

方药研究

从肝治心方对急性心肌梗死大鼠多器官
血管内皮生长因子表达的影响刘小雨¹ 王行宽² 杨孝芳² 戴小良²

摘要 目的:探讨从肝治心方(CGZXP)对急性心肌梗死(AMI)大鼠多器官血管内皮生长因子(VEGF)表达的影响。方法:大鼠AMI造模后分为CGZXP组和生理盐水(NS)组,每组分为3天、7天、14天、21天4个时间点,分别制备血浆及不同部位组织蛋白;制备含药血清,分为CGZXP高、中、低剂量和NS组;ELISA法检测以上血清、血浆及组织中VEGF含量。结果:各组含药血清及AMI大鼠血浆、肺、脾组织中均无或仅有微量VEGF表达;模型组各时间点心、肝、肾、大脑组织均可检测到VEGF分泌,其中梗死边界心肌VEGF含量高于梗死中心区;CGZXP组除AMI⁷天梗死中心、AMI³天肝脏VEGF无明显表达外,心、肝、肾、大脑各时间点均可见VEGF显著上调,较NS组差异有显著性($P < 0.01$)。结论:CGZXP可上调AMI大鼠缺血心肌VEGF蛋白表达,还能同时促进AMI后肾、脑、肝多器官组织不同程度分泌VEGF,可能对AMI后多器官缺血应激损伤有一定保护作用。

主题词 心肌梗死/中医药疗法 从肝论治 @ 从肝治心方

Effects of Conggan Zhixin Prescription on Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Multiple Organs in Acute Myocardial Infarction Rats

Liu Xiaoyu¹, Wang Xingkuan², Yang Xiaofang², et al.

(1. Huashan Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 410007; 2. The First Affiliated Hospital of Hunan College of TCM)

Objective: To explore effects of Conggan Zhixin Prescription (CGZXP) on vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in multiple organs in acute myocardial infarction (AMI) rats. **Methods:** AMI model rats were divided into a CGZXP group and a saline (NS) group. Plasma and tissue protein of different parts were prepared on 3rd, 7th, 14th and 21st day; Drug-containing serum were prepared in high, middle and low doses of CGZXP and NS groups. VEGF levels in the above serum, plasma and tissues were determined with ELISA. **Results:** There was no expression or micro-expression of VEGF in drug-containing serum in all groups, and plasma, lung and spleen tissues in AMI rats; The secretion of VEGF could be determined in the heart, liver, kidney and brain of the model group at all time points. Among them, VEGF content in the myocardium of the juncture of infarction was higher than that in the center of the infarction myocardium. In CGZXP group, VEGF expression in the infarction center on 7th day of AMI, in the liver on 3rd day of AMI, in the heart, liver, kidney and brain at all time points significantly upregulated with a significant difference as compared with NS group ($P < 0.01$). **Conclusion:** CGZXP can upregulate VEGF protein expression in ischemic myocardium in AMI rats, and promote secretion of VEGF in the kidney, brain, liver after AMI, and has a certain protective action on ischemic injury of multiple organs after AMI.

Key Words Myocardial infarction/TCM therapy; Treatment based on theory of the liver; @ Conggan Zhixin Prescription

血管内皮生长因子(VEGF)是血管生成的启动因素,参与并影响多种器官组织缺血损伤的发生和发展进程的调控,因此促进或维持VEGF的适当分泌能有效增加良性血管新生。目前对急性心肌梗死(AMI)后

多器官损伤VEGF表达差异的研究较少。我们前期研究^[1,2]发现,从肝治心方(CGZXP)对AMI有良好疗效及较明显的促血管生成效应,本研究进一步观察其对AMI后多器官VEGF表达的影响。

1 材料

1.1 动物:3月龄雄性Wistar大鼠,体重(260 ± 13.2)g,雌性日本大耳兔,体重(2.7 ± 0.25)kg,由北京大学动物科学部提供。

1.2 药品:CGZXP 功效:补气养营,疏肝理气,豁痰

基金项目:湖南省教育厅基金资助课题(202013)

1 复旦大学附属华山医院中西医结合研究所,上海市乌鲁木齐

中路12号(409994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net)

