

通阳化浊法对心肌梗死大鼠心肌血管再生的作用

袁丁, 靳利利, 黄培红, 苏慧, 史振羽, 王清海

广东省第二中医院心血管科, 广东 广州 510095

摘要: **目的** 探讨通阳化浊法对心肌梗死大鼠心肌血管再生的影响。**方法** 选取 Wistar 雄性大鼠 80 只, 随机分为通阳化浊汤组、麝香保心丸组、模型组及假手术组, 每组 20 只。通阳化浊汤组、麝香保心丸组、模型组以结扎大鼠左冠状动脉方法建立急性心肌梗死动物模型, 假手术组只开胸不结扎冠状动脉。造模后 24 h, 通阳化浊汤组及麝香保心丸组分别灌胃给予通阳化浊汤及麝香保心丸, 模型组及假手术组灌胃同等容积的生理盐水。6 周末超声心动图测定左室射血分数(LVEF)、左室短轴缩短率(LVFS)、舒张末期左室内径(LVEDd), 并处死大鼠。取心肌组织以免疫组织化学法染色检测缺血心肌中的微血管数(MVC)和微血管密度(MVD), 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。**结果** (1) 模型组、麝香保心丸组及通阳化浊汤组 LVEF、LVFS 较假手术组降低(P 均 < 0.05)。麝香保心丸组及通阳化浊汤组 LVEF 较模型组明显增高(P 均 < 0.05), 通阳化浊汤组较麝香保心丸组 LVEF 增高($P < 0.05$)。麝香保心丸组及通阳化浊汤组 LVFS 较模型组明显增高(P 均 < 0.05)。模型组、麝香保心丸组及通阳化浊汤组较假手术组 LVEDd 增大(P 均 < 0.05), 麝香保心丸组及通阳化浊汤组 LVEDd 较模型组明显减小(P 均 < 0.05)。 (2) 模型组、麝香保心丸组及通阳化浊汤组大鼠心肌梗死边缘区 MVC 和 MVD 较假手术组明显增多(P 均 < 0.05), 麝香保心丸组及通阳化浊汤组大鼠梗死心肌边缘区 MVC 和 MVD 较模型组明显增多(P 均 < 0.05), 通阳化浊汤组与麝香保心丸组 MVC 和 MVD 比较差异无统计学意义(P 均 > 0.05)。**结论** 通阳化浊法可改善心肌梗死大鼠的心功能, 促进心肌梗死大鼠缺血心肌的血管再生。

关键词: 通阳化浊; 心肌梗死; 血管再生; 大鼠; 微血管数; 微血管密度

中图分类号: R 542.2⁺2 R-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2015)08-0977-04

Effect of activating Yang and circulating Damp method on myocardial revascularization in rats with myocardial infarction

YUAN Ding, JIN Li-li, HUANG Pei-hong, SU Hui, SHI Zhen-yu, WANG Qing-hai

Cardiovascular Department, Guangdong Second Traditional Chinese Medicine Hospital,

Guangzhou, Guangdong 510095, China

Abstract: Objective To investigate the effects of activating Yang and circulating Damp method on myocardial revascularization in rats with acute myocardial infarction (AMI). **Methods** Eighty male Wistar rats were selected as experimental animals. The rats were randomly divided into four groups ($n = 20$ each): tongyanghuazuo decoction group, shexiangbaoxin pill group, model group and sham operation group. The AMI animal model was established by ligating the left coronary artery after thorecotomy in tongyanghuazuo decoction group, shexiangbaoxin pill group and model group, but the coronary artery ligation was not done after thorecotomy in sham operation group. Twenty-four hours after modeling, the tongyanghuazuo decoction and shexiangbaoxin pills were respectively administered by lavage in tongyanghuazuo decoction group and shexiangbaoxin pill group, while the equal volume of normal saline was given by lavage in model group and sham operation group. At the end of six weeks, the left ventricular ejection fraction (LVEF), left ventricular fractional shortening (LVFS) and left ventricular end diastolic internal diameter (LVEDd) were detected by echocardiography, and the myocardial tissues were taken after killing the rats to detect microvessel count (MVC) and microvessel density (MVD) in ischemic myocardium by immunohistochemical staining method. Because the MVD value was also defined as the numbers of capillary vessels per visual field, the MVD value and MVC value were the same. **Results** (1) Compared with sham operation group, LVEF and LVFS significantly decreased in model group, shexiangbaoxin pill group and tongyanghuazuo decoction group (all $P < 0.05$). LVEF increased significantly in shexiangbaoxin pill group and tongyanghuazuo decoction group compared with model group (all $P < 0.05$), while it in tongyanghuazuo decoction group increased significantly compared with shexiangbaoxin pill

