

大黄蛭虫丸对异丙肾上腺素诱导大鼠心肌纤维化的影响

宋金燕, 刘俊田*, 庞晓明, 毛俊俊, 王淑跃, 吴迪
(西安交通大学医学院药理学系, 西安 710061)

[摘要] **目的:**探讨大黄蛭虫丸抗心肌纤维化作用及其初步机制。**方法:**50 只 SD 大鼠随机分为正常对照组, 模型对照组, 阳性对照组, 大黄蛭虫丸高、低剂量组。除正常对照组外, 其他 4 组大鼠背部皮下注射异丙肾上腺素 (Iso) $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 连续 10 d, 建立大鼠心肌纤维化模型。造模同时阳性对照组按照每日 $1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量灌胃给予丹参, 大黄蛭虫丸高、低剂量组分别按照每日 $3.2, 1.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量灌胃给药, 每天 1 次, 连续 28 d。正常对照组和模型对照组给予等体积的生理盐水。观察大黄蛭虫丸对大鼠心脏指数, 心肌病理学变化, 心肌组织中羟脯氨酸 (Hyp) 含量, 超氧化物歧化酶 (SOD) 活性, 丙二醛 (MDA) 含量等的影响。**结果:**与正常对照组比较, 模型对照组心脏指数增加, 心肌组织出现明显的胶原纤维增生, 心肌组织 Hyp 含量明显增高, 胶原容积积分 (CVF) 与血管周围胶原面积/血管腔横断面积 (PVCA) 显著升高 ($P < 0.01$), SOD 活性下降, MDA 含量增高 ($P < 0.05$)。与模型对照组相比, 大黄蛭虫丸高、低剂量组心肌纤维化病变减轻, 心肌组织 Hyp 含量下降, CVF, PVCA 减小 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), SOD 活性与 MDA 含量无明显变化。**结论:**大黄蛭虫丸能够抑制心肌纤维化的发生发展, 逆转心肌重构, 但该作用可能与抗脂质过氧化作用无关。

[关键词] 大黄蛭虫丸; 心肌纤维化; 异丙肾上腺素; 羟脯氨酸

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)13-0169-04

Effect of Dahuang Zhechong Pill on Myocardial Fibrosis Induced by Isoprenaline in Rats

SONG Jin-yan, LIU Jun-tian*, PANG Xiao-ming, MAO Jun-jun, WANG Shu-yue, WU Di

(Department of Pharmacology, Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

[Abstract] **Objective:** To study the protective effects of Dahuang Zhechong Pill (DHZCP) on myocardial fibrosis induced by isoprenaline (Iso) in rats. **Method:** Fifty SD rats were divided into 5 groups randomly: normal control, model control, positive control (Danshen, $1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), low and high doses of DHZCP ($1.6, 3.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$). Myocardial fibrosis model was established by subcutaneous injection of $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Iso in rats for 10 days except normal control rats. The drugs were administered intragastrally to rats for 28 days. The histopathological change was examined, and level of hydroxyproline and malondialdehyde (MDA) as well as superoxide dismutase (SOD) activity were determined in the myocardial tissue. **Result:** The results showed that heart index, level of hydroxyproline and MDA, collagen volume fraction (CVF), perivascular collagen area (PVCA) were increased, and SOD activity was reduced in myocardial tissue of model rats in comparison with normal rats. The histopathological examination showed that there was a significant collagen proliferation and myocardial fibrosis. However, DHZCP improved and reversed the changes induced by Iso. **Conclusion:** DHZCP is able to reverse the myocardial fibrosis induced by Iso and to improve ventricular remodeling in rats, which may not related to antioxidative effect.

[Key words] Dahuang Zhechong pill; myocardial fibrosis; isoprenaline; hydroxyproline

[收稿日期] 20120112(013)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30572347)

[第一作者] 宋金燕, 在读硕士, 从事心血管药理学研究, Tel: 13659297251, E-mail: gina.song@hotmail.com

[通讯作者] * 刘俊田, 教授, 博士生导师, 从事心血管药理学研究, Tel: 029-82655188, E-mail: ljt@xjtu.edu.cn

心肌纤维化(myocardial fibrosis)是指在心肌细胞外基质中胶原纤维的过量聚集、胶原含量过度升高或胶原成分发生改变。心肌纤维化可导致充血性心力衰竭、恶性心律失常和猝死,成为心室重构持续发展和难于逆转的重要原因^[1]。因此,加强对心肌纤维化的研究及防治具有重要的临床意义。祖国传统中药具有多靶点、多途径、持续有效的特点,在抗心肌纤维化方面有自己的优势^[2]。诸多临床研究发现,中医药在改善心肌纤维化方面疗效独特。从我国中医药宝库中寻找有效中药复方,结合中医理论,中西药联合治疗心肌纤维化将会为患者带来福音。本研究观察了大黄蛰虫丸对心肌纤维化的影响及其初步机制。

