

芪参益气滴丸对模型大鼠心肌梗死后左室结构及心功能的影响

毛秉豫^{1*} 茹永新²

(1. 南阳理工学院医学实验中心, 河南省南阳市长江路 80 号, 473004; 2. 中国医学科学院血液病医院)

基金项目: 河南省重点科技攻关项目(082102330018)

* 通讯作者: maobingyu2005@126.com, (0377) 62071305

[摘要] **目的** 探讨芪参益气滴丸对心肌梗死后左室结构及心肌细胞的作用及可能的机制。 **方法** 成功建立大鼠心肌梗死模型后随机分为对照组、药物组, 各 15 只, 另设假手术组 15 只。药物组给予 $38\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})^{-1}$ 芪参益气滴丸灌胃; 对照组和假手术组给等量生理盐水。8 周后测定血流动力学、超声心动图、心肌梗死面积、心肌及血浆血管紧张素 II (Ang II) 水平、心肌细胞凋亡指数 (AI)、心肌细胞 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达等指标, 并用光镜和透射电镜作形态学观察。 **结果** 对照组左室重量指数 (LVMI)、室间隔厚度 (IVST)、左室后壁厚度 (LVPWT)、左室舒张末压 (LVEDP)、心肌梗死面积等均大于假手术组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 药物组 LVMI、IVST、LVEDP、梗死面积、心肌及血浆 Ang II、AI 等均低于对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 心肌 Bcl-2 蛋白阳性表达高于对照组 ($P < 0.05$), Bax 蛋白阳性表达低于对照组 ($P < 0.05$)。光镜和电镜观察显示药物组心肌损害程度较对照组明显减轻。 **结论** 应用芪参益气滴丸可减轻大鼠心肌梗死后左室重构并改善血流动力学指标, 其作用可能与降低 Ang II 水平, 调节心肌 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达, 减轻心肌细胞凋亡有关。

[关键词] 芪参益气滴丸; 心肌梗死; 左室重构; 血管紧张素 II; 细胞凋亡; 血流动力学

Effect of Qishen Yiqi Dropping Pill on the Structure of the Left Ventricular and Cardiac Function in Rats with Myocardial Infarction

MAO Bingyu¹, RU Yongxin²

(1. Medical Experimental Research Center, Nanyang Institute of Technology, Nanyang 473004; 2. Hematosis Hospital, China Academy of Medical Sciences)

ABSTRACT **Objective** To study the effect and mechanism of Qishen Yiqi Dropping Pill [dropping pills of Huangqi (Radix Astragali) and Danshen (Radix et Rhizoma Salviae Miltiorrhizae) for reinforcing qi] on the left ventricular structure and cardiac function in rats with myocardial infarction (MI). **Methods** The successfully made MI model rats were randomized into control group and Qishen Yiqi Dropping Pill group (treatment group) with 15 in each, and a sham-operation group was set up with 15 models. The treatment group was administered Qishen Yiqi Dropping Pill $38\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})^{-1}$ by gavage, and the other two groups were given the same volume of normal saline. Eight weeks later, hemodynamic and ultrasonic cardiogram examinations were performed to observe the infarction size, myocardial angiotensin II (Ang II) level, myocardial apoptosis index (AI), myocardial bcl-2 and bax protein expression, etc., and morphological analysis on myocardium was done with light microscope and transmission electron microscope. **Results** In the control group, the left ventricle mass index (LVMI), inter-ventricular septal thickness (IVST), left ventricular posterior wall thickness (LVPWT), left ventricle end-diastolic pressure (LVEDP), and infarction size were all worse than those of the sham-operation group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). In the treatment group, the LVMI, IVST, LVPWT, infarction size, LVEDP, Ang II level, and AI were all less than those of the control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the myocardial bcl-2 protein expression was stronger than that of the control group ($P < 0.05$), while the Bax protein expression was weaker than that of the control group ($P < 0.05$). The morphological analysis showed that the myocardial damage in the treatment group was significantly minor than that of the control group. **Conclusion** Qishen Yiqi Dropping Pill can relieve the left ventricular remodeling and improve the cardiac function in rats with myocardial infarction, possibly relating to its decreasing Ang II level, regulating myocardial bcl-2 and Bax protein expression, and alleviating myocardial apoptosis.

