

丹参注射液对心肌梗死后大鼠缺血心肌血管新生的影响

张淑娟 王振涛* 韩丽华 柴松波

河南省中医院心内科, 河南省郑州市东风路 6 号, 450011)

基金项目: 河南省杰出青年科学基金资助项目 (0312002200)

* 通讯作者: wzht62@163.com, 13803817796

[摘要] 目的 观察丹参注射液对心肌梗死后大鼠缺血心肌血管新生的作用及机制。方法 选取 Wistar 大鼠 32 只结扎大鼠左冠状动脉, 造成急性心肌梗死动物模型, 随机分为丹参注射液组、麝香保心丸组、模型组, 并设假手术组, 每组 8 只。6 周后检测各组大鼠缺血心肌中微血管数(MVC)、微血管密度(MVD)及 VEGF mRNA 的表达及其灰度值。结果 模型组、麝香保心丸组及丹参注射液组大鼠心肌梗死边缘区 MVC 和 MVD 较假手术组明显增多 ($P < 0.05$); 丹参注射液组、麝香保心丸组大鼠心肌梗死边缘区 MVC 和 MVD 较模型组明显增加 ($P < 0.05$), 丹参注射液组与麝香保心丸组作用相似 ($P > 0.05$)。模型组 VEGF mRNA 表达及其灰度值明显高于假手术组 ($P < 0.05$); 丹参注射液组、麝香保心丸组明显高于模型组 ($P < 0.05$), 丹参注射液组低于麝香保心丸组 ($P < 0.05$)。结论 丹参注射液可促进心肌梗死后大鼠缺血心肌血管新生, 其机制可能与促进 VEGF mRNA 的表达有关。

[关键词] 丹参注射液; 心肌梗死; 血管新生; 血管内皮生长因子; 实验研究

Effect of Salvia Miltiorrhiza Injection on Angiogenesis in Ischemic Myocardium of Myocardial Infarction Rats

ZHANG Shujuan, WANG Zhentao, HAN lihua, CHAI Songbo

(Henan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450002)

ABSTRACT Objective To observe the effect and mechanism of Danshen Injection (*Salvia Miltiorrhiza* Injection) on the angiogenesis in ischemic myocardium of the rats with myocardial infarction (MI). **Methods** The left coronary arteries of Wistar rats were ligated to make the models of acute myocardial infarction. Totally 32 rats were randomized into Salvia Miltiorrhiza Injection group, Shexiang Baoxin Pills (Pills containing Moschus to protect the heart) group (positive control group), and model group (negative control group). A sham operation group was set up. Eight rats were included in each group. Microvascular count (MVC), Microvascular density (MVD), and vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA expression in ischemic myocardium of rats with MI were detected six weeks later. **Results** The MVC and MVD in the marginal zone of ischemic myocardium of rats with MI in the model group, Shexiang Baoxin Pills group, and Salvia Miltiorrhiza Injection group were significantly higher than those in the sham operation group ($P < 0.05$). The MVC and MVD in the marginal zone in the Salvia Miltiorrhiza Injection group and Shexiang Baoxin Pills group were significantly higher than those in the model group ($P < 0.05$). The effect of Salvia Miltiorrhiza Injection group was similar to that of Shexiang Baoxin Pills group ($P > 0.05$). The VEGF mRNA expression and its grayness in the model group was significantly higher than those in the sham operation group ($P < 0.05$), they were significantly higher in the Salvia Miltiorrhiza Injection group and Shexiang Baoxin Pills group than in the model group ($P < 0.05$), whilst they were lower in the Salvia Miltiorrhiza Injection group than in the Shexiang Baoxin Pills group ($P < 0.05$). **Conclusion** Salvia Miltiorrhiza Injection may promote angiogenesis in ischemic myocardium of the rats with MI. Its mechanism might be related to promoting the VEGF mRNA expression.