1 材料

1.1 动物 SD 大鼠 60 只,雌雄各半,体重 200 ~ 250 g,SPF 级,购自西安交通大学医学院实验动物中心。许可证号 SCXK(陕)2010-002。

1.2 药品与试剂 盐酸异丙肾上腺素(isoprenaline, Iso),Sigma 公司,批号 000051309,大黄蛰虫丸,西安正大制药有限公司,批号 100505,丹参购于陕西广济大药房,经西安交通大学医学院药理学天然药物化学教研室王军宪教授鉴定为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge 的干燥根。取丹参 100 g 用 5 000 mL 蒸馏水分 2 次煎煮,合并 2 次滤液浓缩至 100 mL,得 1 g·mL⁻¹丹参水煎液。羟脯氨酸(Hyp),超氧化物歧化酶(SOD),及丙二醛(MDA),检测试剂盒,由南京建成生物工程研究所提供,批号 20100321。

1.3 仪器 960 全自动酶标仪(美国 Metertech 公司)。721 型可见分光光度计(上海棱光科学仪器公司),超薄石蜡切片机(瑞典 LKB 公司),组织匀浆机(德国 IKA 公司),Image-Pro Plus Version 6.0 图像分析仪(美国 Media Cybernetes 公司)。

2 方法

2.1 心肌纤维化动物模型的制备 大鼠背部皮下注射 Iso 5 mg·kg⁻¹·d⁻¹,连续 10 d,自由进食进水,对照组注射相同体积的生理盐水。

2.2 分组与给药 大鼠随机分为 5 组,正常对照组,模型对照组,阳性对照组,大黄蛰虫丸高、低剂量组。每组 10 只。除正常对照组外,其余各组在造模的同时灌胃给药,每天 1 次,连续 28 d。阳性对照组给予丹参 1 g·kg⁻¹,大黄蛰虫丸低剂量组和高剂量组分别给予大黄蛰虫丸 1.6 g·kg⁻¹和 3.2 g·kg⁻¹,

正常对照组和模型对照组给予等体积的生理盐水。

2.3 标本的采集与制备 实验结束时,用 20% 乌拉坦溶液 1 mL·100 g⁻¹腹腔注射麻醉大鼠,剪开胸腔,取出心脏,以 4 °C 预冷的生理盐水冲洗,滤纸吸干水分,称取质量作为心脏质量。在近心尖部约 6 mm 处取左心室组织,常规固定,制备病理切片。再从左心室纵取约 100 mg 心肌组织,保存于 -20 °C 冰箱中,以备检测心肌 Hyp 浓度。另取剩余左心室组织约 150 mg,保存于 -20 °C 冰箱中,用于测定心肌 MDA 含量和 SOD 活性。

2.4 检测指标

2.4.1 组织病理学与心肌纤维化检测 大鼠心肌组织用 10% 甲醛固定,经脱水、石蜡包埋和切片(4 μm),分别进行苏木精伊红(HE)染色和 MASSON 胶原特异染色。观察大鼠心肌普通病理,测定心肌间质胶原容积分数(collagen volume fraction, CVF)、血管周围胶原面积/血管腔横断面积(perivascular collagen area, PVCA)。CVF 为胶原面积与心肌总面积的比值,其中胶原面积不包括血管周围胶原面积,随机分析 5 个视野,取其均值。PVCA 为每一个标本测量 3 支横切面的壁内小动脉的周围胶原面积与管腔面积的比值,取其均值。以 Image-Pro plus 图像分析软件自动计算完成。

2.4.2 心肌组织 Hyp, MDA 含量和 SOD 活性测定 取 100 mg 左心室心肌组织,用碱水解法,按照试剂盒说明在 550 nm 波长用分光光度法测定心肌组织 Hyp 含量。另取左心室心肌组织 150 mg,在冰浴下制成 5% 组织匀浆,4 °C 条件下 4 000 r·min⁻¹离心 15 min,取上清液按照试剂盒说明书操作。组织蛋白含量采用考马斯亮蓝法测定,SOD 活性采用黄嘌呤氧化酶法测定,MDA 含量采用硫代巴比妥比色法测定。

