

乌头赤石脂丸对心肌缺血再灌注大鼠血管内皮细胞及氧化应激的保护作用

王梦妮, 谢璐璐, 张兆鹏, 凌冰, 林致辉, 刘派, 郭军鹏, 刘宏岩*
(长春中医药大学, 长春 130117)

[摘要] 目的:探讨乌头赤石脂丸对大鼠心肌缺血再灌注损伤(MIRI)的保护作用,并观察其对大鼠心电图变化、凝血功能、血管内皮细胞及氧化应激等相关机制的影响。方法:40只SD大鼠随机分为正常组、模型组、阳性药物组(尿激酶组)及乌头赤石脂丸组,每组10只,除正常组外,其余均建立大鼠心肌缺血再灌注损伤模型。观察大鼠缺血前10 min,缺血后30min,再灌注30,60,120 min(即 T_0, T_1, T_2, T_3, T_4)后心率(HR)及造模后心电图J点的变化;苏木素-伊红(HE)染色法观察大鼠心肌组织病理形态学变化;观察大鼠凝血4项指标[凝血酶原时间(PT),活化部分凝血活酶时间(APTT),凝血酶时间(TT),纤维蛋白原(FIB)]指标的变化;观察大鼠血清中内皮素-1(ET-1),血栓素 A_2 (TXA_2),前列环素(PGI_2)含量及心肌组织超氧化物歧化酶(SOD),丙二醛(MDA)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)水平的影响。蛋白免疫印迹法(Western blot)检测氧化应激指标心肌组织蛋白Keap1与核转录因子E2相关因子(Nrf2)表达水平。结果:与正常组比较,MIRI模型组大鼠心电图出现显著心肌缺血损伤样改变,ST段显著抬高,J点显著升高,在 T_1, T_2, T_3, T_4 时期HR显著降低($P<0.05, P<0.01$);与模型组比较,乌头赤石脂丸使MIRI大鼠心电图,J点改变显著减轻,在 T_1, T_2, T_3, T_4 时期HR升高($P<0.05, P<0.01$);与正常组比较,模型组PT,APTT和TT均显著缩短($P<0.01$),FIB含量显著升高($P<0.01$);模型组血清中 PGI_2 水平显著降低, $TXA_2, ET-1$ 含量显著升高($P<0.01$),模型组心肌组织SOD含量和GSH-Px活性显著降低($P<0.01$),MDA含量升高($P<0.01$);与模型组比较,乌头赤石脂丸组PT延长($P<0.05$),APTT稍有延长,TT显著延长($P<0.01$),FIB含量降低($P<0.05$),乌头赤石脂丸组血清 PGI_2 水平升高($P<0.05$), $TXA_2, ET-1$ 含量显著降低($P<0.01$),心肌组织MDA含量降低且SOD含量和GSP-Px活性显著升高($P<0.01$)。同时乌头赤石脂丸组能够激活Keap1/Nrf2信号通路,使Nrf2表达明显升高,Keap1表达显著下降($P<0.01$)。结论:乌头赤石脂丸能保护心肌缺血再灌注大鼠心肌损伤,其具体机制可能是通过调节血管内皮细胞稳态,调节氧化应激水平及激活Keap1/Nrf2信号通路实现对心肌缺血再灌注损伤的保护作用。

[关键词] 乌头赤石脂丸; 心肌缺血再灌注; 凝血功能; 氧化应激; Keap1/核转录因子E2相关因子(Nrf2)

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)21-0040-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20202003

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200721.1410.009.html>

[网络出版日期] 2020-7-21 16:16

Protective Effect of Wutou Chishizhi Wan on Vascular Endothelial Cells and Oxidative Stress in Myocardial Ischemia-reperfusion Rats

WANG Meng-ni, XIE Lu-lu, ZHANG Zhao-peng, LING Bing, LIN Zhi-hui, LIU Pai,
GUO Jun-peng, LIU Hong-yan*

(Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the protective effect of Wutou Chishizhi Wan on myocardial ischemia reperfusion injury (MIRI) in rats, and observe its effect on such mechanisms as coagulation function, vascular endothelial cells and oxidative stress in rats. **Method:** A total of 40 SD rats were randomly divided into

[收稿日期] 20200223(006)

[基金项目] 吉林省科技厅科技发展计划项目(20170101007JC)

