

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2016.12.018

活血益气方及其拆方对大鼠心肌梗死边缘区血管内皮生长因子及其上游调控因子 miR-126 的影响

郑瑞玲¹, 陈萌², 吴爱明¹, 姜利霞¹, 赵一舟¹, 柴立民¹,
赵久丽¹, 吕晞滢¹, 成文堃¹, 张冬梅[✉]

(1. 北京中医药大学东直门医院, 北京市东城区海运仓 5 号, 100700; 2. 北京中医药大学基础医学院)

摘要 目的 探讨活血益气方促血管新生的可能作用机制及配伍规律。方法 30 只 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、活血益气方组、益气方组、活血方组, 每组 6 只。除假手术组外其余各组建立心肌梗死模型。造模 24 h 后活血益气方组、益气方组、活血方组给予浓度分别为 3.2 g/ml、2.4 g/ml、0.8 g/ml 相应中药溶液 0.5 ml/100 g 灌胃, 模型组和假手术组给予等量生理盐水, 每日 1 次。4 周后取各组大鼠梗死边缘区心肌组织用实时荧光定量 PCR 法检测心肌梗死边缘区组织 miR-126、血管内皮生长因子 (VEGF) mRNA 的表达。结果 模型组大鼠梗死边缘区心肌组织 miR-126 的表达低于假手术组 ($P < 0.01$); 活血益气方组、益气方组、活血方组 miR-126 的均表达低于模型组, 活血益气方组、活血方组 VEGF mRNA 的表达高于模型组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 活血益气方组对 miR-126、VEGF mRNA 的调节优于益气方组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论活血益气方促血管新生的作用机制可能与上调 VEGF 及下调其上游调控因子 miR-126 有关, 活血药和益气药具有协同作用。

关键词 心肌梗死; 活血益气方; 血管新生; 血管内皮生长因子; miR-126

冠心病是导致人类死亡的主要心血管疾病之一, 在我国其发病率和死亡率呈逐年增高趋势^[1]。随着人们对冠心病气虚血瘀基本病机的深入认识, 活血益气法被广泛应用于冠心病的治疗^[2]。前期研究表明, 活血益气方可促进血管内皮生长因子 (VEGF) 蛋白表达和缺血心肌血管新生, 进而减轻心肌缺血、预防和逆转心室重构^[3], 在生理性和病理性的血管生成中起着重要的调节作用^[4]。microRNA 作为基因调控的分子“开关”, 在调控血管新生过程中发挥着重要作用^[5], miR-126 是心血管疾病中最容易表达的 microRNA 之一, 也是血管内皮特异性的 microRNA^[6], VEGF 和 miR-126 均在血管新生中起着重要的调控作用。因此, 本研究采用左冠状动脉前降支结扎术制备大鼠急性心肌梗死模型, 通过观察活血益气方及其拆方对 miR-126 及 VEGF mRNA 表达的影响, 进一步探讨活血益气方促血管新生的作用机制及配伍规律。

1 材料与方法

1.1 动物

成年健康雄性 SD 大鼠 30 只, SPF 级, 6 周龄, 体重 (200 ± 20) g, 由中国医学科学院医学实验动物研究所提供, 实验动物许可证号: 11401300011899。

1.2 药物和主要试剂

活血益气方由黄芪 60 g、党参 60 g、丹参 10 g、川芎 10 g、赤芍 10 g、红花 10 g 组成, 益气方由黄芪 60 g、党参 60 g 组成, 活血方由丹参 10 g、川芎 10 g、赤芍 10 g、红花 10 g 组成, 采用北京康仁堂药业有限公司的免煎颗粒剂 (黄芪、党参、川芎每克颗粒剂相当于生药量 5 g, 丹参、赤芍、红花每克颗粒剂相当于生药量 10 g), 各方每剂药加去离子水定容至 50 ml, 配置成含生药量分别为活血益气方 3.2 g/ml、益气方 2.4 g/ml、活血方 0.8 g/ml 的药液。水合氯醛 (国药集团化学试剂有限公司, 批号: 20140304); microRNA 提取试剂盒 (批号: 148025403)、反转录试剂盒 (批号: 148027867)、荧光定量 PCR 试剂盒 (批号:

