

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2024.13.012

实验研究

当归四逆颗粒对冠心病寒凝血瘀证模型大鼠心肌细胞凋亡及血管活性因子的影响

郭倩池, 张龄月, 王康宇, 贡济宇, 高文义✉

长春中医药大学药学院, 吉林省长春市净月经济开发区博硕路 1035 号, 130117

[摘要] **目的** 探讨当归四逆颗粒治疗冠心病寒凝血瘀证的可能作用机制。**方法** 50 只 SD 大鼠随机分为空白组、模型组、丹参滴丸组及当归四逆颗粒低、高剂量组, 每组 10 只。除空白组外, 其余各组大鼠通过低温反复冷刺激结合腹腔注射垂体后叶素法建立大鼠冠心病寒凝血瘀证模型。造模第 6 周丹参滴丸组给予复方丹参滴丸 $0.073\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 灌胃, 当归四逆颗粒低、高剂量组分别给予当归四逆颗粒 20.2 、 $40.4\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 灌胃, 空白组及模型组给予无菌水 $0.2\text{ ml}/10\text{ g}$ 灌胃, 均连续灌胃 2 周。记录大鼠一般情况, 比较每周体质量, 干预结束后检测心电图、血液流变学指标 (包括全血低切黏度、全血高切黏度、红细胞聚集指数) 及心脏指数评价药物作用效果, 并采用 HE 染色观察心肌组织病理学变化, TUNEL 染色检测心肌细胞凋亡情况, ELISA 法检测血清促甲状腺激素 (TSH)、游离三碘甲状腺原氨酸 (FT_3)、游离四碘甲状腺原氨酸 (FT_4) 水平及血栓素 B_2 (TXB_2)、6-酮前列腺素 $\text{F}_{1\alpha}$ ($6\text{-Keto-PGF}_{1\alpha}$)、内皮素 1 (ET-1)、一氧化氮 (NO) 水平。**结果** 与空白组同时时间点比较, 其余各组大鼠各时间点体质量均降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与模型组同时时间点比较, 当归四逆颗粒高剂量组及丹参滴丸组大鼠在第 6、7 周时体质量增加 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。空白组大鼠心电图 S-T 段接近等电位线, 心肌结构规则, 纤维排列紧密, 细胞核完整且排列整齐; 模型组大鼠心电图 S-T 段显著升高, 心肌纤维排列明显紊乱, 心肌细胞出现肿大、坏死且有炎症细胞浸润, 心肌细胞凋亡阳性细胞明显增多; 各给药组心电图 S-T 段降低, 心肌纤维排列整齐, 心肌细胞结构及形态改善, 炎症细胞减少, 凋亡阳性细胞数明显降低。与空白组比较, 模型组大鼠心脏指数、全血高切黏度、全血低切黏度、红细胞聚集指数升高, 血清中 TSH、 FT_3 、 FT_4 、NO、 $6\text{-Keto-PGF}_{1\alpha}$ 含量显著降低, ET-1、 TXB_2 含量显著升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较, 各给药组大鼠心脏指数、全血高切黏度、全血低切黏度、红细胞聚集指数、ET-1、 TXB_2 水平均显著降低, NO、 $6\text{-Keto-PGF}_{1\alpha}$ 含量显著升高, 当归四逆颗粒高剂量组及丹参滴丸组血清中 TSH、 FT_3 、 FT_4 水平均升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。当归四逆颗粒低剂量组大鼠血清 TSH 水平低于丹参滴丸组和当归四逆颗粒高剂量组 ($P<0.01$)。**结论** 当归四逆颗粒具有减轻冠心病寒凝血瘀证心肌损伤的作用, 其作用机制可能与减少心肌细胞凋亡、提高能量代谢、调节血管活性因子水平有关。

[关键词] 冠心病; 寒凝血瘀; 当归四逆汤; 细胞凋亡; 血管活性因子; 能量代谢

冠心病是由冠状动脉粥样硬化引起的血管腔狭窄和供血不足导致的心脏功能障碍或器质性病变。现代医学治疗方法主要包括药物治疗、介入治疗

等, 但存在费用较高、耐药性增加、危险性高等弊端^[1]。中医学将其归属于“胸痹”范畴, 为本虚标实之证, 本虚多为气虚、气阴两虚及阳虚, 标实主要为血瘀、寒凝、气滞等, 其中寒凝血瘀为冠心病常见的证型之一, 以温补心阳、散寒通脉为主要治则^[2]。当归四逆汤源自《伤寒论》^[3], 具有温经散寒、养血通脉功效, 现已广泛应用于心血管疾病的治^[4]。既往研究表明, 应用当归四逆汤治疗阴寒

基金项目: 国家中医药管理局国家中药标准化项目 (ZYBZH-Y-JL-25); 吉林省科技发展计划 (20210204078YY, 20220401070YY); 神威药业集团有限公司古代经典名方颗粒剂的开发研究 [(2017) SW-KF105]