[第一作者] 王梦妮,硕士,从事张仲景学术思想及临床实验研究,E-mail:982998511@qq.com

[通信作者] *刘宏岩,教授,博士生导师,从事张仲景学术思想及临床实验研究,E-mail:hong.yancc@163.com

normal group, model group, positive drug group (Urokinase group) and Wutou Chishizhi Wan group, with 10 rats in each group. Except for the normal group, rat myocardial ischemia-reperfusion injury models were established. The changes of heart rate (HR) at 10 min before ischemia, 30 min after ischemia and 30, 60, 120 min (T_0, T_1, T_2, T_3, T_4), and the change of electrocardiogram (ECG) J point after modeling in rats were observed. The pathological changes of rat myocardial tissue were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The changes of four indexes of coagulation [prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT), thrombin time (TT), fibrinogen content decreased significantly (FIB)] in rats were observed. The contents of endothelin-1 (ET-1), thromboxane A_2 (TXA₂) and prostacyclin (PGI₂) in serum and myocardium levels of superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) and glutathione peroxidase (GSH-Px) of MIRI rats were observed. Western blot assay was used for the detection of oxidative stress protein Keap1 and transcription factor-E2-related factor (Nrf2) expression levels in rat myocardial tissue. **Result:** Compared with the normal group, the ECG of MIRI rats showed significant myocardial ischemic injury-like changes, ST segment was significantly elevated, J point was significantly increased, and the incidences of HR in T_1, T_2, T_3 and T_4 were significantly reduced ($P<0.05, P<0.01$). Compared with the model group, Wutou Chishizhi Wan significantly reduced ECG J-point changes in MIRI rats, while increased the incidence of HR in T_1, T_2, T_3 and T_4 ($P<0.05, P<0.01$). Compared with the normal group, PT, APTT and TT in the model group were significantly shortened ($P<0.01$), FIB content was significantly increased ($P<0.01$), and the serum PGI₂ level decreased and TXA₂ and ET-1 levels increased significantly in the model group ($P<0.01$). SOD content and GSH-Px activities of myocardial tissue in the model group were significantly reduced ($P<0.01$), whereas the MDA content was increased ($P<0.01$). Compared with the model group, PT of the Wutou Chishizhi Wan group was prolonged ($P<0.05$) and APTT slightly prolonged, TT significantly prolonged ($P<0.01$), FIB content decreased ($P<0.05$), serum PGI₂ increased ($P<0.05$), TXA₂ and ET-1 decreased significantly in the Wutou Chishizhi Wan group ($P<0.01$), myocardial MDA content decreased, and SOD content and GSP-Px activity increased significantly ($P<0.01$). Meanwhile, the Wutou Chishizhi Wan group was able to activate the Keap1/Nrf2 signaling pathway, which significantly increased Nrf2 expression and significantly decreased Keap1 expression ($P<0.01$). **Conclusion:** Wutou Chishizhi Wan group can protect myocardial injury in MIRI rats. The specific mechanism is to protect MIRI by regulating vascular endothelial cell homeostasis and oxidative stress levels and activating Keap1/Nrf2 signaling pathway.

[**Key words**] Wutou Chishizhi Wan; myocardial ischemia/reperfusion; coagulation function; oxidative stress; Keap1/transcription factor-E2-related factor (Nrf2)

急性心肌梗死作为临床常见的心血管疾病,具有高发病率、高死亡率等特点。由于各种诱因诱发冠状动脉病变导致血管内血流急剧减少或中断,心肌出现严重、持久的缺血缺氧,最终导致心肌缺血性坏死^[1]。通过药物溶栓及介入治疗(PCI)使得冠脉血液得以再通恢复灌注是目前最有效的治疗手段,但急性心肌梗死再灌后仍存在溶栓后出血、再灌注性心律失常等诸多心肌损伤问题^[2]。据流行病学统计分析,《中国心血管病报告2018》指出,近十年来我国急性心肌梗死的发病人数持续增加,因患者就诊时间的延误,溶栓治疗的比例下降,PCI治疗率增加,并给社会带来巨大的经济压力^[3]。现代医学认为^[4-6],急性心肌梗死的发病机制主要与血流循

环异常,血液浓、黏、聚、凝状态等密切相关。而再灌注后心肌释放大量炎症因子,出现过度的氧化应激反应也会进一步加剧心肌功能障碍。

急性心肌梗死大致属于中医学“胸痹、心痛”急危重症范畴,汉代张仲景在《金匱要略》中记载“心痛彻背,背痛彻心,乌头赤石脂丸主之。”故乌头赤石脂丸出自张仲景所著《金匱要略》,可理解为该方作为成药用以急救心痛急症。循此思路,自2015年起,本课题组致力于乌头赤石脂丸对急性心肌梗死急救的研究。经大鼠及细胞的实验研究,已有实验结果显示,乌头赤石脂丸可减轻早期急性心肌梗死大鼠的心肌损伤程度,缩小梗死面积,其治疗效果与溶栓剂尿激酶无明显的差异,并通过调节线粒体

凋亡通路蛋白B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)及Bcl-2相关X蛋白(Bax)的表达有效对抗心肌细胞损伤,起到抑制心肌细胞凋亡作用^[7-8]。也有临床研究证实,以乌头赤石脂丸联合用药治疗急性心肌梗死等心脏病具有良好的临床疗效^[9-11]。另有实验研究表明,乌头赤石脂丸可减少寒凝胸痹大鼠模型大鼠的血液黏度,抑制血清内炎症因子水平和氧化应激反应^[12-13]。本研究旨在进一步探讨乌头赤石脂丸对急性心肌梗死后再灌注损伤(MIRI)的作用机制,通过建立MIRI大鼠模型,观察大鼠凝血功能、血清中内皮素-1(ET-1),血栓素A₂(TXA₂),前列环素(PGI₂)含量,心肌组织超氧化物歧化酶(SOD),丙二醛(MDA)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)水平及对胞质接头蛋白Keap1/转录因子E2相关因子(Nrf2)信号通路的影响,以期为急性心肌梗死患者提供更有效的临床应用。

1 材料

1.1 动物 雄性SD大鼠40只,SPF级,体质量260~280g,购自辽宁长生生物技术股份有限公司,合格证号SCXK(辽)2018-0001。本实验通过长春中医药大学实验动物伦理委员会批准(批号2019-065)。