Key Words Qishen Yiqi Dropping Pill [dropping pills of Huangqi (Radix Astragali) and Danshen (Radix et Rhizoma Salviae Miltiorrhizae) for reinforcing qi]; myocardial infarction; left ventricular remodeling; angiotensin II; apoptosis; hemodynamic

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

芪参益气滴丸由黄芪、丹参、三七、降香配伍组成, 方中黄芪补气行血, 丹参、三七活血养血, 降香辛散温通, 诸药合用益气活血、通络止痛, 祛瘀不伤正。目前广泛应用于冠心病治疗及二级预防, 临床资料

显示,该药能较好地改善心肌梗死患者左室功能及相关症状^[1],但更深入的研究较少。本研究通过观察用药后的心肌梗死大鼠血流动力学、左室构型、组织形态结构(光镜和电镜)、血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)水平、心肌细胞凋亡和相关基因蛋白表达等的变化,为临床应用提供参考和可能的依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

SD 雄性大鼠,体重(250±50)g,8 周龄,清洁级,上海斯莱克实验动物中心提供,实验动物许可证号:SCXK(沪)2007-003。在心肌梗死模型制作成功并存活 48h 后,按随机数字表法将大鼠分为心肌梗死对照组(简称对照组)、芪参益气滴丸组(简称药物组),每组各 15 只。另设 15 只为假手术组。

1.2 模型制备与给药

参照文献[2]方法,腹腔麻醉后,经气管插管,连接小动物呼吸机,在左胸骨旁第 4 肋间打开胸腔、心包,暴露心脏,用 7 号丝线结扎左冠状动脉前降支(左心耳与动脉圆锥间接近主动脉根部 2mm 处),结扎后心室前壁变苍白,心电图Ⅱ导联 ST 段明显弓背抬高,表明结扎成功。排除胸腔气体后逐层缝合关闭胸腔。观察有自主呼吸后拔除插管。假手术组只在左冠状动脉前降支相应部位挂线而不结扎。各组分笼饲养,给常规饲料和饮水。药物组术后 48h 开始按 38mg/(kg·d)⁻¹给予芪参益气滴丸灌胃(天士力药业集团产品,批号:20030139),对照组和假手术组给予等量生理盐水灌胃,每天上午给药。每周通过称重调整药物用量,共 8 周。

1.3 超声心动图和血流动力学测定

所有大鼠给药 8 周后称重,使用超声心动图(SONOS 5500 型,美国惠普公司生产)测量室间隔厚度(IVST)、左室后壁厚度(LVPWT)、左室舒张末内径(LVEDd),记录 5 个心动周期取均值。2 天后 1%戊巴比妥钠溶液(40mg/kg)腹腔麻醉,背位固定,连接生理记录仪做血流动力学测定左室收缩压(LVSP)、左室舒张末压(LVEDP)、左室内压曲线最大上升速率(+dp/dt)和最大下降速率(-dp/dt)。

1.4 左心室重量指数及心肌梗死面积测定

打开胸腔,迅速取出心脏,0.9%氯化钠冰溶液中冲洗,沿室间隔剪去右心室称重(LVM),与体重相除得出左室重量指数(LVMI)。梗死面积测定参考文献[3],沿左心室长轴从中部横切,断面取切片 5mm 厚,HE 染色,以显微镜微机彩色图像处理系统

测定左室截面直径并计算出梗死面积。梗死面积(%)=瘢痕弧长/[(外周长+内周长)/2]×100%。将部分心肌放液氮储存以备制组织匀浆,测定 AngⅡ。另部分(包括左心室游离壁和室间隔)放入 10%多聚甲醛溶液中固定,以备病理及免疫组化检测。在距离梗死边缘约 2mm 处取心肌约 1mm×1mm×1mm,戊二醛固定,以备电镜观察。

1.5 血浆 AngⅡ测定

采用放免法,按试剂盒说明书操作。

1.6 心肌细胞凋亡指数

用 TUNEL 法,将甲醛固定 24h 的心肌组织常规石蜡包埋并切块成 5mm 厚,按试剂盒(美国 Roche 公司生产)说明书进行操作。细胞核染色成棕黄色者为阳性凋亡细胞,每张切片在高倍光镜下随机取无重叠 5 个视野计算每个视野的阳性心肌细胞数和心肌细胞总数。计算细胞凋亡指数(AI),AI=凋亡细胞数/心肌细胞总数×100%。

