

芪参益气滴丸对心肌梗死大鼠心肌的保护作用

杨雷,毛秉豫*

(南阳理工学院张仲景国医学院,河南 南阳 473004)

[摘要] 目的:探讨芪参益气滴丸对心肌梗死大鼠心肌的保护作用及其机制。方法:成功构建大鼠心肌梗死模型后,随机分为模型组、氟伐他汀对照组、芪参益气滴丸 3 个不同剂量组各 12 只,另设假手术组 12 只。芪参益气滴丸组分别给予低、中、高剂量(15,30,45 mg·kg⁻¹·d⁻¹ig);氟伐他汀组(30 mg·kg⁻¹·d⁻¹ig);模型组和假手术组生理盐水(30 mL·kg⁻¹·d⁻¹ig)。8 周后测定血清中乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸磷酸激酶(CPK)和心肌组织中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)活性及还原型谷胱甘肽(GSH)含量;应用 HE 染色分析心肌细胞组织形态学变化;并应用免疫组化法检测心肌毛细血管密度变化,采用 TUNEL 试剂盒检测心肌细胞凋亡。结果:模型组大鼠血清中 LDH、CPK 活性均明显高于假手术组($P<0.05$)和芪参益气滴丸组($P<0.05$)及氟伐他汀组($P<0.05$),各治疗组间无统计学差异;而心肌组织中 SOD、CAT、GPx 活性和 GSH 的含量,模型组均明显低于假手术组($P<0.05$)和各治疗组($P<0.05$),芪参益气滴丸高剂量组明显高于氟伐他汀组($P<0.05$)。模型组心肌细胞肥大增生明显,而芪参益气滴丸和氟伐他汀组细胞肥大程度明显降低。免疫组化分析表明,和假手术组相比,模型组毛细血管密度略显升高,芪参益气滴丸组和氟伐他汀组新生毛细血管明显增多,密度显著增加($P<0.05$)。芪参益气滴丸组和氟伐他汀组心肌细胞凋亡指数(AI)显著低于模型组($P<0.05$)。结论:芪参益气滴丸可有效对抗大鼠心肌梗死后氧化应激反应、促进心肌毛细血管增生、保持心肌细胞密度、减轻心肌细胞凋亡,从而对梗死大鼠心肌起到较好的保护作用。

[关键词] 芪参益气滴丸;心肌梗死;氧化应激;凋亡
[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)05-0167-05

Protection of Qisheng Yiqi Pills on Rats with Myocardial Infarction

YANG Lei, MAO Bing-yu*

(Zhang Zhong-jing Traditional Chinese Medicine College, Nanyang Institute of Technology, Nanyang 473004, China)

[Abstract] **Objective:** To study the protection of Qisheng Yiqi pills on rats with myocardial infarction (MI). **Method:** Left coronary artery of Sprague-Dawley rats were ligated to make MI model. The rats were randomly subjected to MI model group, three different Qisheng Yiqi pills dose (15, 30, 45 mg·kg⁻¹·d⁻¹) groups, fluvastatin control group (30 mg·kg⁻¹·d⁻¹) and sham-operated group, each group consisted of 12 rats. The MI group and normal control group were fed 0.9% sodium chloride 30 mL·kg⁻¹·d⁻¹. Eight weeks later, the rats were sacrificed, blood was collected, and the serum separated was used for assaying the activity of lactate dehydrogenase (LDH) and creatine phosphokinase (CPK). Immediately after the sacrifice, the heart was excised and homogenized. The homogenate was used for assaying the activity of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione-peroxidase (GPx), and glutathione (GSH). Segmental heart samples were used for hematoxylin and eosin stain and histological evaluation. For measurement of capillary density, sections were immunohistochemically stained with a specific primary antibody. Capillary density was defined as the capillary to cardiomyocyte ratio. Apoptosis was determined using TUNEL kit. **Result:** Compared with the Sham-operated

