

通脉地仙丸对大鼠缺血心肌血管新生的作用

栾杰男^{1*}, 张大维², 焦燕², 李根¹, 巩琪³

(1. 深圳市中医院, 广东 深圳 518033; 2 吉林大学白求恩医学院, 长春 130021;
3. 广东医学院附属南山人民医院, 广东 深圳 518033)

[摘要] **目的:**通过通脉地仙丸作用于心肌缺血的大鼠,观察缺血心肌梗死边缘区的微血管新生情况,初步探讨其心肌保护机制。**方法:**100只雄性大鼠慢性心肌缺血造模成功后除假手术组外随机分为模型组,通脉地仙高、中、低(6.3, 3.15, 1.57 g·kg⁻¹)剂量组,阳性药麝香保心丸(0.014 2 g·kg⁻¹)组。灌胃给药6周后观察大鼠对心肌梗死范围的影响,同时苏木精-伊红(HE)染色观察心肌组织病理形态学的改变,并免疫组织化学检测观察心肌梗死边缘区微血管新生情况。**结果:**①与模型组比较,通脉地仙高、中剂量组和麝香保心丸组心肌梗死面积不同程度减小($P < 0.05$, $P < 0.01$)。②通脉地仙丸对大鼠心肌组织的影响:光镜下观察,假手术组心肌纤维排列整齐且无肿胀现象,心肌间质极少炎性细胞浸润;模型组心肌纤维肿胀,排列紊乱,心肌间质大量炎细胞浸润,细胞核大小不一,甚至可见局灶性坏死区;通脉地仙高、中剂量组心肌细胞核大小均一,心肌纤维轻度肿胀,排列比较整齐,仍可见不同程度的成纤维细胞及炎细胞浸润;阳性对照组镜下心肌纤维排列基本整齐,轻度肿胀,可见少量炎细胞浸润。③缺血心肌血管新生的微血管密度(MVD)比较:与假手术组比较,模型组大鼠微血管密度相对增加($P < 0.05$),通脉地仙高、中剂量组和阳性对照组与模型组比较有明显微血管密度增加的趋势($P < 0.01$),通脉地仙低剂量组MVD也有不同程度的增加微血管的作用,但与模型组比较没有统计学差异。**结论:**通脉地仙丸可以通过促进心肌梗死边缘区微血管的生成从而达到保护心肌组织和细胞的目的。

[关键词] 通脉地仙丸; 微血管密度; 心肌缺血

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)11-0170-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014110170

Effect of Tongmai Dixian Pills on Angiogenesis of Ischemic Myocardium

LUAN Jie-nan^{1*}, ZHANG Da-wei², JIAO Yan², LI Gen¹, GONG Qi³

(1. Shenzhen Traditional Chinese Medicine Hospital, Shenzhen 518033, China;

2. Norman Bethune Medicine College of Jilin University, Changchun 130021, China;

3. Nanshan Renmin Hospital, Medical University of Guangdong, Shenzhen 518033, China)

[Abstract] **Objective:** This study is to observe the effect of Tongmai Dixian pills on the angiogenesis of ischemic myocardium border zone and to research myocardial protection mechanisms. **Method:** One hundred male rats with chronic myocardial ischemia model except the sham group, which were randomized, model group, Tongmai Dixian pills high, middle and low (6.3, 3.15, 1.57 g·kg⁻¹) dose groups, and Shexiang Baoxin pills (0.014 2 g·kg⁻¹) group. Intra-gastric administration for six weeks, hematoxylin-eosin (HE) staining of myocardial pathomorphology changes and immunohistochemical staining observed neovascularization of myocardial infarct border zone. **Result:** ① Tongmai Dixian pills can deduce the scope of myocardial infarctions as to protect the heart. ② Tongmai Dixian pills on the myocardial tissue (HE staining): sham group's the cardiac muscle fibers arranged in neat rows and inflammatory cells infiltration; model group's cardiocytes had serious edema, lots of disorganized myocardial interstitial inflammatory cells infiltration, or even visible its focal necrosis; Tongmai Dixian pills each dose group myocardial nucleus size is uniform, showing varying degrees of fibroblasts and inflammatory

[收稿日期] 20130624(005)

[基金项目] 广东省自然科学基金项目(9151803301000007)

