

丹酚酸 B 对心肌缺血大鼠缺血心肌血管新生的影响

陈衡霞^{1*}, 许立^{2,3}, 许波华^{2,3}

(1. 南京妇幼保健院, 南京 210008; 2. 南京中医药大学药学院, 南京 210029;
3. 江苏省中药药效与安全性评价重点实验室, 南京 210029)

[摘要] **目的:** 观察丹酚酸 B (salvianolic acid B, Sal B) 对心肌缺血大鼠缺血心肌血管新生的作用。**方法:** 选取 SD 大鼠 60 只, 结扎大鼠结扎大鼠冠状动脉左降支, 建立大鼠心肌缺血模型, 随机分为模型组, Sal B 1.6, 3.2, 6.4 mg·kg⁻¹ 组, 和血管内皮生长因子 (VEGF) 组 (10 μg/只), 并设立假手术组, 每组 10 只, 给药 2 周后, HE 染色法检测心肌梗死面积; 试剂盒检测心肌组织中一氧化氮 (NO)、一氧化氮合酶 (NOS) 和 VEGF 含量; 免疫组化法检测大鼠缺血心肌中微血管数 (MVC)。**结果:** Sal B 3.2, 6.4 mg·kg⁻¹ 组梗死面积 (7.18 ± 3.15)%, (5.74 ± 2.02)% 较模型组 (14.84 ± 5.40)% 明显减小; Sal B 能增加心肌组织中 NO, NOS, VEGF 含量; Sal B 3.2, 6.4 mg·kg⁻¹ 组心肌梗死边缘区 MVC (28.6 ± 5.86), (30.20 ± 5.07) 条, 较模型组 (15.60 ± 4.62) 条, 明显增多。**结论:** Sal B 可促进心肌缺血后大鼠缺血心肌血管新生, 其作用机制与 VEGF、NO 释放增加有关。

[关键词] 丹酚酸 B; 心肌缺血; 血管新生; CD34; 血管内皮生长因子

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)20-0180-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120813.1214.061.html>

[网络出版时间] 2012-08-13 12:14

Effect of Salvianolic Acid B on Angiogenesis of Ischemic Myocardium in Myocardial Ischemia Rats

CHEN Heng-xia^{1*}, XU Li^{2,3}, XU Bo-hua^{2,3}

(1. Nanjing Maternity and Child Health Care Hospital, Nanjing 210008, China;
2. Jiangsu Key Laboratory for Pharmacology and Safety Evaluation of Chinese Materia Medica, Nanjing 210029, China; 3. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of salvianolic acid B (Sal B) on the angiogenesis in ischemic myocardium of the rats with myocardial ischemia. **Method:** The left coronary of SD rats were blocked to make the models of acute myocardial ischemia. Sixty rats were randomized into model group, Sal B groups (1.6, 3.2, 6.4 mg·kg⁻¹) and vascular endothelial cell growth factor (VEGF) group. A sham operation group was set up. Ten rats were included in each group. Two weeks after administration, HE staining was used to detect the myocardial infarct size; using kits to detect the contents of nitrogen oxide (NO), NO synthase (NOS) and VEGF in myocardial tissue; immunohistochemical method was employed to detect microvessel counts (MVC) in ischemic myocardium. **Result:** The infarct size of myocardium in Sal B 3.2, 6.4 mg·kg⁻¹ groups (7.18 ± 3.15)%, (5.74 ± 2.02)% was lower than that in the model group (14.84 ± 5.40); Sal B could increase the contents of NO, NOS and VEGF in myocardial tissue. The number of MVC in the marginal zone of myocardial infarct in Sal B 3.2, 6.4 mg·kg⁻¹ groups (28.6 ± 5.86), (30.20 ± 5.07) was higher than that in the model group (15.60 ± 4.62). **Conclusion:** Sal B may promote angiogenesis of ischemic myocardium in the rats with myocardial ischemia. Its mechanism might be related to promoting the contents of VEGF and NO.

