

# 安心颗粒对心衰大鼠氧化应激和心肌细胞凋亡的影响

郎中云<sup>1</sup>, 方显明<sup>2\*</sup>

(1. 攀枝花学院医学院, 四川 攀枝花 617000; 2. 广西中医学院, 南宁 530001)

[摘要] 目的: 观察安心颗粒对慢性心力衰竭模型大鼠血清超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)水平及心肌细胞凋亡的影响。方法: 将 50 只雌性 SD 大鼠随机分为正常对照组(A组)、模型组(B组)、卡托普利组(C组)、安心颗粒低剂量组(D组)、安心颗粒高剂量组(E组), 每组 10 只。采用阿霉素 ip 造模, 每周 1 次, 连续 6 周。造模同时, C~E 组分别按  $6.25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ,  $0.8, 1.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  剂量 ig 给药。造模结束后, 分别测定各组血清超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)水平, 左室重量指数(LVMI)及心肌细胞凋亡指数(AI)。结果: 模型组血清 MDA 水平、LVMI 及 AI 均显著性升高( $P < 0.01$ ), 血清 SOD 活性显著下降( $P < 0.01$ ); 安心颗粒低、高剂量组均可显著性降低模型大鼠血清 MDA 水平、LVMI 及 AI( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 提高血清 SOD 活性( $P < 0.01$ )。结论: 安心颗粒可通过调控氧化应激、抑制心肌细胞凋亡, 延缓心肌重构, 防治心力衰竭。

[关键词] 安心颗粒; 心力衰竭, 氧化应激; 细胞凋亡

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)03-0124-04

## Effects of Anxin Granules on Oxidative Stress in Serum and Myocardial Cell Apoptosis in Heart Failure Rats

LANG Zhong-yun<sup>1</sup>, FANG Xian-ming<sup>2\*</sup>

(1. Medical College of Panzhihua University, Panzhihua 617000, China;

2. Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530001, China)

**[Abstract] Objective:** To observe the effects of Anxin Granules (AXG) on the levels of serum superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) and myocardial cell apoptosis in rats with chronic heart failure (CHF), and to explore the possible therapeutic mechanism. **Method:** Fifty female SD rats were randomly divided into five groups: normal control group (A), model group (B), captopril group (C), low-dose AXG group (D) and high-dose AXG group (E). CHF models were established by intraperitoneal injection of small-dose of adriamycin, once per week for continuous 6 weeks. Meanwhile, group C was injected captopril ( $6.25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ); groups D and E received low-dose AXG ( $0.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) and high-dose AXG ( $1.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) ig respectively. After 6 weeks, serum levels of SOD, MDA and the left ventricular mass index (LVMI) of different groups were detected. Myocardial cells apoptosis was tested by TUNEL. Apoptosis index (AI) was counted. **Result:** Compared to group A, the serum levels of MDA, and LVMI, and AI in cardiac muscle were markedly increased in the model group ( $P < 0.01$ ), the activity of SOD in serum was significantly decreased ( $P < 0.01$ ) in rats model with CHF. AXG decreased the serum levels of MDA, LVMI and AI compared with the model group ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). And the level of SOD was ascended markedly. **Conclusion:** AXG inhibit apoptosis and anti-oxidative stress.

**[Key words]** Anxin Granules; heart failure; oxidative stress; apoptosis

[收稿日期] 20100804(002)

[基金项目] 广西自然科学基金项目(0728173)

[第一作者] 郎中云, 副教授, 医学硕士, 主要从事心血管疾病的防治研究, Tel: 13438535801, E-mail: langzhongyun@163.com

[通讯作者] \* 方显明, E-mail: fxm621@126.com

研究表明慢性心力衰竭(CHF)时有广泛的心肌细胞凋亡存在,心肌细胞凋亡发生参与了CHF的心肌重构,并在CHF的发生、发展中起重要作用<sup>[1]</sup>。而氧化应激可诱导心肌细胞凋亡、促进心肌重构而促使心衰恶化<sup>[2]</sup>。因此,以调控氧化应激和心肌细胞凋亡为靶向的生物学干预,是治疗CHF的一个有效途径。本实验拟通过建立阿霉素性CHF大鼠模型,观察中药安心颗粒对其氧化应激与心肌细胞凋亡的干预作用,探讨安心颗粒治疗心衰的内在机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 50只健康清洁级雌性SD大鼠,体重(200±20)g,由广西中医学院实验动物中心提供(桂医动字11003)。