1.7 心肌细胞 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达

采用 SP 法,将石蜡包埋的切片脱蜡后洗涤,室温孵育 10min,加入一抗,Bcl-2 和 Bax 均为 1:100 稀释。12h 后洗涤加入二抗,并以生物素标记,孵育 30min 后 PBS 冲洗。加 DAB 显色剂,HE 复染,脱水、透明、封片。显微镜下观察,胞质中有棕黄色颗粒者为阳性表达细胞,不着色者为阴性表达细胞。每张切片于 400 倍光镜下采集 5 个具有代表性的互不重叠视野,应用 VIDAS 图像分析系统测量阳性表达面积、平均光密度和积分光密度。以单位面积积分光密度(%)反映蛋白表达量。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计分析软件。计量数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较用单因素方差分析。

2 结果

在实验 8 周内 45 只大鼠中有 4 只死亡。其中对照组 2 只,药物组 1 只,假手术组 1 只。最终获得完整资料的大鼠共 41 只。

2.1 各组大鼠左心室重构情况

表 1 示,对照组 LVM、LVMI、IVST、LVPWT 及 LVEDd 与假手术组比较明显增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$),药物组 LVM、IVST、LVPWT 及 LVEDd 大于假手术组,LVM、LVMI、IVST 及 LVEDd 低于对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$);药物组的梗死面积小于对照组($P<0.01$)。

表1 各组大鼠超声心动图、左心室重构指标及梗死面积比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	IVST (mm)	LVPWT (mm)	LVEDd (mm)	LVM (mg)	LVMI (mg/g)	梗死面积(%)
药物组	14	2.1±0.2*△	2.2±0.2*	7.5±0.3*△	490.2±58.3*△	1.93±0.4△	34.6±4.7**△△
对照组	13	2.6±0.2**	2.5±0.3**	8.1±0.3**	551.2±58.1**	2.33±0.2*	46.3±5.0**
假手术组	14	1.5±0.4	1.7±0.3	6.2±0.4	448.6±37.1	1.74±0.1	

注:与假手术组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与对照组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$

表2 各组大鼠血流动力学比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	LVSP (mmHg)	LVEDP (mmHg)	+dp/dt (mmHg/s)	-dp/dt (mmHg/s)
药物组	14	131.2±4.3△	14.5±2.2**△△	3.8±0.4*△	3.7±0.6*△
对照组	13	123.2±4.1*	25.6±7.8**	2.9±0.6**	3.0±0.4**
假手术组	14	134.4±3.8	4.6±0.8	5.8±0.4	6.1±0.2

注:与假手术组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与对照组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$

表3 各组大鼠心肌与血浆 Ang II、AI 及 Bcl-2 与 Bax 蛋白表达的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	心肌 Ang II (pg/L)	血浆 Ang II (ng/L)	AI (%)	Bcl-2 蛋白 (%)	Bax 蛋白 (%)
药物组	14	962.5±77.0*△	355.7±28.5△	10.03±4.17**△	3.53±0.24△	1.04±0.48△
对照组	13	1876.4±60.6**	550.7±48.4*	15.72±5.22**	2.12±0.49*	3.25±0.23*
假手术组	14	608.3±32.7	322.6±36.8	1.92±0.31	3.38±0.16	0.96±0.08

注:与假手术组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与对照组比较,△ $P<0.05$

2.2 各组大鼠血流动力学比较

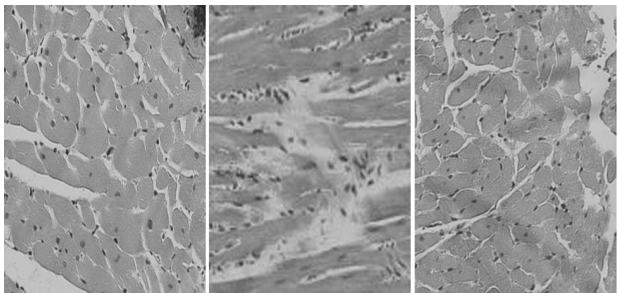
表2示,对照组LVSP、±dp/dt均低于假手术组,LVEDP高于假手术组($P<0.05$ 或 $P<0.01$);药物组±dp/dt均低于假手术组,但高于对照组($P<0.05$);药物组LVEDP高于假手术组、低于对照组($P<0.01$)。

