

丹蒞片对大鼠心肌梗死面积和心室重构的影响

红梅*

(内蒙古国际蒙医医院, 呼和浩特 010055)

[摘要] 目的:观察丹蒞片对异丙肾上腺素(isoproterenol, ISO)致急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)大鼠心肌梗死面积和基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)、基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)及基质金属蛋白酶抑制剂-1(tissue inhibitors of metalloproteinases-1, TIMP-1)蛋白表达的影响。方法:雄性 Wistar 大鼠 80 只随机分为 4 组:空白组(生理盐水 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, $n = 20$)、模型组(生理盐水 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, $n = 20$)、丹蒞高剂量组($900 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, $n = 20$)、丹蒞低剂量组($450 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, $n = 20$), 每组大鼠再随机配对分成 10 小组, 连续 ig 14 d。14 d 后除空白组以外, 其他各组一次性 sc ISO $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 制备急性心肌梗死模型。造模后 1 d, 7 d 观察心肌病理形态学、梗死面积、心肌 MMP-2、MMP-9 及 TIMP-1 蛋白表达水平。结果:与模型组比较, 丹蒞片 $900 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 可明显减轻缺血心肌病理损害程度, 缩小心肌梗死面积, [2 组依次为 $(2.003 \pm 0.546)\%$ 及 $(0.652 \pm 0.301)\%$, $P < 0.01$], 降低缺血心肌 MMP-2 (A 依次为 42.10 ± 6.58 及 26.71 ± 6.84 , $P < 0.01$), MMP-9 (A 依次为 43.37 ± 8.78 及 32.91 ± 5.21 , $P < 0.01$) 蛋白表达, 对 TIMP-1 表达无明显影响。结论:丹蒞片可能通过抑制 MMP-2、MMP-9 蛋白表达, 减少心肌梗死面积, 促进梗死愈合, 防治早期心室重构(ventricular remodeling, VR); 丹蒞片对 TIMP-1 表达无明显影响, 对 MMP 活性的抑制作用可能不通过 TIMP 实现。

[关键词] 丹蒞片; 心肌梗死; 心室重构; 基质金属蛋白酶

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)10-0208-04

Effects of Danlon Tablet on Myocardial Infarct Size and Ventricular Remodeling in Rats

HONG Mei*

(International Hospital of Mongolian Medicine, Huhehaote 010055, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Danlou tablet on myocardial infarct size and MMP-2, MMP-9 and TIMP-1 protein expression in rats with acute isoproterenol-induced myocardial infarction. **Method:** Eighty male Wistar rats were randomly divided into 4 groups: ① blank control group (normal saline $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, $n = 20$); ② model control group (normal saline $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, $n = 20$); ③ Danlou large dose group ($900 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, $n = 20$); ④ Danlou small dose group ($450 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, $n = 20$). Each group of rats were randomly paired into 10 pairs, continuously ig 14 d. Except the blank control group, acute myocardial infarction models were induced by subcutaneous injection of Iso $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ after 14 days of drug treatment. Pathological changes in myocardial, then myocardial infarct size and myocardial MMP-2, MMP-9, TIMP-1 protein expression in 1d and 7 d after injected ISO were investigated. **Result:** Compared with model group, Danlou could significantly reduce the extent of ischemic myocardial injury, reduced myocardial infarct size [$(2.003 \pm 0.546)\%$ vs $(0.652 \pm 0.301)\%$, $P < 0.01$], reduce ischemic myocardial protein expression of MMP-2 (42.10 ± 6.58 vs 26.71 ± 6.84 , $P < 0.01$) and MMP-9 (43.37 ± 8.78 vs 32.91 ± 5.21 , $P < 0.01$), however, TIMP-1 expression was not affected. **Conclusion:** Danlou tablet may reduce myocardial necrosis area, and promote infarct healing, prevention and treatment of early left ventricular remodeling by inhibiting + MMP-2, MMP-9 protein expression; Danlou tablet has no significant effect on the expression of TIMP-1, suggesting the inhibition of MMP activity may not be achieved by TIMP.