2 湖南中医学院第一附属医院

收稿日期:2005-03-28;修回日期:2005-08-01

化痰;组成:人参、白芍、姜黄、柴胡、熊胆、白芥子、九香虫。熊胆粉购自黑龙江黑宝药业集团熊场,其余药品均来自北京同仁堂总店,由北京中医药大学临床中药制剂室制作。白参单独打粉,过筛100目去渣皮。姜黄(打碎先煎)、柴胡、白芍加水煎煮两次,每次两小时,合并煎液过滤,滤液减压浓缩至相对密度为1.30~1.35(60度)的稠膏,真空干燥粉碎成细粉,过筛120目。所有药粉均合成混匀为干燥细粉置干燥皿中备用。临用前用生理盐水配制成溶液。

1.3 仪器及试剂:人 VEGF 定量试剂盒(Stancruz),酶标仪(Awvrotech),0.45 μm 滤器(Sigma 公司),蛋白酶抑制剂混合物(Invitrogen)。

2 方法

2.1 AMI 模型的建立及分组方法:大鼠乙醚麻醉后开胸,在心尖搏动最强处剪开皮肤,用止血钳扩开胸廓,用力挤出心脏。在肺动脉圆锥与左心耳交界下1~2mm处结扎左冠状动脉前降支,可见心前区立即变紫。迅速将心脏纳入胸腔,按压胸部,使其恢复自主呼吸,经心电图证实(I、aVL和V₅导联上出现大Q波)后,逐层缝合胸壁,术后注射青霉素抗感染。造模成功大鼠随机分成CGZXP组和生理盐水(NS)组,每组4个时间点(3天、7天、14天、21天),每时间点8只。造模后1小时,CGZXP组用CGZXP4.25g/kg体重加NS共3ml灌胃,每日两次;NS组用NS 3ml灌胃,每日两次。

2.2 血浆的制备:于大鼠AMI制备分组后各时间点,分别麻醉动物,开胸经心脏采血,EDTA抗凝,低温离心制备血浆。分组同上。

2.3 组织蛋白的制备:冰上操作收获CGZXP组、NS组4个时间点及心(梗死中心部位,梗死与非梗死交界部位)、肝、脾、肺、肾、脑的组织蛋白;RIPA法提取各组蛋白,分别测浓度后,-70℃备用。

2.4 含药血清的制备:选择日本大耳白兔12只,随机分为CGZXP高、中、低剂量(CGZXP-H,CGZXP-M,

CGZXP-S)组和NS组;每组3只。CGZXP 9只分别每日给予CGZXP临床等效用(22.26g/kg体重)的1/2(CGZXP-S)、1倍(CGZXP-M)、2倍(CGZXP-H);均溶于60ml的生理盐水中胃管灌胃;NS组每日给予生理盐水60ml胃管灌胃。除CGZXP-H组每日灌胃3次外,其余均为两次。3天后,于最后1次灌药1小时(灌药前禁食不禁水12小时)后,颈动脉插管采血,无菌分离血清,经56℃处理30分钟,分装后置-20℃保存,同组血清混和备用。实验时将血清溶化后,无菌0.45 μm微孔滤膜过滤。

2.5 ELISA 检测样品蛋白含量:采用双抗夹心ABC-ELISA法(人 VEGF ELISA 检测试剂盒),严格按照试剂盒操作说明书操作,样品在波长492nm处测吸光值,VEGF浓度与吸光值成正比。使用CurveExpert软件画标准曲线,根据样品OD值在该曲线图上读出相应VEGF含量,结果取平均值。

2.6 统计学方法:采用SPSS 11.5统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间及组内各时间点显著性检验采用t检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

3 结果

3.1 各组血清、血浆 VEGF 的变化:各组含药血清中均未发现 VEGF 的增强表达,如CGZXP-H:0.065±0.091;CGZXP-M:0.132±0.074,CGZXP-S:0.087±0.094,NS:0.109±0.104;含药血浆中也仅检测到 VEGF 的微量表达。表1示,CGZXP组与NS组比较,各时间点 VEGF 表达差异均无显著性($P > 0.05$)。提示CGZXP的促血管作用与血清、血浆中 VEGF 含量无关,其机制应是通过血液中其它促血管生成途径发挥作用。

表1 两组AMI大鼠不同时间血浆 VEGF 的表达(ng/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	3天	7天	14天	21天
CGZXP组	8	0.015±0.023	0.049±0.052	0.044±0.037	0.037±0.028
NS组	8	0.014±0.016	0.063±0.071	0.035±0.047	0.042±0.049

表2 两组AMI大鼠不同时间多器官 VEGF 的表达(ng/ml, $\bar{x} \pm s$)

