

黄芪甲苷联合羟基红花黄色素 A 对小鼠心肌梗死的保护作用

苏宁¹, 卢芬萍¹, 朱明明¹, 征宗梅¹, 申毓军², 刘亭宇¹, 施洪飞^{1*}

(1. 南京中医药大学, 南京 210023; 2. 天津医科大学, 天津 300070)

[摘要] **目的:**观察黄芪甲苷联合羟基红花黄色素 A 预处理对心肌梗死小鼠梗死面积、心肌细胞凋亡及炎症因子表达的影响。**方法:**50 只(SPF 级)C57 小鼠雌雄各半,随机分为假手术组(Sham),心肌梗死模型组(MI),黄芪甲苷预处理组(MI + AsⅣ, 3.5 mg·kg⁻¹),羟基红花黄色素 A 预处理组(MI + HSYA, 10 mg·kg⁻¹),黄芪甲苷 + 羟基红花黄色素 A 联合预处理组(MI + AsⅣ + HSYA, 3.5 mg·kg⁻¹ + 10 mg·kg⁻¹)。造模前连续腹腔注射 7 d,每天 1 次;结扎左冠状动脉前降支建立小鼠心肌梗死模型,用伊文思蓝-TTC 双染色方法区分心肌梗死后心肌的梗死区、缺血危险区(AAR)和左心室总面积(LV);ImageJ 软件计算心肌梗死面积,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测心肌细胞中 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 基因(Bcl-2),Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax),活化的天冬氨酸蛋白酶-3(cleaved-Caspase-3)的表达水平,酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6),肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)的含量。**结果:**与模型组相比,黄芪甲苷预处理组、羟基红花黄色素 A 预处理组及联合预处理组均可显著减小小鼠心肌梗死面积,且联合预处理组效果优于单药预处理组($P < 0.05$, $P < 0.01$);与假手术组相比,模型组的缺血面积和梗死面积增大,单独给药组与联合给药组的缺血面积及梗死面积均减小($P < 0.05$, $P < 0.01$);与模型组与假手术相比,黄芪甲苷联合羟基红花黄色素 A 可上调心肌细胞中抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,下调促凋亡蛋白 cleaved-Caspase-3 和 Bax 的表达;黄芪甲苷与羟基红花黄色素 A 联合可降低心肌梗死小鼠血清中 IL-6, TNF- α 的含量($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论:**黄芪甲苷联合羟基红花黄色素 A 可减小小鼠心肌梗死面积,抑制心肌梗死后的心肌细胞凋亡及炎症反应,发挥保护心肌损伤的作用。

[关键词] 黄芪甲苷; 羟基红花黄色素 A; 心肌梗死; 细胞凋亡; 炎症反应

[中图分类号] R285.5; R256.2; R287 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)02-0098-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2018020098

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171102.1856.044.html>

[网络出版时间] 2017-11-02 18:56

Protective Effect of Astragaloside IV Combined with Hydroxysafflor Yellow A on Mice with Myocardial Infarction

SU Ning¹, LU Fen-ping¹, ZHU Ming-ming¹, ZHENG Zong-mei¹,
SHEN Yu-jun², LIU Ting-yu¹, SHI Hong-fei^{1*}

(1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China;

2. Tianjin Medical University, Tianjing 300070, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of pretreatment with astragaloside IV combined with hydroxy safflower yellow A on myocardial infarction area, cardiomyocyte apoptosis and expression of inflammatory cytokines in mice with myocardial infarction. **Method:** Totally 50 SPF grade C57 mice (half male and half female) were randomly divided into sham operation group (Sham), myocardial infarction model group (MI), astragaloside pretreatment group (MI + As IV, 3.5 mg·kg⁻¹), hydroxy safflower yellow A pretreatment group (MI + HSYA, 10 mg·kg⁻¹), and astragaloside IV + hydroxy safflower yellow A pretreatment group (MI + As IV + HSYA, 3.5 mg·kg⁻¹ + 10 mg·kg⁻¹). Intraperitoneal injection lasted for 7 days before modeling, once a day. The model of

[收稿日期] 20170822(027)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81574044)

