

黄芪提取物对大鼠心肌梗死后 心肌组织血管新生的作用

刘暖, 杨雷*, 毛秉豫, 徐国昌, 叶松山
(南阳理工学院 医学实验中心, 河南 南阳 473004)

[摘要] **目的:**观察黄芪提取物对大鼠心肌梗死后心肌组织血管新生的作用,并分析其可能作用机制。**方法:**采用冠状动脉左前降支结扎造模方法成功复制大鼠心肌梗死模型后,随机将大鼠分为模型组、黄芪提取物低、中、高剂量组(10, 20, 40 mg·kg⁻¹·d⁻¹),另设假手术组,各组大鼠数量均为 8 只。黄芪提取物各治疗组给予上述对应的各药物剂量 ig 给药,模型组及假手术组大鼠 ig 给予 20 mL·kg⁻¹·d⁻¹的生理盐水,连续饲养 4 周后采用苏木精-伊红(HE)染色,Masson 染色,电镜法分析心肌梗死大鼠左心室心肌组织和血管病理学变化,免疫组化染色分析心肌组织中血管内皮生长因子(VEGF)及 CD34 蛋白的表达变化。**结果:**与假手术组比较,模型组大鼠心肌组织结构紊乱,心肌细胞坏死严重,完整的微血管数量明显减少($P < 0.05$),胶原含量显著增加($P < 0.01$),内皮细胞缺失明显($P < 0.05$)。与模型组比较,黄芪提取物各组大鼠心肌组织结构相对规整,胶原含量明显下降($P < 0.05$),新生的血管数量明显增多($P < 0.05$),内皮细胞形态相对完整,数量也明显增多($P < 0.05$),VEGF 及 CD34 蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$)。**结论:**黄芪提取物可明显改善大鼠心肌梗死后心肌组织的紊乱状态,促进受损心肌组织中新生血管数量的增加。

[关键词] 黄芪; 心肌梗死; 血管新生; 病理学; 益气

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)19-0092-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2015190092

Promoting Angiogenesis Effect of Astragali Radix Extract on Myocardium of Rats with Myocardial Infarction LIU Nuan, YANG Lei*, MAO Bing-yu, XU Guo-chang, YE Song-shan (*Medical Experimental Center, Nanyang Institute of Technology, Nanyang 473004, China*)

[Abstract] **Objective:** To determine the angiogenesis effect of radix astragali extract on myocardium of rats with myocardial infarction (MI) and analyze its possible mechanism. **Method:** Left coronary arteries of Sprague-Dawley rats were ligated to make MI models. The rats were randomly divided into MI model group, 3 different dose groups of Astragali Radix extract (10, 20, 40 mg·kg⁻¹·d⁻¹), and the sham operation group. Each group consisted of 8 rats. All the treatment groups were orally fed with the drug extract of above corresponding dose, and the model group and sham operation group were fed with normal saline 20 mL·kg⁻¹·d⁻¹. 4 weeks later, hematoxylin and eosin staining, Masson staining, and electron microscope were taken to analyze the left ventricular myocardial tissue and vascular pathological changes in rats with MI, and immunohistochemical staining was taken to analyze the expression changes in vascular endothelial growth factors (VEGF) and CD34 proteins. **Result:** Compared with the sham operation group, myocardial tissue was disordered in the model group, accompanied by severe myocardial necrosis, significantly reduced quantity of complete microvessel ($P < 0.05$), significantly increased collagen content ($P < 0.01$), and obvious endothelial cell loss ($P < 0.05$). Compared with the model group, the structures of myocardial tissue in all the treatment groups were relative regular, with significantly increased collagen content ($P < 0.01$), significantly increased number of new microvessels ($P < 0.05$), as well as relatively complete endothelial cell morphology and increased number of endothelial cells ($P < 0.05$). In addition,

[收稿日期] 20150206(012)

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金项目(81202791),国家自然科学基金面上项目(81473438,81173372),河南省中医内科学重点学科支撑课题(豫教高[2012]186号)

[第一作者] 刘暖,硕士,助教,从事中药抗心血管疾病发病机制研究,Tel:0377-62071308,E-mail:liunuan2006@126.com

[通讯作者] *杨雷,博士,副教授,从事中药抗心血管疾病发病机制研究,Tel:0377-62071309,E-mail:yanglei200609@126.com

VEGF and CD34 protein expression in the cytoplasm of myocardial tissue was increased significantly ($P < 0.01$).
Conclusion: Astragali Radix extract can obviously improve the disorganized myocardial tissue of rats after myocardial infarction, and promote angiogenesis in the impaired myocardial tissue.