✉ 通讯作者: 718945223@qq.com

凝滞型冠心病不稳定型心绞痛获得了较好的疗效^[5]。且当归四逆汤具有调节免疫^[6]、抗血栓抗凝血^[7]等药理作用。另有研究显示,血管活性因子失衡与冠心病的发生具有一定相关性^[8]。因此,本研究从血管活性因子角度探讨当归四逆颗粒治疗冠心病寒凝血瘀证的可能作用机制,旨在为临床应用提供依据。本研究经长春中医药大学伦理委员会审核,伦理审查批准号:2023556。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF级健康雄性SD大鼠50只,6周龄,体重(220±20)g,购于长春市亿斯实验动物技术有限公司,实验动物许可证号:SCXK(吉)-2018-0007。大鼠饲养在光/暗周期为12h、室温18~22℃的SPF级饲养室中,饲养期间自由饮食、饮水。

1.2 药物

当归四逆汤组成:当归三两,桂枝三两(去皮),芍药三两,细辛三两,甘草二两(炙),通草二两,大枣二十五枚(擘)。参照《经典名方当归四逆汤的历史沿革与关键信息考证》^[9]中明确以“1两=13.8g”进行剂量折算,即当归41.4g,桂枝41.4g,白芍41.4g,细辛41.4g,木通27.6g[参照《古代经典名方关键信息表(“竹叶石膏汤”等25首方剂)》^[10]中汉代通草为今木通],炙甘草27.6g,大枣75.0g。当归(批号20181103),桂枝(批号1710202),白芍(批号1709271),细辛(批号JLT20190805),木通(批号17099203),炙甘草(批号17111411),大枣(批号HBA20191202),中药饮片均购自神威药业。按处方量取饮片适量,加10倍量水,煎煮3次,每次120min,合并滤液浓缩干燥。按照1:1比例加入糊精均匀混合,喷洒70%乙醇适量制成颗粒。以70kg成人每日治疗剂量等效剂量系数折算法^[11],将上述颗粒分别配制成1.35、2.70g/ml的药液,4℃保存。

垂体后叶注射液(6U/ml,批号:211001),康普药业股份有限公司;复方丹参滴丸(27mg/丸,批号:221103),天士力医药集团有限公司。

1.3 主要试剂与仪器

一氧化氮(NO,货号:YX-151400R)、6酮前列腺素F1 α (6-Keto-PGF $_{1\alpha}$,货号:YX-061105R)、内皮素1(ET-1,货号:YX-052001R)、血栓素B2(TXB $_2$,货号:YX-202404R)、游离甲状腺激素(FT $_4$,货号:YX-062004R)、游离三碘甲状腺原氨

酸(FT $_3$,货号:YX-062003R)、促甲状腺激素(TSH,货号:YX-201908R)ELISA检测试剂盒,上海优选生物技术有限公司;无水乙醇(货号:100092683)、二甲苯(货号:10023418)、中性树胶(货号:1000416),国药集团化学试剂有限公司;环保型脱蜡液(货号:G1128)、通用型组织固定液(货号:G1101)、HE染液套装(货号:G1076)、PBS缓冲液(货号:G0002)、蛋白酶K(货号:G1205)、破膜液(货号:G1204)、TUNEL试剂盒(货号:G1502)、DAPI(货号:G1012)、抗荧光猝灭封片剂(货号:G1401),Servicebio公司;4%多聚甲醛(批号:23187852),Biosharp公司;戊巴比妥钠(批号:800323),北京化工厂;糊精(食品级,批号:210404),禾兴生物科技有限公司。

电子天平(JM-A5002型,余姚铭铭称重校验设备有限公司);电陶炉(KES-W22CS208H型,深圳市康佳智能电器科技有限公司);台式高速冷冻离心机(TGL16型,长沙英泰仪器有限公司);全自动多功能酶标仪(M200PV0型,奥地利Tecan公司);病理切片机(RM2016型,上海徕卡仪器有限公司);正置光学显微镜(NIKON ECLIPSE CI型,日本尼康公司);冰冻切片机[CRYOSTAR NX50型,赛默飞世尔科技(中国)有限公司];全自动血流变测试仪(ZL600型,众驰伟业科技发展有限公司);16通道多导生理记录仪(MP150型,Biopac公司)。

1.4 造模及干预方法

50只大鼠适应性饲养1周后,采用随机数字表法分为空白组、模型组、丹参滴丸组及当归四逆颗粒低、高剂量组,每组10只。除空白组外,其余各组大鼠参考文献[12]方法将造模大鼠置于低温冰柜内,温度为-15℃,持续放置1h,之后再返回至20℃室温,如此反复6周;于第5周第5天给予垂体后叶素20U/kg腹腔注射,空白组给予0.9%氯化钠溶液3ml/kg腹腔注射,均每日1次,连续3天。当大鼠出现蜷缩少动、寒颤、毛发无光、耳壳发白、大便湿烂等症状,心电图出现S-T段抬高,血清TXB $_2$ 升高、6-Keto-PGF $_{1\alpha}$ 水平降低,与正常大鼠比较有显著性差异,说明冠心病寒凝血瘀证模型建立成功^[12]。

造模第6周开始灌胃给药,丹参滴丸组大鼠给予复方丹参滴丸0.073g·kg $^{-1}$ ·d $^{-1}$ 灌胃;当归四逆颗粒低、高剂量组大鼠分别给予当归四逆颗粒20.2、

