

• 论著 •

心宁片对心肌梗死后大鼠心肌血管内皮生长因子及其受体表达的影响

谢 勇, 刘柏炎, 杨 益, 刘松青, 蔡光先

(湖南中医药大学血管生物学实验室, 湖南 长沙 410007)

【摘要】 目的 观察心宁片对心肌梗死(心梗)后大鼠心肌血管内皮生长因子(VEGF)及其受体胎肝激酶 1(FLK-1)表达的影响,探讨心宁片对心梗后大鼠缺血心肌的保护作用及其相关机制。方法 采用结扎大鼠左冠状动脉前降支制备心肌缺血模型。将 60 只 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、麝香保心丸组($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)以及心宁片大、中、小剂量组(分别为 1.08 、 0.54 和 $0.27 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),各组均于制模后 2 d 给药,连用 30 d。于术前、术后 5 min、给药 30 d 后动态监测 I 导联心电图,采用免疫组化法测定缺血心肌组织 VEGF、FLK-1 的表达。结果 与假手术组比较,模型组心电图 ST 段明显抬高,心肌缺血区 VEGF 及其受体 FLK-1 的含量显著增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较,心宁片大、中剂量组 ST 段显著压低[(0.319 ± 0.064)mV, (0.328 ± 0.046)mV 比 (0.384 ± 0.078)mV, $P < 0.01$ 和 $P < 0.05$];心肌缺血区 VEGF、FLK-1 表达显著升高(VEGF A 值: 0.190 ± 0.029 、 0.169 ± 0.027 比 0.156 ± 0.019 ; FLK-1 A 值: 0.133 ± 0.004 、 0.101 ± 0.004 比 0.095 ± 0.003 , $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),而心宁片小剂量组虽有压低和升高趋势,但差异无统计学意义。阳性对照药麝香保心丸组与心宁片大、中剂量组的作用差异无统计学意义。结论 心宁片可提高心梗后动物缺血心肌组织中的 VEGF 与 FLK-1 含量,其中以大剂量组作用最强。

【关键词】 心宁片; 心电图; 心肌缺血; 胸痹; 血管内皮生长因子; 胎肝激酶 1

中图分类号: R285.5; R542.22 文献标识码: A DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2009.03.006

The influence of Xinning tablets (心宁片) on myocardial expressions of vascular endothelial growth factor and its receptor after myocardial infarction in rats XIE Yong, LIU Bai-yan, YANG Yi, LIU Song-qing, CAI Guang-xian. Vascular Biology Laboratory, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan, China

Corresponding author: CAI Guang-xian, Email: lby1203@sina.com

【Abstract】 **Objective** To study the effects of Xinning tablets (心宁片) on the myocardial expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor, fetal liver kinase 1 (FLK-1), and explore the related mechanisms of Xinning tablets' protective effects on ischemic myocardium in rats after myocardial infarction. **Methods** The left anterior descending coronary artery was ligated to prepare the rat model with myocardial ischemia. Sixty Sprague-Dawley (SD) rats were divided randomly into sham operation group, model group, Shexiang Baoxin pills (麝香保心丸) positive control group ($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) and Xinning tablets high dose, middle dose, low dose groups (1.08 , 0.54 and $0.27 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ respectively). On the second day after modeling, each treatment group of rats was given respective medicine and the treatment lasted for 30 days. The medicines were also given 5 minutes before and after the operation. After 30 days, the dynamic electrocardiogram I-lead was used to monitor the heart and immunohistochemistry was applied to observe the expressions of VEGF and FLK-1 in the ischemic myocardium. **Results** Compared to the sham operation group, the ST segment was elevated obviously and the levels of VEGF and its receptor FLK-1 at the myocardial ischemic region were markedly increased in the model group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The ST segment in Xinning tablets high dose and middle dose groups was markedly lower than that in model group [(0.319 ± 0.064) mV, (0.328 ± 0.046) mV vs. (0.384 ± 0.078) mV, $P < 0.01$ and $P < 0.05$]; the expressions of VEGF and FLK-1 in ischemic myocardial tissue in the above two Xinning tablets groups were respectively higher than those in model group (VEGF: 0.190 ± 0.029 , 0.169 ± 0.027 vs. 0.156 ± 0.019 ; FLK-1: 0.133 ± 0.004 , 0.101 ± 0.004 vs. 0.095 ± 0.003 , $P < 0.05$ or $P < 0.01$); although the Xinning tablets low dose could lower the ST segment and elevate the expressions, but compared to the model group, there were no statistical significances. In the comparisons of actions between the Shexiang Baoxin pills group and high or middle dosage group of Xinning tablets, there were no statistical significant differences. **Conclusion** Xinning tablets can increase the contents of VEGF and its receptor FLK-1 in myocardial tissue of

