

枳实薤白桂枝汤 对不稳定型心绞痛患者 MMP-9/TIMP-1 的影响

戴飞¹, 陆曙^{2*}, 苏伟², 龚少愚²

(1. 南京中医药大学, 南京 210046; 2. 南京中医药大学附属无锡市中医医院, 江苏 无锡 214001)

[摘要] **目的:**探讨枳实薤白桂枝汤对血瘀、痰浊、气滞、寒凝为主的不稳定型心绞痛(UA)患者基质金属蛋白酶9(MMP-9)、基质金属蛋白酶抑制剂1(TIM-1)水平及其基因表达的影响及其作用机制。**方法:**UA患者60例,按随机原则,将患者划分为对照组和治疗组,每组各30例。酶联免疫标记(ELISA)测定血清MMP-9、TIMP-1水平,实时荧光定量PCR技术进行相对定量检测MMP-9、TIMP-1基因表达,比较两组MMP-9、TIMP-1水平及其基因表达的变化。**结果:**两组患者症候积分较治疗前均有改善($P < 0.05$),且治疗组优于对照组($P < 0.05$)。两组患者MMP-9、TIMP-1水平较治疗前均有改善($P < 0.05$),且治疗组优于对照组($P < 0.05$)。两组患者MMP-9、TIMP-1 mRNA较治疗前均有改善($P < 0.05$),MMP-9/TIMP-1 mRNA比较,治疗组优于对照组($P < 0.05$)。**结论:**在规范化治疗的基础上加用枳实薤白桂枝汤可进一步改善UA患者MMP-9、TIMP-1水平及其基因表达,促进粥样斑块的稳定性。

[关键词] 枳实薤白桂枝汤; 不稳定型心绞痛; 基质金属蛋白酶-9; 基质金属蛋白酶抑制剂-1

[中图分类号] R287 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)14-0307-04

[doi] 10.11653/syfj2013140307

Effect of Zhishi Xiebai Guizhi Decoction on MMP-9, TIMP-1 Levels and Gene Expression in Patients with Unstable Angina

DAI Fei¹, LU Shu^{2*}, SU Wei², GONG Shao-yu²

(1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China;

2. Wuxi Hospital Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Wuxi 214001, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect and mechanism of Zhishi Xiebai Guizhi decoction on matrix metalloproteinases-9 (MMP-9), tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-1) levels and gene expression in patients with blood stasis, sputum, qi stagnation, cold obstruction unstable angina (UA). **Method:** Sixty UA patients were divided into control group (30) and treatment group (30) randomly. ELISA was used to determine the serum MMP-9, TIMP-1 levels. Real time fluorescent quantitative PCR was used to determine MMP-9, TIMP-1 gene expression. Compared the serum MMP-9, TIMP-1 levels and gene expression from the two group. **Result:** The two groups had significant improvements in Symptom integra after treatment ($P < 0.05$), and the treatment group were superior to the control group ($P < 0.05$). The two groups had significant improvements in Serum levels of MMP-9, TIMP-1 after treatment ($P < 0.05$). and the treatment group were superior to the control group ($P < 0.05$). The two groups had significant improvements in MMP-9, TIMP-1 mRNA after treatment ($P < 0.05$). The treatment group were superior to the control group in MMP-9/TIMP-1mRNA ($P < 0.05$). **Conclusion:** Based on the standardization of treatment, Zhishi Xiebai Guizhi decoction can improve the serum MMP-9, TIMP-1 levels and gene expression in patients with blood stasis, sputum, qi stagnation, cold obstruction UA, and advance the stability of atherosclerosis plaque.