40.4 g·kg⁻¹·d⁻¹灌胃，其中当归四逆颗粒低剂量为临床等效剂量；空白组及模型组大鼠给予0.2 ml/10 g 无菌水灌胃。各组均灌胃连续2周。

1.5 观察指标及方法

最后一次给药结束后24 h取材。测量大鼠体质量，麻醉后进行心电图检查；腹主动脉采血，离心后取上清液于-80℃冰箱中冻存，用于后续检测；取血后打开大鼠胸腔，剪取完整心脏，用生理盐水冲洗出心脏内的残留血液，计算心脏指数；将各组大鼠心脏浸泡于4%多聚甲醛溶液中保存，用于病理组织学及TUNEL染色细胞凋亡观察。

1.5.1 体征及体质量测定 造模及给药期间观察各组大鼠的精神状态、进食饮水、活动量、毛发、爪甲色泽等情况，每周对大鼠体质量进行监测。

1.5.2 心电图检测 使用0.4%戊巴比妥钠（1 ml·100 g⁻¹）腹腔注射麻醉，连接16通道多导生理记录仪，记录心电图S-T段变化。

1.5.3 全血黏度及红细胞聚集指数测定 取各组大鼠5 ml肝素钠抗凝血，采用全自动血液流变仪检测全血黏度（全血高切黏度、全血低切黏度）及红细胞聚集指数。

1.5.4 心脏指数测定 取各组大鼠心脏称量，计算心脏指数。心脏指数=心脏质量/体质量。

1.5.5 心肌组织病理学观察 心脏组织于4%多聚甲醛中固定，石蜡包埋、切片，HE染色后显微镜下观察心肌组织结构变化。

1.5.6 TUNEL染色检测心肌细胞凋亡 取各组大鼠心脏石蜡切片，依次用二甲苯、梯度乙醇、蒸馏水、蛋白酶K处理，PBS漂洗后室温平衡10 min，滴加TUNEL检测液，用DAPI复染细胞核，封片，切片于荧光显微镜下观察并采集图像（DAPI染出来的细胞核在紫外线的激发下为蓝色，试剂盒为FITC荧光素标记，凋亡阳性细胞核为绿色）。

1.5.7 ELISA法检测血清TSH、FT₃、FT₄、ET-1、NO、TXB₂、6-Keto-PGF_{1α}水平 将各组血清样品与ELISA试剂盒从冰箱里取出，室温下解冻备用。实验操作严格按照ELISA检测试剂盒操作方法进行，并通过样品吸光度值及标准曲线测定各指标水平。

1.6 统计学方法

采用GraphPad Prism 8软件运用进行数据处理和绘图，计量资料均符合正态分布用均数±标准差（ $\bar{x}\pm s$ ）表示，方差齐时多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用LSD-*t*法；方差不齐时多组间比较采用Welch检验，组间两两比较采用Kruskal-Wallis秩和检验。*P*<0.05为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠体征及不同时间点体质量变化

空白组大鼠精神状态良好，饮食正常，无异常改变。与空白组比较，模型组大鼠出现蜷缩少动、毛发无光泽、爪尾部紫暗、耳壳发白、大便湿烂、肛门污秽等表现。与模型组比较，各给药组大鼠精神状态、活动度、毛发、爪尾耳部色泽、大便情况均得到不同程度改善，其中当归四逆颗粒高剂量组改善程度最为明显，当归四逆颗粒低剂量组与丹参滴丸组无明显差别。表1示，与空白组同时时间点比较，其余各组大鼠各时间点体质量均降低（*P*<0.05或*P*<0.01）；与模型组同时时间点比较，当归四逆颗粒高剂量组及丹参滴丸组大鼠在第6、7周时体质量升高，当归四逆低剂量组仅在第7周时体质量升高（*P*<0.05或*P*<0.01）。各给药组在各时间点体质量比较差异无统计学意义（*P*>0.05）。

2.2 各组大鼠心电图变化

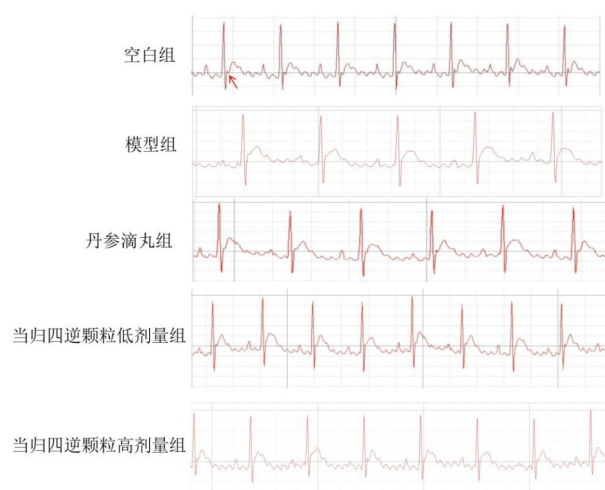
图1示，空白组大鼠心电图S-T段接近等电位线。与空白组比较，模型组心电图S-T段显著升

