

二仙汤对去卵巢大鼠心肌微血管及血液流变学的影响

姜燕华, 王昱涵, 刘燕君, 向丽华, 张治国*, 陈彦静*

(中国中医科学院 中医基础理论研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 观察去卵巢大鼠心肌微血管密度、微血管内皮细胞形态及血液流变学的变化并探讨二仙汤的干预作用。方法: 选用健康10周龄雌性SPF级SD大鼠32只, 随机分为假手术组、模型组、雌激素组(戊酸雌二醇, $0.18 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 二仙汤组($9 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)。去卵巢后2周开始灌胃给药, 1次/d, 连续16周。二仙汤组及雌激素组分别给予二仙汤或戊酸雌二醇灌胃, 假手术组和模型组灌胃等体积纯净水。给药16周末, 无创超声心动图(UCG)检测心功能; CD34免疫荧光染色法检测心肌微血管密度; 透射电镜观测心肌微血管超微结构; 放射免疫分析法检测血浆雌二醇(E_2)含量; 酶联免疫吸附测定(ELISA)检测血浆内皮素-1(ET-1), 前列环素 I_2 (PGI_2), 血栓素 A_2 (TXA_2), 血管内皮生长因子(VEGF)和血管性血友病因子(vWF)水平; 凝固法检测凝血四项; 血液流变学检测全血黏度和血浆黏度。结果: 与假手术组比较, 模型组左室射血分数(EF)显著降低($P < 0.01$), 左室短轴缩短率(FS)显著降低($P < 0.01$), 左室收缩末期容积(LVVol_s)显著升高($P < 0.01$); 心肌微血管密度显著减少($P < 0.01$); 心肌微血管内皮细胞肿胀明显, 胞浆空化; 血浆 E_2 含量显著降低($P < 0.01$); ET-1, VEGF, vWF含量显著升高($P < 0.01$), 前列环素 I_2 /血栓素 A_2 (PGI_2/TXA_2)显著降低($P < 0.01$); 血浆活化部分凝血酶原时间(APTT)显著降低($P < 0.01$), 纤维蛋白原(FIB)含量显著升高($P < 0.01$); 全血黏度、血浆黏度、卡松黏度显著升高($P < 0.01$), 全血高、低切指数和红细胞聚集指数明显升高($P < 0.05$)。与模型组比较, 二仙汤组大鼠EF, FS明显升高($P < 0.05$), LVVol_s明显降低($P < 0.05$); 微血管密度显著增多($P < 0.01$); 心肌微血管内皮细胞水肿改善, 运输小泡清晰可见; 血浆 E_2 显著升高($P < 0.01$); ET-1, VEGF显著降低($P < 0.01$), PGI_2/TXA_2 显著升高($P < 0.01$); APTT显著升高($P < 0.01$); 全血黏度、全血高切相对指数、红细胞聚集指数明显降低($P < 0.05$), 卡松黏度、血浆黏度显著降低($P < 0.01$)。结论: 二仙汤增加去卵巢大鼠心肌微血管密度、保护微血管内皮细胞结构的完整性, 改善其内皮分泌功能和血液流变学, 保护心功能。

[关键词] 去卵巢大鼠; 心功能; 心肌微血管; 血液流变学; 二仙汤

[中图分类号] R2-0; R289; R285.5; R714.252 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)24-0059-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20202440

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20201020.1533.002.html>

[网络出版日期] 2020-10-20 17:07

Effect of Erxian Decoction on Myocardial Microvessels and Hemorheology in Ovariectomized Rats

JIANG Yan-hua, WANG Yu-han, LIU Yan-jun, XIANG Li-hua, ZHANG Zhi-guo*, CHEN Yan-jing*

(Institute of Basic Theory of Chinese Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the changes of myocardial microvessel density, microvascular endothelial cell morphology and hemorheology in ovariectomized rats and explore the interventional effects of Erxian decoction. **Method:** Thirty-two healthy 10 week-old female SPF SD rats were randomly divided into sham operation group, model group, estrogen group (estradiol valerate, $0.18 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) and Erxian decoction group ($9 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$). The rats were intragastrically administered 2 weeks after ovariectomy, once a day for 16 weeks. Sham operation groups and model groups were given equal volumes of purified water. After 16 weeks of

[收稿日期] 20200811(026)

[基金项目] 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(YZ-1884); 中国中医科学院中医药“一带一路”合作专项(GH2017-02-03)

[第一作者] 姜燕华, 在读硕士, 从事中医药防治心血管病的基础研究, Tel: 010-64089029, E-mail: 1466102995@qq.com

[通信作者] * 张治国, 博士, 研究员, 从事中医药防治代谢性疾病的基础研究, Tel: 010-64025179, E-mail: zzzgcm@163.com;

* 陈彦静, 博士, 教授, 从事中医药防治心血管病的基础研究, Tel: 010-64089029, E-mail: chenyj010@163.com

administration, the cardiac function was measured by noninvasive ultrasound cardiogram (UCG), CD34 in the myocardial tissue was tested by immunofluorescence staining to measure the microvessel density, the morphological structure of microvessels of myocardial tissue were detected by transmission electron microscope, the levels of estrogen (E_2) in rat plasma were detected by radioimmunoassay, the levels of endothelin-1 (ET-1), prostacyclin I_2 (PGI_2), thromboxane A_2 (TXA_2), endothelial growth factor (VEGF), and von Willebrand Factor (vWF) in rat plasma were detected by enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA), four items of coagulation was detected by blood coagulation analyzer, whole blood viscosity and plasma viscosity were detected by hemorheology. **Result:** Compared with sham operation group, the ejection fraction (EF) decreased ($P<0.01$), the left ventricular short axis shortening rate (FS) decreased ($P<0.01$), and the left ventricular end systolic volume (LVVols) increased ($P<0.01$), myocardial microvessel density significantly reduced ($P<0.01$), the endothelial cells were swollen and the cytoplasm was cavitation, E_2 in rat plasma decreased ($P<0.01$), ET-1, VEGF, vWF increased ($P<0.01$), prostacyclin I_2 /thromboxane A_2 (PGI_2/TXA_2) decreased ($P<0.01$), plasma activated partial prothrombin time (APTT) decreased ($P<0.01$), fibrinogen (FIB) increased ($P<0.01$), whole blood viscosity, plasma viscosity, and cassone viscosity increased ($P<0.01$), whole blood high-cut, low-cut index, and red blood cell (RBC) aggregation index increased ($P<0.05$) in model group. Compared with model group, EF and FS increased ($P<0.05$), LVVols decreased ($P<0.05$), myocardial microvessel density significantly increased ($P<0.01$), the endothelial cell edema was improved, and transport vesicles were clearly visible, E_2 in rat plasma increased ($P<0.01$), ET-1, VEGF, decreased ($P<0.01$), PGI_2/TXA_2 increased ($P<0.01$), APTT increased ($P<0.01$), whole blood viscosity, whole blood high shear relative index, RBC aggregation index decreased ($P<0.05$), Kassin viscosity and plasma viscosity decreased ($P<0.01$) in Erxian decoction group. **Conclusion:** Erxian decoction increases myocardial microvessel density, protects the structural integrity of microvascular endothelial cells, improves its endothelial secretion function and hemorheology in ovariectomized rats, and protects heart function.