Key Words Salvia Miltiorrhiza Injection (Danshen Zhushen); myocardial infarction; angiogenesis; VEGF mRNA expression; experimental study

心脏冠状动脉侧支循环的形成和开放能够缓解心肌缺血、防止细胞坏死、预防和延缓缺血性心肌病的形成、改善患者的临床症状和预后, 促进冠状动脉侧支循环形成和开放、血运重建为冠心病的治疗措

施之一, 而血管新生可促进缺血周边组织侧支循环建立。本研究观察中药丹参注射液对心肌梗死后大鼠缺血心肌血管新生的影响, 并通过观察其对相关生长因子基因表达的影响, 初步探讨其促缺血心肌

血管新生的作用机制。

1 材料与方法

1.1 药物

丹参注射液,上海第一生化药业有限公司生产,批号:031001,国药准字:Z31020398;麝香保心丸,上海和黄药业有限公司生产,批号:A040214,国药准字:Z31020068。麝香保心丸粉碎后溶于无菌蒸馏水中,浓度为 3mg/ml。

1.2 试剂与仪器

小鼠抗大鼠 CD34 单克隆抗体,购自美国 Santa 公司,血管内皮生长因子(VEGF)原位杂交试剂盒(批号:MK1142)、DAB 浓缩显色液试剂盒(批号:SA2021)购自武汉博士德生物工程有限责任公司。

小动物呼吸机(江西特力麻醉呼吸设备公司,型号:TKR-200C);显微镜(日本 Olympus 光学有限公司,型号:CH20BIMF-200);Biosens Digital Imaging System 型彩色病理图象分析系统(上海山富科学仪器有限公司,版本 V1.60)。

1.3 动物造模、分组与给药

选体重(200g±20)g,清洁级 Wistar 雄性大鼠 32 只(由郑州大学动物中心提供,实验动物合格证号:410116),参照文献[1]方法,1%戊巴比妥腹腔注射(35mg/kg)麻醉后,背位固定行气管插管术,连接小动物呼吸机,开胸结扎左冠状动脉根部,经体表心电图监测显示造成急性心肌梗死后,缝合胸壁,观察大鼠生理状态平稳,停止人工呼吸,术后注射青霉素 3 天预防感染,按随机数字表法分为丹参注射液组、麝香保心丸组、模型组、假手术组手术方法同上,但在冠状动脉下穿线后打一松结,每组各 8 只。

造模后 24h 内开始药物干预,每日给药 1 次。丹参注射液组腹腔注射丹参注射液 0.5g/(kg·d);麝香保心丸组灌胃麝香保心丸 30mg/(kg·d);假手术组腹腔注射生理盐水 10ml/(kg·d);模型组与假手术组灌胃同等容积的生理盐水 10ml/(kg·d)。6 周后处死动物。

1.4 观察指标

取心肌组织(包括心肌梗死区、移行区、健存区),10%中性缓冲甲醛液固定,石蜡包埋,制备组织切片。

1.4.1 大鼠心肌梗死边缘区心肌微血管数(MVC)、微血管密度(MVD)测定 免疫组织化学法染色组织切片,一抗工作浓度为 1:100,染色后血管内皮细胞被染成棕黄色。参考文献[2]方法,凡

染成棕黄色单个内皮细胞或内皮细胞簇均作为一个血管计数,凡管腔大于 8 个红细胞大小、带有较厚肌层的血管区域血管均不计数。具体方法为:在×40 视野下找到心肌梗死边缘区,然后在×400 视野下进行微血管计数,每张切片随机选取 5 个视野,计数每个视野的 MVC,取其均值作为本例大鼠的 MVC 值,因 MVD 以毛细血管个数/视野表示,故每例 MVC 值即为该大鼠的 MVD 值。

1.4.2 大鼠心肌梗死边缘区心肌 VEGF mRNA 表达检测

用原位杂交法染色组织切片,VEGF mRNA 的表达以细胞内出现棕黄色颗粒沉着为阳性反应,用病理图象分析系统计算心肌梗死边缘区心肌每×100 视野中平均灰度值,每张切片随机测定 6 个视野,取其均值作为该大鼠的灰度值。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 11.0 统计分析软件处理,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

2.1 各组大鼠心肌梗死边缘区 MVC 比较

图 1 示,各组均可看到新生的微血管,假手术组微血管增生不明显;模型组可见少量增生的微血管,但多于假手术组;丹参注射液组、麝香保心丸组可见明显增生的微血管,两组均多于模型组,丹参注射液组少于麝香保心丸组。

