

铁皮石斛对冠心病模型家兔心功能和血管变化的影响*

唐汉庆, 赵玉峰, 李天资** , 李克明, 王露瑶, 李晓华, 王金花, 王 兵

(右江民族医学院基础医学院 百色 533000)

摘 要:目的:观察铁皮石斛对冠心病模型家兔心功能和血管变化的影响。方法:清洁级健康家兔 30 只随机分为对照组、模型组、铁皮石斛低剂量、中剂量、高剂量组 5 组,每组 6 只。模型组、低剂量、中剂量、高剂量组采用左冠状动脉放置缩窄环方法,制备冠心病模型。低剂量、中剂量、高剂量组以铁皮石斛按 $10\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $20\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $40\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃(ig),每天 1 次,连续 21 天。对照组、模型组则给予等体积生理盐水。检测白细胞介素-8(IL-8)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、血管细胞间粘附分子-1(VCAM-1)、细胞间粘附分子-1(ICAM-1)水平、actin 表达及心功能指标左室收缩压(LVSP)、左室舒张末压(LVEDP)、左室压力变化最大上升和下降速率($\pm\text{dp}/\text{dt}_{\text{max}}$)、动脉收缩压(BPs)和动脉舒张压(BPd)的变化并观察血管的形态学。结果:与对照组比较,模型组 IL-8、TNF- α 、VCAM-1、ICAM-1 水平、actin 表达升高或显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$);LVEDP 显著升高($P<0.01$),而 LVSP、 $\pm\text{dp}/\text{dt}_{\text{max}}$ 、BPs 均降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),血管壁变厚。与模型组比较,中、高剂量组 IL-8、TNF- α 、VCAM-1、ICAM-1 水平、actin 表达降低或显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$);中、高剂量组 LVEDP 显著降低,差异有统计学意义($P<0.01$),而 LVSP、 $\pm\text{dp}/\text{dt}_{\text{max}}$ 、BPs 均升高或显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$),血管壁变厚得到改善。结论:铁皮石斛具有改善心功能作用,可能是通过改善和抑制血管病理改变、减轻血管损害而起作用。

关键词:铁皮石斛 冠心病 心功能 血管

doi:10.11842/wst.2015.04.018 中图分类号:R331.3 文献标示码:A

冠心病(Coronary Heart Disease, CHD)是由于冠状动脉循环器质性或功能性的改变导致心肌缺血、心功能受损,是严重危害健康的心血管疾病之一。研究显示炎症因子、血管损伤、粥样斑块形成与 CHD 病理生理有密切联系,冠状动脉血液流变学、血液动力学、血凝动力学、血液生化等方面均有异常表现^[1]。铁皮石斛(*Dendrobium officinale* Kimura et Migo)为兰科(Orchidaceae)石斛属(*Dendrobium*)多年生附生草本植物,研究表明铁皮

石斛具有广泛的药理作用,具有降血压、抗氧化、抗疲劳、提高免疫力、抗肿瘤、防辐射性损伤等功效,可用于治疗冠心病、高血压、胃炎等并用于保健养生^[2],是应用历史悠久的名贵药材。本研究通过建立冠心病家兔模型,给予铁皮石斛干预,检测与血管损伤相关的细胞因子白细胞介素-8(IL-8)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、血管细胞间粘附分子-1(VCAM-1)、细胞间粘附分子-1(ICAM-1)水平^[3]、与心肌收缩能力密切相关的肌动蛋白(actin)表达及心功能的变化并观察血管的形态学变化,从血管变化探讨铁皮石斛治疗冠心病的机理。

收稿日期 2014-08-06

修回日期 2014-10-18

* 广西科技厅广西科学研究与技术开发计划(桂科攻 1347003-4)冠心病血瘀证证结合家兔动物模型的构建与中药干预其特征分子群的研究,负责人:唐汉庆。

** 通讯作者:李天资,教授,主要研究方向:心血管疾病基础与临床研究。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物与分组

清洁级健康家兔 30 只,雌雄各半,体质量 2.4 ± 0.8 kg,本院科学实验中心提供,动物合格证号:SCXK(桂)2014-0003。适应性饲养 3 d 后,随机数字表法分成对照组、模型组、铁皮石斛低剂量、中剂量、高剂量组 5 组,每组 6 只。以基础饲料常规饲养,自由饮水,全部家兔照明、通风、湿度、温度等饲养环境相同。实验中对动物的处理遵循相关动物使用伦理学原则。