[Key words] ovariectomized rats; cardiac function; myocardial microvascular; hemorheology; Erxian decoction

冠状动脉微循环障碍(CMD)为冠状动脉微血管结构和功能异常,导致心肌供血供氧不足,引发心绞痛。既往对冠心病研究和治疗的焦点和重点大多集中在心外膜的冠状动脉上,而忽视了冠状动脉微血管的病变。近年来CMD发病率不断增加成为基础和临床研究的热点。临床上,与男性比较,女性较少出现阻塞性心外膜冠状动脉狭窄,更多地表现为冠状动脉微血管功能障碍,且更年期及之后较多发。流行病学资料显示,CMD中女性占60%~70%,其中60%为绝经后女性^[1]。更年期女性CMD已成为威胁女性生命健康的突出问题^[2]。研究发现,女性更年期CMD与雌激素缺乏引起的微血管内皮功能障碍有关^[3]。然而临床上雌激素替代疗法(HRT)有增加乳腺癌、卵巢癌和子宫内膜癌等疾病风险^[4-5],具有雌激素样作用的补肾中药对生殖系统和心血管系统具有保护作用,且副作用少^[6],近年来备受关注。

中医认为女性更年期的根本病机是肾虚,补肾

方剂二仙汤可以补肾精、平阴阳,整体调节下丘脑-垂体-卵巢轴稳态,对更年期症状具有标本兼治的作用。课题组前期研究发现去卵巢大鼠出现心电活动异常、心律失常、心肌基因重构,其血脂、血压及血糖升高,心功能下降,二仙汤可以一定程度地改善上述病理变化^[7-9]。CMD的机制涉及微血管结构异常、数量减少和内皮分泌功能失调^[10],同时与血液流变学异常密切相关^[11]。现代药理学研究表明,二仙汤中成分淫羊藿苷可改善去卵巢大鼠胸主动脉内皮舒血管功能^[12]。二仙汤能否通过改善心肌微血管及内皮功能障碍对更年期心血管起到保护作用,值得深入研究。为此,本实验采用去卵巢大鼠为更年期模型^[13],观察大鼠去卵巢后心肌微血管密度、微血管超微结构、内皮功能以及血液流变学的变化,并探讨补肾方剂二仙汤对上述变化的作用,以期对更年期女性冠脉微循环障碍的防治提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 雌性SD大鼠32只,10周龄,体质量(232±5)g,SPF级,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号SCXK(京)2016-0002,于中国中医科学院中医基础理论研究所实验动物中心清洁级动物房饲养,饲养温度(24±2)℃,湿度45%~60%,不含豆类的特殊饲料饲养,自由摄食饮水。动物实验严格遵照中国中医科学院中医基础理论研究所动物实验伦理规定(伦理委员会审查编号2019-034)。

1.2 药品与试剂 二仙汤由仙茅、淫羊藿、巴戟天、当归、知母、黄柏等组成,所有中药饮片均购自北京同仁堂中药饮片有限公司,由北京市药品检验所中药室主任周富荣主任药师鉴定均为正品。戊酸雌二醇片(拜耳医药保健有限公司广州分公司,批号407A);雌二醇(E₂)放射免疫检测试剂盒(北京北方生物技术研究所,批号BFS20191101);内皮素-1(ET-1),前列环素I₂(PGI₂),血栓素A₂(TXA₂),血管内皮生长因子(VEGF)和血管性血友病因子(vWF)酶联免疫吸附测定(ELISA)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为20191014,20191012,20190928,20191014,20190921);血浆活化部分凝血酶原时间(APTT),血浆凝血酶原时间(PT),凝血酶时间(TT),纤维蛋白原(FIB)检测试剂盒(北京赛科希德科技发展有限公司,批号分别为2019-312208,2019-314204,2019-311403,2019-313403);自发荧光淬灭剂,BSA,CD34抗体,CY3标记山羊抗兔,DAPI染液,抗荧光淬灭封片剂(武汉塞维尔生物科技有限公司,批号分别为G1221,G5001,GB13013,GB21303,G1012,G1401);脱毛膏(澳大利亚Nair公司,批号LL6084);异氟烷(深圳市瑞沃德生命科技有限公司,批号21781101)。

1.3 仪器 XH-6080型γ放射免疫计数器(西安核仪器厂);DNM-9602G型酶标分析仪,DNX-9620A型电脑洗板机(北京普朗新技术有限公司);SF-8101型全自动凝血测试仪,SA-9000型全自动血流变测试仪(北京赛科希德科技发展有限公司);MULTIFUGE X1R型低温离心机,3120061型烤片机,3120059ZPJ-1型展片机,FINESSE ME+型轮转式切片机,Histocentre 3型全自动组织包埋机(美国Thermo公司);NIKON ECLIPSE C1型正置荧光显微镜,NIKON DS-U3型成像系统(日本尼康公司);H7650型透射电镜(日本Hitachi公司);Vevo2100型超高分辨率小动物超声影像系统,VS4083型吸入式

