

实验研究

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2014.20.014

冠脉通片对心肌缺血再灌注损伤大鼠
心肌酶及心肌细胞凋亡的影响张翠香¹, 刘建勋^{*}, 李 丹¹, 李 磊¹, 付建华¹, 郑咏秋¹, 洪晓华¹,
侯金才¹, 杜雪梅², 张发昌²

(1. 中国中医科学院西苑医院, 北京市海淀区西苑操场 1 号, 100091; 2. 天津同仁堂集团股份有限公司)

基金项目: 国家科技重大专项资助项目 (2012ZX09301002-004, 2012ZX09103201-049)

摘要 **目的** 探讨冠脉通片对心肌缺血再灌注损伤的保护作用及可能作用机制。 **方法** 60 只 Wistar 大鼠随机分为假手术组、模型组、阳性对照组和冠脉通片高、中、低剂量组, 每组 10 只。阳性对照组给予复方丹参片 600 mg/(kg·d) 灌胃, 冠脉通片高、中、低剂量组分别给予冠脉通片 1200、600、300 mg/(kg·d) 灌胃, 假手术组和模型组给予等量生理盐水。各组均灌胃 5 天后, 除假手术组外其余各组大鼠心脏前降支结扎 40 min 后再灌注 120 min, 建立心肌缺血再灌注模型。比较各组大鼠心肌缺血再灌注损伤面积, 测定血清门冬氨酸氨基转移酶 (AST)、肌酸激酶 (CK)、肌酸激酶同工酶 (CK-MB)、肌钙蛋白 T (c-TnT) 的活性, 观察心肌缺血再灌注后心肌细胞的病理变化和细胞凋亡数量。 **结果** 冠脉通片高、中、低剂量组和阳性对照组大鼠心肌缺血再灌注损伤面积、细胞凋亡数量较模型组显著减少 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。除冠脉通片低剂量组 CK-MB 外, 各治疗组大鼠血清 AST、CK、CK-MB、c-TnT 活性均较模型组明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。 **结论** 冠脉通片能够改善心肌缺血再灌注的损伤程度, 可能与其改善心肌酶和减少心肌细胞凋亡有关。

关键词 心肌缺血再灌注; 冠脉通片; 心肌细胞; 心肌酶; 细胞凋亡

心肌缺血再灌注是冠心病心绞痛的主要发生机理, 其主要是由于冠状动脉痉挛或闭塞后再恢复血流导致心肌代谢功能障碍和形态结构改变, 心肌细胞缺血缺氧, 线粒体破坏, 细胞内酶等活性物质释放^[1], 同时心肌细胞的形态也发生病理变化, 细胞发生凋亡或坏死, 严重影响心脏的功能^[2]。冠脉通片有补肝益肾、活血化瘀、芳香开窍功效, 用于治疗心悸、胸闷、胸痛、头晕等。本研究通过观察冠脉通片对心肌缺血再灌注后心肌酶活性的变化、心肌病理形态的改变以及细胞凋亡的机制来进一步阐释该药物的可能作用机理。

1 材料和方法

1.1 动物

Wistar 大鼠 120 只, SPF 级, 雄性, 体重 220 ~ 240 g, 北京华阜康生物科技股份有限公司提

供, 动物合格证号: SCXK (京) 2009-0007。

1.2 实验药品及试剂

冠脉通片, 天津同仁堂制药厂, 批号: 2012090901, 由枸杞子、何首乌、淫羊藿、红花、石菖蒲、丹参、桑寄生、冰片组成; 复方丹参片, 320 mg/片, 上海雷允上药业有限公司, 批号 12060204。门冬氨酸氨基转移酶 (AST, 批号 20130805)、肌酸激酶 (CK, 批号 20130802)、肌酸激酶同工酶 (CK-MB, 批号 20130725)、肌钙蛋白 T (c-TnT, 批号 20130722) 试剂盒均为南京建成生物工程研究所产品; Tunel 凋亡检测试剂盒, Roche 公司, 批号 11684817910。水合氯醛, 天津市鼎盛鑫化工有限公司, 批号 20120912。

