

· 药理 ·

宣痹安痛方对心肌梗死后心室重构大鼠心功能的改善及机制

陈恒文¹, 李军¹, 林飞², 李俊平³, 王阶^{1*}

(1. 中国中医科学院广安门医院, 北京 100053; 2. 新乡医学院第一附属医院, 河南新乡 453100;
3. 北京中医医院顺义医院, 北京 101300)

[摘要] 目的: 探析基于“清热活血涤痰”组方的宣痹安痛方(XBF)改善心肌梗死后心室重构大鼠心功能的作用及机制。方法: 本实验采用Wistar大鼠急性心梗模型, 经灌胃XBF(1.22 g·kg⁻¹·d⁻¹)4周后, 观察XBF对大鼠体征、心脏指数的影响, 超声心动图观察心功能变化, 病理学检查评价心脏形态变化, 酶联免疫吸附法(ELISA)评价肿瘤坏死因子-α(TNF-α), 白细胞介素-6(IL-6), IL-10等细胞炎症因子的变化, 免疫组化和蛋白免疫印迹法(Western blot)评价半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)和Caspase-9蛋白表达情况。结果: 与模型组比较, XBF组大鼠生存状态普遍有所改善, 左心室射血分数(LVEF)明显增高($P < 0.05$), 左室舒张末内径(LVIDd); 左室收缩末内径(LVIDs)明显缩小($P < 0.05$); 病理学检查显示, XBF组大鼠心肌细胞变性减少, 排列较整齐, 肌丝较为完整, 间隙较为均匀, 细胞间质胶原纤维明显减少; 心肌细胞线粒体超微结构清楚, 膜完整, 嵴致密, 基质较清楚; XBF组大鼠血清中TNF-α, IL-6表达水平显著降低($P < 0.01$), IL-10表达水平明显升高($P < 0.05$); 此外, XBF组大鼠心肌组织中Caspase-3和Caspase-9蛋白表达明显下降($P < 0.05$)。结论: 以清热活血涤痰组方的XBF能够明显改善心梗后心室重构大鼠的心功能, 其改善心功能作用机制与XBF促进心室重构的炎症因子TNF-α下调, 抑制IL-6, 促生IL-10, 抑制Caspase-3和Caspase-9的表达等因素相关。

[关键词] 宣痹安痛方(XBF); 心肌梗死; 心室重构; 半胱氨酸蛋白酶(Caspase)-3; Caspase-9

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)23-0071-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017230071

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170912.1442.052.html>

[网络出版时间] 2017-09-12 14:42

Effect of Xuanbi Antong Formula in Improving Ventricular Remodeling in Myocardial Infarction Rats and Its Mechanism

CHEN Heng-wen¹, LI Jun¹, LIN Fei², LI Jun-ping³, WANG Jie^{1*}

(1. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Science, Beijing 100053, China; 2. The First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453100, China; 3. Shunyi Hospital, Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Beijing 101300, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the effect of Xuanbi Antong formula (XBF) on ventricular remodeling in myocardial infarction rats and its mechanism. **Method:** In this study, the acute myocardial infarction model was established by ligating the anterior descending coronary artery in Wistar rats. After administration with XBF (1.22 g·kg⁻¹·d⁻¹) for 4 weeks, the effect of XBF on apparent signs and cardiac indexes of the Wistar rats were observed, the left ventricular ejection fraction (LVEF) observed by Doppler ultrasonography, the changes in cardiac morphology were observed by pathological examination, the expressions of tumor necrosis factor-α

[收稿日期] 20170710(002)

[基金项目] 国家科技重大专项(2013ZX09301307); 国家自然科学基金项目(81503421)

[第一作者] 陈恒文, 博士, 助理研究员, 从事心血管临床与药物研究, E-mail: chenhengwen@163.com

[通讯作者] *王阶, 博士, 主任医师, 从事心血管中西医结合临床与基础研究, Tel: 010-88001817, E-mail: jiewang1001@126.com

(TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and IL-10 were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the expressions of Caspase-3 and Caspase-9 were detected by immunohistochemistry and Western blot. **Result:** Compared with model group, the survival conditions of rats in all treatment groups were generally improved after XBF treatment, LVEF were significantly increased ($P < 0.05$), both LV end-diastolic inner diameter (LVIDd) and LV end-systolic inner diameter (LVIDs) were significantly reduced ($P < 0.05$). Pathological examination showed that the myocardium degeneration of the rats treated with XBF was decreased in a good order, the myofilaments were complete, the gaps were more uniform, and the interstitial collagen fibers were significantly reduced. The mitochondrial structure of cardiomyocytes was significantly improved, the ultrastructure was clear, and the arrangement of myofilaments was more regular. TNF- α and IL-6 were decreased ($P < 0.01$), and IL-10 was increased ($P < 0.05$) in rats treated with XBF. The expressions of Caspase-3 and Caspase-9 were descended in rats treated with XBF ($P < 0.05$). **Conclusion:** XBF for 'clearing heat, promoting blood circulation and removing phlegm' can significantly improve the LVEF of rats after ventricular remodeling resulted in myocardial infarction. The mechanism may be that XBF can decrease and inhibit inflammatory factors for promoting ventricular remodeling, such as TNF- α and IL-6, increase inflammatory inhibitor IL-10, and inhibit the expressions of Caspase-3 and Caspase-9.