[第一作者] 苏宁, 硕士, 从事营养学的研究, Tel:13912973522, E-mail:2066509826@qq.com

[通信作者] *施洪飞, 博士, 教授, 从事中医营养的研究, Tel:18362908558, E-mail:hfs@njucm.edu.cn

myocardial infarction was established by ligating left anterior descending coronary artery. The infarction area, ischemic area and total left ventricle area of myocardium were distinguished by evans blue-TTC double staining method. ImageJ software was used to calculate the myocardial infarction area, the expressions of Bax, Bcl-2 and cleaved-Caspase-3 in myocardium were detected by Western blot. The levels of serum interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) content. **Result:** Compared with the model group, the pretreatment group and the combined pretreatment group could significantly reduce the myocardial infarction area of the mice, and the effect of the combined treatment group was better than that of the single pretreatment group. Compared with the sham group, the ischemic area and infarction area of the model group were increased, and the ischemic area and infarction area of the combination group and the combined administration group were decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the model group and the sham operation group, astragaloside IV combined with hydroxy safflower yellow A up-regulates the expression of anti-apoptotic protein Bcl-2 in cardiomyocytes, and down-regulates the expressions of cleaved-Caspase-3 and Bax ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Astragaloside IV combined with hydroxysafflor yellow A can reduce the levels of IL-6 and TNF- α in serum of mice with myocardial infarction ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Astragaloside IV combined with hydroxy safflower yellow A can reduce the myocardial infarction area in mice, and inhibit myocardial cell apoptosis and inflammatory response after myocardial infarction, with an effect in protecting myocardial injury.

[**Key words**] astragaloside IV; hydroxy safflower yellow A; myocardial infarction; apoptosis; inflammatory reaction

心肌梗死发生在冠状动脉闭塞时,冠状动脉血流急剧减少或中断,导致下游心肌供氧不足,使相应心肌出现严重而持续的缺血,从而导致缺血性心肌坏死^[1];分急性期、亚急性期和慢性期3期。临床症状主要出现在急性期,表现多是持续性剧烈的胸骨后疼痛,服用硝酸甘油不能缓解,严重者可出现休克、心律失常、心力衰竭;缺血是导致心肌损伤,引起细胞凋亡的主要原因^[2]。

益气活血法是补法和消法相结合的中医药物治疗方法,能使病血去新血生,气流畅通,机体功能恢复。张仲景的温经汤、孙思邈的芎藭汤,《医林改错》的补阳还五汤等历代名方都是植根于益气活血法的有效方剂^[3]。近年以益气活血为立法的各种配方对心肌缺血的作用多有研究。如保心汤(党参、黄芪、白术、茯苓、山楂、葛根、丹参、桃仁、川芎、红花)通过抑制血清白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6),肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α),细胞黏附分子-1(ICAM-1)水平,抑制炎症反应,治疗冠心病稳定型心绞痛^[4]。益气活血方(人参、黄芪、党参、丹参、川芎、赤芍、红花)能显著改善改善心肌缺血,缓解临床症状^[5]。人参山楂饮(人参、山楂、三七粉)改善心率变异性,减少恶性心律失常及心脏突发事件发生^[6]。在组成这些具有改善心肌缺血的益气活血法方剂中,出现频率最高的益气药是人参和黄芪,活血化瘀药是红花,黄芪和红花配伍出现的

次数最多。则中医药的益气活血药为笔者治疗心肌梗死后提供了可能。

黄芪,出自《神农本草经》。为豆科植物膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* 或蒙古黄芪 *A. membranaceus* var. *mongholicus* 等的根。长期以来被广泛的应用。黄芪甲苷(又称黄芪皂苷IV, astragaloside IV)是黄芪的主要活性物质^[7]。研究表明,黄芪甲苷可能对心肌损伤具有保护作用^[8-9]。黄芪甲苷可通过上调B细胞淋巴瘤/白血病-2基因(Bcl-2),Hsp-70,下调Bcl-2相关X蛋白(Bax),半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)的表达发挥抗心肌细胞凋亡作用^[10]。红花为菊科植物红花的花,是活血化瘀的代表药,对血液凝固具有显著地抑制作用。近年来,研究表明红花也可调节纤维蛋白溶酶原激活剂(tPA)和抑制物(PAI)之间的平衡,改善心绞痛^[11]。红花可能对心肌缺血具有一定保护作用^[12]。羟基红花黄色素A(hydroxysafflor yellow A, HSYA)是红花关键活性成分之一。本实验通过观察黄芪甲苷和羟基红花黄色素A联合对心肌梗死小鼠心肌损伤的保护作用,并探讨其可能的保护机制,为阐明黄芪联合红花保护心肌损伤的作用及机制提供科学依据。