[Key words] Zhishi Xiebai Guizhi decoction; unstable angina; MMP-9; TIMP-1

[收稿日期] 20121028(002)

[第一作者] 戴飞, 主治中医师, 从事中医心系疾病研究, Tel: 15950565816, E-mail: daitian77@126.com

[通讯作者] * 陆曙, 教授、主任医师, 博士生导师, 从事心血管疾病预防研究, E-mail: lushu@medmail.com.cn

目前认为斑块的不稳定性或破裂是急性冠状动脉综合征的主要发病机制,斑块纤维帽的破裂是由于细胞外基质合成和崩解失去平衡的结果。研究显示,基质金属蛋白酶通过消化纤维帽成分而促使斑块不稳定性或破裂,其中基质金属蛋白酶 9 (MMP-9) 是造成斑块不稳定而诱发冠脉事件的主要降解酶之一。基质金属蛋白酶抑制剂 1 (TIMP-1) 可限制 MMP-9 降解基质的作用,从而有利于斑块的稳定而减少冠脉事件发生。以往研究显示中药可经多途径防治动脉粥样硬化,且疗效显著^[1]。红梅^[2] 研究显示丹菱片可显著降低心肌梗死大鼠 MMP-9 蛋白表达。本研究通过枳实薤白桂枝汤对不稳定型心绞痛患者 MMP-9, TIMP-1 表达的影响的研究以探讨枳实薤白桂枝汤治疗血瘀、痰浊、气滞、寒凝为主的不稳定型心绞痛的机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料 入选 2009 年 12 月—2010 年 12 月无锡市中医医院心内科住院并诊断为不稳定型心绞痛(UA)患者 60 例。诊断标准参照 2007 年中华医学会心血管病学分会、中华心血管病杂志编辑委员会公布的《不稳定型心绞痛和非 ST 段抬高心肌梗死诊断和治疗指南》。中医诊断标准参照 2002 年卫生部《中药新药治疗冠心病心绞痛的临床指导原则》拟定①血瘀:胸部刺痛、绞痛,固定不移,痛引肩臂或臂内侧,胸闷,心悸不宁,口唇紫暗,舌质暗或有瘀点瘀斑,脉细涩。②痰浊:胸室闷而痛,或痛引肩背,胸脘痞满,气短喘促,体胖多痰,身体困重。舌苔厚腻,脉滑。③气滞:胸闷胸痛,胸胁胀痛,心悸,善太息。舌淡红,脉弦。④寒凝:胸痛彻背,感寒痛甚,胸闷气短,心悸,畏寒,四肢欠温,面白。纳入标准①符合上述 UA 西医诊断标准,且为血瘀、痰浊、寒凝、气滞为主的 UA 患者;②18 岁 ≤ 受试者年龄 ≤ 75 岁;③患者知情。排除标准①非寒凝气滞型的 UA 患者;②心力衰竭,急慢性感染,严重凝血机制异常,甲状腺功能异常,免疫性及炎症性疾病、肿瘤、手术创伤,有严重肝、肾、造血、神经系统等疾病患者。

治疗组与对照组在发病年龄、性别、体重、身高、血压、血糖、血脂方面无统计学意义,具有可比性。见表 1。

1.2 方法 两组患者均按照《不稳定型心绞痛和非 ST 段抬高心肌梗死诊断和治疗指南》给予西医规范化药物治疗,治疗组在规范化治疗的基础上加服枳实薤白桂枝汤(枳实 12 g,桂枝 6 g,薤白 9 g,厚朴 12 g,全栝楼 24 g,每剂以水 1 000 mL,先煎枳

表 1 两组患者基线资料比较 ($\bar{x} \pm s, n = 30$)

指标	治疗组	对照组
男/女/例	19/11	20/10
年龄/岁	64.63 ± 9.426	64.63 ± 10.21
收缩压/mmHg	142.83 ± 27.03	143.67 ± 24.81
舒张压/mmHg	82.50 ± 10.15	85.67 ± 10.15
体重/kg	63.38 ± 10.93	63.62 ± 12.51
身高/cm	164.10 ± 7.05	161.57 ± 8.22
空腹血糖/mmol·L ⁻¹	5.46 ± 1.39	5.32 ± 0.81
总胆固醇/mmol·L ⁻¹	3.519 ± 1.27	2.89 ± 1.82
甘油三酯/mmol·L ⁻¹	3.71 ± 1.0	4.07 ± 0.67
高密度脂蛋白/mmol·L ⁻¹	1.248 ± 0.38	1.34 ± 0.29
低密度脂蛋白/mmol·L ⁻¹	3.379 ± 0.89	3.47 ± 1.37

