。每样本取总蛋白30 μg,应用SDS-PAGE进行电泳分离VEGF-R2与Akt磷酸化蛋白,分离胶浓度为12%。随后,转膜90 min至甲醇处理后的PVDF上。转印后PVDF膜采用含5%牛血清白蛋白的TBST封闭液在室温条件下震荡封闭1 h,随后加入一抗GADPH(1:2 500),VEGF-R2(1:3 000)和Akt(1:3 000),4℃孵育过夜。过夜后TBST清洗PVDF膜3次,15 min/次,随后加入二抗(1:2 000)室温孵育1 h,TBST洗膜3次,5 min/次;最后加入ECL化学发光反应液置于凝胶成像系统中进行显影。采用Image J软件测定目的蛋白灰度值,以内参蛋白GADPH和目的蛋白比值表示蛋白相对表达量。

**2.3.5 Real-time PCR检测心肌缺血区VEGF和碱性成纤维细胞生长因子(bFGF) mRNA表达** 采用trizol方法提取各组心肌组织样本总mRNA,采用DNA酶除去DNA影响后,逆转录试剂盒合成cDNA,β-激动蛋白(β-actin)为内参。加入合成的PCR引物,对缺血心肌组织中特定的基因序列进行PCR扩增。PCR扩增条件为94℃预变性15 min,然后按95℃30 s,60℃30 s,75℃30 s进行40个循环,计算ΔΔC<sub>t</sub>,以2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup>表示VEGF和bFGF mRNA相对表达量。引物序列由生物工程(上海)股份有限公司合成,见表1。

表1 PCR引物序列

Table 1 Primer sequences of PCR

引物	序列(5'-3')	长度/bp
VEGF	上游 CCACTTCTGAGGAGCCTAGG	216
	下游 CACACACACAGCCAAGTCTC	
bFGF	上游 CACTTCAAGGATCCCAAGCG	184
	下游 TCATAGCCAGGTACCGGTTTC	
β-actin	上游 TGGCTCTAACAGTCCGCCTAG	295
	下游 AGTGCGACGTGGACATCCG	

**2.4 统计学分析** 实验数据采用SPSS 16.0软件进行统计,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组实验数据通过方差齐性检验后,多组间比较用单因素方差分析;两两比较采用两独立样本t检验分析,P<0.05为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 对AMI大鼠心脏结构与功能的影响** 与假手术组比较,模型组大鼠LVIDs, LVIDd, LVEVs,

LVEVd明显增加, LVAWs, LVAWd, LVPWs, SV, EF, FS, CO明显下降( $P<0.05, P<0.01$ )。与模型组比较, 地尔硫卓组大鼠LVIDs, LVIDd, LVEVs, LVEVd明显下降, LVAWs, LVAWd, LVPWs, SV, EF, FS, CO明显增加( $P<0.05, P<0.01$ ); 淫羊藿总黄

酮低剂量组大鼠LVIDs和LVEVs明显下降, EF和FS明显增加( $P<0.05$ ); 高剂量组大鼠LVIDs, LVIDd, LVEVs, LVEVd明显下降, LVAWs, SV, EF, FS明显增加( $P<0.05, P<0.01$ ), 差异有统计学意义。见表2~4和图1。