1 材料

1.1 药品与试剂 黄芪甲苷(美国Sigma公司,批号JY0001171);羟基红花黄色素A, evans blue, 多聚甲醛(中国阿拉丁公司,批号分别为H117996,

e104208-100 g, c104190-10 kg); 10 × TBST, 二甲基亚砜(DMSO)(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为 T1081-500, D8371-50); 异氟烷(河北一品制药有限公司,国药准字 H19980141); 2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC),(北京雷根生物技术有限公司,批号 dk0004); BCA 蛋白浓度测定试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司,批号 KGP902); 牛血清白蛋白(BSA,中国上海爱必信生物科技有限公司,批号 abs49001012b); 电泳缓冲液和转膜液(美国伯乐公司,批号分别为 1610732, 1610734); Bax, Bcl-2 多克隆抗体(博奥森生物有限公司,批号分别为 bs-0127M, bs-0032R); Caspase-3, 甘油醛 3-磷酸脱氢酶(GAPDH), 二抗(美国 CST 中国分公司,批号分别为 9662S, 5174S, 5571S); IL-6, TNF- α 定量检测酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(美国 Raybiotech 公司,批号分别为 ELM-IL6-1, ELM-TNF α -1)。

1.2 仪器 MSS-3 型动物麻醉机(上海任宜生物科技发展有限公司组装); MICROCL 21R 型冷冻离心机, Multiskan spectrum 型酶标仪(美国 Thermo 公司); SMZ1000 型体式显微镜(日本 Nikon 公司); Tissuelyser-48 型全自动样品研磨仪(上海净信实业发展有限公司); Biosafer1200-98 型超生破碎仪(赛飞中国有限公司); Bio-rad1708265 型化学发光凝胶成像系统, 1703940 型半干转膜仪, 1658000 型电泳仪(美国伯乐公司); Arium comfot1 型纯水超纯水系统一体机(德国 Sartorius 公司)。

1.3 动物 C57 小鼠,雌雄各半,6~8 周龄,体重(18 ± 22)g,由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供,SPF 级,合格证号 SCXK(沪)2013-0016。小鼠分笼饲养,保持恒温 24 °C,12 h 光/暗周期下,接受标准的饮食和水,自由采食。实验动物的开展取得了南京中医药大学实验动物伦理委员会的批准。实验通过随机分组的方式,小鼠之间体重具有相似性,体重变化无统计学意义。

2 方法

2.1 动物模型的制备 根据文献方法^[13],通过开胸手术结扎左前降支建立心肌缺血动物模型。小鼠经异氟烷吸入麻醉,仰卧于手术台上,胸前区剃毛,酒精消毒,氧气支持呼吸,沿肋骨方向切开皮肤,钝性分离皮下肌肉,于第 4 肋间插开肋间隙,将心脏挤出,于左心耳根部下方 2 mm 处进针,深度约 1~1.5 mm,结扎后并将心脏复位并挤出胸腔内空气,以止血钳暂时闭合伤口。6~0 尼龙线逐层缝合,关闭呼吸麻醉机,待动物苏醒。

2.2 动物分组与给药 将小鼠随机分为 5 组,每组 10 只;即假手术组(Sham),心肌梗死模型组(MI),黄芪甲苷组(MI + As IV, 3.5 mg·kg⁻¹),羟基红花黄色素 A 组(MI + HSYA, 10 mg·kg⁻¹),黄芪甲苷 + 羟基红花黄色素 A 组(MI + As IV + HSYA, 3.5 mg·kg⁻¹ + 10 mg·kg⁻¹);假手术组只穿线不结扎;黄芪甲苷、羟基红花黄色素 A 用 DMSO 溶解,两者的终质量浓度分别为 700, 2 000 mg·L⁻¹;假手术组、心肌梗死模型组给予与给药组相同剂量的 DMSO,连续腹腔注射 7 d。