2.3 各组大鼠心肌与血浆 Ang II、AI 及 Bcl-2 蛋白、Bax 蛋白表达的比较

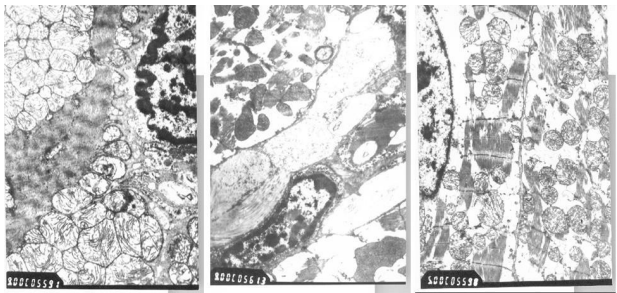
表3示,对照组心肌及血浆 Ang II 较假手术组均增高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),药物组高于假手术组,低于对照组($P<0.05$);对照组可见到大量黄褐色凋亡细胞,药物组亦可见黄褐色凋亡细胞,但较对照组明显减少,假手术组偶见被染色的凋亡细胞;对照组与药物组AI均显著大于假手术组($P<0.01$),而药物组低于对照组($P<0.05$);对照组心肌 Bcl-2 蛋白阳性表达的单位面积积分光密度低于假手术组($P<0.05$),药物组则高于对照组($P<0.05$),对照组 Bax 蛋白阳性表达的单位面积积分光密度高于假手术组($P<0.05$),而药物组则低于对照组($P<0.05$)。

2.4 各组大鼠心肌形态、超微结构比较

光镜观察显示假手术组大鼠心肌细胞排列整齐,结构正常;对照组大鼠心肌组织排列疏乱,出现肌束断裂,纤维组织增生;药物组心肌有断列,组织之间也可见纤维组织增生,但程度较轻,心肌存活



A 假手术组 B 对照组 C 药物组
图1 心肌组织切片(光镜,HE染色,×200)



A 假手术组 B 对照组 C 药物组
图2 心肌组织切片(电镜,×6600)

多,见图1。电镜观察显示假手术组心肌细胞可见正常肌小节,排列较整齐,肌纤维密集,无明显断裂和溶解,线粒体无水肿,嵴存在,间质无水肿和增生,心肌细胞大致正常;对照组心肌细胞结构不完整,排列紊乱,部分心肌纤维缺失,部分纤维断裂,润盘不连

续;线粒体肿大明显,结构完整,但密度增高,嵴消失,有内质网扩张,肌间质中可见胶原纤维增生,心肌组织中毛细血管腔收缩,部分肌细胞崩解;药物组心肌细胞排列较规则,肌节基本完好,心肌纤维较密,间质无渗出和水肿;但部分线粒体水肿伴有嵴消失,少数线粒体嵴间基质电子密度增高,心肌细胞结构尚完整,轻度损伤,见图2。