1.2 试剂 苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号G1120);注射用尿激酶(南京南大药业有限责任公司,批号H10920040);SOD,MDA,GSH-Px,ET-1,TXA₂,PGI₂试剂盒(北京华英生物技术研究所,批号分别为20180119,20181105,20181101,20180122,20181113,20181115); β -肌动蛋白(β -actin)抗体(美国Proteintech公司,批号为66009-1-Ig);Keap1抗体,二抗辣根过氧化物酶(HRP)(武汉博士德生物工程技术有限公司,批号分别为BA4497-2,BA1054);Nrf2抗体(美国Abcam公司,批号31163)。

1.3 药物 根据张仲景《金匮要略·胸痹心痛短气病脉证治第九》中乌头赤石脂丸中蜀椒、川乌、干姜、附子、赤石脂、人参片,中药饮片均购于吉林省同仁大药房,经长春中医药大学中药学专家鉴定无误。按照方中乌头赤石脂丸比例(蜀椒-川乌-附子-干姜-赤石脂2:1:1:1:2)与剂量,根据人服药比例换算成大鼠的给药量(蜀椒1.26g,川乌0.63g,附子0.63g,干姜0.63g,赤石脂1.26g),剂量为8.17g·kg⁻¹。煎煮方法:将川乌、附子放入10倍总药量水中浸泡30min后先煎60min,再放入其他中药煮沸后用文火煎煮30min,过滤后继续加8倍量

水煎煮30min,合并2次滤液,水浴浓缩3d的总用药量(2mL/次/只,早晚各1次)。于4℃冰箱冷藏。以生理盐水制备注射用尿激酶,放置于冰箱4℃保存。

1.4 仪器 BL-420S型生物机能实验系统,HX-100E型小动物呼吸机(成都泰盟科技有限公司);DR-200BS型酶标分析仪(无锡华卫德朗仪器有限公司);CA-600型全自动凝血分析仪(希森美康医用电子有限公司);A6型半自动生化仪(北京松上技术有限公司);DYY-7C型电泳仪(北京六一生物科技有限公司);VDS凝胶成像仪(美国Pharmacia Biotech公司)。

2 方法

2.1 分组与给药 将大鼠分为正常组、模型组、尿激酶组、乌头赤石脂丸组,先常规饲养1周后,再进行药物预处理。出正常组外,其余各组大鼠以2%戊巴比妥钠溶液(40mg·kg⁻¹)腹腔注射,待大鼠麻醉后仰卧固定,四肢皮下与心电图(ECG)电极相连。待心电稳定,行气管插管术,辅以小动物呼吸机。消毒后沿胸骨左缘2mm处纵向切开第3~4肋间皮肤,依次切开周围组织,暴露并挤出心脏,以5-0缝合针带线于左心耳下缘1~2mm处穿线结扎,深度约1mm,宽度约2mm,结扎后逐层缝合关胸。监测心电图,以EGG的ST段呈弓背向上为缺血梗死标志,肉眼可见血管支配区心肌颜色先变苍白再变成紫绀色。30min后松开结扎线,行再灌注120min,于再灌注未取材处理。正常组麻醉后,对大鼠进行死亡处理,采集大鼠腹主动脉血和心脏标本,根据实验需求检测相关指标^[14]。正常组常规饲养;模型组用生理盐水灌胃,以每只2mL/次灌胃3d,早晚各1次;尿激酶组用尿激酶腹腔注射,取10万单位的尿激酶,溶解于2mL的生理盐水中,充分混匀,静置1~2min,腹腔注射于大鼠体内5万U·mL⁻¹·d⁻¹,现用现配,以每只2mL/次给药3d,每日1次;乌头赤石脂丸组根据生药材含量按人与大鼠等效剂量换算关系计算^[15],用药剂量为8.17g·kg⁻¹的乌头赤石脂丸水煎剂灌胃,以2mL/次/只进行给药3d,早晚各1次。于第3天给药30min后,将大鼠用2%的戊巴比妥分组进行麻醉制备MIRI模型,于再灌注结束后,采取腹主动脉取血,静置30min,离心后提取血清,并剪取大鼠心肌组织,于冰箱-20℃保存。

2.2 HE染色观察心肌组织病理学变化 将大鼠麻醉后进行取材,将心脏组织快速用冰生理盐水进行

冲洗,然后固定4% FPA共48 h,用流水冲洗1 h,将心肌梗死区域脱水、透明、浸蜡和包埋后,连续切片并固定;经过各梯度乙醇及二甲苯浸泡脱蜡后置于苏木素染液,伊红染液染色后,脱水透明并封片,在光镜下($\times 400$)观察比较各组心肌组织形态学变化。

2.3 凝血4项指标的测定 腹主动脉采血,按照全自动凝血分析仪的操作流程,测定凝血酶原时间(PT),活化部分凝血活酶时间(APTT),凝血酶时间(TT)和纤维蛋白原(FIB),并记录检测结果。

2.4 血清ET-1, TXA₂及PGI₂含量的测定 将离心机以3 000 r·min⁻¹离心10 min收集血清于离心管,采用酶联免疫吸附测定法检测血清中ET-1, TXA₂及PGI₂活性,具体步骤以试剂盒的说明为准。