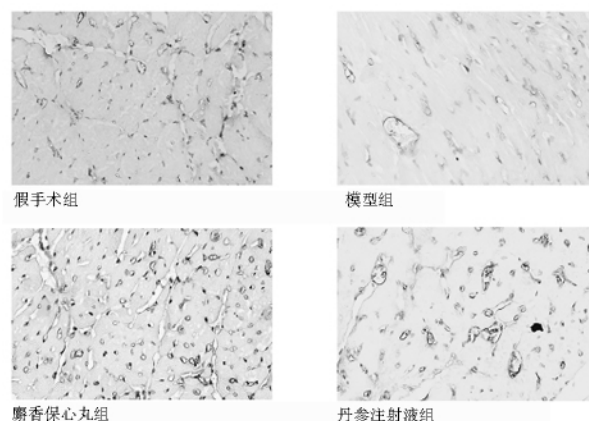


图 1 各组大鼠心肌梗死边缘区免疫组化切片(×400)

表 1 示,与假手术组相比,模型组、麝香保心丸组及丹参注射液组 MVC 和 MVD 明显增多($P < 0.05$);丹参注射液组、麝香保心丸组 MVC 和 MVD 较模型组明显增多($P < 0.05$);丹参注射液组和麝香保心丸组作用相似($P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠心肌梗死边缘区 MVC 及 VEGF mRNA 表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	MVC(个)	VEGF mRNA
假手术组	8	42.41 $\pm$ 2.31	50.93 $\pm$ 7.19
模型组	8	56.96 $\pm$ 10.53 [#]	65.41 $\pm$ 5.93 [#]
麝香保心丸组	8	82.69 $\pm$ 4.89 ^{#*}	91.30 $\pm$ 7.98 ^{#*}
丹参注射液组	8	77.60 $\pm$ 7.52 ^{#*}	78.38 $\pm$ 8.95 ^{#*} ▲

注:与模型组比较,* $P < 0.05$;与麝香保心丸组比较,▲ $P < 0.05$;与假手术组比较,# $P < 0.05$

2.2 各组大鼠心肌梗死边缘区 VEGF mRNA 的表达及其灰度值

图 2 示,各组 VEGF mRNA 的阳性染色呈棕黄色,阳性区域主要分布于心肌细胞胞浆,假手术组可见极少量弱阳性表达;模型组的阳性染色范围较小,多于假手术组;丹参注射液组明显多于模型组,但少于麝香保心丸组。

表 1 示,模型组 VEGF mRNA 表达的灰度值明显高于假手术组,差异有统计学意义($P < 0.05$);丹参注射液组、麝香保心丸组 VEGF mRNA 表达的灰度值高于模型组,差异均有统计学意义($P < 0.05$);丹参注射液组 VEGF mRNA 表达的灰度值低于麝香保心丸组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

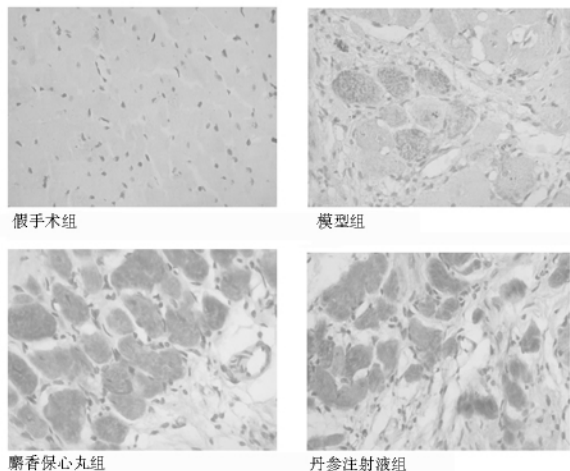


图 2 各组大鼠心肌梗死边缘区 VEGF mRNA 表达($\times 400$)

3 讨论

丹参注射液具有改善冠状动脉循环、促进冠状动脉侧枝循环的开放和形成、保护缺血心肌及可能具有预防经皮腔内冠状动脉成形术后再狭窄的作用^[3-4],是临床上治疗冠心病常用且已证实有效的活血化瘀类中成药。本研究通过动物实验观察丹参注射液是否有促心肌梗死后大鼠缺血心肌血管新生的作用并探讨其分子机制。