表2 淫羊藿总黄酮对AMI大鼠左心室体积和内径的影响( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

Table 2 Effect of total flavonoids from Epimedii Folium (TEF) on left ventricular volume and diameter in AMI rats ( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	HR/bpm	LVIDs/mm	LVIDd/mm	LVEVs/ $\mu$ L	LVEVd/ $\mu$ L
假手术		423.32±52.08	3.21±0.47	6.25±0.51	36.54±10.85	215.82±40.23
模型		445.25±85.28	7.08±0.69 <sup>2)</sup>	8.64±0.69 <sup>2)</sup>	298.85±68.30 <sup>2)</sup>	410.30±93.32 <sup>2)</sup>
地尔硫卓	10	478.46±42.15	4.15±1.21 <sup>4)</sup>	6.65±0.71 <sup>4)</sup>	89.95±60.55 <sup>4)</sup>	245.48±62.00 <sup>4)</sup>
淫羊藿总黄酮	100	470.68±61.74	5.81±1.47 <sup>3)</sup>	7.72±1.60	195.65±113.23 <sup>3)</sup>	367.55±158.60
	200	423.32±58.72	4.88±2.12 <sup>4)</sup>	7.32±0.75 <sup>4)</sup>	136.62±109.80 <sup>4)</sup>	295.74±69.85 <sup>4)</sup>

注: 与假手术组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ , <sup>2)</sup> $P<0.01$ ; 与模型组比较<sup>3)</sup> $P<0.05$ , <sup>4)</sup> $P<0.01$ (表3~7同)。

表3 淫羊藿总黄酮对AMI大鼠左心室壁厚度的影响( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

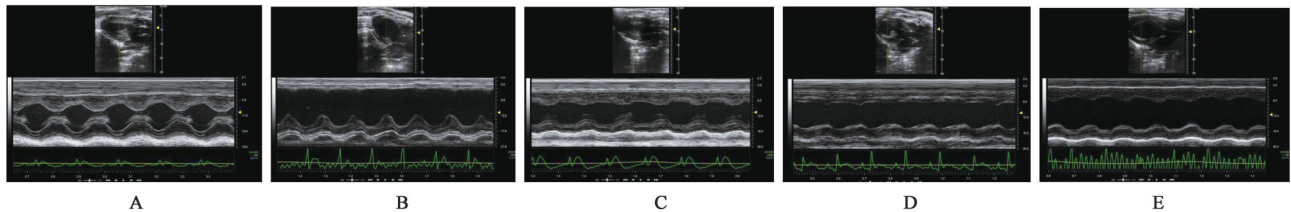
Table 3 Effect of TEF on left ventricular wall thickness in AMI rats ( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	LVAWs	LVAWd	LVPWs	LVPWd
假手术		3.25±0.56	2.11±0.42	3.36±0.56	2.08±0.33
模型		1.52±0.71 <sup>2)</sup>	1.41±0.47 <sup>2)</sup>	2.42±0.60 <sup>2)</sup>	2.14±0.39
地尔硫卓	10	3.26±0.34 <sup>4)</sup>	2.25±0.32 <sup>4)</sup>	3.18±0.45 <sup>3)</sup>	2.25±0.42
淫羊藿总黄酮	100	2.02±1.45	1.50±0.88	3.35±0.72	2.51±0.48
	200	2.68±1.02 <sup>3)</sup>	1.69±0.45	2.96±0.97	1.98±0.55

表4 淫羊藿总黄酮对AMI大鼠左心室心功能的影响( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

Table 4 Effect of TEF on left ventricular function in AMI rats ( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	SV/ $\mu$ L	EF/%	FS/%	CO/mL·min <sup>-1</sup>
假手术		183.00±42.05	81.55±5.62	55.27±7.14	80.65±25.45
模型		112.32±45.28 <sup>2)</sup>	25.88±12.05 <sup>2)</sup>	14.12±6.10 <sup>2)</sup>	45.20±24.85 <sup>2)</sup>
地尔硫卓	10	162.80±52.25 <sup>3)</sup>	66.53±18.82 <sup>4)</sup>	42.08±17.55 <sup>4)</sup>	70.74±20.83 <sup>3)</sup>
淫羊藿总黄酮	100	139.74±69.95	48.56±24.02 <sup>3)</sup>	26.95±15.35 <sup>3)</sup>	58.36±35.17
	200	154.08±48.72 <sup>3)</sup>	57.90±25.46 <sup>4)</sup>	37.22±24.14 <sup>4)</sup>	68.95±23.88 <sup>3)</sup>