[Key words] Sal B; myocardial ischemia; angiogenesis; CD34; VEGF

[收稿日期] 20120407(005)

[基金项目] 国家科技部“十二五”重大新药创制科技重大专项(2011ZX09102-002-07)

[通讯作者] * 陈衡霞, Tel:13951624748, E-mail:hxc_fybjiy@126.com

血管生成 (angiogenesis) 是从现有的血管滋生出新血管的生物学行为,它和胚胎发育时的血管发生一样,在缺血性心脏病侧枝循环的建立和发展中起重要作用。通过药物或者一些生物因子对血管生成和血管发生进行调控和干预,促进缺血心肌血管新生,以增加侧枝循环来改善心功能的方法被称为“药物搭桥术”^[1],它已引起人们广泛重视,有望成为治疗缺血性心脏病的新途径。

丹酚酸 B (salvianolic acid B, Sal B) 是从中药丹参中提取的一种水溶性成分,是丹参中含量最高的酚酸类化合物,许多实验已经证明丹酚酸 B 具有抗心肌缺血作用^[2-3],但作用机制不明确,本文从 Sal B 对心肌缺血大鼠血管新生的影响来探讨 Sal B 抗心肌缺血的作用机制。

1 材料

1.1 动物 SD 大鼠,60 只,雌雄各半,180~220 g,由南京中医药大学实验动物中心提供,动物许可证号 SCXK(浙)2008-0033。

1.2 药物及试剂 Sal B(南京先慧医药工程研究所有限公司提供,纯度 $\geq 98\%$,批号 20110424);血管内皮生长因子 (VEGF, Sigma, 批号 110M1688v);一氧化氮试剂盒(南京建成,批号 20110910);一氧化氮合酶试剂盒(南京建成,批号 20110910);VEGF 酶联免疫检测试剂盒 (RD 公司, E11091601), Rabbit CD34 antibody(北京博奥森, BS-0646R)。

1.3 仪器 ALC-V8 动物呼吸机(上海奥尔特生物科技有限公司), XFD-H 匀浆机(宁波新芝生物科技股份有限公司), SPECTRA Max 190 酶标仪(美国, Molecular Device 公司), Olympus 倒置显微镜。

2 方法

2.1 大鼠心肌缺血模型的建立 SD 大鼠称重, 3% 戊巴比妥钠 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ip 麻醉。仰卧固定后, 进行气管插管, 连接呼吸机, 呼吸频率为 40 次/min, 潮气量为 $50 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 在胸骨左缘第 3~4 肋间, 分离膈肌, 进行切口, 暴露心脏弄破心包膜, 勾出心脏, 以左心耳与肺动脉圆锥交界处的左冠状动脉前降支为标志, 以 5/0, 弧 3/8 无损伤缝合针于左心耳下方 2 mm 处进针, 结扎后迅速将心脏放回, 心电图 II 导 ST 段抬高, 代表心肌缺血模型建立, 肋骨缝合后, 将膈肌和皮肤分别缝合。

2.2 分组 动物分为 6 组: Sal B 高、中、低剂量组: 造模后每日尾静脉注射 Sal B 6.4, 3.2, 1.6 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; VEGF 组: 手术方法同造模组, 在结扎冠状动脉后在缺血区域直接注射 VEGF 10 μg /只; 模型组: 造模后每日给予等量生理盐水; 假手术组: 手术方法

同造模组, 但在冠状动脉下穿线后不结扎, 常规饲养。各治疗组均于造模后 24 h 内开始药物干预, 2 周后处死, 进行各项指标的观察。

2.3 检测指标

2.3.1 心肌梗死面积 处死大鼠, 迅速取出心脏, 用生理盐水冲洗, 去除血渍, 剔除脂肪组织, 用滤纸吸干水分, 用 10% 甲醛固定, 常规石蜡包埋, 4 μm 切片, 苏木素-伊红 (HE) 染色, 显微镜下观察, 用 IPP 图像分析软件测量心肌梗死面积。