**1.2 药物** 安心颗粒(由人参,桂枝,茯苓,水蛭,瓜蒌等组成)为褐色颗粒状4.5g/包,每克颗粒含生药4.5g,由培力(南宁)药业有限公司提供(批号050301);卡托普利由中美上海施贵宝制药有限公司生产(批号0505031);盐酸阿霉素(ADR)粉针由深圳万乐药业有限公司生产(批号0501E2)。

**1.3 试剂** 原位细胞凋亡检测试剂盒为德国Roche公司生产(批号050402);超氧化物歧化酶(SOD,批号050615)、丙二醛(MDA,批号050613)测试试剂盒购于南京建成生物工程研究所。

## 2 方法

**2.1 动物模型复制** 参照文献[3]方法,将注射用ADR粉针用灭菌注射用水溶解,用9g·L<sup>-1</sup>生理盐水配成0.8g·L<sup>-1</sup>溶液,第1~3周按3mg·kg<sup>-1</sup>剂量给模型组和用药组大鼠进行ip,第4~6周再按2mg·kg<sup>-1</sup>剂量进行ip,正常对照组大鼠ip等容积的生理盐水,均每周1次,连续6周。以出现CHF临床表现和病理改变为造模成功<sup>[4]</sup>(出现动物行为改变:精神不振,活动减少,食欲减退,肢冷,腹泻;心衰体征:气喘痰鸣,紫绀,唇舌青紫,四肢皮下水肿;动物病理解剖:出现胸水和/或腹水,肝脏和肺充血肿胀等变化;病理切片:心肌、肝脏和肺组织病理切片出现组织充血、水肿等)。

**2.2 动物分组及给药** 大鼠在用基础饲料适应性喂养1周后,随机分为正常对照组(A组)、模型组(B组)、卡托普利组(C组)、安心颗粒低剂量组(D组)、安心颗粒高剂量组(E组),每组10只,分笼饲养。造模同时,C组给予卡托普利6.25mg·kg<sup>-1</sup>剂

量ig,D组和E组分别给予安心颗粒0.8,1.6g·kg<sup>-1</sup>剂量ig,用药剂量按动物体表面积换算。A组给予等容积蒸馏水ig。每日1次,自由饮食。给药共计6周(安心颗粒给药剂量系按提取浓缩物计算)。

## 2.3 指标检测

**2.3.1 血清SOD,MDA测定** 于末次给药24h,取大鼠主动脉血5mL,分离血清,用黄嘌呤氧化酶法和硫代巴比妥酸法分别测定大鼠血清SOD,MDA水平,严格按试剂盒说明操作。

**2.3.2 左室质量指数的测定** 动物采血后,用颈椎脱臼法处死大鼠,剖胸取出心脏,用冰生理盐水洗净残血,迅速分离左心室(包括室间隔在内),用滤纸吸干,称取质量(单位为mg),并计算左室质量指数。

左室质量指数(LVMI) = 左室质量(mg)/体重(g) (LVW/BW)。

**2.3.3 心肌细胞凋亡检测** 左心室称重后,切取部分左室心尖部组织,用40g·L<sup>-1</sup>多聚甲醛液固定12h,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,切片进行形态学观察。同时用TUNEL法检测心肌细胞凋亡,按试剂盒说明操作,以细胞核被染成棕褐色为阳性结果。每个标本观察5张切片,每张切片随机计数5个高倍视野(×400)中的凋亡阳性细胞核数/总细胞核数,取其平均值作为心肌细胞凋亡指数(AI)。

**2.4 统计学处理** 采用SPSS 12.0统计软件分析数据,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较用方差分析,两两比较用 $q$ 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

## 3 结果

**3.1 各组大鼠心肌病理形态学观察** 光镜下观察心肌组织切片,正常对照组大鼠心肌形态正常,胞浆纹理清晰。其他各组可见程度不同的肥大心肌细胞群,细胞排列紊乱、断裂、溶解、炎性细胞浸润,药物干预各组均较模型组改变轻,其结果见图1。模型组还可见肺泡壁破裂、融合、水肿、淤血改变,且肝组织苏木素-伊红染色可见肝窦扩张淤血,提示心衰模型制备成功。