注:1 mmHg = 0.133 kPa。

实、厚朴,取 400 mL,后入其他药物,得 300 mL,分 2 次温服)。疗程 2 周。

1.3 观察指标与测定方法

1.3.1 心绞痛疗效评价方法 观察治疗前后中医症状积分。

1.3.2 血清 MMP-9/TIMP-1 水平的检测 入选患者入院后次日及治疗 2 周后抽取晨静脉血,即刻送实验室予以 2 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,分离血清后编号,酶联免疫标记测定(ELISA),试剂盒均由上海西唐生物公司提供。

1.3.3 外周血 MMP-9/TIMP-1 基因表达水平定量测定 全血总 RNA 抽提:取入组者晨空腹血 2 mL,经 EDTA·Na₂ 抗凝,全血 0.3 mL 采用 3S 柱离心式血液总 RNA 抽提试剂盒(K3620 上海博彩生物科技有限公司),RNA 浓度测定采用 BIO-RAD 核酸蛋白测量仪(SmartSpecTM Plus Spectrophotometer),RNA 提取物 -80 ℃ 保存。通过实时荧光定量 PCR 技术进行相对定量检测。全血总 RNA 合成 cDNA 使用 TAKARA 反转录反应试剂盒(DRR037S 大连宝生物工程股份有限公司)。实时荧光定量 PCR 采用 SYBR[®] PrimeScriptTM RT-PCR Kit II 试剂盒(DRR083S 大连宝生物工程股份有限公司),PCR 仪采用 LightCycler480 扩增仪。实时荧光定量 PCR 反应体系为 20 μL,包括 2 × SYBR[®] Premix Ex TaqTM, 1 ~ 100 ng cDNA, 50 pmol·μL⁻¹ 引物。两步法 PCR 循环条件:预变性 95 ℃ 30 s 一个循环,变性 95 ℃ 5 s,退火/延伸 60 ℃ 20 s 共 40 个循环。溶解曲线分析 95 ℃ 1 s, 65 ℃ 15 s, 95 ℃ 1 s。相对定量分析采用 LightCycler Relative Quantification (Version 1.5) 软件。见表 2。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据处理,计数资料比较采用 χ^2 检验;计量资料用

$\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较用 t 检验, $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 中医症状积分比较 两组治疗前后比较有统计学意义 ($P < 0.001$); 两组治疗前后积分差值比较有统计学意义 ($P = 0.03$)。见表 3。

2.2 两组患者血清 MMP-9, TIMP-1 水平的比较 治疗前后比较有统计学意义 ($P < 0.001$); 治疗后组间比较有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 4。

2.3 两组患者 MMP-9, TIMP-1 mRNA 水平的比较 治疗前后比较有统计学意义 ($P < 0.001$)。见表 5。

表 2 MMP-9, TIMP-1 mRNA 及内参照引物

指标	引物	基因片段	扩增产物/bp
MMP-9	上游引物	5'-AATCTCACCCACAGGCAGCT-3'	401
	下游引物	5'-CCAAACTGGATGACGATGTC-3'	
人 β_2 激动蛋白	上游引物	5'ATCGTGCCTGACATTAAGG3'	195
	下游引物	5'ACAGGACTCCATGCCAGG3'	
TIMP-1	上游引物	5'-TCCTGTTGTTGCTGTGGCTGATAG-3'	274
	下游引物	5'-GGTTGTGGGACCTGTGGAAGTA-3'	
内参照	上游引物	5'-CAACTTTGGTATCGTGAAGGACT-3'	392
	下游引物	5'-CGTCAAAGGTGGAGGAGTGGGT-3'	

注: MMP-9 及 TIMP-1 mRNA 引物设计, 与 GeneBank 上对比后合成。

表 3 两组患者治疗前后中医症状积分比较 ($\bar{x} \pm s, n = 30$)