1.3 仪器

ALC-V8 型动物呼吸机 (上海奥尔科特生物技术有限公司); MPIAS-500 多媒体彩色病理图文分析系统 (同济医科大学); LST-003 型全自动生化

* 通讯作者: liujx0324@sina.com, (010) 62835644

分析仪 (日本日立公司); Synergy2 多功能微孔板检测仪 (美国 Biotek 仪器有限公司); NanoZoomer 2.0-RS 数字切片扫描系统 [滨松光子学商贸 (中国) 有限公司]。

1.4 动物分组及处理方法

120 只 Wistar 大鼠中 60 只用于生化指标的检测,另 60 只大鼠行心脏灌注固定后用于心脏病理形态的观察和凋亡的检测,两部分实验平行进行。60 只大鼠采用随机数字表法分为 6 组,每组 10 只。阳性对照组给予复方丹参片 600 mg/(kg·d) 灌胃,冠脉通片高、中、低剂量组分别给予冠脉通片 1200 mg/(kg·d)、600 mg/(kg·d)、300 mg/(kg·d) 灌胃,各组给药体积为 10 ml/kg;假手术组和模型组给予等量生理盐水。

各组均灌胃 5 天后,除假手术组外其余各组大鼠以 35 mg/kg 水合氯醛腹腔注射麻醉,仰位固定,接动物呼吸机,开胸,暴露心脏,于冠状动脉左前降支根部穿线 (0 号缝合线) 结扎,缝合胸壁,动物恢复自主呼吸,结扎 40 min 后再灌注 120 min^[3-4]。假手术组亦暴露心脏,不结扎,操作同其他各组。

1.5 观察指标及方法

再灌注 120 min 后,60 只大鼠腹主动脉取血,制备血清测定 AST、CK、CK-MB、c-TnT;心脏结扎线以下横切 5 片,N-BT 染色,采用多媒体彩色病理图文分析系统,以固定象距测量总心肌面积及缺血再灌注损伤心肌面积,观察心肌缺血再灌注损伤程度。另 60 只大鼠行 4% 多聚甲醛心脏灌注固定后,取材,在固定液中固定 24~48 h,脱水、透明、包埋、切片,进行常规 HE 染色和 Tunel 凋亡染色。血清心肌酶检测和 Tunel 凋亡染色均按说明书操作进行。染色后的心脏切片用数字切片扫描系统 (NanoZoomer 2.0-RS) 进行扫描分析。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 11.5 统计学软件进行分析,计量资

料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 t 检验。

2 结果

2.1 各组大鼠心肌损伤面积比较

表 1 示,假手术组大鼠心肌无损伤。与模型组比较,阳性对照组和冠脉通片高、中、低剂量组心肌损伤面积均显著减小 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),而各给药组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.2 各组大鼠血清 AST、CK、CK-MB、c-TnT 活性比较

表 2 示,模型组大鼠血清 AST、CK、CK-MB、c-TnT 活性均较假手术组明显增高 ($P < 0.01$);与模型组比较,除冠脉通片低剂量组 CK-MB 外,各治疗组大鼠血清 AST、CK、CK-MB、c-TnT 活性均明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),各给药组间比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠心肌损伤面积比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	损伤面积
假手术组	10	0
模型组	10	20.07 ± 4.663
阳性对照组	10	14.43 ± 4.895*
冠脉通片高剂量组	10	11.25 ± 5.222**
冠脉通片中剂量组	10	13.42 ± 4.677**
冠脉通片低剂量组	10	14.43 ± 5.335*

注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

2.3 各组大鼠心肌组织病理形态改变

在光学显微镜下,假手术组心内膜内皮完整,心肌着色均匀,心肌细胞排列整齐,胞膜完整,界限清楚,横纹清晰,核正常,无水肿,间质未见血管扩张及炎性细胞浸润。模型组大鼠心肌可见心肌着色不均,细胞界限不清,横纹消失,部分细胞核溶解,心肌组织片状坏死,心肌纤维断裂,排列紊乱;间质充血、水肿,炎细胞浸润,病变以内膜下较为严重。冠脉通片各剂量组大鼠心肌可见较多散在的坏死,少量炎细胞浸润,间质水肿充血,病变较模型组明显改善,随着用药剂量的增大,心肌损

