

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2014.24.018

补肾活血方对急性心肌梗死大鼠早期心功能及内皮素-1、血管紧张素 II 的影响

杨伟峰¹, 陈 靓², 崔海峰¹, 李连达³, 郝 伟³, 雷洪涛^{*}

(1. 中国中医科学院医学实验中心, 北京市中医药防治重大疾病基础研究重点实验室, 北京市东城区东直门内南小街 16 号, 100700; 2. 湖北中医药大学药学院, 3. 中国中医科学院西苑医院)

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项 (2009ZX09301005-032); 湖北省自然科学基金资助项目 (2012FKB02102)

摘要 目的 观察补肾活血方对急性心肌梗死 (AMI) 大鼠早期心功能的影响并探讨其可能作用机制。方法 将 60 只 Wistar 大鼠随机分为模型组、假手术组、阳性药组及补肾活血方高、中、低剂量组, 每组 10 只。除假手术组外其余大鼠采用冠状动脉结扎法建立 AMI 大鼠模型。阳性药组予依那普利 0.2 g/(kg·d) 灌胃, 补肾活血方高、中、低剂量组分别予补肾活血方生药 10、5、2.5 g/(kg·d) 灌胃, 假手术组与模型组予等量生理盐水灌胃。14 天后, 采用高分辨率超声影像系统测量大鼠左心室舒张末期前壁厚度 (LVAWd) 与后壁厚度 (LVPWd)、左室舒张末期内径 (LVIDd) 和收缩末期内径 (LVIDs), 计算左室舒张末期和收缩末期容积 (LVEDV, LVESV) 及射血分数 (EF)、短轴缩短率 (FS)、每搏输出量 (SV), 评价各组大鼠心脏结构和功能变化。ELISA 法检测各组大鼠血清内皮素-1 (ET-1)、血管紧张素 II (Ang II) 水平。结果 与模型组比较, 补肾活血方各剂量组 LVAWd 均显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), LVIDs、LVIDd、LVEDV 呈现减小趋势但差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 补肾活血方高剂量组与阳性药组 EF、FS 显著升高 ($P < 0.01$); 补肾活血方各剂量组血清 Ang II 水平明显下降 ($P < 0.01$), ET-1 水平呈现减小趋势但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 补肾活血方可在心肌梗死早期调节心室重构、改善心脏功能, 其机制与调节 AngII、ET-1 水平有关。

关键词 补肾活血方; 心肌梗死; 心功能; 内皮素-1、血管紧张素 II

目前急性心肌梗死 (AMI) 后常规的药物治、介入技术等手段可明显降低患者的死亡率, 然而 AMI 后心力衰竭的发病率仍居高不下^[1]。因此如何最大限度地阻止和延缓 AMI 后心室重构和心衰的进展, 抑制 AMI 后心肌组织纤维化过程成为预防和治疗 AMI 的目标和重点。研究表明肾素-血管紧张素系统 (RAAS)、内皮系统的过度激活, 血管紧张素 II (Ang II)、醛固酮 (Ald)、内皮素-1 (ET-1) 等大量释放与 AMI 后早期心室重构、心力衰竭、室壁瘤形成等密切相关^[2-3]。补肾活血方是在温肾活血化瘀法治疗冠心病的中医理论指导下, 经长期实践而得出的经验方。本方由淫羊藿、丹参等组成, 具有益阳补气, 活血通络之功效。前期实验结果证实补肾活血方可抑制 I 型、III 型胶原纤维的合成, 减轻 AMI 后心肌纤维化程度^[4]。本

研究通过观察补肾活血方对 AMI 模型大鼠早期心功能及 ET-1、Ang II 水平的影响, 以期为其临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 Wistar 大鼠 60 只, 雄性, 体重 (200 ± 10) g, 购于北京华阜康生物科技股份有限公司, 动物许可证号: SCXC (京) 2009-0004。

1.2 主要药品与试剂

补肾活血方 (处方: 淫羊藿、丹参等), 由中国中医科学院西苑医院实验中心制备为含生药 1 g/ml 的浸膏; 马来酸依那普利片 (5 mg/片, 购自扬子江药业集团江苏制药股份有限公司, 国药准字: H32026568)。大鼠 Ang II、ET-1 ELISA 试剂盒 (批号: KB2751、KB3100) 均购自上海凯博生化试剂有限公司。