[Key words] Danlou tablet; myocardial infarction; ventricular remodeling; matrix metalloproteinase

[收稿日期] 20101112(008)

[通讯作者] * 红梅, 主治医师, 心脑血管疾病临床及基础研究, E-mail: hongmeib2009@yahoo.cn

基质金属蛋白酶(MMPs)是一组锌离子(Zn^{2+})依赖的内肽酶家族,能特异降解细胞外基质(extracellularmatrix,ECM),并为基质金属蛋白酶抑制剂(TIMPs)及细胞因子所调控。证据表明,在急性心肌梗死(AMI)后MMPs的迅速升高并持续高表达与AMI后损伤心肌的修复和愈合过程直接相关。在心肌早期重构阶段MMPs被激活,心肌ECM胶原和其他参与胶原网代谢的成分被MMPs降解,使心室壁变薄、梗死区扩展(infarct expansion,IE),心室腔扩大,导致心室重构(VR)^[1]。大量研究证实,ACEI和ARB类药物可以改善MI后MMPs/TIMP-1平衡,防治心梗后心室重构^[2-3]。中药通心络^[4]通过抑制心肌梗死后MMPs水平,也可防治VR的发生发展。在心肌MMPs主要来源于浸润的炎性细胞,此外心肌细胞也合成少量MMPs。丹莪片是以瓜蒌、薤白为君药的新痰瘀同治方剂,本研究通过异丙肾上腺素建立大鼠AMI模型,观察丹莪对早期心肌梗死面积和MMPs及TIMPs蛋白表达的影响,初步探讨丹莪对心肌缺血损伤后早期VR的作用及可能机制。

1 材料

1.1 动物 健康雄性Wistar大鼠80只,由吉林大学实验动物中心提供,动物合格证号SCXK(吉)2010-0005。

1.2 药品和试剂 丹莪片由吉林康乃尔药业有限公司提供;4%盐酸异丙肾上腺素(Iso),上海禾丰制药有限公司生产,生产批号090701。兔抗大鼠MMP-2(批号019889),MMP-9(批号900582W),TIMP-1(批号90028W)多克隆抗体购自北京博奥森生物技术有限公司;多聚赖氨酸(批号100105K4357),SP免疫组化试剂盒(批号1010299710),DAB显色试剂盒(批号1008040081)购自福州迈新生物技术开发有限公司。

1.3 仪器 光学显微镜,日本Olympus DP72产品;PL303电子天平,瑞士Mettler-Toledo公司;Leica RM2145半自动切片机,浙江省金华市科迪仪器设备有限公司产品;Olympus PM-10AO全自动显微照相装置和Image-Pro-Plus图像分析系统均为日本奥林巴斯公司产品。

2 方法

2.1 分组与给药 选用体重200~250g大鼠80只随机分为空白组、模型组、丹莪900mg·kg⁻¹组、丹莪

450mg·kg⁻¹共4组,每组20只,每组大鼠进一步随机配对分成10小组饲养。空白组、模型组给予生理盐水10mL·kg⁻¹;丹莪干预组将丹莪片粉末用生理盐水配制成高(900mg·kg⁻¹)、低(450mg·kg⁻¹)不同浓度的混悬液,给药容积10mL·kg⁻¹,分别ig14d,每日1次,动物均喂饲普通饲料,饮水不限。ig第14d模型组和丹莪高、低剂量组注射Iso制备动物模型,空白组注射相同容积生理盐水。造模后1d从各配对组随机抽取大鼠10只,共40只处死取材。其余大鼠继续ig7d,处死取材,给药方法同前。

2.2 动物模型制备 4组大鼠连续ig14d,于末次ig后30min,将模型组和丹莪高、低剂量3组共60只大鼠用10%水合氯醛浅麻醉后,一次性腹部皮下多点注射Iso15mg·kg⁻¹,空白组给予等容量生理盐水。记录II导联心电图,具备以下条件之一者判断为造模成功的标志:①ST段水平向下或向上偏移≥0.1mV;②T波高耸超过同导联R波的1/2;③T波高耸伴ST段移位。阴性判断标准:①ST段斜形偏移,或水平偏移<0.1mV;②T波低平或双向倒置。