[**Key words**] Xuanbi Antong formula (XBF); myocardial infarction; ventricular remodeling; Caspase-3; Caspase-9

急性心肌梗死(AMI)是由于冠状动脉发生严重病变,使血液供应出现急剧减少甚至中断,导致其心肌出现严重持久地缺血,以致部分心肌梗死的病理过程。AMI可并发致命性心律失常、休克及急性心力衰竭(心衰)等急性心血管事件,远期亦可并发慢性心衰,严重影响AMI的预后,而AMI后心室重构(VR)则是导致慢性心衰的首要因素^[1]。AMI发生后出现的心室形态和结构的改变,进而引起血液动力学改变,最终出现心衰^[2]。因此,延缓或阻止心室重构是预防心梗后心衰的重要环节。已有研究证实,肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素(IL)-6和IL-10等炎症细胞因子水平的高低与心衰严重程度密切相关^[3]。TNF- α 可以通过激活炎症细胞而启动级联反应,不断加重心梗后的心室重构;IL-6和其受体结合,可以诱导心肌成纤维细胞向肌纤维细胞的转化,促使心脏出现纤维化,导致心室重构;而IL-10可以抑制辅助性T细胞产生干扰素(IFN),有效防止炎症细胞的增殖和活化,起到抗炎作用,改善心室重构^[3]。

心衰的能量代谢障碍机制是当前研究的热点之一,研究表明心肌能量代谢紊乱是导致心衰发生、发展的主要原因之一。充血性心衰(CHF)发生时线粒体结构被破坏,其功能异常,导致ATP生成减少,进而导致能量供应不足,最终促使心肌细胞凋亡,研究表明心肌细胞凋亡是CHF过程中心肌重构发生的重要机制^[4-5]。研究还发现在慢性心衰大鼠、

超容量负荷型心衰及心肌缺血再灌注模型兔中,半胱氨酸蛋白酶(Caspase)-3和Caspase-9参与了心衰、心室重构的发生和发展,其水平的高低与心衰的严重程度呈正相关^[6-7]。由此推测在能量代谢障碍机制中Caspase-3,Caspase-9异常的生物学途径是导致心衰的重要原因。因此抑制TNF- α ,IL-6,Caspase蛋白的表达,促进IL-10的表达对改善心室重构具有重要意义。

基于“清热活血涤痰”组方的宣痹安痛方(XBF)是中国中医科学院广安门医院临床治疗缺血性心脏病的经验方,由丹参、黄连、半夏等中药组成,具有祛瘀止痛、清热化痰之功效,用于治疗瘀热痰互结所致胸痹心痛,临床疗效确切。基于前期提取制备工艺以及初步药理筛选的研究^[8],XBF对心肌梗死模型大鼠心脏有显著保护作用,能明显增加心肌梗死后大鼠左心室射血分数,减轻左心室扩张程度,改善心梗后心室重构,其中XBF中剂量组(1.22 g·kg⁻¹·d⁻¹)效果最为明显。为了进一步验证XBF对心梗大鼠的治疗效果及作用机制,本实验采用Wistar大鼠急性心肌梗死模型构建心室重构模型,灌胃给予XBF(1.22 g·kg⁻¹·d⁻¹)4周后,观察XBF对心肌梗死后心功能、心肌组织形态学、炎症因子以及心肌细胞凋亡的影响。

1 材料

1.1 动物 SPF级雄性Wistar大鼠共100只,体重(200±10)g,购自北京维通利华实验动物有限

公司,合格证号 SCXK(京)2015-0007。经中国中医科学院广安门医院动物伦理委员会(批号 2015EC035-01)批准,按中国伦理委员会有关动物研究指导原则的要求,饲养于中国中医科学院广安门医院动物房,室内保持恒温状态(25 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,进食和饮水不加限制,标准饲料喂养。

1.2 仪器 SSD-5000 型多普勒超声仪(日本 Aloka 公司);AU640 型全自动生化分析仪,IX-70 型倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司);PowerLab 型多导生理记录仪(澳大利亚 Adinstruments 公司);ST 5020 型自动染色染色机(德国 Leica 公司);MK3 型酶标仪(美国 Thermo 公司);VE180 型小型高通量电泳槽,VE186 型转膜仪(上海天能科技有限公司);DS-Ri1-U3 型数码显微成像系统(日本 Nikon 公司);JEM-1400 型透射电子显微镜(日本 JEOL 公司);HX-300 型动物呼吸机(成都泰盟软件有限公司)。

1.3 药物与试剂 XBF 由中国中医科学院广安门医院新药研发中心提供;卡托普利(中美上海施贵宝制药有限公司,批号 AAA9286); β -肌动蛋白(β -actin,北京中杉金桥生物技术有限公司,货号 TA-09);单克隆抗体 Caspase-3, Caspase-9,辣根过氧化酶标记抗大鼠二抗(美国 Cell signaling 公司,批号分别为 15120618, 15110720, 16010108);蛋白质裂解液(北京优科卓越生物科技有限公司,批号 P001);BCA 蛋白测定试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司,货号 02912E);IL-6, IL-10, TNF- α 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(杭州联科生物技术股份有限公司,批号分别为 21543652, 15072221, 23122470),其余试剂皆为国内分析纯。

