

强心通脉微丸对心力衰竭大鼠血小板活化的影响

海 丽^{1*}, 刘芝新²

(1. 北京南苑医院, 北京 100076; 2. 辽宁省血栓病医疗中心, 辽宁 沈阳 110101)

[摘要] 目的: 探讨强心通脉微丸治疗心力衰竭的作用机理。方法: 制备心衰大白鼠模型, 随机分为模型组、强心通脉微丸中剂量组、强心通脉微丸大剂量组、科素亚组, 给药 8 周, 观察其一般状态、心功能指标、血清血栓素 B₂(TXB₂) 和心肌纤维电镜超微结构。结果: 西药组和中药中剂量组的各项指标改善最好。结论: 强心通脉微丸是防治心衰的有效降低血小板活化药物, 可以延缓心力衰竭的发生和发展。

[关键词] 强心通脉微丸; 心力衰竭; 血小板活化

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2006)11-0036-03

慢性充血性心力衰竭(CHF)是指在静脉回流正常的情况下,由于不同病因的心血管疾病发展到心脏功能受损,在有适量的静脉回流情况下,心脏不能维持足够的心排量,并致组织灌注减少,肺循环和/或体循环瘀血的一组病生理综合征。国内外研究证实,心力衰竭的病生理变化是由一系列复杂的分子和细胞机制引起的,导致全身性神经-体液调节因素的重大代偿性变化,而引起心肌纤维丧失、细胞骨架排列紊乱、胶原合成增加、心肌细胞Ca²⁺稳态紊乱、细胞因子激活、血小板活化等。其中血小板的激活程度与心力衰竭的程度具有一定的相关性,心功能越差,血小板的活性越高,血栓形成的危险性就越大,尤其易造成微血栓形成。提示血小板激活指标可以作为反映心功能状态的指标之一。本实验从中药对血小板活化影响角度探讨中药治疗心力衰竭的机理。

1 材料

1.1 动物 10~12 周龄的 Wistar 大白鼠 100 只, 雄性, 体重 250~280g, 由辽宁中医学院实验动物中心提供。

1.2 药物及试剂 强心通脉微丸(黄芪 213.7g、人参 213.7g、三七 85.5g、红花 85.5g、丹参 85.5g、益母草 85.5g, 以上 6 味, 粉碎成细粉, 过筛, 混匀, 每 100g 粉末用炼蜜 30g 加适量的水泛丸, 干燥, 制成 0.5g/粒的水蜜丸 1000g, 其中每 1g 含黄芪以黄芪甲苷 C₄₁

H₆₈O₁₄ 计, 不得少于 0.06mg), 由辽宁中医学院附属医院制剂室提供; 科素亚, 由杭州默沙东制药有限公司生产, 国药准字(2000037); 血栓素 B₂(TXB₂)、纤溶酶原激活物抑制剂(PAF-1)试剂盒, 购自苏州大学血栓与止血研究室, 试剂批号 MB0311。

1.3 仪器与器械 DH-1 小动物呼吸机, 浙江医科大学医疗仪器实验厂生产; MS-2000 多媒体化心电图软件, 主要由多功能程控生物信号放大器、生物信号采集吸收接口卡、计算机软件系统构成, 广州市龙飞达科技有限公司生产; SONOS5500 彩色多普勒超声心动图, Agilent 公司生产; JEM-1200EX 电子显微镜, 瑞典 LGD 公司生产; AO 石蜡切片机, Scientific instruments 生产。

2 实验方法

2.1 心力衰竭大鼠模型的制备 腹腔注射 5% 戊巴比妥钠(1~2mL/kg)麻醉^[1]。胸部去毛, 仰卧位固定于解剖台上, 75% 酒精消毒手术视野。行气管插管, 连接小动物呼吸机, 正压人工呼吸(潮气量 0.7~0.8mL, 呼吸频率 60 次/分)。用针形电极刺入四肢及胸壁皮下, 描记正常心电图(记录标准肢 II 导联及胸前导联, 纸速 50mm/s)。在无菌操作下, 于胸骨左侧第三、四肋间横向切开皮肤长约 1.5cm 的切口, 钝性分离软组织, 可见胸骨及肋软骨。沿第三、四肋间隙打开胸腔, 用开胸器撑开切口, 用眼科小镊子轻提心包膜, 用眼科小剪子剪开心包膜, 暴露心脏, 用镊子轻提左心耳, 于左冠状动脉前降支起源点下 2~4mm 处用 6 号丝线结扎左冠状动脉主干造成心肌梗塞模型。随即逐层缝合胸壁, 并于伤口处散以注射