2.5 心肌组织SOD, MDA, GSH-Px指标的测定 将大鼠心肌组织,放于生理盐水漂洗,制备心肌匀浆标本,按照试剂盒说明书测定心肌组织中MDA含量及SOD和GSH-Px活性。

2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测心肌组织Keap1和Nrf2蛋白表达的测定 将大鼠心肌组织放入研磨棒中加入RIPA组织裂解液后,于冰浴中研磨,于4℃以12 500 r·min⁻¹离心10 min,制备心肌匀浆,测定蛋白浓度,再行蛋白定量定性。配制分离胶、浓缩胶,采用半干法将蛋白转至PVDF膜上进行电泳、转膜,于封闭液慢速摇床封闭1 h。分别在不同条带加入一抗Keap1(1:2 000),Nrf2(1:1 000)和 β -actin(1:1万)4℃过夜。次日,用HRP标记的二抗孵育1 h后,使用VDS凝胶成像仪进行曝光成像,并检测灰度值。

2.7 统计学分析 采用SPSS 19.0软件统计分析,

数据统计结果表示 $\bar{x}\pm s$,数据符合正态分布和方差齐时,采用单因素方差分析,两两比较使用LSD-t检验;不符合正态分布或者方差不齐,使用多个样本比较的Kruskal-Wallis H检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对MIRI大鼠心电图指标的影响 与正常组比较,MIRI大鼠的心电图可见显著的心肌缺血损伤样改变,ST段显著抬高,J点明显升高($P<0.05$);与模型组比较,乌头赤石脂丸和尿激酶组均能使MIRI大鼠心电图J点改变显著降低($P<0.05$)。见表1。

表1 乌头赤石脂丸对MIRI大鼠心电图II导联J点位移影响($\bar{x}\pm s$)
Table 1 Effect of Wutou Chishizhi Wan(WCW) on displacement of point J in ECG II lead of MIRI rats($\bar{x}\pm s$)

组别	n	剂量	J点抬高值/mV
正常	10	-	0.075±0.013
模型	8	-	0.174±0.022 ²⁾
尿激酶	8	5×10 ⁴ U·kg ⁻¹	0.123±0.020 ³⁾
乌头赤石脂丸	9	8.17 g·kg ⁻¹	0.103±0.019 ⁴⁾

注:与正常组比较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)。

3.2 对MIRI大鼠心率(HR)的影响 与正常组比较,MIRI大鼠出现显著的心律失常表现,ECG除见上述宽大而畸形QRS波,严重者出现室颤,MIRI大鼠在T₁,T₂,T₃,T₄时间段HR显著降低($P<0.01$);与模型组比较,尿激酶组与乌头赤石脂丸组T₁,T₂,T₃,T₄时间段HR显著升高,且乌头赤石脂丸组HR显著高于尿激酶组,差异无统计学意义($P<0.01$)。见表2。

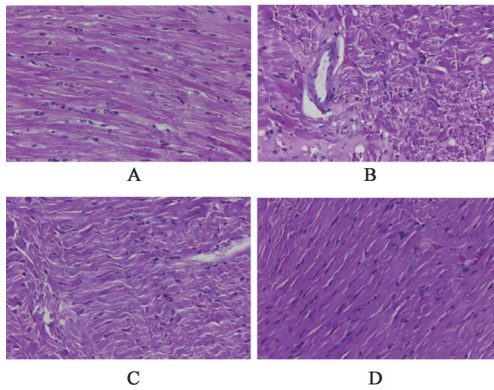
表2 乌头赤石脂丸对MIRI大鼠HR的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	n	剂量	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄
正常	10	-	374.23±25.73	353.93±27.42	356.26±31.10	360.25±27.47	369.86±31.05
模型	8	-	365.86±31.78	238.98±33.64 ²⁾	242.75±29.26 ²⁾	260.25±25.73 ²⁾	268.34±29.52 ²⁾
尿激酶	8	5×10 ⁴ U·kg ⁻¹	384.26±29.58	266.26±26.28 ³⁾	287.32±31.12 ³⁾	302.53±29.03 ³⁾	311.67±34.67 ⁴⁾
乌头赤石脂丸	9	8.17 g·kg ⁻¹	376.30±36.36	292.57±22.20 ⁴⁾	302.26±25.25 ⁴⁾	325.87±31.16 ⁴⁾	336.40±25.53 ⁴⁾

3.3 对MIRI大鼠病理形态学变化的影响 正常组大鼠心肌细胞排列整齐,结构完整,细胞间质无水肿、炎症浸润及出血,细胞无变性、坏死。MIRI组大鼠心肌细胞排列紊乱,出现心肌纤维化,细胞肿胀严重,部分细胞空泡样变及坏死,炎性细胞浸润。尿激酶组及乌头赤石脂丸组心肌细胞较模型组排列稍整齐,心肌细胞坏死程度减轻,心肌间质出血、

水肿程度降低,炎性细胞浸润减少,尤以乌头赤石脂丸组病理形态学减轻明显。见图1。

3.4 对MIRI大鼠凝血四项指标PT,TT,APTT,FIB的影响 与正常组比较,模型组PT,APTT和TT均明显缩短($P<0.01$),FIB含量显著升高($P<0.01$),差异具有统计学意义;与模型组比较,尿激酶组PT,TT均显著延长($P<0.01$),FIB含量显著降低($P<$