1.1.2 试剂与仪器

铁皮石斛鲜品由广西浙商投资有限公司馈赠;IL-8 试剂盒购于南京建成生物工程研究所;TNF- α 、VCAM-1、ICAM-1 试剂盒、免疫组化 ABC 试剂盒、actin 单克隆抗体均购于武汉博士德公司;PK121R 型高速低温离心机(美国 ALC 公司);MDF-U72V 型超低温冰箱(日本三洋公司);SN-695B 型智能放免 γ 测量仪(上海核所日环光电仪器有限公司);Vivid 7 型彩色多普勒超声诊断仪(美国 GE 公司);MP150 型生理记录仪(美国 BIOPAC 公司);DMIL LED 倒置式生物显微镜(德国莱卡公司);MK3 型酶标仪(美国 Thermo Labsystem 公司);BIPAPSYNCHRONY 小动物呼吸机(上海飞利浦公司);KD-2258-VI 电脑快速恒冷冷冻石蜡两用切片(浙江科迪公司)。

1.2 方 法

1.2.1 实验动物造模及分组处理

模型组、低剂量、中剂量、高剂量组造模方法参考文献^[4-6],动物麻醉,辅助呼吸,左冠状动脉远端放置缩窄环,术后常规消毒抗炎,制备冠心病模型。术后第 12wk 起,低剂量、中剂量、高剂量组每天早上 8 点以铁皮石斛按 $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $40 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃(ig),1 次/d,连续治疗 21 d。对照组、模型组则 ig 等体积生理盐水。家兔给药剂量的计算依据,参考文献^[7]中药复方药动学研究中给药剂量标准进行折算,按汤剂折成平均临床等效剂量大约 $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。低剂量设为平均临床等效剂量的 1/2 即 $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,高剂量设为平均临床等效剂量的 2 倍即 $40 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

1.2.2 铁皮石斛制备

称取适量铁皮石斛鲜品,加入 3 倍水量,浸泡 1 h,

再加入 2 倍水量,采用热水回流加纤维素酶浸提法提取,将滤液水浴加热浓缩至含生药量为 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度的药液,杀菌,贮存于 4°C 冰箱内备用。

1.2.3 指标检测

疗程结束后,取静脉血 5 mL,置于内含 $30 \mu\text{L}$ 10% EDTA- Na_2 和 400 IU 抑肽酶酶的抗凝管中混匀,离心(4°C , $1\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min),分离血浆, -20°C 冻存待检。采用放射免疫分析法检测 IL-8 水平;双抗体夹心 ELISA 法检测 TNF- α 、VCAM-1、ICAM-1 水平,检测时严格按说明书操作进行检测。

1.2.4 冠状动脉组织形态学观察

取冠状动脉 4 mm 组织,4% 多聚甲醛固定 24 h, pH 7.2 的 PBS 冲洗 2 次,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋组织切片,厚度 $5 \mu\text{m}$,HE 染色,生物光学显微镜、自动图像分析仪观察并拍片。

1.2.5 心功能检测

末次给药后 12 h,3% 戊巴比妥钠按 $0.05 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 麻醉家兔,分离右颈总动脉和左股动脉,经右颈总动脉插入聚苯乙烯 PE-20 导管至左心室,导管另一端经换能器连接多导生理记录仪,检测左室收缩压(LVSP)、左室舒张末压(LVEDP)、左室压力变化最大上升和下降速率($\pm \text{dp}/\text{dt}_{\text{max}}$),同时经股动脉插管同步记录动脉收缩压(BPs)和动脉舒张压(BPd)。