2 方法

2.1 大鼠心梗模型建立 根据文献[9-10]和前期研究结果构建急性心肌梗死大鼠模型。Wistar 大鼠称重,做标号;用 10% 水合氯醛经腹腔注射进行麻醉($0.33 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),剃毛备皮,将大鼠仰卧固定于手术台,碘伏消毒,术前以 B 超测心率及心脏射血分数;经口插入气管插管,连接呼吸机,进行辅助呼吸,设置潮气量 8 mL,频率为 70 次/min,呼吸比为 1:3,连接多通道生理信号采集系统,描记术前 II 导联心电图;在大鼠左胸第 3~4 肋间开胸,用眼科开睑器打开胸腔,暴露心脏,结扎冠状动脉前降支。其中假手术组大鼠心脏相同部位只穿线,不结扎;心梗模型建立成功后,逐层缝合肌层及皮肤。模型成功标准,结扎下方心肌颜色变灰白,同时心电图 ST 段进行性

抬高甚至弓背向上(较正常至少抬高 2 mm);模型剔除标准,术前发现大鼠心率 $< 350 \text{ bpm}$ 或有心律失常者始终未转复者、结扎后心肌颜色未明显改变或 ST 段未抬高者、未到取材时间死亡者;术后前 3 d 每只大鼠皮下注射单位青霉素以预防感染。

2.2 分组及给药 预实验分组,将术后存活大鼠随机分为假手术组,模型组, XBF 高、中、低剂量 ($2.44, 1.22, 0.61 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 组。XBF 中剂量组给药剂量为 70 kg 体重成人等效剂量(按体表面积折算),高剂量为成人等效剂量的 2 倍,低剂量组为成人等效剂量的 1/2 倍,用 0.5% 羧甲基纤维素钠水溶液配成的混悬液灌胃,假手术组和模型组给予等量 0.5% 羧甲基纤维素钠水溶液灌胃, $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。术后苏醒后 2 h 开始给药,正常给予饮水与饲料,对急性心梗模型成功大鼠喂养 28 d,每天灌胃 1 次。

正式实验分组,将术后存活大鼠随机分为假手术组,模型组,卡托普利组, XBF 组,各 15 只。卡托普利组按成人 70 kg 体重折算给药量,为 $9.00 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, XBF 组选择预实验中最佳有效剂量进行实验,采用 0.5% 羧甲基纤维素钠水溶液配成的混悬液灌胃,假手术组、模型组给予等量 0.5% 羧甲基纤维素钠水溶液灌胃, $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。饲养时间和方法同 2.2 项。

2.3 XBF 对心室重构作用的实验方法 为观察 XBF 对心室重构的作用,选取假手术组,模型组,卡托普利组, XBF 组等 4 组大鼠,对大鼠体征变化、心脏质量指数、心功能变化、心肌组织形态学等各项指标进行观察。

2.4 一般观察 观察大鼠毛色、活动情况、精神状态、进食量、饮水量、体重、粪便等。

2.5 心脏指数检测 分别称量各组大鼠体重(W),全心重(HW),并按照以下公式计算心脏质量指数(HMI)。

$$\text{心脏质量指数} = \text{心脏质量}(\text{mg}) / \text{体重}(\text{g})$$

2.6 心功能检测 取材前将各组大鼠用 10% 水合氯醛经腹腔麻醉,将胸部剃毛备皮,以背位固定于操作台,进行心脏超声检查,测量左心室舒张末期(LVIDd)和收缩末期内径(LVIDs),左心室射血分数(LVEF)。

2.7 取材及标本处理方法 按照魏本君^[11]操作方法,给药 4 周后,将各组大鼠用 10% 水合氯醛($300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)腹腔注射麻醉后,固定于解剖台,进行抽血、取心脏,取电镜用心尖组织、取苏木素-伊红

(HE)染色和马松(Masson)染色用心肌梗死组织后,其余组织-80℃保藏备用。

2.8 观察心室重构形态学 根据杨洁琼等^[12]的制片方法,通过HE染色法观察心肌细胞形态变化;参照王岩等^[13]的制片方法,通过Masson染色观察心肌细胞纤维化程度,由中国中医科学院广安门医院病理室协助完成。

通过透射电镜观察线粒体超微结构。大鼠心肌组织常规取材后,将组织立即投入2.5%戊二醛溶液中进行固定,固定4h以上;用1%四氧化锇固定1.5h,再用磷酸缓冲液(PBS)漂洗3次;以1%醋酸铀浸泡2h,再分别用梯度乙醇依次脱水,用环氧树脂-丙酮(1:1)浸泡2h;再用环氧树脂812+815包埋;最后用Leica超薄切片机切片(50~70nm),即可用透射电镜进行观察。

2.9 TNF-α, IL-6, IL-10 炎症因子检测 按照试剂盒说明书分别检测大鼠血清TNF-α, IL-6, IL-10含量。于ELISA检测仪450nm处,以空白孔调零后测各孔吸光度A。

2.10 免疫组化法检测 Caspase-3, Caspase-9 蛋白 按照免疫组化步骤进行操作^[12], Caspase-3, Caspase-9主要表达部位在心肌细胞的胞浆,在切片

中可以看到细胞浆呈棕色(棕黄、棕色、棕褐色)。以阳性细胞的积分吸光度IA表示表达水平,IA测量按照文献[12]描述的方法,然后进行数据统计。

2.11 Western blot 检测 Caspase-3, Caspase-9 蛋白 心肌组织总蛋白的提取,配制10%分离胶,检测蛋白样品上样,封闭,一抗(1:1000)孵育,二抗(1:1000)孵育,加入ECL到膜的蛋白面,胶片曝光,显影2min,定影,扫描图片进行保存。运用Image J分析软件对图片进行分析,样品目的蛋白相对含量以目的蛋白灰度值/内参GAPDH灰度值表示。