A. 正常组; B. 模型组; C. 尿激酶组; D. 乌头赤石脂丸组
图1 乌头赤石脂丸对MIRI大鼠病理形态学变化的影响(HE, ×400)
Fig. 1 Effect of WCW on pathological changes in MIRI Rats (HE, ×400)

0.01), 差异具有显著性, APTT延长($P < 0.05$); 与模

表3 乌头赤石脂丸对MIRI大鼠凝血四项的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of APC on four clotting items in MIRI rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量	PT/s	APTT/s	TT/s	FIB/g·L ⁻¹
正常	10	-	15.80±0.62	23.50±1.06	39.90±1.87	2.20±0.10
模型	8	-	13.97±0.67 ²⁾	18.83±0.51 ²⁾	30.57±2.07 ²⁾	2.67±0.15 ²⁾
尿激酶	8	5×10 ⁴ U·kg ⁻¹	16.73±0.21 ⁴⁾	21.17±0.90 ³⁾	44.47±1.67 ⁴⁾	2.07±0.07 ⁴⁾
乌头赤石脂丸	9	8.17 g·kg ⁻¹	15.13±0.47 ³⁾	20.17±0.68	37.87±2.20 ⁴⁾	2.35±0.16 ³⁾

表4 乌头赤石脂丸对MIRI大鼠血清中PGI₂, TXA₂, ET-1含量的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Effect of APC on serum PGI₂, TXA₂, ET-1 content in MIRI rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量	PGI ₂	TXA ₂	ET-1
正常	10	-	271.96±11.65	73.56±2.32	65.43±1.53
模型	8	-	115.41±11.32 ²⁾	163.95±6.50 ²⁾	183.48±6.91 ²⁾
尿激酶	8	5×10 ⁴ U·kg ⁻¹	166.77±18.72 ⁴⁾	123.51±2.61 ⁴⁾	115.95±4.01 ⁴⁾
乌头赤石脂丸	9	8.17 g·kg ⁻¹	153.70±10.93 ³⁾	124.22±6.63 ⁴⁾	101.98±7.65 ⁴⁾

表5 乌头赤石脂丸对MIRI大鼠心肌组织中SOD, MDA, GSH-Px的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Effect of WCW on SOD, MDA, GSH-Px in myocardial tissue of MIRI rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量	SOD/U·mg ⁻¹	MDA/μmol·g ⁻¹	GSH-Px/U·mg ⁻¹
正常	10	-	16.29±0.54	0.31±0.02	164.80±9.23
模型	8	-	6.39±0.36 ²⁾	0.90±0.12 ²⁾	79.81±6.67 ²⁾
尿激酶	8	5×10 ⁴ U·kg ⁻¹	13.44±0.53 ⁴⁾	0.58±0.08 ⁴⁾	116.74±8.53 ⁴⁾
乌头赤石脂丸	9	8.17 g·kg ⁻¹	14.58±0.54 ⁴⁾	0.49±0.09 ⁴⁾	126.14±10.98 ⁴⁾

3.7 对MIRI大鼠心肌组织Keap1与Nrf2蛋白的表达水平的影响 与正常组比较, 模型组Keap1表达显著升高, Nrf2表达显著降低($P < 0.01$); 与模型组比较, 尿激酶和乌头赤石脂丸组Nrf2表达明显升高, Keap1表达明显降低($P < 0.05, P < 0.01$); 与尿激酶组比较, 乌头赤石脂丸无明显差别。见图2, 表6。

型组比较, 乌头赤石脂丸PT延长($P < 0.05$), APTT稍有延长, 但差异无统计学意义, TT显著延长($P < 0.01$), FIB含量明显降低($P < 0.05$)。见表3。

3.5 对MIRI大鼠血清PGI₂, TXA₂, ET-1含量的影响 与正常组比较, 模型组心肌缺血后血清中PGI₂显著降低, TXA₂, ET-1含量显著升高($P < 0.01$); 与模型组比较, 尿激酶及乌头赤石脂丸组大鼠血清中PGI₂明显升高, TXA₂, ET-1显著降低($P < 0.05, P < 0.01$)。见表4。

3.6 对MIRI大鼠心肌组织SOD, MDA, GSH-Px的影响 与正常组比较, 模型组心肌组织SOD和GSH-Px活性显著降低($P < 0.01$), MDA含量显著升高($P < 0.01$); 与模型组比较, 尿激酶和乌头赤石脂丸组能够显著降低大鼠心肌组织中MDA含量并显著升高SOD和GSP-Px活性($P < 0.01$)。见表5。

4 讨论

在《金匱要略·胸痹心痛短气病》篇中, 仲景将“阳微阴弦”高度概括为胸痹心痛的核心病机, 因患者素体阳虚, 加之痰饮、寒凝等阴寒痼结, 而致气滞、饮停、血瘀, 心脉不通。当则上焦胸阳极虚, 下焦阴寒极盛, 而发“心痛彻背, 背痛彻心”之急重症