麻醉机(加拿大VisualSonics公司);AR2130型电子天平,SE3001F型电子天平(美国奥豪斯公司)。

2 方法

2.1 二仙汤的制备 参照《中华医方精选辞典》(上海科学技术文献出版社)中二仙汤组成与剂量:仙茅9g,淫羊藿9g,巴戟天9g,当归9g,知母4.5g,黄柏4.5g,第1煎以药材质量10倍体积的水武火煎至沸腾后改用文火煎40min,第2煎以药材质量8倍体积水煎煮,方法同第1煎,两煎药液混合浓缩至含生药质量浓度为0.9g·mL⁻¹,4℃冰箱保存。

2.2 去卵巢大鼠模型的制备 参照文献[14]方法,雌性SD大鼠适应性饲养1周后,随机选择24只大鼠,以3%戊巴比妥钠(1.3mL·kg⁻¹)腹腔注射麻醉,两侧腹部备皮、碘液消毒,经腹背部肋缘下1cm,脊柱两侧各1cm交界处,分别切2个1cm左右的切口,依次分离肌肉、腹膜,于腹腔脂肪中找到菜花样卵巢结扎并切除双侧卵巢,将组织放回大鼠腹腔,逐层缝合。剩余8只大鼠作为假手术组,按照卵巢切除的方法切除腹腔小块脂肪组织,不摘除卵巢,术后腹腔注射青霉素预防感染。术后1周行阴道涂片检查,1次/d,连续5d,通过阴道涂片细胞形态判断动情周期是否消失,未出现动情周期的大鼠视为造模成功^[14],同时在实验结束取材时检查卵巢缺如情况。

2.3 分组与给药 将造模成功的24只大鼠随机分为模型组、雌激素组、二仙汤组,术后2周开始给药。雌激素组以戊酸雌二醇片9.2mg溶于500mL生理盐水中制备质量浓度为0.018g·L⁻¹的药液,以0.18mg·kg⁻¹剂量灌胃;二仙汤组参照前期研究及相关文献,以9g·kg⁻¹(相当于65kg成人13倍)灌胃二仙汤溶液^[7,14-15];假手术组和模型组灌服等体积纯净水;各组大鼠每天灌胃1次,每灌胃6d停药1d,持续16周。

2.4 一般状态观察 每天仔细观察大鼠的精神状态、姿势、皮毛色泽、活动度、眼裂黏膜色泽、耳廓色泽及粪便等全身情况,每周固定时间称各组大鼠质量并记录。

2.5 超声法检测心功能 给药16周末,每组随机选取5只大鼠,禁食12h后,采用超声心动图(UCG)检测心脏结构及心功能。大鼠胸部备皮,涂擦耦合剂,持续吸入异氟烷与纯氧的混合气体麻醉大鼠,使大鼠心率保持在350次/min左右。大鼠仰卧位固定于操作台,使用Vevo2100超高分辨率小动物超声影像系统,MS-250,21Hz探头,取大鼠左心室长轴

切面,使M型UCG取样线位于乳头肌水平。连续记录不少于10个心动周期,测量并计算下列各项参数:左室射血分数(EF),短轴缩短率(FS),左室收缩末期内径(LVIDs),左室后壁收缩末期厚度(LVPWs),左室收缩末期容积(LVVols),左室舒张末期内径(LVIDd),左室后壁舒张末期厚度(LVPWd),左室舒张末期容积(LVVold)。所有指标测值均取3个心动周期的平均值。

2.6 免疫荧光染色法检测心肌微血管密度 给药16周末,每组随机选取6只大鼠,禁食12h后,以3%戊巴比妥钠($1.3\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$)腹腔注射麻醉大鼠,取新鲜大鼠心脏,冰生理盐水冲洗,心室横切并立即置于4%多聚甲醛溶液固定24h,常规脱水,包埋和切片后进行免疫荧光染色。内皮细胞被染成红色,心肌细胞核被染成蓝色。微血管判断标准为凡是染成红色的血管内皮细胞或者内皮细胞簇均作为1个血管计数,管腔>8个红细胞大小、带有较厚肌层的血管均不进行计数,注意不以出现红细胞或管腔来计数血管。具体计数方法:首先在低倍镜下,选取微血管较密集的心内膜区域,分别在5个高倍视野($400\times$)下进行微血管计数,并取其平均值,即微血管密度以毛细血管个数/视野表示。

2.7 透射电镜检测心肌微血管超微结构 给药16周末,各组大鼠禁食12h后麻醉,取新鲜大鼠心脏,纵切左心室,约 $3\text{ mm}\times 3\text{ mm}\times 1\text{ mm}$ 大小,立即置于4%戊二醛溶液固定,4℃保存待测。使用磷酸盐缓冲液(PBS)充分清洗后用1%锇酸固定,PBS充分清洗,丙酮梯度脱水,环氧树脂混合物包埋,使用超薄切片机制备心肌超薄切片,厚度50nm,经乙酸铀-枸橼酸铅双重染色。透射电镜下观察心肌组织及其微血管的超微结构并拍照。

2.8 放射免疫法检测血浆 E_2 含量 给药16周末,各组大鼠禁食12h后麻醉,取腹主动脉血,置于枸橼酸钠抗凝管中,使用 E_2 放射免疫检测试剂盒,运用 γ 放射免疫计数器测定大鼠血浆中 E_2 含量。

2.9 ELISA检测血浆ET-1, VEGF, vWF含量以及 $\text{PGI}_2/\text{TXA}_2$ 如上取腹主动脉血,置于肝素抗凝管中,使用低温离心机 $5\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15min(离心半径10.6cm),分离血浆。以ELISA法检测血浆ET-1, PGI_2 , TXA_2 , VEGF, vWF的含量,并计算 $\text{PGI}_2/\text{TXA}_2$ 值。因 PGI_2 和 TXA_2 在体内不稳定,很快代谢为6-酮-前列腺素 F_{1a} (6-K-PGF $_{1a}$)和血栓素 B_2 (TXB $_2$),故测定大鼠血浆6-K-PGF $_{1a}$ 和TXB $_2$ 含量,并计算6-酮-前列腺素 F_{1a} /血栓素 B_2 (6-K-PGF $_{1a}$ /