animals after myocardial infarction, the action of high dose tablets being the strongest.

【Key words】 Xinning table; electrocardiogram; myocardial ischemia; thoracic obstruction; vascular endothelial growth factor; fetal liver kinase 1

已知良好侧支循环形成是改善缺血心肌灌注及心脏功能的基础,通过恢复血运,可以使缺血区或边缘区因缺血、缺氧而损伤的心肌细胞及时得到供血、供氧,阻止损伤的心肌细胞因持续的缺血、缺氧而走向死亡,从而可以缩小梗死区,达到改善心脏功能的目的。本研究旨在通过心肌缺血大鼠模型,观察心宁片对动物心肌组织内血管内皮生长因子(VEGF)及其受体胎肝激酶 1(FLK-1)变化的影响,探讨心宁片对缺血心肌的保护作用及其相关机制。

1 材料与方法

1.1 动物模型制备:参照文献[1-2]方法进行改进制备大鼠心肌缺血模型。水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠,气管插管接呼吸机行人工呼吸(90 次/min,呼吸比 1:1),将针形电极分别插入右上肢和双下肢皮下,连接多导生理记录仪记录标准 I 导联心电图。开胸,结扎冠状动脉(冠脉)左前降支,以结扎部位以下心肌变白、搏动减弱且心电图出现 ST 段弓背向上明显抬高为制模成功。待动物自主呼吸稳定时撤除呼吸机,术后连续腹腔注射青霉素 3 d 防感染。假手术组只穿线不结扎冠脉,其余步骤同模型组。

1.2 动物分组及给药:健康雄性 SD 大鼠 60 只,体重 200~300 g,由湖南中医药大学实验动物中心提供。按照随机数字表法分为假手术组、模型组、阳性对照组及心宁片大、中、小剂量组 6 组,每组 10 只。阳性对照组给予麝香保心丸(购自上海和黄药业) 30 mg · kg⁻¹ · d⁻¹;心宁片大、中、小剂量组分别给予心宁片(由湖南省中医药研究院提供,批号:2006304)1.08、0.54、0.27 g · kg⁻¹ · d⁻¹。假手术组和模型组给等量蒸馏水。各组于制模后 2 d 开始灌胃,每日 2 次,均连用 30 d。

1.3 观察指标及方法

1.3.1 心电图观察:术前大鼠心电图(标准 I 导联)不合格者被剔除。术后 5 min、给药 30 d 测定各组大鼠心电图。

1.3.2 免疫组化检测:采用免疫组化方法测定 VEGF、FLK-1 的表达(试剂盒均购自武汉博士德生

物工程有限公司),以心肌细胞胞质内出现棕黄色颗粒为阳性判断标准,选择阳性细胞密集区域,在高倍镜(×200)下随机选取 5 个视野,测定每个视野中的平均吸光度(A)值及棕色颗粒的面积,以此代表该组织切片内 VEGF、FLK-1 的相对含量。

1.4 统计学方法:使用 SPSS 13.0 软件,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;组间两两比较方差齐用 LSD 检验,不齐用 Dunnett T3 检验;P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 心电图 ST 段变化(表 1):模型组大鼠结扎左冠脉前降支 5 min 后,心电图 ST 段较假手术组明显抬高(P<0.01),证明制模成功。给药 30 d 后,心宁片大、中剂量组和阳性对照组心电图 ST 段的偏移程度较模型组明显压低,以大剂量组为甚(P<0.05 或 P<0.01);小剂量组有一定的降低趋势,但与模型组比较差异无统计学意义。