时间	组别	鼠数	心		肝	肾	脑	肺	脾
			梗死中心部位	交界部位					
第3天	CGZXP组	8	2.08±0.25*	2.73±0.24*	0.76±0.17	2.30±0.30*	2.20±0.33*	0.17±0.15	0.01±0.03
	NS组	8	1.62±0.21	2.12±0.16	0.69±0.12	1.57±0.41	1.66±0.29	0.17±0.15	0.06±0.11
第7天	CGZXP组	8	2.44±0.25	3.16±0.33*	2.30±0.31*	3.15±0.37*	3.27±0.42*	0.15±0.17	0.03±0.04
	NS组	8	2.27±0.27	2.44±0.25	1.93±0.30	2.33±0.23	2.65±0.43	0.15±0.16	0.03±0.04
第14天	CGZXP组	8	2.53±0.31*	3.58±0.29*	2.65±0.41*	2.64±0.22*	2.83±0.39*	0.15±0.13	0.03±0.05
	NS组	8	2.03±0.28	2.53±0.31	2.34±0.39	2.14±0.24	2.37±0.29	0.14±0.13	0.04±0.06
第21天	CGZXP组	8	2.06±0.28	2.81±0.33*	2.24±0.28	2.60±0.24*	2.63±0.40*	0.16±0.13	0.04±0.06
	NS组	8	1.76±0.22	2.37±0.34	2.06±0.25	2.01±0.26	2.13±0.41	0.19±0.08	0.02±0.02

与NS组同项目比较,* $P < 0.01$

3.2 CGZXP 对AMI 大鼠多器官VEGF 表达的影响: 表2 示, NS 组大鼠AMI 后, 4 个时间点心、肝、肾、大脑组织中均可检测到 VEGF 不同程度的分泌, 提示 VEGF 分泌作为缺氧后应激反应参与了以上各重要器官缺血后的自我保护代偿机制。其中梗死边界心肌 VEGF 分泌高于梗死中心, 与微血管密度^[2]相一致。梗死中心 VEGF 分泌第 7 天时达到峰值, 14 天、21 天逐渐下降; 梗死边界心肌 7 天时分泌增多, 14 天达到峰值, 到 21 天逐渐下降; 肝脏组织较心、脑、肾分泌量少 ($P < 0.01$), 3 天时最低, 7 天、14 天逐渐增加, 21 天恢复到 7 天时的水平; 肾和大脑组织 7 天达到峰值, 然后逐渐下降至起始水平。CGZXP 组第 7 天的 AMI 梗死中心、第 3 天的肝、肺、脾几乎不分泌或仅有微量 VEGF 分泌; 心、肝、肾、大脑在各时间点均可显著上调 VEGF 蛋白的表达, 并且可在到达峰值后继续维持较长时间 ($P < 0.01$)。

4 讨论

系统器官之间存在微妙的相互依存关系以维持机体功能的整体性, 一个器官功能不全必然影响到其它器官。如 AMI 后梗死面积较大, 心肌收缩力下降, 迅速出现失代偿, 则易发生泵衰竭、低血压等, 泵衰竭时由于肺瘀血、水肿, 可致呼吸衰竭, 继之可有其它器官衰竭; 器官衰竭又反过来加重泵衰竭、休克, 发生或加剧微循环灌注障碍, 最终引起广泛组织细胞缺血缺氧, 导致各系统器官功能不全, 有时在同一患者可同时累及 2~5 个脏器。

近年来, AMI 作为脑卒中独立因素已引起重视, 在其导致的全身内脏器官功能改变中, 脑往往是首发的衰竭器官。研究表明, 心肌缺血再灌注 4 小时后就可以造成多部位脑组织损伤^[3], 而前壁心梗是 AMI 患者发生脑卒中最危险的因素^[4]。VEGF 对缺血脑细胞 DNA 损害与修复具有重要影响, 其表达与缺氧后新生血管形成存在密切关系^[5,6]。正常情况下, 脑和脑膜组织几乎不表达 VEGF, 但在急性脑缺血缺氧时, 组织血供不足和氧分压下降通常会诱导 VEGF 及其受体过量表达^[7], 有助于促进血管再通及血管新生, 是缺血损伤脑组织自我保护的应激反应之一。研究显示^[8~10], 脑梗死或缺血再灌注后, 挫伤灶周围神经细胞 VEGF 基因及受体表达先后在梗死边界及缺血中心明显增强, 24 小时达高峰, 其高水平持续到 48 小时、72 小时或 168 小时后恢复正常。本研究中缺血脑组织 VEGF 分泌较上述 VEGF 及其受体表达峰值及恢复时间普遍延迟, 但其表达消长规律基本与 AMI 心肌 VEGF 表达一

