

丹花颗粒对实验性急性心肌缺血大鼠炎症机制的研究*

邓悦**, 李哲山, 陈声武, 刘永强

(长春中医药大学附属医院 长春 130021)

摘要:目的 通过丹花颗粒对急性心肌缺血大鼠炎症因子表达的影响,探讨其保护心肌缺血的作用机制,为进一步研究奠定基础。方法 120只Wistar大鼠,按照随机数字表法分为假手术组、模型组、丹花颗粒高、中、低剂量组、通心络组。灌胃14d后,以结扎冠脉左前降支建立急性心肌缺血模型。全自动生化仪检测谷草转氨酶(AST)、乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸酶同工酶(CK-MB),记录造模前后ST段变化;双抗夹心酶联免疫吸附方法(ELISA)检测白介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、血栓素(TXA₂)、前列环素(PGI₂)、血清高敏C反应蛋白(CRP)、肌钙蛋白I(Tn-I)浓度;免疫组化方法检测心肌细胞NF- κ B表达。结果 造模前后治疗组与模型组比较ST变化显著($P<0.01$)。与模型组比较,丹花颗粒高剂量组与通心络组AST、LDH、CK-MB、Tn-I浓度均明显降低($P<0.05$),低剂量组与中剂量组CK-MB、Tn-I浓度明显降低($P<0.05$),丹花颗粒组与通心络组CRP表达明显减少($P<0.05$),丹花颗粒组与通心络组IL-6、TNF- α 浓度明显降低($P<0.05$),丹花颗粒组与通心络组PGI₂水平明显增加($P<0.05$);TXA₂水平明显降低($P<0.05$)。丹花颗粒组及通心络组NF- κ Bp65阳性表达明显减弱($P<0.05$)。结论 丹花颗粒可能通过抑制NF- κ B细胞外的正反馈激活途径,从而减少IL-6、TNF- α 、TXA₂、PGI₂、CRP等炎症因子的基因转录,阻断后者所介导的一系列炎症反应,可能是其防治心肌缺血的作用机制之一。

关键词: 丹花颗粒 急性心肌缺血 IL-6 TNF- α TXA₂ PGI₂ CRP NF- κ B

doi: 10.11842/wst.2013.05.049 中图分类号: R285.5 文献标识码: A

急性心肌缺血是冠状动脉血液供应急剧减少或中断,使相应的心肌严重而持久地急性缺血导致心肌坏死,是心血管疾病的主要死亡原因^[1]。心肌缺血过程中,炎症损伤贯穿于心肌细胞损伤的全过程,且能够渗透到其它损伤因素中发挥作用,炎症因子是十分活跃的中介因子^[2]。近年研究表明,中药中清热解毒药物在动脉粥样硬化、急性心肌缺血中具有抗炎作用^[3-5]。丹花颗粒是在治疗脱疽的古方——四妙勇安汤基础上,增加丹参等5味药物而组成9味中药复方制剂,具有解毒活血、通络止痛之效。临床应用治疗

急性冠脉综合征取得一定效果,有降低冠脉内支架植入术(Percutaneous Coronary Intervention, PCI)的作用。本研究为进一步探讨其作用机制,进行了丹花颗粒对急性心肌缺血大鼠炎症因子影响的研究。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康清洁级Wistar大鼠120只,雌雄各半,体重(230±10)g,由吉林大学基础医学院动物实验中心提供,许可证号:SCXK(吉)-2011-0004。

1.2 药物

丹花颗粒(长春中医药大学制剂中心提供),通

收稿日期:2013-04-19

修回日期:2013-08-13

* 吉林省科技厅科研专项(20120936):中药丹花颗粒临床前研究,负责人:邓悦。

** 通讯作者 邓悦,主任医师,博士生导师,主要研究方向:心血管病中西医结合基础与临床研究。

心络胶囊(石家庄以岭药业有限公司,产品批号:110919)。

1.3 主要试剂

IL-6、TNF- α 、TXA₂、PGI₂、CRP、Tn-I ELISA 试剂盒均购置于北京鼎国昌盛生物技术有限公司, SABC 免疫组化试剂盒、兔抗大鼠 NF- κ Bp65 单克隆抗体均购置于武汉博士德生物工程有限公司。