group ($P < 0.05$). The LVFS significantly increased in shexiangbaoxin pill group and tongyanghuazuo decoction group compared with model group (all $P < 0.05$). Compared with sham operation group, LVEDd significantly increased in model group, shexiangbaoxin pill group and tongyanghuazuo decoction group (all $P < 0.05$), while it significantly decreased in shexiangbaoxin pill group and tongyanghuazuo decoction group compared with model group (all $P < 0.05$). (2) Compared with sham operation group, MVC and MVD at marginal zone of infarcted myocardium significantly increased in model group, shexiangbaoxin pill group and tongyanghuazuo decoction group (all $P < 0.05$), while that increased significantly in shexiangbaoxin pill group and tongyanghuazuo decoction group compared with model group (all $P < 0.05$), but which were similar in tongyanghuazuo decoction group and shexiangbaoxin pill group (all $P > 0.05$). **Conclusion** The method of activating Yang and circulating Damp may improve the heart function and promote neovascularization in ischemic myocardium in rats with AMI.

Key words: Activating Yang and circulating Damp; Myocardial infarction; Revascularization; Rats; Microvessel count; Microvessel density

心肌梗死是我国病死率最高的疾病,占心血管疾病病死率的 50% 以上^[1]。近年来,心肌梗死的发病率逐年提高,发病年龄逐年下降^[2]。虽然已有药物、冠状动脉介入、冠状动脉旁路移植术等治疗手段的完善,可不同程度改善心肌缺血,减少梗死面积,延缓左心室的重构,但这些疗法尚不能有效逆转左心室重构及防止心力衰竭。心肌梗死的修复过程及预后均与心肌血管的功能状态密切相关,梗塞区内的血管再生或重新开放对梗塞区心肌细胞的存活具有至关重要的作用,而单靠自然再生新血管适应缺血变化的过程极为缓慢,且只能代偿部分心肌功能,难以满足正常需要^[3]。心肌梗死后血管的再生作为目前新的旁路生物学策略,尤其对于一些弥漫性冠状动脉改变及难以接受传统血管重建治疗的患者可能是一种新的治疗手段^[4]。但冠状动脉旁路移植术、经皮冠状动脉血管成形术等等,需在符合要求的人群中开展,且其血管再通后仍会面临再次的狭窄、脱落等问题^[5]。在众多治疗缺血心肌血管新生的方法中,中医药具有疗效安全、可靠、毒副作用小、适用范围广等特点而备受关注^[6]。因此,深入开发研究中医药的应用,并通过科学的实验和临床研究对其疗效加以证实是急需解决的问题。

在心肌梗死的相关研究中,动物模型被广泛用于发病机制和药物治疗的研究,其模型的有效建立是完成相关实验研究的前提^[7]。心肌梗死模型动物的研发与应用是研究心肌梗死的机制及治疗的关键,也是客观评价治疗方法的重要工具^[8],可以为药物的使用提供依据。为探讨通阳化浊法对心肌梗死大鼠心肌血管再生的影响,本研究选取 Wistar 雄性大鼠,结扎大鼠左冠状动脉,造成急性心肌梗死动物模型。随机分为通阳化浊汤组、麝香保心丸组、模型组及假手术组。比较其左室射血分数(LVEF)、左室短轴缩短率(LVFS)、舒张末期左室内径(LVEDd)、微血管数

(MVC)和微血管密度(MVD)等。现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 动物 实验动物为体重(200 ± 20)g 清洁级 Wistar 大鼠 80 只,均为雄性。由郑州大学动物中心提供;饲养在带不锈钢盖底的塑料笼内,每笼 4 只,均可自行取食饮水。室内温度为 25°C ,湿度为 65%。