**3.2 各组大鼠血清SOD,MDA,AI及LVMI比较** 在造模过程中,正常对照组有1只大鼠因ig操作失误死亡,模型组有3只、其余各组各有2只大鼠死于CHF。表1结果显示:模型组血清MDA水平、AI及LVMI均显著性升高( $P < 0.01$ ),血清SOD活性显著下降( $P < 0.01$ );安心颗粒低剂量组、安心颗粒高剂

量组均可显著性降低模型大鼠血清 MDA 水平、AI 及 LVMI ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 提高血清 SOD 活性 ( $P < 0.01$ )。

**3.3 各组大鼠心肌细胞凋亡图片比较** 模型组可见棕褐色细胞核明显增多, 正常对照组偶见, 其余各组均较少, 结果见图 2。

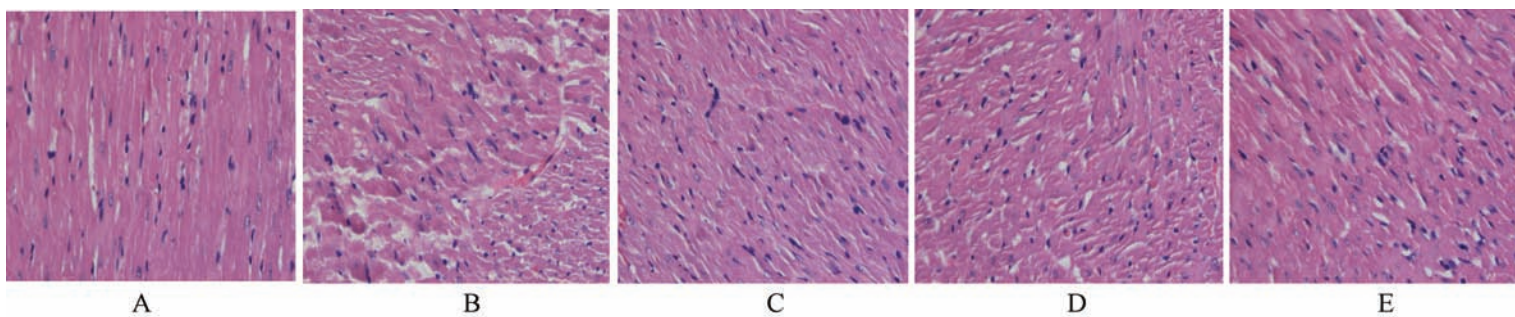


图 1 各组大鼠心肌组织病理形态学改变(×200)

A. 正常对照组; B. 模型组; C. 卡托普利组  $6.25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ; D. 安心颗粒低  $0.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  组; E. 安心颗粒高  $1.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  组(图 2 同)

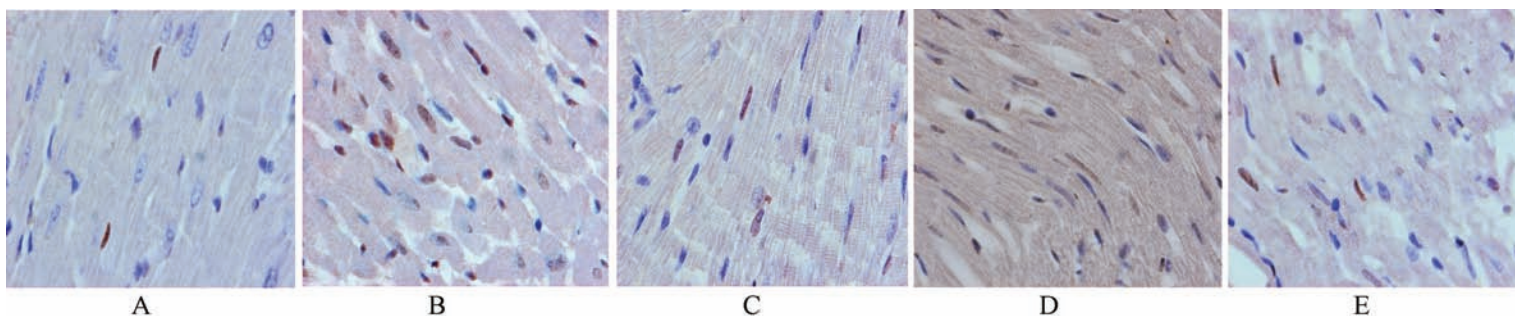


图 2 各组大鼠心肌细胞凋亡检测比较(TUNEL 法, ×400)