2.3 样本取材及染色 手术 24 h 后取材。①取血,摘眼球取血,3 000 r·min⁻¹离心 10 min,取上清后置于 -80 °C 保存。②取心脏组织,将心脏左心室剪下,组后迅速转移至 -80 °C 保存备用。③伊文思蓝和 TTC 双染,于心脏左心室注射 2% 伊文思蓝 0.1 mL, PBS 冲洗 3 次,将心脏放置 -80 °C 速冻 10 min,用刀片从心尖开始切成厚度约 1 mm。将切片的心脏置于 2% TTC 中,37 °C 15 min。4% 多聚甲醛固定 24 h,体视显微镜拍照,正常区为蓝色,缺血区为砖红色,梗死区为白色;用 Image J 软件计算心肌梗死面积,计算梗死区、缺血危险区与左心室的比例;综合评价心肌损伤程度。

2.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测缺血心肌组织中的 Bax, Bcl-2, Caspase-3 的表达 每组 5 只小鼠,取心脏的左心室,加入 RIPA(Radio Immunoprecipitation Assay)裂解液 500~600 μ L,用组织研磨仪研末 60 s,超生破碎 1~2 min, 12 000 r·min⁻¹离心 15 min,取上清,用 BCA 蛋白测定试剂盒测定全蛋白的浓度,每个样本做 2 个复孔,求平均值;将整个蛋白质与 4 × 上样缓冲液混合,100 °C 煮 5 min, -20 °C 保存备用。以每个样品的总蛋白为 30 μ g 上样,加样后加入适量的电泳液,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳(10%~15% 聚丙烯酰胺凝胶), 250 V, 30 min;半干转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,15 V, 30 min;放入 5% 的脱脂奶粉封闭 1~2 h,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗膜 1 次,牛血清白蛋白 BSA 稀释一抗(1:1 000),剪膜,一抗 4 °C 封闭过夜;TBST(Tris Buffered Saline, with Tween-20)缓冲液洗膜 6 次,每次 5 min,二抗(抗兔 IgG)摇床室温孵育 1 h, TBST 洗膜 6 次,每次 5 min;化学发光凝胶成像系统曝光。

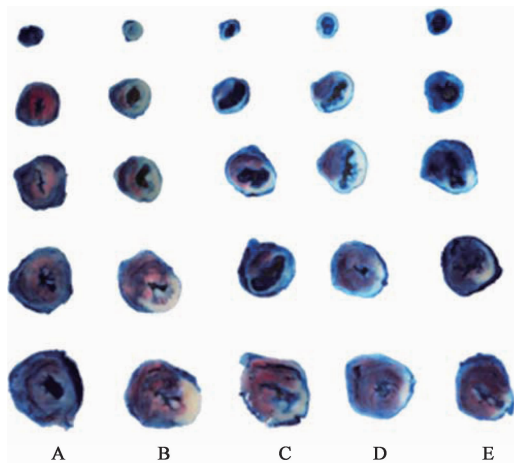
2.5 ELISA 检测血清 IL-6, TNF- α 的含量 检测方法按试剂盒说明进行。提前把试剂盒拿到室温孵育,96 孔板加入对照品及样品 100 μ L 摇床上室温

孵育 2.5 h, 洗板 5 次, 加二抗生物素, 摇床上室温孵育 1 h, 洗板 5 次, 加酶结合物工作液摇床上室温孵育 45 min, 洗板, 加显色底物室温孵育 30 min, 加终止液, 酶标仪 450 nm 测吸光度 A。

2.6 统计学方法 采用 SPSS 21.0 进行统计学分析, 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间的比较采用 ordinary one-way ANOVA 分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 黄芪甲苷与羟基红花黄色素 A 对心肌梗死面积的影响 蓝色部分代表正常心肌组织, 红色部分为危险区即缺血区, 白色部分为梗死区; 与模型组相比, 单药组与联合组都能减小心肌梗死面积和心肌缺血区 ($P < 0.01$), 且联合组比单药组更显著 ($P < 0.01$); 与假手术组相比, 模型组的缺血面积和梗死面积增大 ($P < 0.05, P < 0.01$), 单独给药组与联合给药组的缺血面积及梗死面积均减小 ($P < 0.01$); 研究发现, 只穿线不结扎的假手术组缺血面积大于联合给药组 ($P < 0.01$)。见图 1, 表 1, 2。