致。当阻断左前降支冠状动脉或右冠状动脉后, 由于心功能衰竭, 心输出量减少, 通过动脉压力感受器引起交感神经兴奋性增高, 可导致肾血流量减少, 肾小球滤过率下降, 血清尿素氮、肌酐升高。VEGF 主要位于肾小球脏层细胞及集合管上皮细胞^[11], 脏层细胞损伤时可释放大量的 VEGF, 血液中的高 VEGF 水平可促进肾小球毛细血管内皮细胞分裂并释放纤溶酶原、胶原酶等血管活性物质, 促进血管床重建^[12]。本研究中 AMI 大鼠肾脏不同时间点的 VEGF 分泌情况与 AMI 缺血心肌的 VEGF 分泌规律类似, 提示 VEGF 参与 AMI 后肾脏缺血应激损伤保护反应, CGZXP 可能在减轻 AMI 的同时, 同步上调肾损伤时 VEGF 的表达, 使肾缺血损伤随之好转。研究表明^[13,14], VEGF 表达水平与肝功能分级密切相关, 分级越低, 血中 VEGF 浓度越低。VEGF 表达增高可能与肝脏病变时血供相对减少、肝细胞缺氧有关, 而在肝脏广泛损伤的失代偿状态, VEGF 的表达则显著下降^[15]。说明肝在 AMI 缺血损伤时较肾、脑恢复得快, 可能与肝“藏血”功能有关, 但确切机制尚待研究。

参考文献

- 王行宽, 肖瑄. 心痛灵 II 号对结扎冠状动脉致大鼠心肌缺血的保护作用. 中国中医药科技, 2000, 7(6): 363~364.
- 刘小雨, 王行宽, 杨孝芳. 从肝治心组方对急性心肌梗死大鼠心肌毛细血管密度的影响. 中国中西医结合急救杂志, 2004, 11(1): 17~19.
- 王曙光, 徐小虎, 高庆春. 急性心肌缺血再灌注对脑组织的影响. 中国神经精神病杂志, 2001, 27(3): 215~216.
- 皮延生, 张薇, 施倡元, 等. 急性心肌梗死住院患者脑卒中危险因素的研究. 中华流行病学杂志, 2002, 23(6): 457~460.
- Yang ZJ, Bao WL, Qiu MH, et al. Role of vascular endothelial growth factor in neuronal DNA damage and repair in rat brain following a transient cerebral ischemia. J Neurosci Res, 2002, 70(2): 140~149.
- Harrigan MR, Ennis SR, Sullivan SE, et al. Effects of intraventricular infusion of vascular endothelial growth factor on cerebral blood flow, edema, and infarct volume. Acta Neurochir, 2003, 145(1): 49~53.
- Jin KL, Mao XO, Nagayama T, et al. Induction of vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor-1 alpha by global ischemia in rat brain. Neuroscience, 2000, 99(3): 577~585.
- Pichule P, Chavez JC, Xu K, et al. Vascular endothelial growth factor upregulation in transient global ischemia induced by cardiac arrest and resuscitation in rat brain. Brain Res Mol Brain Res, 1999, 74(1~2): 83~90.
- 刘亢丁, 宫萍, 吴江, 等. 在急性局灶性脑缺血早期 VEGF、FLT-1、FLK-1 mRNA 的表达及作用研究. 中风与神经疾病杂志, 2003, 20(1): 38~40.
- Sun Y, Jin K, Xie L, et al. VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia. J Clin Invest, 2003, 111(12): 1843~1851.

约获得所需要的学习内容,从而使教育机会均等,人人终身受教育成为可能。远程教育网络伸向农村、伸向医疗保健欠发达地区,为县级以上人群提供了以往大学教育所不能给予的学习机会,在一定程度上满足了农民提高医疗保健的需求,促进了中医药普及教育,促进了农村及贫穷地区医疗卫生保健事业的发展。

3 《中医内科学》远程网络教学多媒体课件的编制

本课程制作的总体指导思想是:在不破坏原教材线性层次结构的前提下,应用现代网络多媒体编制技术编制一套既可供中医院校在校本科生、专科生、留学生的学习教材,又可作为《中医内科学》基础理论多媒体教学的辅助课件,形成个体化交互式学习方式,为学生的自主学习提供及时而高效的助学支持服务,促进高等中医教育事业的发展。

