

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2016.12.019

加参方对急性心肌梗死模型大鼠心肌组织单核-巨噬细胞及血管细胞黏附分子 1 表达的影响

谢世阳¹, 王幼平¹, 李彬¹, 高原¹, 刘艳艳², 南小利³, 刘卫红¹, 朱明军^{1*}

(1. 河南中医学院第一附属医院, 河南省郑州市人民路 19 号, 450000; 2. 郑州市中医院, 3. 广西壮族自治区河池市人民医院)

摘要 目的 探讨加参方对心肌梗死大鼠心功能的影响及可能作用机制。方法 采用结扎大鼠左冠状动脉前降支的方法建立大鼠急性心肌梗死模型, 将术后 24 h 成活大鼠随机分为假手术组 (19 只)、模型组 (30 只)、加参方低剂量组 (31 只)、加参方高剂量组 (30 只) 和氯沙坦组 (30 只)。加参方低、高剂量组分别给予加参方浸膏含生药量 3、6 g/(kg·d), 氯沙坦组给予氯沙坦片 10 mg/(kg·d), 假手术组和模型组给予相同体积蒸馏水, 各组连续灌胃 4 周。分别于给药后 1、4 周末超声检测心功能, 测定心肌组织缺血危险区单核-巨噬细胞计数及血管细胞黏附分子-1 (VCAM-1) 蛋白表达量。结果 与假手术组同时间点比较, 模型组大鼠心功能降低, 心肌组织中单核-巨噬细胞计数及 VCAM-1 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组同时间点比较, 氯沙坦组和加参方高剂量组大鼠心功能改善明显, 心肌组织单核-巨噬细胞计数和 VCAM-1 表达降低 ($P < 0.05$)。结论 加参方可能通过抑制大鼠心肌组织单核-巨噬细胞的浸润及 VCAM-1 蛋白表达, 从而改善心室重构, 提高心功能。

关键词 急性心肌梗死; 加参方; 单核-巨噬细胞; 血管细胞黏附分子-1

急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 发生后, 心肌细胞的凋亡与坏死、细胞因子的表达与分泌、细胞间基质的合成与降解等平衡状态被打破, 从而使心脏出现一系列的病理变化, 与炎症密不可分^[1]。前期研究初步显示, 加参方具有抑制炎症因子、缩小梗死面积的心脏保护作用^[2]。本研究观察大鼠急性心肌梗死后心肌组织中单核-巨噬细胞的浸润情况及血管细胞黏附分子 1 (VCAM-1) 蛋白表达变化以及加参方对此的干预作用, 以期加参方改善心功能作用提供进一步的数据支持。

1 材料与方法

1.1 动物

清洁级健康 SD 雄性大鼠 200 只, 体重 (220 ± 30) g, 8 周龄, 由河南省动物实验中心提供, 实验动物许可证编号: SCXK (豫) 2010-0002。

基金项目: 国家自然科学基金 (81173410); 河南省创新型科技团队 (C20130050); 河南省高校科技创新团队支持计划 (13IRTSTHN012)

* 通讯作者: zhumingjun317@163.com, (0371) 66289006

1.2 药物与试剂

加参方浸膏 (1 g 浸膏 = 9.515 g 生药), 主要由香加皮、黄芪、丹参、三七、益母草、桑白皮、泽泻、葶苈子等组成 (剂量保密), 天津中医药大学中医药研究中心提供; 氯沙坦片 (批号: H20030654), 杭州默沙东制药有限公司; 庆大霉素 (批号: 14043001), 开封制药有限公司; 水合氯醛 (批号: 20140707), 郑州派尼化学试剂厂; 即用型羊抗兔 SABC 试剂盒 (批号: 09E09A), 武汉博士德生物工程有限公司; 山羊抗 VCAM-1 多克隆抗体 (批号: B1712), 美国 Santa Cruz 公司; 小鼠抗兔 GAPDH 单克隆抗体 (批号: 051M5971), 美国 Sigma 公司。