表 1 心宁片对大鼠心肌梗死后心电图 ST 段偏移程度的影响($\bar{x} \pm s$) mV

组别	动物数	术前	术后 5 min	给药 30 d
假手术组	10	0.154±0.079	0.166±0.034	0.164±0.085
模型组	10	0.145±0.075	0.480±0.089 ^b	0.384±0.078 ^b
心宁片大剂量组	10	0.148±0.052	0.464±0.035	0.319±0.064 ^{df}
心宁片中剂量组	10	0.146±0.028	0.475±0.065	0.328±0.046 ^{ef}
心宁片小剂量组	10	0.151±0.036	0.477±0.047	0.343±0.023 ^f
阳性对照组	10	0.152±0.054	0.471±0.034	0.309±0.057 ^{df}

注:与假手术组比较,^bP<0.01;与模型组比较,^cP<0.05,

^dP<0.01,与本组术后 5 min 比较,^eP<0.01

2.2 心肌组织 VEGF、FLK-1 的含量变化(表 2):模型组心肌中 VEGF、FLK-1 含量明显高于假手术组(P 均<0.05);心宁片大、中剂量组和阳性对照组心肌中 VEGF、FLK-1 的表达则较模型组显著增强(P<0.05 或 P<0.01);心宁片小剂量组 VEGF 含量也有一定升高趋势,但与模型组比较差异无统计学意义。

3 讨论

心肌梗死范围对病情发展和预后有重要的影响,在梗死边缘区,血液供应既可来自闭塞的冠脉,也可来自非闭塞的冠脉,这一部分心肌能否恢复取决于侧支循环的代偿程度,包括动脉间的吻合、

基金项目:湖南省科技厅科技计划重点项目(05sk2007)

通信作者:蔡光先,Email:lby1203@sina.com

作者简介:谢 勇(1975-),男(汉族),湖南省人,医学硕士,助教,Email:bellbearxy@163.com.

表 2 心宁片对大鼠心肌梗死后心肌组织 VEGF 和 FLK-1 含量的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	VEGF 表达的面积(mm ²)		VEGF 表达量(A 值)		FLK-1 表达的面积(mm ²)		FLK-1 表达量(A 值)	
		给药前	给药 30 d	给药前	给药 30 d	给药前	给药 30 d	给药前	给药 30 d
假手术组	10	1.213±0.149	1.209±0.151	0.131±0.016	0.131±0.016	0.909±0.023	0.915±0.028	0.092±0.002	0.091±0.002
模型组	10	1.412±0.163	1.408±0.165 ^a	0.157±0.018	0.156±0.019 ^a	0.959±0.029	0.965±0.032 ^a	0.095±0.003	0.095±0.003 ^a
心宁片大剂量组	10	1.405±0.178	1.823±0.254 ^{df}	0.157±0.018	0.190±0.029 ^{df}	0.961±0.031	1.314±0.040 ^{df}	0.095±0.003	0.133±0.004 ^{df}
心宁片中剂量组	10	1.413±0.174	1.677±0.268 ^{ce}	0.156±0.018	0.169±0.027 ^{ce}	0.967±0.035	1.013±0.041 ^{ce}	0.096±0.003	0.101±0.004 ^{ce}
心宁片小剂量组	10	1.407±0.153	1.585±0.173 ^a	0.156±0.015	0.158±0.027 ^a	0.957±0.028	0.986±0.037 ^a	0.095±0.003	0.098±0.003 ^a
阳性对照组	10	1.415±0.181	1.873±0.314 ^{df}	0.156±0.015	0.196±0.027 ^{df}	0.963±0.034	1.437±0.053 ^{df}	0.095±0.003	0.153±0.005 ^{df}

注:与假手术组比较,^aP<0.05,^bP<0.01;与模型组比较,^cP<0.05,^dP<0.01;与本组给药前比较,^eP<0.05,^fP<0.01

Thebsian 循环及重叠的毗邻动脉。如果加剧该区氧供求的不平衡,坏死即将从中心向外扩大,如能改善侧支循环,增加能源物质和氧的供应,减少耗氧量,就可能向好的方面转化,把梗死范围控制在最小的程度^[3]。