A. 假手术组; B. 模型组; C. 地尔硫卓组; D. 淫羊藿总黄酮低剂量组; E. 淫羊藿总黄酮高剂量组(图2~5同)

图1 淫羊藿总黄酮对AMI大鼠心脏结构与功能的影响

Fig. 1 Effect of TEF on cardiac structure and function in AMI rats

3.2 对AMI大鼠心肌缺血区病理形态的影响 假手术组大鼠心肌着色均匀, 细胞形态及间质结构正常, 心肌纤维清晰可见, 排列整齐。模型组大鼠心肌横纹基本消失, 肌束断裂, 心肌纤维紊乱明显, 伴有不同程度的心肌细胞坏死, 有明显的大量炎细胞

浸润, 心肌纤维间可见明显的胶原纤维与结缔组织增生。地尔硫卓组大鼠可见心肌纤维明显紊乱, 部分心肌细胞增大, 心肌纤维间有一定程度的结缔组织增生, 有较为明显的心肌纤维化改变, 出现较多的炎细胞浸润。淫羊藿总黄酮低剂量组大鼠可见

心肌纤维较明显紊乱,部分心肌细胞增大,心肌纤维间有一定的结缔组织增生,心肌纤维化程度相对模型组较轻,有少量的炎细胞浸润。高剂量组大鼠

可见心肌纤维有一定程度的紊乱,少部分心肌细胞增大,心肌纤维间有少量的结缔组织增生,心肌纤维化及炎细胞浸润程度相对较轻。见图2。

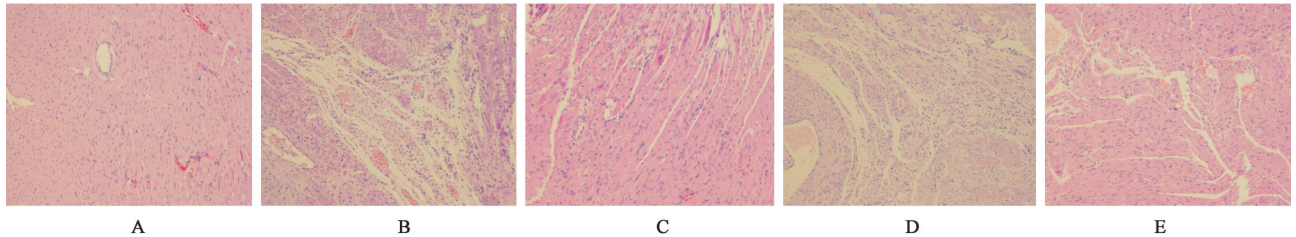


图2 淫羊藿总黄酮对AMI大鼠心肌缺血组织病理结构的影响(HE,×100)

Fig. 2 Effect of TEF on pathological structures in ischemia myocardial tissue of AMI rats (HE,×100)

**3.3 对AMI大鼠心肌缺血区CD31与 $\alpha$ -SMA表达的影响** 与假手术组比较,模型组大鼠心肌缺血组织CD31与 $\alpha$ -SMA表达显著下降( $P<0.01$ );与模型组比较,淫羊藿总黄酮低剂量组大鼠心肌CD31表

达均明显增加( $P<0.05$ ),同时淫羊藿总黄酮高剂量组与地尔硫卓组大鼠心肌CD31与 $\alpha$ -SMA表达均明显增加( $P<0.05, P<0.01$ ),差异有明显统计学意义。见图3,4和表5。