1.4 主要仪器

Biofuge stratos 型台式高速冷冻离心机(德国);日立 7600 全自动生化分析仪(日本);BIO RAD-680 型酶标仪(日本);UB200i 显微镜(重庆澳浦);BI2000 医用图像分析系统(成都泰盟科技);Image-Pro Plus version 6.0(美国 IPP 图像分析软件有限公司)。

1.5 分组及给药

120 只 Wistar 大鼠按照随机数字表法分为假手术组、模型组(灭菌蒸馏水 2 mL·d⁻¹),丹花颗粒高、中、低剂量组(1.528 g·kg⁻¹·d⁻¹、3.055 g·kg⁻¹·d⁻¹、6.11 g·kg⁻¹·d⁻¹),通心络组(0.24 g·kg⁻¹·d⁻¹)连续灌喂 14 d 后进行造模。

1.6 模型复制及评估

乙醚麻醉大鼠,将其仰位固定于手术台;正中剃毛,以 10 号线做荷包缝合,以手术刀正中切开,用止血钳剥离肋间肌肉,自左侧 3~4 肋间开胸,暴露心脏;于肺动脉圆锥及左心房间找出冠脉左前降支,假手术组仅穿线不结扎外,余组以 0 号线立即结扎左前降支;将心脏送回胸腔,挤出胸腔内空气后迅速扎紧荷包,缝线关闭胸腔。

通过造模前及造模后 24 h,心电图 ST 段变化毫伏数,造模后各组间血清 AST、LDH、CK-MB、Tn-I 浓度比较,评估模型复制成功与否。

1.7 观察指标及检测方法

1.7.1 标本收集

术后 24 h,采用 20%乌拉坦(1.0 g·kg⁻¹)腹腔麻醉,腹主动脉插管取血 5~10 mL,置于试管中。以 3 000 rpm,离心 10 min 后,吸取上清液,放置于-20℃超低温冰箱备用。完全剪开胸腔,取出心脏,用生理盐水冲洗,滤纸吸干,在距离心尖 1 cm 处,取厚度为 0.5 cm 的横断心肌组织块,浸泡于 10%福尔马林溶液 24 h,常规石蜡包埋。

1.7.2 ELISA 法检测血清中 IL-6、TNF- α 、TXA₂、PGI₂、CRP 浓度

检测血清白介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α

(TNF- α)、血栓素(Thromboxane A₂,TXA₂)、前列环素(Prostacycline,PGI₂)、血清高敏 c 反应蛋白(High-sensitivity C-reactive Protein,hs-CRP)、肌钙蛋白 I (Troponin,Tn-I),设置标准品孔和样本孔,标准品孔各加不同浓度的标准品 50 μ L;样本孔先加待测样本 10 μ L,再加样本稀释液 40 μ L,空白孔不加;除空白孔外,标准品孔和样本孔中每孔加入辣根过氧化物酶标记的检测抗体 100 μ L,用封板膜封住反应孔;37℃水浴锅温育 60 min;洗板 5 次;加底物 A、B 各 50 μ L,37℃避光孵育 15 min;每孔加入终止液 50 μ L;在酶标仪 450 nm 波长处测定各孔的 OD 值,并在 Excel 工作表中,计算各样本浓度值。

1.7.3 免疫组化法检测心肌 NF- κ Bp65 表达

石蜡标本常规 4 μ m 连续切片后,置于经多聚赖氨酸处理的防脱玻片中,放于 60℃烤箱过夜;石蜡切片脱蜡至水:组织切片置于二甲苯 I、II 中脱蜡各 15 min,无水乙醇 I 5 min,无水乙醇 II、95%乙醇、80%乙醇、70%乙醇各 3 min,蒸馏水 5 min;抗原修复:在高压锅中加入 0.01 mol·L⁻¹ 枸橼酸钠缓冲液(PH6.0),使液面没过染色架上玻片组织,水浴至小阀门升起后 1~2 min,待降至室温打开盖子;SABC 法:PBS 冲洗,5 min×3 次;滴加 5%BSA 封闭液,室温湿盒内孵育 30 min,倾去;滴加兔抗大鼠 NF- κ Bp65 单克隆抗体(1:100 稀释)40 μ L,4℃过夜,阴性对照用 PBS 代替一抗;PBS 冲洗,5 min×3 次;滴加二抗工作液,室温湿盒内孵育 30 min;PBS 冲洗,5 min×3 次;滴加试剂 SABC,室温湿盒内孵育 30 min;PBS 冲洗,5 min×3 次;DAB 显色;蒸馏水冲洗;苏木素复染 5 min,自来水返蓝;盐酸酒精、氨水分色;常规脱水、二甲苯透明、中性树胶封片、镜检。

