

益气活血方对大鼠缺血心肌血管新生及缺血心肌局部胰岛素样生长因子-1 表达的影响

韩丽华¹ 王振涛¹ 索红亮² 董晓瑞²

(1. 河南省中医院心血管病研究所, 郑州市东风路 6 号, 450002; 2. 河南中医学院)

[摘要] **目的** 探讨益气活血方对心肌梗死后大鼠缺血心肌局部血管新生的影响及其分子学机制。 **方法** 建立心肌梗死模型后, 将大鼠分为 5 组, 即益气活血方大剂量组(简称大剂量组)、益气活血方小剂量组(简称小剂量组)、麝香保心丸组、假手术组、模型组。灌胃 6 周后处死动物, 取心肌组织, 用免疫组化法测定梗死边缘区新生血管数(MVC)及微血管面密度(MVD); 检测缺血心肌局部胰岛素样生长因子-1(IGF-1)的表达。 **结果** 与假手术组相比, 模型组大鼠心肌梗死边缘区 MVC、MVD 及 IGF-1 的表达明显升高($P < 0.05$)。大剂量组梗死边缘区 MVC、MVD 明显升高, 与其他各组(除小剂量组外)比较差异均有显著性意义($P < 0.05$); 小剂量组有一定的促血管新生效应, 其 MVC 较模型组差异有显著性意义($P < 0.05$), MVD 虽高于模型组, 但两者比较差异无显著性意义($P > 0.05$)。大、小剂量组的 IGF-1 表达均高于模型组($P < 0.05$), 大剂量组与麝香保心丸组比较, 差异有显著性意义($P < 0.05$); 小剂量组与麝香保心丸组比较差异无显著性意义($P > 0.05$)。 **结论** 益气活血方大剂量组能够促进梗死后大鼠缺血心肌局部血管新生, 对缺血心肌具有保护作用, 上调心肌局部 IGF-1 蛋白表达可能是其作用机制之一。

[关键词] 益气活血方; 血管新生; 心肌梗死; CD34; 胰岛素样生长因子-1

Effect of Yiqi Huoxue Formula on Angiogenesis and Expression of IGF-1 in Ischemic Myocardium of Rats after Myocardial Infarction

HAN Li-hua¹, WANG Zhen-tao¹, SUO Hong-liang², et al.

(1. Institute of Cardio-Vascular Disease, Henan Provincial Hospital of Chinese Medicine, Zhengzhou 450002; 2. Henan College of Chinese Medicine)

ABSTRACT **Objective** To study the molecular mechanism and effect of Yiqi Huoxue Formula(YHF) on angiogenesis in ischemic myocardium of rats after myocardial infarction. **Methods** Myocardial infarction model rats were divided into large dose YHF group, small dose YHF group, Shexiang Baoxin Pill group, sham operation group and model group. Rats were executed and myocardium was taken after 6 weeks' intragastric administration. Microvessel counting(MVC), microvessel density(MVD) and insulin-like growth factor 1(IGF-1) were detected by immunohistochemical method. **Results** In comparison with sham operation group, MVC, MVD and IGF-1 increased significantly in model group($P < 0.05$). MVC and MVD in large dose YHF group increased significantly compared with other groups($P < 0.05$) except small dose YHF group. There was significant difference in MVC between small dose YHF group and model group($P < 0.05$). The expression of IGF-1 in both large and small dose YHF groups were higher than that in model group($P < 0.05$). **Conclusion** Large dose of YHF can enhance angiogenesis and protect myocardium in ischemic myocardium of rats after myocardial infarction, which may be relevant to its up-regulating the expression of IGF-1.