[通讯作者] * 栾杰男, 博士, 教授, 主任医师, 从事心血管及亚健康的中医临床科研和教学研究, E-mail: luanjienan@sohu.com.com

cells infiltration; Shexiang Baoxin pills group under the light microscopic is similar to Tongmai Dixian pills middle dose group; ③ ischemic myocardial angiogenesis microvessel density (MVD): compared with the sham group, model group with significant difference ($P < 0.05$), Tongmai Dixian pills each dose group can be significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), Tongmai Dixian pills high, middle dose and Shexiang Baoxin pills can also be significantly increased ($P < 0.01$), Tongmai Dixian pills low dose group is also an increasing trend, but no statistically significant differences compared with model group. **Conclusion:** Tongmai Dixian pills can promote the generation microvascular in the myocardial infarction border zone in order to achieve the purpose of protecting the myocardium.

[**Key words**] Tongmai Dixian pills; microvessel density; myocardial ischemia

中药被广泛地应用于心血管疾病的临床治疗与预防,收到良好的效果。自 20 世纪 70 年代至今,有关抗心肌缺血的研究一直是现代中药药理研究的热点之一。通脉地仙丸是由黄芪、杜仲、何首乌、牛膝、川芎、丹参、地龙等组成的中药复方制剂,难溶于水。前期研究发现,该药对慢性心肌缺血损伤通过减少自由基的生成,促进自由基的清除,降低过氧化自由基对内皮细胞的损伤程度,提高机体清除自由基能力,抗脂质过氧化反应起到保护作用。为进一步探讨通脉地仙丸心肌缺血保护作用机制,本实验研究应用药物作用于心肌缺血的大鼠,观察其缺血心肌梗死边缘区的微血管新生情况,揭示通脉地仙丸对心肌缺血血管新生的影响。

1 材料

1.1 动物 雄性 Wistar 大鼠 100 只,体重(240 ± 20)g,由吉林大学白求恩医学院动物实验中心提供,动物合格证号 SCXK(吉)2007-0003。

1.2 药品 通脉地仙丸深圳市中医院,合格证号(粤)Z20070568,难溶于水,用 2% 羧甲基纤维素钠助溶,麝香保心丸(上海和黄药业有限公司,批号 100507),青霉素(华北制药股份有限公司,批号 Y1003401)。

1.3 试剂 羧甲基纤维素钠(上海三浦化工有限公司,批号 20100715),甲醛(沈阳市东兴试剂厂,批号 0080818),兔多克隆抗 CD34(北京博奥森生物技术有限公司),SP-9710 试剂盒和 DAB 试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司)。

1.4 仪器 ECG-6511 型心电图机(上海光电医用电子仪器有限公司),半自动生化测定仪测(上海麦莎生物科技有限公司),TGL-16 型低温高速离心机(湘仪离心机仪器有限公司),BX51 型光学显微镜(日本 Olympus 公司),微量移液器(芬兰 Gilson 公司),RM 2245 型石蜡切片机、HI1210 型组织烘片机、HI1220 型组织摊片机及 EG1150H 型组织包埋

机(德国 Leica 公司),101A-2E 型电热鼓风干燥箱(上海实验仪器厂有限公司),DHP-9082 型电热恒温培养箱(上海一恒科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 模型制备 依照文献[1]的方法复制心肌梗死模型。将大鼠用乙醚麻醉后仰位固定于手术台上,胸部备皮、消毒,使用 10 号线行荷包缝合,正中用手术刀切开,止血钳剥离肋间肌肉,在左侧 3 ~ 4 肋间开胸,显露心脏,于左心房与肺动脉圆锥间下 2 ~ 3 mm 处找到冠状动脉左前降支,用 0 号线立即结扎,然后将心脏放回胸腔,将胸腔内气体迅速挤出并拉紧荷包缝合线进行结扎,关闭胸腔,开胸时间全程不超过 30 s,假手术组只将手术线打一松结。结扎冠状动脉左前降支达 24 h 后,心电图机检测,以心电图 ST 段明显抬高,结扎线以下心肌颜色变苍白、搏动减弱为造模成功标志,术后 1 周注射青霉素预防感染。

2.2 分组和给药 将模型制备成功的大鼠除假手术外随机分为 5 组,为模型组,通脉地仙高、中、低(6.3,3.15,1.57 g·kg⁻¹)剂量组,阳性药麝香保心丸(0.014 2 g·kg⁻¹)组,用 2% 羧甲基纤维素钠溶液配制药。假手术和模型组不进行药物干预,只是灌胃相同容积的羧甲基纤维素钠溶液。各组于造模成功后 24 h 后给予药物干预,给药组大鼠每周称质量 1 次。6 周后进行各项指标的检测。

