

调脂通络胶囊对心肌 IRI 大鼠炎症反应的影响

王永霞, 王彩歌, 任琳琳, 吴先杰, 王幼平, 朱明军
(河南中医学院第一附属医院, 郑州 450003)

[摘要] **目的:**通过测定调脂通络胶囊对心肌缺血再灌注损伤(MIRI)后髓过氧化物酶(MPO)、心梗面积和心肌组织结构形态的变化等,观察调脂通络胶囊对 MIRI 后的心肌保护作用及可能的机制。**方法:**将大鼠分为调脂通络胶囊高、中、低(8.64, 4.32, 2.16 g·kg⁻¹·d⁻¹)剂量组,高脂模型组、非高脂模型组和阿托伐他汀阳性对照组。喂食高脂饲料 4 周后药物干预或生理盐水灌胃 4 周,之后结扎左冠状动脉前降支 30 min 后再灌注 24 h,采血检测总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白(LDL)和乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK-MB),各组一半动物取心肌组织缺血部分测定髓过氧化物酶(MPO),并于靠近心尖部取约 0.5 cm²的心肌组织行 HE 染色,另一半动物伊文思蓝(Evans blue)和氯化三苯基四氮唑(TTC)双染色后,测定心脏缺血和梗死范围质量比率。**结果:**高脂模型组与非高脂模型组相比较梗死范围质量比率、血脂水平和心肌酶含量明显升高($P < 0.01$)。各药物治疗组与高脂模型组相比可以明显降低 MPO 和心肌酶含量,减少梗死范围质量比率($P < 0.01$)。**结论:**调脂通络胶囊和阿托伐他汀可以通过减轻炎性细胞浸润以达到保护心肌细胞的目的,二者的心肌细胞保护作用可能与降低血脂、保护内皮功能有关。调脂通络胶囊无明显剂量依赖性。

[关键词] 调脂通络胶囊; 缺血再灌注损伤; 髓过氧化物酶; 血脂

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)01-0272-04

Influence of Tiaozhi Tongluo Capsules on Inflammatory Response after Myocardial Ischemia Reperfusion Injury

WANG Yong-xia, WANG Cai-ge, REN Lin-lin, WU Xian-jie, WANG You-ping, ZHU Ming-jun
(First Affiliated Hospital, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450003, China)

[Abstract] **Objective:** By measuring the level of myeloperoxidase (MPO), infarction weight ratio, myocardial cell morphology, to observe the myocardial protective effects and possible mechanism of Tiaozhi Tongluo capsules for myocardial ischemia-reperfusion injury (MIRI). **Method:** Ninety-six male Wistar rats were fed with high fat diet for 4 weeks except the non-fat model group. The rats were randomized into six groups and drug intervention or saline for 4 weeks: (1) fat model group; (2) non-fat model group; (3) statin group; (4) Tiaozhi Tongluo capsules 8.64 g·kg⁻¹·d⁻¹; (5) Tiaozhi Tongluo capsules 4.32 g·kg⁻¹·d⁻¹; (6) Tiaozhi Tongluo capsules 2.16 g·kg⁻¹·d⁻¹. The same volume of saline was infused in fat model and non-fat model group. After 2 hours of the last intragastric infusion, the chest was opened and the left anterior descending coronary arteries (LAD) was ligated for 30 min and unclamped for 24 hours for all the rats. After 24 h of reperfusion, the level of blood lipids, cardiac enzymes in serum or the content of MPO in ischemic myocardium tissue (half of the animals of each group) were measured. Myocardial tissue near the apical about 0.5 cm² was taken for HE staining, morphological changes were observed. The myocardial tissue of the rest animals in each group was stained by Evans blue and TTC. Then these slices were immersed in 4% paraformaldehyde formalin, ischemic zone size (IZS), infarct size (IS), the ischemic weight ratio and the infarction weight ratio were determined. **Result:** The level of cardiac enzymes, MPO and infarction weight ratio were significantly higher in fat model group compared to the non-fat

[收稿日期] 20120614(001)

[基金项目] 河南省教育厅青年骨干教师资助项目(教高[2012]862-132)

[第一作者] 王永霞, 博士, 副教授, 从事中西医结合防治心血管病研究, Tel:0371-66262960, E-mail:wychzhq@yahoo.com.cn

model group ($P < 0.01$). The drug treatment groups could significantly reduce the level of cardiac enzymes, MPO and infarction weight ratio compared to fat model group ($P < 0.01$). **Conclusion:** Tiaozhi Tongluo capsules and atorvastatin could protect myocardial cells by reducing the infiltration of inflammatory cells, which might be related to the effects of lowering blood lipids and protecting endothelial function. No clear dose-dependent effects were found for Tiaozhi Tongluo capsules.