组别	治疗前	治疗后	差值
治疗	18.53 \pm 4.67	6.07 \pm 3.37 ¹⁾	12.47 \pm 4.90
对照	616.60 \pm 3.45	6.73 \pm 2.49 ¹⁾	9.87 \pm 3.85 ²⁾

注: 组内比较, ¹⁾ $P < 0.01$; 组间比较²⁾ $P < 0.05$ (表 4~7 同)。

表 4 两组患者治疗前后血清 MMP-9, TIMP-1 水平的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 30$)

组别	MMP-9		TIMP-1	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
治疗	1 617.3 \pm 917.00	924.3 \pm 401.07 ¹⁾	99.44 \pm 66.67	234.3 \pm 153.69 ¹⁾
对照	1 649.33 \pm 991.10	1 280.33 \pm 875.72 ^{1,2)}	90.62 \pm 55.48	170.70 \pm 78.65 ^{1,2)}

表 5 两组患者 MMP-9, TIMP-1 mRNA 水平的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 30$)

组别	MMP-9 mRNA		TIMP-1 mRNA	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
治疗	1.43 \pm 1.38	0.68 \pm 0.42 ¹⁾	0.7 \pm 0.29	1.12 \pm 0.41 ¹⁾
对照	1.23 \pm 0.95	0.67 \pm 0.52 ¹⁾	0.8 \pm 0.31	1.16 \pm 0.36 ¹⁾

2.4 两组患者 MMP-9, TIMP-1 水平治疗前后差值比较 两组患者血清 MMP-9, TIMP-1 治疗前后差值

比较有统计学意义 ($P < 0.05$); MMP-9, TIMP-1 mRNA 治疗前后无统计学意义。见表 6。

表 6 两组患者 MMP-9, TIMP-1 水平治疗前后差值比较 ($\bar{x} \pm s, n = 30$)

组别	MMP-9	MMP-9mRNA	TIMP-1	TIMP-1mRNA
治疗	693.03 \pm 665.52	0.75 \pm 1.07	134.86 \pm 124.11	0.15 \pm 0.29
对照	369.0 \pm 222.94 ¹⁾	0.56 \pm 0.65	80.08 \pm 62.52 ¹⁾	0.17 \pm 0.44

2.5 两组患者治疗后 MMP-9/TIMP-1 水平比较 MMP-9/TIMP-1 比较无统计学意义; MMP-9 mRNA/TIMP-1 mRNA 比较有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 7。

表 7 两组患者治疗后 MMP-9/TIMP-1 水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 30$)

组别	MMP-9/TIMP-1	MMP-9 mRNA/TIMP-1 mRNA
治疗	7.86 \pm 8.50	5.76 \pm 3.96
对照	10.10 \pm 23.77	9.09 \pm 6.34 ¹⁾

3 讨论

MMPs 是导致 AS 斑块不稳定的重要因素之

一^[3]。研究发现 MMPs 升高与纤维帽变薄、不稳定型心绞痛及急性心肌梗死 (AMI) 的发生密切相关^[4-5]。MMPs 是一组特异性降解细胞外基质成分的锌离子依赖的蛋白水解酶超家族, 研究显示冠状动脉粥样斑中的 MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9 表达增加^[6]。MMP-9 是其家族重要成员之一, 主要水解变性胶原及基膜的主要成分 IV 型胶原。在体内可由单核细胞、巨噬细胞、成纤维细胞、中性粒细胞、血管平滑肌细胞及内皮细胞等多种细胞分泌。TIMPs 是 MMPs 的特异性抑制因子, 两者以 1:1 的比例形成 MMP-TIMP 复合体, 从而阻断 MMPs 与底物结合而失活, 抑制细胞外基质的降解。在人体内 MMP-9 的活性受 TIMP-1 调控, TIMP-1 是调节细胞外基质代谢的重要蛋白水解酶, 与动脉粥样硬化、心肌梗死等许多心血管疾病的发病机制有关^[7]。Konstantion 等^[8]研究 ACS 患者经治疗病情稳定后 MMP-9 水平下降、预后改善。在 ACS 的发生过程中, MMP-9 与 TIMP-1 失衡, MMP-9 表达增加 > TIMP-1 表达增加, 使冠状动脉粥样硬化斑块纤维帽的胶原降解大于合成, 导致斑块不稳定性或最终破裂^[9]。李如意等^[10]研究显示: ACS 患者血清 TIMP-1 水平高于稳定性心绞痛组及对照组, 但其增高程度低于 MMP-9, 导致 MMP-9/TIMP-1 在 ACS 患者高于 SAP 组及对照组, 提示两者比值可反应斑块的稳定性。