表 2 各组大鼠血清 AST、CK、CK-MB、c-TnT 活性比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	CK (U/L)	AST (U/L)	CK-MB (U/L)	c-TnT (pg/ml)
假手术组	10	1117.6 ± 314.8	201.2 ± 35.29	684.12 ± 67.48	0.9232 ± 0.3308
模型组	10	3124.1 ± 872.2*	685.3 ± 132.86*	1326.70 ± 312.40*	6.8967 ± 1.6743*
阳性对照组	10	1861.3 ± 428.8 ^{△△}	401.0 ± 135.59 ^{△△}	873.30 ± 196.40 ^{△△}	3.2409 ± 1.4082 ^{△△}
冠脉通片高剂量组	10	1987.6 ± 509.1 ^{△△}	444.3 ± 130.53 ^{△△}	818.00 ± 151.90 ^{△△}	2.9117 ± 0.6478 ^{△△}
冠脉通片中剂量组	10	1998.8 ± 586.0 ^{△△}	484.2 ± 166.04 ^{△△}	1068.30 ± 154.70 [△]	3.4068 ± 1.3371 ^{△△}
冠脉通片低剂量组	10	2011.3 ± 575.1 ^{△△}	491.5 ± 143.42 ^{△△}	1107.60 ± 216.50	3.8591 ± 1.5912 ^{△△}

注:与假手术组比较,* $P < 0.01$,与模型组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$

伤程度有减小的趋势。阳性对照组可见心肌细胞水肿、散在片状坏死，间质见有炎细胞浸润，但较模型组减轻。

2.4 各组大鼠心肌组织凋亡细胞比较

光镜下凋亡的心肌细胞细胞核为深浅不一的棕褐色，坏死区细胞结构模糊不清；正常细胞核呈蓝色，细胞轮廓清楚。凋亡主要出现在心肌缺血再灌注损伤区和边缘区，假手术组心肌细胞偶见凋亡细胞，其他各组均有凋亡，以模型组最多，且可见凋亡小体。冠脉通片各剂量组随着药物剂量的增加，凋亡细胞的数量减少。阳性对照组与模型组比凋亡细胞数量减少。表 3 示，显微镜下每张切片计算心肌缺血再灌注损伤区和边缘区细胞凋亡的数量（400 倍下 10 个视野，不足 10 个视野的用 0 来补足），模型组大鼠心肌组织凋亡细胞较假手术组明显增加（ $P < 0.01$ ）；与模型组比较，阳性对照组和冠脉通片高、中、低剂量组凋亡细胞明显减少（ $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ）。

表 3 各组大鼠心肌组织凋亡细胞数量比较

组别	鼠数	凋亡细胞数量（个）
假手术组	10	2.01 ± 0.411
模型组	10	28.86 ± 0.362*
阳性对照组	10	10.29 ± 0.259△△
冠脉通片高剂量组	10	12.63 ± 0.231△△
冠脉通片中剂量组	10	15.34 ± 0.421△△
冠脉通片低剂量组	10	21.38 ± 0.325△

注：与假手术组比较，* $P < 0.01$ ，与模型组比较，△ $P < 0.05$ ，△△ $P < 0.01$

3 讨论

中医认为心肌缺血再灌注之前缺血心肌的病机是阳虚阴盛，而且缺血时间越长，阳虚阴盛越重；而再灌注之时，缺血心肌的阳气又骤然来复。一方面是阳虚阴盛已极，另一方面是阳气骤然来复，因此，极易形成阴盛格阳、阴阳格拒的病机，尤其是在阳气骤然来复的最初一瞬间，阴阳格拒最为严重^[5]。在心肌缺血再灌注形成之后，其病机是本虚标实，本虚为气虚、阳虚、阴虚；标实为痰浊、气滞血瘀，辨证分型各有差异^[6-7]。冠脉通片中枸杞子、桑寄生、何首乌能补益肝肾，淫羊藿能滋阴补阳、壮阳强身，石菖蒲与冰片能化痰开窍、化湿，红花与丹参能活血化瘀、行气止痛，故该方有活血化瘀、芳香开窍、补益肝肾之功效，常用于肝肾不足，痰瘀阻络之胸痹。