[**Key words**] Tiaozhi Tongluo capsules; myocardial ischemia-reperfusion injury; myeloperoxidase; blood lipid

研究表明,血脂异常者发生心血管事件的危险性明显增加,而积极降低血脂水平,可以显著减少冠心病事件的发生率。随着冠脉再通术在临床上的广泛应用,心肌缺血灌注损伤(MIRI)也受到了越来越多医学工作者的关注。因此本实验在高脂血症模型的基础上建立 MIRI 模型,模拟临床冠心病的发病特点,观察调脂通络胶囊对 MPO,心肌酶等的影响,并进一步探究其作用原理及其量效关系。

1 材料

1.1 动物 Wistar 种雄性大鼠 96 只,SPF 级,体重(190 ± 20) g,由河南省动物实验中心提供。动物许可证号 SCKK(豫)2010-0002。

1.2 药物、试剂和仪器 调脂通络胶囊由红参、皂角刺、红曲、三七、血竭组成,药材购自河南中医药大学第一附属医院药房并由药剂科将红参、三七、皂角刺醇提制成浸膏,1 mL 的浸膏相当于 2 g 原生药材。三七、血竭打粉,过 100 目筛备用。

阿托伐他汀片,辉瑞制药有限公司提供,批号 054610K;髓过氧化物酶试剂盒(批号 20120205),乳酸脱氢酶试剂盒(批号 20120202),肌酸激酶同工酶试剂盒(批号 20120207)均由南京建成生物工程研究所提供;总胆固醇试剂盒(批号 20120105),甘油三酯试剂盒(批号 20120104),高密度脂蛋白试剂盒(批号 20120105),低密度脂蛋白试剂盒(批号 20111207)均由北京北化康泰临床试剂有限公司提供。伊文思蓝(Evans blue,批号 MKBH2094V),氯化三苯基四氮唑(TTC,批号 BCBD9078V)均由美国 Sigma 公司提供。Harvard 683 小动物呼吸机(美国),LDE-2 低速自动平衡离心机(北京),Sartorius BS110S 电子天平(德国),Haier 低温冰箱(青岛),TU-1901 紫外可见分光光度计(北京普析),SC-15 数控超级恒温槽(宁波新芝生物科技股份有限公司),DNP-9082 电热恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司)等。

2 方法

2.1 分组和高脂血症模型的制作 购买的 96 只

Wistar 大鼠先适应性喂养 1 周,按数字表法随机分为 6 组,调脂通络高剂量组、调脂通络中剂量组、调脂通络低剂量组、高脂模型组、非高脂模型组、阿托伐他汀阳性对照组、高脂假手术组各 8 只。除非高脂模型组外余组均给予 4 周高脂饲料^[1](3.5% 胆固醇、10% 猪油、0.2% 甲基硫氧嘧啶、0.5% 胆酸钠、5% 白糖加基础饲料)喂养。之后再给予药物干预或生理盐水 4 周,其中调脂通络 $8.64 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, $4.32 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, $2.16 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,阿托伐他汀 $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,高脂模型组和非高脂模型组 $1 \text{ mL} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ 生理盐水灌胃。