TXB $_2$),代替 $\text{PGI}_2/\text{TXA}_2$ 。

2.10 凝固法检测凝血四项 如上取腹主动脉血,置于枸橼酸钠抗凝管中,以凝固法检测APTT,PT,TT,及FIB含量。

2.11 血液流变学检测全血黏度和血浆黏度 如上取腹主动脉血,置于肝素抗凝管中,以锥板法检测全血黏度,以毛细管法检测血浆黏度。

2.12 统计学分析 采用SPSS 20.0统计软件进行统计分析,数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示。多组间比较采用One-way ANOVA,方差齐时采用最小显著性差异法(LSD)检验两两比较,方差不齐时采用Kruskal-Wallis进行非参数检验,采用Bonferroni法两两比较, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对去卵巢大鼠一般状态的影响 各组大鼠全身状况良好。假手术组大鼠活动度佳,毛发光泽,抓触反应轻。与假手术组比较,模型组大鼠活动度减少,毛发光泽度减少,抓触反应强烈;与模型组比较,雌激素组大鼠和二仙汤组大鼠活动度较好,毛发较光泽,抓触反应较轻。

3.2 对去卵巢大鼠体质量和血浆 E_2 的影响 与假手术组比较,模型组大鼠体质量显著增加($P<0.01$),血浆 E_2 水平显著降低($P<0.01$);与模型组比较,雌激素组大鼠体质量显著降低($P<0.01$),血浆 E_2 含量明显升高($P<0.05$);二仙汤组大鼠体质量显著降低($P<0.01$),血浆 E_2 含量显著升高($P<0.01$)。见表1。

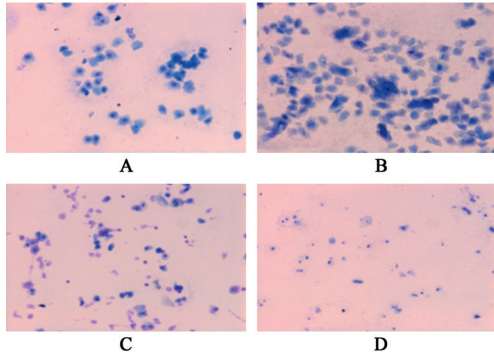
表1 二仙汤对去卵巢大鼠体质量和血浆 E_2 水平的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)
Table 1 Effect of Erxian decoction on weight and level of plasma E_2 in ovariectomized rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	体质量/g	$E_2/\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$
假手术	-	324.25 \pm 7.89	10.39 \pm 3.49
模型	-	390.13 \pm 11.74 ²⁾	2.84 \pm 1.03 ²⁾
雌激素	1.8×10^{-4}	344.00 \pm 5.45 ⁴⁾	7.52 \pm 1.20 ³⁾
二仙汤	9.0	358.50 \pm 8.07 ⁴⁾	8.44 \pm 2.24 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2~7同)。

3.3 对去卵巢大鼠阴道动情周期的影响 假手术组大鼠阴道涂片呈现动情前期-动情期-动情后期-动情间期的周期变化。发情前期大鼠阴道涂片中有核上皮细胞占优势;发情期大鼠阴道涂片中可见大量无核的角化上皮细胞,细胞大而扁平,边缘不整齐;发情后期大鼠阴道涂片中角化上皮细胞减少,出现白细胞及有核上皮细胞;发情间期大鼠阴

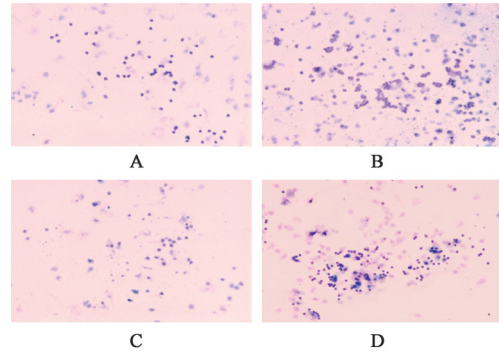
道涂片中细胞数量较少,主要为白细胞,偶见有核上皮细胞。去卵巢大鼠阴道涂片可见大量白细胞,呈现持续动情间期特征,连续5 d检测阴道涂片未见动情周期变化。见图1,2。结合大鼠体质量和血浆E₂结果,可知此次实验造模成功。



A. 发情前期;B. 发情期;C. 发情后期;D. 发情间期

图1 假手术组大鼠阴道涂片(姬姆萨染色,×100)

Fig. 1 Vaginal smears of rats in sham operation group (Giemsa stain, ×100)



A. 第1天;B. 第2天;C. 第3天;D. 第4天

图2 去卵巢术后大鼠阴道涂片(姬姆萨染色,×100)

Fig. 2 Vaginal smears in rats after ovariectomy (Giemsa stain, ×100)

3.4 对去卵巢大鼠心功能的影响 与假手术组比

表2 二仙汤对去卵巢大鼠心功能的影响($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 2 Effect of Erxian decoction on cardiac function of ovariectomized rats ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	EF/%	FS/%	收缩功能			舒张功能		
				LVIDs/mm	LVPWs/mm	LVVols/ μ L	LVIDd/mm	LVPWd/mm	LVVold/ μ L
假手术	-	77.87±3.44	48.12±3.61	3.91±0.34	2.89±0.20	66.91±13.50	7.54±0.46	1.82±0.43	302.87±42.58
模型	-	64.36±2.66 ²⁾	36.44±1.93 ²⁾	4.49±1.30	3.45±1.97	114.38±21.18 ²⁾	7.20±1.63	1.96±0.50	320.05±47.35
雌激素	1.8×10 ⁻⁴	71.17±4.91 ³⁾	41.94±4.00 ³⁾	4.32±0.38	2.67±0.42	84.83±17.71 ³⁾	7.44±0.44	1.70±0.35	294.20±38.57
二仙汤	9.0	70.45±3.94 ³⁾	41.31±3.37 ³⁾	4.34±0.28	2.54±0.26	85.72±12.67 ³⁾	7.41±0.32	1.61±0.30	290.93±28.18