2.5 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件处理数据,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析与秩和检验。 $P < 0.05$ 为有统计意义。

3 结果

3.1 对心肌纤维化大鼠心脏指数的影响 与正常对照组比较,模型对照组心脏指数升高($P < 0.01$),表明 Iso 能促进心肌胶原纤维增生,使心脏质量增加;与模型对照组比较,阳性对照组和大黄蛰虫丸高、低剂量组心脏指数均有不同程度降低($P < 0.05$),其中以大黄蛰虫丸高剂量组降低最为明显($P < 0.01$)。见表 1。

表1 大黄蛰虫丸对心肌纤维化大鼠心脏指数和心肌 Hyp 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 9 \sim 10$)

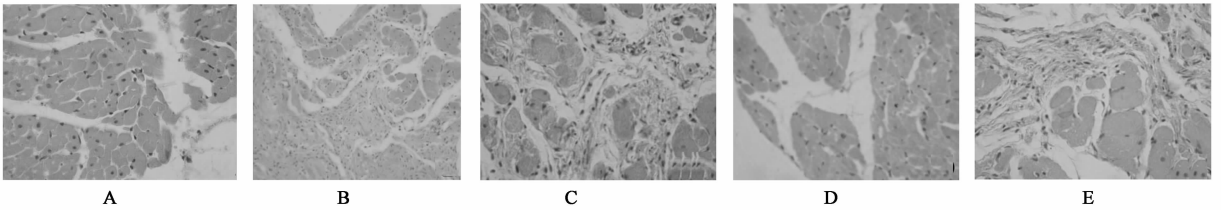
组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	心脏指数/ $mg \cdot g^{-1}$	Hyp/ $\mu g \cdot g^{-1}$
对照	-	3.34 ± 0.12 ²⁾	404 ± 15.4 ²⁾
模型	-	3.88 ± 0.09	595 ± 30.9
大黄蛰虫丸	3.2	3.45 ± 0.10 ²⁾	490 ± 25.1 ¹⁾
	1.6	3.53 ± 0.14 ¹⁾	524 ± 28.9 ¹⁾
丹参	1.0	3.48 ± 0.07 ¹⁾	515 ± 10.9 ¹⁾

注:与模型对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表2~3同)。

3.2 对心肌纤维化大鼠心肌 Hyp 含量的影响 模型对照组大鼠心肌组织中 Hyp 含量显著高于正常对照组($P < 0.01$);阳性对照组和大黄蛰虫丸高、低

剂量组心肌组织中 Hyp 含量明显低于模型对照组($P < 0.05$),其中以大黄蛰虫丸高剂量组降低最为明显。见表1。

3.3 大黄蛰虫丸对心肌组织病理学变化的影响 大鼠皮下注射异丙肾上腺素 10 d 后出现明显的心肌纤维化改变,病理切片显示血管周围和心肌细胞间有大量纤维组织增生,心内膜处心肌细胞有不同程度的坏死,局部由增生的纤维组织取代,表现为局部心肌间质增宽,胶原纤维增生。与模型对照组比较,阳性对照组和大黄蛰虫丸高、低剂量组心内膜下纤维化病灶多数比较局限,程度较轻,表明大黄蛰虫丸可以减轻异丙肾上腺素诱导的心肌纤维化,见图1,图2。



A. 对照; B. 模型; C. 丹参; D. 3.2 $g \cdot kg^{-1}$ 大黄蛰虫丸; E. 1.6 $g \cdot kg^{-1}$ 大黄蛰虫丸(图2同)

图1 大黄蛰虫丸对心肌组织病理学变化的影响(HE染色, ×200)

