

定心方对大鼠缺血及再灌注心律失常的保护作用及对核因子 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 活化的影响

贾钰华 周玉平 陈育尧 张云仙 孙学刚

(南方医科大学中医药学院中西医结合基础教研室, 广东省广州市白云区沙太南路 1023 号, 510515)

[摘要] **目的** 研究定心方对大鼠缺血及再灌注心律失常的保护作用及对心肌组织核因子(NF) κB 活化的影响。**方法** 用冠状动脉结扎及再松开的方法制备缺血及再灌注心律失常动物模型;记录 II 导联心电图,对心律失常进行评分;常规 HE 染色观察心肌组织的病理改变;免疫组化法检测心肌组织 NF- κB 的表达。**结果** 定心方干预后缺血及再灌注心律失常明显减轻($P<0.01$),心肌组织病理改变减轻,心肌组织 NF- κB 的表达明显减少($P<0.01$)。**结论** 定心方对大鼠缺血及再灌注心律失常具有良好的保护作用,抑制 NF- κB 的活化是其机制之一。

[关键词] 定心方;心肌;缺血再灌注;心律失常;NF- κB

Protective Effect of Dingxin Formula on Arrhythmia Rats with Myocardial Ischemical Reperfusion Injury and Its Effect on NF- κB Activation

JIA Yu-hua, ZHOU Yu-ping, CHEN Yu-yao, et al.

(Chinese Medical College of Southern Medical University, Guangzhou 510515)

ABSTRACT **Objective** To study protective effect of Dingxin Formula on arrhythmia rats with myocardial ischemical reperfusion injury and its effect on NF- κB activation. **Methods** Coronary artery was ligated and loosened again to establish arrhythmia rat models with myocardial ischemical reperfusion injury. Arrhythmia was scored by electrocardiogram. Pathological change and expression of NF- κB in myocardium were observed by HE stain and immunohistochemical method respectively. **Results** Dingxin Formula could reduce arrhythmia with ischemical reperfusion injury ($P<0.01$) and pathological change in myocardium, and decrease the expression of NF- κB significantly ($P<0.01$). **Conclusion** Dingxin Formula has a protective effect on arrhythmia rats with myocardial ischemical reperfusion injury by inhibiting NF- κB activation.

Key Words Dingxin Formula; Myocardium; Ischemical reperfusion injury; Arrhythmia; NF- κB

定心方(DXF)是南方医科大学附属南方医院心律失常专科经验方,临床研究^[1,2]表明其对多种心律失常有较好疗效,特别是对快速性心律失常效果显著。随着冠状动脉再通术等心脏溶栓疗法的广泛开展,缺血再灌注损伤越来越成为临床常见的病理现象,心律失常是其最主要的表现之一。心肌缺血再灌注损伤是阻碍缺血心肌从再灌注疗法中获得最佳疗效的主要原因,多种细胞的信号途径参与了缺血再灌注的病理生理过程,其中核因子 NF- κB 信号系统在心肌缺血再灌注损伤中发挥了关键性作用^[3]。本实验采用整体大鼠心肌缺血及再灌注心律失常模型,研究 DXF 抗心肌缺血及再灌注心律失常的作用,并探讨 DXF 对核因子 NF- κB 活化的影响,进一步阐明 DXF 治疗心律失常的作用机理。

1 材料和方法

1.1 动物模型制备

参照文献[4]方法稍加改进,成年雄性 Wistar 大鼠(体重为 250~300g,由南方医科大学动物中心提

供),3%戊巴比妥钠(0.15ml/100g)腹腔麻醉,仰卧固定四肢与头,双上肢与左下肢皮下插入针形心电图电极,连接心电图机和心电示波器(上海医用电子仪器厂),连续观察记录 II 导联心电图。气管切开插管,连接小动物呼吸机(第二军医大学研制,设置频率为 60 次/分,潮气量为 2ml/100g),在胸骨左侧第五肋间处切开胸壁,并沿胸骨左缘 2mm 处切断第四肋,切开心包膜,轻压胸壁挤出心脏,用细小弯针在冠状动脉左前降支下传一丝线,经此操作后,动物可能出现心律失常、血压下降,故需稳定 15 分钟再结扎冠状动脉。先在心脏表面垫一实心小塑料管(直径 1~2mm),结扎冠状动脉时打一活结,并把塑料管扎在结内,结扎后连续观测心电图 15 分钟,然后处死动物取心脏备用,缺血心律失常模型到此步骤即完成。若要制备再灌注心律失常则不处死,把活结打开,抽出塑料管,恢复冠状动脉灌注,连续观测再灌注期心电图 30 分钟,然后处死动物取心脏备用。