表1 各组大鼠不同时间点体质量比较

Table 1 Comparison of body mass at different time points of rats in each group (g, $\bar{x}\pm s$)								
组别	鼠数	第1周	第2周	第3周	第4周	第5周	第6周	第7周
空白组	10	163.67±5.22	179.63±9.351	205.87±11.02	229.27±9.15	246.95±13.27	274.14±12.19	301.37±26.56
模型组	10	158.92±4.82 ^{a)}	168.47±3.74 ^{a)}	173.37±5.08 ^{a)}	178.44±4.88 ^{a)}	212.24±8.63 ^{a)}	223.64±13.18 ^{a)}	236.66±13.05 ^{a)}
丹参滴丸组	10	160.51±2.43 ^{a)}	166.47±4.78 ^{a)}	179.01±5.99 ^{a)}	185.23±11.54 ^{a)}	216.09±12.36 ^{a)}	244.27±20.91 ^{a) c)}	265.35±15.17 ^{a) c)}
当归四逆颗粒低剂量组	10	158.44±4.38 ^{a)}	168.95±4.11 ^{a)}	176.50±6.28 ^{a)}	184.21±10.31 ^{a)}	222.33±12.63 ^{a)}	240.65±12.05 ^{a)}	265.16±15.05 ^{a) c)}
当归四逆颗粒高剂量组	10	155.01±4.09 ^{a)}	166.92±4.46 ^{a)}	175.74±6.20 ^{a)}	185.13±8.40 ^{a)}	218.55±18.25 ^{a)}	255.09±6.14 ^{b) d)}	271.94±18.16 ^{b) d)}

注：a) 与空白组同时时间点比较，*P*<0.01；b) 与空白组同时时间点比较，*P*<0.05；c) 与模型组同时时间点比较，*P*<0.05；d) 与模型组同时时间点比较，*P*<0.01。

高;与模型组比较,各给药组心电图 S-T 段降低,且当归四逆颗粒高、低剂量组降低幅度大于丹参滴丸组。



注:红色箭头指示为等电位线。

图1 各组大鼠心电图结果比较

Figure 1 Comparison of electrocardiographic results of rats in each group

2.3 各组大鼠心脏指数、红细胞聚集指数、全血高切黏度、全血低切黏度比较

表 2 示,与空白组比较,模型组大鼠心脏指数、红细胞聚集指数、全血高切黏度、全血低切黏度升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与模型组比较,当归四逆颗粒高、低剂量组及丹参滴丸组大鼠以上指标均显著降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$);各给药组大鼠以上指标比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.4 各组大鼠心肌组织 HE 染色结果

图 2 示,空白组心肌结构规则,纤维排列紧密,细胞核完整且排列整齐。与空白组比较,模型组心肌纤维排列明显紊乱,心肌细胞出现肿大、坏死且有炎症细胞浸润。与模型组比较,当归四逆颗粒高、低剂量组和丹参滴丸组心肌纤维排列整齐,心肌细胞结构及形态改善,炎症细胞减少。

2.5 各组大鼠心肌细胞凋亡结果比较

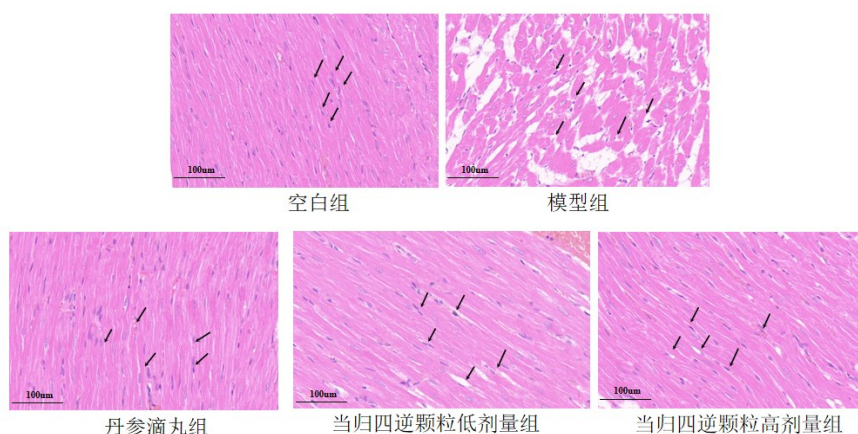
图 3 示,与空白组比较,模型组大鼠心肌组织细胞凋亡阳性细胞明显增多(凋亡阳性细胞核为绿色);与模型组比较,当归四逆颗粒高、低剂量组

表 2 各组大鼠心脏指数、红细胞聚集指数、全血高切黏度、全血低切黏度比较

Table 2 Comparison of cardiac index, erythrocyte aggregation index, whole blood high cut viscosity, and whole blood low cut viscosity of rats in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	心脏指数	红细胞聚集指数	全血高切黏度/mPa·s	全血低切黏度/mPa·s
空白组	10	0.307±0.045	2.100±0.430	3.988±0.111	9.545±0.768
模型组	10	0.400±0.036 ^{a)}	3.275±0.275 ^{b)}	6.150±0.800 ^{b)}	16.675±1.875 ^{b)}
丹参滴丸组	10	0.280±0.026 ^{c)}	2.267±0.395 ^{c)}	4.905±0.165 ^{d)}	9.105±2.939 ^{d)}
当归四逆颗粒低剂量组	10	0.313±0.015 ^{d)}	2.480±0.370 ^{c)}	4.515±0.435 ^{c)}	12.310±0.026 ^{d)}
当归四逆颗粒高剂量组	10	0.260±0.017 ^{c)}	2.737±0.085 ^{d)}	4.635±0.665 ^{d)}	7.055±1.503 ^{c)}