2.3 梗死面积的测定 氯化三苯基四氮唑(TTC)观察梗死程度。将滤纸拭干的心肌组织沿短轴切成 2 ~ 3 mm 厚的薄片,放入 1% TTC 磷酸盐缓冲液中,37 °C 水浴 5 ~ 10 min,观察梗死范围。应用图像处理软件检测,计算梗死心肌占全心的百分率。

2.4 心肌组织的病理观察 大鼠处死后迅速取出心脏,用预冷的生理盐水冲洗,滤纸拭干,在 4% 中性甲醛溶液中固定。心肌组织常规脱水石蜡包埋 4 μm 切片,二甲苯常规脱蜡 10 min 2 次,无水乙醇、

95% 乙醇、80% 乙醇、70% 乙醇各 5 min, 蒸馏水洗 5 min, 苏木素染色 3 min, 1% 盐酸乙醇分化 5 ~ 10 s, 弱氨水返蓝数秒, 0.5% 伊红复染 1 min, 95% 乙醇、无水乙醇脱水各 5 min, 二甲苯透明各 5 min, 中性树胶封片, 光学显微镜下观察组织形态学改变。

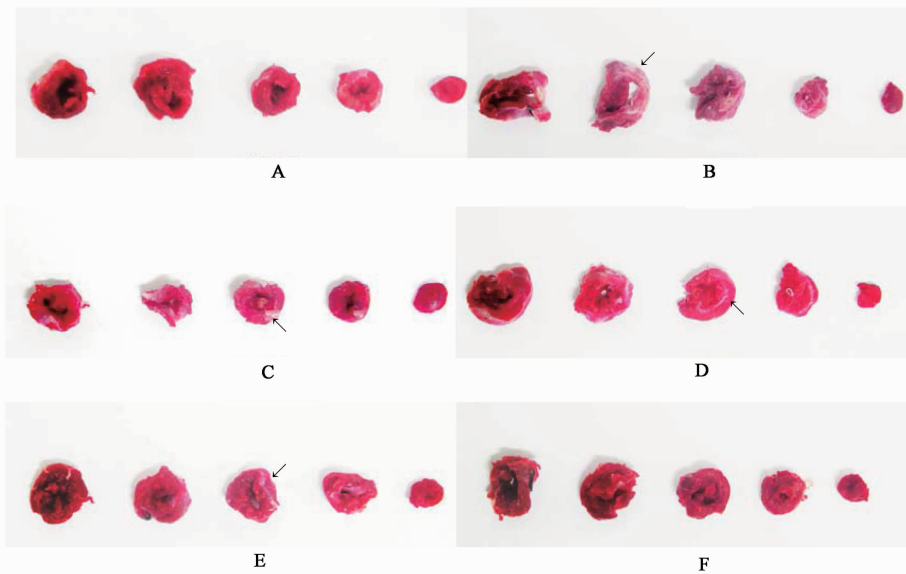
2.5 大鼠心肌组织免疫组织化学检测 石蜡切片, 常规脱蜡至水, 3% H₂O₂ 去离子水孵育 10 min, 以消除内源性过氧化物酶活性, PBS 冲洗 3 遍, 每遍 5 min; 正常山羊免疫血清封闭, 室温孵育 15 min, 倾去血清, 滴加 1:100 稀释的 CD34 抗体, 4 °C 过夜; 滴加生物素标记二抗, 室温孵育 10 min → PBS 液冲洗, 3 min × 3 次; 滴加辣根酶标记链酶卵白素工作液, 室温孵育 10 min, PBS 液冲洗, 3 min × 3 次; DAB 免疫组化染色试剂显色, 镜下观察 1 ~ 2 min, 至显色满意蒸馏水终止; 苏木素复染 1 min, 脱水, 透明, 中性树胶封片。以 CD34 的表达标记血管内皮, 凡是染成

棕黄色单个内皮细胞或内皮簇均作为一个血管计数, 凡管腔大于 8 个红细胞大小、带有较厚肌层的血管区域的血管均不计数。每张切片随机观察 5 个视野 (×400) 计数微血管的数目, 以毛细血管个数/视野表示 MVD 值。P < 0.05 为具有统计学意义。