1.2.6 actin 表达检测

SABC 免疫组化法检测,左室心肌石蜡切片($3 \mu\text{m}$),常规脱蜡、梯度酒精水化,用体积分数 0.3% H_2O_2 乙醇阻断内源性酶 30 min, TBS 漂洗,10% 羊血清保护下 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 胰蛋白酶 37°C 消化 30 min, TBS 漂洗后 1:100 稀释的一抗孵育过夜, TBS 漂洗后加 1:400 生物素标记羊抗鼠二抗,孵育 30 min; TBS 漂洗后加 ABC 1:100 三抗(A、B 液等量)孵育 1 h,0.05% DAB 加 0.03% 双氧水显色 5 min,蒸馏水冲洗终止显色;苏木素复染 1 min,盐酸酒精浸泡 5 s,流水冲洗,常规脱水、透明、封片。200 倍显微镜下观察,图像用 Image Pro Plus 4.0 软件分析,细胞有棕褐染色为 actin 表达呈阳性心肌细胞,每组选 3 张切片,每张切片随机选取 3 个视野,计算 actin 表达阳性细胞数目和总细胞数目比值,得到 actin 阳性细胞百分率,每组取 3 张切片平均值。

1.2.7 统计方法

数据统计采用 SPSS 13.0 软件。计量资料用

表 1 各组 IL-8、TNF- α 、VCAM-1、ICAM-1 水平和 actin 阳性细胞率比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	例数	剂量 /g·kg ⁻¹	IL-8/pg·mL ⁻¹	TNF- α /pg·mL ⁻¹	VCAM-1/ng·mL ⁻¹	ICAM-1/ng·mL ⁻¹	actin 阳性细胞率 /%
对照组	6	-	6.25 \pm 0.86	8.24 \pm 1.36	14.12 \pm 2.08	20.45 \pm 2.18	0.21 \pm 0.05
模型组	6	-	17.45 \pm 3.36 [#]	42.13 \pm 5.32 ^{##}	98.32 \pm 6.39 ^{##}	112.46 \pm 6.68 ^{##}	0.69 \pm 0.09
低剂量	6	10	13.12 \pm 3.02	36.25 \pm 4.15	69.36 \pm 5.87	70.21 \pm 4.12	0.32 \pm 0.07
中剂量	6	20	10.15 \pm 2.18	14.11 \pm 3.28	22.31 \pm 3.56	26.11 \pm 3.64	0.26 \pm 0.06
高剂量	6	40	7.66 \pm 1.01	7.33 \pm 1.02	17.34 \pm 2.18	18.78 \pm 2.32	0.24 \pm 0.05

注 :与对照组比较 ,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;与模型组比较 , $P < 0.05$, $P < 0.01$ 。(下表同)

表 2 各组心功能指标比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	例数	剂量 /g·kg ⁻¹	LVSP/kPa	LVEDP/Pa	+dp/dt _{max} /kPa·s ⁻¹	-dp/dt _{max} /kPa·s ⁻¹	BPs/kPa	BPd/kPa
对照组	6	-	24.38 \pm 6.54	1.13 \pm 0.65	1 158.58 \pm 82.14	878.25 \pm 91.22	33.56 \pm 5.85	11.96 \pm 4.92
模型组	6	-	10.34 \pm 4.08 ^{##}	8.14 \pm 1.96 ^{##}	618.48 \pm 75.35 ^{##}	554.87 \pm 78.66 [#]	26.42 \pm 4.68 [#]	9.84 \pm 6.01
低剂量	6	10	17.12 \pm 4.78	5.65 \pm 1.68	896.35 \pm 70.24	628.21 \pm 71.26	28.47 \pm 4.77	10.06 \pm 6.11
中剂量	6	20	26.95 \pm 5.33	1.45 \pm 0.43	1 092.32 \pm 91.35	871.28 \pm 88.36	31.15 \pm 5.63	11.14 \pm 6.28
高剂量	6	40	26.52 \pm 7.35	1.32 \pm 0.86	1 146.24 \pm 96.86	874.34 \pm 93.46	32.03 \pm 6.02	11.28 \pm 5.26

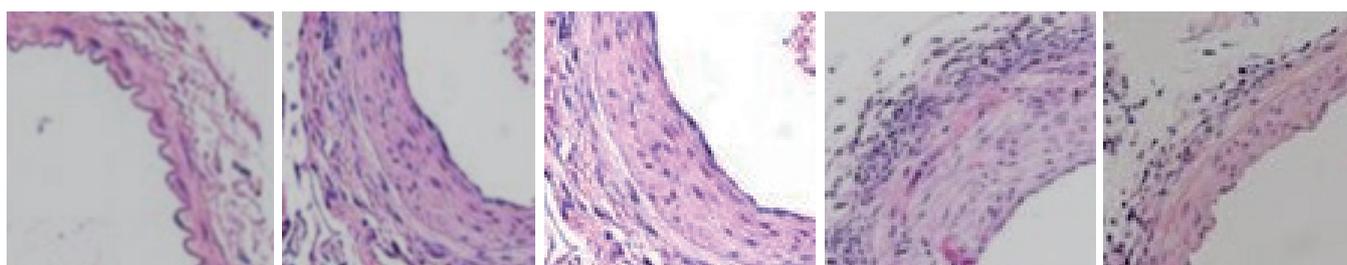


图 1 各组动脉组织形态学比较 (HE \times 100)