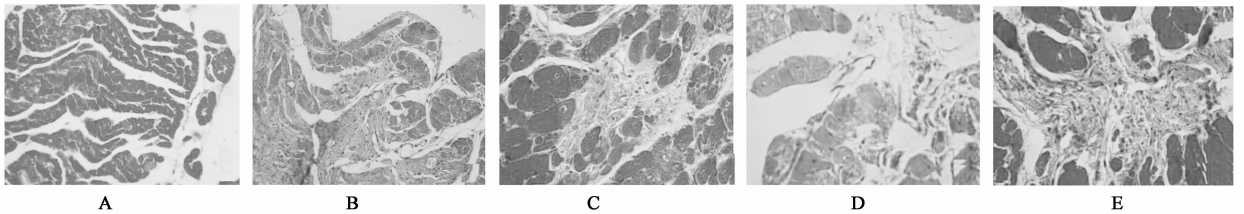


图2 大黄蛰虫丸对心肌组织病理学变化的影响(MASSON染色, ×200)

3.4 对心肌纤维化大鼠 CVF 和 PVCA 的影响 模型对照组大鼠 CVF 和 PVCA 均显著高于正常对照组($P < 0.01$)。与模型对照组相比,阳性对照组和大黄蛰虫丸高、低剂量组 CVF 及 PVCA 均有显著减小($P < 0.01$)。结果见表2。

表2 大黄蛰虫丸对心肌纤维化大鼠 CVF 和 PVCA 的影响($\bar{x} \pm s, n = 9 \sim 10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	CVF/%	PVCA/%
对照	-	2.79 ± 0.43 ²⁾	4.70 ± 1.02 ²⁾
模型	-	13.78 ± 1.24	29.95 ± 1.59
大黄蛰虫丸	3.2	6.75 ± 0.84 ²⁾	7.37 ± 0.41 ²⁾
	1.6	7.75 ± 0.72 ²⁾	6.98 ± 0.54 ²⁾
丹参	1.0	9.25 ± 0.88 ²⁾	11.59 ± 1.71 ²⁾

3.5 大黄蛰虫丸对心肌纤维化大鼠心肌 MDA 含量和 SOD 活性的影响与正常对照组比较,模型对照组大鼠心肌组织 MDA 含量增加, SOD 活性降低($P < 0.05$);然而,阳性对照组 MDA 含量下降, SOD

活性增高($P < 0.05$);但是大黄蛰虫丸高、低剂量组 MDA 含量和 SOD 活性与模型对照组相比无明显变化。见表3。

表3 大黄蛰虫丸对心肌纤维化大鼠心肌 SOD 活性和 MDA 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 9 \sim 10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	SOD/ $U \cdot mg^{-1}$	MDA/ $nmol \cdot mg^{-1}$
对照	-	30.46 ± 1.59 ¹⁾	3.10 ± 0.25 ¹⁾
模型	-	21.50 ± 3.75	4.35 ± 0.33
大黄蛰虫丸	3.2	22.29 ± 1.63	4.10 ± 0.22
	1.6	23.40 ± 2.17	3.86 ± 0.13
丹参	1.0	30.99 ± 4.50 ¹⁾	3.44 ± 0.22 ¹⁾

4 讨论

已有资料表明^[3-4], Iso 作为 β 受体激动剂,可以增加心肌收缩力和收缩频率,还可促进糖原合成增加,从而促进心肌细胞总蛋白和非收缩蛋白合成,导致心肌细胞肥大,胶原纤维增生。连续给予大鼠 Iso,可引起大鼠心肌肥厚和心肌纤维化。本实验结

果发现,模型对照组大鼠心脏指数、心肌 Hyp 含量、CVF 和 PVCA 均显著高于正常对照组,而且病理学检查可见有大量胶原纤维增生,表明用 Iso 建立大鼠心肌纤维化模型成功。该造模方法简便、经济,所需时间短,并且成功率高。

研究表明^[5-6],丹参可以减轻大鼠心肌纤维化,故本实验以丹参作为阳性对照药物。

组织病理学检查显示,大黄蛰虫丸可以抑制大鼠心肌胶原纤维增生,减轻心肌纤维化程度。Hyp 含量的高低在心肌纤维化的评定中有重要意义。正常状态下 Hyp 在胶原蛋白中占 13.4%,测定心肌 Hyp 的含量,可特异性反映心肌胶原蛋白的含量,从而判断心肌间质细胞增殖和纤维增生的程度。CVF 和 PVCA 则是从形态学上定性分析心肌间质纤维化和血管周围纤维化程度,被认为是一个与心功能相关性最为密切的心肌纤维化指标^[7-8]。本研究从生化检测(Hyp 的含量)和形态学分析两方面均表明,大黄蛰虫丸均能减少心肌组织胶原含量,证明大黄蛰虫丸可以抑制心肌间质细胞产生胶原蛋白,减轻心肌纤维化的发展,从而改善心肌重构。