[**Key words**] Astragali Radix ; myocardial infarction; angiogenesis; pathology; tonifying Qi

心肌梗死是引发心血管疾病患者致残和死亡的最重要原因之一,现有的治疗措施对预防和逆转患者向心功能衰竭方向的发展仍难以令人满意^[1]。过去的20年当中,介入治疗是一种相对有效的治疗方式,然而长期的临床效果并不令人感到乐观^[1-3]。在这种背景之下,促血管新生治疗方法作为一种崭新的治疗策略被提出,并且在短期临床治疗上收到了较为积极的效果^[3]。然而,随着研究的深入,越来越多的证据发现,单一的促血管生成疗法如血管内皮生长因子(VEGF)治疗在长期的治疗过程中存在耐药、致畸等多重潜在危险因素,由此引发了学者对心肌梗死新的药物治疗的探讨^[1-3]。

中药黄芪治疗心血管疾病的历史悠久,心肌梗死治疗的重要策略之一就是“活血化瘀”,黄芪益气功效强大,气行则血行,血行则络脉畅通。益气不仅能生新血,而且还能生新络,即血管新生。本研究在前期的实验研究基础之上^[4-5],进一步研究黄芪提取物对大鼠心肌梗死后血管新生的作用,并探讨其可能的作用机制。

1 材料

1.1 动物 SD大鼠,雄性,清洁级,8周龄,体重200~240 g,购自河南省实验动物中心,合格证号SCXK(豫)2010-0002。

1.2 药物与试剂 黄芪为豆科植物蒙古黄芪(*Astragalus membranaceus* var. *mongholicus*)的干燥根,由南阳理工学院方药研究所黄显章副教授鉴定,黄芪提取物均由南阳理工学院方药研究所提供,系经水提、大孔吸附树脂纯化所得,纯化后的黄芪提取物(黄芪总苷的含量为66.9%,每1 g相当于原生药32.21 g,批号NYIST-003)。CD34和VEGF单克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司,批号分别为bs-2038R,bs-0565R),羊抗兔IgG,DAB显色液(武汉博士德生物工程有限公司,批号分别为TC1378,DD1660),其他试剂为国产分析纯。

1.3 仪器 HX-100E型小动物呼吸机(泰盟科技有限公司),ERM-3100型半自动病理切片机(中国郝思琳科技有限公司),TKY-BMB型石蜡包埋机(博大精科技实业有限公司),Nikon Tis型光学显微镜及Nikon NIS-Elements Software BR分析系统(日

本尼康公司),SU3500型高新扫描电子显微镜(日本日立公司)。

2 方法

2.1 模型建立及分组 参照文献[4-5]复制大鼠心肌梗死模型,采用5-0型无创缝合线结扎左心耳下缘约2~3 mm处的左冠状动脉前降支,以心尖部变白或II导联心电图ST段弓背抬高持续15 min以上为心肌梗死模型复制成功的标志。术后ip 80万U青霉素,连续用3 d以预防感染。假手术组大鼠仅在左冠状动脉前降支下穿线而不结扎。术后存活达2 d以上的心肌梗死大鼠随机被分为模型组、黄芪提取物低、中、高剂量组(10,20,40 mg·kg⁻¹·d⁻¹),每组8只。假手术组和模型组按中剂量组给予等量生理盐水ig。各实验组大鼠每周根据体重变化调整用药剂量,术后连续饲养4周。

2.2 组织形态学及微血管数量变化 取大鼠术后的心尖部心肌组织,用液氮快速冷冻,之后用10%的甲醛浸泡固定,沿左室长轴的中点进行组织切片,其厚度保持在4 μm左右。行苏木精-伊红(HE)染色。光学显微镜下400倍放大观察分析。每张切片选取10个无重复视野,计数每个视野下结构完整的微血管的数量,最后取其均数。