免疫组化评分:参照文献^[3-5],以细胞膜、细胞质、细胞核中出现淡黄色或棕黄色颗粒为阳性表达,染色强度高于背景的非特异性染色判定为阳性细胞,每张组织切片随机选取 5 个低倍(×100)视野,采用二次加权法计算阳性总评分,即阳性总评分=染色强度评分×染色阳性细胞率评分。

染色强度评分分级:不着色为 0 分,淡黄色为 1 分,褐色或棕褐色为 2 分,棕色或棕黑色为 3 分;染色阳性细胞率评分:占 0~9%为 0 分,10%~24%为 1 分,25%~49%为 2 分,50%~100%为 3 分;阳性总评分:0 分为-,1~3 分为+,4~6 分为++,7~9 分为+++。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 16.0 软件进行统计学处理, 计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 组间均数的比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。等级资料用 Ridit 分析, 检测组的 Ridit 值 95%可信区间不包括 0.5, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 造模前后 ST 段变化

与假手术组比较, 模型组与各治疗组造模后 ST 段明显升高($P<0.05$); 与模型组相比, 各治疗组 ST 段显著降低($P<0.01$), 其中以高剂量组与通心络组最为明显。具体见表 1。

2.2 心肌酶及心肌标志物表达

与假手术组比较, 模型组 AST、LDH、CK-MB、Tn-I 浓度均显著升高($P<0.01$); 与模型组比较, 丹花颗粒高剂量组与通心络组 AST、LDH、CK-MB、Tn-I 浓度均明显降低($P<0.05$), 低剂量组与中剂量

组 CK-MB、Tn-I 浓度均明显降低($P<0.05$)。具体见表 1。

2.3 丹花颗粒对 C 反应蛋白表达的影响

与假手术组比较, 模型组 C 反应蛋白显著增高($P<0.01$); 与模型组比较, 丹花颗粒各治疗组与通心络治疗组 C 反应蛋白表达明显减少($P<0.05$)。具体见表 2。

2.4 丹花颗粒对 IL-6、TNF- α 表达的影响

与假手术组比较, 模型组 IL-6、TNF- α 浓度明显增高($P<0.05$); 与模型组比较, 丹花颗粒各剂量组与通心络组 IL-6、TNF- α 浓度明显降低($P<0.05$)。具体见表 2。

2.5 丹花颗粒对 TXA₂、PGI₂ 表达的影响

与假手术组比较, 模型组 PGI₂ 水平显著降低($P<0.01$); TXA₂ 水平显著升高($P<0.01$); 与模型组比较, 丹花颗粒各剂量组与通心络组 PGI₂ 水平均明显增加($P<0.05$), TXA₂ 水平明显降低($P<0.05$)。具体见表 2。

表 1 造模前后 ST 段改变及对心肌酶及心肌标志物表达的影响($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	Σ ST/mv	AST/U·L ⁻¹	LDH/U·L ⁻¹	CK-MB/U·L ⁻¹	Tn-I/pg·mL ⁻¹
假手术组	0.021 \pm 0.009	102.000 \pm 36.832	320.130 \pm 109.103	229.630 \pm 168.008	50.150 \pm 2.851
模型组	0.168 \pm 0.048*	207.250 \pm 140.079**	665.500 \pm 353.414**	622.00 \pm 344.496**	300.310 \pm 62.038**
低剂量组	0.084 \pm 0.037* $\Delta\Delta$	166.620 \pm 77.016	548.500 \pm 229.884	343.250 \pm 171.457 Δ	113.930 \pm 10.799 $\Delta\Delta$
中剂量组	0.068 \pm 0.029* $\Delta\Delta$	138.250 \pm 55.690	539.750 \pm 328.320	320.500 \pm 267.223 Δ	97.820 \pm 13.893 $\Delta\Delta$
高剂量组	0.060 \pm 0.035* $\Delta\Delta$	126.630 \pm 45.950 Δ	338.000 \pm 218.908 Δ	319.750 \pm 173.018 Δ	92.820 \pm 10.446 $\Delta\Delta$
通心络组	0.065 \pm 0.041* $\Delta\Delta$	129.000 \pm 49.022 Δ	278.000 \pm 139.356 $\Delta\Delta$	288.960 \pm 152.295 $\Delta\Delta$	101.560 \pm 16.640 $\Delta\Delta$