[收稿日期] 2006-01-14

[通讯作者] * 海丽, Tel: (010) 67991313-8040

用青霉素钠。同时腹腔注射呋塞米 0.2mL/kg, 洛贝林 0.2mL/kg。术后记录标准肢导联及胸前导联心电图, ST 段弓背抬高者为造模成功。待动物恢复自主呼吸状态平稳后, 撤离呼吸机, 并注射青霉素钠 4 万单位, 日 1 次, 共 1 周, 防止感染。常规喂养饲料与水 1 周后, 于第 2 周将其饲料减半, 大鼠处于半饥饿状态, 常规喂水; 于第 3 周开始, 每天游泳 1 次, 致疲乏无力(约 20min); 于第 4 周做彩色超声多普勒心电图, 测定左室收缩末期容积(LVESV)、左室舒张末期容积(LVEDV)、左室射血分数(LVEF)、左室每搏输出量(SV), 进而计算出左室心指数(CI), $CI \leq 180 \text{ mL/min/kg}$ 者为心衰成功模型, 列入观察、实验对象, 并开始用药。

2.2 实验分组 正常对照组不进行任何处理, 其余大鼠按上述方法造模后, 符合诊断标准者随机分成 4 组: 即模型组(给生理盐水)、强心通脉微丸中剂量组($5.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、强心通脉微丸大剂量组($16.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、科素亚组($4.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), 均灌胃给药, 每日 1 次, 连续 8 周。

2.3 指标观察

2.3.1 心衰大鼠心功能的测定 动物造模成功, 分组饲养 4 周后, 做彩色超声多普勒心动图, 测定左室射血分数(LVEF)、左室收缩末期容积(LVESV)、左室舒张末期容积(LVEDV)、左室每搏输出量(SV), 各项数值均经计算机专用程序处理后获得。

心肌结构采样方法在用 5% 戊巴比妥钠麻醉状态下^[2], 打开胸腔, 取出心脏在左心室心尖部, 室间隔各取出约 100mg 心肌组织放入 1mL 的 PBS 预冷 EP 管中, 在冰浴条件下转速 < 12 000r/min, 超声波破碎心肌细胞, -4℃ 下转速 < 10 000r/min 离心 20min, 取上清液放入 -25℃ 冰箱内保存。

2.3.2 血清中 TXB₂ 的测定 ①血清样品的收集: 动物各组用药 8 周后, 在 5% 戊巴比妥(2~3mL/kg) 腹腔注射麻醉下开胸取左心室腔血 2mL, 注入试管中, 摇匀 -4℃ 3000r/min 离心 10min, 取血清置于 -20℃ 保存以测定 TXB₂、PAF-1; ②样品的测定: 用放射免疫法测定 TXB₂、PAF-1, 严格按照试剂盒说明书进行操作。

2.3.3 电镜标本的制作与观察 开胸取出心脏, 自房室沟切除心房, 冰生理盐水洗净血液, 用 3% 戊二醛将大鼠左心室固定后, 进行梯度酒精脱水、二甲苯透明、浸蜡包埋后切片, 切片平行于乳头肌。之后用

醋酸双氧钠溶液与柠檬酸铅溶液染色, 用透射电镜观察心肌组织的超微结构。

2.4 数据处理及统计检验 本实验中所有计量资料均以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$) 表示。采用 SPSS10.0 for windows 统计软件进行分析。

3 实验结果

3.1 各组大鼠一般状态比较 除正常对照组外, 其他各组大鼠在造模后均出现不同程度的蜷卧、脱毛、消瘦、四肢爪甲及皮肤颜色暗淡、呼吸急促、舌质紫暗、有瘀斑、活动能力下降、厌食、便溏等症状。其中以未经任何治疗的模型组最重。该组大鼠一般状态差, 表现为活动度显著下降, 进食及饮水量明显减少, 消瘦明显。各组大鼠治疗后状态普遍有所改善, 尤以强心通脉微丸中剂量组最为明显, 表现为消瘦不明显, 活动较多, 一般状态尚可。强心通脉微丸大剂量组和科素亚组同模型组相比, 一般状态也有所改善, 但不如强心通脉微丸中剂量组明显。

3.2 对心衰大鼠心功能的影响 心脏功能的测定是运用彩色多普勒超声心动图这一仪器, 主要测定收缩期容积(EVD)、每搏量(SV)、射血分数(EF), 见表 1。

表 1 强心通脉微丸对心衰大鼠心功能的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 (g/kg)	LVESV (mL)	LVEF (%)	LVEDV (mL)	SV (mL)
正常组	—	81 ± 11 ²⁾	79 ± 21 ²⁾	149 ± 16 ²⁾	68 ± 29 ¹⁾
模型组	—	191 ± 28	33 ± 28	265 ± 34	51 ± 17
科素亚组	0.0045	86 ± 32 ²⁾	71 ± 36 ²⁾	150 ± 19 ²⁾	62 ± 13 ¹⁾
强心通脉组	16.2	106 ± 21 ^{1,3)}	53 ± 28 ⁴⁾	167 ± 17 ^{2,3)}	61 ± 27 ³⁾
强心通脉组	5.1	98 ± 29 ²⁾	68 ± 26 ²⁾	165 ± 18 ^{2,3)}	63 ± 28 ¹⁾

注: 与模型组比较: ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, 与西药对照组比较: ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (下同)