2.3 组织形态学及胶原含量变化 心肌组织取材同HE染色部分。将脱蜡和脱水处理后的切片再用1%的盐酸溶液处理3~5 s后冲洗干净,用温和的碱性品红溶液染色3 min后去离子水冲洗干净,1%的磷钼酸溶液处理1 min,去离子水去除残留的磷钼酸溶液后,切片再用2%苯胺蓝溶液染色2 min,95%的乙醇冲洗脱水,干燥后包埋处理。光学显微镜下染色后的心肌胶原纤维呈蓝绿色,心肌组织呈现红色,心肌组织的胶原含量变化应用Nikon NIS-Elements Software BR系统进行检测,计算每张切片的心肌胶原容积分数(CVF,同一图像中胶原面积/所测视野面积),每张切片选取10个无重复视野,最后取其均数。同时,计数每个视野下结构完整的微血管的数量,取其均数。

2.4 超微结构及内皮细胞数量变化 剪取大鼠术后的心尖部梗死区少许心肌组织,用生理盐水洗去血迹并移至盛满碎冰的玻璃培养皿上,组织周围保

持有适量 2.5% 戊二醛,用双面刀片迅速将组织切成 0.5 mm³ 小块,立即移至 2.5% 戊二醛固定液中固定 3 h 后 1% 锇酸固定,梯度脱水,环氧树脂与丙酮包埋、聚合成块,超薄切片(50 nm),醋酸铀-柠檬酸铅染色,透射电镜观察、摄片。每张切片选取 10 个无重复视野,计数每个视野下完整的内皮细胞的数量,最后取其均数。

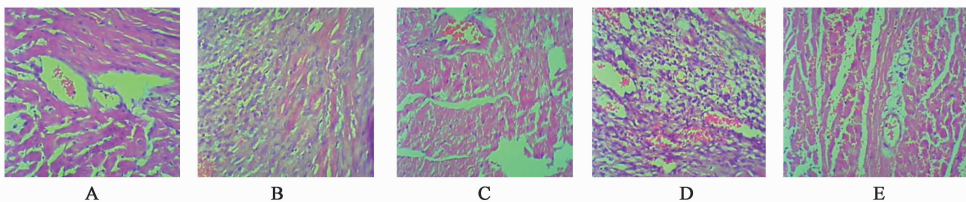
2.5 VEGF 和 CD34 蛋白表达变化 心肌组织取材同 2.2。将脱蜡和脱水处理后的切片用新鲜配置的 3% H₂O₂ 溶液室温下处理 15 min,以灭活内源性过氧化物酶。去离子水冲洗干净后,微波加热条件下用 pH 6.0 的枸橼酸缓冲液进行抗原的修复处理,PBS 冲洗后,室温下采用 5% BSA 封闭 20 min,加入 1:100 稀释的兔抗鼠 VEGF 或者 CD34 单克隆抗体,黑暗环境下 4 ℃ 孵育 12 h,加入生物素标记的羊抗兔 IgG 二抗室温下孵育 20 min,用链酶亲和素-生物素-过氧化物酶复合物处理,3,3'-二氨基联苯胺显色剂显色,苏木精复染,盐水和二甲苯脱水、透明、封

片。400 倍光学显微镜下,每张切片取 10 个无重复视野观察分析,Nikon NIS-Elements Software BR 分析系统计算各视野下目标蛋白 VEGF 或者 CD34 的平均吸光度 A。

2.6 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件系统,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 心肌组织形态学及微血管数量变化 HE 染色假手术组大鼠心肌细胞结构清晰,心肌组织排列整齐有序,血管形态完整;与假手术组大鼠比较,模型大鼠心肌组织排列错乱,细胞轮廓模糊,有核溶解现象,坏死心肌组织呈现明显的纤维化,形态学上清晰完整的血管数量明显下降($P < 0.05$);与模型组相比,各治疗组大鼠心肌组织排列相对有序,轮廓较为清晰,成纤维细胞数量下降明显,形态学上清晰完整的血管数量明显增多($P < 0.05$),见图 1,表 1。