* 通讯作者: riantian@163.com, (010) 64014411 转 2560

1.3 主要仪器

Vevo770 高分辨率超声影像系统 (17.5 MHz RMV-716 探头, 加拿大 Visual Sonics 公司), 352 型酶标仪 (芬兰 Labsystems Multiskan MS 公司), AC8 洗板机 (芬兰 Thermo Labsystems 公司)。

2 方法

2.1 模型制作

AMI 大鼠模型参考文献 [5] 方法制备。腹腔注射 3.5 g/kg 水合氯醛麻醉大鼠, 仰卧固定、胸部备皮, 于胸骨左侧第四、五肋间开胸, 剪开心包, 暴露心脏, 将心脏挤出, 左心耳根部下方 2~3 mm 处穿线、结扎冠状动脉左前降支, 关闭胸腔, 缝合胸壁, 青霉素连续用药 3 天预防伤口感染。假手术组除不结扎冠状动脉外, 其余操作与模型制备相同。

2.2 动物分组及给药剂量

将大鼠以随机数字表法分成模型组、假手术组、阳性药组及补肾活血方高、中、低剂量组, 每组 10 只。于造模动物清醒 1h 后, 补肾活血方高、中、低剂量组大鼠参考文献 [6] 分别给予补肾活血方生药 10、5、2.5 g/kg 灌胃。阳性药组给予依那普利 0.2 g/kg 灌胃 (相当于成人临床等效剂量), 模型组和假手术组给予等量生理盐水灌胃, 每日 1 次, 共 14 天。在实验过程中假手术组及补肾活血方高、中剂量组大鼠各死亡 1 只。

2.3 观察指标及方法

2.3.1 超声检测 于给药后第 14 天, 麻醉大鼠, 采用 Vevo770 高分辨率超声影像系统, RMV-716 探头 (频率 17.5 MHz) 进行超声心动图检查 [7]。分别测量左室舒张末期前壁厚度 (LVAWd) 与后壁厚度 (LVPWd)、左室舒张末期内径 (LVIDd) 和收缩末期内径 (LVIDs), 计算左室舒张末期容积 (LVEDV) 和左室收缩末期容积 (LVESV)、射血分数 (EF)、短轴缩短率 (FS)、每搏输出量 (SV)。所有超声检测值均取 3 个连续心动周期的平均值。

2.3.2 血清 ET-1、Ang II 检测 超声检测结束后, 腹主动脉采血, 3000 r/min 离心 10 min, 取血清, 采用 ELISA 法分别检测各组大鼠 ET-1 和 Ang II 水平, 操作严格按照试剂盒说明书。

2.4 统计学方法

采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 各组大鼠心功能观察

模型组大鼠二维超声显示左室前壁变薄, 运动减弱或消失。假手术组大鼠二维超声显示左室室壁厚度均匀, 左室前壁及后壁随心动周期运动良好。阳性药组大鼠及补肾活血方高、中、低剂量组大鼠二维超声左室前壁及后壁运动与模型组比较均有一定程度的改善。

3.2 各组大鼠心脏左室结构相关指标比较

表 1 示, 与假手术组比较, 模型组 LVAWd 明显变薄, LVIDs 及 LVIDd 明显增大 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 补肾活血方各剂量组和阳性药组 LVAWd 均有显著改善 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), LVIDs、LVIDd 呈现减小趋势, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3.3 各组大鼠心脏左室功能相关指标的比较

表 2 示, 与假手术组比较, 模型组 LVEDV、LVESV 明显增大, EF、FS 明显减少 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 补肾活血方高剂量组和阳性药组 EF、FS 显著升高 ($P < 0.01$), 补肾活血方各剂量组 LVEDV 有下降趋势, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。各组 SV 比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3.4 各组大鼠血清 ET-1、Ang II 水平比较

表 3 示, 与假手术组比较, 模型组大鼠血清 ET-1、Ang II 水平显著增加 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 阳性药组大鼠血清 ET-1、Ang II 水平显著下降 ($P < 0.01$); 补肾活血方各剂量组大鼠血清