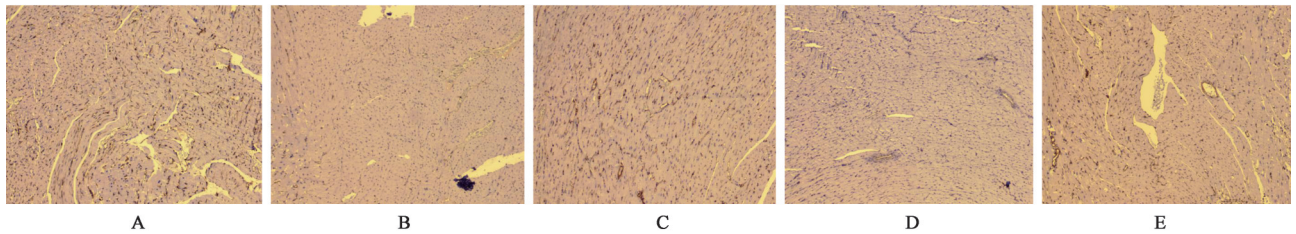


图3 淫羊藿总黄酮对AMI大鼠心肌缺血组织CD31表达的影响(免疫组化,×100)

Fig. 3 Effect of TEF on expressions of CD31 in ischemia myocardial tissue of AMI rats (IHC, ×100)

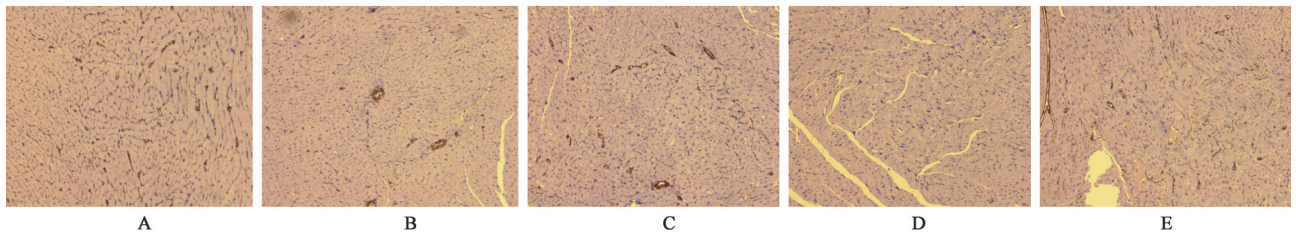


图4 淫羊藿总黄酮对AMI大鼠心肌缺血组织 $\alpha$ -SMA表达的影响(免疫组化,×100)

Fig. 4 Effect of TEF on expressions of  $\alpha$ -SMA in ischemia myocardial tissue of AMI rats (IHC, ×100)

表5 淫羊藿总黄酮对AMI大鼠心肌缺血组织CD31及 $\alpha$ -SMA表达的影响( $\bar{x}\pm s, n=4$ )

Table 5 Effect of TEF on expressions of CD31 and  $\alpha$ -SMA in ischemia myocardial tissue of AMI rats ( $\bar{x}\pm s, n=4$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	CD31	$\alpha$ -SMA
假手术		535±116	584±96
模型		224±82 <sup>2)</sup>	258±88 <sup>2)</sup>
地尔硫卓	10	325±118 <sup>3)</sup>	362±112 <sup>3)</sup>
淫羊藿总黄酮	100	298±67 <sup>3)</sup>	272±105
	200	376±92 <sup>4)</sup>	328±104 <sup>3)</sup>

**3.4 对AMI大鼠心肌缺血区VEGF-R2蛋白与Akt磷酸化表达的影响** 与假手术组比较,模型组大鼠心肌缺血区VEGF-R2蛋白表达与Akt磷酸化水平

明显下降,具有统计学意义( $P<0.01$ )。与模型组比较,淫羊藿总黄酮高、低剂量组与地尔硫卓组大鼠心肌组织VEGF-R2表达及Akt磷酸化水平均明显增加( $P<0.05, P<0.01$ )。见图5和表6。

**3.5 对AMI大鼠心肌缺血组织VEGF与bFGF mRNA表达的影响** 与假手术组比较,模型组心肌组织中VEGF与bFGF mRNA表达显著下降( $P<0.01$ );与模型组比较,淫羊藿总黄酮高、低剂量组及地尔硫卓组大鼠心肌组织中VEGF与bFGF mRNA表达明显增加( $P<0.05, P<0.01$ )。见表7。