A. 假手术组;B. 模型组;C. 黄芪提取物 10 mg·kg⁻¹·d⁻¹组;D. 黄芪提取物 20 mg·kg⁻¹·d⁻¹组;E. 黄芪提取物 40 mg·kg⁻¹·d⁻¹组(图 2~5 同)
图 1 黄芪提取物对心肌梗死大鼠心肌组织形态学和微血管数量变化的影响(HE, ×400)

Fig. 1 Effect of Astragali Radix extract on myocardial pathomorphology and quantity change of microvessel in rats with myocardial infarction (HE, ×400)

表 1 黄芪提取物对心肌梗死大鼠心肌组织微血管数量、胶原含量及内皮细胞数量的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effect of Astragali Radix extract on changes of microvessel quantity, collagen fibres and endothelial cells number in rats with myocardial infarction ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	微血管数量/个		胶原容积分数/%	内皮细胞数/个
		HE 染色	Masson 染色		
假手术	-	5.2 ± 0.4	4.6 ± 0.2	9.5 ± 2.2	4.5 ± 0.5
模型	-	3.4 ± 0.1 ¹⁾	2.0 ± 0.5 ¹⁾	44.7 ± 8.3 ²⁾	2.8 ± 0.2 ²⁾
黄芪提取物	10	17.7 ± 2.5 ⁴⁾	13.4 ± 1.8 ⁴⁾	32.2 ± 6.8 ³⁾	6.6 ± 0.4 ³⁾
	20	29.2 ± 3.4 ⁴⁾	20.5 ± 3.0 ⁴⁾	20.4 ± 5.1 ⁴⁾	12.5 ± 3.5 ⁴⁾
	40	32.5 ± 2.7 ⁴⁾	29.6 ± 2.8 ⁴⁾	12.3 ± 3.6 ⁴⁾	17.6 ± 3.4 ⁴⁾

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 心肌组织形态学及胶原含量变化 假手术组大鼠心肌组织以红色心肌组织为主,间杂蓝色的胶原组织,血管形态完整清晰;和假手术组比较,模型组大鼠心肌组织排列较为紊乱,并出现部分组织断裂现象,蓝色胶原含量明显增加($P < 0.01$),清晰完整的血管数量明显减少($P < 0.05$);与模型组比较,

各治疗组大鼠红色心肌组织占比增加显著,蓝色胶原含量明显降低($P < 0.01$),并且,清晰完整的血管数量明显增多($P < 0.01$),见图 2,表 1。

3.3 心肌组织超微结构及内皮细胞数量变化 醋酸铀-柠檬酸铅染色,透射电镜观察假手术组大鼠心肌组织排列整齐有序,闰盘清晰,血管形态清晰完

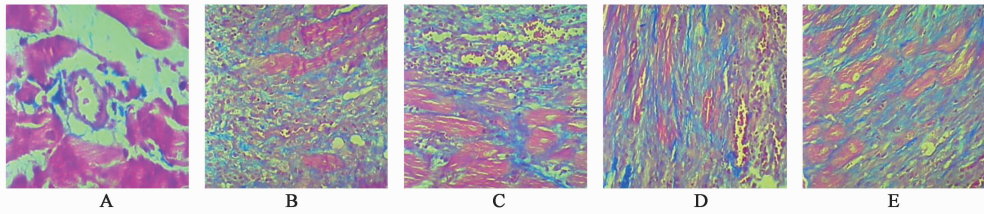


图 2 黄芪提取物对心肌梗死大鼠心肌组织形态学和胶原含量变化的影响 (Masson, ×400)

Fig. 2 Effect of Astragali Radix extract on myocardial pathomorphology and collagen fibres change in rats with myocardial infarction (Masson, ×400)

整,管壁内皮细胞胞核清晰完整,基膜平滑,伴周细胞围绕;与假手术组比较,模型组大鼠心肌组织排列紊乱,部分闰盘消失,残留的血管管壁破损,管壁内皮细胞破坏严重,数量上显著下降($P < 0.01$),基膜

明显皱缩,周细胞少见;与模型组比较,各治疗组心肌组织形态较为规则,闰盘相对清晰,血管内皮细胞数量明显增多($P < 0.05$),胞核较为清晰,周细胞可见,见图 3,表 1。