1.2 药物制备及给药方法

定心方由丹参、三七、苦参、黄连、酸枣仁、党参、灵芝、茯苓、瓜蒌、赤芍等 10 味药物组成,均购自南方医

科大学附属南方医院中药房。按上述组方配置混合,煎煮后浓缩调节至含生药 3.75g/ml 的药液,4℃冰箱保存备用。缺血加定心方组(I+DXF)、再灌注加定心方组(I/R+DXF)每天灌服 DXF 药液 1 次,连续 7 天,按大鼠与人体体表面积换算,灌胃量为每天 1ml/100g,末次给药两小时后进行手术,术后均不再给药。

1.3 实验分组及处理

48 只大鼠随机分成 6 组,每组 8 只,即正常组(N 组)、假手术组(SH 组)、缺血组(I 组)、再灌注组(I/R 组)、I+DXF 组、I/R+DXF 组。N 组不手术,监测心电图 15 分钟。SH 组开胸冠脉穿线但不结扎,监测心电图 15 分钟。I 组、I+DXF 组缺血 15 分钟、I/R+DXF 组缺血 15 分钟后再灌注 30 分钟。I+DXF、I/R+DXF 组灌服 DXF,其余各组均灌服等体积生理盐水。各组动物于实验结束后立即被处死,取左室结扎点以下的心肌先用预冷的生理盐水冲洗,再放入 10% 甲醛溶液中固定。

1.4 心律失常评分方法

根据 Ravingerova T 等的方法^[5]进行室性心律失常(VA)评分。无 VA 或有<5 次的室性早搏(VE),计 0 分;仅有≥5 次的 VE,计 1 分;仅有一阵<60 秒的室性心动过速(VT),计 2 分;有一阵≥60 秒的或多阵累计<60 秒的 VT,计 3 分;多阵 VT 累计>60 秒,计 4 分;出现室颤(VF),计 5 分;出现持续 5 分钟以上的 VF 或在观察期间死亡,计 6 分。I/R 组只计算再灌注期 30 分钟内发生的心律失常。

1.5 心肌 NF-κB 活化的检测

按 SABC 试剂盒(武汉博士德公司)说明操作,常规制作石蜡切片,按程序脱腊至水,3% H₂O₂ 灭活内源性酶,微波抗原修复,BSA 封闭液封闭,加兔抗大鼠 NF-κB p65 多克隆抗体(武汉博士德公司,稀释度为 1:100),冰箱中过夜后加羊抗兔 IgG,加酶标记物,DAB 显色,脱水,透明,封片。以细胞核内出现棕黄色颗粒为阳性标准。应用 Leica 图像系统,光学显微镜放大 400 倍,每张切片随机选取 5 个视野摄取图像保存分析。用 Imageproplus 5.0.1 图像分析系统,计算每个图像的 IOD 值(IOD 值=阳性区域总面积×阳性区域平均光密度),用 5 个视野图像的均值表示每张切片的 IOD 值。

1.6 统计学方法

计量数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 组织病理学观察

HE 染色光镜观察结果:N 组和 SH 组大鼠心肌细胞排列整齐,着色均匀,胞膜完整,无变性、坏死等改变;I 组和 I/R 组大鼠心肌细胞排列紊乱,着色不均匀,部分区域心肌细胞水肿,心肌纤维横纹不清或消失,核裂解消失;I+DXF 组和 I/R+DXF 组亦有心肌细胞变性与坏死改变,但程度较轻,着色相对均匀,水肿变性减轻,心肌坏死范围较小。

2.2 心律失常观测

附表示,N 组和 SH 组偶见室性早搏,未见其他心律失常。I 组 8 只大鼠均发生心律失常,主要发生在冠状动脉结扎 5~10 分钟,以 VE 和 VT 为主,还有窦性心动过缓和Ⅱ度房室传导阻滞,比 N 组明显加重($P < 0.01$)。I/R 组 8 只大鼠均发生心律失常(从冠状动脉再通时开始计算在内),大部分冠脉再通 1 分钟就开始出现,可见频繁 VE、VT、VF、Ⅱ度及Ⅲ度房室传导阻滞,其中 2 只大鼠因室颤死亡,比 N 组明显加重($P < 0.01$)。I+DXF 组有 6 只出现心律失常,主要是 VE 和短暂的 VT,比 I 组明显减轻($P < 0.05$)。I/R+DXF 组有 7 只出现心律失常,以 VE 和 VT 为主,比 I/R 组明显减轻($P < 0.05$)。

2.3 心肌 NF-κB 的活化

附表示,N 组和 SH 组大鼠心肌组织有少量量的 NF-κB 的表达,I 组和 I/R 组大鼠心肌组织中 NF-κB 的表达比 SH 组显著上调($P < 0.01$),I+DXF 组和 I/R+DXF 组大鼠心肌组织中 NF-κB 表达明显低于相应的 I 组和 I/R 组($P < 0.01$)。