1.3 仪器

MICRO MAXX 型彩色多普勒超声诊断仪 (美国索诺声公司); RM2245 轮转式石蜡切片机 (德国徕卡公司); TB-718E 生物组织自动包埋机 (湖北泰维医疗科技有限责任公司); BX41 型显微镜 (Olympus 公司); TU-1901 双光束紫外可见分光光度计 (北京普析通用仪器有限责任公司); Power

Pac HC 型通用电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.4 心肌梗死模型复制

参照课题组前期研究^[2]方法,大鼠术前禁食 12 h, 10% 水合氯醛 (300 mg/kg) 腹腔麻醉,背位固定,于胸前第三、四肋间隙处剪开皮肤,钝性分离肌层,开胸挤出心脏,于肺动脉圆锥与左心耳交界距离左心耳根部约 3 mm 处结扎,结扎后迅速将心脏放回胸腔,随后挤出胸腔内气体,荷包缝合皮肤。术后注射庆大霉素 3 万单位,每天 1 次,连续 3 天,预防感染。假手术组在冠状动脉前降支下仅穿线不结扎。

1.5 动物分组与给药

将术后 24 h 存活大鼠采用随机数字表法分为假手术组 (19 只)、模型组 (30 只)、加参方低剂量组 (31 只)、加参方高剂量组 (30 只) 和氯沙坦组 (30 只)。加参方低、高剂量组分别给予含生药量 3、6 g/(kg·d) 的加参方浸膏,氯沙坦组给予氯沙坦片 10 mg/(kg·d),假手术组和模型组给予相同体积蒸馏水。各组均每天灌胃 1 次,连续给药 4 周。

1.6 观察指标及检测方法

分别于药物干预 1、4 周后超声测定各组大鼠心功能,后处死大鼠,收集心肌组织用于免疫组化及 Western blot 测定。

1.6.1 心功能 于药物干预 1 周时,采用随机数字表法组分别选取 8 只大鼠进行心脏超声测量左室收缩末采用内径 (LVESD)、左室舒张末期内径 (LVEDD),计算左室射血分数 (LVEF) 和左室短轴缩短率 (LVFS)。

1.6.2 心肌组织中单核-巨噬细胞计数 收集心肌组织,石蜡包埋,以 4 μm 厚度连续切片,常规脱蜡至水,严格按照免疫组化试剂盒说明书操作,进

行 CD68 免疫组化染色,应用 DAB 溶液显色。显微镜下观察,细胞核染为棕黄色为阳性细胞,每张切片在心脏不同部位选取 10 个视野,进行阳性细胞计数,最后取平均值。

1.6.3 心肌组织中 VCAM-1 蛋白表达 取 -80℃ 保存心肌组织,加入组织裂解液,匀浆,离心后取上清液,用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度。以 50 μg 上样量进行 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,然后利用半干转法将电泳蛋白转到 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉封闭 1 h,加入一抗 (VCAM-1 1:400, GAPDH 1:2000) 4℃ 孵育过夜,加入 1:5000 稀释的 HRP 标记的二抗,37℃ 孵育 1 h, ECL 化学发光法显色。蛋白条带经 Image J 1.38 软件 (美国国立卫生研究院开发) 进行分析,蛋白表达水平以 IOD 值_{目的蛋白}/IOD 值_{GAPDH} 表示。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件,计量数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组内不同时间点比较采用配对样本 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠不同时间心功能指标比较

表 1 示,各组大鼠不同时间心率比较差异均无统计学意义 (*P* > 0.05)。与假手术组同时间点比较,模型组和加参方低剂量组大鼠 LVEDD、LVESD 增大, LVEF 和 LVFS 降低 (*P* < 0.05),氯沙坦组和加参方高剂量组 LVESD 增大, LVEF 和 LVFS 降低 (*P* < 0.05); 与模型组同时间点比较,加参方高剂量组和氯沙坦组 LVEDD、LVESD 降低, LVEF 和 LVFS 升高 (*P* < 0.05),加参方低剂量组仅在给药 4 周时较模型组 LVESD 降低, LVEF