2.2 MIRI 模型的制作^[2] 末次给药或生理盐水后,空腹 12 h 的大鼠用 10% 的水合氯醛 $3 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔注射麻醉后固定于鼠板上,备皮、碘伏消毒,约于 3,4 肋间开口,钝性分离皮下、胸大肌与前锯肌,显露肋骨及肋间肌。于第 4,5 肋间钝性分离肋间肌,显露胸膜。弯止血钳于呼气时刺破胸膜,进入胸腔。撑开肋骨,挤出心脏。确定缝扎位置(肺动脉圆锥与左心耳交界处下方 2 mm,可以看到左冠静脉影,亦为标志)。6.0 线缝扎左冠状动脉前降支(LAD),进针深度约 1.5 mm 左右,宽度约 3 mm 左右。于结扎处垫一塑料管后打结(外科结)。经口气管插管,连接小动物呼吸机,呼吸频率 90 次/min,潮气量 2.5 mL,30 min 后剪开结扎线。探查无出血后关胸,缝合肌肉层后按压胸腔,挤出空气,防止气胸。大鼠苏醒后,放回鼠笼。在 MIRI 模型制作过程中,每组均有 25% 的死亡率。

2.3 标本的留取和检测 再灌注 24 h 后,除假手术组外各组取一半动物,首先进行颈动脉置管,抽取 5 mL 血液 $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 后制成血清 $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存。再经颈动脉导管推注 5 mL 肝素钠注射液和约 20 mL 生理盐水冲洗心脏(需将左心耳剪一小口,便于冲洗),待心脏颜色苍白,推注 1% 的伊文思蓝约 2 mL(需用镊子夹住左心耳的破口,以免整个心脏表面被蓝染),区分缺血区和非缺血区,之后剪下心脏,用冰生理盐水冲洗,剪去大血管、心耳和右心室,滤纸吸干水分,用保鲜膜把左心室包

裹放入 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱 10 min, 取出沿左室长轴切约 2 mm 厚的薄片, 放入 1% 的 TTC 磷酸盐缓冲液中 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min, 之后取出用生理盐水冲洗, 滤纸吸干水分, 放入 4% 多聚甲醛溶液保存。各组另一半动物处理同上, 取出心脏后将左室未蓝染部分(缺血部分)剪下, 冰生理盐水冲洗, 滤纸吸干水分, 用组织研磨器将组织制成 10% 的心肌匀浆, 匀浆介质为磷酸盐缓冲生理盐水(PBS), EP 管分装后 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存。其中 CK-MB 用酶联免疫分析法(ELISA)测定, 余指标皆用比色法测定。

2.4 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件, 数据资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, $P <$

0.05 为有统计意义。

3 结果

3.1 各组大鼠血清中血脂含量的变化 高模组的总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白(LDL)均较非高脂模型组显著升高($P < 0.01$), 证明高脂血症模型造模成功。各药物治疗组的 TC, TG, LDL 与非高模组比较差异无统计学意义, 其中调中组的 TG 与调高组和调低组相比差异有统计学意义($P < 0.05$), 各药物治疗组间的 TC, LDL 差异无统计学意义。调中组的高密度脂蛋白(HDL)与高模组相比明显升高($P < 0.05$), 与非高模组相比无差异。见表 1。

表 1 调脂通络胶囊对大鼠血清中血脂的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

mmol·L⁻¹

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TC	TG	HDL	LDL
非高脂模型	0	1.14 ± 0.22 ²⁾	0.71 ± 0.30 ²⁾	0.46 ± 0.13	0.39 ± 0.13 ²⁾
高脂模型	0	1.91 ± 0.29	1.65 ± 0.93	0.37 ± 0.20	0.69 ± 0.67
调脂通络胶囊	8.64	1.10 ± 0.58 ²⁾	1.10 ± 0.34 ¹⁾	0.40 ± 0.10	0.47 ± 0.44 ¹⁾
	4.32	1.33 ± 0.57 ¹⁾	0.35 ± 0.57 ²⁾³⁾	0.57 ± 0.18 ¹⁾	0.48 ± 0.10 ¹⁾
	2.16	1.35 ± 0.30 ¹⁾	0.97 ± 0.39 ¹⁾	0.40 ± 0.13	0.53 ± 0.16 ¹⁾
阿托伐他汀	0.002	1.10 ± 0.38 ²⁾	0.86 ± 0.26 ²⁾	0.47 ± 0.14	0.41 ± 0.20 ²⁾

注: 与高脂模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与调脂通络高剂量组和调脂通络低剂量组比较³⁾ $P < 0.05$ (表 2~4 同)。