2.12 统计学分析 采用SPSS 17.0软件进行数据分析,所有数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用One-Way ANOVA方差分析或T检验进行组间比较,不服从正态分布者,采用非参数检验。以 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

3 结果

3.1 XBF 用药剂量筛选 预实验表明XBF对心肌梗死大鼠缓解期心脏有确切的保护作用,能抑制心肌梗死后大鼠LVEF下降,减轻左心室扩张程度,各工艺组相对于模型组均有明显效果,尤以中剂量组效果最为明显,后续实验药物剂量为XBF中剂量(1.22 g·kg⁻¹·d⁻¹)。见表1。

表1 XBF对心肌梗死大鼠心功能的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of XBF on cardiac function in rats with myocardial infarction($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/g·kg ⁻¹	HR/beats·min ⁻¹	LVEF/%	LVIDd/mm	LVIDs/mm
假手术	10	-	472.25 ± 23.14	96.66 ± 1.85	0.63 ± 0.07	0.19 ± 0.03
模型	15	-	483.67 ± 18.74	68.27 ± 7.42 ²⁾	0.71 ± 0.08 ¹⁾	0.47 ± 0.06 ²⁾
XBF	14	2.44	454.83 ± 43.43	86.75 ± 2.32 ⁴⁾	0.65 ± 0.05 ³⁾	0.34 ± 0.08 ⁴⁾
	15	1.22	455.67 ± 35.51	89.73 ± 5.45 ⁴⁾	0.64 ± 0.06 ³⁾	0.32 ± 0.06 ⁴⁾
	16	0.61	456.31 ± 60.13	77.37 ± 3.48 ³⁾	0.68 ± 0.08	0.41 ± 0.03 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⁾ $P < 0.01$ (表2~6同)。

3.2 XBF 对大鼠一般情况的影响 模型组大鼠因室颤在术后第1天死亡2只,其余无死亡。治疗期间,除假手术组外,其余各组大鼠均出现不同程度地消瘦、脱毛、厌食、便溏等症状,其中以模型组大鼠症状最为严重,卡托普利组和XBF组大鼠生存状态有明显改善。

3.3 XBF 对心肌梗死大鼠心脏指数的影响 与假手术组比较,模型组大鼠心脏指数明显增大($P < 0.05$);与模型组比较,卡托普利组和XBF组心脏指数明显减小($P < 0.05$),与假手术组比较未出现统计学差异。见表2。

表2 XBF对心肌梗死大鼠心脏指数的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of XBF on cardiac indexes in rats with myocardial infarction($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/g·kg ⁻¹	心脏指数/mg·g ⁻¹
假手术	15	-	2.58 ± 0.16
模型	13	-	2.80 ± 0.09 ¹⁾
卡托普利	15	0.009	2.63 ± 0.12 ³⁾
XBF	15	1.22	2.60 ± 0.07 ³⁾

3.4 XBF 对心肌梗死大鼠心功能的影响 与假手术比较,模型组大鼠LVEF显著下降($P < 0.01$),

收缩期心室腔、舒张期心室腔均显著增大 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 卡托普利组大鼠 LVIDd, LVIDs 均明显缩小 ($P < 0.05$), LVEF 改变不明显; XBF 组大鼠 LVEF 明显增高 ($P < 0.05$), LVIDd, LVIDs 明显缩小 ($P < 0.05$)。见表 3。

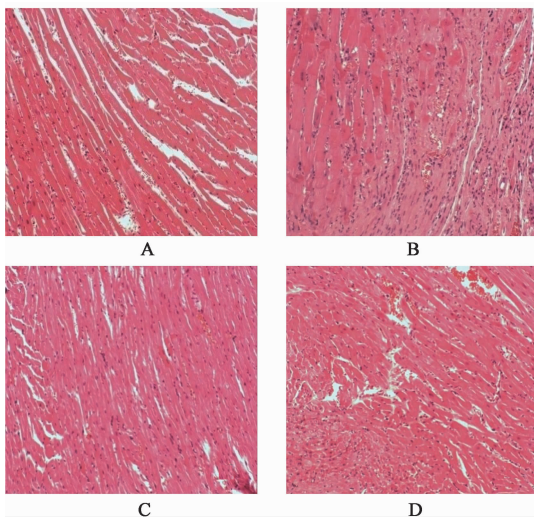
表 3 XBF 对心肌梗死大鼠心功能的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of XBF on cardiac function in rats with myocardial infarction ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量 /g·kg ⁻¹	LVEF/%	LVIDd/mm	LVIDs/mm
假手术	15	-	95.48 ± 3.06	0.58 ± 0.05	0.19 ± 0.06
模型	13	-	68.32 ± 9.64 ²⁾	0.76 ± 0.11 ²⁾	0.50 ± 0.09 ²⁾
卡托普利	15	0.009	72.85 ± 8.28	0.68 ± 0.09 ³⁾	0.42 ± 0.09 ³⁾
XBF	15	1.22	83.67 ± 5.41 ³⁾	0.67 ± 0.09 ³⁾	0.41 ± 0.07 ³⁾