2.3.2 心肌组织中 NO, NOS 和 VEGF 含量 取出大鼠心脏用生理盐水洗净残留血液, 分离周围脂肪组织, 用生理盐水制成 10% 匀浆, $3\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 取上清 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 冻存, 备用。按照试剂盒操作说明书测定心脏匀浆中 NO, NOS 和 VEGF 的含量。

2.3.3 免疫组化检测心肌缺血区域 CD34 的表达

大鼠取出心脏后用生理盐水洗净残留血液, 分离周围脂肪组织, 在结扎缺血区域切取心肌组织, 10% 中性福尔马林液固定, 石蜡包埋, 制备 4 μm 组织切片, 一抗工作液浓度为 1:100, 染色后血管内皮细胞被染成棕黄色。微血管密度计数方法: ①组织内的血管经抗原抗体反应染色后, 先用低倍镜 40 倍扫视玻片, 寻找血管密度最高的区域, 称为“热点”(hot plot), 然后在高倍镜下 400 倍计数视野内被染色的血管数。②血管生成的判断: 任何被抗体染色的单个细胞或细胞团, 不管它是否形成管腔, 只要它与周围的血管、细胞和其他连接组织成分有一个清楚的分隔, 都认为是一个可计数的微血管。

2.4 统计学处理 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 16.0 软件包进行统计, 单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对心肌梗死面积的影响 实验结果显示, Sal B 3.2, 6.4 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 及 VEGF 组能使心肌梗死面积明显较少, 与模型组比较有明显差异 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 1。

表 1 丹酚酸 B 对心肌梗死面积的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	缺血面积/%
假手术	-	$1.20 \pm 0.21^{3)}$
模型	-	14.84 ± 5.40
丹酚酸 B	1.6	9.52 ± 2.43
	3.2	$7.18 \pm 3.15^{1)}$
	6.4	$5.74 \pm 2.02^{2)}$
VEGF ⁴⁾	10	$8.26 \pm 1.20^{1)}$

注: 与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$; ⁴⁾ VEGF 的剂量单位是 μg /只(表 2~3 同)。

3.2 对心肌组织中 NO, NOS 和 VEGF 含量的影响

Sal B 1.6 mg·kg⁻¹ 组心肌组织中 NO 含量与模型组比较明显升高 ($P < 0.05$); Sal B 3.2, 6.4 mg·kg⁻¹ 组心肌组织中 NO, NOS 和 VEGF 含量明显升高 ($P < 0.05$); VEGF 组使心肌组织中 NO 和 VEGF 含量与模型组比较明显升高 ($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 丹酚酸 B 对心脏匀浆中 NO, NOS 和 VEGF 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	NO /μmol·g ⁻¹	NOS /U·g ⁻¹	VEGF /ng·L ⁻¹
假手术组	-	0.42 ± 0.14 ¹⁾	51.16 ± 17.35 ²⁾	25.46 ± 14.12
模型	-	0.30 ± 0.05	26.88 ± 15.79	30.20 ± 19.67
丹酚酸 B	1.6	0.45 ± 0.09 ¹⁾	49.15 ± 17.04	41.12 ± 9.64
	3.2	0.49 ± 0.14 ¹⁾	51.64 ± 17.50 ¹⁾	67.57 ± 14.08 ¹⁾
	6.4	0.48 ± 0.14 ¹⁾	54.18 ± 17.14 ¹⁾	65.59 ± 26.76 ¹⁾
VEGF ⁴⁾	10	0.40 ± 0.04 ²⁾	48.18 ± 15.11	81.60 ± 15.38 ²⁾