注: 与假手术组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与模型组比较, Δ $P<0.05$, $\Delta\Delta$ $P<0.01$ 。

表 2 丹花颗粒对 CRP、IL-6、TNF- α 、TXA₂、PGI₂ 表达的影响($\bar{x}\pm s$, $n=11$)

组别	CRP/ng·mL ⁻¹	IL-6/pg·mL ⁻¹	TNF- α /pg·mL ⁻¹	PGI ₂ /pg·mL ⁻¹	TXA ₂ /pg·mL ⁻¹
假手术组	95.890 \pm 13.066	10.060 \pm 1.461	130.690 \pm 13.902	128.780 \pm 23.131	123.070 \pm 8.346
模型组	339.470 \pm 53.995**	25.410 \pm 5.591*	153.210 \pm 22.925*	79.840 \pm 22.774**	226.070 \pm 54.889**
低剂量组	309.470 \pm 26.447** Δ	12.550 \pm 2.429 Δ	128.750 \pm 23.191 Δ	97.420 \pm 23.242 Δ	146.400 \pm 20.386 $\Delta\Delta$
中剂量组	292.560 \pm 48.098** $\Delta\Delta$	13.220 \pm 3.597 Δ	130.180 \pm 21.615 Δ	101.960 \pm 13.959 $\Delta\Delta$	136.460 \pm 20.089 $\Delta\Delta$
高剂量组	295.110 \pm 19.746** $\Delta\Delta$	12.780 \pm 3.414 Δ	124.120 \pm 18.152 Δ	102.100 \pm 13.750 $\Delta\Delta$	135.600 \pm 13.851 $\Delta\Delta$
通心络组	279.110 \pm 30.336** $\Delta\Delta$	18.980 \pm 6.274 Δ	133.700 \pm 25.444 Δ	110.100 \pm 14.138 $\Delta\Delta$	150.780 \pm 18.749 $\Delta\Delta$

注: 与假手术组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与模型组比较, Δ $P<0.05$, $\Delta\Delta$ $P<0.01$ 。

2.4 丹花颗粒对心肌细胞 NF-κBp65 表达影响

与假手术组比较,模型组心肌细胞内的 NF-κBp65 阳性表达明显增加,阳性积分经 Ridit 分析比较差异明显($P<0.05$);与模型组比较,丹花颗粒低、中、高剂量组及通心络组阳性表达明显减弱,阳性积分比较有明显差异($P<0.05$)。具体见表 3,图 1。

3 讨论

3.1 急性心肌缺血病机“瘀毒”与炎症

中医认为,急性心肌缺血病机主要为心脉痹阻,其病理性质为本虚标实。最早关于热邪致心痛的记载出现于《黄帝内经》,有“心热病者...数日乃热,热争则卒心痛”,之后历代医家有所发挥,《诸病源候论》曰:“因邪迫于阳气,不得宣畅,壅瘀生热”;《医林改错》言:“血受热则煎熬成块”;《血证论》曰:“火结则为结胸,...火不宣发则为胸痹”;可见各种原因引起心之阳气被遏,郁久生热,郁热日久又可化火,火邪痹阻心脉则厥。针对上述病因病机,在热者寒之的中医指导思想下,产生了清热解毒法,是对胸痹心痛治法的补充。四妙勇安汤出自《验方新编》,是治疗脱疽的古方,全方由银花、当归、玄参、甘草等组成,该方具有清热解毒、活血止痛的功效。近年相关研究用四妙勇安汤加减方剂治疗急性冠脉综合征,对心绞痛症状及炎症指标有较好作用^[4,5],显示出较好应用前景。本实验研究在四妙勇安汤基础上增加丹参、红曲、薤白、甘松、红花等 5 味药物组成丹花颗粒,方中以丹参、双花为君,活血解毒;以当归、红曲、薤白、红花为臣,辅助君药发挥活血

解毒化浊的作用;佐以甘松理气活血,调畅气机;使以甘草,健脾和胃,调和诸药;合方具有解毒活血,通络止痛之功。

近年来心血管疾病危险因素研究中炎症反应倍受关注。C 反应蛋白(C-reactive Protein,CRP)是一种急性时相反应蛋白,是机体炎症的一项敏感指标。当机体受到创伤、炎症、心肌严重缺血时,血清中 CRP 含量迅速升高。同时 CRP 可激活炎症细胞加重血管内皮损伤程度,降低一氧化氮功能,造成局部血栓形成、血管发生痉挛、脂质代谢紊乱等现象加重,从而进一步加重动脉硬化、心肌细胞损伤程度,形成恶性循环^[6]。

