

心脑苏提取物对异丙肾上腺素诱导大鼠心肌缺血的 保护作用及机制

潘金火¹, 李姗姗¹, 任卫高¹, 雷飞飞¹, 孙成祥¹, 蒋志涛^{2*}

(1. 南京中医药大学, 南京 210023; 2. 张家港市中医医院, 江苏 张家港 215600)

[摘要] **目的:**研究心脑苏提取物对大鼠心肌缺血的治疗作用,并探讨其作用机制。**方法:**SD大鼠,按体重随机分为6组,即正常组,模型组,阳性对照0.135 g·kg⁻¹组(麝香保心丸组0.135 g·kg⁻¹),心脑苏提取物高、中、低剂量组(0.055, 0.276, 1.38 g·kg⁻¹),各组n≥10。异丙肾上腺素(isoproterenol, ISO)尾静脉注射建立大鼠心肌缺血模型。造模第2天开始ig给予心脑苏提取物剂量(0.055, 0.276, 1.38 g·kg⁻¹),连续给药14 d,大鼠腹主动脉取血,测定血清乳酸脱氢酶(LDH),肌酸激酶(CK),超氧化物歧化酶(SOD),丙二醛(MDA)的含量。取心脏进行苏木素和伊红(HE)染色,光镜观察其组织形态学变化。通过CD34单克隆抗体进行免疫组化技术标记心脏微血管内皮细胞,计算微血管密度(MVD)。**结果:**与正常组比较,模型组大鼠血清中CK, LDH酶活力及MDA含量显著升高, SOD活力显著降低(P<0.01);与模型组比较,心脑苏提取物中、高剂量组显著降低大鼠血清中CK, LDH酶活力及MDA含量(P<0.01), SOD活性显著增加(P<0.01),内皮血管数及MVD显著增加(P<0.01)。**结论:**心脑苏提取物能明显改善大鼠心肌缺血损伤,其机制可能为减轻氧化损伤、促进微血管再生。

[关键词] 心脑苏提取物; 心肌缺血; 异丙肾上腺素; 血管新生

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)24-0132-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015240132

Protective Effect of Xinnaosu Extracts on Myocardial Ischemic Injury Induced by Isoproterenol in Rats

PAN Jin-huo¹, LI Shan-shan¹, REN Wei-gao¹, LEI Fei-fei¹, SUN Cheng-xiang¹, JIANG Zhi-tao^{2*} (1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 2. Zhangjiagang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhangjiagang 215600, China)

[Abstract] **Objective:** To study the protective effect of Xinnaosu extract on myocardial ischemic injury induced by isoproterenol (ISO) in rats and discuss its mechanism of action. **Method:** SD rats were randomly divided into six groups, normal group, model group, positive control 0.135 g·kg⁻¹ group (Heart-protecting musk pill 0.135 g·kg⁻¹), Xinaosu extract low, medium and high dose groups (0.055, 0.276, 1.38 g·kg⁻¹), n≥10 in each group. Rats were injected with isoproterenol to induce myocardial infarction models. From the second day after modeling, rats were given with Xinaosu extract ig (0.055, 0.276, 1.38 g·kg⁻¹) for consecutive 14 d. Abdominal aortic blood samples were collected to detect the level of creatine kinase (CK), lactic dehydrogenase (LDH), superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA). Hearts were collected for hematoxylin and eosin (HE) staining and histomorphology changes were observed by light microscope. Immunohistochemical technique was done with CD34 monoclonal antibody to mark cardiac microvascular endothelial cells, and calculate microvascular density (MVD). **Result:** Compared with the normal group, the activity of CK, LDH and level of MDA in model group showed a significant increase (P<0.01). Compared with model group, the middle and high dose of Xinnaosu extracts both showed significant decrease in the activity of CK and LDH as well as the level of MDA (P<0.01), and significant increase in SOD activity (P<0.01), endothelial angiogenesis and MVD (P<0.01). **Conclusion:** Xinnaosu extract has protective effect on myocardial ischemic injury induced by isoproterenol