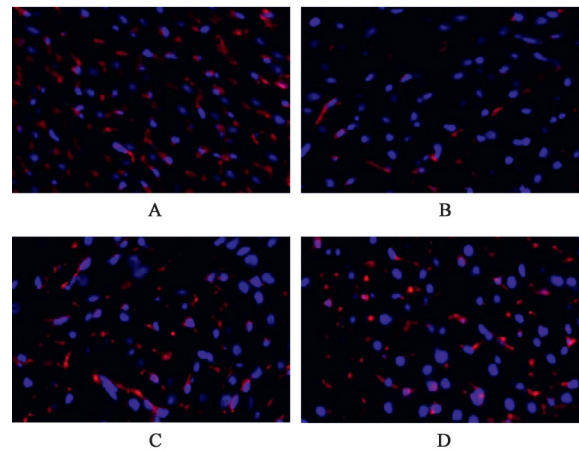
3.5 对去卵巢大鼠心肌组织微血管密度的影响

免疫荧光染色法观察心肌组织微血管情况,心肌细胞核DAPI染为蓝色,代表心肌细胞数量;CD34红色荧光标识心肌组织微血管。结果显示,与假手术组比较,模型组微血管密度显著降低($P<0.01$),且分布不均;与模型组比较,雌激素组和二仙汤组微血管密度显著增多($P<0.01$)。见图3,表3。

3.6 对去卵巢大鼠心肌微血管超微结构的影响

假手术组大鼠心肌微血管内皮细胞形态较正常,血管内皮厚度较一致,胞浆电子密度较均匀,为中等电子密度,其间可见许多运输泡;基膜厚度均匀电子密度中等。与假手术组比较,模型组大鼠心肌微血管内皮细胞肿胀明显,尤以核周为著,其余部分仍可见厚度增加伴电子密度降低、胞浆空化;基底膜变化不明显;与模型组比较,雌激素组、二仙汤组

较,模型组大鼠EF显著降低($P<0.01$),FS显著降低($P<0.01$),LVVols显著升高($P<0.01$);与模型组比较,雌激素组大鼠EF及FS明显升高($P<0.05$),LVVols明显降低($P<0.05$);二仙汤组大鼠EF及FS明显升高($P<0.05$),LVVols明显降低($P<0.05$);给药组大鼠LVIDs, LVIDd, LVPWs, LVPWd, LVVold与模型组比较,差异无统计学意义。见表2。



A. 假手术组;B. 模型组;C. 雌激素组;D. 二仙汤组(图4同)

图3 二仙汤对去卵巢大鼠心肌组织微血管密度的影响(免疫荧光,×400)

Fig. 3 Effect of Erxian decoction on microvessel density of myocardial tissue in ovariectomized rats (IF, ×400)

表3 二仙汤对去卵巢大鼠心肌血管密度的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Effect of Erxian decoction on microvessel density of myocardial tissue in ovariectomized rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	心肌血管密度/个
假手术	-	213.63±32.16
模型	-	53.15±19.44 ²⁾
雌激素	1.8×10 ⁻⁴	105.70±22.14 ⁴⁾
二仙汤	9.0	118.04±21.53 ⁴⁾

大鼠心肌微血管内皮水肿较轻范围局限,基底膜变化不明显,运输小泡清晰可见。见图4。

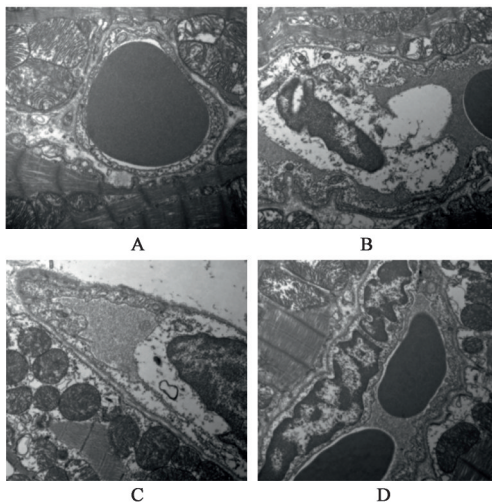


图4 二仙汤对去卵巢大鼠心肌微血管超微结构的影响(透射电镜,×15 000)

Fig. 4 Effect of Erxian decoction on morphological structure of microvessels of myocardial tissue(TEM,×15 000)

3.7 对去卵巢大鼠血浆 ET-1, VEGF 和 vWF 的影响 与假手术组比较,模型组大鼠血浆 ET-1, VEGF 和 vWF 显著升高($P<0.01$);与模型组比较,雌激素组大鼠血浆 ET-1 和 vWF 明显降低($P<0.05$), VEGF 显著降低($P<0.01$),二仙汤组大鼠血浆 ET-1 和

表6 二仙汤对去卵巢大鼠凝血四项的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 6 Effect of Erxian decoction on four items of coagulation in ovariectomized rats plasma ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	APTT/s	PT/s	TT/s	FIB/g·L ⁻¹
假手术	-	31.08±3.01	16.68±3.10	37.05±5.11	0.60±0.12
模型	-	26.18±2.90 ²⁾	13.85±0.50	36.95±4.70	1.44±0.56 ²⁾
雌激素	1.8×10 ⁻⁴	32.69±1.93 ⁴⁾	15.75±0.51	37.45±0.76	0.74±0.07
二仙汤	9.0	31.30±4.31 ⁴⁾	15.81±2.61	37.58±1.08	0.73±0.08

3.10 对去卵巢大鼠血液流变学的影响 与假手术组比较,模型组各切变率下的全血黏度,卡松黏度,血浆黏度均显著升高($P<0.01$),全血高切指数,全血低切指数,红细胞聚集指数明显升高($P<0.05$);与模型组比较,雌激素组高切(200 s⁻¹)下的全血黏

度显著降低($P<0.01$),vWF 有降低趋势,但与模型组比较差异无统计学意义。见表4。

表4 二仙汤对去卵巢大鼠血浆 ET-1, VEGF 和 vWF 的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 4 Effect of Erxian decoction on level of ET-1, VEGF and vWF in ovariectomized rats plasma ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ET-1/ng·L ⁻¹	VEGF/ng·L ⁻¹	vWF/μg·L ⁻¹
假手术	-	103.93±19.35	35.04±10.12	9.30±3.06
模型	-	177.22±11.5 ²⁾	82.45±12.38 ²⁾	30.33±2.81 ²⁾
雌激素	1.8×10 ⁻⁴	128.01±26.92 ³⁾	54.11±20.60 ⁴⁾	15.10±8.35 ³⁾
二仙汤	9.0	115.46±8.15 ⁴⁾	62.08±9.13 ⁴⁾	17.05±3.75

3.8 对去卵巢大鼠血浆 PGI₂/TXA₂ 的影响 与假手术组比较,模型组大鼠血浆 PGI₂/TXA₂ 显著降低($P<0.01$);与模型组比较,雌激素组大鼠和二仙汤组大鼠 PGI₂/TXA₂ 均明显升高($P<0.05$)。见表5。