2.6 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件处理数据, 组间比较采用单因素方差分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。P < 0.05 为具有统计学意义。

3 结果

3.1 通脉地仙丸对大鼠心肌梗死面积的影响 由于正常心肌组织含有脱氢酶可与 TTC 反应生成红色甲胍, 而梗死的心肌细胞中因细胞膜损伤脱氢酶丢失, 则不会呈现红色而是苍白色。结果显示与模型组比较, 通脉地仙高、中剂量组和麝香保心丸组心肌梗死面积有不同程度减小 (P < 0.05 或 P < 0.01), 见图 1, 2。



A. 假手术组; B. 模型组; C. 通脉地仙高剂量组 (6.30 g·kg⁻¹); D. 通脉地仙中剂量组 (3.15 g·kg⁻¹); E. 通脉地仙低剂量组 (1.57 g·kg⁻¹); F. 麝香保心丸组 (0.01 g·kg⁻¹) (图 2 ~ 4 同)

与模型组比较¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01; 与假手术组比较³⁾ P < 0.01

图 1 通脉地仙丸对大鼠心肌梗死面积的影响 (TTC 染色)

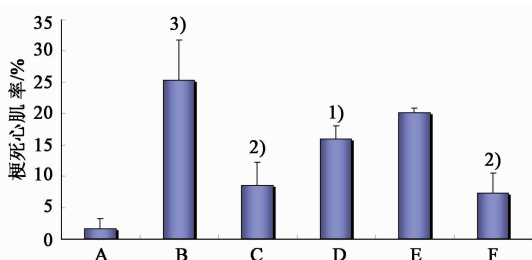


图 2 通脉地仙丸对大鼠心肌梗死面积的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

3.2 通脉地仙丸对大鼠心肌组织形态结构的影响 光镜下观察, 假手术组心肌纤维排列整齐且无肿

胀现象, 心肌间质极少炎性细胞浸润; 模型组心肌纤维肿胀, 排列紊乱, 心肌间质大量炎细胞浸润, 细胞核大小不一, 甚至可见局灶性坏死区; 通脉地仙高、中剂量组心肌细胞核大小均一, 心肌纤维轻度肿胀, 排列比较整齐, 仍可见不同程度的成纤维细胞及炎细胞浸润; 阳性对照组镜下心肌纤维排列基本整齐, 轻度肿胀, 可见少量炎细胞浸润, 见图 3。

3.3 缺血心肌血管新生的微血管密度 (MVD) 比较 与假手术组比较模型组大鼠微血管密度相对增加

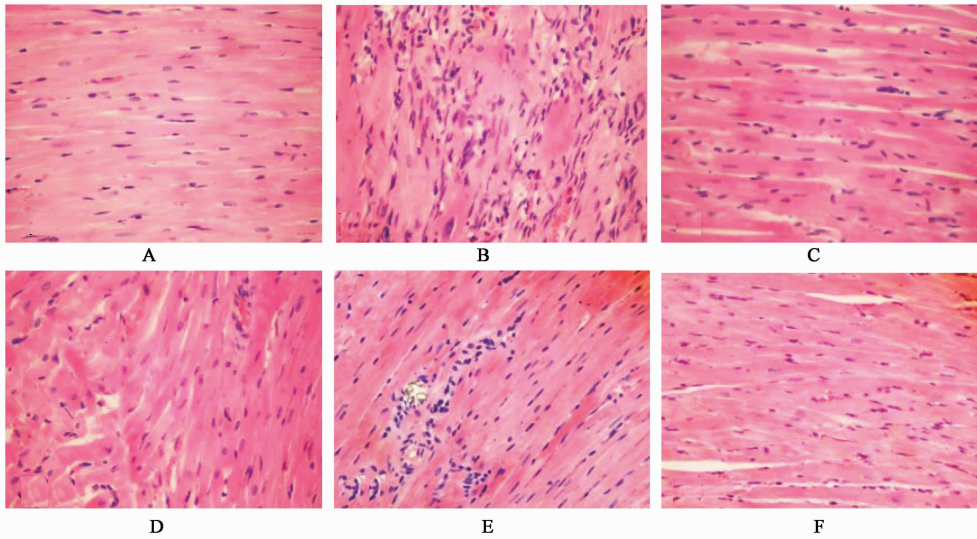


图3 通脉地仙丸对大鼠缺血心肌损伤组织形态学的影响(HE, ×400)