3.3 对心衰大鼠血清中 TXB₂、PAF-1 水平的影响 见表 2。

表 2 强心通脉微丸对 CHF 大鼠血清中 TXB₂、PAF-1 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 (g/kg)	TXB ₂ (ng/mL)	PAF-1 (ng/mL)
正常组	—	32.45 ± 5.06 ²⁾	14.18 ± 2.15 ²⁾
模型组	—	123.69 ± 14.26	43.40 ± 7.65
科素亚组	0.0045	64.38 ± 7.50 ²⁾	29.71 ± 4.53 ²⁾
强心通脉组	16.2	41.75 ± 5.95 ²⁾	25.90 ± 6.29 ²⁾
强心通脉组	5.1	34.28 ± 4.57 ³⁾	15.04 ± 2.94 ³⁾

3.4 对心衰大鼠心肌组织超微结构的影响 正常电镜下可见心肌细胞模横纹清晰,肌细胞核位于肌原纤维下方,肌浆内线粒体数量较多,大小形态均一,无肿胀,嵴排列紧密,肌原纤维走行整齐,相邻肌纤维间有闰盘,闰盘位于细胞的两端。模型组可见心肌细胞超微结构有严重损伤,心肌细胞核固缩,部分边缘出现空白区域,现核仁、肌原纤维排列紊乱、断裂及缺失,相邻细胞间闰盘间隙增宽、紧密连接及桥粒连接消失,线粒体散布于细胞,普遍肿胀。科素亚组可见心肌细胞肌原纤维接近正常,排列较紧密,肌细胞核接近正常,线粒体体积变小,外形不规则,无纤维紊乱、断裂及缺失,较接近正常组。强心通脉大剂量组可见肌细胞肌纤维正常,排列紧密、肌细胞核正常、线粒体体积变小,外形欠规则,嵴密集、数量较多,与正常组比较接近。强心通脉中剂量组可见心肌细胞肌原纤维和肌细胞核均正常,嵴清晰,部分线粒体体积缩小,外形不十分规则,但总体上与正常组接近。

4 讨论

CHF 的主要病理生理学改变即心脏泵功能的下降^[3]。从本实验结果看出,模型组同正常对照组比较泵功能显著下降。强心通脉微丸中剂量组与科素亚量组在改善心脏收缩及舒张功能方面的作用大致相当,强心通脉微丸大剂量组在改善心脏收缩及舒张功能方面作用较弱。本研究结果表明:强心通脉微丸能够改善血流动力学各项指标,提高 LVEF、SV,降低 ESV、EDV,说明强心通脉微丸具有增强心肌收缩力,提高左室顺应性及改善心脏舒张功能的作用。

血小板在正常血液循环中处于静止状态^[4],当血管内皮损伤或在某些病理情况下,外界病理或生理刺激因子可促使血小板过度聚集导致血栓前状态或血栓栓塞症,引起或加重缺血性组织损伤。血栓素 A₂(TXA₂)是花生四烯酸的主要代谢产物。TXA₂可直接引起血小板聚集及 ADP 的释放,具有强烈的

血小板聚集和血管收缩作用。TXA₂本身很不稳定,在体液中的半衰期仅为 30~60s,然后迅速变成稳定的代谢产物 TXB₂,故常用 TXB₂反映 TXA₂的水平。本研究发现,血小板的激活程度与心力衰竭的程度有关,心功能越差,血小板的活性越高,血栓形成的危险性就越大,尤其易造成微血栓形成。提示血小板激活指标可以作为反映心功能状态的指标之一。心功能越差,血小板释放 PAF-1 越多,外周静脉血中浓度越高,血小板活化程度越高,血液高凝状态越重,故应警惕心衰患者血栓性并发症的发生,在心衰治疗过程中注意选择一些抗凝或抑制血小板聚集及黏附的药物,可能有利于改善心衰患者的临床症状及预后。

总之,心衰患者的高凝状态及血小板活化较严重^[5],可能与心衰的病程及预后有密切关系。强心通脉微丸大剂量、中剂量组和科素亚组血清中的 TXB₂,PAF-1 水平较模型组明显降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)说明强心通脉微丸能显著降低心衰大鼠血清中的 TXB₂,PAF-1 的水平,为临床应用该药治疗心力衰竭提供了理论依据。

[参考文献]

- [1] 济民.心力衰竭实验研究进展[J].基础医学,2002,22(1):14-16.
- [2] 杨丽霞.心力衰竭病人细胞因子与心功能的相关性研究[J].中国急救医学,2001,21(8):451-453.
- [3] 张艳,田金洲.益气活血中药联合西药治疗慢性心衰 60 例临床观察[J].北京中医药大学学报,2002,25(6):63-154.
- [4] 陈世德,陶新智,伍伟锋.心力衰竭患者血浆纤溶酶原激活物抑制物 I 与血管紧张素 II 相关性的研究[J].临床心血管杂志,2003,19(6):336-341.
- [5] 王志坚,赵水平.心力衰竭患者纤溶参数变化及药物干预效果的评价[J].中国循环杂志,2002,17(1):38-40.