表 1 各组大鼠不同时间心功能指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	鼠数	心率 (次/min)	LVEDD (mm)	LVESD (mm)	LVEF (%)	LVFS (%)
假手术组	给药 1 周	8	438 ± 11	5.2 ± 0.3	2.2 ± 0.2	90.3 ± 1.2	57.1 ± 2.1
	给药 4 周	8	404 ± 13	6.4 ± 0.3	3.0 ± 0.3	87.6 ± 1.9	54.1 ± 2.5
模型组	给药 1 周	8	422 ± 13	7.8 ± 0.2*	5.9 ± 0.2*	52.4 ± 4.9*	24.1 ± 2.7*
	给药 4 周	8	423 ± 21	8.8 ± 0.5*	7.1 ± 0.6*	42.6 ± 5.9*	18.9 ± 3.0*
氯沙坦组	给药 1 周	8	432 ± 10	6.0 ± 0.5 [△]	3.6 ± 0.3* [△]	77.9 ± 1.9* [△]	42.9 ± 3.1* [△]
	给药 4 周	8	398 ± 17	7.1 ± 0.2 [△]	4.3 ± 0.3* [△]	76.3 ± 2.7* [△]	41.0 ± 2.5* [△]
加参方低剂量组	给药 1 周	8	431 ± 14	7.6 ± 0.4* [▲]	5.2 ± 0.4* [▲]	60.9 ± 6.0* [▲]	31.6 ± 5.5* [▲]
	给药 4 周	8	414 ± 25	7.9 ± 0.4*	5.5 ± 0.4* ^{△▲}	64.0 ± 3.8* ^{△▲}	31.3 ± 2.4* ^{△▲}
加参方高剂量组	给药 1 周	8	426 ± 12	6.7 ± 0.2* [△]	4.4 ± 0.4* [△]	69.8 ± 5.0* [△]	34.7 ± 3.6* [△]
	给药 4 周	8	419 ± 17	7.1 ± 0.2 [△]	4.4 ± 0.2* [△]	73.6 ± 1.4* [△]	37.5 ± 1.9* [△]

注: LVEDD, 左室舒张末期内径; LVESD, 左室收缩末期内径; LVEF, 左室射血分数; LVFS, 左室短轴缩短率; 与假手术组同时间点比较, * *P* < 0.05; 与模型组同时间点比较, [△] *P* < 0.05; 与氯沙坦组同时间点比较, [▲] *P* < 0.05

和 LVFS 升高 ($P < 0.05$)。与氯沙坦组同时间点比较,加参方低剂量组给药 1 周时 LVEDD、LVESD、LVEF、LVFS 和给药 4 周时 LVESD、LVEF、LVFS 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),而加参方高剂量组各时间点与氯沙坦组各指标比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.2 各组大鼠不同时间点心肌组织中单核-巨噬细胞计数、VCAM-1 蛋白表达比较

心肌组织免疫组化染色显示,假手术组偶见单核-巨噬细胞浸润;模型组可见大量细胞核呈棕黄色染色的阳性细胞,以心肌梗死后 1 周时最显著;加参方低、高剂量组及氯沙坦组阳性细胞数比模型组均有减少,其中加参方高剂量组和氯沙坦组减少明显。表 2 示,与假手术组同时间点比较,其余各组大鼠心肌组织中单核-巨噬细胞计数明显增多 ($P < 0.05$);与模型组同时间点比较,氯沙坦组和加参方高剂量组大鼠心肌组织单核-巨噬细胞计数明显减少,而加参方低剂量组仅在给药 4 周时降低 ($P < 0.05$);加参方低剂量组在给药 1、4 周时心肌组织单核-巨噬细胞计数亦明显高于氯沙坦组 ($P < 0.05$)。与假手术组同时间点比较,模型组大鼠心肌组织 VCAM-1 蛋白明显升高 ($P < 0.05$);与模型组同时间点比较,加参方高剂量组和氯沙坦组心肌组织 VCAM-1 蛋白降低明显,加参方低剂量组仅在给药 4 周时降低,但亦明显高于同时间点氯沙坦组 ($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠不同时间点心肌组织中单核-巨噬细胞计数、VCAM-1 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	单核-巨噬细胞 (个)	VCAM-1 蛋白
假手术组	给药 1 周	1.33 ± 0.05 (6)	0.43 ± 0.18 (4)
	给药 4 周	0.28 ± 0.05 (6)	0.20 ± 0.08 (4)
模型组	给药 1 周	42.58 ± 5.93* (6)	2.70 ± 0.64* (4)
	给药 4 周	12.53 ± 1.16* (6)	0.58 ± 0.02* (4)
氯沙坦组	给药 1 周	21.95 ± 1.83*△ (6)	0.93 ± 0.39△ (4)
	给药 4 周	7.25 ± 0.33*△ (6)	0.11 ± 0.03△ (4)
加参方低剂量组	给药 1 周	33.83 ± 2.79*△ (6)	1.49 ± 0.39 (4)
	给药 4 周	9.92 ± 0.77*△△ (6)	0.32 ± 0.06△△ (4)
加参方高剂量组	给药 1 周	19.12 ± 2.09*△ (6)	0.97 ± 0.32△ (4)
	给药 4 周	8.33 ± 0.57*△ (6)	0.23 ± 0.05△ (4)