A. 假手术组; B. 模型组; C. 黄芪甲苷组; D. 羟基红花黄色素 A 组; E. 黄芪甲苷与羟基红花黄色素 A 联合组 (图 2 同); 蓝色区域为正常区, 红色区域为缺血高危区, 白色为梗死区

图 1 黄芪甲苷、羟基红花黄色素 A 对心肌梗死 24 h 小鼠心肌梗死面积的影响 (evans blue-TTC 双染, $\times 1.4$)

Fig.1 Effect of astragaloside IV and hydroxysafflor yellow A on myocardial infarct size in 24 hours after myocardial infarction (evans blue-TTC double staining, $\times 1.4$)

3.2 黄芪甲苷与羟基红花黄色素 A 对心肌细胞中 Caspase-3, Bax, Bcl-2 蛋白表达的影响 与模型组相比, 联合组心肌细胞中的 Bax 的表达量减少 ($P < 0.05$), 单药组无统计学意义, 单药组和联合组的抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达量升高 ($P < 0.01$), 而联合组的表达量显著升高; 单药组和联合组的心肌细胞中

表 1 黄芪甲苷、羟基红花黄色素 A 对心肌梗死 24 h 小鼠缺血区在左心室所占的比例的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of astragaloside IV and hydroxysafflor yellow A on proportion of ischemic area in left ventricle in mice with myocardial infarction ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	n	AAR/LV/%
假手术	-	5	13.03 ± 1.55
模型	-	3	19.75 ± 1.08 ¹⁾
黄芪甲苷	3.5	3	9.63 ± 0.33 ^{2,3)}
羟基红花黄色素 A	10	4	5.53 ± 1.02 ^{2,3)}
黄芪甲苷与羟基红花黄色素 A 联合	3.5 + 10	3	1.28 ± 0.23 ^{2,3)}

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

表 2 黄芪甲苷、羟基红花黄色素 A 对心肌梗死 24 h 小鼠梗死区在左心室所占的比例的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of astragaloside IV and hydroxysafflor yellow A on proportion of infarct area in left ventricle in myocardial infarction ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	n	梗死区/LV/%
假手术	-	5	0
模型	-	3	28.74 ± 7.31 ²⁾
黄芪甲苷	3.5	3	21.92 ± 1.86 ²⁾
羟基红花黄色素 A	10	4	22.80 ± 4.27 ²⁾
黄芪甲苷与羟基红花黄色素 A 联合	3.5 + 10	3	14.56 ± 2.12 ²⁾

cleaved-Caspase-3 表达量均下调 ($P < 0.01$); 与假手术组相比, 模型组的 Bcl-2 表达量明显下调 ($P < 0.01$), 羟基红花黄色素 A 与联合组表达量上调 ($P < 0.05$); Bax 无统计学意义, 模型组的 cleaved-Caspase-3 的表达量上调 ($P < 0.05$)。见图 2, 表 3。

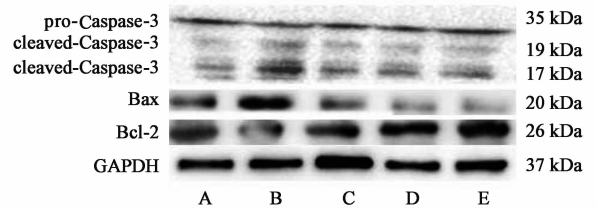


图 2 黄芪甲苷、羟基红花黄色素 A 以及两药联合对心肌梗死小鼠心肌细胞中 Caspase-3, Bax, Bcl-2 蛋白表达的影响

Fig.2 Effect of astragaloside IV, hydroxysafflor yellow A and two drugs on expression of Caspase-3, Bax and Bcl-2 in cardiomyocytes of mice with myocardial infarction

3.3 黄芪甲苷、羟基红花黄色素 A 以及两药联合对心肌梗死小鼠血清中 TNF- α , IL-6 含量的影响 与模型组相比, 血清中 TNF- α , IL-6 的含量降低