Key Words Yiqi Huoxue Formula; Angiogenesis; Myocardial infarction; CD34; Insulin-like growth factor-1

本研究观察了中药复方制剂益气活血方对实验性心肌梗死大鼠缺血心肌血管新生的影响, 并通过测定梗死边缘区心肌组织中胰岛素样生长因子(IGF-1)蛋白的表达来初步探讨其作用机制, 现报告如下。

1 材料

1.1 实验动物

雄性Wistar大鼠, 体重(230 ± 20)g, 由郑州大学动物中心提供, 合格证号: 410116。

1.2 药物及试剂

(1) 益气活血方组成: 人参1200g, 黄芪4000g, 黄精2400g, 赤芍4000g, 西红花200g。以上5味, 取人参、西红花分别粉碎成细粉, 各另器保存; 其余黄芪等3味加水煎煮2次, 每次2小时, 合并煎液, 滤过, 滤液浓缩至稠膏状, 加入上述人参细粉, 拌匀, 干燥, 粉碎成细粉, 再加入西红花细粉, 混合均匀。出膏率26.83%, 每克干浸膏相当于生药2.81g, 由河南省中医院制剂室提供。
(2) 麝香保心丸: 上海和黄药业有限公司生产, 批号: A 040214。
(3) 小鼠抗大鼠CD34单克隆抗体, 购自美国Santa公司; 兔抗鼠IGF-1多克隆抗体、生物素化二抗、

三抗、非免疫血清、DAB 显色试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 主要仪器

小动物呼吸机(江西特力麻醉呼吸设备公司,型号:TKR-200C);显微镜(日本OLYMPUS光学有限公司,型号:CH20BIMF200);石蜡切片机(德国蔡司公司,型号:HM 340E);BT 2000 医用图像分析系统(成都泰盟科技有限公司,3.6 Build 0211)。

2 方法

2.1 动物模型制备

按文献[1]方法,以 1%戊巴比妥钠腹腔注射(0.04g/kg)麻醉大鼠,背位固定,行气管插管术,连接小动物呼吸机,进行人工呼吸。开胸结扎左冠脉根部,结扎位点在左冠脉主干位于主动脉圆锥与左心耳之间的连线下 0.1cm 处,经体表心电图监测显示造成急性心肌梗死模型后,缝合胸壁,停止人工呼吸。术后注射青霉素 3 天以预防感染。

2.2 动物分组及给药方法

实验共分为 5 组,(1)益气活血方大剂量组(简称大剂量组):造模后每日管饲益气活血方干浸膏 3.84g·kg⁻¹·d⁻¹。(2)益气活血方小剂量组(简称小剂量组):造模后每日管饲益气活血方干浸膏 0.95g·kg⁻¹·d⁻¹。(3)麝香保心丸组:造模后每日管饲麝香保心丸 0.3g·kg⁻¹·d⁻¹。(4)模型组:造模后每日管饲与治疗组同等容积的生理盐水。(5)假手术组:手术方法同上,但在冠状动脉下穿线后打一松结,不进行药物干预,常规饲养。各治疗组均于造模后 24 小时内开始药物干预,6 周后处死,进行各指标的观察。

2.3 动物心肌取材方法

麻醉大鼠后迅速摘取心脏,剪去主动脉弓、右心室、心房、心耳等,在乳头肌横切面切取心肌组织(包括梗死区、移行区、健存区),10%中性缓冲福尔马林液固定,石蜡包埋,制备厚 4 μm 组织切片。

2.4 观察指标及方法

大鼠梗死边缘区心肌组织中微血管数(MVC)、微血管面密度(MVD)的测定用免疫组化法染色组织切

片。一抗工作浓度为 1:100。染色后血管内皮细胞被染成棕黄色。微血管判断标准:按参考文献[2]方法以 CD34 的表达来标记血管内皮,凡是染成棕黄色单个内皮细胞或内皮细胞簇均作为一个血管计数,凡管腔大于 8 个红细胞大小、带有较厚肌层的血管区域的血管均不计数。具体方法为:先在 40 倍视野下找到梗死边缘区,然后在 400 倍视野下(图像分析系统所取的视野)计数大鼠梗死边缘区新生 MVC,并用图像分析系统测定其阳性染色 MVD,每张切片随机选取 5 个视野,分别测定其 MVC、MVD,取平均值作为本例大鼠的 MVC、MVD 值。

大鼠梗死边缘区 IGF-1 的表达的测定用免疫组织化学法染色组织切片。兔抗鼠 IGF-1 多克隆抗体的工作浓度为 1:100,DAB 染色,IGF-1 蛋白的表达以细胞内出现棕黄色颗粒沉着为阳性反应。用病理图像分析系统计算心梗边缘区心肌每 400 倍视野中平均光密度。每张切片随机测定 5 个视野,取其均值作为该大鼠的光密度值(MOD)。其光密度大小与 IGF-1 蛋白表达水平呈正相关。