3.3 心肌缺血区域 CD34 表达

免疫组化结果显示, 心肌缺血区域中模型组大鼠与假手术比较血管数明显增加 ($P < 0.001$), Sal B 3.2, 6.4 mg·kg⁻¹ 与模型组比较能使血管数明显增加 ($P < 0.01$); VEGF 组与模型组比较血管新生数明显增加 ($P < 0.01$)。见表 3, 图 1。

表 3 丹酚酸 B 对缺血和非缺血区域心肌微血管数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	微血管数/条
假手术	-	2.40 ± 1.14 ²⁾
模型	-	15.60 ± 4.62
丹酚酸 B	1.6	20.00 ± 2.92
	3.2	28.6 ± 5.86 ¹⁾
	6.4	30.20 ± 5.07 ¹⁾
VEGF ⁴⁾	10	31.00 ± 0.002 ¹⁾

4 讨论

机体在缺血、炎症、创伤等病理状态或外源因子诱导下可发生新生血管新生^[4]。这些新生的微血管主要是由内皮细胞构成的。所以利用内皮细胞的标志抗原可以反映微血管的生成情况。选择良好的血管内皮标记物计数微血管, 判定血管生成情况, 有助于治疗性血管新生方法的实施, 在所选的血管内皮标记物如 VIII 因子相关抗原, CD34 和 CD31 抗原中, 以 CD34 抗原特异性最高, CD34 抗原是一种高度糖基化 I 型跨膜蛋白, 它选择性的表达于人类造血干细胞, 祖细胞和血管内皮细胞的表面, 而且 CD34 在小血管内皮中都有表达。CD34 原为造血

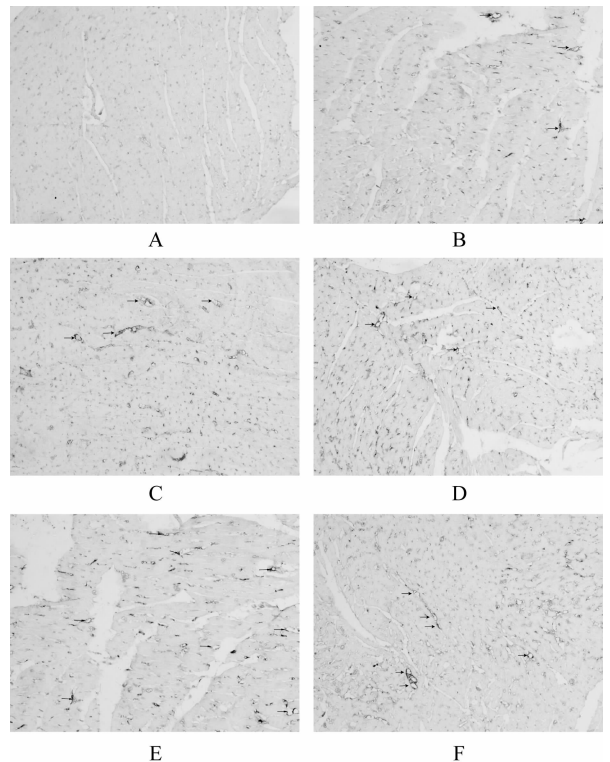


图 1 丹酚酸 B 对心肌缺血区域 CD34 表达的影响
(免疫组化, ×100)

干细胞抗原, 后来被证实可以在正常及新生的血管内皮细胞中表达, 为目前最敏感的血管标记物^[5]。所以实验中选择 CD34 作为标记物来检测心肌组织中新生的血管。

VEGF 是一种特异性的、与血管生长有关的生长因子, 它可以特异性的促进血管内皮细胞进行有丝分裂, 具有诱导新生血管生成的作用, 是目前发现的最重要的血管生长因子之一^[6-7], 被广泛应用于缺血性疾病的治疗。动物实验表明^[8], 在缺血心肌附近给予 VEGF, bFGF 等生长因子可促进梗死部位血管新生, 侧支循环形成, 改善心肌的供血供氧; 当内源性促血管生长因子不足的情况下, 给予外源性促血管生长物质, 如血管内皮生长因子、重组蛋白或基因, 可以扩大侧支循环的形成、增强血管再生、改善组织器官的灌注功能。目前研究表明许多中药复方或者单味药中的某一成分具有促进血管新生的能力, 可以通过提高 VEGF 及 VEGF 受体的表达, 促进缺血心肌原有侧支的开放和成长, 促进新的侧枝形成达到治疗心肌缺血的目的^[9], 实验结果显示 Sal B 给药组可以使心肌组织和血清中 VEGF 的含量增