表 1 各组大鼠心脏左室结构相关指标比较 (mm, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	LVAWd	LVPWd	LVIDd	LVIDs
模型组	10	0.88 ± 0.22*	1.43 ± 0.14	9.09 ± 0.64*	7.30 ± 0.61*
假手术组	9	1.53 ± 0.11	1.58 ± 0.17	7.87 ± 0.39	4.51 ± 0.67
阳性药组	10	1.26 ± 0.28 ^{△△}	1.44 ± 0.11	8.59 ± 0.61	6.25 ± 1.06
补肾活血方高剂量组	9	1.28 ± 0.23 ^{△△}	1.43 ± 0.09	8.70 ± 0.78	6.56 ± 1.54
补肾活血方中剂量组	9	1.29 ± 0.22 ^{△△}	1.43 ± 0.16	9.04 ± 1.01	7.34 ± 1.05
补肾活血方低剂量组	10	1.11 ± 0.19 [△]	1.42 ± 0.13	9.38 ± 0.90	7.26 ± 1.13

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

表 2 各组大鼠心脏左室功能相关指标的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	LVEDV (ml)	LVESV (ml)	EF (%)	FS (%)	SV (ml)
模型组	10	505.18 ± 56.56*	283.32 ± 52.62*	40.95 ± 10.30*	23.97 ± 6.14*	236.75 ± 40.25
假手术组	9	333.20 ± 37.53	82.37 ± 30.03	75.05 ± 6.57	45.79 ± 6.12	231.00 ± 26.16
阳性药组	10	429.25 ± 59.71	204.71 ± 78.02	59.71 ± 12.04 [△]	33.99 ± 9.94 [△]	245.24 ± 27.31
补肾活血方高剂量组	9	443.52 ± 67.54	275.19 ± 118.87	55.44 ± 13.18 [△]	33.73 ± 8.01 [△]	236.35 ± 35.48
补肾活血方中剂量组	9	461.38 ± 106.77	290.84 ± 84.14	45.96 ± 11.37	30.76 ± 9.69	236.17 ± 21.08
补肾活血方低剂量组	10	495.68 ± 98.50	285.66 ± 93.77	44.68 ± 9.34	23.62 ± 5.80	219.83 ± 33.56

注: 与假手术组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.01$

表 3 各组大鼠血清 ET-1、Ang II 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	ET-1	Ang II
模型组	10	149.81 ± 14.91*	402.96 ± 17.18*
假手术组	9	105.60 ± 6.55	281.23 ± 18.03
阳性药组	10	122.75 ± 6.62 [△]	292.08 ± 22.21 [△]
补肾活血方高剂量组	9	131.88 ± 11.15	351.57 ± 16.33 ^{△#}
补肾活血方中剂量组	9	139.28 ± 6.72	366.96 ± 18.96 ^{△#}
补肾活血方低剂量组	10	134.40 ± 15.91	375.87 ± 18.39 ^{△#}

注: 与假手术组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.01$; 与阳性药物组比较, $\#P < 0.01$

Ang II 水平显著下降 ($P < 0.01$), 而 ET-1 水平仅呈现下降趋势, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。补肾活血方各剂量组 Ang II 水平与阳性药组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

4 讨论

AMI 后心室重构是指 AMI 后所产生的心室形状、大小和功能状态的改变, 以心肌细胞肥大、心肌组织纤维化等病理改变为主, 表现为心室扩张、心肌肥厚、心功能恶化^[1]。早期心室重构主要表现为 AMI 后梗死区室壁局限性变薄、扩张和膨出。梗死区心室壁在左室腔压力作用下形成膨展, 该过程始于 AMI 后数小时, 1~2 周时最重, 4~6 周时结束^[2]。梗死区膨展与 AMI 后严重并发症密切相关, 早期的左室扩大、真性室壁瘤及后期的心力衰竭等多在梗死区膨展基础上形成。及早、有效控制 AMI 心室重构, 阻止和/或延缓心力衰竭的发生可在很大程度上改善临床症状, 提高生活质量, 降低病死率。