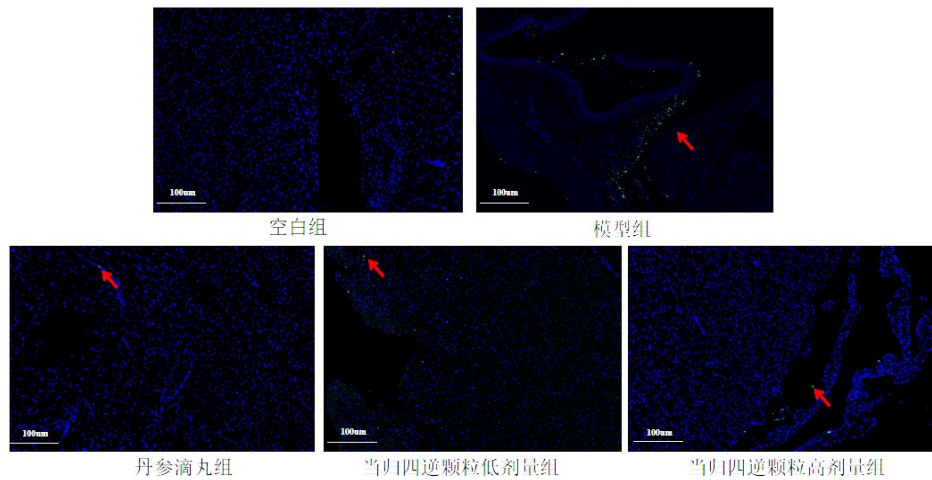
注: a) 与空白组比较, $P<0.05$; b) 与空白组比较, $P<0.01$; c) 与模型组比较, $P<0.01$; d) 与模型组比较, $P<0.05$ 。



注:黑色箭头所指为心肌细胞和炎症细胞聚集。

图2 各组大鼠心肌组织 HE 染色结果 (×10)

Figure 2 HE staining results of rat myocardial tissue in each group (×10)



注：红色箭头指示为凋亡阳性细胞。

图3 各组大鼠心肌组织TUNEL染色 (×10)

Figure 3 TUNEL staining of rat myocardial tissue in each group (×10)

及丹参滴丸组凋亡阳性细胞明显减少；与丹参滴丸组比较，当归四逆颗粒高、低剂量组凋亡阳性细胞略增多；当归四逆颗粒高、低剂量组无明显差异。

2.6 各组大鼠血清TSH、FT₃、FT₄水平比较

表3示，与空白组比较，模型组大鼠血清TSH、FT₃、FT₄水平显著降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；与模型组比较，当归四逆颗粒高剂量组及丹参滴丸组血清TSH、FT₃、FT₄水平均升高，当归颗粒低剂量组血清TSH、FT₄水平升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；

与丹参滴丸组比较，当归四逆颗粒低剂量组大鼠血清TSH水平降低 ($P<0.01$)；与当归四逆颗粒低剂量组比较，当归四逆颗粒高剂量组TSH水平显著升高 ($P<0.01$)。

2.7 各组大鼠血清ET-1、NO、TXB₂、6-Keto-PGF_{1α}水平比较

表4示，与空白组比较，模型组大鼠血清ET-1、TXB₂水平显著升高，NO、6-Keto-PGF_{1α}水平显著降低 ($P<0.01$)；与模型组比较，当归四逆颗粒高、

表3 各组大鼠血清TSH、FT₃、FT₄水平比较

Table 3 Comparison of serum TSH, FT3 and FT4 levels of rats in each group (x̄±s)

组别	鼠数	TSH/μIU·L ⁻¹	FT ₃ /pmol·L ⁻¹	FT ₄ /pmol·L ⁻¹
空白组	10	4928.89±280.46	10.91±1.33	26.50±0.48
模型组	10	3501.30±31.65 ^{a)}	8.19±0.67 ^{a)}	19.11±4.62 ^{b)}
丹参滴丸组	10	6947.96±254.92 ^{c)}	10.20±0.18 ^{d)}	28.23±0.52 ^{c)}
当归四逆颗粒低剂量组	10	4786.67±93.05 ^{c)} e)	9.82±0.09	28.30±1.95 ^{c)}
当归四逆颗粒高剂量组	10	7195.00±444.30 ^{c)} f)	10.01±0.46 ^{d)}	28.60±2.13 ^{c)}

注：TSH，促甲状腺激素；FT₃，游离三碘甲状腺原氨酸；FT₄，游离四碘甲状腺原氨酸。

a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与空白组比较， $P<0.05$ ；c) 与模型组比较， $P<0.01$ ；d) 与模型组比较， $P<0.05$ ；e) 与丹参滴丸组比较， $P<0.01$ ；f) 与当归四逆低剂量组比较， $P<0.01$ 。

表4 各组大鼠血清ET-1、NO、TXB₂、6-Keto-PGF_{1α}水平比较

Table 4 Comparison of serum ET-1, NO, TXB₂ and 6-Keto-PGF_{1α} levels in rats of each group (x̄±s)