表 1 各组大鼠血清 SOD, MDA, AI, LVMI 比较(均±s)

组别	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	n	SOD / $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$	MDA / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	AI / %	LVMI / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
正常对照	-	9	455.00 ± 13.38	6.90 ± 2.31	3.27 ± 0.81	1.60 ± 0.24
模型	-	7	318.67 ± 13.06	19.22 ± 3.49	23.26 ± 4.02	2.28 ± 0.17
卡托普利	0.006 25	8	403.90 ± 19.01 <sup>2)</sup>	11.46 ± 3.32 <sup>2)</sup>	13.49 ± 3.81 <sup>2)</sup>	1.87 ± 0.16 <sup>2)</sup>
安心颗粒	0.8	8	362.36 ± 26.00 <sup>2, 4)</sup>	15.43 ± 3.56 <sup>1, 3)</sup>	18.12 ± 4.16 <sup>1, 3)</sup>	2.09 ± 0.17 <sup>1, 3)</sup>
	1.6	8	376.83 ± 17.91 <sup>2, 4)</sup>	11.79 ± 3.38 <sup>2, 5)</sup>	14.27 ± 3.91 <sup>2)</sup>	1.90 ± 0.13 <sup>2, 5)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与卡托普利组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$ ;与安心颗粒低剂量组比较<sup>5)</sup>  $P < 0.05$ 。

#### 4 讨论

氧化应激是指由于氧自由基(OFR)过量生成和(或)细胞内抗氧化防御系统受损导致氧自由基及其相关代谢产物过量聚集,从而对机体造成损害的病理状态<sup>[5]</sup>。在心衰的发生发展过程中,由于儿茶酚胺的大量分泌和自由化、促炎性细胞因子合成分泌增加、黄嘌呤氧化酶激活、线粒体呼吸链功能异常等病理生理机制产生大量的 OFR, SOD 活性下降, OFR 清除下降,体内过多的 OFR 可能通过各种机制引起连锁反应,产生大量的 MDA,发生氧化应激反应<sup>[6]</sup>。氧化应激不但可以直接损害心肌细胞及其超微结构,使心肌收缩舒张功能失调,影响能源代谢,破坏核酸结构,最终导致细胞死亡<sup>[7]</sup>;还可以调控细胞的信号转导通路或作用于核酸水平,改变遗传物质的表达,诱导心肌细胞凋亡,致心肌细胞数目减少<sup>[8]</sup>。同时, OFR 可刺激间质胶原酶活化,分解胶

原蛋白,破坏间质胶原网络,刺激体内各种生长因子的表达,促进胶原的合成,导致心肌纤维化,影响心肌重构,进一步恶化心衰<sup>[7]</sup>。

本实验研究表明,CHF 模型大鼠血清 MDA 含量、AI 及 LVMI 较正常组显著性升高 ( $P < 0.01$ ), 血清 SOD 活性显著下降 ( $P < 0.01$ ), 且心肌凋亡细胞明显增多,提示 CHF 的发生与氧化应激诱导心肌细胞凋亡、促进心肌重构等机制有着密切的关系,与文献报道一致<sup>[9]</sup>。在给予安心颗粒和卡托普利干预后,可显著降低血清 MDA 含量、AI 及 LVMI, 提高血清 SOD 活性,减少心肌凋亡细胞数量,尤其是高剂量安心颗粒,其作用与卡托普利相仿。

心力衰竭属于中医“心悸”、“水肿”等病证范畴,多因心(阳)气受损,气血津液运行不畅,以致瘀血、痰饮、水湿互结为沉痾之疾。治宜益气通阳、逐瘀通脉、化痰利水。安心颗粒(原名益心脉颗粒)是