MVD 是普遍采用的能够反映血管新生强度的有效指标^[5]。目前认为 CD34 是较特异和敏感的生长中的血管内皮细胞表面标志,其特异性最高,有较强的可重复性^[6],优于内皮细胞的其他标记物^[7],故本研究采用抗 CD34 单抗来检测大鼠心肌组织切片中血管内皮细胞 CD34 表达状况,用以反映血管新生状况、显示和计算 MVC 和 MVD。分子生物学研究表明,心肌缺血缺氧时的血管新生均是通过生长因子的作用而引起的^[8],以 VEGF 和碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)为最重要。VEGF 是促进血管生成特异性最高、功能最强的调控因子^[9],VEGF 水平可反映心肌缺血程度,并与冠状动脉病变程度密切相关^[10],故采用原位杂交方法检测丹参注射液对心肌梗死后大鼠缺血心肌局部 VEGF mRNA 表达的影响,在 mRNA 水平探讨其促血管新生作用机制。心肌缺血缺氧时,VEGF 和 bFGF 及受体的表达增强^[11],本研究也发现模型组 VEGF mRNA 的表达及其灰度值高于假手术组,提示缺血缺氧可诱导 VEGF mRNA 的表达。

本研究显示,丹参注射液能使心肌梗死后大鼠心肌梗死边缘区 MVC 及 MVD 显著增加,表明丹参注射液有促进或诱导心肌梗死后大鼠缺血心肌血管新生的作用。本研究还表明,应用丹参注射液后大鼠缺血心肌中 VEGF mRNA 表达及其灰度值明显增加,且发现其增加趋势同 MVC、MVD 相一致。从上述结果推测丹参注射液促心肌梗死后大鼠缺血心肌血管新生作用与促进 VEGF mRNA 表达有关。麝香保心丸有促心肌梗死后大鼠缺血心肌血管新生及促进 VEGF 和 bFGF 表达的作用^[12-13],故选该药作为对照。尽管本研究显示丹参注射液能上调 VEGF mRNA 的表达,但其机理、用药时间以及最佳剂量均有待进一步研究。

参考文献

- [1]王振涛,李敏,赵明镜,等.活血、益气注射液对心梗后左心衰大鼠心肌局部 RA、Ang II 影响的对比实验研究[J].中国中医药信息杂志,2000,7(8):35,78.
- [2]Tatsuta M, Iishi H, Baba M, et al. Attenuation by genistein of sodium-chloride-enhanced gastric carcinogenesis induced by N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in Wistar rats[J]. Int J Cancer, 1999, 80(3):396-399.
- [3]刘后功,王琳,陆再英,等.丹参注射液对犬缺血心肌更新供血的影响[J].中国医院药学杂志,1999,19(11):653-655.

(下转第 1596 页)

低肺毛细血管内皮细胞的损伤程度,同时也可以减少血浆蛋白向肺泡腔内渗出,从而使肺毛细血管通透性降低,蛋白渗漏减少,在一定程度上减轻肺水肿,且全方组表现为臭秽的黑色稀便,说明泻肺平喘灵泻肺以解毒,邪气渐退,正气渐复,恢复肺脏之通调水道之功,使水液代谢趋于正常而改善模型大鼠的肺水肿状态。本研究表明,在三拗汤基础上配伍通里攻下药、活血化瘀药组成的泻肺平喘灵,能降低肺泡灌洗液中白蛋白,从而减少磷脂的耗损,其整体疗效明显优于各拆方单用。泻肺平喘灵组成中因有大黄,实验大鼠多数出现大便稀,小便增多,是痰饮由二便排出之故。这与临床应用时情况类似。腹泻导致水、电解质紊乱,甚至血容量不足而影响循环功能。但腹泻很可能也是大黄等通下药发挥泻下作用,消除肠道内及其他部位细菌和毒素的重要方式。如何解决这个矛盾,使各药既能发挥疗效又减少副反应,值得进一步研究。