#### 4 讨论

AMI后的心力衰竭仍然是全球范围内致死和致残的主要原因之一,尽管存在众多的治疗方案,

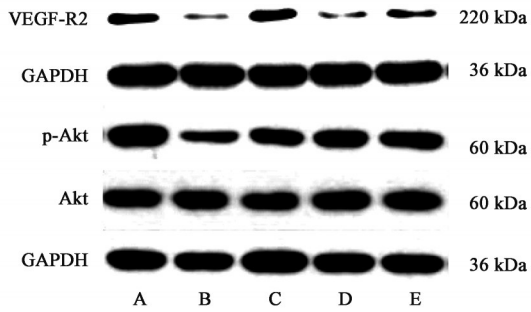


图5 各组大鼠心肌缺血组织 VEGF-R2 蛋白表达与 Akt 磷酸化水平电泳

Fig. 5 Electrophoresis of VEGF-R2 and Akt phosphorylation expressions in ischemia myocardial tissue of rats

表6 淫羊藿总黄酮对AMI大鼠心肌缺血组织 VEGF-R2 表达与 Akt 磷酸化的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

Table 6 Effect of TEF on expressions of VEGF-R2 and Akt phosphorylation in ischemia myocardial tissue of AMI rats ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	VEGF-R2/GAPDH	p-Akt/GAPDH
假手术		0.82±0.08	0.98±0.07
模型		0.54±0.05 <sup>2)</sup>	0.69±0.06 <sup>2)</sup>
地尔硫卓	10	0.75±0.07 <sup>4)</sup>	0.78±0.04 <sup>4)</sup>
淫羊藿总黄酮	100	0.62±0.05 <sup>3)</sup>	0.84±0.07 <sup>4)</sup>
	200	0.64±0.04 <sup>4)</sup>	0.88±0.06 <sup>4)</sup>

表7 淫羊藿总黄酮对AMI大鼠心肌缺血组织 VEGF 与 bFGF mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

Table 7 Effect of TEF on mRNA expressions of VEGF and bFGF in ischemia myocardial tissue of AMI rats ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	VEGF	bFGF
假手术		1.05±0.13	1.12±0.11
模型		0.65±0.11 <sup>2)</sup>	0.72±0.14 <sup>2)</sup>
地尔硫卓	10	0.85±0.12 <sup>4)</sup>	1.02±0.13 <sup>4)</sup>
淫羊藿总黄酮	100	0.77±0.12 <sup>3)</sup>	0.91±0.10 <sup>3)</sup>
	200	0.82±0.13 <sup>3)</sup>	0.94±0.13 <sup>3)</sup>

但AMI后心功能恢复及预防AMI向心力衰竭转变的手段仍不能达到满意效果。AMI在病理上主要表现为长时间的缺血导致梗死区域心肌细胞大量的丧失。AMI后由于心肌细胞坏死、炎症、细胞肥大、毛细血管丧失及过度纤维化等引起的恶性心室重构最终可导致心力衰竭<sup>[14]</sup>。大量研究显示,AMI后心肌毛细血管密度不足和心肌肥厚被认为是心脏重构过程中的关键事件<sup>[15]</sup>。因此促进血管生成被认为是在心肌梗死后恢复缺血区域的营养和氧气供应,改善恶性左室重构的有效治疗策略。