$\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析,多重比较采用 q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 各组 IL-8、TNF- α 、VCAM-1、ICAM-1 水平及 actin 表达检测结果

与对照组比较,模型组 IL-8、TNF- α 、VCAM-1、ICAM-1 水平升高或显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较,低剂量组 VCAM-1、ICAM-1 水平降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$);中、高剂量组 IL-8、TNF- α 、VCAM-1、ICAM-1 水平和 actin 表达降低或显著降低,差异也均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),见表 1。

2.2 心功能检测结果

与对照组比较,模型组 LVEDP 显著升高,差异

有统计学意义($P < 0.01$),而 LVSP、 $\pm dp/dt_{max}$ 、BPs 均降低或显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),BPd 虽也降低,但差异没有统计学意义($P > 0.05$)。与模型组比较,低剂量组 LVSP 升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);中剂量、高剂量组 LVEDP 显著降低,差异有统计学意义($P < 0.01$),而 LVSP、 $\pm dp/dt_{max}$ 、BPs 均升高或显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),BPd 虽也升高,但差异没有统计学意义($P > 0.05$),见表 2。

2.3 冠状动脉组织形态学观察

对照组动脉管壁平滑,厚度均匀,细胞排列层次分明、整齐;模型组管壁细胞增多明显,血管内膜增生、变粗,管壁粗糙,管壁增厚;相对于模型组,石斛各剂量组管壁细胞增多现象减轻,血管内膜增生、管壁增厚一定程度上得到抑制,见图 1。

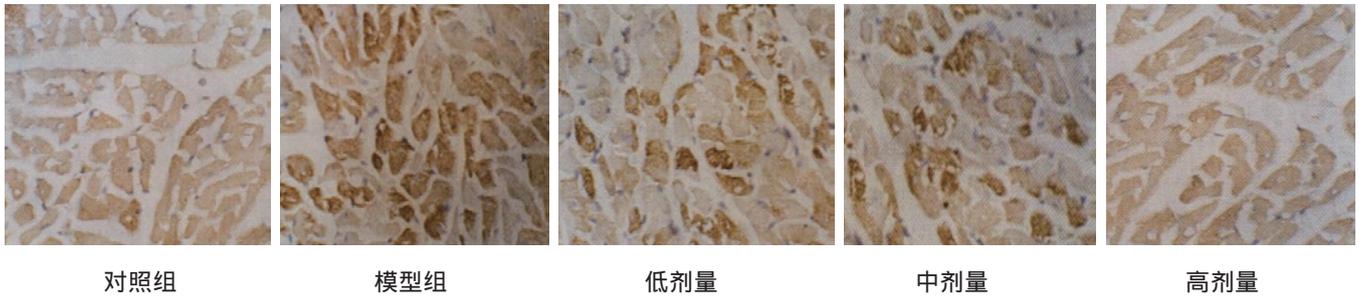


图2 各组 actin 表达比较 (SABC×200)

2.4 actin 表达观察

对照组 actin 表达呈阳性心肌细胞数目很少,模型组 actin 表达呈阳性心肌细胞数目较多。和模型组比较,低剂量、中剂量、高剂量组 actin 表达呈阳性心肌细胞数目均减少,以中剂量、高剂量组减少比较明显,见图 2。

3 讨论

CHD 的发病环节包括脂质过氧化,脂质浸润、血栓形成及平滑肌迁徙、增殖等,由于动脉粥样硬化形成、血管内膜增生、管壁增厚、官腔狭窄导致心脏供血不足,使心功能下降^[8,9]。其中,炎症介质或细胞因子介导的炎症反应和细胞平滑肌增生和迁徙在血管内膜增生中起重要作用。