基金项目: 国家自然科学基金 (81273694)

* 通讯作者: chaweto@126.com, (010) 84013229

148023632)、RNU6 引物(批号: 177027206)、miR-126 引物(批号: 177027205)均为德国凯杰公司产品; 荧光定量试剂盒(批号: 10197100)为罗氏公司产品。

1.3 主要仪器

动物呼吸机(上海奥尔科特生物科技有限公司, ALC-V8 型), 心电图机(CardioMax 公司, Fx-7202 型), 电子天平(上海精密科学仪器有限公司, JA1003N 型), 4℃ 离心机(上海沪粤明科学仪器有限公司, TGL-16G 型), 基因扩增仪(美国 AB 公司, GeneAmp PCR system 9700 型), 安捷伦实时荧光定量 PCR 仪(美国安捷伦科技公司, Mx3000P 型)。

1.4 模型制备

采用左冠状动脉前降支结扎法制备大鼠急性心肌梗死模型^[7]。大鼠用 7% 水合氯醛 0.5 ml/100 g 腹腔麻醉后, 背位固定, 经喉行气管插管术, 连接呼吸机, 以 80 次/分, 潮气量 0.7~0.8 ml 行人工呼吸。左胸前区备皮去毛, 在左侧腋第三、第四肋间处切开皮肤, 长约 1.5 cm, 钝性分开肌层, 沿第三、第四肋间隙打开胸腔, 以开胸器扩大手术视野, 撕开心包, 在动脉圆锥与左心耳之间下约 2 mm 处用 5/0 线结扎左冠状动脉前降支, 当心电图 I 导联显示 ST 段显著抬高后, 重置心脏于胸腔, 并立即分层缝合胸壁。术后连续 3 天注射青霉素预防感染。

1.5 动物分组与给药

30 只大鼠采用随机数字表法分为假手术组、模型组、活血益气方组、益气方组、活血方组, 每组 6 只。除假手术组外其余各组大鼠建立急性心肌梗死模型, 假手术组的手术过程同上, 但只穿线不结扎左冠状动脉。造模后 24 h 活血益气方组、益气方组、活血方组给予相应中药溶液 0.5 ml/100 g 灌胃, 模型组和假手术组给予等量生理盐水, 每日 1 次, 连续 4 周。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 实时荧光定量 PCR 法检测 miR-126 的表达

处死大鼠, 取大鼠心肌梗死边缘区组织, 置于冻存管, 液氮中保存。在冰上, 取约 40 mg 大鼠梗死边缘区组织, microRNA 试剂盒提取包括 microRNA 在内的总 RNA, 测定吸光度 A260/A280, 计算 RNA 浓度及纯度。取 1 μg 总 RNA, 根据反转录试剂盒说明书: 5 × miScript HiSpec Buffer 4 μl、10 × miScript Nucleics Mix 2 μl、miScript Reverse

Transcriptase Mix 2 μl、RNase-free water, 配置 20 μl 反应体系, 在 37℃ 60 min、95℃ 5 min 条件下进行反转录, 得到 cDNA 链。以 cDNA 为模板进行 PCR 反应, 按荧光定量 PCR 试剂盒说明书配置 25 μl 的反应体系, 放入 PCR 仪, 95℃ 15 min 激活 HotStart DNA Taq 聚合酶后, 94℃ 15 s, 55℃ 30 s, 70℃ 30 s, 40 个循环, 进行实时荧光定量 PCR, 接着检测 PCR 溶解曲线。以 RNU6 作为内参照。每个样品设立 2 个复孔, 取均值, 所得 CT 值按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的方法, 进行均一化处理后再进行统计学分析。