附表 定心方对大鼠缺血及再灌注心律失常和 NF-κB 的活化的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	剂量 (g/kg 体重)	VA 评分	NF-κB(IOD 值)
N 组	8	—	0	1552.13±695.76
SH 组	8	—	0	1974.88±541.28
I 组	8	—	3.63±1.41*	21363.63±4404.91*
I+DXF 组	8	0.375	1.75±1.17△	1735.50±462.54△△
I/R 组	8	—	6.00±2.51*△△	21924.75±7603.07*
I/R+DXF 组	8	0.375	3.50±1.77☆	5304.00±1885.30☆☆

与 SH 组比较,* $P < 0.01$;与 I 组比较,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$;与 I/R 组比较,☆ $P < 0.05$,☆☆ $P < 0.01$

3 讨论

冠状动脉缺血引起的缺血性心脏病是心血管系统疾病死亡的主要原因,临床治疗主要是恢复冠状动脉血液供应,但许多患者恢复冠状动脉血供后,非但没有使病情减轻,反而引起更严重的再灌注损伤,主要表现为严重的心律失常和心功能不全等,因此,消除和减轻缺血后再灌注损伤已成为亟待解决的问题。

NF-κB 作为一种核转录因子,可调节多种蛋白基

因的表达,在许多细胞因子、黏附分子等基因的启动子或增强子上都有一个或几个 NF- κ B 结合位点,具有这些启动子或增强子的基因包括白细胞介素 1、白细胞介素 6、肿瘤因子 α 内皮细胞黏附分子、血管细胞黏附分子等,因此 NF- κ B 在机体的免疫应答、炎症反应中发挥了重要作用^[6]。心肌 I/R 损伤时,由于缺血和再灌注后氧化应激、复氧、内质网钙离子超载、游离基、一氧化氮(NO)和内毒素等因素激活 NF- κ B,导致多种炎症介质基因过度表达,进而造成心肌炎症反应、损伤、凋亡和坏死。有研究^[7]表明,抑制 NF- κ B 的活性对心肌缺血及再灌注损伤具有明显的保护作用。抑制核因子 NF- κ B 的活化,可望为缺血再灌注损伤的防治提供一条新的思路。

以往研究表明,定心方能明显地降低血小板膜黏附分子 CD41、CD62P 的表达^[8],降低心肌组织 TNF- α 的表达^[9],能抑制 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPK)信号通路的活化^[9]。P38MAPK 是 NF- κ B 的上游激酶,而 CD41、CD62P、TNF- α 可以是 NF- κ B 下游的激活物,因此我们推测,定心方的抗缺血及再灌注心律失常可能与影响 NF- κ B 这一中间关键环节的活化有关。本实验证明,定心方能明显抑制缺血及缺血再灌注心律失常大鼠心肌组织 NF- κ B 的活化,有明显的抗心律失常作用。DXF 以入心、肝经之苦参、黄连、丹参清心活血为主药,以酸枣仁、茯苓、党参、灵芝益气宁神为辅药,以三七、赤芍、瓜蒌祛痰化瘀为佐使,补虚泻实,标本兼治,共同发挥清心安神的作用。本实验表明,定心方能通过减少心肌组织 NF- κ B 的活化,减轻

心肌缺血再灌注损伤,对缺血及再灌注心律失常起到良好的防治作用,为其治疗缺血及再灌注心律失常进一步提供了理论依据。

参考文献

- [1]贾钰华,孙学刚,赵晓山,等.南方地区心律失常病证特点与中医药防治的临床研究.中医杂志,2003,44(3):202~204.
- [2]贾钰华,孙学刚,贾满盈,等.清心安神方治疗中老年冠心病室性早搏 107 例临床观察.中医杂志,2000,41(1):27~28.
- [3]Kagan-Ponomarev M Ia. Clinical value of some factors of gene transcription in heart diseases. Kardiologiya. 2004, 44(1):66~70.
- [4]徐叔云,卞如谦,陈修.药理实验方法学.北京:人民卫生出版社,2002:1022~1023.
- [5]Ravingerova T, Tribulova N, Slezak J, et al. Brief, intermediate and prolonged ischemia in the isolated crystalloid perfused rat heart: relationship between susceptibility to arrhythmias and degree of ultrastructural injury. J Mol Cell Cardiol. 1995, 27(9):1937~1951.
- [6]Baeuerle PA, Baltimore D. NF-kappa B: ten years after. Cell. 1996, 87(1):13~20.
- [7]Turan B, Saini HK, Zhang M, et al. Selenium improves cardiac function by attenuating the activation of NF-kappaB due to ischemia-reperfusion injury. Antioxid Redox Signal. 2005, 7(9~10):1388~1397.
- [8]孙学刚,贾钰华,陈育尧.定心方及丹参酮 II A 对心律失常大鼠血小板膜粘附分子表达的影响.中医杂志,2002,43(2):140~143.
- [9]赵晓山,贾钰华,姜勇,等.定心方对大鼠心肌缺血再灌注损伤时 p38 丝裂原活化蛋白激酶和肿瘤坏死因子- α 的影响.中国临床康复,2004,8(15):2882~2884.