表5 二仙汤对去卵巢大鼠血浆 PGI₂/TXA₂ 值的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 5 Effect of Erxian decoction on level of PGI₂/TXA₂ in ovariectomized rats plasma ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	PGI ₂ /TXA ₂
假手术	-	0.81±0.19
模型	-	0.32±0.04 ²⁾
雌激素	1.8×10 ⁻⁴	0.69±0.32 ³⁾
二仙汤	9.0	0.64±0.20 ³⁾

3.9 对去卵巢大鼠凝血四项的影响 与假手术组比较,模型组 APTT 显著降低($P<0.01$),FIB 显著升高($P<0.01$),PT,TT 有降低趋势,但与假手术组比较差异无统计学意义;与模型组比较,雌激素组和二仙汤组 APTT 显著升高($P<0.01$);PT,TT 都有升高趋势,FIB 都有降低趋势,但与模型组比较差异均无统计学意义。见表6。

度明显降低($P<0.05$),卡松黏度,血浆黏度显著降低($P<0.01$);二仙汤组中切(30 s⁻¹和 50 s⁻¹),高切(200 s⁻¹)下的全血黏度明显降低($P<0.05$),全血高切相对指数,红细胞聚集指数,卡松黏度及血浆黏度均明显降低($P<0.05, P<0.01$)。见表7。

表7 二仙汤对去卵巢大鼠全血黏度和血浆黏度的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 7 Effect of Erxian decoction on whole blood viscosity and plasma viscosity in ovariectomized rats plasma ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	全血黏度/mPa·s					卡松黏度 /mPa·s	血浆黏度 /mPa·s	红细胞聚 集指数	全血高切 相对指数	全血低切 相对指数
		1 s ⁻¹	5 s ⁻¹	30 s ⁻¹	50 s ⁻¹	200 s ⁻¹					
假手术	-	47.46±6.72	16.83±2.45	7.44±0.80	6.32±0.62	4.61±0.40	3.14±0.20	1.31±0.03	10.49±1.27	3.43±0.38	36.12±6.82
模型	-	61.35±5.96 ²⁾	20.51±1.54 ²⁾	8.72±0.49 ²⁾	7.35±0.38 ²⁾	5.28±0.26 ²⁾	3.55±0.26 ²⁾	1.35±0.02 ²⁾	12.28±0.70 ¹⁾	4.02±0.30 ¹⁾	46.61±4.66 ¹⁾
雌激素	1.8×10 ⁻⁴	56.11±2.41	18.89±0.70	8.03±0.20	6.75±0.15	4.81±0.09 ³⁾	3.19±0.07 ⁴⁾	1.29±0.02 ⁴⁾	11.38±0.30	3.71±0.13	42.99±2.25
二仙汤	9.0	51.78±6.73	17.77±1.77	7.79±0.50 ³⁾	6.60±0.38 ³⁾	4.79±0.22 ³⁾	3.24±0.11 ⁴⁾	1.29±0.02 ⁴⁾	10.75±1.09 ³⁾	3.65±0.14 ³⁾	39.51±5.19

4 讨论

近年来,更年期女性CMD发病率高,患者表现为疲劳乏力,心前区疼痛反复发作,严重影响生活质量,引起国内外学者广泛关注。冠脉微循环是血液与心肌进行物质交换的直接场所,内皮细胞更是直接与血液接触,对冠脉微循环的调节至关重要。目前,CMD内皮障碍是基础和临床研究的热点。研究表明,冠脉微血管内皮受损,局部内皮剪切应力降低,可促进炎症过程,加重动脉粥样硬化的发展^[16];内皮细胞功能障碍也会加重高血脂、弥漫性动脉粥样硬化,并且可能进一步导致心血管疾病的发生^[17]。同时,CMD与雌激素水平降低有密切关系^[18]。有研究表明雌激素对血管内皮细胞有重要保护作用,但与之相伴的乳腺癌与子宫内膜癌的潜在危险性升高,在一定程度上限制了HRT的广泛应用^[19-20]。因此寻找保护内皮结构和功能的具有植物雌激素作用的中药成为防治CMD的重要途径。

中医认为,肾气虚衰引起诸脏乃至全身机能失调是更年期综合征发病的根本原因^[21]。CMD病位在心络,中医络脉学说认为心络与冠脉微循环具有同一性,更年期CMD与心络营卫气血运行失常密切相关^[22]。肾阳为一身阳气之本,更年期肾阳不足,累及心阳,最终心肾阳气不足,鼓动无力,痰浊瘀血阻滞,心络气血不足,心失所养^[23]。补肾方剂二仙汤由仙茅、淫羊藿、巴戟天、知母、黄柏、当归配伍而成,可以通过补肾阳而间接补心阳,从而改善痰瘀阻滞和心络失养,从本质上调节更年期女性CMD。

本实验中,阴道涂片显示,假手术组大鼠阴道涂片呈现动情前期—动情期—动情后期—间期的周期变化;去卵巢大鼠阴道涂片可见大量淋巴细胞,呈现持续间期特征,规律动情周期消失。大鼠体质量和血浆E₂检测结果表明,去卵巢大鼠体质量增加,血浆E₂含量减少。二仙汤能够降低大鼠体质量,增加去卵巢大鼠血浆E₂含量。以上结果表明本

实验造模成功,二仙汤具有雌激素样作用,与课题组前期结果一致^[9]。

内皮损伤是冠心病血管损伤的始动环节^[24]。而微血管内皮对CMD的发生发展起关键作用。其结构的完整性直接影响血液与组织间的物质交换。透射电镜结果显示,去卵巢大鼠心肌微血管内皮细胞肿胀明显,胞浆空化,运输小泡减少,肿胀的内皮细胞和内皮突出部分可能阻塞了微血管管腔,诱发或加重CMD。二仙汤能够从一定程度上改善内皮细胞水肿程度,改善因内皮水肿引起的官腔狭窄,同时增加运输小泡数量,从而在一定程度上恢复微血管内外的物质交换。心肌微血管的密度与组织器官代谢水平相适应,每个心肌细胞都有一到两根微血管为其提供氧气与营养成分。心肌免疫荧光检测结果表明,去卵巢大鼠心肌微血管密度降低,二仙汤能够增加微血管密度。现代药理研究表明,巴戟天能够促进心肌梗死后大鼠心肌血管的生成^[25],二仙汤增加微血管密度可能与此有关。心功能检测结果表明,去卵巢大鼠EF和FS下降,LVVol_s增大,提示存在射血功能的下降。二仙汤和雌激素均可显著升高EF和FS,减少LVVol_s,在一定程度上恢复去卵巢大鼠受损的心功能,尤其对改善射血功能效果较好。可能与二仙汤改善内皮细胞结构完整性,并增加微血管密度,从而增加了心肌供血,而在一定程度上改善左室射血功能。