组别	鼠数	TXB ₂ /pg·ml ⁻¹	6-Keto-PGF _{1α} /pg·ml ⁻¹	ET-1/pg·ml ⁻¹	NO/μmol·L ⁻¹
空白组	10	208.535±10.407	3452.315±161.404	148.197±1.766	76.501±2.397
模型组	10	284.470±23.392 ^{a)}	2810.183±15.582 ^{a)}	159.864±2.279 ^{a)}	62.573±2.458 ^{a)}
丹参滴丸组	10	240.833±0.896 ^{b)}	3072.593±82.985 ^{b)}	149.025±1.189 ^{c)}	71.402±3.814 ^{c)}
当归四逆颗粒低剂量组	10	241.793±18.655 ^{b)}	3184.259±64.482 ^{c)}	146.090±7.021 ^{c)}	73.691±0.690 ^{c)}
当归四逆颗粒高剂量组	10	244.697±14.135 ^{b)}	3088.241±148.451 ^{b)}	139.853±1.893 ^{c)}	71.346±0.375 ^{c)}

注：TXB₂，血栓素B₂；6-Keto-PGF_{1α}，6酮前列腺素F_{1α}；ET-1，内皮素1；NO，一氧化氮。

a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与模型组比较， $P<0.01$ 。

低剂量组及丹参滴丸组大鼠血清 ET-1、TXB₂ 水平显著降低，NO、6-Keto-PGF_{1α} 水平显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。而当归四逆颗粒高、低剂量组及丹参滴丸组组间两两比较，各指标差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

中医学认为，冠心病的主要病机是寒邪积于胸中日久，损伤胸阳，胸阳不振，血液凝滞，致使心脉痹阻^[13]。当归四逆颗粒是依据当归四逆汤研制的颗粒剂，根据对当归四逆汤方证的研究结果，认为当归四逆汤适应的病机主要为营卫气血不和/不足，不能濡养四末经脉，加之外受寒邪刺激致寒凝血瘀、阻滞经脉^[14]。本研究采用低温反复冷刺激造成寒邪积存，血脉凝滞，再通过腹腔注射垂体后叶素，使冠状动脉收缩，构建冠心病寒凝血瘀证模型^[11]，同时观察不同剂量的当归四逆颗粒对其作用效果。复方丹参滴丸已被证实在冠心病的治疗中发挥重要作用^[15]，故本研究设其为阳性对照药。

《四圣悬枢》曰：“寒伤营血，而病则在卫，以营性升发，一被寒邪，阖其皮毛，则营愈欲发。”^[16]根据寒证的特征，本实验以毛发、动物行为、大便情况等作为评价指标。本研究发现，与空白组比较，模型组大鼠出现蜷缩少动、爪尾部紫暗、耳壳发白、大便湿烂、肛门污秽等寒凝血瘀证表现。与模型组比较，当归四逆颗粒高、低剂量组及丹参滴丸组大鼠精神状态、活动度、毛发、爪尾耳部色泽、大便情况均得到改善。寒邪凝滞，易出现气滞血瘀，均可影响心脏功能^[17]。心电图 S-T 段改变作为心肌缺血常见表现，包括 S-T 段下降、S-T 段抬高^[18]。本研究心电图检测结果显示，与空白组相比，模型组大鼠心电图 S-T 段明显抬高，提示出现心肌缺血趋势，经当归四逆颗粒高、低剂量灌胃后 S-T 段明显下降，组间无明显差异，且下降幅度大于丹参滴丸组。

甲状腺激素是反映机体能量代谢的重要激素，当机体表现为寒证时，TSH、FT₃、FT₄ 表达量降低^[19]。本研究结果显示，与空白组比较，模型组大鼠 TSH、FT₃、FT₄ 表达量显著降低，当归四逆颗粒高剂量组和丹参滴丸组干预后大鼠 TSH、FT₃、FT₄ 表达水平显著上升，提示当归四逆颗粒和复方丹参滴丸均可改善大鼠寒证体质，且当归四逆颗粒高剂量组 TSH 水平显著高于丹参滴丸组和当归四逆低剂量组。血脉受寒则凝，日久则瘀，可表现为血

液流变的异常，该指标同样被用于冠心病病情参考^[20]。本研究结果显示，与空白组比较，模型组大鼠全血高切黏度、全血低切黏度及红细胞聚集指数显著上升，提示模型组出现血流变异常。与模型组比较，当归四逆颗粒各剂量组及丹参滴丸组均可降低模型大鼠全血高切、全血低切黏度及红细胞聚集指数，且各给药组差异无统计学意义。

病理结果显示，与空白组比较，模型组大鼠心肌纤维排列明显紊乱，心肌细胞出现肿大、坏死且有炎症细胞浸润；经当归四逆颗粒各剂量及复方丹参滴丸干预后，大鼠心肌纤维排列整齐，心肌细胞结构及形态改善，炎症细胞减少，提示当归四逆颗粒可以保护心肌细胞，减轻心肌损伤，效果与复方丹参滴丸相当。心肌缺血能够损伤心肌细胞，使线粒体功能紊乱，是心肌细胞坏死和凋亡的重要因素^[21]。结果表明，与空白组比较，模型组心肌细胞凋亡明显增加，当归四逆颗粒各剂量及复方丹参滴丸干预后，心肌细胞凋亡明显减少，提示当归四逆颗粒能够有效减少心肌损伤及心肌细胞凋亡的发生，从而对心肌起到保护作用。