[收稿日期] 20150324(018)

[基金项目] 张家港市中医医院青年自然科学基金项目(zzyq1308)

[第一作者] 潘金火, 博士, 教授, 硕士生导师, 从事中药制剂和新药研发, Tel:13951856876, E-mail:panjinhua@163.com

[通讯作者] * 蒋志涛, 硕士, 从事中药制剂研究工作, Tel:15250355261, E-mail:253170992@qq.com

in rats. Its mechanism may be related to upregulating the expression of angiogenesis and reducing oxidative damages.

[Key words] Xinnaosu extracts; myocardial ischemic injury; isoproterenol; angiogenesis

心血管病严重威胁着人类的健康,它目前已成为影响健康的最主要疾病之一。近年来由于社会竞争的加剧,生活水平的提高,生活方式的改变,心血管病发病率明显增高,且有年轻化的趋势,已严重影响了人们的生活质量和预期寿命^[1-3]。“心脑苏”处方化裁自经典名方“补阳还五汤”,是由我院名老中医多年临床实践形成的经验方。全方由丹参、三七、川芎等药组成,具有行气活血、化痰祛瘀、通脉止痛之效^[4]。全方经精制后制得心脑苏提取物药粉。本研究采用大鼠尾静脉注射异丙肾上腺素(ISO)的方法制备心肌缺血模型,探讨心脑苏提取物对大鼠心肌缺血的保护及血管再生作用^[5-6]。

1 材料

1.1 试剂与药材 乳酸脱氢酶(LDH)测定试剂盒(批号 20140714),肌酸激酶(CK)测定试剂盒(批号 20140704),超氧化物歧化酶(SOD)测试盒(批号 20140704),微量丙二醛(MDA)测定试剂盒(批号 20140718),均购自南京建成生物工程研究所。麝香保心丸(批号 131204,上海和黄药业),盐酸异丙肾上腺素(ISO,批号 131002,上海禾丰制药有限公司)。丹参、三七、川芎、制南星、红花药材均购自安徽省万生中药饮片有限公司,经南京中医药大学药学院陈建伟教授鉴定均符合 2010 年版《中国药典》一部项下规定。

1.2 仪器 AG135 型电子天平(瑞士梅特勒),RM2135 型石蜡切片机,DM1000 型光学显微镜(均为德国 LEICA 公司),Tissue-Tek 型组织包埋机(日本 Sakura 公司),MiniSee 型图像采集系统,7020 型自动生化分析仪(日本日立公司),FA1104N 电子分析天平(上海精密科学仪器有限公司),Synergy HT 型紫外荧光酶标仪(美国 Bio-Tek 公司),TGL-16M 型高速台式冷冻离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司)。

1.3 供试品的制备 按照心脑苏处方比例,三七、丹参药材 70% 乙醇提取,提取液回收乙醇,浓缩得稠浸膏;川芎提取挥发油, β -环糊精包合;剩余药渣加制南星、红花水提取,水提醇沉后浓缩。将稠浸膏干燥后与挥发油包合物混合均匀得心脑苏提取物中间体。所得中间体含丹参素、原儿茶醛、丹酚酸 B 分别为 6.783,2.186,0.415 mg·g⁻¹。

1.4 动物 雄性 SD 大鼠,SPF 级,体重 200 ~ 220 g,购于上海斯莱克试验动物有限责任公司,合格证号 SCXK(沪)2007-0005。

2 方法

2.1 动物分组 大鼠按体重随机分为 6 组,即正常组,模型组,阳性对照组(麝香保心丸组),心脑苏提取物高、中、低剂量组,其中模型组 12 只,心脑苏提取物高剂量组 13 只,其他组均为 10 只。