[收稿日期] 2011-08-29
[基金项目] 河南省重点科技攻关项目(112102310351)
[第一作者] 杨雷,医学博士,讲师,从事中药抗心血管疾病预防发病机制研究,E-mail: yanglei200609@126.com
[通讯作者] *毛秉豫,医学博士,教授,主任医师,硕士生导师,从事心血管疾病的气血并治方药研究,E-mail: maobingyu2005@126.com

group, Qisheng Yiqi pills and fluvastatin group, the activities of marker enzymes, LDH, CPK in the serum of the MI group were significantly increased ($P < 0.05$). While the activities of SOD, CAT, GPx and GSH in the heart of MI group were significant decreased than the normal control group, Qisheng Yiqi pills and fluvastatin group ($P < 0.05$), compared with sham operated mice, the MI group indicated compensatory cardiac hypertrophy, and the capillary density was significantly decreased ($P < 0.05$). While in the Qisheng Yiqi pills group, the capillary density was significantly increased ($P < 0.05$) and the number of TUNEL positive cells was significantly lower than the MI group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Qisheng Yiqi pills can significantly reduce myocardial damage, counteract the oxidative stress induced by myocardial infarction in rats, increase microvessel density, and decrease cardiomyocyte apoptosis.

[**Key words**] Qisheng Yiqi pills; myocardial infarction; oxidative stress; apoptosis

心肌梗死可引发严重的心肌缺血而导致患者的死亡率明显增加,因缺血引发的病理学变化较为复杂,活性氧的大量积聚在这一过程中起着重要作用,可破坏细胞膜稳定性,使之通透性增加,细胞内活性酶成份大量释放,并引发心肌细胞 DNA 断裂,导致细胞凋亡和坏死,故对氧自由基的清除已被作为治疗心肌梗死的有效干预措施之一^[1]。同时,心肌梗死可促使心肌细胞肥大增生、毛细血管密度降低,进而导致心室重构、心力衰竭等一系列严重后果的发生^[2]。芪参益气滴丸由黄芪、丹参、三七、降香等配伍组成,诸药合用益气活血、通络止痛,祛瘀而不伤正,目前已被应用于心肌梗死二级预防,取得较好疗效^[3-5]。为研究该药对心肌损伤的保护作用,本实验研究通过构建心肌梗死大鼠模型,以氟伐他汀做为阳性对照,观察芪参益气滴丸在心肌梗死后清除氧自由基、促进毛细血管生成、减轻心肌细胞肥大增生和凋亡的作用,并对其作用机制进行初步探讨。

1 材料

1.1 动物与分组 SD 雄性大鼠,体重(250 ± 50) g, 8 周龄,清洁级,上海史来克实验动物中心提供,合格证号 SCXK(沪)2007-003。大鼠采用标准饲养方式,明暗环境各 12 h 交替。在心梗模型制作成功并存活 48 h 后,将大鼠随机分为模型组,芪参益气滴丸低、中、高剂量组,氟伐他汀组,每组各 12 只。另设 12 只为假手术组。

1.2 药物与试剂 芪参益气滴丸(天士力药业集团,批号 20030139),氟伐他汀为 HPLC 级(Sigma 公司,美国),乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸磷酸激酶(CPK)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)、谷胱甘肽(GSH)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所),抗 vWF 因子抗体(NeoMarkers 公司,美国),TUNEL 检测试剂盒(Roche 公司,德国),其他试剂为国产分

析纯。

1.3 仪器 低温冷冻离心机(美国 Beckman 公司),IX71 倒置显微镜(日本 Olympus 公司),AMS-18 全自动生化分析仪(北京奥普森公司),T10 组织匀浆机(德国 IAK 公司),FACSCanto II 流式细胞仪(美国 BD 公司)。

2 方法

2.1 造模及给药 心肌梗死模型的建立参照文献[5]。假手术组只在左冠状动脉前降支相应部位挂线而不结扎。各组分笼饲养,给予常规饲料和饮水。术后 48 h 开始芪参益气滴丸组 15, 30, 45 mg · kg⁻¹ · d⁻¹、氟伐他汀组 30 mg · kg⁻¹ · d⁻¹、对照组和假手术组生理盐水 30 mL · kg⁻¹ · d⁻¹,均 ig,每天上午 9 时给药。每周称体重调整剂量,连续 8 周。

2.2 生化指标检测

2.2.1 血清 LDH,CPK 检测 给药 8 周后,所有大鼠处死,收集全血,分离血清,全自动生化分析仪检测 LDH,CPK 的活性。

2.2.2 心肌组织 SOD,CAT,GPx 活力和 GSH 含量检测 处死后的大鼠心脏立刻使用 0.9% 氯化钠冰溶液冲洗,参照文献[5],沿室间隔剪去右心室。取部分心肌制成组织匀浆,检测心肌 SOD,CAT,GPx 活性和 GSH 含量。