1.6.2 实时荧光定量 PCR 法检测 VEGF mRNA 的表达

取 1 μg microRNA 试剂盒提取的总 RNA, 根据反转录试剂盒说明书操作: 5 × miScript HiFlex Buffer 4 μl、10 × miScript Nucleics Mix 2 μl、miScript Reverse Transcriptase Mix 2 μl、RNase-free water, 配置 20 μl 反应体系, 在 37℃ 60 min、95℃ 5 min 条件下进行反转录, 得到 cDNA 链。以 cDNA 为模板进行 PCR 反应, 按荧光定量试剂盒说明书操作: 2 × QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix 12.5 μl、10 μmol/l 上下游引物各 1 μl、cDNA 1 μl、RNase-free water 9.5 μl, 配置 25 μl 的反应体系, 放入 PCR 仪, 95℃ 10 min 激活 FastStart DNA Taq 聚合酶后, 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 40 个循环, 进行实时荧光定量 PCR, 接着检测 PCR 溶解曲线。以 GAPDH 作为内参照。用 NCBI PrimeR-BLAST 设计引物, 由北京诺赛基因组研究中心有限公司合成, 引物序列(5′-3′): VEGF, 上游: GTCAC-CGTCGACAGAACAGT, 下游: GACCCAAAGTGCTC-CTCGAA, 扩增产物长度: 80 bp; GAPDH, 上游: CCATGGAGAAGGCTGGG, 下游: CAAAGTTGT-CATGGATGACC, 扩增产物长度: 195 bp。每个样品设立 2 个复孔, 取均值, 所得 CT 值按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的方法, 进行均一化处理后再进行统计学分析。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 服从正态分布组间比较采用单因素方差分析, 方差齐则采用 LSD 检验, 方差不齐时采用 Dunnett's T3 检验; 不服从正态分布者用两个独立样本的非参数检验, 显著性水平设定 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 各组大鼠心肌梗死边缘区 miR-126 表达比较

表 1 示, 与假手术组比较, 模型组、益气方

组、活血方组、活血益气方组大鼠心肌梗死边缘区 miR-126 的表达均降低 ($P < 0.01$)；与模型组比较，益气方组、活血方组、活血益气方组大鼠心肌梗死边缘区 miR-126 的表达进一步降低，并且活血益气方组较益气方组降低更明显 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)；而活血方组和益气方组比较，差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠心肌梗死边缘区 miR-126、VEGF mRNA 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	miR-126	VEGF mRNA
假手术组	6	1.000 ± 0.036	1.000 ± 0.048
模型组	6	0.722 ± 0.106 **	1.053 ± 0.094
益气方组	6	0.622 ± 0.280 **△▲▲	1.124 ± 0.095 **▲
活血方组	6	0.511 ± 0.200 **△△	1.244 ± 0.116 **△△
活血益气方组	6	0.481 ± 0.094 **△△	1.270 ± 0.118 **△△

注：与假手术比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，△ $P < 0.05$ ，△△ $P < 0.01$ ；与活血益气方组比较，▲ $P < 0.05$ ，▲▲ $P < 0.01$

2.2 各组大鼠心肌梗死边缘区 VEGF mRNA 表达比较

表 1 示，与假手术组比较，模型组大鼠心肌梗死边缘区 VEGF mRNA 的表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，而益气方组、活血方组、活血益气方组大鼠心肌梗死边缘区 VEGF mRNA 的表达较假手术组均升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)；与模型组比较，活血方组和活血益气方组 VEGF mRNA 的表达明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)，且活血益气方组明显高于益气方组 ($P < 0.05$)。益气方组、活血方组 VEGF mRNA 的表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