2.2 剂量设计 大鼠等效剂量为 0.055 g·kg⁻¹ 作为低剂量组,5,10 倍剂量为中、高剂量组。心脑苏提取物低、中、高剂量组分别 ig 给与心脑苏提取物(按生药)质量浓度分别为 0.005 5,0.027 6,0.138 g·L⁻¹,给药体积应按 10 mL·kg⁻¹,剂量为 0.055,0.276,1.380 g·kg⁻¹ ig,正常组给予等体积生理盐水,阳性药物(麝香保心丸)组给予 10 倍等效剂量即 0.135 g·kg⁻¹。

2.3 造模及给药 动物适应饲养 1 周,自由饮水。除正常组外,其余各组于每日 9,15 时尾静脉注射 ISO,均为 10 mg·kg⁻¹,连续 2 d^[2]。于第 3 天开始,每日上午 9 时 ig 给药,连续给药 14 d,于末次给药 1 h 后 20% 乌拉坦 ip 麻醉。

2.4 样品采集及处理 腹主动脉取血,3 000 r·min⁻¹ 离心取上清液;取心脏,用冰冷生理盐水冲洗干净,置于 10% 福尔马林溶液中,备用^[7]。

2.5 指标检测

2.5.1 血清酶及 MDA 检测 血液 3 500 r·min⁻¹ 离心 10 min,取血清备用。采用试剂盒方法用全自动生化分析仪进行测定血清中 LDH,CK,SOD,MDA 含量。

2.5.2 组织病理学观察 取心脏,常规石蜡包埋,切片厚 4 ~ 5 μ m,苏木素和伊红(HE)染色,光镜下观察组织的病理状况。根据①灶性心肌纤维变性程度,②炎细胞浸润数量,③结缔组织增生程度,依次定量为轻度“+”,中度“++”,重度“+++”,无病变组织标记为“-”^[8]。

2.5.3 微血管密度观察 取切片大鼠心脏,CD34 抗体行免疫组化操作,凡被染成棕黄色或棕褐色的单个血管内皮细胞或细胞簇,只要其与邻近的微血管或结缔组织成分有明显区别,就视为一个微血管而计数。用 IPP 图像分析软件进行计数,每一标本

在低倍镜(×100)下选 3 个微血管数最多的区域,在每个区域中计数 1 个高倍镜(×400)下的微血管数,取 3 个视野的均值作为微血管密度(MVD)值^[9-11]。

2.6 数据分析 实验数据采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计分析,各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 LSD 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠一般情况的观察 造模前各组大鼠精

神状态良好,饮食正常,造模后大鼠饮食大量减少,几乎不活动,心跳加快,蜷缩,少数有抽搐行为;给药 1 周后,造模各组大鼠进食量增加,活动量增加,体重增长较快。

3.2 对血清酶指标的影响 与正常组比较,模型组 CK, LDH 酶活力及 MDA 含量均显著增加 ($P < 0.01$), SOD 活性显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较,心脑苏提取物低、中、高剂量组 CK, LDH 酶活力及 MDA 含量显著降低 ($P < 0.05, P < 0.01$), SOD 活性显著增加 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 心脑苏提取物对心肌缺血大鼠血清 CK, LDH, SOD 及 MDA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effects of Xinnaosu extracts on serum CK, LDH, SOD and MDA of myocardial ischemic injury in rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	CK/U·L ⁻¹	LDH/U·L ⁻¹	SOD/U·mL ⁻¹	MDA/μmol·L ⁻¹
正常	-	233.2 ± 45.9	219.4 ± 23.1	176.6 ± 12.2	322.8 ± 28.7
模型	-	454.0 ± 43.9 ¹⁾	493.3 ± 44.8 ¹⁾	132.6 ± 8.8 ¹⁾	459.1 ± 59.1 ¹⁾
心脑苏提取物	0.055	408.9 ± 24.5 ^{2,5)}	386.1 ± 51.6 ^{2,5)}	137.3 ± 5.2 ^{3,5)}	412.9 ± 58.8 ^{2,5)}
	0.276	340.7 ± 29.9 ^{3,4)}	324.8 ± 48.8 ^{3,4)}	149.3 ± 9.3 ³⁾	356.2 ± 32.4 ³⁾
	1.380	259.2 ± 30.8 ³⁾	238.9 ± 16.6 ³⁾	169.2 ± 10.9 ³⁾	336.2 ± 21.8 ³⁾
麝香保心丸	0.135	251.7 ± 26.2 ³⁾	224.6 ± 26.8 ³⁾	161.4 ± 6.7 ³⁾	328.2 ± 20.5 ³⁾