2.5 统计学方法

数据用平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,以 SPSS 11.5 统计分析软件处理,计量资料样本均数间多重比较用单因素方差分析(One-Way ANOVA)。

3 结果

3.1 各组大鼠心肌一般形态学观察

大剂量组、小剂量组、麝香保心丸组、模型组、假手术组均可看到新生的微血管。假手术组可见微血管增生不明显;模型组可见少量微管增生;麝香保心丸组、小剂量组可见较多增生的微血管;大剂量组可见多数增生的微血管。各组均可见到 IGF-1 蛋白表达,其中麝香保心丸组、大剂量组及小剂量组表达较显著。

3.2 各组大鼠梗死边缘区 MVC、MVD 及 IGF-1 蛋白表达比较

附表表示,模型组大鼠梗死边缘区 MVC、MVD 及 IGF-1 表达显著增多,与假手术组比较差异有显著性意义($P < 0.05$)。大剂量组梗死边缘区 MVC 和 MVD

附表 各组大鼠梗死边缘区 MVC、MVD 及 IGF-1 表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	剂量 (g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	MVC(个/视野)	MVD	IGF-1 表达(MOD)
假手术组	6	0	8.00±1.55*△	0.0065±0.0010*△	0.1425±0.0342*△
模型组	7	0	11.55±1.03#△	0.0207±0.0033#△	0.2179±0.0197#△
麝香保心丸组	9	0.03	15.98±0.93*#	0.0303±0.0035*#	0.3370±0.0328*#
小剂量组	8	0.95	14.61±1.42*#	0.0264±0.0042#	0.2931±0.0255*#
大剂量组	8	3.84	17.11±1.46*#	0.0314±0.0053#	0.3811±0.0309*#

©1994-2021 China Academic Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

与模型组比较,* $P < 0.05$;与假手术组比较,# $P < 0.05$;与麝香保心丸组比较,△ $P < 0.05$

明显增多,与其余各组(除小剂量组外)比较差异有显著性意义($P < 0.05$);小剂量组梗死边缘区 MVC 较模型组明显增多($P < 0.05$),其 MVD 在麝香保心丸组与模型组之间,但与两组比较差异均无显著性意义($P > 0.05$)。大剂量组、小剂量组和麝香保心丸组 IGF-1 蛋白表达较模型组明显增高($P < 0.05$);大剂量组 IGF-1 蛋白表达比麝香保心丸组高($P < 0.05$)、小剂量组与麝香保心丸组比较差异无显著性意义($P > 0.05$)。

4 讨论

心肌梗死属于中医学“胸痹”、“真心痛”等范畴。近年来多数医家达成共识,冠心病为本虚标实之证,气虚血瘀证是其常见的主要证型之一,因此益气活血法成为治疗心肌梗死的重要治法。我们结合长期临床经验拟定了益气活血方,临床上用于治疗心肌梗死后气虚血瘀证。全方由黄芪、人参、黄精、赤芍、西红花组成,诸药合用,使气旺、血活、瘀散、痹除。长期临床实践证实,本方可以改善患者的临床症状和心功能,提高生活质量。以往动物实验亦研究证实本方可以降低血小板聚集、逆转心室重塑、抑制心肌细胞凋亡等^[3,4]。新近研究表明,促缺血心肌血管新生疗法可能诱使冠脉侧支循环的形成和开放,减轻心肌缺血,预防和逆转心室重塑,是缺血性心脏病的研究焦点。有研究证实某些益气、活血方药具有促血管新生作用^[5],据此我们推测血管新生可能是益气活,血方防治心肌梗死后心室重塑的机理之一。