冠心病属于中医学“胸痹”“心痛”范畴，是多种原因引起血行瘀滞、痹阻心脉、心脉不通而导致的以左胸前区疼痛为主症的一类病症。中医学理论认为，该病病机为本虚标实，气虚为本，血瘀为标，气虚血瘀为冠心病的基本病机。《素问·五脏生成》曰“诸血者，皆属于心”；清代王清任在《医林改错》中提出“元气既虚，必不能达于血管，血管无气，必停留而为瘀”。瘀阻心脉引起心肌缺血是冠心病主要的病理变化，治疗性血管新生可诱使冠脉侧枝循环形成和开放，在改善微循环和改善器官功能上有积极的作用^[8]。

近年来，基础和临床试验表明 VEGF 在促进血管生成、改善侧支循环、缓解心绞痛的症状、改善

心功能方面具有较好疗效^[9-11]。但由于 VEGF 在体内半衰期短，全身应用疗效有限，蛋白治疗需较多量反复给药，基因治疗时目的基因在体内能否得到安全、持久和可控制的表达，尚缺乏强有力的技术保证^[12]。microRNAs 是一种长约 22 个核苷酸、高度保守的、内源性非编码的小分子 RNA，心血管 microRNA 参与了心肌细胞的生长、凋亡、电传导及血管生成等众多生理病理过程，其病理生理意义越来越受关注^[13]，而 miR-126 作为血管内皮特异性 microRNA，在血管性疾病中具有重要意义^[14]。郑志伟等^[14]研究表明，上调 miR-126 能降低 VEGF mRNA 的表达，下调 miR-126 能增加 VEGF mRNA 的表达。因此，miR-126 可能是 VEGF 的上游调控因子，在转录后水平反向调节靶基因 VEGF mRNA 的表达。

本实验结果显示，活血益气方及其拆方可以减少梗死边缘区 miR-126 表达，而增加 VEGF mRNA 表达，说明活血益气方可能通过下调 miR-126 的表达，而减轻 miR-126 对 VEGF 表达的抑制，从而使 VEGF 表达增加。模型组 miR-126 的表达低于假手术组，差异具有统计学意义，而模型组 VEGF mRNA 的表达与假手术组比较差异无统计学意义，可能与在缺血缺氧状态下机体组织细胞 VEGF 表达的反应性增加有关。益气活血方在抑制 miR-126 表达、促进 VEGF mRNA 表达的作用方面强于益气方，说明活血方和益气方在这方面具有协同作用^[15]。因此，活血益气方促血管新生的作用机制可能与其降低 miR-126 的表达、减轻 miR-126 对 VEGF 的表达抑制，从而使 VEGF 表达增加有关，并且活血方和益气方具有协同作用。

参考文献

- [1] 乔树宾. 冠心病诊疗进展 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 53-56.
- [2] 赵地, 郭伟星. 益气活血法治疗冠心病研究进展 [J]. 山东中医杂志, 2012, 31(3): 219-221.
- [3] 张冬梅, 吴爱明, 姜利霞, 等. 活血益气方对心梗后大鼠缺血心肌血管新生及 VEGF 表达的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2010, 37(8): 1602-1604.
- [4] OLSSON AK, DIMBERG A, KREUGER J, et al. VEGF receptor signalling-in control of vascular function [J]. Nat Rev Cell Biol, 2006, 7(5): 359-371.
- [5] 秦升, 金百翰, 魏茜. 心血管系统中微小 RNA 的作用 [J]. 医学综述, 2010, 16(5): 644-646.
- [6] WANG S, AUROAN AB, JOHNSON BA, et al. An

endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis [1]. Dev cell, 2008, 15(2): 261-271.

[7] 刘振, 刘玲玲, 杨廷桐. 两种大鼠心肌梗死模型的比较研究 [J]. 动物医学进展, 2010, 31(4): 19-25.

[8] SHIMA DT, DEUTSCH U, D'AMORE PA. Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human epithelial cells is mediated by increases in mRNA stability [J]. FEBS Lett, 1995, 370(3): 203-208.