(收稿日期:2006-05-31;修回日期:2006-07-28)

欢迎邮购下列图书

●《中医脾胃学说应用与研究》共分 5 部分,即:中医脾胃学说的文献研究、中医脾胃学说的现代研究、脾胃疾病临床证治研究、中医脾胃学说在临床各科应用研究,以及附篇。该书从古到今,从理论到实践,从脾胃系统到临床各科,较系统地全面地展示了脾胃学说的产生、发展过程和当代的实践、研究水平,既继承发展了以李东垣《脾胃论》为代表的先贤的脾胃理论,又为今后脾胃学研究工作向更深阶段发展提供了丰富的历史经验和资料。每册 39.00 元。

●《冠心病中西医结合诊疗学》是一本临床实用的中西医结合专著。系统地论述了冠心病的中西医基础理论;重点阐明了冠心病心绞痛、心肌梗塞、心律失常、心力衰竭及猝死的中西医结合治疗与进展;对目前临床能够开展的各种检查及对冠心病的现代治疗手段与进展、冠心病临床用药等作了详细的论述。每册:66.00 元。

●《乡药集成方》为现存最早的古代朝鲜官修方书。全书共 85 卷,凡 959 门,病源 931 种,载方 10706 首,附针灸法 1476 条,收乡药 630 余种。其中卷 1 至卷 75,介绍各科病证、方药及其它疗法;卷 76 至卷 85,专述乡药本草,并附有药物炮炙法。该书有论有方,熔中国传统医药与东医本地经验于一炉。每册 111.00 元。

●《中医脑病现代研究进展》是一部临床医学专著。收集、精选了建国以来中医脑病的理论研究和临床研究进展等资料,并结合作者的临床经验,系统地完整地阐述了近代中医脑病的临床研究成就、研究动态和发展。每册:36.00 元。

●《常用中草药药识别与应用》收录常用中草药 400 种,精选常用验方 5545 条,每种药均附有原型植物(动物)图,每种药均介绍其植物形态、生长环境、地、最佳采摘期、制药方法、药性、常用量、用药禁忌。每种药均附有多个常用处方和中草药中文名及学名索引。本书内容丰富,简明实用,可读性强。每册:35.50 元。

●《医学纲目》本书系明代医家楼英之代表作。全书共 40 卷,汇集明以前中医学术之大成,并结合个人见解分部论述,纲目清晰,资料丰富,内容包括阴阳脏腑、运气占候、各科病证诊治、针灸及调摄等。其特点是每论一证,先引历代有关论述,治法区分为正门与支门,取各家之长,体现同病异治的原则。该书是一部颇具法度的中医类图书。每册:98.50 元。

●《千金方衍义》每册:70.00 元。《千金要方》是孙思邈的一部划时代医学巨著,为历代医家研究发掘医学的一个宝库。由于其博大精深,绵历 1300 百余年,对其注释阐发无一人敢于问津。清代名医张璐凭藉 60 多年的临证体会,探琢磨研数十年,撰成《千金方衍义》一书,为历史上唯一一部《千金要方》注释之书。

●《中药现代临床应用手册》全书以病统药,以药领方,涉及 487 种疾病,介绍常用中药 550 余种。附有各地临床医家经验,证明确实有效的验方两千余首。本书内容详实,简明实用,集中反映了中药临床应用的最新进展,是提高临床疗效,改进用药方法,适合临床实用的工具书和参考书。定价 34.50 元。

●《全科医生处方手册》每册:37.00 元。本书按临床科别分系统介绍了常见疾病的用药要点,处方依据、处方药物组成、用法用量、用药说明等。突出临床用药的实用性、针对性,查找方便,可操作性强,是基层医生的一本必备药具书。书后附有药物过敏试验法、皮试药物浓度表、药物相互作用表等。

●《千金翼方译注》1916 页,每册:110.00 元。北京中医药大学钱超尘教授主编,现对该书进行首次诠释、校勘、语译。注释:包括词语、病名、地名、难字等注释。校勘。全书除卷九、卷十两卷以《伤寒论》十二个不同传本详密校勘外,其余二十八卷以注释为主。

以上书价均含邮资,汇款地址:北京东直门内南小街 16 号中医杂志医海林音像书店图书部收,邮编:100700,电话:010-64035632。