研究表明,侧支血管的形成是由于局部组织释放的内源性促血管因子所引起的^[4-5]。VEGF 又名血管通透因子,是由两个相同多肽链通过二硫键构成的同源二聚体糖蛋白,能特异性作用于血管内皮细胞,强烈促进其增殖,促进血管形成,并有升高血管通透性的作用。张曼等^[5]研究显示,将 VEGF 基因导入缺血心肌后,其不仅能够表达 VEGF mRNA,而且可以促进缺血心肌血管增生,呈束状,增加侧支循环的生物效应。通过提高骨髓中 VEGF 的表达水平可能帮助促进急性放射性损伤骨髓造血功能的修复^[6]。在内皮细胞上有两种与 VEGF 高度结合的特异性受体,即酪氨酸激酶受体 1(FLT-1)、FLK-1,两者具有酪氨酸蛋白激酶活性,能提高 VEGF 作用于血管内皮细胞的作用,促进其有丝分裂。而其中 FLK-1 在血管发生和生长中起着传递细胞增殖和迁移信号的作用,只有 VEGF 与 FLK-1 结合才能引起内皮细胞的增殖。在心血管中,冠脉并非终极动脉,它们之间有许多正常情况下处于关闭状态的吻合支,当冠脉狭窄或关闭时,这些吻合支逐渐开放,形成有功能意义的侧支循环。

心宁片是有效经验方护心康片组方的优化与筛选,能明显减轻冠心病心绞痛,提高生活质量,既往

研究表明,其作用机制可能是:提高心肌血流量,保护缺氧/再复氧损伤心肌细胞,拮抗 Ca²⁺ 超载,减少细胞凋亡^[7-9]。本实验中通过免疫组化法测定动物心肌组织中 VEGF 及其受体 FLK-1 的表达,观察药物对缺血心肌的影响,结果表明,心宁片可能通过提高 VEGF 及其受体 FLK-1 的含量以增加缺血心肌中侧支循环的建立而改善其缺血的情况,起到对缺血心肌的保护作用。

参考文献

- [1] 刘付平,姚宏伟,李俊. 大鼠心肌缺血再灌注损伤模型的改进[J]. 安徽医科大学学报, 2003, 38(3): 234-236.
- [2] 李敏,孙明,左国平,等. 大鼠单次完全可逆缺血/再灌注心肌顿抑模型的改进[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2002, 22(4): 325-327.
- [3] 黄衍寿,冼绍祥,周名璐,等. 养心康对心肌肥大心力衰竭大鼠血浆 ET、CGRP 含量的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2002, 19(1): 40-42.
- [4] Schaper W, Sharma HS, Quinkler W, et al. Molecular biologic concepts of coronary anastomoses [J]. J Am Coll Cardiol, 1990, 15(3): 513-518.
- [5] 张曼,郭启煜,张福春,等. 血管内皮生长因子基因对兔左冠状动脉前降支结扎心肌侧支循环建立的影响[J]. 中国危重病急救医学, 1999, 11(1): 15-17.
- [6] 刘振芳,孙汉英,刘文励,等. 川芎嗪对急性放射损伤小鼠骨髓血管内皮细胞生长因子表达水平的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志 2002, 9(6): 320-322.
- [7] 蔡光先,胡学军,刘柏炎. 护心康片治疗冠心病心绞痛及对患者生存质量的影响[J]. 中国中医急症, 2004, 13(1): 21-25.
- [8] 蔡光先,胡学军,郑爱华. 护心康片治疗冠心病心绞痛 86 例[J]. 中医药学刊, 2003, 21(3): 33-36.

(收稿日期:2009-04-23)

(本文编辑:李银平)

欢迎订阅 2009 年《中国危重病急救医学》杂志

中华医学会主办,全国各地邮局订阅,邮发代号:6-58

定价:每期 9.8 元,全年 117.6 元。2009 年以前的刊物可在本刊社邮购部购买

刊社地址:天津市和平区睦南道 122 号天和医院内 邮编:300050 电话:022-23042150