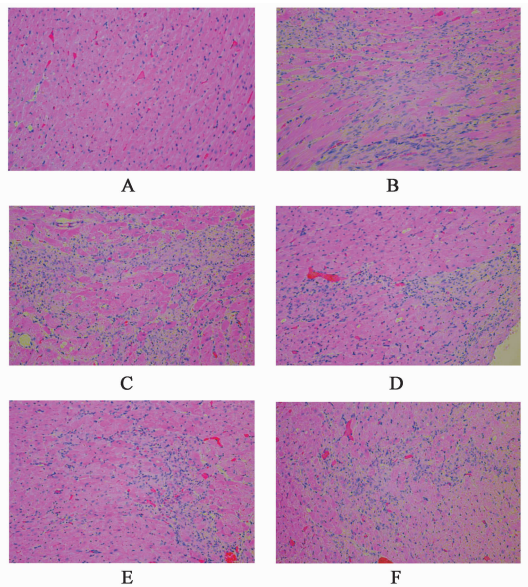
注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$;与麝香保心丸组比较⁴⁾ $P < 0.05$, ⁵⁾ $P < 0.01$ 。

3.3 对心肌组织的影响 模型组可见灶性心肌纤维变性坏死,中度炎细胞浸润,结缔组织中度增生,血管扩张出血,间质出血明显,说明造模成功;心脑苏提取物各剂量组及阳性药物组病理改变介于模型组和正常组之间,其中心脑苏提取物高剂量组与麝香保心丸组心肌病理改变状况明显轻于其他给药组。HE 染色结果见图 1。统计结果见表 2。

3.4 对心肌微血管密度的影响 与正常组比较,模型组微血管密度没有明显差异;与模型组比较,心脑苏中、高剂量组、阳性药物组 MVD 均有显著增加 ($P < 0.01$)。见表 3。

4 讨论

注射大剂量(100 mg·kg⁻¹) ISO 可诱发实验动物心肌缺血性损伤,其作用机制是异丙肾上腺素能兴奋 β 受体,使心肌兴奋性提高、收缩加快、心率加快、代谢旺盛,增加心肌耗氧量,造成心脏负荷过重,同时它还能兴奋受体,使外周血管扩张、回心血量减少、动脉压降低、冠脉流量减少^[12-13]。心肌缺血损伤可导致心肌细胞通透性增高,使一些可溶性的心肌酶类大量释放到血液中,从而使血清心肌酶的含量显著升高,故常通过检测血清心肌酶含量以判断心肌受损情况^[14]。心肌缺血后细胞内的 CK, LDH 释放入血循环,造成血中 CK, LDH 活性升高^[15];



A. 正常组; B. 模型组; C. 心脑苏 0.055 g·kg⁻¹ 组; D. 心脑苏 0.276 g·kg⁻¹ 组; E. 心脑苏 1.380 g·kg⁻¹ 组; F. 麝香保心丸 0.135 g·kg⁻¹ 组

图 1 心脑苏提取物对心肌缺血大鼠心肌病理改变的影响 (HE, ×200)

Fig. 1 Effect of Xinnaosu extracts on myocardial pathological changes of myocardial ischemia rats (HE, ×200)

SOD 活性和 MDA 含量可以反映体内氧自由基代谢水平,同时也可以作为判断心功能及心肌受损程度

表 2 心脑苏提取物对心肌缺血大鼠心肌病理改变的统计
Table 2 Statistical results of myocardial pathological changes in myocardial ischemia rats by Xinnaosu extracts