表 3 黄芪甲苷、羟基红花黄色素 A 以及两药联合对心肌细胞中 Bcl-2, Bax, cleaved-Caspase-3 相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of astragaloside IV, hydroxysafflor yellow A and two drugs on expression of Bcl-2 and Bax, cleaved-Caspase-3 in cardiomyocytes ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	Bcl-2/GAPDH	Bax/ GAPDH	cleaved-Caspase-3/ pro-Caspase-3
假手术	-	1.22 ± 0.29	1.33 ± 1.05	0.42 ± 0.24
模型	-	0.44 ± 0.04 ²⁾	2.26 ± 1.49	1.06 ± 0.41 ¹⁾
黄芪甲苷	3.5	0.98 ± 0.44 ³⁾	0.79 ± 0.62	0.30 ± 0.24 ³⁾
羟基红花黄色素 A	10	1.57 ± 0.06 ^{1,3)}	0.87 ± 0.70	0.36 ± 0.13 ³⁾
黄芪甲苷与羟基红花黄色素 A 联合	3.5 + 10	1.56 ± 0.11 ^{1,3)}	0.46 ± 0.42 ⁴⁾	0.20 ± 0.04 ³⁾

($P < 0.05, P < 0.01$); 与假手术组相比, 模型组的 TNF- α , IL-6 的含量均升高 ($P < 0.05, P < 0.01$)。联合给药组与单药组相比没有统计学意义。见表 4。

表 4 黄芪甲苷、羟基红花黄色素 A 以及两药联合对心肌梗死小鼠血清中 TNF- α , IL-6 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of astragaloside IV and hydroxysafflor yellow A on serum TNF- α and IL-6 levels in mice with myocardial infarction ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	TNF- α	IL-6
假手术	-	251.27 ± 28.41	64.27 ± 15.06
模型	-	309.33 ± 10.91 ²⁾	76.78 ± 7.16 ¹⁾
黄芪甲苷	3.5	271.03 ± 7.64 ⁴⁾	57.30 ± 7.75 ³⁾
羟基红花黄色素 A	10	261.03 ± 10.98 ⁴⁾	54.39 ± 6.31 ³⁾
黄芪甲苷与羟基红花黄色素 A 联合	3.5 + 10	262.67 ± 18.28 ⁴⁾	54.74 ± 4.14 ^{1,3)}

4 讨论

据美国心脏协会报道, 每天有 2 200 美国人死于心血管疾病, 其中很大一部分是 65 岁以下^[14]。我国心肌梗死的发病率为 45/10 万 ~ 55/10 万^[15]。心肌梗死的病情发展快, 致死率高; 目前心肌梗死的治疗手段有西医的再灌注治疗、溶栓治疗、介入治疗和西药治疗, 中医方面的中药治疗和针灸治疗^[16]。临床上的方法并不确切。本研究通过观察黄芪甲苷与羟基红花黄色素 A 单用及联合用药对心肌梗死小鼠心肌面积、凋亡水平以及炎症反应的影响, 提示两药可能对心肌梗死小鼠的心肌损伤具有保护作用。

在中医上属于“胸痹”、“真心痛”的范畴, 中医古籍的描述最早见于《灵枢·厥病篇》:“真心痛, 手足青至节, 心痛甚, 旦发夕死, 夕发旦死。”胸痹痹阻者, 以上焦阳微阴盛, 气滞血瘀, 为致病之标; 气虚血亏, 营卫失调, 系胸痹之本^[17]。即补气活血为治疗本虚标实缺血性心脏病的理论学说。黄芪为重要的补气药, 全身之气皆能补益, 善治“胸中大气下陷”^[18]。清代黄宫绣还在《本草求真》中将黄芪推崇为“补气诸药之最”。黄芪甲苷是黄芪的主要活性成分, 临床上使用的黄芪注射液的主要成分也是

黄芪甲苷, 则黄芪甲苷在一定程度上能够代替黄芪。有研究显示, 黄芪甲苷能够促进血管新生和成熟, 提高梗死心肌的功能^[19]。红花为菊科植物红花 (*Carthamus tinctorius*) 的干燥管状花冠^[20]。具有活血通经、祛瘀止痛的功效。羟基红花黄色素 A 是红花中的主要有效成分。羟基红花黄色素 A 可以通过调节血清中一氧化氮 (NO), 6-酮-前列腺素 F_{1 α} (6-Keto-PGF_{1 α}), 血栓素 B (TXB) 和血管紧张素 I (Ang I) 的水平, 从而增加心肌供血供氧, 减轻心肌细胞损伤、凋亡, 保护缺血心肌^[21]。两药联合配伍可以达到益气活血的目的, 目前未见黄芪甲苷与羟基红花黄色素 A 联合对心肌梗死小鼠的保护作用的研究, 联合用药对心肌梗死的作用机制尚不清楚; 笔者研究显示 AsIV 预处理组, 黄芪甲苷预处理组及联合预处理组均可显著减小小鼠心肌梗死面积、上调心肌细胞中抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达、下调促凋亡蛋白 cleaved-Caspase-3 和 Bax 的表达, 以及降低心肌梗死小鼠血清中 IL-6, TNF- α 的含量。