研究^[22]显示，血管活性物质失衡参与了冠心病心绞痛寒凝血瘀证的病理变化过程，血管内皮功能紊乱主导了寒凝血瘀证的内在病理机制，冠心病心绞痛寒凝血瘀证与血管内皮功能紊乱密切相关。ET-1、NO、血栓素 A₂ (TXA₂)、前列环素 (PGI₂) 均是血管内皮细胞分泌的血管活性因子，其中 NO、PGI₂ 具有扩张血管、增加冠状动脉血流量及抑制血小板凝集的作用，ET-1、TXA₂ 则具有相反的作用^[23]。TXB₂、6-Keto-PGF_{1α} 是 TXA₂ 与 PGI₂ 的稳定代谢产物^[24-25]。本研究结果显示，与空白组比较，模型组大鼠血清中 ET-1、TXB₂ 水平显著升高，NO、6-Keto-PGF_{1α} 水平显著降低；与模型组比较，当归四逆颗粒各剂量组及丹参滴丸组大鼠血清中 ET-1、TXB₂ 水平显著降低，NO、6-Keto-PGF_{1α} 水平显著升高，提示当归四逆颗粒可以调节模型大鼠血管活性因子失衡，且各剂量组无显著性差异，与丹参滴丸组结果相当。

综上所述，当归四逆颗粒对冠心病寒凝血瘀证大鼠具有减轻心肌损伤作用，其作用机制可能与减少心肌细胞凋亡，调节血管活性因子，改善血液流变异常及机体能量代谢有关。本研究不足之处在于未涉及模型大鼠心肌凋亡的调控机制，未来将对相关机制作进一步研究。

参考文献

- [1] 赖一炜, 马长生. 2018 EHRA/EAPCI/ACCA 心房颤动合并急性冠状动脉综合征或接受经皮心血管介入治疗患者的抗栓治疗管理共识解读[J]. 中国循环杂志, 2018, 33(S2): 14-18.
- [2] 张雨涵. 胸痹寒凝血瘀证辨证规律的文献研究[D]. 吉林: 长春中医药大学, 2019.
- [3] 张仲景. 伤寒论[M]. 北京: 中医古籍出版社, 1997: 60.
- [4] 张发艳. 当归四逆汤治疗心血管疾病作用机制及应用进展[J]. 天津中医药, 2018, 35(6): 477-480.
- [5] 袁琪旻. 当归四逆汤治疗阴寒凝滞型冠心病不稳定性心绞痛的临床研究[D]. 吉林: 长春中医药大学, 2020.
- [6] 刘紫薇, 王振亮, 王兵. 基于氧化应激-炎症-衰老探讨当归四逆汤对亚急性衰老大鼠免疫功能的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2022, 28(11): 1802-1805, 1844.
- [7] 朱洪嘉, 尹春丽, 刘西, 等. 超滤离心质谱法筛选和鉴定当归四逆汤中的直接凝血酶抑制剂[J]. 广西医科大学学报, 2020, 37(5): 950-955.
- [8] 陈云龙, 李培英, 郭益红, 等. 冠心病与血管活性因子水平的相关性研究[J]. 中国医药指南, 2017, 15(30): 27-28.
- [9] 刘思鸿, 贾思琦, 佟琳, 等. 经典名方当归四逆汤的历史沿革与关键信息考证[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(1): 53-60.
- [10] 国家中医药管理局综合司, 国家药品监督管理局综合司. 国家中医药管理局综合司 国家药品监督管理局综合司关于发布《古代经典名方关键信息表(“竹叶石膏汤”等 25 首方剂)》的通知[EB/OL]. (2023-07-28) [2024-01-16]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/fgwj/gz-wj/gzwjyp/20230728165515101.html>.
- [11] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 1103.
- [12] 李驰坤, 靳宏光, 成光宇, 等. 冠心病寒凝血瘀证动物模型的建立及评价[J]. 吉林中医药, 2021, 41(9): 1209-1212.
- [13] 欧阳文. 冠心病中医证型分布特征与冠状动脉病变程度相关性的研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2016.
- [14] 彭霞. 当归四逆汤方证研究[D]. 广州: 暨南大学, 2013.
- [15] 李春霞, 张菊霞. 复方丹参滴丸治疗冠心病的系统评价研究[J]. 世界最新医学信息文摘, 2017, 17(18): 117.
- [16] 黄元御. 黄元御医学全书: 四圣悬枢[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2016: 776.
- [17] 耿运玲, 吴圣贤, 杜雅薇. 试述寒生引病[J]. 环球中医药, 2020, 13(3): 488-490.
- [18] 王芬, 蔺军芳, 张录兴, 等. ST-T 段改变患者心电图瀑布图形态特征及其对心血管疾病的预测价值[J]. 检验医学与临床, 2024, 21(3): 346-349.
- [19] 黄俊山, 白介辰, 黄国良, 等. 从检测血中 FT₃、FT₄、T₄、E₂ 及皮质醇等指标探讨寒证热证的本质[J]. 中国中西医结合杂志, 2002, 22(2): 113-115.
- [20] 刘华朋, 朱成慧, 李丹丹, 等. 寒凝血瘀型家兔模型的实验观察[J]. 辽宁中医杂志, 2017, 44(9): 1985-1987.
- [21] HOU HF, WANG YL, LI Q, et al. The role of RiP3 in cardiomyocyte necrosis induced by mitochondrial damage of myocardial ischemia-reperfusion[J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2018, 50(11): 1131-1140.
- [22] 王朋, 杨明会, 李绍旦, 等. 冠心病心绞痛寒凝血瘀证大鼠血 ET-1、NO、TXB₂、6-Keto-PGF_{1α} 水平的变化[J]. 辽宁中医杂志, 2014, 41(5): 1049-1050.
- [23] 吴立玲, 张幼怡. 心血管病理生理学[M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2009: 131-134.
- [24] ROBERTSON RM, ROBERTSON D, ROBERTS LJ, et al. Thromboxane A₂ in vasotonic angina pectoris: evidence from direct measurements and inhibitor trials[J]. New Engl J Med, 1981, 17(304): 998-1003.
- [25] WENMAMALM A. Cardiovascular prostaglandins: some comments on their involvement in circulatory physiology and pathophysiology[J]. Acta Med Scand, 1986, 219(Suppl): 707-709.