1.2 药物 (1)通阳化浊汤:主要组成为瓜蒌 30 g、薤白 18 g、桂枝 13 g、炙草 10 g、桔梗 12 g、研杏仁 16 g、红花 9 g、研桃仁 12 g、川芎 12 g、丹参 15 g、焦术 20 g、茯苓 24 g、半夏 15 g、(炮)附子 5 g、陈皮 15 g。制剂采用全自动煎药机煎煮,保证同一煎煮温度、煎煮时间、定水定量煎取。(2)麝香保心丸:上海和黄药业有限公司生产,国药准字:Z31020068。微丸粉碎后溶于无菌蒸馏水中,浓度为 3 mg/ml。

1.3 试剂与仪器 小鼠抗大鼠 CD34 单克隆抗体(美国 Santa 公司生产);小动物呼吸机(江西特力麻醉呼吸设备公司);EGG-6951D 型心电图机(上海光电子仪器有限公司);Powerlab/8s 型八导数据分析记录仪;显微镜(日本 Olympus 光学有限公司);彩色病理图像分析系统(日本 Sony 公司);大鼠心脏超声诊断仪(韩国 CE 公司生产)。

1.4 方法

1.4.1 试验动物分组 将心电图标准 II 导联正常的健康雄性 Wistar 大鼠 80 只进行随机分组,随机分为通阳化浊汤组、麝香保心丸组、模型组及假手术组,每组 20 只。

1.4.2 制备大鼠急性心肌梗死模型 给予大鼠适应喂养 1 周后,用 3.5% 戊巴比妥钠进行大鼠腹腔注射(35 mg/kg)麻醉,仰位固定于鼠板上,将大鼠与 Powerlab/8s 型八导数据分析记录仪连接,记录一段开胸前的正常心电图。随后将大鼠气管切开连接 Y 型气

管插管,并与小动物呼吸机连接,以 10×60 ml/min 持续通气。开胸结扎左冠状动脉制备大鼠急性心肌梗死模型。具体操作如下:胸部去毛后消毒,沿左胸骨中线切开皮肤约 2 cm,在 4~5 肋间开胸,并钝性分离肌层,打开胸腔,用静脉拉钩扩胸,除去心包膜,暴露心脏,在左心耳根部与肺动脉圆锥交界处(相当于左冠状动脉起始下约 2 cm)用一细线进行结扎,假手术组只留置手术线而不结扎。心电监护见 I、II 导联 ST 段明显抬高,即造模成功^[6]。

1.4.3 给药方式 造模后 24 h 开始进行药物干预,每日给药 1 次。通阳化浊汤组灌胃通阳化浊汤 30 mg/kg;麝香保心丸组将微丸粉碎后溶于无菌蒸馏水中(浓度为 3 mg/ml)进行灌胃 30 mg/kg;模型组及假手术组灌胃同等容积的生理盐水 10 ml/kg。

1.4.4 观察指标 (1)第 6 周末将大鼠麻醉后,选用大鼠心脏超声诊断仪记录大鼠心脏左室长轴及短轴像。超声分别测量左室内径及室壁厚度,用多普勒超声测量血流速度后计算 LVEF、LVFS、LVEDd。以上每项指标均测量 3 个心动周期,取其平均值^[9]。(2)大鼠心肌梗死边缘区心肌 MVC、MVD 测定:6 周后处死大鼠。取心肌组织包括心肌梗死区、移行区、健存区,用 10% 福尔马林液固定,石蜡包埋,常规制片。免疫组织化学法染色组织切片,以小鼠抗大鼠 CD34 单克隆抗体检测大鼠心肌组织中血管内皮细胞的 CD34 表达情况,以反映新生血管情况。一抗工作浓度为 1:100,染色后血管内皮细胞被染成棕黄色。单个染成棕黄色内皮细胞或内皮细胞簇均作为 1 个血管计数,凡管腔 > 8 个红细胞大小且带有较厚肌层的血管区域血管不计^[10]。具体操作如下:在 40 倍视野下找到心肌梗死边缘区(心肌梗死边缘 2 mm 范围内定为梗死边缘区^[11]),然后转换到 400 倍视野下进行 MVC 计数,每张切片随机选取 5 个视野,取其均值作为该大鼠的 MVC 值。MVD 以毛细血管个/视野表示。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。