2.3 心肌组织病理形态学观察 在靠近心尖部1/3处,平行于房室沟横行切取3mm厚度心脏组织块,常规脱水、透明、石蜡包埋后,做3μm厚的连续石蜡切片,摊片、烘片,60℃烤片过夜后室温放置自然干燥,常规HE染色,光镜下观察心肌组织病理变化。

2.4 心肌梗死面积测量 采用造模后1,7d分段处死大鼠,心肌HE染色切片,按逐区点测量法求示各组大鼠心肌梗死面积^[5]。计算每张切片上落在坏死灶内的总点数(Pn)和落在整个心肌切片上的总点数(Pt),以百分比表示该切片心肌坏死的程度,即Pn/Pt×100%。

2.5 心肌组织免疫组织化学染色及定量分析 造模后7d大鼠心肌MMP-2,MMP-9,TIMP-1的检测采用SP二步法进行免疫组织化学染色,具体步骤按试剂盒说明书操作。抗体稀释浓度1:100,阴性对照用PBS替代一抗。细胞浆、细胞膜、间质中出现棕黄色颗粒,且其着色强度高于背景非特异性染色者判定为阳性。在每张切片阳性表达区随机选择5个高倍视野(×400),用Image pro plus图像分析系统进行图片处理,对所选视野内的阳性信号进行图像分析,测定各组大鼠心肌组织阳性信号的积分吸光度(A),其值越高,表达量越多,以进行半定量分析。

2.6 统计学方法 采用SPSS13.0统计软件分析处

理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间用单因素方差分析;前、后比较用重复测量方差分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 心肌组织变化 空白组心肌结构正常,模型组心肌出现广泛融合性病变,肌纤维大片状坏死,肌间隙增宽,间质水肿,可见大量炎细胞浸润,病变集中在心内膜下肌层、乳头肌和血管周围处,造模后 7 d 与 1 d 比病变有加重趋势。丹萎 900 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组心肌组织呈点片灶状坏死,病灶疏散,且坏死范围较小,间质水肿,有少量炎细胞浸润,病变程度明显轻于模型组,尤以造模后第 7 天明显,与造模后 1 d 比病变程度和范围进一步减小,病变趋于愈合。丹萎 450 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组与模型组比心肌病变程度稍轻,坏死范围略显局限,与 1 d 比第 7 天变化不明显。见图 1。

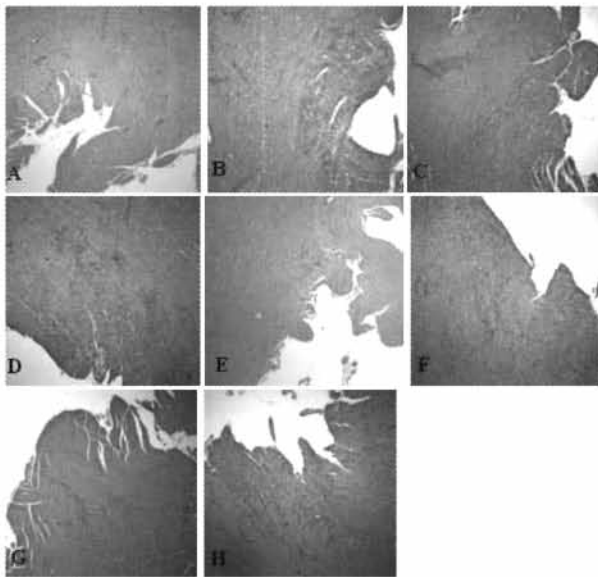


图 1 丹萎片对异丙肾上腺素致急性心肌梗死大鼠心肌坏死面积的影响

大鼠心肌 HE 染色 ($\times 100$) A, E: 空白组; B, F: 模型组;
C, G: 丹萎片 900 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;
D, H: 丹萎片 450 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组。
A, B, C, D: 造模后 1 d; E, F, G, H: 造模后 7 d