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	分级	灶性心肌	炎细胞	结缔组织
			纤维变性 /只	浸润 /只	增生 /只
正常	-	+	-	-	-
		++	-	-	-
		+++	-	-	-
模型	-	+	-	-	-
		++	-	10	10
		+++	10	-	-
心脑苏提取物	0.055	+	2	2	-
		++	7	7	9
		+++	-	-	-
	0.276	+	5	5	5
		++	5	5	5
		+++	-	-	-
	1.38	+	8	11	8
		++	3	-	3
		+++	-	-	-
麝香保心丸	0.135	+	7	7	7
		++	3	3	3
		+++	-	-	-

表 3 心脑苏提取物对大鼠缺血心肌内皮细胞数及 MVD 的影响
($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Effects of Xinnaosu extracts on angiogenesis and microvessel vascular density (MVD) in rats with myocardial ischemic injury ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	内皮细胞数 /个/高倍视野	MVD /个/mm ²
正常	-	12.6 ± 2.7	5.7 ± 1.2
模型	-	19.2 ± 3.6	8.4 ± 1.6
心脑苏提取物	0.055	20.8 ± 6.0 ³⁾	9.5 ± 2.7 ³⁾
	0.276	28.2 ± 5.3 ²⁾	13.4 ± 2.5 ²⁾
	1.380	32.4 ± 8.7 ²⁾	16.2 ± 4.4 ²⁾
麝香保心丸	0.135	37.2 ± 7.7 ²⁾	17.7 ± 3.7 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与麝香保心丸组比较³⁾ $P < 0.01$ 。

的指标。

心肌微血管的建立能减轻心肌缺血坏死,预防和延缓缺血性心脏病和室壁瘤形成,改善临床症状和预后^[16]。中医药在血管相关疾病的治疗中积累了丰富的经验,研究发现临床实践中常用的一些中药

复方是通过影响血管新生来发挥药效的,其作用机制主要体现在对血管新生因子、内皮细胞增殖和迁移的正反双向调节^[17]。已有研究表明,麝香保心丸能促进心肌微血管的再生,具有保护心肌缺血,减小梗死面积的作用^[18]。本研究以麝香保心丸为阳性药物,实验结果表明,心脑苏提取物具有与麝香保心丸类似的促血管再生的作用。模型组与正常组相比血管数有所增加,原因可能是局部缺血后,可在一定程度上诱发多种生长因子协同促进病变区短暂的血管新生,从而使机体适应和抵御局部的缺血缺氧变化。但是这种自身生理代偿性新生的血管数量有限,过程缓慢,且不具有治疗意义^[19]。

本实验结果表明,心脑苏提取物中、高剂量组均能显著降低血清中 CK, LDH, MDA ($P < 0.01$),并显著增加 SOD 活性 ($P < 0.01$),促进血管内皮细胞再生 ($P < 0.01$),明显改善心肌缺血情况。通过降低 CK, LDH 活性,减少心肌细胞的死亡和炎症细胞的浸润,提示心脑苏提取物可以减轻异丙肾上腺素所致的心肌损害;通过对 SOD, MDA 的影响,提示心脑苏提取物可能干预自由基的产生并增强自由基清除剂的功能,维持心肌细胞氧化和抗氧化平衡,阻断脂质过氧化的链锁反应,发挥了抗心肌缺血损伤作用;采用抗体 CD34 来标记大鼠缺血心肌中血管内皮细胞的表达状况,测定、分析并比较血管内皮细胞数及 MVD,表明心脑苏提取物可以促进微血管再生,进而减轻心肌缺血所导致的病变。

以上表明,心脑苏提取物对异丙肾上腺素诱导大鼠心肌缺血具有保护作用,其可能机制是通过影响氧自由基和心肌酶、促进微血管再生来改善心肌缺血,进一步机制仍有待研究。

[参考文献]