1.5 统计学方法 应用 SPSS 20.0 统计软件进行统计分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较用单因素方差分析,两两比较采用 q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠超声心动图检查结果 模型组、麝香保心丸组及通阳化浊汤组 LVEF、LVFS 较假手术组降低(P 均 < 0.05)。麝香保心丸组及通阳化浊汤组 LVEF 较模型组明显增高(P 均 < 0.05),通阳化浊汤

组较麝香保心丸组 LVEF 增高($P < 0.05$)。麝香保心丸组及通阳化浊汤组 LVFS 较模型组明显增高(P 均 < 0.05)。模型组、麝香保心丸组及通阳化浊汤组较假手术组 LVEDd 增大(P 均 < 0.05),麝香保心丸组及通阳化浊汤组 LVEDd 较模型组明显减小($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 各组大鼠心肌梗死边缘区 MVC、MVD 比较 模型组、麝香保心丸组及通阳化浊汤组大鼠心肌梗死边缘区 MVC 和 MVD 较假手术组明显增多(P 均 < 0.05),麝香保心丸组及通阳化浊汤组大鼠心肌梗死边缘区 MVC 和 MVD 较模型组明显增多(P 均 < 0.05),通阳化浊汤组与麝香保心丸组 MVC 和 MVD 比较差异无统计学意义(P 均 > 0.05)。见表 2。

表 1 各组大鼠超声心动图检查结果 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 例数 | LVEF (%) | LVFS (%) | LVEDd (mm) |
|--------|----|-----------------------------|----------------------------|---------------------------|
| 假手术组 | 20 | 81.20 ± 3.31 | 48.42 ± 3.11 | 5.67 ± 0.47 |
| 模型组 | 20 | 53.53 ± 2.42 ^a | 26.33 ± 2.92 ^a | 7.21 ± 0.72 ^a |
| 麝香保心丸组 | 20 | 55.41 ± 5.32 ^{ab} | 29.93 ± 3.10 ^a | 6.43 ± 0.47 ^{ab} |
| 通阳化浊汤组 | 20 | 63.43 ± 4.63 ^{abc} | 31.72 ± 3.81 ^{ab} | 6.51 ± 0.41 ^{ab} |

注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$;与麝香保心丸组比较,^c $P < 0.05$ 。

表 2 各组大鼠心肌梗死边缘区 MVC/MVD 比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 例数 | MVC/MVD |
|--------|----|----------------------------|
| 假手术组 | 20 | 42.36 ± 2.66 |
| 模型组 | 20 | 52.99 ± 10.41 ^a |
| 麝香保心丸组 | 20 | 78.73 ± 6.87 ^{ab} |
| 通阳化浊汤组 | 20 | 82.74 ± 5.01 ^{ab} |

注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$ 。

3 讨论

心肌梗死是心肌缺血性坏死,常见的临床表现有持久的胸骨后剧烈疼痛,可向右侧胸壁及后背放射,可伴有汗出、恶心呕吐等症状。属于中医“胸痹”、“真心痛”等范畴,首见于《黄帝内经》^[12]。在《金匮要略·胸痹心痛短气病脉证治第九》对胸痹亦有较全面的阐述:“夫脉当取太过不及,阳微阴弦,即胸痹而痛,所以然者,责其极虚也”“今知气滞在下焦,所以胸痹心痛者,以其阴弦故也”。张仲景指出疾病的产生离不开邪盛和正虚^[13]。而胸痹心痛中的“阳微阴弦”亦可理解为心阳虚,推动血行不畅,闭阻脉络,不通则痛。而心阳虚,不能生脾土,则脾虚失运,寒湿内生,湿聚化浊痰,为阴邪,而浊痰阻滞,气机不畅,亦可痹阻心脉。故可通阳化浊,以利气血,贯通脉络^[14]。

左心室收缩功能是反映心功能情况的重要指标,彩色多普勒超声检查亦是常用的检查方法之一。本

研究中用以观察药物对心血管再生恢复心室收缩功能的影响,结果发现大鼠的 LVEF、LVFS 依假手术组、通阳化浊汤组、麝香保心丸组、模型组的顺序递减;麝香保心丸组及通阳化浊汤组大鼠的 LVEDd 较假手术组明显增大,但较模型组明显减小。以上结果证实:(1)心肌梗死大鼠建模成功,其 LVEF、LVFS 低于非心肌梗死大鼠,LVEDd 大于非心肌梗死大鼠;(2)经通阳化浊汤、麝香保心丸分别治疗后,LVEF、LVFS 升高,LVEDd 减小,说明通阳化浊法可较好改善心功能,增加左心室的收缩能力。