2.3 心肌细胞形态学变化分析

2.3.1 心肌形态学观察 取左心室组织,4% 多聚甲醛溶液固定,石蜡包埋,制成厚 3 μm 切片,HE 染色,进行心肌细胞形态学观察。

2.3.2 毛细血管密度检测 采用免疫组化法,抗体为抗 vWF 因子抗体,1:100 稀释,毛细血管密度为毛细血管和心肌细胞比值。

2.3.3 心肌细胞凋亡指数测定 采用 TUNEL 法,根据试剂盒说明书进行操作,细胞核染成棕黄色者为阳性凋亡细胞,每张切片在高倍光镜下随机取无

重叠 5 个视野,计算每个视野的凋亡阳性心肌细胞数和心肌细胞总数^[5]。计算心肌细胞凋亡指数(AI)。

AI = 凋亡细胞数/心肌细胞总数 × 100%

2.4 统计学处理 使用 SPSS 16.0 统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 动物一般情况 在实验 8 周内 72 只大鼠中有 5 只死亡,其中模型组 3 只,芪参益气滴丸低剂量组 1 只,假手术组 1 只。最终获取完整资料的大鼠共 67 只。模型组大鼠术后食欲减退,皮毛光泽度下降,神态疲倦,活动减少。芪参益气滴丸组和氟伐他汀组大鼠用药后一般情况有好转,较前活泼。假手术组大鼠活动、进食基本正常。

3.2 血清 LDH 和 CPK 活性测定 模型组 LDH 和 CPK 活性与假手术组、芪参益气滴丸组及氟伐他汀组相比明显增加($P < 0.05$),芪参益气滴丸各剂量组与氟伐他汀组相比较均无统计学差异。所有数据

均重复测定 3 次,见表 1。

表 1 芪参益气滴丸对大鼠血清 LDH,CPK 活性的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量		LDH		CPK	
	/mg·kg ⁻¹	n	/U·mL ⁻¹		/U·mL ⁻¹	
芪参益气滴丸	15	11	84.37 ± 8.41 ¹⁾		24.87 ± 2.45 ¹⁾	
	30	12	75.23 ± 5.54 ¹⁾		24.12 ± 2.57 ¹⁾	
	45	12	67.87 ± 2.19 ¹⁾		20.73 ± 1.98 ¹⁾	
氟伐他汀	30	12	75.89 ± 4.54 ¹⁾		24.11 ± 2.36 ¹⁾	
模型	-	9	137.24 ± 10.89		47.96 ± 4.28	
假手术	-	11	77.06 ± 7.43 ¹⁾		22.49 ± 2.27 ¹⁾	

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

3.3 心肌抗氧化剂活性测定 模型组心肌组织中 SOD,CAT,GPx 活力和 GSH 含量均低于假手术组、氟伐他汀组和芪参益气滴丸组($P < 0.05$),芪参益气滴丸组高剂量组 GPx 活力和 GSH 含量均明显高于氟伐他汀组($P < 0.05$),所有数据均重复测定 3 次,见表 2。

表 2 芪参益气滴丸对大鼠心肌抗氧化活性的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	n	GPx/U·g ⁻¹	GSH/mmol·L ⁻¹	SOD /U·g ⁻¹	CAT / U·g ⁻¹
芪参益气滴丸	15	11	13.13 ± 4.06 ¹⁾	1.47 ± 0.20 ¹⁾	8.67 ± 0.57 ¹⁾	19.94 ± 2.01 ¹⁾
	30	12	17.19 ± 1.3 ¹⁾	2.51 ± 0.57 ¹⁾	10.39 ± 0.33 ¹⁾	23.33 ± 2.35 ¹⁾
	45	12	20.56 ± 1.73 ²⁾	2.72 ± 0.20 ²⁾	10.42 ± 0.42 ¹⁾	23.49 ± 2.33 ¹⁾
氟伐他汀	30	12	13.05 ± 4.49 ¹⁾	1.45 ± 0.18 ¹⁾	10.40 ± 0.89 ¹⁾	23.46 ± 1.81 ¹⁾
模型	-	9	8.90 ± 1.64	0.89 ± 0.14	4.69 ± 0.37	13.41 ± 1.22
假手术	-	11	16.85 ± 1.38 ¹⁾	2.55 ± 0.21 ¹⁾	10.23 ± 0.63 ¹⁾	23.75 ± 1.80 ¹⁾