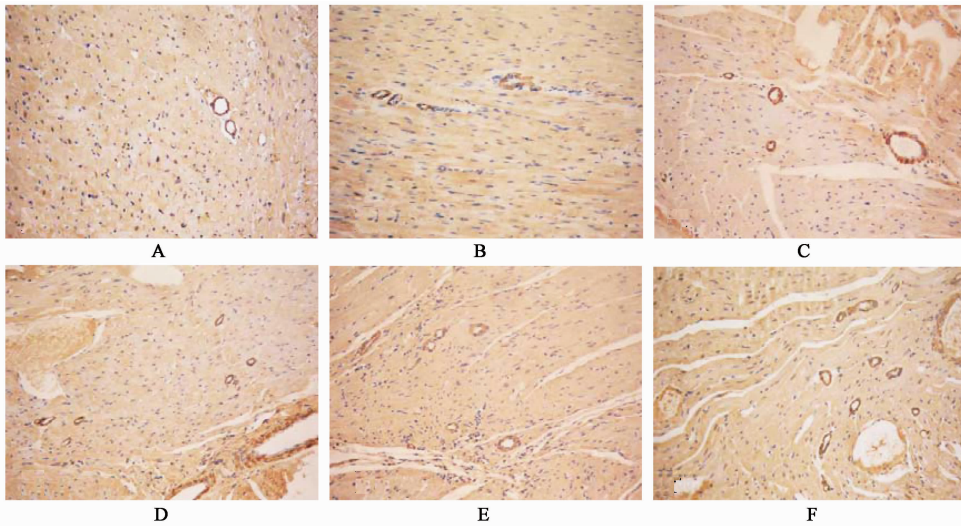


图4 CD34 标记的免疫组织化学染色观察缺血心肌梗死边缘区微血管密度的影响(HE, ×200)

($P < 0.05$),通脉地仙高、中剂量组和阳性对照组与模型组比较有明显微血管密度增加的趋势($P < 0.01$),通脉地仙低剂量组 MVD 也有不同程度的增加微血管的作用,但与模型组比较没有统计学差异,见表 1,图 4。

表 1 通脉地仙丸对缺血心肌梗死边缘区微血管密度的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	n	MVD(个/视野)
假手术	-	13	2.47 ± 1.13
模型	-	10	$3.60 \pm 1.40^{1)}$
通脉地仙	6.30	12	$7.47 \pm 2.10^{2)}$
	3.15	11	$6.13 \pm 2.03^{2)}$
	1.57	10	3.87 ± 1.85
麝香保心丸	0.01	12	$7.23 \pm 1.30^{2)}$

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

从血管新生机制来研究中医基础理论及中药作用机制渐受重视。郑曙云等通过观察单味中药红参、附子及参附注射液对大鼠心肌缺血再灌注损伤的实验,发现红参、附子或参附合用对大鼠心肌缺血再灌注损伤均有保护作用,参附合用疗效优于红参和附子单独应用^[2]。于成瑶等通过对中药复方冠心 II 号(丹参-红花-川芎-赤芍-降香 6:3:3:3:2)对大鼠心肌缺血基因差异表达谱的研究,结果表明运用后使得上调和下调基因均减少,而且具有一定的基因特异性^[3]。苏剑峰等^[4]应用血府逐瘀汤(桃仁、红花、当归、地黄、川芎、赤芍、牛膝、柴胡、桔梗、枳壳、甘草等组成)作用于心肌缺血大鼠实验结果显示,血府逐瘀汤能明显缩小心肌梗死面积,促进大

鼠缺血心肌血管的新生,能明显增加心梗边缘区内皮细胞数和微血管数目,对缺血心肌具有保护作用。因此,以保护缺血心肌为出发点,血管新生机制为中心的研究,对阐明中医基础理论,中药的药理作用及促进新药开发具有重大的意义。

一般认为,缺血心肌侧支循环的建立主要有两个过程:血管增生和血管重构。以往认为血管新生仅存在于胚胎发育的早期阶段,但最近几年研究发现成人血液中也存在着内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPC),说明在成人阶段也可能存在由 EPC 参与的血管新生^[5]。心肌梗死的病变部位一般包括中央坏死区域和周围的梗死缺血区域,并且缺血区也是新生血管相对集中的区域,若能及时改善缺血区的血液供应可以减轻心肌组织的损伤。