本实验以麝香保心丸为对照,观察了心肌梗死后大鼠缺血心肌局部 MVC 和 MVD,以较特异和敏感的血管内皮细胞表面标志物 CD34^[6]来标记血管内皮细胞,用 MVC、MVD 来反映血管新生强度。实验结果显示,益气活血方能促进心肌梗死后大鼠缺血心肌局部的血管新生,改善缺血冠脉侧支循环,这为本方临床应用防治心肌梗死后心衰提供了依据。分子生物学研究表明,心肌缺血缺氧时的血管新生多是通过各种生长因子的作用而引起的,其中 IGF-1 起到一定的作用^[7]。心肌缺血缺氧时,包括 IGF-1 在内的生长因子表达增强。本研究测定了心肌梗死后大鼠缺血心肌局部的 IGF-1 蛋白表达的 MOD,发现各药物干预组的表达明显增强,并与反映新生血管强度的 MVC、MVD 显示了一定的相关性,这提示益气活血方的促血管新生作用可能与其诱导缺血心肌局部 IGF-1 蛋白表达有关。

实验中我们还发现,缺血心肌新生血管强度与 IGF-1 的表达在高度相关的同时并不完全一致,这提示中药干预血管新生的机制可能不仅仅是通过对 IGF-1 一种因子的作用,推测有多个因子参与了其促

血管新生过程的调控。而且,实验中益气活血方最佳有效剂量尚难以确定,仍有待于进一步深入研究。

参考文献

[1]王振涛,王硕仁,赵明镜,等.活血和益气方药对心肌梗死后左心衰大鼠左心室重构影响的比较研究.中国中西医结合杂志,2002,22(5):376~378.

[2]Tatsuta M, Iishi H, Baba M, et al. Attenuation by genistein of sodium-chloride-enhanced gastric carcinogenesis induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in Wistar rats. Int J Cancer, 1999, 80(3):396~399.

[3]韩丽华,吴鸿,王振涛,等.益气活血方对心梗后大鼠血小板聚集率和 APTT、PT、TT 的影响.江苏中医药,2005,26(1):55~56.

[4]王振涛,王硕仁,赵明镜,等.活血、益气方药对心衰大鼠心肌细胞凋亡及 Bax、Bcl-2 蛋白表达影响的研究.中华实用中西医杂志,2003,16(4):537~538.

[5]雷燕,王军辉,陈可冀.黄芪、当归配伍后促鸡胚绒毛尿囊膜血管生成的药效比较研究.中国中药杂志,2003,28(9):876~878.

[6]Kimura H, Nakajima T, Kagawa K, et al. Angiogenesis in hepatocellular carcinoma as evaluated by CD34 immunohistochemistry. Liver, 1998, 18(1):14~19.

[7]Donohue TJ, Dworkin LD, Lango MN, et al. Induction of myocardial insulin-like growth factor-1 gene expression in left ventricular hypertrophy. Circulation, 1994, 89(2):799~809.

(收稿日期:2006-01-06;修回日期:2006-05-15)

首届全国生殖医学论坛
征文通知

由中国中医药研究促进会主办的“首届全国生殖医学论坛暨生殖相关疾病诊疗技术学术研讨会”,将于2007年8月在吉林省珲春市召开,现征文如下。

1. 生殖相关疾病的中医、西医、中西医结合的基础与临床研究,包括常见男科和妇科疾病[不孕症、ED、前列腺疾病、盆腔炎、输卵管阻塞、女性和男性激素替代疗法(HRT)]的最新治疗技术进展及发展趋势。2. 辅助生殖技术的应用情况总结与探讨(超排卵方案、子宫内膜种植条件改善、IVF实验室建设、冷冻保存技术、减胎技术)。3. 男科及生殖实验室检测技术的应用与发展(精液及精子功能检测、遗传及基因检测技术)。4. 性传播疾病的检测及治疗技术交流等。5. 生殖医学领域新器械、新设备、新产品的研究与应用报告。

会议将出论文集,优秀论文将由学会推荐给《中华中医杂志》、《中华男科学杂志》、《中国男科学杂志》、《中国性科学杂志》等发表。会议还将增选中国中医药研究促进会生殖医学专业委员会副主任委员、常务委员、委员若干名,参会者授予国家级Ⅰ类继续教育学分12分。

参会报名及征文请寄:生殖医学专业委员会秘书处。地址:北京市朝阳区樱花园东街中日友好医院男科,100029。联系人:李三群。

征文请同时发电子版(E-mail:sanyitang@sina.com)。