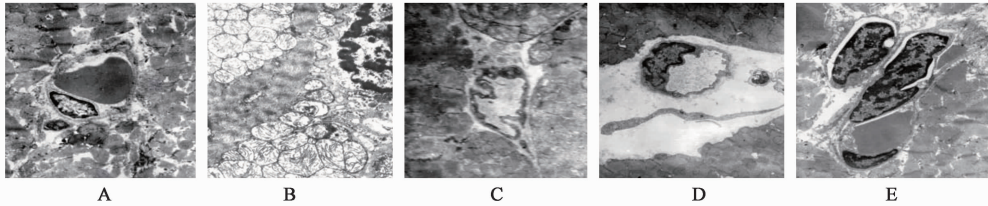


图 3 黄芪提取物对心肌梗死大鼠心肌超微结构及内皮细胞数量变化的影响 (醋酸铀柠檬酸铅双重染色, ×5 000)

Fig. 3 Effect of Astragali Radix extract on myocardial ultrastructure and endothelial cells number change in rats with myocardial infarction (lead acetate double staining, ×5 000)

3.4 大鼠心肌组织中 VEGF 和 CD34 蛋白的表达变化 心肌细胞中 VEGF 表达阳性者其胞浆内可见棕黄颗粒,CD34 表达阳性者其胞浆内可见棕褐色颗粒。假手术组大鼠心肌细胞胞浆中 VEGF 及 CD34 阳性表达的数量很少;与假手术组相比,模型组大鼠心肌组织胞浆中 VEGF 表达略有增加,CD34 的表达略有下降,但均没有统计学差异;与模型组相比,各治疗组大鼠心肌细胞胞浆中 VEGF 及 CD34 阳性表达的数量均显著上升($P < 0.01$),见图 4,5,表 2。

表 2 黄芪提取物对心肌梗死大鼠心肌组织 VEGF 及 CD34 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effect of Astragali Radix extract on the expression levels of VEGF and CD34 protein in cardiac myocytes of rats with myocardial infarction ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	蛋白/A	
		VEGF	CD34
假手术	-	41.2 ± 2.8	19.7 ± 4.5
模型	-	58.2 ± 8.8	14.4 ± 3.1
黄芪提取物	10	124.1 ± 12.3 ¹⁾	85.5 ± 5.2 ¹⁾
	20	198.6 ± 20.0 ¹⁾	169.8 ± 18.6 ¹⁾
	40	268.5 ± 25.7 ¹⁾	292.1 ± 35.3 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

在本实验研究中,大鼠心肌梗死之后,由于缺血等损伤因素的刺激,HE 染色和 MASSON 染色下的模型组大鼠心肌组织中均有肉芽组织明显增生,VEGF 和 CD34 的表达较假手术也略有升高。电镜下超微结构分析表明,模型组大鼠内皮细胞数量很少,且胞核并不完整,溶解甚至消失,血管基膜皱缩,受损严重,而内皮细胞等血管附件是血管新生的必要条件。这表明,上述损伤区域肉芽组织的发生是机体应对有害刺激的一种自我防御反应,虽有血管新生却不能形成成熟的血管。和模型组大鼠相比,各治疗组大鼠的心肌组织排列较

为规整,胶原含量明显下降,新生的血管数量显著增多,CD34 和 VEGF 的表达也明显升高。而 VEGF 是血管新生和血管形成的重要信号关联蛋白之一,可以引发内皮细胞的迁移和增殖,诱导内皮细胞的增多和新的管腔形成^[6-9];CD34 蛋白是新生血管特征性标记之一,CD34 表达水平是反映新生血管数量的重要指标之一^[6-7]。同时,电镜分析结果表明,治疗后的心肌组织中血管基膜趋向完整,特别是内皮细胞不仅胞核完整,而且数量增

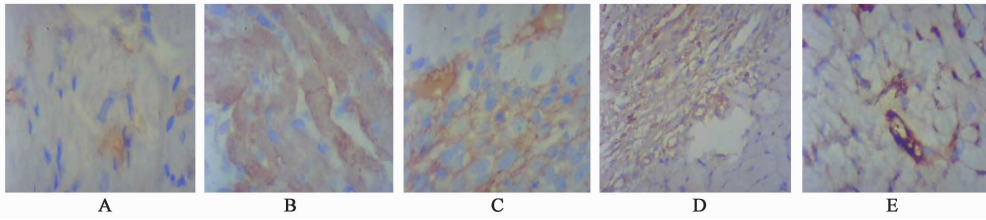


图 4 黄芪提取物对心肌梗死大鼠心肌组织 VEGF 表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 4 Effect of Astragali Radix extract on the expression levels of VEGF protein in cardiac myocytes of rats with myocardial infarction (Immunohistochemical, ×400)