本研究应用证素辨证为便于临床操作, 能灵活准确地辨别处理 ACS 临床证候。ACS 的病机为本虚标实, 本虚以气血阴阳亏虚为主, 标实以血瘀、痰浊、气滞、寒凝为主, 且在疾病发展过程中, 多虚实兼见, 相互夹杂。通过观察, 在 ACS 发病中, 多以标实为主。枳实薤白桂枝汤由栝楼、薤白、枳实、厚朴、桂枝组成。薤白通阳散结, 化痰散寒、能散胸中凝滞之阴寒、化上焦结聚之痰浊、宣胸中阳气以宽胸, 乃治疗胸痹之要药, 栝楼涤痰散结、开胸痛痹; 二者共为君药。枳实破气除痞、化痰消积。厚朴燥湿消痰, 下气除满。二者均为臣药。佐以桂枝通阳散寒, 降逆平冲。诸药配伍, 调气血、化痰浊、振胸阳、消阴寒, 则 ACS 诸症可除。提示在规范化治疗的基础上, 加用枳实薤白桂枝汤能进一步降低以血瘀、痰浊、气滞、寒凝为主的不稳定型心绞痛的临床症状、血清 MMP-9/TIMP-1 水平、MMP-9/TIMP-1 mRNA, 更有利于保持细胞外基质的平衡和斑块的稳定。通过以上研究显示枳实薤白桂枝汤治疗以血瘀、痰浊、气

滞、寒凝为主的不稳定型心绞痛的机制可能与以下方面有关: 降低血清 MMP-9 水平的表达, 增加 TIMP-1 水平表达、改善 MMP-9/TIMP-1 mRNA 平衡关系, 从而保持细胞外基质的平衡和斑块的稳定而改善临床症状及预后。

[参考文献]

- [1] 姬媛媛, 刘俊田, 王志东. 中药防治动脉粥样硬化研究现状述评[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(4):58.
- [2] 红梅. 丹萎片对大鼠心肌梗死面积和心室重构的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(10):208.
- [3] Newby A C. Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture[J]. *Physiol Rev*, 2005, 85(1):1.
- [4] Chow A K, Cena J, Schulz R. Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature[J]. *Br J Pharmacol*, 2007, 152(2):189.
- [5] Kuge Y, Takai N, Ishino S, et al. Distribution profiles of membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP), matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and cyclooxygenase-2 (COX-2) in rabbit atherosclerosis: comparison with plaque instability analysis [J]. *Biol Pharm Bull*, 2007, 30(9):1634.
- [6] Feldman L J, Mazighi M, Scheuble A, et al. Differential expression of matrix metalloproteinases after stent implantation and balloon angioplasty in the hypercholesterolemic rabbit [J]. *Circulation*, 2001, 103(25):3117.
- [7] Creemers E E, Cleutjens J P, Smits J F, et al. Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure [J]. *Circ Res*, 2001, 89(2):201.
- [8] Konstantino Y, Nguyen T T, Wolk R, et al. Potential implications of matrix metalloproteinase-9 in assessment and treatment of coronary artery disease [J]. *Biomarkers*, 2009, 14(2):118.
- [9] Visse R, Hideaki N. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases structure, function, and biochemistry [J]. *Circ Res*, 2003, 92(3):827.
- [10] 李如意, 李秀芳, 刘永欣, 等. 联合检测血清炎症因子对急性冠脉综合症的预测价值[J]. 江苏医药, 2011, 37(2):190.

[责任编辑 邹晓翠]