参考文献

- [1]倪新强,韩新民.肺与大肠相表里发生学研究[J].安徽中医学院学报,2010,29(5):1-3.
- [2]韩新民,李江全,任现志.活血通腑法是治疗哮喘发作期的重要法则[J].南京中医药大学学报,2003,19(5):304.
- [3]韩新民,杨江,孙轶秋,等.“泻肺平喘灵”治疗小儿热性哮喘 55 例临床观察[J].江苏中医药,2007,39(11):39-41.
- [4]Griese M. Pulmonary surfactant in health and human lung disease: state of the art[J]. Eur Respir J, 1999,13(6): 1455-1476.
- [5]韩国栋,常繁华,冯学瑞,等.对“肺与大肠相表里”理论的实验研究[J].中医杂志,1990,31(2):48-50.
- [6]杨胜兰,王鹏,李道木,等.通腑法对大鼠肠源性肺损伤保护作用机制的研究[J].中国中西医结合消化杂志,2003,11(3):154-156.
- [7]史菲,邱晨.大鼠支气管肺泡灌洗术标准化操作的探讨[J].中国现代医学杂志,2002,12(24):67-69.
- [8]薛芳.急性呼吸窘迫综合征与阳明腑实喘满证[J].辽宁中医杂志,1982,5(4):10-11.
- [9]冯立民,陈海龙,关凤林.阳明腑实证时内毒素与炎症介质的变化及复方大承气汤的治疗作用[J].中国中西医结合外科杂志,2003,9(5):351-353.
- [10]赵丹虹,吴肇汉,孙波.内毒素致急性肺损伤时内源性肺表面活性物质的改变[J].上海医科大学学报,1999,26(3):169-171.
- [12]张绍芬,邓继岩,李晶,等.肺炎患儿支气管肺泡灌洗液中 PS 水平的变化[J].青岛大学医学院学报,2009,45(6):542-543,546.

(收稿日期:2010-12-29,修回日期:2011-03-17)

[编辑:行之]

(上接第 1592 页)

- [4]郭丽娥,陈晓虎,张如升.丹参对经皮冠状动脉介入治疗后再狭窄的预防机制[J].中国民族民间医药,2009,4(1):1.
- [5]Erdem O, Erdem M, Erdem A, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and assessment of microvascular density with CD34 and endoglin in proliferative endometrium, endometrial hyperplasia, and endometrial carcinoma[J]. Int J Gynecol Cancer, 2007, 17(6): 1327-1332.
- [6]Tanigawa N, Lu C, Mitsui T, et al. Quantitation of sinusoid-like vessels in hepatocellular carcinoma: Its clinical and prognostic significance[J]. Hepatology, 1997, 26(5): 1216-1223.
- [7]Kimura H, Nakajima T, Kagawa K, et al. Angiogenesis in hepatocellular carcinoma as evaluated by CD34 immunohistochemistry[J]. Liver, 1998, 18(1): 14-19.
- [8]Harada K, Friedman M, Lopez JJ, et al. Vascular endothelial growth factor administration in chronic myocardial ischemia[J]. Am J Physiol, 1996, 270 (5 Pt 2): H1791-1802.
- [9]Ehrlich M, Rao J, Pabby A, et al. Improvement in the appearance of wrinkles with topical transforming growth factor beta (1) and L-ascorbic acid[J]. Dermatol Surg, 2006, 32(5): 618-625.
- [10]黄晨,张春蕾,李源,等.老年大鼠心肌缺血后心脏 VEGF-1 和 VEGFR-2 表达的研究[J].中国老年学杂志,2007,27(2):113-115.
- [11]尹瑞兴,冯建章,姚震.急性心肌梗死大鼠血清血管内皮生长因子含量的变化[J].中国病理生理杂志,2000,16(1):30-32.
- [12]汪姗姗,李勇,范维琥,等.麝香保心丸对实验性心肌梗塞大鼠心脏的促血管生成作用[J].中成药,2002,24(6):446-449.
- [13]王大英,李勇,范维琥.麝香保心丸对心肌梗死大鼠梗死面积和血管新生的作用[J].中成药,2004,26(11):912-915.

(收稿日期:2010-12-13,修回日期:2011-03-09)

[编辑:行之]