加,所以 Sal B 可以通过增加内源性 VEGF 从而促进心肌缺血区域血管新生,增加缺血区域的供血供氧。

NO 在血管生成过程中发挥其重要的作用^[10], NO 能调节内皮细胞的生长,迁移和管腔形成,同时也是血管生成的一个重要的调节因子^[11],NO 能通过参与 VEGF 的血管生成作用机制来参与血管的新生作用,NO 能诱导 VEGF 的合成^[12],内源性的 NO 能诱导血管平滑肌合成 VEGF。VEGF 也可以上调 eNOS 的表达,从而刺激产生 NO^[13]。NO 在 VEGF 介导的血管形成过程中起着重要的作用,机制可能为 VEGF 在促血管早期 NO 生成增加,使微血管扩张,内皮拉长、伸展,促进血管内皮有丝分裂和移行,促进血管的进一步形成。

实验结果表明,Sal B 连续给药 2 周后能减小心肌的梗死面积,并且能促进心肌缺血后大鼠缺血心肌血管新生的作用,其作用机制可能与上调 VEGF 的表达有关,正是通过对 VEGF 蛋白的调节,从而使 VEGF 释放增加,起到促进血管新生的作用。

[参考文献]

[1] 胡晓红,朱亚彬,刘志勇. 缺血性心脏病的药物搭桥术[J]. 铁道医学,1999,27(3):204.
 [2] 高枫,孙桂波,任小宁,等. 丹酚酸 B 对大鼠离体心脏缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国中药杂志,2012,37(3):358.
 [3] 张良,袁冬平,徐立,等. 丹酚酸 B 对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用机制研究[J]. 中药新药与临床药理,2008,19(6):467.
 [4] 许波华,许立. 中药抗心肌缺血作用机制的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(15):265.

[5] Ruck, Xiao J C, Kaiserling E. Immunoreactivity of sinusoids in hepatocellular carcinoma [J]. Arch Pathol Lab Med,1995,119:173.
 [6] 陈萌,娄利霞,吴爱明,等. 活血益气方及其拆方药物血清对 VEGF₁₆₅ 转染脐静脉内皮细胞分泌 MMP-9, MMP-2 的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(2):156.
 [7] Yan C, Davis G. Vascular specific growth factor and blood vessel formation [J]. Nature,2000,407:242.
 [8] 张晓东,李若凡,杨占军,等. VEGF 在实验性心肌梗死中促血管生成的实验研究[J]. 中国临床解剖学杂志,2001,19(2):167.
 [9] 王振涛,曹生海,张淑娟. 中医药促冠心病缺血心肌血管新生的研究摘要[J]. 中医药学刊,2005,23(1):67.
 [10] Ziche M, Morbidelli L, Choudhuri R, et al. Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis [J]. J Clin Invest, 1997, 99:2625.
 [11] Pohl, Busse R. Hypoxia stimulates release of endothelium-derived relaxant factor [J]. Am J Physiol, 1989,256:H1595.
 [12] Dulak J, Jozkowicz A, Dembinska Kiec A, et al. Nitricoxide induces the synthesis of vascular endothelial growth factor by rat vascular smooth muscle cells[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,2000,20:659.
 [13] Hood J D, Meininger C J, Ziche M, et al. VEGF upregulates eNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells [J]. Am J Physiol, 1998, 274:1054.

[责任编辑 聂淑琴]