3.2 心肌梗死面积测定 通过测量心肌组织切片内心肌梗死部分占整个心肌面积的百分比(梗死心

肌面积/整个心肌面积 $\times 100\%$) 来反映心肌坏死程度。表 1 所示,模型组和丹萎片组有明显心肌坏死。与模型组比,丹萎 900 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组心肌梗死面积(1 d 和 7 d)显著减少($P < 0.01$);与 1 d 比,第 7 天丹萎 900 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组心肌梗死面积明显减少($P < 0.05$)。450 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组对梗死面积的影响无统计学意义。

表 1 丹萎片对异丙肾上腺素致急性心肌梗死大鼠心肌坏死面积的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$) %

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	1 d	7 d
空白	-	0.086 \pm 0.007	0.083 \pm 0.007
模型	-	2.185 \pm 0.637	2.003 \pm 0.546
丹萎片	900	1.224 \pm 0.365 ¹⁾	0.652 \pm 0.301 ^{1,2)}
	450	1.983 \pm 0.501	1.902 \pm 0.413

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$;与 1 d 比较²⁾ $P < 0.05$ 。

3.3 免疫组织化学染色 各组大鼠心肌胞浆、包膜及间质中均有 MMP-2, MMP-9, TIMP-1 蛋白表达,可见棕色阳性颗粒;空白组有少量表达。如表 2 所见,与空白组比,模型组和丹萎片组 MMP-2, MMP-9 表达明显升高($P < 0.01$)。与模型组比,丹萎 900 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组 MMP-2, MMP-9 表达显著降低($P < 0.01$), 450 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组表达有所下降,但差异无统计学意义。与空白组比,模型组和丹萎片组 TIMP-1 表达明显升高($P < 0.01$),但 3 组间 TIMP-1 表达差异无统计学意义。

4 讨论

AMI 后重构早期基质胶原降解、梗死扩展,造成梗死区局部室壁变薄,在胶原沉积和梗死区瘢痕形成之前,薄弱的梗死区室壁不易保持原有的结构、形状和功能,因此在血流动力学影响下容易发生室壁瘤和心脏破裂。AMI 后的 VR 和心室扩大是充血性心力衰竭的发生机制,而 AMI 后 VR 的决定因素之一是 MI 愈合过程中 ECM 的损伤和丢失。因此,治疗的策略应尽可能减少导致心室扩张的因素而增加促进愈合的因素,因此调节 MMPs 的活性成为 VR 和 HF 治疗的潜在靶点。

国内外广泛应用 ISO 诱发的 AMI 动物模型,观察 AMI 后心脏电生理学、生化物质、组织病理学、心

表 2 大鼠心肌 MMP-2, MMP-9 及 TIMP-1 免疫组化检测 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	MMP-2	MMP-9	TIMP-1
空白	-	10.40 \pm 4.44	13.06 \pm 3.56	14.97 \pm 3.40
模型	-	42.10 \pm 6.58 ¹⁾	43.37 \pm 8.78 ¹⁾	29.25 \pm 6.37 ¹⁾
丹萎片	900	26.71 \pm 6.84 ^{1,2)}	32.91 \pm 5.21 ^{1,2)}	30.83 \pm 5.33 ¹⁾
	450	37.69 \pm 7.87 ¹⁾	39.59 \pm 7.53 ¹⁾	28.30 \pm 5.45 ¹⁾

注:与空白组¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$ 。

功能以及基因表达等各种动物实验研究^[6-8]。本实验中,大鼠一次性皮下注射 Iso 15 mg·kg⁻¹后心肌出现广泛融合性片状坏死病灶,伴有弥漫的炎性细胞浸润。丹莪片预防性干预使缺血心肌病理损害及炎细胞浸润明显减轻,梗死面积显著减少($P < 0.01$)。且造模后继续丹莪片治疗 7 d 发现,病变程度和范围较 1 d 时进一步缩小,病变趋于愈合,此种梗死面积的前后(1 d 与 7 d)变化与模型组比较有显著性差异($P < 0.01$)。观察发现与模型组 1 d 比,7 d 时心肌病变、炎症反应及梗死面积无明显变化,甚者有加重趋势,符合心梗后缺血心肌病理生理变化规律。实验结果说明丹莪片不仅可对抗 ISO 引起的大鼠心肌缺血损伤,减少心肌梗死面积,防止早期梗死扩展,在一定程度上缩短了病程,对心肌缺血起到保护作用。实验通过不同剂量的干预,发现其心肌保护作用具有一定剂量依赖性。