AMI 后机体的神经内分泌系统过度激活, 其中肾素-血管紧张素系统活性增强, 循环及心肌局部高水平的 Ang II 可通过促进心脏纤维母细胞增殖和细胞外基质 (ECM) 产生, 促进纤维原细胞内 I 型和 II 型胶原合成, 抑制基质金属蛋白酶 I 活性等作用促进心肌细胞肥大、抑制胶原的降解、诱导纤维化, 从而在 AMI 后心室重塑和心力衰竭的发生中发挥着至关重要的作用^[3-10]。ET 可激活交感神经及肾素-血管紧张素系统, 使心肌细胞肥厚、细

胞凋亡, 心室重塑和纤维化, 进一步造成心脏舒缩功能障碍^[11]。ET 还能刺激 Ang I 转变为 Ang II, 增强 Ang II 引起醛固酮分泌而影响心室重构^[12]。此外, ET-1 可收缩外周血管和心肌微血管, 导致心脏后负荷增加和心肌微血管床血流灌注障碍, 加剧心功能和循环功能衰竭, 进而导致心衰^[13]。

补肾活血方由淫羊藿、丹参等组成, 研究表明淫羊藿可降低 ET 蛋白的表达^[14]; 以丹参为主药的组方^[15-16]也可通过降低 ET 水平发挥保护心肌作用。本实验超声结果表明, 模型组大鼠不仅出现左心室形态上的变化 (前壁变薄、心室扩大), 而且出现部分收缩、舒张功能的降低。补肾活血方干预后显著改善 LVAWd、EF、FS ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 并使 LVIDs、LVIDd、LVEDV 呈现减小趋势 ($P > 0.05$), 提示补肾活血方能在一定程度上改善 AMI 后左心室形态上的变化和收缩、舒张功能, 且以补肾活血方高剂量在改善心功能方面作用较好。各组 SV 比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 提示大鼠在 AMI 后心脏功能仍能有效代偿, 满足机体需要, 并未出现心衰表现。补肾活血方各剂量组大鼠 Ang II 水平较模型组明显下降 ($P < 0.01$), 而 ET-1 仅呈现下降趋势而差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。本次研究结果提示, 补肾活血方可通过干预肾素-血管紧张素系统降低 Ang II 水平, 调节 ET-1 水平, 减轻 AMI 后早期出现的不良病理反应, 早期发挥调节心室重构的作用, 改善心脏功能, 有效防治 AMI 后心力衰竭的发生。

参考文献

- [1] Velagaleti RS, Pencina MJ, Murabito JM, et al. Long-term trends in the incidence of heart failure after myocardial infarction [J]. Circulation, 2008, 118(20): 2057-2062.
- [2] 任毅, 曹政, 朱成刚, 等. 血浆大内皮素、N 末端脑钠肽水平与急性心肌梗死后室壁瘤形成的关系 [J]. 临床心血管病杂志, 2008, 24(10): 761-764.
- [3] 甘慧敏, 车京津, 邵元霞, 等. 血管紧张素 II、醛固酮与 TIMI 积分和心肌梗死后早期心室重构的关系 [J]. 天津医科大学学报, 2012, 18(1): 47-49.

- ④ 杨伟峰,李贻奎,杨斌,等. 补肾活血方对大鼠心肌梗塞后心肌纤维化干预作用的实验研究 [J]. 中国新药杂志, 2011, 21(15): 1792-1797.
- ⑤ 李贻奎,宁可永,梁嵘,等. 大鼠冠状动脉结扎心肌缺血模型方法的改进 [J]. 中国新药杂志, 2005, 14(4): 427-428.
- ⑥ 黄颖,李贻奎,崔海峰,等. 高频率超声影像在急性心肌梗死大鼠心功能评价中的应用 [J]. 中国超声医学杂志, 2012, 28(8): 676-679.
- ⑦ Pelouch V, Dixon IM, Golfman L, et al. Role of extracellular matrix proteins in heart function [J]. Mol Cell Biochem, 1993, 129(2): 101-120.
- ⑧ Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction, experimental observations and clinical implications [J]. Circulation, 1990, 81(4): 1161-1172.
- ⑨ Cleutjens JP, cremers EE. Integration of concepts: cardiac extracellular matrix remodeling after myocardial infarction [J]. J Card Fail, 2002, 8(6 Suppl): S344-348.
- ⑩ Lijnen P, Petrov V. Induction of cardiac fibrosis by aldosterone [J]. Mol Cell Cardiol, 2000, 32(6): 865-879.
- ⑪ Kalk P, Westermann D, Herzfeld S, et al. Additional lack of iNOS attenuates diastolic dysfunction in aged ET-1 transgenic mice [J]. Can J Physiol Pharmacol, 2008, 86(6): 353-357.
- ⑫ Jolda-Mydlowska B, Salomon P. Cytokines and remodeling of the heart in patients with congestive heart failure [J]. Pol Arch Med Wewn, 2003, 109(1): 23-33.
- ⑬ Yip HK, Wu CJ, Chang HW, et al. Prognostic value of circulating levels of endothelin-1 in patients after acute myocardial infarction undergoing primary coronary angioplasty [J]. Chest, 2005, 127(5): 1491-1497.
- ⑭ 王雪冰,张磊,田允,等. 女贞子、淫羊藿补肾中药对自发性高血压大鼠主动脉内皮舒缩功能的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2011, 31(15): 2914-2927.
- ⑮ 李鹏,沈宝藩,何立人. 心痛宁加味方对实验性急性心肌梗死大鼠血管内皮细胞的保护作用 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2005, 12(3): 117-180.
- ⑯ 朱伟,陈兰英,朱杰,等. 冠心丹参方、精制冠心方和舒胸方对急性心肌梗死大鼠的保护作用比较研究 [J]. 江西中医学院学报, 2013, 25(5): 63-65.