选择良好的血管内皮标记物计数微血管判定血管生成状况,有助于治疗性血管新生方法的实施。在所选的血管内皮标记物如Ⅷ因子相关抗原,CD31 和 CD34 抗原中,以 CD34 抗原特异性最高,被认为是最敏感的血管内皮标记物,利用 CD34 抗体进行免疫组化染色可测量缺血组织微血管密度和面积,检测早期新生血管的形成^[6]。

来源于骨髓造血干、祖细胞的 CD34 抗原具有黏附、加速血管前内皮细胞聚集形成血管的功能。表达 CD34⁺/AC133⁺/VEGFR2⁺的内皮祖细胞经 VEGF, bFGF 等诱导分化后,CD34 和 AC133 表达开始减弱,并逐渐表达内皮细胞表面特有的分子标志物 CD31 和 FⅧRA 等,而 VEGFR2 继续表达,最终转化为成熟的血管内皮细胞^[7]。由此可见,CD34 主要在内皮细胞分化较早期表达,在成熟的血管内皮细胞表达较弱,因此,CD34 是检测新生血管的标志性抗原,可用于检测早期新生血管的形成。有关报道也显示,CD34 标记血管内皮细胞时特异性较高,优于其他的内皮细胞标记物^[8],而且 CD34 能突出标记不成熟的或是较小的微血管和单一的内皮细胞^[9]。在研究血管新生的指标中,MVD 是反映血管新生强度的半定量指标,现已被很多实验用作检测血管新生的指标^[10]。

在本实验中结果显示,模型组大鼠梗死边缘区域 MVD 较正常心肌组织中明显增多,提示缺血后的心肌组织具有一定的代偿能力,可以启动内源性血管新生机制促进血管新生。给药后,给药组的心

肌梗死边缘区的 MVD 较模型组明显增高,且高剂量组和麝香保心丸组增高效果最为明显。因此,通脉地仙丸可以通过血管新生的途径,有效的促进缺血心肌侧支循环的建立,改善缺血心肌的血液供应,减轻心肌损伤程度,从而起到保护缺血心肌组织的目的。

[参考文献]

- [1] 李竞进. HspA12B 对慢性心梗后心功能不全和心肌重塑的保护作用[D]. 南京:南京医科大学,2011.
- [2] 郑曙云,徐建国,赵振中. 参附注射液对大鼠心肌缺血再灌注损伤的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2004,24(6):541.
- [3] 于成瑶,高会丽,刘振,等. 冠心 II 号对大鼠心肌缺血基因差异表达谱的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2008,28(5):426.
- [4] 苏剑峰,张秋雁,王权礼,等. 血府逐瘀汤对心肌缺血大鼠心肌梗死面积及缺血心肌血管新生影响的研究[J]. 中国中医药信息杂志,2011,24(1):15.
- [5] Heida N M, Muller J P, Cheng I F, et al. Effects of obesity and weight loss on the functional properties of early outgrowth endothelial progenitor cells [J]. J Am Coll Cardiol, 2010,55(4):357.
- [6] 朱惠斌,陈懿,谭璇,等. 脑泰方提取物对局灶性脑缺血大鼠 CD34 表达的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2011,22(2):141.
- [7] 石秋艳,孙惠芳,姜进克,等. 实验性脑出血大鼠血肿周围 VEGF, bFGF 表达及血管新生的动态变化及重组人促红细胞生成素对其干预作用的研究[J]. 中风与神经疾病研究,2010,27(4):299.
- [8] Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease [J]. Nat Med, 2003,9: 653.
- [9] Hiasa K, Ishibashi M, Ohtani K, et al. Gene transfer of stromal cell-derived factor-1 alpha enhances ischemic vasculogenesis and angiogenesis via vascular endothelial growth factor/endothelial nitric oxide synthase-related pathway: next-generation chemokine therapy for therapeutic neovascularization [J]. Circulation, 2004, 109(20):2454.
- [10] ZHANG Sanyin, CHEN Shilin, SHEN Yingjun, et al. Puerarin induces angiogenesis in myocardium of rat with myocardial infarction [J]. Biol Pharm Bull, 2006, 29(5): 945.

[责任编辑 邹晓翠]