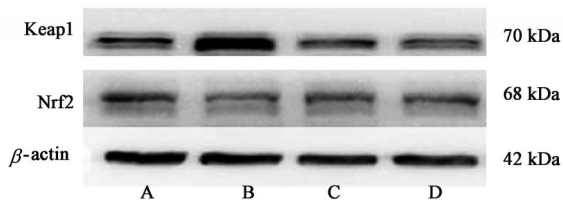


图2 各组大鼠心肌组织Keap1与Nrf2蛋白表达电泳
Fig. 2 Electrophoresis of myocardial tissue Keap1 and Nrf2 protein expression in MIRI rats

表6 乌头赤石脂丸对MIRI大鼠心肌组织中Keap1, Nrf2蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 6 Effect of WCW on protein expression of Keap1, Nrf2 in myocardial tissue of MIRI ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量	Keap1/ β -actin	Nrf2/ β -actin
正常	10	-	1.05 \pm 0.05	1.59 \pm 0.03
模型	8	-	1.56 \pm 0.04 ²⁾	1.24 \pm 0.07 ²⁾
尿激酶	8	5 \times 10 ⁴ U \cdot kg ⁻¹	1.38 \pm 0.03 ³⁾	1.39 \pm 0.04 ⁴⁾
乌头赤石脂丸	9	8.17 g \cdot kg ⁻¹	1.22 \pm 0.04 ⁴⁾	1.41 \pm 0.03 ⁴⁾

候, 治以乌头赤石脂丸, 温阳行痹, 驱散阴寒, 通行血脉, 收敛止痛。该方由乌头、附子、蜀椒、干姜、赤石脂组成, 药简且力专, 效宏而不散, 同时本方采用丸剂, 便于急救服用。据《神农本草经》及《名医别录》记载, 乌头可除寒湿痹, 消胸上痰冷; 附子治心腹冷痛, 祛寒湿血痹。二者同属大辛大热之品, 可温胸阳行寒痹。蜀椒可祛寒湿痹痛, 通利血脉; 干姜可温中止血, 治寒冷腹痛。二者亦属辛温大热, 能加强乌附散寒逐冷, 温暖中阳。赤石脂主养心气, 以其酸涩之性收敛止血, 以防乌、附、椒、姜辛温走窜太过。

现代药理研究显示, 乌头除具有强心、抗心律失常的作用外, 还有调节血流、降压、抗炎及镇痛等功效^[16-17]。乌头中的次乌头碱有抗急性心肌缺血的作用, 并能抑制心肌细胞氧化损伤和凋亡, 可能与增加钠离子内流, 提高细胞内钙离子浓度等机制密切相关^[18]。附子具有强心、抗心律失常、抗炎、抗血栓、抗氧化等作用^[19-20]。实验观察发现, 附子能显著升高大鼠心肌Na⁺-K⁺-ATP酶活性, cAMP及PKA含量, 证实附子具有明显的抗缓慢性心律失常作用^[21]。干姜具有促血管扩张、抗炎、抗氧化和抗血小板聚集等作用^[22-23]。干姜对心肌细胞缺氧缺糖性损伤具有显著保护作用, 其能抗血小板聚集, 改善心室收缩舒张功能, 同时降低外周阻力, 对急性心力衰竭模型具有显著保护作用^[24]。蜀椒中具有挥发油、酰胺和生物碱, 其可促进血管舒张、加快血液循环、抗心律失常、抗血小板凝集及抗氧化等作

用^[25]。赤石脂具有抗炎、缩短凝血时间, 抑制血小板聚集等作用^[26]。本方中诸药合用, 进一步增强其强心、扩血管、抗炎、抗凝、抗氧化、抗血栓及抗心律失常等作用, 改善心肌受损, 达到保护心肌的作用。本研究结果显示, 乌头赤石脂丸能使心肌损伤大鼠的心电图J点改变明显减轻, 对MIRI大鼠在再灌注T₁, T₂, T₃, T₄时期的HR显著升高, 从而改善心肌缺血缺氧状态。

心肌缺血再灌注损伤为心肌缺血缺氧造成心肌损伤后, 短期内迅速恢复血供, 不仅治疗作用减弱, 反而加重缺血性心肌损伤, 出现心肌梗死面积增大、心律失常等更严重的病理现象, 导致心肌梗死进一步加重^[27-28]。研究证实, 心肌缺血再灌注损伤的发生与炎症、氧化应激、血管内皮细胞受损、血小板聚集、及细胞凋亡等因素密切相关^[29]。现代医学认为凝血功能与血管内皮细胞内环境的稳态对维持心脏血管的舒缩及血流状态尤为重要^[30]。当血液高黏稠、血流缓速, 血液呈高凝状态, 心血管出现动脉硬化, 使得血栓形成, 造成急性心肌梗死。早期溶栓治疗可延长PT, APTT激活凝血系统, 将血栓及血浆中的纤溶酶原, 将其转化为纤溶酶, 进而激活纤溶系统, 使FIB成为可溶物质, FIB的含量降低, TT时间延长, 即形成纤维蛋白丝的时间延长。溶栓后FIB下降越低, 血栓越能被有效溶解, 但也增加了溶栓性出血等不良反应发生的风险^[31]。因此及时观察凝血系统PT, APTT, TT, FIB是对急性心肌梗死的溶栓再灌注影响是十分重要的。TXA₂与PGI₂是血清中一组反映血管内皮细胞合成、释放且生物活性相反的生物活性物质^[32]。PGI₂为内皮细胞合成并分泌的血管舒张因子, 能够抑制血小板黏附与聚集, 扩张血管。TXA₂是内皮细胞合成并分泌的血管收缩因子, 能促进血小板的黏附与聚集, 收缩血管, 二者相互拮抗, 维持生理水平血管内皮细胞的内环境稳定^[33]。ET-1作为一种重要的活性肽, 是血管内皮细胞合成与分泌的血管收缩物质, ET-1的浓度升高可增加钙离子内流, 其水平异常为血管功能障碍常见的评判指标之一^[34]。当血液出现浓、黏、凝、稠等状态, 刺激血管内皮细胞分泌ET-1, TXA₂与PGI₂等代谢产物, 使心肌出现持续收缩, 出现临床心痛等症状^[35]。因此维持血液流变学、凝血功能及血管内皮细胞稳态具有重要意义。本研究结果显示, 乌头赤石脂丸可延长PT, TT, 并降低FIB含量; 同时升高血清PGI₂含量、降低TXA₂, ET-1的含量, 证实乌头赤石脂丸对心肌缺血再灌注大鼠的