内皮细胞分泌多种血管舒缩因子调节微血管舒缩活动,舒缩因子间的平衡对微血管舒缩起重要作用,平衡失调,血管舒张功能减弱,痉挛趋势增强,血小板聚集,不仅导致血管狭窄,也可引起血液高凝状态、黏滞度增加,而加重微血管损伤。本次实验结果表明,去卵巢大鼠血浆ET-1水平升高,PGI₂/TXA₂降低,雌激素和二仙汤都能够降低血浆ET-1水平,升高血浆PGI₂/TXA₂。ET-1是已知最强的缩血管物质,增多会导致持续的血管收缩而加重CMD^[26]。PGI₂和TXA₂是一组由内皮细胞合成并分

泌的血管活性物质, PGI₂是舒血管因子, TXA₂是缩血管因子, 两者具有拮抗作用, 内皮分泌失调, PGI₂减少, TXA₂增多, 打破PGI₂/TXA₂的相对平衡, 一方面发生微血管痉挛, 加重CMD; 另一方面增强血小板活性, 使其黏附性、聚集性及分泌性增强, 诱发微血栓, 加速原有CMD^[27-28]。本次结果表明, 去卵巢大鼠血浆vWF和VEGF升高, 二仙汤能够降低血浆vWF和VEGF。vWF由内皮分泌, 是血管内皮细胞活化以及损伤的重要标志物, 内皮细胞损伤时, 血浆vWF水平会明显上升, 介导血小板的黏附和聚集, 并使血液处于高凝状态^[29]。VEGF又称血管调理素, 能够增加微血管的通透性, 促进内皮的生成和血管的新生等^[30]。低水平的VEGF具有促进血管形成以及促进内皮生长的能力^[31]; 而高水平的VEGF能够促进基底膜解离, 增加微血管的通透性, 是微血管病变的危险因素^[32-33]。本实验表明, 去卵巢大鼠出现内皮分泌功能失调, 二仙汤改善了内皮分泌功能, 平衡微血管舒缩活动和抗血小板聚集, 在一定程度上改善了CMD。现代药理学研究发现, 淫羊藿具有保护血管内皮, 调节内皮舒缩因子分泌的作用^[34], 其主要成分淫羊藿苷能够提高NO的含量, 减轻内皮细胞损伤^[35]。当归能够升高PGI₂/TXA₂值, 扩张冠脉, 增加血流量^[36]。知母皂苷具有抗血小板聚集的作用^[37]。一定程度上解释了本实验中二仙汤的作用效果。

凝血四项结果显示, 去卵巢大鼠血浆APTT缩短, FIB水平升高。血液流变学检测结果也显示, 去卵巢大鼠全血黏度、血浆黏度和红细胞聚集指数升高。表明去卵巢大鼠血液处于高凝状态, 血液黏滞度增加。这与本实验中去卵巢大鼠血浆vWF和TXA₂水平升高一致, vWF和TXA₂能够诱导血小板的黏附、聚集, 促进血小板活化, 而血小板活化是反映高凝状态的重要指标, 可以诱发或加重血液高凝状态和高黏滞度^[38-39]。雌激素和二仙汤都能延长APTT, 改善高凝状态。雌激素能够降低血浆黏度和高切下的全血黏度; 二仙汤能够降低中切, 高切下的全血黏度、血浆黏度、红细胞聚集指数、全血高切相对指数。由此可见, 二仙汤可以通过降低血浆vWF水平, 改善血液高凝状态和高黏滞度; 二仙汤是否还可通过其他途径改善去卵巢大鼠血液高凝状态和高黏滞度, 值得进一步探究。

综上所述, 去卵巢大鼠心肌微血管密度降低, 微血管内皮细胞结构异常, 内皮分泌失调, 微血管舒缩失衡, 血液处于高凝状态和高黏滞度, 这些都

会加重CMD, 影响心肌供血, 引起心功能下降。补肾方剂二仙汤具有植物雌激素作用可提高大鼠体内雌激素水平, 增加心肌组织雌激素受体表达^[40-41], 通过保护心肌微血管内皮细胞结构的完整性, 增加心肌微血管密度, 改善内皮分泌功能, 降低血液高凝状态和高黏滞度, 在一定程度上改善更年期女性CMD, 起到保护心肌、抗心功能损伤的作用, 其进一步机制值得深入研究。

[参考文献]

- [1] KASKI J C. Cardiac syndrome X in women: the role of oestrogen deficiency[J]. *Heart*, 2006, 92(3): 5-9.
- [2] 钟仕利, 黄晶. 女性冠状动脉微血管性心绞痛的诊断及治疗进展[J]. *心血管病学进展*, 2019, 40(7): 992-995.
- [3] 谢媛丽, 白文佩. 微血管性心绞痛与雌激素关系的研究进展[J]. *中国妇产科临床*, 2003, 4(5): 398-400.
- [4] 杨珺, 罗爱月, 王世宣. 女性卵巢功能与心血管疾病[J]. *中国妇幼保健*, 2015, 30(4): 644-647.
- [5] ROSSOUW J E, PRENTICE R L, MANSON J E, et al. Relationships of coronary heart disease with 27 hydroxycholesterol, low-density lipoprotein cholesterol, and menopausal hormone therapy [J]. *Circulation*, 2012, 126(13): 1577-1586.
- [6] 梁春梅, 黄照权. 植物雌激素对心血管疾病作用的研究进展[J]. *中国医药导报*, 2017, 14(8): 37-40.
- [7] 赵兰平, 陈彦静, 薛淑芳, 等. 二仙汤对去卵巢大鼠心脏电活动的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(5): 136-140.
- [8] ZANG Z Z, XIANG L H, ZHAO L P, et al. The protective effect of Er-Xian decoction against cardiac injury in menopausal rat model [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2018, 18(1): 245-255.
- [9] 王昱涵, 姜燕华, 向丽华, 等. 二仙汤对去卵巢大鼠心功能和血压动态演变的干预作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(3): 53-61.
- [10] 刘磊, 姚道阔, 陈晖. 冠状动脉微循环障碍发病机制研究进展[J]. *中国循证心血管医学杂志*, 2020, 12(1): 126-128.
- [11] 王玉珍, 刘海涛, 宋欢欢, 等. 补肾活血汤对去卵巢大鼠心肌微血管和CYP2J3的影响[J]. *心脏杂志*, 2015, 27(5): 540-546.
- [12] 龚青, 刘海梅, 朱丽娟, 等. 淫羊藿苷对卵巢切除大鼠胸主动脉内皮舒血管功能的影响[J]. *时珍国医国药*, 2012, 23(8): 2061-2063.
- [13] 张玉芬, 王玉珍, 赵洁, 等. 补肾活血汤对去卵巢大鼠心脏微血管内皮细胞形态及血清E₂、ET、NO、PGI₂、