3.5 XBF 对心肌梗死大鼠心脏组织病理水平的影响

HE 染色可以看出假手术组大鼠心肌细胞排列较为整齐, 清晰可见, 细胞间隙较为均匀, 肌丝较为完整; 模型组大鼠可见有些部位心肌细胞坏死, 部分细胞核固缩、碎裂, 有些心肌纤维溶解并断裂; 卡托普利组大鼠心肌组织可见少量心肌细胞坏死, 少量细胞变性, 炎性浸润较轻, 局部心肌纤维排列紊乱; XBF 组大鼠心肌组织整体形态相对较为清晰, 可见少量心肌细胞坏死, 炎细胞浸润较轻, 心肌纤维排列较整齐。与模型组比较, 卡托普利组和 XBF 组都有明显改善。见图 1。



A. 假手术组; B. 模型组; C. 卡托普利组; D. XBF 组 (图 2~6 同)

图 1 XBF 对心肌梗死大鼠心脏组织病理水平的影响 (HE, ×100)

Fig. 1 Effect of XBF on heart histopathology in rats with myocardial infarction (HE, ×100)

Masson 染色可见假手术组心肌细胞排列较为

整齐, 细胞间质胶原纤维没有明显增生; 模型组大鼠心肌组织结构比较紊乱, 心肌细胞排列极不整齐, 并出现明显肥大, 心肌细胞被胶原纤维取代; 与模型组比较, 卡托普利组和 XBF 组大鼠心肌组织有显著改善, 胶原纤维明显减少。见图 2。

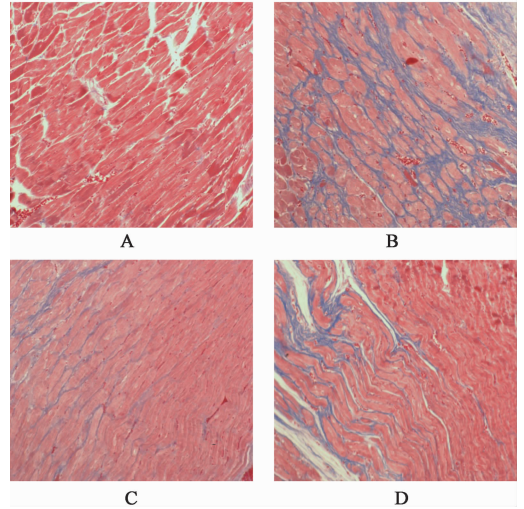


图 2 XBF 对心肌梗死大鼠心脏组织胶原纤维的影响 (Masson, ×100)

Fig. 2 Effect of XBF on heart collagen fibrils in rats with myocardial infarction (Masson, ×100)

透射电镜可见假手术组心肌线粒体超微结构清楚, 闰盘整齐, 连续性好, 膜较完整, 嵴致密, 偶见个别线粒体嵴增宽, 嵴断裂或空泡; 模型组线粒体肿胀明显, 部分出现峭断裂, 多见嵴模糊紊乱, 部分嵴消失或空泡化, 基质模糊不清, 并可见破碎线粒体。内膜和外膜的完整性明显受到破坏, 排列较为紊乱, 结构较为松散, 肌原纤维粗细不均, 肌节结构不清, 大部分肌丝破坏, 溶解, 部分闰盘紊乱, 连续性差; 卡托普利组线粒体轻度断裂, 部分膜破裂, 线粒体嵴减少, 嵴模糊不清, 部分嵴消失或空泡化, 部分菱形嵴和纵向嵴。肌浆网轻度扩张, 肌丝排列规则, 整齐, 闰盘整齐, 连续性好; XBF 组心肌线粒体超微结构清楚, 线粒体嵴有轻度断裂, 膜较完整, 嵴致密, 基质清楚, 偶见线粒体嵴模糊不清。线粒体呈带状分布, 排列整齐。肌节排列较为整齐, 可见少量胶原增生。与模型组比较, 卡托普利组和 XBF 组线粒体结构均得到明显改善。见图 3。

3.6 XBF 对心肌梗死大鼠血清炎症因子的影响

与假手术组比较, 模型组大鼠血清中 TNF- α , IL-6 显著升高 ($P < 0.01$), IL-10 显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 卡托普利组大鼠血清中 IL-6 显著降低 ($P < 0.01$), TNF- α 明显降低 ($P < 0.05$), IL-10 未

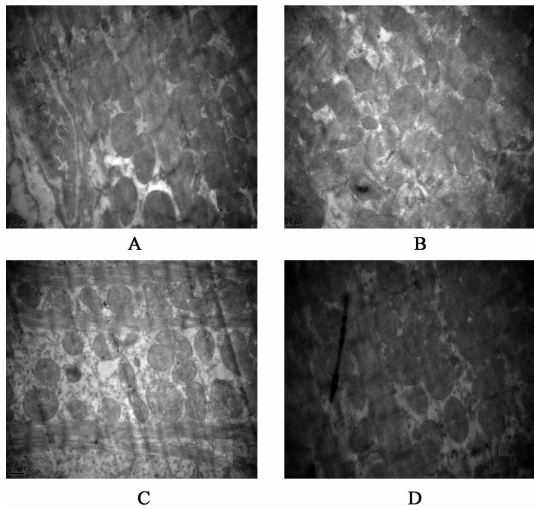


图 3 XBF 对心肌梗死大鼠心肌细胞线粒体的影响 (透射电镜, $\times 20\ 000$)

Fig. 3 Effect of XBF on myocardial mitochondria in rats with myocardial infarction (transmission electron microscope, $\times 20\ 000$)