[9] LEE LY, PATEL SR, HACKETT NR, et al. Focal angiogenesis therapy using intramyocardial delivery of an adenovirus vector coding for vascular endothelial growth factor 121 [J]. Ann Thorac Surg, 2000, 69(1): 14-23.

[10] SYMES JF, LOSORDO DW, VALE PR, et al. Gene therapy with vascular endothelial growth factor for inoperable coronary artery disease [J]. Ann Thorac Surg, 1999,

68(3): 830-836.

[1] HENRY TD, ANNEX BH, MCKENDALL GR, et al. The VIVA trial: vascular endothelial growth factor in ischemia for vascular angiogenesis [J]. Circulation, 2003, 107(10): 1359-1365.

[2] RUBANYI GM. Identifying and overcoming obstacles in angiogenic gene therapy for myocardial ischemia [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2014, 64(2): 109-119.

[3] MISHA PK, TYAGI N, KUMAR M, et al. MicroRNAs as a therapeutic target for cardiovascular disease [J]. J Cell Mol Med, 2009, 13(4): 778-789.

[4] 郑志伟, 朱志伟, 郑滢, 等. miR-126 对 EA-hy926 细胞血管内皮生长因子表达的调控作用 [J]. 中国病理生理杂志, 2014, 30(1): 20-34.

[5] 徐培平, 符林春, 张凤学, 等. 方剂配伍中的“耦合”效应 [J]. 中医杂志, 2009, 50(1): 8-10.

Effects of *Huoxue Yiqi Fang* (活血益气方) and its Disassembled Prescription on Vascular Endothelial Growth Factor and its Upstream Regulation Factor miR-126 in Rat Myocardial Infarction Border Area

ZHENG Ruiling¹, CHEN Meng², WU Aiming¹, LOU Lixia¹, ZHAO Yizhou¹, CHAI Limin¹, ZHAO Jiuli¹, LYU Xiyang¹, CHENG Wenkun¹, ZHANG Dongmei¹

(1. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100700 2. School of Preclinical Medicine, Beijing University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Huoxue Yiqi Fang* (活血益气方) in promoting angiogenesis and its compatibility law. **Methods** Sprague Dawley Rats (n = 30) were randomly divided into sham operation group, model group, *Huoxue Yiqi Fang* Group, *Yiqi Fang* Group, and *Huoxue Fang* Group, with 6 rats in each group. Myocardial infarction models were established in all groups except sham operation group. Twenty-four hours after modeling, *Yiqi Huoxue Fang* group, *Yiqi Fang* group and *Huoxue Fang* group were given 3.2 g/ml, 2.4 g/ml and 0.8 g/ml of corresponding Chinese medicines (Chinese medicine solution 0.5 ml/100 g) respectively, while model group and sham operation group were given normal saline, once daily. Four weeks later, myocardial tissue in the infarct zone of rats was taken out from each group. The expression of miR-126 and vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA were detected by real-time fluorescence quantitative PCR. **Results** The expression of miR-126 in model group rats (myocardial infarction border area group) was lower than that in sham operation group ($P < 0.01$); The expression of miR-126 in *Yiqi Huoxue Fang* group, *Yiqi Fang* group and *Huoxue Fang* group was lower than that in model group, the expression of VEGF mRNA in *Huoxue Yiqi Fang* group and *Huoxue Fang* group were higher than that in model group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); The regulation of miR-126 and VEGF mRNA in *Huoxue Yiqi Fang* group was better than that in *Yiqi Fang* group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** The mechanism of *Huoxue Yiqi Fang* promoting angiogenesis may be related to the up-regulation of VEGF and down-regulation of its upstream regulatory factor miR-126, and promoting blood circulation drugs and supplementing Qi drugs have a synergistic effect.

Keywords myocardial infarction; *Huoxue Yiqi Fang* (活血益气方); angiogenesis; vascular endothelial growth factor; miR-126

(收稿日期: 2015-10-27; 修回日期: 2015-12-30)

编辑: 邓 媛