广西中医学院附属瑞康医院方显明教授临床多年用于治疗冠心病的复方中药制剂。该药由人参、桂枝、瓜蒌、水蛭、茯苓等中药制成,方中人参大补元气,为主药;桂枝通阳化气,辅人参以振奋心阳;瓜蒌化痰泄浊、水蛭破血逐瘀,佐人参以畅通血脉;并以茯苓利水渗湿消痰,为人参之使药。诸药配伍,具有强心利尿、标本同治之功。近年来临床用于 CHF 的治疗也取得了显著效果<sup>[10]</sup>,推测其作用机制,可能与该药能降低 MDA 含量、提高血清 SOD 活性,并通过调控氧化应激而抑制心肌细胞凋亡的作用,延缓心肌重构,改善心脏功能,从而阻止 CHF 的发展有关。其确切机制有待进一步研究。

#### [参考文献]

- [ 1 ] Peter M K, Seigo I. Apoptosis and heart failure: a critical review of the Literature [ J ] . Circ Res, 2000, 86 ( 11 ) : 1107.
- [ 2 ] Heistad D D. Oxidative stress and vascular disease [ J ] . Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26 ( 4 ) : 689.
- [ 3 ] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学 [ M ] . 3 版. 北京: 人民卫生出版, 2002: 1085.
- [ 4 ] 施新猷. 现代医学实验动物学 [ M ] . 北京: 人民军医出版社, 2000: 464.
- [ 5 ] Singal P K, Khaper N, Palace V, et al. The role of oxidative stress in the genesis of heart disease [ J ] . Cardivasc Res, 1998, 40 ( 3 ) : 426.
- [ 6 ] Maack C, Kartes T, Kilter H, et al. Oxygen free radical release in human failing myocardium is associated with increased activity of Rae1-GTPase and represents a target for statin treatment [ J ] . Circulation, 2003, 108 ( 13 ) : 1567.
- [ 7 ] Tsutsui H, Ide T, Kinugawa S. Mitochondrial oxidative stress, DNA damage, and heart failure [ J ] . Antioxid Redox Signal, 2006, 8 ( 9/10 ) : 1737.
- [ 8 ] Wencker D, Chandra M, Nguyen K, et al. A mechanistic role for cardiac myocyte apoptosis in heart failure [ J ] . J Clin Invest 2003, 111 ( 1 ) : 497.
- [ 9 ] Hare J M. Oxidative stress and apoptosis in heart failure Progression [ J ] . Circ Res, 2001, 89 ( 3 ) : 198.
- [ 10 ] 黄绍湘, 杨小英. 益心脉颗粒治疗慢性心力衰竭的疗效观察 [ J ] . 中西医结合心脑血管病杂志, 2007, 5 ( 5 ) : 381.

[责任编辑 聂淑琴]

## 《中国中药杂志》2011 年征订启事

《中国中药杂志》系中国科协主管,中国药学会主办,中国中医科学院中药研究所承办的综合性中药学术期刊。创刊于 1955 年 7 月,是创早最早、发行量最大的中药学术刊物。《中国中药杂志》全面反映我国中医科研最高学术水平,主要报道该领域新成果、新技术、新方法与新思路,内容包括栽培、资源与鉴定、炮制、药剂、化学、药理、不良反应、临床等。设有专论、综述、研究论文、研究报告、临床、学术探讨、药事管理、经验交流、信息等栏目。主要读者对象为医药领域各级管理部门、科研院所、大专院校、企业以及医院等从事医药科研、管理、生产、医院制剂及临床研究等方面的专业人员。

《中国中药杂志》现为半月刊,128 页,2011 年定价每期 30 元,全年 24 期定价为 720 元。国内刊号 11 - 2272/R,国际刊号 1101 - 5302。

本刊现已全面实现网络编辑办公,如欲投稿或联系本刊、获取本刊各种信息动态请登录中国中药杂志网站 [www.cjcmm.com.cn](http://www.cjcmm.com.cn) 或 [www.中国中药杂志.com](http://www.中国中药杂志.com)。

联系电话:稿件查询 010 - 64045830 转 602;主任电话 010 - 64058556;资源与栽培栏编辑:010 - 64048925;制剂栏编辑:010 - 64040392;化学栏编辑:010 - 64040113;药理栏编辑:010 - 84022522;临床栏编辑:010 - 64059766;电子杂志制作发行及网上维护:010 - 64030625。