凝血功能及血管内皮细胞具有显著保护作用。

氧化应激在心肌缺血再灌注损伤中有着重要的作用,是导致心肌组织损害的关键原因。心肌缺血再灌注损伤后,中性粒细胞大量粘附、聚集、浸润,氧自由基的迅速堆积,内源性抗氧化系统功能被破坏,自由基不能被清除,释放大量的活性氧 ROS 并与心肌组织脂质体反应,生成大量 MDA,同时抗氧化酶 SOD 和 GSH-Px 活性降低,导致氧化与抗氧化系统失衡,清除自由基的能力显著降低,从而引起心血管组织严重损伤,SOD,MDA 活性可反映机体抗氧化自由基的能力^[36]。此外,Keap1/Nrf2 信号通路作为体内重要内源性抗氧化系统之一,具有抗氧化应激损伤、抗炎症反应、抗肿瘤等作用,在维持机体氧化平衡具有重要作用^[37]。早期研究结果表明,大鼠 H9c2 心肌细胞缺氧/复氧(H/R)损伤后心肌细胞中 Nrf2 水平显著下降,通过黄连素治疗后,Nrf2 核转运进显著增加,Keap1 表达显著下降,抗氧化因子 HO-1 表达也增加,进而减少心肌氧化应激水平,保护缺血诱导的心肌损伤^[38]。因此可以推测激活 Keap1/Nrf2 信号通路对缺血性心肌氧化具有保护作用,是心肌缺血损伤中改善氧化应激过程的潜在靶点。本实验结果显示,MIRI 大鼠心肌组织中 SOD, GSH-Px 水平显著降低,MDA 含量显著升高,而乌头赤石脂丸治疗后可显著减弱 SOD 和 GSH-Px 水平的降低和 MDA 水平的升高。此外,心肌细胞中 Nrf2 蛋白核转运进显著增加,Keap1 表达显著下降,证实其对 MIRI 大鼠具有显著的抗氧化作用。

综上所述,乌头赤石脂丸能够改善心肌缺血再灌注大鼠心脏损伤,与降低血液黏度,提高再灌后的凝血功能有关,其机制可能是通过调节血管内皮细胞分泌代谢产物,激活氧化应激 Keap1/Nrf2 通路、抗细胞凋亡等多种途径发挥药理作用。应用该方对急性心肌梗死患者的临床救治及再灌注损伤的改善具备可行性。

[参考文献]

[1] JIA C X, WANG J P, ZHANG F L, et al. Study on the mechanism of qingre huoxue prescription in the intervention and treatment of acute myocardial infarction based on network pharmacology[J]. World J Tradit Chin Med, 2019, 5(4): 220-227.

[2] IBÁEZ B, HEUSCH G, OVIZE M, et al. Evolving therapies for myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. J Am Coll Cardiol, 2015, 65(14): 1454-1471.

[3] 胡盛寿,高润霖,刘力生,等.《中国心血管病报告

2018》概要[J]. 中国循环杂志, 2019, 34(3): 209-220.

[4] 李颖慧,魏芸,程文豪,等.三七皂苷红花提取物复方配伍对心肌缺血及再灌注损伤的保护作用[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2019, 21(7): 1346-1352.

[5] YANG M, CHEN J, ZHAO J, et al. Etanercept attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury by decreasing inflammation and oxidative stress[J]. PLoS One, 2014, 9(9): e108024.

[6] PAN Y, QIAN J X, LU S Q, et al. Protective effects of tanshinone IIA sodium sulfonate on ischemia-reperfusion-induced myocardial injury in rats[J]. Iran J Basic Med Sci, 2017, 20(3): 308-315.

[7] 闫晓博. 乌头赤石脂汤抑制急性心肌梗死大鼠细胞凋亡的实验研究[D]. 长春: 长春中医药大学, 2018.

[8] 张一伟. 乌头赤石脂丸抗心肌细胞凋亡的机制研究[D]. 长春: 长春中医药大学, 2019.

[9] 朱金花,安国辉,刘淑云,等. 乌头赤石脂汤联合丹参注射液治疗急性心肌梗死临床研究[J]. 河南中医, 2017, 37(4): 609-611.

[10] 叶涛. 乌头赤石脂汤辅以丹参注射液静脉滴注治疗急性心肌梗死患者的临床疗效[J]. 中国医药指南, 2016, 14(20): 185-186.