有研究表明, 黄芪甲苷、羟基红花黄色素 A 对保护心肌的缺血和梗死有一定的作用^[22-23]。本研究用 evans blue-TTC 双染发现, 黄芪甲苷、羟基红花黄色素 A 单药及联合都能减少已损伤心肌的缺血面积、梗死面积; 且在减小缺血面积方面联合给药更显著, 而在减小梗死面积方面, 单药组与联合组没有统计学差异; 这可能与给药时间不够有关。

细胞凋亡是由生理或病理刺激引起的正常体细胞自发死亡。缺血损伤可诱导细胞凋亡, 因此凋亡是心肌梗死的一个重要机制。研究发现^[24], Bcl-2 是一种凋亡抑制蛋白, 其过表达可以阻断由各种刺激诱导细胞凋亡; Bax 是促凋亡蛋白, 主要在线粒体膜和内质网中表达。细胞内 Bax/Bcl-2 影响细胞凋亡的发生^[25]。研究表明^[26], Caspases 是哺乳动物细胞凋亡的启动者和执行者, 其中 Caspase-3 是细胞凋亡的关键蛋白酶之一, 在细胞凋亡的过程中负责部分或全部重要蛋白质的蛋白裂解, 非活性状态的 pro-Caspase-3 和活性状态的 cleaved-Caspase-3 存在

于细胞质中,当 pro-Caspase-3 被剪切后剩下 p17 和 p12 2 个亚基,而产生活性,成为 cleaved-Caspase-3,促进细胞凋亡。本研究通过蛋白印迹法检测 Bax, Bcl-2, cleaved-Caspase-3 在心肌细胞的活性,结果显示,与模型组相比黄芪甲苷和羟基红花黄色素 A 单用及合用组 Bcl-2 蛋白表达增高,Bax 的表达降低,cleaved-Caspase-3 的表达降低,联合组效果更显著,再次证实了黄芪甲苷联合羟基红花黄色素 A 能够减少缺血心肌细胞的凋亡,保护心肌损伤。

炎症在心肌缺血损伤中起着重要的作用,心肌缺血后,心肌细胞释放大量的炎症因子如 TNF- α , IL-6 等。心肌缺血后, TNF- α 可能是负责启动炎症级联的“上游”因子^[26]。TNF- α 的增多可以反过来刺激炎症反应。早期心肌缺血后心脏淋巴细胞能够诱导单核细胞中的 IL-6 表达。在缺血区域内,快速增多的 TNF- α 也可以诱导 IL-6 的表达^[27]。本研究通过 ELISA 检测心肌缺血血清中 TNF- α , IL-6 的表达;结果显示结果显示,与模型组相比,血清中 TNF- α , IL-6 的含量降低,联合给药组与单药组相比没有统计学意义。证明了黄芪甲苷、羟基红花黄色素 A 可以抑制心梗缺血区的炎症反应,联合与单药相比没有统计学意义可能与预处理时间、用药剂量有关。

综上所述,两药联合及单用都能对损伤心肌起保护作用,且在抑制心肌细胞凋亡方面联合要优于单药。在对炎症反应的作用上联合是不是与单药没有差别还要有待进一步验证。

[参考文献]

[1] Thiagarajan H, Thiyagamoorthy U, Shanmugham I, et al. Angiogenic growth factors in myocardial infarction: a critical appraisal [J]. *Heart Fail Rev*, 2017, doi: 10.1007/s10741-017-9630-7.

[2] Jugdutt B I. Ischemia/infarction [J]. *Heart Fail Clin*, 2011, 8(1):43-51.

[3] 王登科,汪绍懿. 试探益气活血法[J]. *云南中医杂志*, 1980, 2(2):24-27.

[4] 彭伟军,邢之华. 益气活血法对冠心病稳定型心绞痛气虚血瘀证患者血清 IL-6、TNF- α 及 ICAM-1 的影响[J]. *湖南中医药大学学报*, 2011, 31(7):49-51.