出现统计学差异;XBF 组大鼠血清中 TNF- α , IL-6 显著降低 ($P < 0.01$), IL-10 明显升高 ($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 XBF 对心肌梗死大鼠血清炎症因子的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Effect of XBF on inflammatory factors in rats with myocardial infarction ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量 /g·kg ⁻¹	IL-6	IL-10	TNF- α
假手术	15	-	53.18 \pm 3.65	42.90 \pm 17.23	123.44 \pm 26.51
模型	13	-	126.66 \pm 13.00 ²⁾	21.09 \pm 11.92 ²⁾	238.17 \pm 46.18 ²⁾
卡托普利	15	0.009	62.04 \pm 12.63 ⁴⁾	24.10 \pm 9.32	206.44 \pm 36.88 ³⁾
XBF	15	1.22	66.18 \pm 17.69 ⁴⁾	39.67 \pm 8.48 ³⁾	177.38 \pm 20.42 ⁴⁾

3.7 XBF 对心肌梗死大鼠心肌细胞中 Caspase-3, Caspase-9 蛋白表达的影响 Caspase-3, Caspase-9 阳性细胞染色定位于细胞浆中,与假手术组比较,模型组 Caspase-3, Caspase-9 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,卡托普利组, XBF 组 Caspase-3, Caspase-9 蛋白表达均有明显降低 ($P < 0.05$)。见表 5,图 4,5。

表 5 XBF 对心肌梗死大鼠心肌细胞中 Caspase-3 和 Caspase-9 蛋白表达 IA 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Effect of XBF on Caspase-3 and Caspase-9 expressions IA in rats with myocardial infarction ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/g·kg ⁻¹	Caspase-3	Caspase-9
假手术	15	-	0.21 \pm 0.04	0.23 \pm 0.03
模型	13	-	0.44 \pm 0.04 ²⁾	0.47 \pm 0.02 ²⁾
卡托普利	15	0.009	0.32 \pm 0.02 ³⁾	0.33 \pm 0.03 ³⁾
XBF	15	1.22	0.31 \pm 0.05 ³⁾	0.34 \pm 0.04 ³⁾

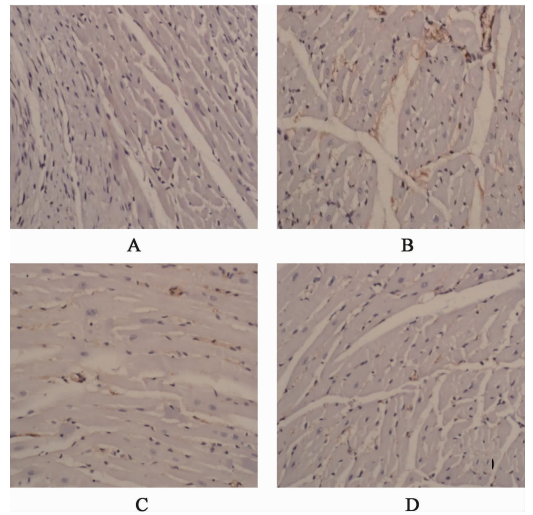


图 4 XBF 对心肌梗死大鼠心肌细胞中 Caspase-3 蛋白表达的影响 (免疫组化, $\times 200$)

Fig. 4 Effect of XBF on Caspase-3 expression in rats with myocardial infarction (IHC, $\times 200$)

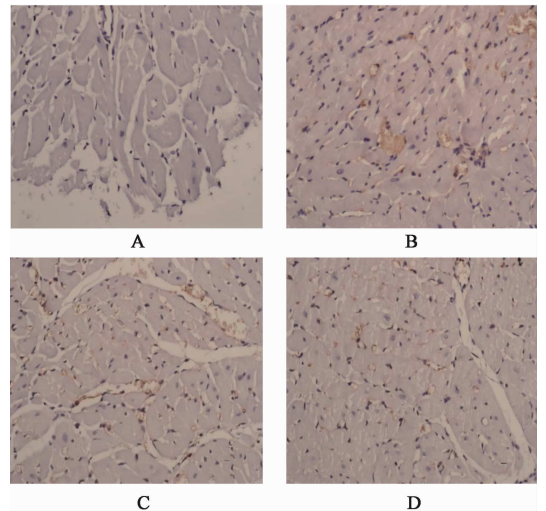


图 5 XBF 对心肌梗死大鼠心肌细胞中 Caspase-9 蛋白表达的影响 (免疫组化, $\times 200$)

Fig. 5 Effect of XBF on Caspase-9 expression in rats with myocardial infarction (IHC, $\times 200$)

与假手术组比较,模型组的 Caspase-3, Caspase-9 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,卡托普利组 Caspase-3, Caspase-9 蛋白表达水平均明显下降 ($P < 0.05$), XBF 组 Caspase-3, Caspase-9 蛋白表达显著下降 ($P < 0.01$)。见图 6,表 6。

4 讨论

临床试验结果证实宣痹安痛方在治疗冠心病、高血压病等所致充血性心衰中疗效显著,安全无副作用。现代药理实验结果显示组成 XBF 的丹参、黄连、三七、人参、葛根、赤芍、肉苁蓉、法半夏等中药能