AMI 后 VR 不仅表现为心肌细胞的凋亡、坏死、肥大、延长等,还表现为心肌 ECM 合成和降解的失衡。心肌中的 MMPs 是降解 ECM 成分的最主要酶系,而 TIMP 是 MMP 的内源性特异性抑制剂。在心肌早期重构阶段 MMPs 被激活,心肌 ECM 胶原被降解,心室壁变薄、表现为早期 VR,即梗死范围的扩展(IE)。此后新的 ECM 成分沉积,瘢痕形成,梗死区组织结构强度增加,完成 AMI 区的愈合。任何延迟和影响这一过程的因素,都会使得梗死区愈合不良,心肌重构恶化,心力衰竭,严重者发生心脏破裂。有证据表明,在兔心肌缺血再灌注模型,给予舒伐他汀和强力霉素预处理,结果两者均能显著减少心肌梗死面积和 MMP-2 活性,进一步的数据分析表明,MMP-2 活性与梗死面积显著相关,MMP-2 活性越低梗死面积越小^[9]。本实验中发现,缺血心肌 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达明显升高($P < 0.01$)。而经丹莪干预后 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达显著降低($P < 0.01$),推测丹莪可能通过抑制 MMP 活性,缩小梗死面积,促进梗死愈合,减轻 VR。提示对 MMP 活性的影响是丹莪心肌保护作用的重要机制之一。Sun 等^[10]发现,大鼠在 AMI 后第 3 d,梗死区 TIMP mRNA 表达增加,并持续 4 周以上。本实验中心梗后 7 d 大鼠心肌 TIMP 表达明显提高,表明 TIMP 在梗塞后合成的激活能进一步抑制 MMP 的活性,是心梗后的自身保护机制。丹莪片组与模型组 TIMP 表

达水平差异无统计学意义,提示丹莪对 MMP 蛋白表达的调控并非通过 TIMP 途径。

[参考文献]

- [1] 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(3):201.
- [2] Yang D, Ma S, Li D, et al. Angiotensin II receptor blockade improves matrix metalloproteinases/tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 balance and restores fibronectin expression in rat infarcted myocardium[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 388(3):606.
- [3] Matsunaga T, Abe N, Kameda K, et al. Circulating level of gelatinase activity predicts ventricular remodeling in patients with acute myocardial infarction [J]. *Int J Cardiol*, 2005, 105(2):203.
- [4] 张桂林. 通心络对大鼠心肌梗死后 MMP-2, MMP-9 表达的影响[C]. 吴以岭. 络病学基础与临床研究(3). 北京:中国科学技术出版社, 2007:104.
- [5] 李才, 王丽娟, 赵志涛. 灶状心肌坏死的定量组织学测量-逐区点测量法[J]. *白求恩医科大学学报*, 1988, 14(4):314.
- [6] Korkmaz S, Radovits T, Barnucz E, et al. Pharmacological activation of soluble guanylate cyclase protects the heart against ischemic injury [J]. *Circulation*, 2009, 120:677.
- [7] Buttros J B, Bergamaschi C T, Ribeiro D A, et al. Cardioprotective actions of ascorbic acid during isoproterenol-induced acute myocardial infarction in rats [J]. *Pharmacology*, 2009, 84(1):29.
- [8] Liu B, Li W, Li Y, et al. Protective effects of N-acetylcysteine in isoproterenol-induced myocardium injury in rats[J]. *Mol Biol Rep*, 2009, 36(4):761.
- [9] D' Annunzio V, Donato M, Ermi L, et al. Rosuvastatin given during reperfusion decreases infarct size and inhibits matrix metalloproteinase-2 activity in normocholesterolemic and hypercholesterolemic rabbits [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2009, 53(2):137.
- [10] Sun Y, Zhang J Q, Zhang J, et al. Cardiac remodeling by fibrous Tissue after infarction in rats [J]. *J Lab Clin Med*, 2000, 135(4):316.

[责任编辑 聂淑琴]