3 讨论

心肌梗死因持续缺血导致心肌细胞的损伤和坏死,心肌结构和心室构型同时产生相应变化,并使心脏收缩舒张功能损害,血流动力学发生障碍。本研究中对对照组LVM、LVMI、IVST、LVPWT、LVEDd及LVEDP等明显大于假手术组,LVSP、 $\pm dp/dt$ 小于假手术组,提示严重持续缺血导致了左室重构发生和心功能降低。在药物组,以上指标的改善则显著优于对照组,提示持续给予芪参益气滴丸能改善严重缺血所致的心室重构和心脏收缩、舒张功能损害。光镜与电镜的形态观察也显示药物组的心肌细胞、血管损伤较轻,心肌的超微结构得到保护。持续心肌缺血可激活循环或局部的RAAS系统。本研究中对对照组心肌、血浆Ang II水平增高提示血液循环和组织中RAAS的过度激活。在芪参益气滴丸药物组,血浆、心肌组织的Ang II水平明显降低,表明该药具拮抗循环和局部Ang II作用。既往研究显示,芪参益气丸中一些药物组分具有对抗Ang II作用^[4-5],此与本研究结果相似。Ang II分泌增加与左室重构和心功能损失密切相关,因而该药改善心肌梗死的心室重构和舒缩功能可能是通过调节Ang II水平,拮抗其过度的分泌而产生的。研究显示^[6],心功能衰竭模型的心肌组织Bcl-2蛋白和Bax蛋白的表达量及比值与组织中Ang II有关。Bcl-2基因抑制凋亡,Bax基因促进凋亡,Ang II对心脏的急性炎症反应的介导和促进作用加速心肌细胞的凋亡。本研究中对对照组心肌AI高于假手术组,药物组AI低于对照组,药物组与对照组比较Bcl-2表达上调,Bax表达下调,表明心肌细胞凋亡减轻可能与Bcl-2/Bax的不同表达结果有关,提示了该药抑制心肌梗死后的心室重构、改善心功能原因所在。心室壁张力的增加也是促使心肌细胞凋亡重要因素^[7],有研究表明,黄芪增高心肌细胞内环磷酸腺苷(cAMP),抑制心肌细胞膜 Na^+-K^+-ATP 酶,产生类似正性肌力作用,本研究中药物干预后左室舒张末压力降低、心输出量的增加,提示此正性变力作用,因而产生的室壁张力降低

对减轻和抑制心肌细胞凋亡起一定作用。此外该药物中丹参、三七的某些组分有扩张冠状动脉,抑制血小板聚集、降低血黏度、抑制血栓形成,提高心肌超氧化物歧化酶(SOD)活力、降低过氧化脂质含量、抗自由基,促进细胞再生及抑制组织纤维化^[8],其减轻心肌损伤改善心功能可能还与这些因素相关,可作进一步研究与探讨。

参考文献

- [1]杜武勋,朱明丹,冯利民,等.芪参益气丸干预急性心肌梗死后早期心室重构的临床研究[J].中国循证心血管医学杂志,2008,1(1):41-43.
- [2]Olivetti G, Capasso JM, Meggs LG, et al. Cellular basis of chronic ventricular remodeling after myocardial infarction in rat[J]. Circ Res, 1991, 68(3):856-859.
- [3]张沛,杨跃进,宋来凤,等.大、中、小剂量依那普利防治大鼠急性心肌梗死左心室重构的作用对比[J].中国循环杂志,2001,16(4):255-258.
- [4]侯云生,何振山,齐书英,等.黄芪对心肌血管紧张素和羟脯氨酸含量的影响[J].心脏杂志,2006,12(1):270-272.
- [5]刘继军,张宏考,谢辉.丹参酮 II 抑制血管紧张素 II 诱导的心肌细胞凋亡与肥大[J].高血压杂志,2006,14(4):286-289.
- [6]Cardin S, Li D, Thorin-Trescases N, et al. Evolution of the atrial fibrillation substrate in experimental congestive heart failure: angiotensin-dependent and independent pathways[J]. Cardiovasc Res, 2003, 60(2):315-325.
- [7]Di Napoli P, Taccardi AA, Grilli A, et al. Left ventricular wall stress as a direct correlate of cardiomyocyte apoptosis in patients with severe dilated cardiomyopathy[J]. Am Heart J, 2003, 146(6):1105-1111.
- [8]李霞,尚小明,许丹.中医药治疗急性心肌梗死的研究进展[J].河北中医,2007,29(4):365-368.

(收稿日期:2010-02-25;修回日期:2010-09-06)

[编辑:行 之]

欢迎邮购《中国现代名中医医案精粹》

《中国现代名中医医案精粹》(1-6)共收录434位名老中医的5172例医案,所选名中医极具权威性,其中部分名老中医现已谢世,因此所收医案尤为珍贵。《中国现代名中医医案精粹》为精装16开本,第1集694页(95元),第2集669页(92元),第3集720页(96元),第4集820页(108元),第5集619页(85元),第6集558页(75元)。邮购单集加邮挂费5元,购全套免邮费,款到寄书。汇款地址:北京市东直门内南小街16号中医杂志医海林书店(100700);联系人:崔京艳、邓媛;联系电话:(010)64013162,(010)64014411-3053。