有研究显示大量氧自由基生成及脂质过氧化反应也是促进心肌纤维化发展的主要参与因素^[9]。在本研究中我们发现,模型对照组大鼠心肌组织 SOD 活性显著下降,MDA 含量明显升高,而阳性对照药丹参可增高 SOD 活性,减少 MDA 含量,具有抗脂质过氧化作用,这与文献报道一致^[10]。但是,大黄蛰虫丸高、低剂量组 SOD 活性和 MDA 含量与模型对照组相比无明显差异,表明大黄蛰虫丸对抗心肌纤维化作用可能与抗脂质过氧化作用和清除自由基无关。

大黄蛰虫丸为汉·张仲景《金匮要略》收录的活血破瘀名方^[11],近年来主要用于治疗肝硬化,肝炎,乳腺增生等,临床疗效显著^[12-14]。本课题组经过几年来对大黄蛰虫丸的研究,发现此方用于抗动脉粥样硬化效果显著^[15-17],而心肌纤维化、肝硬化、肝炎、乳腺增生与动脉粥样硬化同属中医瘀血阻滞之范畴,结合本研究结果,推测临床应用大黄蛰虫丸治疗心肌纤维化可能有较好疗效。但是其作用机制尚不清楚,有待进一步探讨。

【参考文献】

[1] Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling [J]. *Physiol Rev*, 1999, 79 (1):215.
[2] 贾旭荣,何汉康,陈舒. 中西医结合治疗心衰疗效的临床观察 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16

(5):142.

[3] Ocaranza M P, Diaz-Araya G, Chiong M, et al. Isoproterenol and angiotensin I converting enzyme in lung, left ventricle, and plasma during myocardial hypertrophy and fibrosis [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2002, 40(2):46.
[4] 王秋红,匡海学,吴伦,等. 二氢槲皮素对异丙肾上腺素致大鼠心肌缺血的保护作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(17):178.
[5] 龚丽娅,郑智,熊玮,等. 丹参预防自发性高血压大鼠左心室肥厚 [J]. *高血压杂志*, 2003, 11(3):257.
[6] 唐忠志,郑智,唐瑛,等. 丹参对自发性高血压大鼠心肌纤维化的逆转作用及其机制研究 [J]. *J Med Coll PLA*, 2002, 31(3):292.
[7] Salazar B L, Albeniz S, Guedon T A, et al. Altered fibrillar collagen metabolism in hypertensive heart failure. Current understanding and future Prospects [J]. *Rev Esp Cardiol*, 2006, 59(10):1047.
[8] 周迎春,刘彬,王娇,等. 桃红四物汤对大鼠心肌梗后心肌间质胶原重构的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(13):152.
[9] Takizawa T, Gu M, Chobanian A V, et al. Effect of nitric oxide on DNA replication induced by angiotensin II in rat cardiac fibroblasts [J]. *Hypertension*, 1997, 30(5):1035.
[10] 邹昌群,占成业,白祥军. 丹参酮 II_A 抗心肌纤维化作用机制实验研究 [J]. *内科急危重症杂志*, 2008, 14(5):242.
[11] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 上海:上海科技出版社, 1997:102.
[12] 程木华,潘志恒,许杰华,等. 探讨大黄蛰虫丸治疗肝硬化的作用 [J]. *中华实用中西医杂志*, 2005, 18(1):6.
[13] 陈瑞领. 逍遥丸联合大黄蛰虫丸对乙型肝炎肝纤维化的疗效观察 [J]. *医药论坛杂志*, 2009, 15(11):28.
[14] 焦乃军. 大黄蛰虫丸穴位贴敷治疗乳腺增生病 100 例 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(12):293.
[15] 李静莉,刘俊田,苟伟,等. 大黄蛰虫丸对动脉粥样硬化机理研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2006, 12(5):32.
[16] 李静莉,刘俊田,苟伟,等. 大黄蛰虫丸对动脉粥样硬化模型家兔血管平滑肌细胞的影响 [J]. *中成药*, 2006, 28(10):1470.
[17] 姬媛媛,刘俊田,李静莉,等. 大黄蛰虫丸拆方对动脉粥样硬化家兔血管平滑肌细胞增殖与凋亡的影响 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2006, 26(10):913.

【责任编辑 何伟】