3.2 各组大鼠血清 LDH 和 CK-MB 的变化 高模组的 LDH 和 CK-MB 含量与各药物治疗组和非高模组相较显著降低($P < 0.01$), 各药物治疗组间差异无统计学意义。见表 2。

表 2 调脂通络胶囊对大鼠血清中 LDH 和 CK-MB 的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	CK-MB /ng·mL ⁻¹	LDH /U·L ⁻¹
非高脂模型	0	2.49 ± 0.17 ¹⁾	1 276.60 ± 21.8 ¹⁾
高脂模型	0	2.70 ± 0.39	1 524.66 ± 84.7
调脂通络胶囊	8.64	2.36 ± 0.10 ¹⁾	1 256.11 ± 103.97 ¹⁾
	4.32	2.24 ± 0.35 ^{1,2)}	1 122.56 ± 83.55 ^{1,2)}
	2.16	2.38 ± 0.18 ¹⁾	1 255.40 ± 84.70 ¹⁾
阿托伐他汀	0.002	2.32 ± 0.15 ^{1,2)}	1 124.10 ± 131.67 ^{1,2)}

3.3 各组大鼠心肌梗范围和缺血范围质量比率的变化 各组间比较缺血范围质量比率(%)差异无统计学意义; 药物治疗组和非高模组梗死范围质量比率(%)均较高模组显著减少($P < 0.01$), 调高组、调中组和他汀组与非高模组相比明显降低($P < 0.05$)。各药物治疗组间差异无统计学意义。见表 3。

3.4 各组大鼠心肌匀浆中 MPO 含量的变化 非高脂模型组较高脂模型组明显降低, 药物治疗组较高

表 3 调脂通络胶囊对大鼠缺血范围和梗死范围质量比率的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

%

组别	剂量/g·kg ⁻¹	缺血范围质量比率	梗死范围质量比率
非高脂模型	0	61.7 ± 7.5	53.1 ± 14.9 ¹⁾
高脂模型	0	63.4 ± 6.9	65.8 ± 4.2
调脂通络胶囊	8.64	60.4 ± 8.9	39.4 ± 8.1 ^{1,2)}
	4.32	56.9 ± 7.6	38.4 ± 9.8 ^{1,2)}
	2.16	62.7 ± 4.5	43.8 ± 12.0 ¹⁾
阿托伐他汀	0.002	61.7 ± 5.7	39.5 ± 12.2 ^{1,2)}

脂模型组显著降低, 有统计学意义; 各药物治疗组间差异无统计学意义。见表 4。

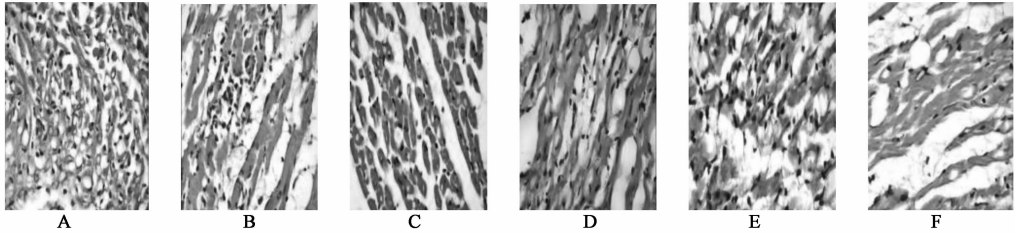
表 4 各组大鼠心肌匀浆中 MPO 含量的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	MPO 单位/克湿片
非高脂模型	0	2.66 ± 0.86 ¹⁾
高脂模型	0	3.87 ± 1.62 ³⁾
调脂通络胶囊	8.64	1.17 ± 0.48 ^{2,3)}
	4.32	1.15 ± 0.36 ^{2,3)}
	2.16	1.43 ± 1.07 ^{2,3)}
阿托伐他汀	0.002	2.30 ± 1.29 ²⁾

注: 与高脂模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与非高脂模型组比较³⁾ $P < 0.05$ 。

3.5 各组大鼠心肌组织病理形态学观察 各组大鼠心肌组织 HE 染色显示缺血区心肌排列紊乱、稀疏,心肌细胞肿胀,甚至肌纤维断裂、溶解,其中高模组胞浆还可见颗粒变性和脂肪变性。各组均可见坏