血管生成是新血管在缺氧,生长因子或血管扩张剂等血管生成信号刺激下,从原有存在的血管基

础上经出芽或其他方式形成新血管的生理过程,心肌梗死后血管生成作为一种补偿性反应,可重新建立心脏缺血区域的血液供应,对心肌组织修复至关重要。研究显示多种生长因子参与了AMI后血管生成,其中VEGF和bFGF在AMI后可以刺激静态内皮细胞,在促进血管生成过程中具有重要作用<sup>[16]</sup>。VEGF蛋白是同源二聚体,具有120~200个氨基酸的2个亚基,通过与其受体VEGFR2结合促进内皮细胞的存活,增殖和迁移,同时促进细胞外基质降解,有助于新生侧支血管形成。bFGF与其受体结合,上调整合蛋白的表达,从而增强细胞黏附和迁移,促进平滑肌细胞增殖,最终导致新血管的形成并增加侧支循环<sup>[17]</sup>。因此bFGF和VEGF在体内对血管再生具有协同作用,已显示出AMI后增加局部灌注,组织代谢,改善心肌功能和防止缺血性损伤的作用<sup>[18]</sup>。进一步的研究显示小鼠心肌梗死区域Akt磷酸化水平与VEGF表达相比假手术小鼠明显下降,提示了PI3K/Akt/VEGF细胞信号途径参与了心肌梗死后血管新生<sup>[19]</sup>。本研究结果也显示,大鼠AMI后出现明显的心功能下降及心室壁变薄、心室腔增大等心室重构的改变。同时心肌缺血区域血管特异性标志物CD31和 $\alpha$ -SMA表达降低,说明缺血区域心肌微血管数量明显下降,心肌有效灌注不足是导致心室重构和心力衰竭的重要原因。进一步研究发现,缺血区域心肌VEGF及其受体VEGF-R2, bFGF表达与Akt磷酸化水平明显下降。这些都再次证实bFGF与Akt磷酸化依赖的VEGF途径与AMI后血管新生密切相关。

中医理论认为“脉者血之府也”,将血管新生属于“脉”的范畴并与“肾”的生理关系非常密切,提出“脉者,资使之肾间动气,资生于胃中谷气,贯出于十二经中”,说明脉的生成始于先天之本、肾中之精气。故补肾固本也可以促进血管的生成,这为补肾中药发挥促血管生成作用奠定了理论基础<sup>[20]</sup>。本实验结果表明,淫羊藿总黄酮作为补肾助阳中药淫羊藿的主要有效部分,能够改善大鼠AMI后心室重构与心功能,增加缺血心肌组织CD31和 $\alpha$ -SMA表达;同时还可使缺血心肌组织中VEGF及其受体VEGF-R2, bFGF表达与Akt磷酸化水平显著升高,说明淫羊藿总黄酮能够激活PI3K/Akt/VEGF细胞信号通路,增加VEGF-R2, bFGF表达,促使大鼠AMI后缺血心肌组织血管新生,达到减轻心肌缺血性损害的目的。HE染色结果也证实,淫羊藿总黄酮高、低剂量组缺血心肌组织纤维化、炎细胞浸润

及心肌纤维紊乱成度相比模型组有明显的改善。

综上所述,淫羊藿总黄酮能够通过上调AMI后缺血心肌bFGF, VEGF及其受体VEGF-R2表达,激活PI3K/Akt/VEGF细胞信号通路促使缺血心肌血管新生,可以改善心肌梗死区周边心肌有效灌注不足的状态,达到抑制大鼠AMI后心室重构及心功能下降的作用,从而减缓心肌梗死向心功能衰竭阶段的发展,这为临床补肾生脉法治疗缺血性心脏病提供了重要的参考。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] HEAD S J, MACK M J, HOLMES DR J R, et al. Incidence, predictors and outcomes of incomplete revascularization after percutaneous coronary intervention and coronary artery bypass grafting: a subgroup analysis of 3-year SYNTAX data[J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2012, 41(3): 535-541.
- [2] SUTTON M G, SHARPE N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy [J]. *Circulation*, 2000, 101(25):2981-2988.
- [3] MALIKEN B D, KANISICAK O, KARCH J, et al. Gata4-dependent differentiation of c-Kit<sup>+</sup>-derived endothelial cells underlies artefactual cardiomyocyte regeneration in the heart [J]. *Circulation*, 2018, 138(10):1012-1024.
- [4] WANG N, LIU C, WANG X, et al. Hyaluronic acid oligosaccharides improve myocardial function reconstruction and angiogenesis against myocardial infarction by regulation of macrophages [J]. *Theranostics*, 2019, 9(7): 1980-1992.
- [5] LIM M, WANG W, LIANG L, et al. Intravenous injection of allogeneic umbilical cord-derived multipotent mesenchymal stromal cells reduces the infarct area and ameliorates cardiac function in a porcine model of acute myocardial infarction[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1):129.
- [6] SONG G, LI X, SHEN Y, et al. Transplantation of iPSc restores cardiac function by promoting angiogenesis and ameliorating cardiac remodeling in a post-infarcted swine model[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2015, 71(3):1463-1473.
- [7] 谢瑞芳,林评兰,王瑛,等. 不同配伍比例当归补血汤化学成分及促血管新生作用比较[J]. *中国中医药信息杂志*, 2016, 23(6):83-87.
- [8] 付卫云,刘暖,杨雷,等. 红景天苷促大鼠心肌梗死后心肌组织血管新生的作用[J]. *中药药理与临床*,