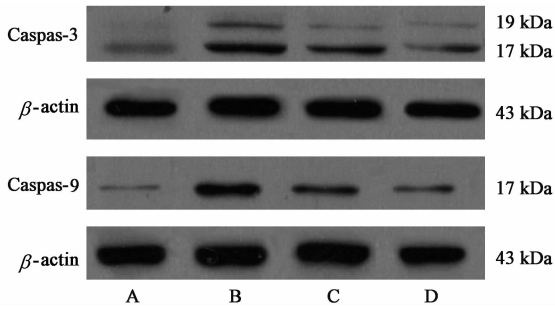


图 6 心肌梗死大鼠心肌细胞中 Caspase-3 和 Caspase-9 蛋白表达电泳

Fig. 6 Electrophoresis of Caspase-3 and Caspase-9 expressions in rats with myocardial infarction

表 6 XBF 对心肌梗死大鼠心肌细胞中 Caspase-3 和 Caspase-9 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 6 Effect of XBF on Caspase-3 and Caspase-9 expressions in rats with myocardial infarction ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/g·kg ⁻¹	Caspase-3/ β -actin	Caspase-9/ β -actin
假手术	15	-	0.18 ± 0.04	0.20 ± 0.02
模型	13	-	0.45 ± 0.04 ²⁾	0.48 ± 0.04 ²⁾
卡托普利	15	0.009	0.36 ± 0.04 ³⁾	0.40 ± 0.05 ³⁾
XBF	15	1.22	0.25 ± 0.05 ⁴⁾	0.23 ± 0.02 ⁴⁾

增加心肌收缩力、有扩张冠状动脉、扩张周围血管、降低血压和左室舒张末期压力、降低心脏前后负荷、减轻心室重构、改善心功能等作用^[14-21],但机制尚不清楚,为此,本文在前期研究的基础上通过 XBF 干预急性心肌梗死大鼠模型,对 XBF 改善大鼠心室重构的作用及机制进行研究。

4.1 宣痹安痛方对大鼠心功能的影响 心肌细胞富含 40% 线粒体,提供给心肌 90% 以上的能量,心肌为高能量需求组织,能量代谢异常直接或者间接影响心室重构,现代研究证实能量代谢障碍机制是导致心衰的重要原因^[10]。本研究发现,XBF 能显著改善急性心肌梗死大鼠心功能,且大鼠生存状态优于模型组,研究结果显示 XBF 组大鼠射血分数出现显著增高,LVIDd, LVIDs 均出现减小的现象。心肌组织病理学结果显示,经 XBF 治疗后大鼠心肌细胞变性减少,排列较整齐,肌丝较为完整,间隙较为均匀,细胞间质胶原纤维明显较少,与卡托普利治疗效果相当。更为重要的是,大鼠心肌线粒体发现经 XBF 治疗后其结构出现了明显改善,超微结构清楚,膜较完整,嵴较为致密,基质清楚,线粒体膜较为完整,肌丝排列较为规则。本研究结果显示 XBF 改善心室重构可能同改善心肌细胞以及超微组织,进而影响能量代谢相关。

4.2 XBF 对大鼠 TNF- α , IL-6 和 IL-10 的影响 一般而言细胞炎症因子影响结果有 2 个方面,TNF- α , IL-6 等炎症因子可加重炎症反应,促进心脏纤维化,进而引发心衰;而 IL-10 等炎症因子可抑制炎症反应,保护心肌细胞^[3]。本实验发现,与假手术组大鼠比较,模型组大鼠血清中炎症因子 TNF- α , IL-6, IL-10 均出现明显差异,说明炎症机制存在于结扎冠状动脉所致的心肌梗死模型中;卡托普利和 XBF 均可以下调血清中促炎性反应的因子 TNF- α , IL-6,但卡托普利对抑制炎症反应的因子 IL-10 的调节不明显,XBF 可以同时上调 IL-10 表达水平,表明 XBF 可以双向调节炎症因子,减少炎症级联反应对心室纤维化的影响,预防心衰的发生。

4.3 XBF 对心梗大鼠 Caspase-3 和 Caspase-9 表达的影响 研究发现心肌细胞凋亡伴随心衰的整个过程^[22]。线粒体是细胞生命活动控制中心和细胞凋亡调控中心,细胞凋亡表现为凋亡信号通路的启动及相关基因的表达。Caspase 途径是心肌细胞凋亡的重要途径,其中 Caspase-3 是凋亡发生的标志酶,位于凋亡级联反应的下游^[23]。心肌细胞凋亡或通过死亡受体途径或通过线粒体途径^[24]激活 Caspases 家族,其上游的 Caspase-9 在细胞凋亡过程中被各种促凋亡因子促进形成的凋亡体所激活,从促进 Caspase-3 的表达,进而执行心肌细胞凋亡过程^[25]。

本研究显示 XBF 和卡托普利对 Caspase-3, Caspase-9 的表达均具有明显抑制作用,且 XBF 组效果显著优于卡托普利组,其干预后可明显改善心衰大鼠的临床症状和心功能指标,与模型组大鼠比较具有显著差异,从而推测 XBF 能减少细胞凋亡、抑制心室重构,改善心衰的形成和发展,这可能是其治疗心梗后心衰的机制之一。

总之,以“清热活血涤痰”组方的 XBF 能够明显改善急性心肌梗死后心室重构大鼠的心功能,其改善心功能作用机制同 XBF 促进心室重构的炎症因子 TNF- α 下调,抑制 IL-6, 促生 IL-10, 抑制 Caspase-3 和 Caspase-9 的表达等因素相关。但是目前本研究仅对 XBF 治疗 CHF 的作用机制从病的角度进行了初步探讨,而对病证结合模型的治疗作用,XBF 在病证结合模型中的代谢组学分析等方面尚待深入研究。