Experimental Study of *Bushen Huoxue Formula* on Cardiac Function, ET-1 and Ang II in Rat Models of Acute Myocardial Infarction in Early Phase

YANG Weifeng¹, CHEN Liang², CUI Haifeng¹, LI Lianda³, HAO Wei³, LEI Hongtao¹

(1. Experimental Research Center, Beijing Key Laboratory of TCM Basic Research on Prevention and Treatment of Major Disease, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing, 100700; 2. Hubei University of Chinese Medicine; 3. Experimental Research Center of Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences)

ABSTRACT Objective To investigate the influence of *Bushenhuoxue formula* on cardiac function in rat models of acute myocardial infarction (AMI) and its possible mechanism. **Method** Sixty Wistar rats were randomly divided into six groups, which were the sham-operation group, AMI model group, positive drug control group, and high-dose, medium-dose and low-dose *Bushenhuoxue formula* groups. The rat models of myocardial infarction were established by ligation of the anterior descending coronary artery in all groups except for sham-operation group. The high-dose, medium-dose and low-dose *Bushenhuoxue formula* groups were gavaged with 10 g/ (kg · d), 5 g/ (kg · d), or 2.5 g/ (kg · d) of crude drug of *Bushenhuoxue formula*, respectively; The positive drug control group was gavaged with 0.2 g/ (kgd) of enalapril; and both the sham-operation group and AMI model group were give the same volume of saline. 14 days after treatment, thickness of left ventricular anterior and posterior wall at end-diastole (LVAWd and LVPWd), as well as left ventricular internal dimension at end-diastole and end of systole (LVIDd and LVIDs) were measured with high resolution ultrasound imaging system. Left ventricular end diastolic volume (LVEDV), left ventricular end systolic volume (LVESV), ejection fraction (EF), fractional shortening (FS), and systolic volume (SV) were calculated to assess the change in structure and function of rat hearts in each group. Serum levels of angiotensin II (Ang II) and endothelin-1 (ET-1) were detected with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Result** Compared with the model group, LVAWd increased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and LVIDd and LVEDV showed a trend of decrease but with no significant difference ($P > 0.05$) in all *Bushenhuoxue formula* groups; Levels of EF and FS were increased significantly in *Bushenhuoxue formula* high dose group and positive drug control group ($P < 0.01$); Levels of Ang II was reduced significantly ($P < 0.01$); and levels of ET-1 showed a downward trend but with no significant difference in all *Bushenhuoxue formula* groups ($P > 0.05$). **Conclusion** *Bushenhuoxue formula* can inhibit left ventricular remodeling and improve heart function by reducing level of Ang II and adjusting the level of ET-1 in early phrase of acute myocardial infarction.

Keywords *Bushenhuoxue Formula*; acute myocardial infarction; cardiac function; endothelin-1; angiotensin II
(收稿日期: 2014-08-20; 修回日期: 2014-10-25)

编辑: 侯建春