死周边区有炎性细胞浸润,药物治疗组与高模组和非高模组相比心肌细胞变性与坏死改变程度较轻,心肌坏死范围较小,坏死周边区炎性细胞浸润明显减少。见图 1。



A. 高模组;B. 非高模组;C. 调脂通络 8.64 g·kg⁻¹组;D. 调脂通络 4.32 g·kg⁻¹组;E. 调脂通络 2.16 g·kg⁻¹组;F. 他汀 2 mg·kg⁻¹组

图 1 调脂通络胶囊和他汀组对 MIRI 大鼠心肌组织的影响 (HE 染色, ×400)

4 讨论

高血脂主要引起血管内皮细胞的损伤,并刺激其释放大量的细胞黏附分子,促进白细胞黏附聚集到内皮细胞形成炎症反应,致使血管内皮功能紊乱^[3]。急性缺血缺氧产生的大量氧自由基可以通过心肌细胞和血管内皮细胞的相互作用触发白细胞的趋化和炎症,中性粒细胞(PMN)激活时产生脱颗粒,其嗜天青颗粒中含有大量的髓过氧化物酶(MPO)亦被释放出来,缺血再灌注时 MPO 随细胞脱颗粒而被大量释放出来,其含量可间接反映 PMN 浸润程度^[4-5]。同时浸润的 PMN 通过释放蛋白水解酶和细胞间黏附分子(ICAM-1)对心肌细胞施加强有力的细胞毒性作用,活化的 PMN 亦可刺激组织释放各种细胞毒性物质,包括氧自由基、活性氧物种、炎性细胞因子、蛋白酶等介导内皮功能障碍和心肌细胞损伤,其中的活性氧物种不仅可以直接损伤心肌细胞和血管细胞,还可以通过激发细胞因子和黏附分子加重炎症反应^[6-7]。他汀类药物作为冠心病的二级预防药物,其对心脏的益处似乎与降低血脂改善血管内皮功能和促进 NO 形成有关^[8]。

调脂通络胶囊是由院内制剂调脂胶囊和冠心舒乐胶囊筛选优化而成,二者自 1993 年以来进行了相关的临床和实验研究,发现两药具有明显的降脂、抗动脉硬化和防治冠心病心绞痛的作用。本实验中调脂通络各剂量组和他汀组的 LDH,CK-MB,MPO 含量均明显降低,心梗范围质量比率明显减小,心肌组织 HE 染色结果也提示二者可以减轻坏死区得炎性细胞浸润,从而减轻再灌注后的心肌损伤。高脂模型组比非高脂模型组心肌损伤更明显,提示高血脂可以加重缺血再灌注对心肌的损伤,可能与其慢性

炎症反应损伤血管内皮有关。实验也发现调脂通络胶囊各剂量组间不存在剂量依赖。

[参考文献]

- [1] 赵娟,李相军,孙波,等. 维生素 D3 联合高脂饲料建立大鼠动脉粥样硬化模型[J]. 实用医学杂志,2009,25(21): 3569.
- [2] 陈业农,周逸平,汪克明,等. 急性心肌缺血再灌注损伤大鼠模型制备方法的改进和评价[J]. 中国中医急症,2008,17(3):359.
- [3] 金永娟,李宏妹,朱文云,等. 高血脂对红细胞和血管内皮细胞的损伤[J]. 中国微循环,2002,6(1):22.
- [4] Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I, et al. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals[J]. Nat Med, 2000,6(9):1004.
- [5] Takemoto M, Sun J, Hirioke J, et al. Rho-kinase mediates hypoxia-induced downregulation of endothelial nitric oxide synthase [J]. Circulation, 2002, 106(1): 57.
- [6] Park J L, Lucchesi B R. Mechanisms of myocardial reperfusion injury [J]. Ann Thorac Sur, 1999, 68(5):1905.
- [7] Vinten-Johansen J. Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury[J]. Cardiovasc Res,2004, 61(3): 481.
- [8] Suatin V P, Mahesh T, Srikanth K, et al. Statin and resveratrol in combination induces cardioprotection against myocardial infarction in hypercholesterolemic rat [J]. JMCC, 2007, 42(3): 508.

[责任编辑 李玉洁]