MVC 和 MVD 均是常用的能够较准确反映血管新生程度的有效指标。目前 CD34 被认为是特异性和敏感性较高的生长中的血管内皮细胞表面标志物,且具有较强的可重复性,好于其他血管内皮细胞标记物^[15],因此本研究采用小鼠抗大鼠 CD34 单克隆抗体检测大鼠心肌组织切片中血管内皮 CD34 的表达情况,进而反映梗死心肌边缘区的血管新生情况(MVC 及 MVD)。本研究发现模型组、麝香保心丸组及通阳化浊汤组大鼠心肌梗死边缘区 MVC/MVD 较假手术组及模型组均明显增多,通阳化浊汤组与麝香保心丸组 MVC/MVD 无明显差异。以上结果提示:(1)心肌梗死大鼠的 MVC/MVD 多于非心肌梗死大鼠;(2)经通阳化浊汤、麝香保心丸分别治疗后,MVC/MVD 进一步增多,说明通阳化浊法治疗可促进心血管再生。

综上所述,通阳化浊法可改善心肌梗死大鼠的心功能,促进心肌梗死大鼠心血管再生。基于本实验研究的结果,建议可进一步开展临床研究,以为患者提供更多的治疗选择,改善其生活质量。

参考文献

[1] 陈立红. 参红通络方对实验性心肌梗死大鼠心肌梗死面积及

VEGF、bFGF、 MMP 因子表达量的影响[D]. 长春:长春中医药大学,2012.

- [2] 豆利华,田剑光. 丹参酮 II A 磺酸钠注射液在治疗急性心肌梗死中心肌保护作用的临床研究[J]. 临床荟萃,2010,25(10):895-896.
- [3] 巫金龙. 心包固定术联合血管生长素在心肌缺血动物模型中的初步应用研究[D]. 上海:第二军医大学,2012.
- [4] 刘克强,刘彩霞,齐新. 芪参益气浸膏促心肌梗死大鼠心血管新生实验研究[J]. 中国循证心血管医学杂志,2009,1(1):91-95.
- [5] 李军,杜建超,唐新军. 促冠脉血管新生中药的研究概述[J]. 北京中医药,2013,32(9):650-652.
- [6] 段刚峰. 通阳逐瘀法激活 MAPKs/IL-6 信号通路抗急性心肌缺血作用及机制研究[D]. 武汉:湖北中医药大学,2012.
- [7] 李峰杰,李贻奎. 心肌梗死动物模型研究进展[J]. 中国药理学通报,2013,29(1):5-10.
- [8] 徐铭. 大鼠心肌梗死模型制作的影响因素[J]. 上海畜牧兽医通讯,2012,2:48-49.
- [9] 衣慧. 益气活血方影响心肌梗死后血管新生与成熟的 HIF-1 α 信号机制研究[D]. 西安:第四军医大学,2013.
- [10] 张淑娟,王振涛,韩丽华,等. 丹参注射液对心肌梗死后大鼠缺血心肌血管新生的影响[J]. 中医杂志,2011,52(18):1590-1592,1596.
- [11] Kido M, Du L, Sullivan CC, et al. Hypoxia-inducible factor 1-alpha reduces infarction and attenuates progression of cardiac dysfunction after myocardial infarction in the mouse [J]. J Am Coll Cardiol, 2005,46(11):2116-2124.
- [12] 杨霞. 陈学忠教授治疗冠心病心绞痛经验介绍[J]. 云南中医中药杂志,2012,6(6):4-5.
- [13] 江磊磊,梅晓云. 胸痹心痛病因病机研究述评[J]. 中医学报,2012,27(2):178-180.
- [14] 程路涵. 化浊祛湿通心方治疗胸痹心痛的临床研究[D]. 北京:北京中医药大学,2014.
- [15] 张淑娟,王振涛,韩丽华,等. 川芎嗪注射液对梗后大鼠缺血心肌血管新生及 VEGF-mRNA 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(7):170-173.

收稿日期:2015-02-07 修回日期:2015-03-13 编辑:石嘉莹