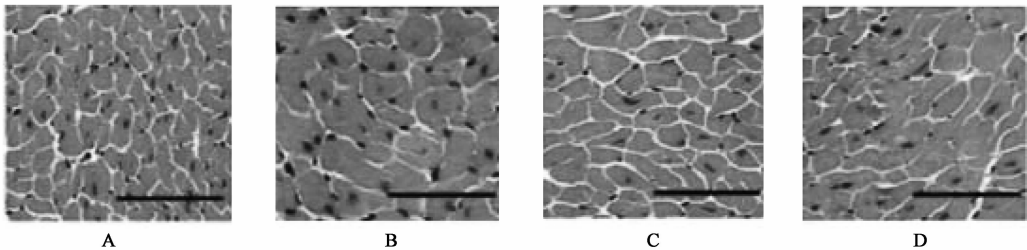
注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$;与氟伐他汀组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 3 同)。

3.4 心肌细胞形态学观察

3.4.1 对大鼠心肌细胞形态学的影响 和假手术组比,模型组心肌细胞明显肥大增生,细胞密度降低;而芪参益气滴丸组和氟伐他汀组较模型组心肌细胞肥大程度有所减轻,密度也相对增加;氟伐他汀组心肌细胞较芪参益气滴丸组排列分布更加规则。见图 1。

3.4.2 对新生毛细血管密度的影响 和假手术组相比,模型组毛细血管密度略显增加,而药物治疗组和模型组及假手术组相比,新生毛细血管数量生成较多,毛细血管密度增加更为明显($P < 0.05$),但各治疗组间无明显差异,见表 3,图 2。

3.4.3 对心肌细胞凋亡的影响 和假手术组相比,模型组阳性凋亡细胞明显增多($P < 0.05$),芪参益



A. 假手术组;B. 模型组;C. 辛伐他汀 30 mg·kg⁻¹组;D. 芪参益气滴丸 30 mg·kg⁻¹组(图 2~3 同)

图 1 芪参益气滴丸对心肌细胞形态学的影响(HE, ×200)

气滴丸和氟伐他汀组凋亡细胞数量显著下降($P < 0.05$),前者中、高剂量组在减轻细胞凋亡的作用中更为明显($P < 0.05$)。见表 3,图 3。

表 3 各实验组大鼠心肌细胞形态学变化($\bar{x} \pm s$) %				
组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	n	毛细血管密度	凋亡指数
芪参益气滴丸	15	11	11.78 ± 0.83 ¹⁾	4.03 ± 0.66 ¹⁾
	30	12	13.2 ± 0.99 ¹⁾	0.89 ± 0.06 ²⁾
	45	12	14.22 ± 0.88 ¹⁾	0.64 ± 0.05 ²⁾
氟伐他汀	30	12	12.96 ± 0.84 ¹⁾	3.99 ± 0.59 ¹⁾
模型	-	9	6.7 ± 0.78	11.98 ± 0.79
假手术	-	11	5.3 ± 0.33	0.57 ± 0.07 ¹⁾