西医认为，急性心肌缺血再灌注损伤是由于冠

状动脉发生闭塞性后再通，造成供血急剧减少或中断后血流恢复，使心肌细胞生物膜损伤，通透性增加，心肌酶逸出^[8]。其中比较重要的有 AST、CK、CK-MB、c-TnT，AST 在心肌细胞中含量最高，临床一般常作为心肌缺血再灌注和心肌炎的辅助检查；CK 与 CK-MB 值增高，反映了心肌细胞的受损程度；c-TnT 是评估心肌细胞损伤的重要指标^[9]。本研究观察到，模型组心肌用 N-BT 染色后心肌损伤斑块明显，显示了病理模型的特征，而冠脉通片高、中、低剂量组均能够改善心肌缺血再灌注损伤程度，作用与复方丹参片相似，并能显著提高血清 AST、CK、CK-MB、c-TnT 活性，对心肌缺血再灌注损伤有明确的保护作用。

缺血缺氧后细胞一方面坏死死亡，另一方面也发生凋亡^[10]。研究证实，动物和人类心肌细胞在经历长时间的缺血后，出现明显的凋亡特征^[11-12]。本研究结果显示，细胞凋亡不仅存在于缺血再灌注灶中心，也存在于缺血再灌注灶边缘区和远处的存活心肌。冠脉通片显著改善了心肌细胞形态，减轻了细胞损伤，使心肌水肿、变性、坏死等病理形态显著减轻，炎细胞浸润、灶性坏死等也明显改善，且凋亡细胞的数量随着药量的增加有减少的趋势。

综上所述，冠脉通片对心肌缺血再灌注导致的心肌损伤有明确的保护作用，其可能与改善心肌酶和减少心肌细胞凋亡有关。

参考文献

- [1] 卞海,王雅娟,黄顺,等. 瓜蒌薤白白酒汤对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中成药,2013,35(11): 2347-2350.
- [2] 周朝伟,严冬. 心肌缺血再灌注损伤中医药研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报,2014,16(3): 217-219.
- [3] Murphy E, Steenbergen C. Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury[J]. Physiol Rev,2008,88(2): 581-609.
- [4] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理学实验方法[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社,2002: 1052.
- [5] 张东,管宏钟. 心肌缺血/再灌注损伤的中西医结合病理研究[J]. 中医杂志,2005,46(9): 702-704.
- [6] 韦红巧,杨林杰,李连达. 冠心Ⅱ号对急性心肌梗塞大鼠心肌损伤和心肌酶的影响[J]. 时珍国医国药,2008,19(7): 1552-1553.
- [7] 贾钰华,周玉平,陈育尧,等. 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κB活化的影响[J]. 中医杂志,2007,48(4): 357-359.
- [8] 郭武辉. 心肌标志物与心肌酶联合检测对急性心梗的

诊断价值 [J]. 航空航天医学杂志, 2013, 24(9): 1098 - 1099.

[J] 周玉娟, 魏继承, 张建军, 等. 葛根素预处理对心脏瓣膜置换术中血清肌钙蛋白-T 及 IL-6、IL-8 浓度的影响 [J]. 中医杂志, 2010, 51(S1): 239 - 240.

[10] Boyle AJ, Hwang J, Ye J, et al. The effects of aging on apoptosis following myocardial infarction [J]. Cardiovasc

Ther, 2013, 31(6): 102 - 110.

[1] 上官海娟, 徐江, 汤剑青, 等. 当归对心肌梗塞后心肌细胞凋亡及凋亡相关基因的影响 [J]. 武汉大学学报(医学版), 2005, 26(2): 172 - 177.