Effects of *Danggui Sini Granules* (当归四逆颗粒) on Cardiomyocyte Apoptosis and Vasoactive Factors in Rat Models of Coronary Heart Disease with Cold Congealing and Blood Stasis Syndrome

GUO Qianchi, ZHANG Lingyue, WANG Kangyu, GONG Jiyu, GAO Wenyi

School of Pharmacy, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun, 130117

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Danggui Sini Granules* (当归四逆颗粒) in treatment of coronary heart disease with cold congealing and blood stasis syndrome. **Methods** Fifty SD rats were randomly divided into a blank group, a model group, a *Danshen Pill* (丹参滴丸) group, and a low- and high-dosage *Danggui Sini Granules* group, with 10 rats in each group. Except for the blank group, the rat model of coronary heart disease with cold congealing and blood stasis syndrome was established by repeated cold stimulation at low temperature combined with intraperitoneal injection of posterior pituitary hormone in all other groups. In the 6th week of modelling,

0.073 g·kg⁻¹·d⁻¹ of compound *Danshen Pill* was given to the *Danshen Pill* group, 20.2 and 40.4 g·kg⁻¹·d⁻¹ of *Danggui Sini Granules* were given to the low- and high-dose *Danggui Sini Granules* groups, respectively, and 0.2 ml/10 g of sterile water was given to the blank group and the model group, all for 2 consecutive weeks. The general conditions of the rats were recorded, and the body mass was compared weekly. At the end of the intervention, electrocardiogram, blood rheological indexes, including whole blood low-cut viscosity, whole blood high-cut viscosity, erythrocyte aggregation index, and cardiac index were detected to evaluate the effect of the medication, and HE staining was used to observe the myocardial histopathological changes, TUNEL staining to detect the apoptotic situation of cardiomyocytes, and ELISA to detect the serum thyroid-stimulating hormone (TSH), free triiodothyronine (FT₃), free tetraiodothyronine (FT₄) levels and thromboxane B₂ (TXB₂), 6-keto-prostaglandin F_{1α} (6-Keto-PGF_{1α}), endothelin 1 (ET-1), and nitric oxide (NO) levels. **Results** Compared with the blank group at the same time point, the body mass of rats in the remaining groups decreased at all time points ($P<0.05$ or $P<0.01$); compared with the model group at the same time point, the body mass of rats in high-dose *Danggui Sini Granules* group and *Danshen Pill* group increased at the 6th and 7th weeks ($P<0.05$ or $P<0.01$). In the blank group, the S-T segment of the electrocardiogram was close to the isoelectric line, the myocardial structure was regular, the fibres were closely arranged, and the nuclei of the cells were intact and neatly aligned; in the model group, the S-T segment of the electrocardiogram significantly elevated, and the arrangement of the myocardial fibres was obviously disordered, with myocardial cells appearing to be swollen, necrotic, and infiltrated by inflammatory cells, and the apoptosis-positive cells of the cardiac muscle cells obviously increased; in each of the medication groups, the electrocardiogram had a lowered S-T segment, and myocardial fibres were aligned, myocyte structure and morphology were improved, inflammatory cells reduced, and the number of apoptosis-positive cells significantly reduced. Compared with the blank group, the cardiac index, whole blood high cut viscosity, whole blood low cut viscosity, erythrocyte aggregation index increased in the model group, and the serum levels of TSH, FT₃, FT₄, NO, 6-Keto-PGF_{1α} significantly reduced, and the levels of ET-1 and TXB₂ significantly increased ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with the model group, the levels of cardiac index, whole blood high cut viscosity, whole blood low cut viscosity, erythrocyte aggregation index, ET-1 and TXB₂ significantly decreased and the levels of NO and 6-Keto-PGF_{1α} significantly increased in each medication group, and the serum levels of TSH, FT₃, and FT₄ elevated in the high-dose *Danggui Sini Granules* group and *Danshen Pill* group ($P<0.05$ or $P<0.01$). The serum TSH level of rats in the low-dose *Danggui Sini Granules* group was lower than that in *Danshen Pill* group and the high-dose *Danggui Sini Granules* group ($P<0.01$). **Conclusion** *Danggui Sini Granules* have the effect of alleviating myocardial injury in coronary heart disease with cold congealing and blood stasis syndrome, and its mechanism may be related to reducing myocardial cell apoptosis, improving energy metabolism, and regulating the level of vasoactive factors.

Keywords coronary heart disease; cold congealing and blood stasis; *Danggui Sini Decoction* (当归四逆汤); apoptosis; vasoactive factor; energy metabolism

(收稿日期: 2024-01-16; 修回日期: 2024-03-26)

[编辑: 邓媛]