核转录因子 NF-κB 广泛存在于包括心肌细胞、血管内皮细胞在内的各种细胞,具有基因转录多向调控作用,是炎症反应链的“开关”。急性心肌缺血时氧化应激可诱导 NF-κB 激活,活化的 NF-κB 经细胞外的正反馈途径,增强 TNF-α 和 IL-6 的基因

表 3 丹花颗粒对大鼠心肌细胞内 NF-κB 免疫组化阳性表达的影响($n=30$)

组别	阳性总评分分级			
	-	+	++	+++
假手术组	25	4	1	0
模型组 [*]	0	13	15	2
低剂量组 [#]	5	20	5	0
中剂量组 [#]	13	13	4	0
高剂量组 [#]	17	12	1	0
通心络组 [#]	11	16	3	0

与假手术组比较^{*} $P<0.05$;与模型组比较[#] $P<0.05$ 。

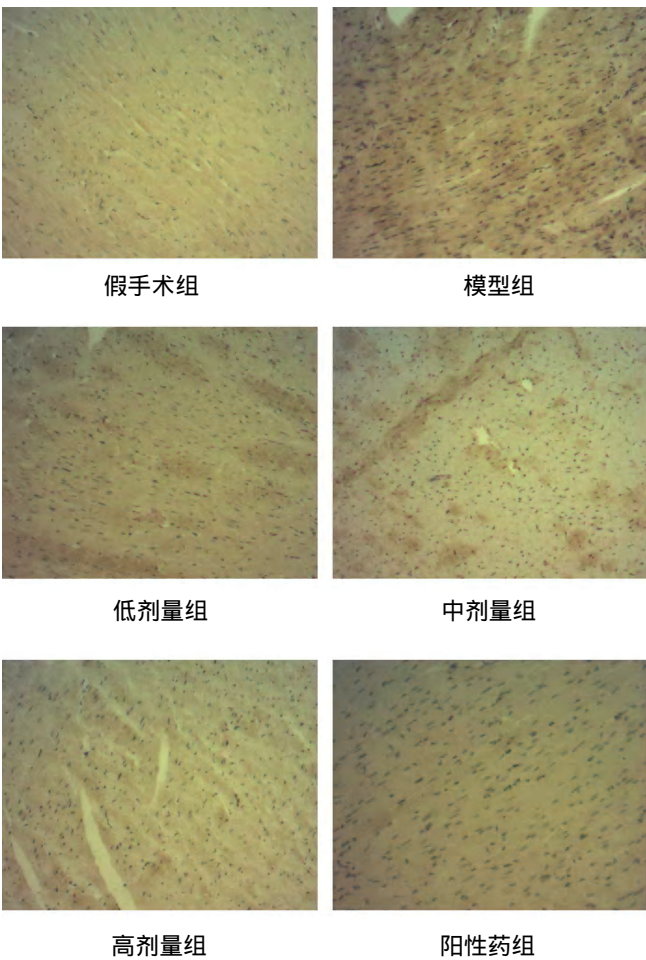


图 1 NF-κB 免疫组化($\times 100$)

转录,使后者们产生和释放增多,而前炎症细胞因子的 TNF- α 和 IL-6 作为 NF- κ B 激活剂,再次激活 NF- κ B,导致最初的炎症信号进一步放大。有研究表明,实验性急性心肌缺血后,核转录因子 NF- κ B 信号通路相关炎症因子肿瘤坏死因子 TNF- α 、IL-1、IL-6 表达增加^[7],NF- κ B DNA 结合活性增加,提示心肌缺血后 NF- κ B 通路被激活。据文献报道,大鼠心肌梗死后 10 周,NF- κ B 在其心肌细胞中缓慢并持续的激活^[8]。