注: VCAM-1, 血管细胞黏附分子 1; 与假手术组同时间点比较, * $P < 0.05$; 与模型组同时间点比较, △ $P < 0.05$; 与氯沙坦组同时间点比较, ▲ $P < 0.05$; () 内为鼠数

3 讨论

单核-巨噬细胞是心肌梗死后主要的炎症浸润细胞,目前多认为其在心肌梗死后的炎症反应及损

伤修复中都具有重要作用^[3-4]。研究显示,由单核-巨噬细胞引起的炎症过强会扰乱心肌梗死后心肌修复过程,而利用氯膦酸盐消耗掉单核-巨噬细胞后的小鼠死亡率明显上升,心功能下降,并且血栓形成率升高^[5]。VCAM-1 属免疫球蛋白超家族成员,能够与整合素家族的 VLA-4 ($\alpha 4 \beta 1$) 或 $\alpha 4 \beta 7$ 结合发挥生物学作用,是心肌梗死后介导并激活炎症细胞(特别是单核细胞)进入损伤部位并发挥作用的关键因子^[6]。Chunluyan 等^[7]利用白介素 1 α (IL-1 α) 刺激人脐带静脉内皮细胞来诱导 VCAM-1 的表达后发现,人脐带静脉内皮细胞未被 IL-1 α 激活时,单核细胞趋化迁移的作用是由抗 LFA-1 单抗阻断,而人脐带静脉内皮细胞活化后,该作用被抗 VLA-4 单抗阻断,表明 VCAM-1 与单核细胞的趋化关系密切。

加参方以香加皮、黄芪为君,补益心气;丹参、三七为臣,活血化瘀;益母草、桑白皮、泽泻、葶苈子化湿利水、泻肺逐饮共为佐药。诸药合用,共奏益气活血、温阳利水之功。全方标本兼顾,扶正不滞邪,利水不伤阴。本研究结果显示,大鼠心肌梗死后 1、4 周心肌组织单核-巨噬细胞计数和 VCAM-1 的蛋白表达量均显著增高,提示 VCAM-1 对单核-巨噬细胞的浸润过程起重要作用。加参方高剂量组在急性心肌梗死后 1 周时能够明显抑制心肌中单核-巨噬细胞计数,说明加参方在心肌梗死早期能够抑制过度激活的炎症反应;急性心肌梗死后 4 周时加参方低、高两个剂量组中单核-巨噬细胞计数均明显降低,表明随着用药时间的延长,加参方抑制炎症的作用愈加明显。加参方对 VCAM-1 蛋白表达的影响与对单核-巨噬细胞的抑制情况一致,提示加参方在心肌梗死后对 VCAM-1 蛋白的降低,可能是其抑制单核-巨噬细胞浸润的关键环节。结合加参方能够缩小 LVEDD 和 LVESD、提高 LVEF 和 LVFS,从而推测加参方抑制左心室扩大、改善心功能的作用可能与其抑制过度的炎症反应,平衡单核-巨噬细胞促炎和损伤修复两方面的作用有关。

参考文献

- NAHRENDORF M, PITTET MJ, SWIRSKI FK. Monocytes: protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction [J]. Circulation, 2010, 121 (22): 2437-2445.
- 谢世阳,王幼平,李彬,等.加参方对大鼠心梗早期心功

能及心肌炎症因子表达的影响 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2014, 16(10): 2106-2111.