[2] 武小微, 张一娜, 滕宗艳. 人重组硫氧还蛋白对大鼠心肌缺血再灌梗塞范围和心肌凋亡的影响 [J]. 心血管康复医学杂志, 2009, 18(1): 26 - 31.

Effects of *Guanmaitong Tablets* on Cardiac Enzymes and Cardiac Myocyte Apoptosis in Rats with Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury

ZHANG Cuixiang¹, LIU Jianxun¹, LI Dan¹, LI Lei¹, FU Jianhua¹, ZHENG Yongqiu¹, HONG Xiaohua¹, HOU Jincal¹, DU Xuemei², ZHANG Fachang²

(1. Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091; 2. Tianjin Tongrentang Group Co., Ltd.)

ABSTRACT Objective To study the protective effect and possible mechanism of *Guanmaitong Tablets* on myocardial ischemia-reperfusion injury (MIRI). **Methods** Sixty rats were randomized into the sham operation group, model group, positive control group and *Guanmaitong Tablets* high-dose, middle-dose and low-dose groups, with 10 in each. The positive control group was gavaged with 600 mg/kg · d *Compound Danshen Tablets*. The *Guanmaitong Tablets* high-dose, middle-dose and low-dose groups were gavaged with 1 200 mg/kg · d, 600 mg/kg · d and 300 mg/kg · d of *Guanmaitong Tablets* respectively. The sham operation group and model group were gavaged with the same volume of normal saline. The intragastric administration lasted for 5 days. The rat models of MIRI were established in all groups except the sham operation group. The area of MIRI was compared among groups. The activities of aspartate aminotransferase (AST), creatine kinase (CK), CK-MB and cardiac troponin T (c-TnT) were detected. The pathological changes and number of apoptotic cells in myocardial cells were observed after MIRI. **Results** Comparing with the model group, the area of MIRI and number of apoptotic cells were significantly decreased in the *Guanmaitong Tablets* high-dose, middle-dose and low-dose groups and positive control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Comparing with the model group, the activities of AST, CK, CK-MB and c-TnT were significantly increased in all administration groups except CK-MB in the *Guanmaitong Tablets* low-dose group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** *Guanmaitong Tablets* can obviously relieve MIRI, which may be relevant to improving cardiac enzymes and reducing myocardial apoptosis.

Keywords myocardial ischemia-reperfusion; *Guanmaitong Tablets*; myocardial cells; cardiac enzymes; apoptosis

(收稿日期: 2013 - 12 - 31; 修回日期: 2014 - 04 - 22)

[编辑: 邓 媛]

欢迎邮购 《中医杂志》

2000 年合订本 85 元, 2001 年合订本 95 元, 2002 年合订本 105 元, 2003 年合订本 105 元, 2004 年合订本 115 元, 2005 年合订本 125 元, 2007 - 2010 年合订本每年 140 元。2011 年 (半月刊), 每册 9.80 元 (缺 5、6 期), 2011 - 2013 年合订本 (每年 4 本), 每年 280 元, 2014 年上半年合订本 (共 2 本) 200 元。《中医杂志》2006 - 2009 年增刊每册 40 元。以上免费邮寄, 如需挂号每件另加 3 元。

欲购者请汇款至北京东直门内南小街 16 号中医杂志社读者服务部, 邮编: 100700, 电话: (010) 64014411 - 3036

欢迎邮购 《中医杂志》光盘合订本

1951 - 1986 年 (4 张光盘) 480 元; 1987 - 1994 年 (1 张光盘) 260 元; 1995 - 2004 年 (1 张光盘) 280 元。光盘合订本为计算机用数据光盘, 收入了同期出版的全部《中医杂志》的内容, 可对所有文章进行任意字检索, 方便实用。

汇款地址: 北京东直门内南小街 16 号中医杂志社北京医海林音像书店, 邮政编码: 100700

电话: (010) 64035632

网址: <http://www.jtcm.net.cn>