[参考文献]

[1] Macintyre L, Capewell S, Stewart S, et al. Evidence of improving prognosis in heart failure: trends in case

- fatality in 66547 patients hospitalized between 1986 and 1995 [J]. *Circulation*, 2000, 102(10):1126-1131.
- [2] 黄根牙, 顾新元, 唐利龙. 急性心肌梗死后早期心功能的变化及其调节机制[J]. *心血管病学进展*, 2008, 29(6):851-854.
- [3] Haugen E, Gan L M, Isic A, et al. Increased interleukin-6 but not tumour necrosis factor-alpha predicts mortality in the population of elderly heart failure patients [J]. *Exp Clin Cardiol*, 2008, 13(1):19-24.
- [4] KANG P M, Izumo S. Apoptosis in heart: basic mechanisms and implications in cardiovascular diseases [J]. *Trends Mol Med*, 2003, 9(4):177-182.
- [5] Higuchi M, Aggarwal B B, Yeh E T. Activation of CPP32-like protease in tumor necrosis factor-induced apoptosis is dependent on mitochondrial function [J]. *J Clin Invest*, 1997, 99(7):1751-1758.
- [6] Di-Lisa F, Canton M, Menabo R, et al. Mitochondria and cardioprotection [J]. *Heart Fail Rev*, 2007, 12(3/4):249-260.
- [7] Ashrafian H, Frenneaux M P. Metabolic modulation in heart failure; the coming of age [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2007, 21(1):5-7.
- [8] 陈恒文, 张翠英, 任伟光, 等. 多指标综合评分法优化宣痹安痛方的水提醇沉工艺 [J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(1):70-74.
- [9] 张冬颖, 罗羽慧, 杨辉, 等. 冠状动脉结扎与腹主动脉缩窄所致慢性心力衰竭大鼠模型比较 [J]. *中国微循环*, 2005, 9(3):171-174.
- [10] 高琴, 关瑞锦. 充血性心力衰竭大鼠模型的制作及意义 [J]. *心血管康复医学杂志*, 2004, 13(1):27-30.
- [11] 魏本君. 基于《伤寒论》辛开苦降法对心梗后心室重构大鼠的作用及机制研究 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2016.
- [12] 杨洁琼, 胡明珠, 杜斌, 等. AMPK/PGC-1 α 信号通路在硫化氢抗心肌缺血/再灌注损伤中的作用 [J]. *中国药理学通报*, 2015, 31(7):951-956.
- [13] 王岩, 郭永川, 梁前垒, 等. 参麦注射液对糖尿病心肌病大鼠心肌纤维化的干预作用及相关机制探讨 [J]. *中国病理生理杂志*, 2014, 30(3):449-453.
- [14] 蔡丽萍, 习志刚, 杨红. 丹参酮的药理作用和临床研究进展 [J]. *广东药学院学报*, 2008, 24(3):321-324.
- [15] JIN S N, WEN J F, WANG T T, et al. Vasodilatory effects of ethanol extract of *Radix Paeoniae Rubra* and its mechanism of action in the rat aorta [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 142(1):188-193.
- [16] 田建明, 郑淑秋, 郭伟芳, 等. 人参皂苷 Rg₂ 对大鼠心肌缺血再灌注损伤诱发心肌细胞凋亡的保护作用 [J]. *中国药理学通报*, 2004, 20(4):480.
- [17] XU Q F, FANG X L, CHEN D F. Pharmacokinetics and bioavailability of ginsenoside Rb₁ and Rg₁ from *Panax notoginseng* in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2003, 84(2/3):187-192.
- [18] 刘永娟, 王素梅. 黄连素治疗缺血性心脏病心力衰竭的疗效观察 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2012, 10(5):519-520.
- [19] 张华, 周筠, 张力. 葛根素对大鼠心肌细胞 Ito、ICa-L、INa 离子通道的影响 [J]. *心脏杂志*, 2007, 19(5):524-527.
- [20] 周倩, 吴皓, 王倩如, 等. 半夏药材中总生物碱部位抗炎作用的研究 [J]. *南京中医药大学学报*, 2006, 22(2):86-88.
- [21] 宋志宏, 雷丽, 屠鹏飞. 肉苁蓉属植物的药理活性研究进展 [J]. *中草药*, 2003, 34(9):877-879.
- [22] Prabhu S D, WANG G, LUO J, et al. Beta-adrenergic receptor blockade modulates Bcl-X (S) expression and reduces apoptosis in failing myocardium [J]. *Mol Cell Cordial*, 2003, 35(5):483-493.
- [23] Herbeuval J P, Lambert C, Sabido O, et al. Macrophages from cancer patients: analysis of TRAIL, TRAIL receptors, and colon tumor cell apoptosis [J]. *Nat Cancer Inst*, 2003, 95(8):611-621.
- [24] 温凯, 孙尧, 张艳梅, 等. Caspase-3 在慢性心力衰竭大鼠心肌重塑中动态表达及意义 [J]. *中国循证心血管医学杂志*, 2009, 1(2):96-98.
- [25] 王萧, 林传权, 许庆文, 等. Caspase-3 在心衰兔模型细胞凋亡过程中的变化 [J]. *中国实验动物学报*, 2009, 17(3):201-205.

[责任编辑 张丰丰]