3.2 解毒活血与心肌缺血炎症表达

本实验研究表明,丹花颗粒各剂量治疗组均能有效减少心肌缺血时 CRP、IL-6、TNF- α 、TXA₂、PGI₂、NF- κ B 等炎症因子的表达。说明丹花颗粒能减少上述炎症因子的合成而抑制炎性细胞的浸润,减少心肌细胞的缺血性损伤。其机制可能是通过抑制 NF- κ B 细胞外的正反馈激活途径,从而减少 IL-6、TNF- α 、TXA₂、PGI₂、CRP 等炎症因子的基因转录,阻断后者所介导的一系列炎性反应;对其详细机制及丹花颗粒防治心肌缺血的其他机制尚

需深入研究。

参考文献

- 1 陆再英,终南山,谢毅,等.内科学.北京:人民卫生出版社,2008:284.
- 2 刘镇,连俊兰,雷健.心肌缺血再灌注炎症损伤机制的研究进展.中华心血管病研究杂志,2004,2(11):909~912.
- 3 贾琳,耿立梅,王亚利.解毒活血方含药血清对氧化低密度脂蛋白损伤血管内皮细胞及细胞间黏附分子 1 的影响.临床荟萃,2013,28(1):56~58.
- 4 王立茹.四妙勇安汤治疗冠状动脉粥样硬化性心脏病 60 例.陕西中医,2010,31(2):131~132.
- 5 廖荣德,陈远平.四妙勇安汤治疗不稳定性心绞痛 24 例疗效观察.云南中医中药杂志,2009,30(11):42.
- 6 曾欣,曾哲.尿酸和超敏 CRP 在急性心肌梗死患者中的变化和意义.中国当代医药,2009,16(11):65~66.
- 7 Dostal D E, Baker K M. Angiotensin II stimulation of left ventricular hypertrophy in adult rat heart: mediation by the AT1 receptor. *Am J Hypertension*, 1992, 5(2):276~280.
- 8 Frantz S, Fraecarlo D, Wagner H, et al. Sustained activation of nuclear factor kappaB and activator protein-1 were in chronic heart failure. *Cardiovasc Res*, 2003, 57(3):749~756.

Study of *Danhua* Particles on Inflammatory Mechanism in Rats with Acute Myocardial Ischemia

Deng Yue, Li Zheshan, Chen Shengwu, Liu Yongqiang

(Affiliated Hospital of Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130021, China)

Abstract: This study was aimed to explore mechanism of *Danhua* particles in the protection of myocardial ischemia, and lay the foundation for further study through the expression of inflammatory cytokines of *Danhua* particles in rats with acute myocardial ischemia. A total of 120 Wistar rats were divided into the sham group, model group, *Danhua* particles high-dose group, middle-dose group, low-dose group, *Tongxinluo* group, according to the random number table. The automatic biochemical analyzer was used in the detection of the concentration of the AST, LDH, CK-MB. And the ECG was used to record the ST-segment changes before and after modeling. The ELISA kit was used in the detection of concentration of IL-6, TNF- α , TXA₂, PGI₂, CRP and TN-I. Immunohistochemical methods were used to detect myocardial cell NF- κ B expression. The results showed that before and after the modeling, the treatment group compared with model group Σ ST changed significantly ($P < 0.01$). Compared with the model group, the *Danhua* particles high-dose group and *Tongxinluo* group were significantly reduced in the concentration of AST, LDH, CK-MB and Tn-I ($P < 0.05$); the low-dose group and middle-dose group were significantly reduced in the concentration of CK-MB and Tn-I ($P < 0.05$); the expression of CRP in the *Danhua* particles group and *Tongxinluo* group was significantly reduced ($P < 0.05$). *Danhua* particles group and *Tongxinluo* group compared with the model group were significantly reduced in the concentration of IL-6 and TNF- α ($P < 0.05$); the PGI₂ level in the *Danhua* particles group and *Tongxinluo* group was significantly increased ($P < 0.05$); and the TXA₂ level was obviously

reduced ($P < 0.05$). The positive expression of NF- κ Bp65 in the *Danhua* particles group and *Tongxinluo* group was significantly reduced ($P < 0.05$). It was concluded that *Danhua* particles inhibited the NF- κ B extra cellular positive feedback activation pathway, and thus reduced the inflammatory factor gene transcription such as IL-6, TNF- α , TXA₂, PGI₂, CRP, block a series of inflammatory reactions which were mediated. It may be one of the mechanisms of *Danhua* particles in the prevention on myocardial ischemia.

Keywords: *Danhua* particles, acute myocardial infarction, IL-6, TNF- α , TXA₂, PGI₂, CRP, NF- κ B

(责任编辑 张丰丰 张志华, 责任译审 王 晶)