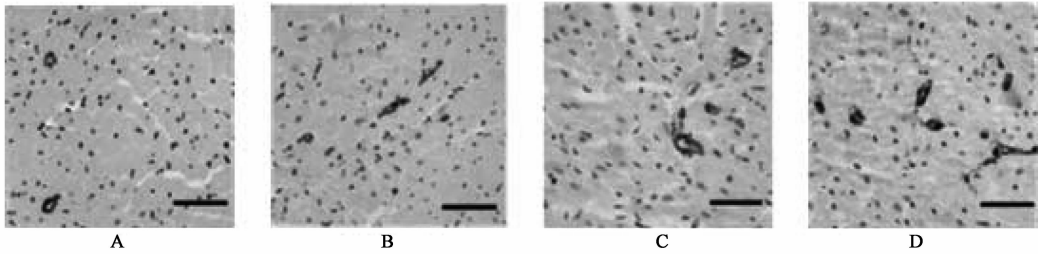
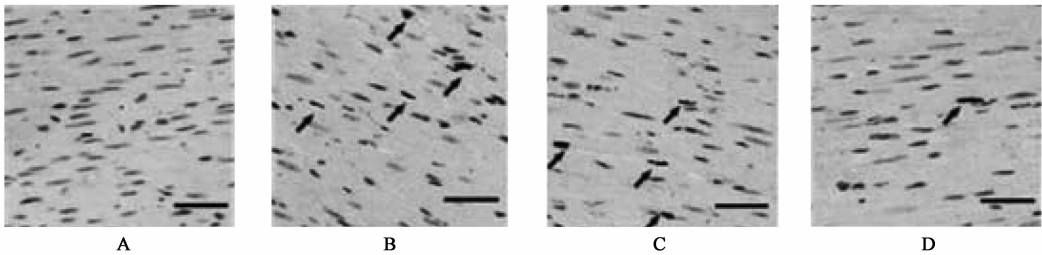


图 2 芪参益气滴丸对心肌细胞毛细血管密度的影响(HE, ×100)



箭头所示为凋亡心肌细胞

图 3 芪参益气滴丸对心肌细胞凋亡的影响(HE, ×100)

心肌梗死导致心肌细胞受损的过程中,抗氧化剂构成了抗氧自由基的重要防御系统,有效的抑制了其毒性反应^[6]。本实验中,模型组大鼠心肌组织中 GPx 活性和 GSH 含量较假手术组明显降低。芪参益气滴丸组,GPx 活性和 GSH 含量较模型组显著增加,且呈显剂量依赖关系;和氟伐他汀组相比,芪参益气滴丸和高剂量组增加更为明显。芪参益气滴丸含阿魏酸,后者可以有效的降低 GPx 和 GSH 的消耗,维持心血管组织内一氧化氮(NO)的浓度,NO 具有扩张冠状动脉、增加血液供给、保护心肌细胞清除氧自由基的作用^[1]。同时,阿魏酸的酚基基团复合物可以呈递电子于氧自由基,从而使其处于灭活状态^[10]。本研究表明,芪参益气滴丸在促进 GPx 和

3 讨论

心肌梗死后心肌细胞膜通透性增加,LDH 和 CPK 泄漏,其血液中的表达水平为心肌梗死的指示性指标之一^[6-7]。本研究中,和假手术组相比,模型组大鼠血清中 LDH 和 CPK 的含量显著增加;而和模型组相比,芪参益气滴丸组和氟伐他汀组血清中上述酶含量显著降低。芪参益气滴丸中的主要成分黄芪、丹参,含阿魏酸,具有较强的抗氧化活性,可以抑制氧自由基生成,维持细胞膜稳定,防止细胞内有害活性酶成分的释放^[8]。本研究结果表明,和氟伐他汀一样,芪参益气滴丸具有保护心肌细胞膜结构和功能的完整性,减轻心肌细胞受损的作用。

GSH 生成中的作用较氟伐他汀更为显著。SOD, CAT 具有对抗脂质过氧化物(LPO)的作用,后者在心肌梗死的形成中起着重要的作用。模型组中,两种酶的活性均显著降低,芪参益气滴丸组和氟伐他汀组心肌组织中 SOD, CAT 的含量均较模型组明显增加,但两者之间作用没有差异。氟伐他汀作用机制在于促进脂溶性维生素 E 的生成,增加 NO 的生物利用度,并在抑制 LPO 的生成中起着重要的作用^[9]。芪参益气滴丸和氟伐他汀作用机制不全相同,但均有清除心肌梗死中生成的氧自由基的作用。

心肌梗死造成大量的心肌细胞功能受损和坏死,加重心脏的压力负荷,导致正常心肌细胞肥大增生。同时,伴随着心肌梗死引发的炎症反应,大量氧

自由基的生成,心肌细胞的凋亡增多,会引发心肌的纤维变性,左心室顺应性下降,心脏重塑以及渐进性的心脏泵功能减退。本研究中,和假手术组相比,模型组心肌细胞出现了明显肥大增生,细胞密度相对减低,同时毛细血管也代偿性地生成增多,这可能是弥补肥大的心肌细胞氧供所需。芪参益气滴丸组和氟伐他汀组与模型组相比,细胞肥大增生程度明显下降,细胞密度相对增加,新生毛细血管明显增多。芪参益气滴丸的这一作用可能与血管内皮生长因子(VEGF)的作用密切相关,VEGF促进干细胞向内皮细胞分化,并促进内皮细胞的增殖^[11]。VEGF在内皮细胞及新生毛细血管的生成和发育中起重要的作用,有助于线粒体功能的发挥,增加新鲜氧和能量的供应,有效的保护心肌细胞,降低其凋亡率^[12]。