CHD 由于微循环障碍,心肌细胞能量代谢出现异常,心肌舒缩能力会受到影响,进而导致心功能的异常,研究^[10,11]证明 actin 表达上调会引起 α -肌球蛋白(α -MHC)表达下调,导致心肌细胞内收缩蛋白含量发生变化,心肌细胞的收缩能力减弱^[12],研究^[13,14]表明 TNF- α 能够促进内皮细胞分泌 IL-8, TNF- α 和 IL-8 可通过影响脂质代谢中的载脂蛋白,进而促进血管内皮细胞表达 VCAM-1、ICAM-1 或 ET,参与动脉粥样硬化的发生和发展,在 CHD 血管病变中是一个重要的细胞因子。

CHD 血管动脉粥样斑块形成、管壁增厚、官腔狭窄引起心肌缺血,心功能障碍^[15],在本实验工作

中,观察到和对照组比较,模型组 IL-8、TNF- α 、VCAM-1、ICAM-1 水平升高或显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。同时,形态学观察显示模型组冠状动脉管壁细胞增多明显,血管内膜增生、变粗,管壁粗糙,管壁增厚,表明 CHD 出现血管病变与 IL-8、TNF- α 、VCAM-1、ICAM-1 水平变化相关,与上述的研究报道基本一致,提示炎症反应是 CHD 重要的病理环节。同时,模型组有较多 actin 蛋白阳性表达的心肌细胞,actin 蛋白的高表达会引起 α -MHC 表达下调从而使心肌收缩力减弱,而且,心功能指标检测结果显示,和对照组比较,模型组 LVSP、 $\pm dp/dt_{max}$ 、BPs 均降低或显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),说明心功能出现下降,表明 CHD 血管病变已经损害到心泵功能的发挥,提示在 CHD 的治疗中若要改善心功能,需要抑制或扭转血管的病变。

现代药理学研究^[16]表明铁皮石斛具有广泛作用,在心血管疾病中有降血压、改善血管舒缩功能等效果^[17],本实验研究表明,采用铁皮石斛干预后,和模型组比较,石斛中剂量、高剂量组 IL-8、TNF- α 、VCAM-1、ICAM-1 水平降低或显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),LVSP、 $\pm dp/dt_{max}$ 、BPs 均升高或显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),形态学观察也显示石斛各剂量组管壁细胞增多现象减轻,血管内膜增生、管壁增厚一定程度上得到抑制,提示铁皮石斛具有改善心功能作用,可能是通过改善和抑制血管病理改变、减轻血管损害而起作用。

参考文献

- 1 Karrowni W, Makki N, Dhaliwal A S, et al. Single versus double stenting for unprotected left main coronary artery bifurcation lesions: a systematic review and meta-analysis. *J Invasive Cardiol*, 2014, 26(6):229-233.
- 2 吕圭源,颜美秋,陈素红.铁皮石斛功效相关药理作用研究进展. *中国中药杂志*,2013,38(4):489-493.
- 3 薛忠文,董天崑,张琦,等.参芍口服液对冠状动脉粥样硬化大鼠主动脉 IL-8、VCAM-1 和 ICAM-1 表达的影响. *中成药*,2012,34(11):2077-2081.
- 4 刘涛,王伟,赵明镜,等.心肌缺血动物模型气虚血瘀证的评价. *辽宁*