[3] ANZAI T. Post-infarction inflammation and left ventricular remodeling: a double-edged sword [J]. Circ J, 2013, 77(3): 580-587.

[4] FERNÁNDEZ-VELASCO M, GONZÁLEZ-RAMOS S, BOSCA L. Involvement of monocytes/macrophages as key factors in the development and progression of cardiovascular diseases [J]. Biochem J, 2014, 458(2): 187-193.

[5] FRANTZ S, HOFMANN U, FRACCAROLLO D, et al. Monocytes/macrophages prevent healing defects and left ventricular thrombus formation after myocardial infarction

[J]. FASEB J, 2013, 27(3): 871-881.

[6] COOK-MILLS JM, ME M, ABDALAVALENCIA H. Vascular cell adhesion molecule-1 expression and signaling during disease: regulation by reactive oxygen species and antioxidants [J]. Antioxid Redox Signal, 2011, 15(6): 1607-1638.

[7] CHULUYAN HE, SCHALL TJ, YOSHIMURA T, et al. IL-1 activation of endothelium supports VLA-4 (CD49d/CD29)-mediated monocyte transendothelial migration to C5a, MIP-1alpha, RANTES, and PAF but inhibits migration to MCP-1: a regulatory role for endothelium-derived MCP-1 [J]. J Leukoc Biol, 1995, 58(1): 71-79.

Effects of *Jiashen Fang* (加参方) on the Expression of Myocardial Tissue Monocyte-Macrophage and Vascular Cell Adhesion Molecule-1 in Rats Model of Acute Myocardial Infarction

XIE Shiyang¹, WANG Youping¹, LI Bin¹, GAO Yuan¹, LIU Yanyan², NAN Xiaoli³, LIU Weihong¹, ZHU Mingjun¹

(1. The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Henan Province, 450000; 2. Chinese Medicine Hospital of Zhengzhou City; 3. The People's Hospital of Hechi City, Guangxi Zhuang Autonomous Region)

ABSTRACT Objective To study the effects of *Jiashen Fang* (加参方) on the cardiac function of rats with myocardial infarction and to explore the possible mechanism. **Methods** Anterior descending branch of left coronary artery of rats were ligatured to establish the rat models of acute myocardial infarction. Twenty-four hours after the operation, the survival rats were randomly divided into a control group (19), a model group (30), a low dose of *Jiashen Fang* group (31), a high dose of *Jiashen Fang* group (30), and a losartan group (30). The low and high dose of *Jiashen Fang* groups were given extractum of *Jiashen Fang* with 3 g/(kg·d) and 6 g/(kg·d) of pure dose, respectively. The losartan group was given 10 mg/(kg·d) of losartan tablets. The control group and the model group were given the equivalent distilled water. Each group was given medication or water by gavage for 4 weeks. One week and 4 weeks after treatment, cardiac function was evaluated with ultrasonic testing, and levels of monocyte-macrophage and expression levels of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in danger area of myocardial tissue ischemia were tested, respectively. **Results** Compared with the control group at the same time point, cardiac function of rats decreased, and level of monocyte-macrophage and protein expression of VCAM-1 in myocardial tissue increased significantly in the model group ($P < 0.05$); Compared with the model group at the same time point, cardiac function of rats improved significantly, and level of monocyte-macrophage and expression of VCAM-1 in the myocardial tissue decreased in the losartan group and the high dose of *Jiashen Fang* group ($P < 0.05$). **Conclusion** *Jiashen Fang* may inhibit infiltration of monocyte-macrophage and protein expression of VCAM-1 in myocardial tissue of rats, improve the ventricular remodeling and improve cardiac function.

Keywords acute myocardial infarction; *Jiashen Fang* (加参方); monocyte-macrophage; vascular cell adhesion molecule-1

(收稿日期: 2015-10-17; 修回日期: 2016-02-04)

编辑: 邓媛