心肌细胞凋亡是心肌梗死左室重塑和心脏功能减退的关键因素之一。和假手术组相比,模型组心肌细胞凋亡率增加显著,而芪参益气滴丸组和模型组相比,凋亡率明显降低,且呈剂量依赖关系。和氟伐他汀组比较,芪参益气滴丸中、高剂量组在降低心肌细胞凋亡率方面更为显著。这一作用是多种因素综合影响的结果,可能有效的防护了心肌细胞DNA的断裂^[1],也可能与心肌组织Bcl-2蛋白的表达增多和Bax蛋白的表达下降相关^[5],同时,也可能与新生毛细血管的生成增多、氧气和能量供应充分、SOD,CAT,GPx和GSH的消耗减少、氧自由基被有效清除等因素均存在密切的关系。

氟伐他汀可以有效的抑制和清除大鼠心肌梗死后生成的大量氧自由基,同时参与改善心肌梗死后心室重塑过程,降低心肌细胞肥大程度,减轻心室壁的扩张,并改善心脏的血流动力学,延缓心衰的发展。本研究应用经典的大鼠心肌梗死模型,证实了芪参益气滴丸和氟伐他汀作用相似,对心肌梗死后大鼠心肌起到重要的保护作用,而这一作用是否和NO及VEGF相关将是下一步深入研究的内容。

[参考文献]

[1] Surinder K Y, Arunachalam G, Subramanian S K, et al. Synergistic interactions of fluvastatin with ascorbic acid: Its cardioprotective role during isoproterenol induced myocardial infarction in rats [J]. Mol Cell Biochem, 2006, 283: 139.

[2] Xiao H X, Jing X, Lei X, et al. VEGF attenuates development from cardiac hypertrophy to heart failure after aortic stenosis through mitochondrial mediated apoptosis and cardiomyocyte proliferation [J]. J Cardiothorac Surg, 2011, 6:54.

[3] 谢东霞,毛秉豫. 芪参益气滴丸对冠心病二级预防的临床观察[J]. 中国中医药信息杂志, 2008, 15(8):81.

[4] 谢东霞,毛秉豫. 芪参益气滴丸对心肌梗死后气虚血瘀证患者心室重构及心功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(1):192.

[5] 毛秉豫,茹永新. 芪参益气滴丸对模型大鼠心肌梗死后左室结构及心功能的影响[J]. 中医杂志,2011,52(2):151.

[6] Thomes P, Rajendran M, Pasanban B, et al. Cardioprotective activity of cladosiphon okamuranus fucoidan against isoproterenol induced myocardial infarction in rats [J]. Phytomedicine, 2010, 18(1):52.

[7] Trigueros M L, Gonzalez J M, Rivera J, et al. Hutchinson-Gilford progeria syndrome, cardiovascular disease and oxidative stress[J]. Front Biosci, 2011, 3:1285.

[8] Trombino S, Serini S, Nicuolo F D, et al. Antioxidant effect of fluvastatin in isolated membranes and intact cells: synergistic interactions with α -tocopherol, β -carotene and ascorbic acid[J]. J Agric Food Chem, 2004,52: 2411.

[9] Mac Kenzie A, Martin W. Loss of endothelium-derived nitric oxide in rabbit aorta by oxidant stress: restoration by superoxide dismutase mimetics[J]. Br J Pharmacol, 1998,124: 719.

[10] Gil M I, Francisco A, Barberan T, et al. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing[J]. J Agric Food Chem, 2000,48: 4581.

[11] Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2001, 280: 1358.

[12] Khan M, Meduru S, Pandian R P, et al. Effect of oxygenation on stem-cell therapy for myocardial infarction[J]. Adv Exp Med Biol, 2011, 701:175.

[责任编辑 何伟]