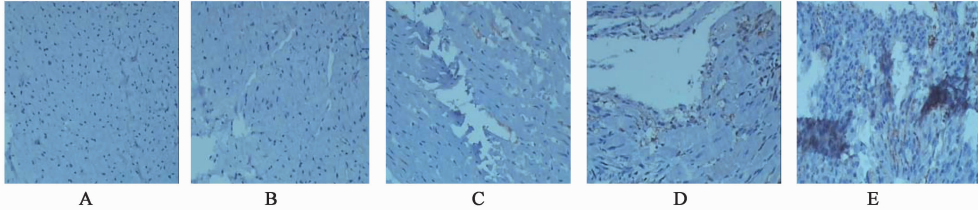


图 5 黄芪提取物对心肌梗死大鼠心肌组织 CD34 表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 5 Effect of Astragali Radix extract on the expression levels of CD34 protein in cardiac myocytes of rats with myocardial infarction (Immunohistochemical, ×400)

多。这表明黄芪提取物不仅有明显的促心肌梗死大鼠损伤心肌组织血管新生的作用,而且可以促进新生血管的发育和成熟。

近年来,促血管新生治疗的策略在心肌梗死治疗方面倍受推崇,尤其是急性心肌梗死的治疗方面,通过新的微细血管的形成,有效改善心肌梗死早期阶段心肌有效灌注不足的状态,减少心肌细胞的肥大和收缩力的下降,有效预防心肌梗死向心力衰竭阶段的发展^[1,6,9]。从中医学角度而言,心肌梗死病变重点在于心络痹阻、血行不畅,血管新生可以促进血管生成、重建和侧枝循环的建立,从而起到防治心肌缺血的作用。黄芪作为一种经典的中药,在心肌梗死的治疗过程中,通过“益气”而生新血,进而生新络。络脉是营卫气血津液输布贯通的枢纽,是物质传递的末端环节,益气补血养络则新络生,新络生则络脉通而络痹除。由此可见,黄芪对心肌梗死大鼠受损心肌组织血管新生的作用既符合中医的基本病因病机,又与现代医学的基本理论相吻合。

[参考文献]

[1] Shah A M, Mann D L. In search of new therapeutic targets and strategies for heart failure; recent advances in basic science [J]. Lancet, 2011, 378 (9792): 704-712.

[2] Tongers J, Losordo D W, Landmesser U. Stem and progenitor cell-based therapy in ischaemic heart disease: promise, uncertainties, and challenges [J]. Eur Heart J, 2011, 32(10):1197-1206.

[3] Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis [J]. Cell, 2011, 146(6):873-887.

[4] 杨雷,毛秉豫,徐国昌,等. 黄芪提取物对大鼠心肌梗死后心肌组织 PKD1 蛋白表达的影响 [J]. 中国药理学通报, 2013, 29(4):535-539.

[5] 杨雷,毛秉豫,徐国昌,等. 黄芪和丹参提取物配伍对大鼠心肌梗死后心肌组织病理变化的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(8):175-179.

[6] Yellon D M, Hausenloy D J. Myocardial reperfusion injury [J]. N Engl J Med, 2007, 357(11):1121-1135.

[7] Frangogiannis N G. The mechanistic basis of infarct healing [J]. Antioxid Redox Signal, 2006, 8(11/12):1907-1939.

[8] Tirziu D, Chorianopoulos E, Moodie K L, et al. Myocardial hypertrophy in the absence of external stimuli is induced by angiogenesis in mice [J]. J Clin Invest, 2007, 117(11):3188-3197.

[9] Shiojima I, Sato K, Izumiya Y, et al. Disruption of coordinated cardiac hypertrophy and angiogenesis contributes to the transition to heart failure [J]. J Clin Invest, 2005, 115(8):2108-2118.

[责任编辑 聂淑琴]