[5] 藕二祥. 益气活血法对冠心病心绞痛患者血小板活化功能的影响[J]. *中国中医急症*, 2011, 20(1):122-123.

[6] 冷建春,张晓云. 益气活血法对非 ST 抬高急性心肌梗死患者心率变异性的影响[J]. *中国中医药现代远程教育*, 2010, 8(18):189-190.

[7] 梅周芳,施天响,都勇,等. 黄芪甲苷研究进展[J]. *临床医药文献杂志*, 2017, 4(3):586-589.

[8] ZHAO J, YANG P, LI F, et al. Therapeutic effects of astragaloside IV on myocardial injuries: multi-target identification and network analysis [J]. *PLoS One*,

2012, 7(9):e44938.

[9] 张蕾,高文远,满淑丽. 黄芪中有有效成分药理活性的研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2012, 37(21):3203-3207.

[10] 职玉娟,黄水清. 黄芪总皂苷对 H₂O₂ 诱导心肌细胞凋亡的保护作用[J]. *中药新药与临床药理*, 2013, 24(1):10-13.

[11] 刘涛,刁治民,祁永青,等. 药用植物藏红花研究现状及发展前景 [J]. *青海草业*, 2009, 18(1):21-25.

[12] LIU S X, ZHANG Y, WANG Y F, et al. Upregulation of heme oxygenase-1 expression by hydroxysafflor yellow A conferring protection from anoxia/reoxygenation-induced apoptosis in H9c2 cardiomyocytes [J]. *Int J Cardiol*, 2012, 160(2):95-101.

[13] Erhe G, YONG H L, XI Y S, et al. A novel and efficient model of coronary artery ligation and myocardial infarction in the mouse [J]. *Circ Res*, 2010, 107(28):1445-1453.

[14] Mozaffarian D, Benjamin E J, Go A S, et al. Executive summary: heart disease and stroke statistics—2016 update. A Report from the American Heart Association [J]. *Circulation*, 2016, 133(4):447-454.

[15] 苏懿,王磊,张敏州,等. 急性心肌梗死的流行病学研究进展[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2012, 10(4):467-469.

[16] 张敏州,王磊. 急性心肌梗死的中西医结合治疗[J]. *中国中西医结合杂志*, 2009, 29(10):955-959.

[17] 沈仲圭. 胸痹(胸痛、真心痛) [J]. *辽宁中医*, 1982, 43(6):41-42.

[18] 刘立昌. 治补两益话黄芪[M]. 长春:吉林科学技术出版社, 2002:282.

[19] 李军昌,司静文,刘海涛,等. 黄芪甲苷 IV 对梗死小鼠心肌新生血管成熟及 HIF-1 α 、VEGF 蛋白表达的影响[J]. *心脏杂志*, 2017, 29(3):269-275.

[20] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2015:151.

[21] 王天,傅风华,韩冰,等. 羟基红花黄色素 A 对实验性心肌梗死大鼠的保护作用及机制[J]. *中草药*, 2007, 38(12):1853-1856.

[22] ZHOU M X, FU J H, ZHANG Q, et al. Effect of hydroxy safflower yellow A on myocardial apoptosis after acute myocardial infarction in rats[J]. *Genet Mol Res*, 2015, 14(2):3133-3141.

[23] Lum L, TANG F T, ZHANG J, et al. Astragaloside IV attenuates injury caused by myocardial ischemia/reperfusion in rats via regulation of toll-like receptor 4/nuclear factor- κ B signaling pathway [J]. *Phytother Res*, 2015, 29(10):599-606.

[24] Klitos K, Russell S W, Richard N. Mechanisms of cell death in heart disease [J]. *Arterioscl Throm Vas*, 2012, 32(7):1552-1562.

[25] Love S. Apoptosis and brain ischaemia [J]. *Prog Neuro-Psychoph*, 2003, 27(2):267-282.

[26] Gerald M. COHE N. Caspases: the executioners of apoptosis [J]. *Biochem J*, 1997, 326(10):1-16.

[27] Nikolaos G, Frangogiannis C, Wayne S, et al. The inflammatory response in myocardial infarction [J]. *Cardiovasc Res*, 2002, 53(1):31-47.

[责任编辑 邹晓翠]