课程编制内容主要来源于广州中医药大学自编教材《中医内科学》(丘和明主编,广东高等教育出版社出版),并参考统编教材《中医内科学》第五版和第六版以及《中医基础学》、《中医诊断学》、《方剂学》、《中药学》等。教学总目标要掌握中医内科学各病证的诊断、辨证和治疗方法,对于典型病例的诊断正确率应 $\geq 95\%$ 。为实现总目标,其分支目标应该是:(1)准确阐述各病证的定义;(2)正确阐述各病证的病因病机;(3)熟记各病证的证候特征与诊断标准;(4)能鉴别诊断类似病证;(5)熟练掌握各病证的辨证论治方法;(6)了解各病证的转归预后和预防与调摄方法;(7)对典型病例能正确诊断、辨证与治疗,突出重点、难点;(8)较全面了解各病证历代主要学术流派和现代研究进展。编制特点具有先进性、交互性、科学性、开放性。

本课程编制使用的媒体形式包括:(1)Web 页(文字素材):根据中医内科学理论性强的特点,仍将文本作为主要素材。(2)图象(jpg 或 gif):各病证的临床体征、舌象特点、相关现代医学影像学资料如X线片、B超、心电图等,还有部分病例的原始资料。(3)动画(gif 或 java):显示复杂的发病机制、临床模拟诊疗及原始病例。(4)音频:采用标准普通话解说,提供部分病证特

点如哮鸣、喘息音及背景音乐。(5)视频(asf):将大批临床资料经加工、剪辑成与教学目标同步配套的视频信号,并转换为流媒体,配以普通话同步解说。(6)临床模拟诊疗:以典型病例为蓝本制作,以二维、三维动画为主,配以文本、音频、视频等素材,采用部分现代医学辅助检查结果,采用互助式智能教学,模拟医生对患者的处置及患者的反馈,以提高学习者的临床技能。我们选用了网络编程语言Java进行编程,选择JDK 1.0以上、VJ++ 1.1以上版本集成环境作为系统编程工具;采用HTML、JavaScript、XML等语言制作课程Web页面,利用Dreamwaver及FrontPage 2000实现;使用Photoshop和PhotoStyler作为图像加工器,并以GIF或JEG格式存储,然后插接到网络课件;以Flash、3DS、3D-Max等合成器制作GIF动画,采用HTML技术实现动态效果;使用Premiere、Sonic Foundry Stream Anywhere、Window Media Toolkit、Gold-Wave等软件处理视频及音频信号;利用数据库系统实现搜索词条技术。我们使用上述各种开发工具编制出了集《中医内科学》课程信息(包括教学要求、安排、内容及教学资源等)、教学课程内容(总论和各论)、复习测试(作业、练习、病例)、教学指导(电子教案、教学大纲)、讨论天地(答疑、讨论)、目录导航及知识点检索(部分重点病证将汇编有关学术源流及最新进展)等为一体的直观易学、趣味性较浓的单机版和网络版远程多媒体教育课件。

本课件共编入《中医内科学》总论7章和各论47种病证,选择题及问答题2000多条,练习题约2000条,模拟试题8份,于2002年1月编制完成。多媒体课件的制作方式有很多,但这种有别于磁带录象式的网络课程,由于具有合理的教学设计,知识结构清晰明了,模块结构跳转灵活,交互性能好,适应个性化教学,且充分利用现代计算机网络多媒体技术制作,通用性强等特点,正被广大师生所接受。经过两年多的实际应用,课堂内外反映良好,已体现出较好的社会效益和经济效益。

(上接第300页)

- 11 Simon M, Grone HJ, Jöhren O, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in human renal ontogenesis and in adult kidney. *Am J Physiol*, 1995, 268(2Pt2): F240~250.
- 12 周智, 杨曦明, 李艳君, 等. 血浆血管内皮生长因子及血管紧张素Ⅱ与糖尿病肾病的关系. *中国病理生理杂志*, 2002, 18(5): 551.
- 13 施宝民, 杨镇, 张黎, 等. 癌变肝组织VEGF的表达与原癌基因c-fos, c-myc以及肝功能分级的相关性研究. *中华外科杂志*, 2001, 39(6): 466~468.

- 14 Akiyoshi F, Sata M, Suzuki H, et al. Serum vascular endothelial growth factor levels in various liver diseases. *Dig Dis Sci*, 1998, 43(1): 41~45.
- 15 Larcher F, Robles AI, Duran H, et al. Up-regulation of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in mouse skin carcinogenesis correlates with malignant progression state and activated H-ras expression levels. *Cancer Res*, 1996, 56(23): 5391~5396.