- 中医杂志,2007,34(4):530-531.
- 5 王勇,王思轩,李春,等.cTnT与慢性心肌缺血瘀证模型心功能相关性的实验研究. 辽宁中医杂志,2011,38(6):1234-1236.
 - 6 贾明贤,余婕,张媛,等.冠心病动物模型建立研究. 世界科学技术-中医药现代化,2013,15(8):1735-1740.
 - 7 黄娟萍,罗裕,江力,等.中药药动学研究中给药剂量的现状分析. 中国药学杂志,2012,47(21):1685-1689.
 - 8 康萍,李福凤,姚笛,等.冠心病脉象信息与血脂凝血系统变化的关联研究. 世界科学技术-中医药现代化,2011,13(5):810-815.
 - 9 魏峰,郑若龙,李伟章,等.冠心病患者冠状动脉病变严重程度与相关危险因素分析. 宁夏医科大学学报,2014,38(6):677-679.
 - 10 Guillard E, Gueret G, Guillouet M, *et al.* Alteration of muscle membrane excitability in sepsis: possible involvement of ciliary nervous trophic factor(CNTF). *Cytokine*, 2013, 63(1):52-57.
 - 11 Lee N, Spearry R P, Leahy K M, *et al.* Muscle ciliary neurotrophic factor receptor α promotes axonal regeneration and functional recovery following peripheral nerve lesion. *J Comp Neurol*, 2013, 521(13):2947-2965.
 - 12 Sadoshima J, Jahn L, Takahashi T, *et al.* Molecular Characterization of the stretch-induced adaptation of cultured cardiac cells. An *in vitro* model of load-induced cardiac hypertrophy. *J Biol Chem*,1992, 267(15):10551-10556.
 - 13 Xu H, Lai W, Zhang Y, *et al.* Tumor-associated macrophage-derived IL-6 and IL-8 enhance invasive activity of LoVo cells induced by PRL-3 in a KCNN4 channel-dependent manner. *BMC Cancer*,2014,14(1):330.
 - 14 王师蔷,王阶,李霖.冠心病血瘀证的Gensini积分与血管内皮因子的关系. 世界科学技术-中医药现代化,2010,13(3):355-357.
 - 15 Esmailidehaj M, Kakoo M, Rezvani M E, *et al.* Pretreatment with Assafoetida exerts dose-dependent dual effects on rat hearts. *Pharmacogn Mag*, 2014,10(38):147.
 - 16 国家环境保护局,中国科学院植物研究所. 中国珍稀濒危保护植物名录. 北京: 科学出版社, 1987.
 - 17 黄明峰,张燕玲,任真真,等.网络药理学方法探讨活血化痰中药治疗冠心病作用机理. 世界科学技术-中医药现代化,2012,14(5):1969-1973.

Effects of *Dendrobium Officinale* Kimura et Migo on Cardiac Function and Changes of Blood Vessel in Rabbits with Coronary Heart Disease

Tang Hanqing, Zhao Yufeng, Li Tianzi, Li Keming, Wang Luyao, Li Xiaohua, Wang Jinhua, Wang Bing
(School of Basic Medicine, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, China)

Abstract: This study was aimed to observe effects of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo on cardiac function and changes of blood vessel in rabbits with coronary heart disease (CHD). Thirty clean grade healthy rabbits were randomly divided into 5 groups, which were the control group, model group, *Dendrobium* low-dose (DLD), middle-dose (DMD), and high-dose (DHD) group, with 6 rabbits in each group. Constrictor ring was implanted in the left coronary artery to establish CHD model in the model group, DLD, DMD and DHD groups. Intragastric administration of *Dendrobium* decoction at the dose of 10, 20, and 40 g·kg⁻¹ was given to rabbits in the DLD, DMD and DHD groups once a day for 21 consecutive days, respectively. The same volume of normal saline was given to the control group and the model group. Detections were made on levels of IL-8, TNF- α , VCAM-1, ICAM-1, the expression of actin, changes of LVSP, LVEDP, $\pm dp/dt_{max}$, BPs, BPd and morphologic changes of blood vessel. The results showed that compared with the control group, levels of IL-8, TNF- α , VCAM-1, ICAM-1 and the expression of actin increased or significantly increased in the model group with statistical significance ($P < 0.05$, or $P < 0.01$); LVEDP increased significantly ($P < 0.01$). However, LVSP, $\pm dp/dt_{max}$ and BPs reduced ($P < 0.05$, or $P < 0.01$). The blood vessel wall became thicker. Compared with the model group, IL-8, TNF- α , VCAM-1, ICAM-1 and the expression of actin in the DMD and DHD group reduced or significantly reduced with statistical significance ($P < 0.05$, or $P < 0.01$); LVEDP reduced significantly in the DMD and DHD group with statistical significance ($P < 0.01$). While, LVSP, $\pm dp/dt_{max}$ and BPs increased or significantly increased with statistical significance ($P < 0.05$, or $P < 0.01$). The thickening of blood vessel wall was inhibited. It was concluded that *Dendrobium officinale* Kimura et Migo can improve cardiac function, which may take effect by improving and inhibiting pathologic changes of blood vessel and alleviating vessel injury.

Keywords: *Dendrobium officinale* Kimura et Migo, coronary heart disease, cardiac function, blood vessel

(责任编辑:陶佳颐 张志华, 责任译审:王 晶)