2015, 31(5):30-34.

- [9] 吴丹丹,国倩倩,高毅洁,等. 基于网络药理学探讨活血益气方促进心肌梗死后血管新生作用机制[J]. *中国中医药信息杂志*, 2020, 27(12):76-82.
- [10] LIU D, YE Y, XU L, et al. Icariin and mesenchymal stem cells synergistically promote angiogenesis and neurogenesis after cerebral ischemia via PI3K and ERK1/2 pathways [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 108:663-669.
- [11] CHUNG B H, KIM J D, KIM C K, et al. Icariin stimulates angiogenesis by activating the MEK/ERK- and PI3K/Akt/eNOS-dependent signal pathways in human endothelial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 376(2):404-408.
- [12] 张卫萍,邓杨阳,任建勋,等. 淫羊藿总黄酮对大鼠心肌急性缺血再灌注损伤氧化应激干预机制的研究[J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(18):3400-3405.
- [13] 曹珏,李贻奎,陈孟倩,等. 大鼠急性心肌梗死模型制备方法研究进展[J]. *中国比较医学杂志*, 2017, 27(10):96-100.
- [14] ZARROUK-MAHJOUB S, ZAGHDOUDI M, AMIRA Z, et al. Pro- and anti-inflammatory cytokines in post-infarction left ventricular remodeling[J]. *Int J Cardiol*, 2016, 221:632-636.
- [15] VAN KERCKHOVEN R, VAN VEGHEL R, SAXENA P R, et al. Pharmacological therapy can increase capillary density in post-infarction remodeled rat hearts [J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 61(3):620-629.
- [16] POHL-SCHICKINGER A, KOEHNE P, SCHMITA T, et al. Vascular endothelial growth factor and its soluble receptor in infants with congenital cardiac disease[J]. *Cardiol Young*, 2010, 20(5):505-508.
- [17] FAN Z, XU Z, NIU H, et al. Spatiotemporal delivery of basic fibroblast growth factor to directly and simultaneously attenuate cardiac fibrosis and promote cardiac tissue vascularization following myocardial infarction [J]. *J Control Release*, 2019, 311-312: 233-244.
- [18] DRAGNEVA G, KORPISALO P, YLA-HERTTUALA S. Promoting blood vessel growth in ischemic diseases: challenges in translating preclinical potential into clinical success [J]. *Dis Model Mech*, 2013, 6(2): 312-322.
- [19] 杜泓森,史金玉,王帅,等. 柴胡加龙骨牡蛎汤对急性心肌梗死合并焦虑小鼠血清ACTH及CORT的影响[J]. *世界中医药*, 2020, 15(2):239-243.
- [20] 刘超,王阶. 从补肾对血脉的影响探讨其在冠心病治疗中的应用与研究[J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(3):841-843.

[责任编辑 周冰冰]