- [1] 杨艺. 浅析冠心病的病因及治疗[J]. 中外医药, 2010, 14(2): 182.
- [2] 陈虹, 朱颀鹏, 张真. 地奥心血康对心肌缺血再灌注损伤的保护作用及机制研究[J]. 中草药, 2010, 12(7): 2018-2023.
- [3] 解培顺. 冠心病的预防与治疗[J]. 中国现代药物应用, 2010, 4(5): 214-215.
- [4] 潘金火. 心脑苏提取物对离体豚鼠心脏冠脉流量的影响实验[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(6): 1534-1535.
- [5] Sawsan A, Zaitone, Noha M, et al. Rosuvastatin promotes angiogenesis and reverses isoproterenol-induced acute myocardial infarction in rats: role of iNOS and VEGF

- [J]. Eur J Pharmacol, 2012, 691(1/3):134-142.
- [6] Nagoor Meeran, Stanely M F, Mainzen Prince, et al. Protective effects of N-acetyl cysteine on lipid peroxide metabolism on isoproterenol-induced myocardial infarcted rats [J]. J Biochem Mol Toxicol, 2011, 25(3), 151-157.
- [7] Karnezis T, Shayan R, Caesar C, et al. VEGF-D promotes tumor metastasis by regulating prostaglandins produced by the collecting lymphatic endothelium [J]. Cancer Cell, 2012, 21(2):181-195.
- [8] Zheng H, Liu C, Ou Y, et al. Total saponins of Panax notoginseng enhance VEGF and relative receptors signals and promote angiogenesis derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells [J]. J Ethnopharmacol, 2013, 147(3):595-602.
- [9] 杨景柯, 冯国清. 巴戟天醇提取物促大鼠缺血心肌治疗性血管生成的实验研究[J]. 中国药理学通报, 2010, 26(3):367-371.
- [10] 姜丽红, 陈立红. 益气活血方对实验性心肌梗死大鼠心肌梗死面积及 VEGF, bFGF, V III 表达量的影响[J]. 世界中西医结合杂志, 2011, 6(12):1067-1069.
- [11] 王大英, 李勇, 范维琥. 麝香保心丸对心肌梗死大鼠梗死面积和血管新生的作用[J]. 中成药, 2004, 26(11):921-925.
- [12] Herrmann J E, Heale J, Bieraugel M, et al. Isoproterenol effects evaluated in heart slices of human and rat in comparison to rat heart *in vivo* [J]. Toxicol Appl Pharm, 2014, 274(2):302-312.
- [13] 卢志强, 张艳君. 心肌缺血模型的制作方法研究进展[J]. 中国药理学通报, 2012, 28(8):1053-1057.
- [14] 李国川, 李春香. 新冠心苏合滴丸抗异丙肾上腺素致大鼠心肌缺血的比较实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(3):56-58.
- [15] 高荣, 刘清飞. 中药双龙片对实验性大鼠心肌梗塞的治疗作用[J]. 中成药, 2010, 32(5):746-750.
- [16] 陈荣, 郭浩. 中药复方和有效成分对血管新生促进或抑制作用的研究进展[J]. 中草药, 2013, 44(23):3417-3419.
- [17] 陈裴裴, 周昕, 谢瑞芳. 基于心肌缺血的中药促血管新生机制研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2014, 21(5):133-136.
- [18] 汪姗姗, 范维琥. 麝香保心丸对实验性心肌梗塞大鼠心脏的促血管生成作用[J]. 中成药, 2002, 24(6):446-450.
- [19] 李大勇, 谷峰. 肢体缺血后代偿性血管新生及相关基因表达的动态变化和意义[J]. 中国动脉硬化杂志, 2009, 17(12):961-965.

[责任编辑 聂淑琴]

热烈祝贺中国中医科学院中药研究所屠呦呦研究员荣获

“2015年诺贝尔生理学或医学奖”

Congratulation to Youyou Tu on Her Receiving the 2015 Nobel

Prize in Physiology or Medicine