[11] 范红玲. 乌头赤石脂丸联合西药治疗不稳定型心绞痛 54 例[J]. 中医研究, 2012, 25(7): 32-34.

[12] 戴启刚,汪受传. 乌头赤石脂丸对寒凝胸痹大鼠损伤心肌和血液粘度的作用研究[J]. 云南中医学院学报, 2012, 35(4): 25-28.

[13] 黄仕文,戴启刚. 乌头赤石脂丸对寒凝胸痹大鼠血液黏度、TXB₂、6-keto-PGF_{1α}、ET、NO、SOD 及 MDA 的影响[J]. 山西中医学院学报, 2012, 13(3): 56-58.

[14] 刘祥,景桂霞,白娟,等. 舒芬太尼预处理对大鼠心肌缺血再灌注时 PI3K/Akt 的影响[J]. 南方医科大学学报, 2014, 34(3): 335-340.

[15] 魏伟,吴希美,李元建. 药理试验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 69-73.

[16] ZHOU G, TANG L, ZHOU X, et al. A review on phytochemistry and pharmacological activities of the processed lateral root of *Aconitum carmichaelii* Debeaux[J]. J Ethnopharmacol, 2015(160): 173-193.

[17] 王宁宁,王佳,谭洪玲,等. 乌头碱抑制血管紧张素 II 诱导的心肌细胞肥大[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(8): 1642-1647.

[18] 李世哲. 乌头类中药禁忌配伍的抗氧化活性研究[D]. 长春: 长春师范大学, 2013.

[19] 刘沛沛. 探讨附子的药理研究和临床应用[J]. 智慧健康, 2019, 5(21): 24-25.

[20] 汪颀浩,高继海,陈海媚,等. 转录组学探讨附子治疗

- 急性心衰大鼠的作用机制[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(1):131-140.
- [21] 吴杰, 向净匀, 孙彦杰, 等. 基于网络药理学的附子-干姜抗心肌缺血损伤的分子机制[J]. 中南药学, 2019, 17(4):481-488.
- [22] 马晓茜, 赵晓民. 干姜水提物解热镇痛作用的实验研究[J]. 山东医学高等专科学校学报, 2011, 33(5):327-329.
- [23] 范颖, 于彩娜, 徐丹, 等. 人参、黄芪、附子、干姜对阿霉素心脏毒性损伤大鼠线粒体途径细胞凋亡的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2011, 38(6):1030-1032.
- [24] 唐劲松. 附子、干姜组分配伍治疗心力衰竭作用机理研究[D]. 成都:成都中医药大学, 2008.
- [25] 娄京荣. 花椒化学成分及药理活性研究[D]. 济南:济南大学, 2019.
- [26] 禹志领, 窦昌贵, 刘保林, 等. 赤石脂对凝血系统作用的初步研究[J]. 中药药理与临床, 1992(4):23-25.
- [27] TURER A T, HILL J A. Pathogenesis of myocardial ischemia-reperfusion injury and rationale for therapy [J]. *Am J Cardiol*, 2010, 106(3):360-368.
- [28] HOLLANDER M R, DE WAARD G A, KONIJNENBERG L S F, et al. Dissecting the effects of ischemia and reperfusion on the coronary microcirculation in a rat model of acute myocardial infarctio[J]. *PLoS One*, 2016, 11(7):e0157233.
- [29] GONZÁLEZ-MONTERO J, BRITO R, GAJARDO A, et al. Myocardial reperfusion injury and oxidative stress: therapeutic opportunities [J]. *World J Cardiol*, 2018, 10(9):74-86.
- [30] 尤星宇, 陈璐, 李春晓, 等. 脑心通胶囊对心肌缺血大鼠血小板聚集及其凝血功能的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 34(15):1835-1838.
- [31] 王晶莹, 谢凤. 纤维蛋白原与血栓性疾病[J]. 中国实验诊断学, 2006, 10(5):566-567.
- [32] YANG L, GONG M F. Influence of decoction of Huoxuetongmai on changes of plasma TXB₂ and 6-Keto-PGF1 α levels during cerebral ischemia reperfusion injury in rats[J]. *J Chin Microcircul*, 2006, 10(1):36-38.
- [33] 张琪, 薛明明, 薛锋, 等. Celecoxib对心肌肥厚大鼠心室结构功能及PGI₂、TXA₂的作用[J]. 河北医科大学学报, 2016, 37(8):874-877.
- [34] 武云涛, 田国祥, 张薇. 血管内皮功能失调与冠心病急性缺血发作的机制探讨[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2018, 10(7):888-890.
- [35] 李立. 心血管病理生理学[M]. 北京:人民军医出版社, 2013:213.
- [36] 王雅枫, 周璐, 雷少青, 等. 缺血再灌注对大鼠心肌损伤及氧化应激的影响[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2018, 32(12):1157-1159.
- [37] AHMED S M, LUO L, NAMANI A, et al. Nrf2 signaling pathway: pivotal roles in inflammation [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2016, 1863(2):585-597.
- [38] 王松海, 车奕宏, 陈捷. 黄连素对缺氧复氧诱导大鼠心肌细胞内Nrf2/Keap1的影响[J]. 中国临床解剖学杂志, 2017, 35(3):282-285.

[责任编辑 周冰冰]