- TXA₂含量的影响[J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(31):6044-6049, 6038.
- [14] 谢慧慧,王莹,杨硕,等. 二仙汤对围绝经期大鼠心脏电生理的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(18):43-48.
- [15] 伍娟娟,刘锐,尤昭玲,等. 二仙汤对免疫性卵巢早衰模型小鼠形态学影响[J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(7):1645-1647, 1709.
- [16] GERASIMOS S, JASKANWAL D S, MARINA Z, et al. Local low shear stress and endothelial dysfunction in patients with nonobstructive coronary atherosclerosis [J]. J Am Coll Cardiol, 2018, 71(19):2092-2102.
- [17] FABIO M, MARCO G D B, ANTONIO A, et al. Role of endothelial dysfunction in determining angina after percutaneous coronary intervention: learning from pathophysiology to optimize treatment [J]. Prog Cardiovasc Dis, 2020, 63(3):233-242.
- [18] ELIF T, ALICIA A E, ZEYNEP M E. Coronary microvascular dysfunction and estrogen receptor signaling[J]. Trends Endocrinol Metab, 2020, 31(3):228-238.
- [19] 金超英. 雌激素对绝经后CHD患者血管内皮功能及斑块稳定性的影响[J]. 西南国防医药, 2016, 26(11):1265-1268.
- [20] 吴婉莉,于爱军. 绝经激素治疗在妇科恶性肿瘤中的研究进展[J]. 国际妇产科学杂志, 2016, 43(3):318-322.
- [21] 刘新华,何立华. 女性更年期综合征中医研究进展[J]. 中医临床研究, 2019, 11(36):125-128.
- [22] 常成成,魏聪,吴以岭. 络病学说“孙络-微血管”概念及其临床指导意义[J]. 中医杂志, 2016, 57(1):7-11.
- [23] 王文杰,王志梅,郝伟. 微血管性心绞痛中西医发病机制研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(72):123, 126.
- [24] 韩宝玲. 氧化应激在2型糖尿病及其并发症发病机制中的作用[J]. 实用临床医药杂志, 2011, 15(3):122-124.
- [25] 赵胜,冯国清,付润芳,等. 巴戟天水提物对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 浙江中医杂志, 2005, 40(3):35-37.
- [26] 倪晶怡,张倩倩,王文彤,等. 内皮素-1与冠心病相关性研究进展[J]. 医学理论与实践, 2018, 31(21):3183-3184, 3187.
- [27] 张璐,马学竹,黄焯. 二参颗粒对心肌缺血大鼠血清TXA₂/PGI₂的平衡及炎症细胞因子水平的影响[J]. 中国药师, 2020, 23(6):1077-1081.
- [28] 刘子安,刘维. 血栓烷A₂在临床中的应用进展[J]. 当代医学, 2018, 24(15):184-186.
- [29] 杨进山. 血管性血友病因子在冠心病中的研究进展[J]. 中国医药导报, 2016, 13(15):68-71.
- [30] 刘炳男,周霞,张文倩,等. 血管内皮生长因子生物学功能及中医药治疗研究进展[J]. 实用心脑血管病杂志, 2019, 27(5):12-15.
- [31] SUCATO V, EVOLA S, QUAGLIANA A, et al. Comparison of coronary artery flow impairment in diabetic and hypertensive patients with stable microvascular angina [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2014, 18(23):3687-3689.
- [32] 倪英群,方朝晖,施慧. 丹蛭降糖胶囊调控VEGF信号通路促糖尿病大鼠血管新生的作用机制[J]. 北京中医药大学学报, 2020, 43(2):141-147.
- [33] 韦华,蒙连新,耿琳,等. 2型糖尿病患者微血管病变与血清代谢学指标的关系[J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(9):1713-1715.
- [34] 方东菲,张建永. 淫羊藿及其活性成分对心血管疾病的改善作用机制研究进展[J]. 中国药房, 2020, 31(9):1139-1143.
- [35] 白鹭,李鸿,覃琴,等. 黄酮类化合物对血管内皮细胞损伤的保护作用及机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(12):203-211.
- [36] 黄红泓,覃日宏,柳贤福. 中药当归的化学成分分析与药理作用探究[J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(58):127, 153.
- [37] 尤杰,孙兆林,季宇彬,等. 知母皂苷AⅢ药理活性及机制研究进展[J]. 中国医药导报, 2012, 9(3):11-13.
- [38] 努尔巴哈尔·热木图拉,彭辉. 血管性血友病因子在心血管相关疾病中的研究进展[J]. 新疆医学, 2018, 48(11):1234-1236, 1246.
- [39] 刘子安,刘维. 血栓烷A₂在临床中的应用进展[J]. 当代医学, 2018, 24(15):184-186.
- [40] 陈彦静,向丽华,张治国,等. 去卵巢对大鼠心肌损伤及二仙汤的保护作用研究[J]. 中国病理生理杂志, 2015, 31(10):1897-1898.
- [41] 高雅楠,袁婷,张伟伟,等. 二仙汤水提物、醇提物对小鼠脾脏和卵巢细胞作用的比较研究[J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(4):958-961.

[责任编辑 孙丛丛]