

冠心 V 号合剂对大鼠急性心肌梗死后 心室重构的作用及机制

左可可¹, 柯峰¹, 顾宁^{2*}

(1. 南京中医药大学, 南京 210023; 2. 南京中医药大学 第三附属医院, 南京 210001)

[摘要] **目的:**观察冠心 V 号合剂对急性心肌梗死(AMI)后心室重构的作用,探讨冠心 V 号合剂改善心室重构的机制。**方法:**雄性 SD 大鼠 56 只,随机分为空白组、假手术组、模型组、冠心 V 号合剂临床等剂量组,2,4 倍剂量组(0.5,1,2 g·kg⁻¹),血脂康组(12.5 g·kg⁻¹)。采用冠状动脉左前降支结扎法建立急性心肌梗死模型,各组模型鼠造模成功 24 h 后开始灌胃给药 1 次/d,连续 4 周,以心脏彩超测量射血分数(EF),缩短分数(FS),计算体表面积及左室心肌质量指数(LVMI),用 Western blot 技术检测 Toll 样受体 4(TLR4),髓样分化因子(MyD88),核因子-κB/p65(NF-κB/p65)蛋白表达。**结果:**与空白组、假手术组比较,模型组大鼠 EF,FS 降低,LVMI 升高,梗死区心肌组织 TLR4,MyD88,NF-κB/p65 蛋白表达上调,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,冠心 V 号合剂干预组各组大鼠 EF,FS 升高,LVMI 降低,梗死区心肌组织 TLR4,MyD88,NF-κB/p65 蛋白表达降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论:**冠心 V 号合剂能够抑制 TLR4/MyD88/NF-κB/p65 信号通路,改善心室结构及心功能,从而干预心肌梗死后心室重构。

[关键词] 心肌梗死; 心室重构; 冠心 V 号合剂; Toll 样受体 4 信号通路
[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)05-0147-04
[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015050147

Effect and Mechanism of Guanxin V Mixture on Ventricular Remodeling after Acute Myocardial Infarction ZUO Ke-ke¹, KE Feng¹, GU Ning^{2*} (1. *Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China*; 2. *The Third Affiliated Hospital Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210001, China*)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Guanxin V mixture on acute myocardial infarction (AMI) after the ventricular remodeling, and investigate the mechanism of Guanxin V improving ventricular remodeling. **Method:** The model of acute myocardial infarction was established by left anterior descending coronary artery ligation. All of the rats were treated with Guanxin V mixture and Xuezhikang capsule for 4 weeks, The heart color measurement of ejection fractions (EF) value, fractional shortening (FS) value, calculate the left ventricular mass index and left ventricular surface area were observed, Western blot technique was used to detect the expression of Toll like receptor 4 (TLR4), myeloid differentiation factor 88 (MyD88), nuclear factor-kappa B/p65 (NF-κB/p65) proteins. **Result:** Compared with the normal group and sham operation group, the EF, FS and expression of TLR4, MyD88, NF-κB/p65 in model rats were up-regulated, left ventricular mass index (LVMI) was decreased, the difference was statistically significant ($P < 0.05$), Compared with the model group, the EF, FS and expression of TLR4, MyD88, NF-κB/p65 in model rats were decreased, LVMI was increased, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Expression of Guanxin V mixture was inversely proportional to the concentration of protein, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** Guanxin V mixture can inhibit TLR4/MyD88/NF-κB p65 signal pathway, this may be one of the mechanisms of improving ventricular remodeling.

[Key words] myocardial infarction; ventricular remodeling; Guanxin V mixture; TLR4 signal pathway

[收稿日期] 20140802(003)
[基金项目] 南京市卫生局医学科技发展重点项目(201108005);江苏省普通高校研究生科研创新计划项目(CXZZ13_0)
[第一作者] 左可可,博士,从事中医及中西医结合心血管疾病的临床与基础研究,E-mail:kekedou2021@163.com
[通讯作者] *顾宁,教授,博士生导师,主任中医师,从事中医及中西医结合心血管疾病的临床与基础研究,E-mail:guning@medmail.com.cn

心肌梗死 (MI) 后心室重构 (ventricular remodeling) 是指急性心肌梗死 (AMI) 后心脏在受到损伤或超负荷状态下, 心肌细胞肥大、凋亡及心肌细胞外基质纤维化, 临床表现为心室肌肥厚、心室容量增加和心室结构改变^[1]。Toll 样受体 4 (TLR4) 是第一个被发现的哺乳动物 TLR, 是天然免疫系统的一种模式识别受体。研究表明, TLR4 基因缺乏的大鼠的心肌梗死范围及炎性反应明显减少^[2], 使用 TLR4 拮抗剂 eritoran 干预心肌缺血再灌注小鼠, 发现小鼠心肌梗死面积明显减少^[3]。国内研究表明, 中医药有效组分可通过抑制 TLR4-NF- κ B-TNF- α 通路激活, 改善 AMI 大鼠心肌缺血损伤导致的心脏形态结构和功能异常^[4]。本研究是在课题组前期的研究基础上, 从分子生物学方面研究冠心 V 号合剂是否可以通过抑制 TLR4 信号通路, 从而干预心肌梗死后心室重构。

1 材料

1.1 动物 健康雄性 SD 大鼠 56 只, 为 6~7 周龄, 体重为 (220 $\pm$ 10) g, 由南京中医药大学动物房购于浙江省医学科学院实验动物中心, 合格证号 SCXK (浙) 2008-0033。

1.2 药品试剂 冠心 V 号合剂由党参 200 g, 麦冬 100 g, 丹参 200 g, 赤芍 200 g, 制五味子 50 g, 地黄 200 g 组成, 丹参、五味子以 75% 乙醇回流提取 2 h, 提取 2 次, 溶剂用量为 4 倍, 药渣与党参、麦冬、赤芍、地黄合并, 加水煎煮 2 h, 加水量 10 倍, 煎 3 次, 浓缩为 1 000 mL, 以高效液相色谱法 (HPLC) 法测定丹参酮 II_A 和阿魏酸的含量为质控标准, 由南京中医药大学第三附属医院药剂科制备 (苏药制字 Z04000795)。血脂康胶囊 (由北大维信生物科技有限公司提供, 批号 D1400002346)。TLR4 抗体 [ab22048, Abcam (香港) 有限公司], MyD88 抗体 (D80F5, CST 公司), NF- κ B/p65 抗体 (SC372, 美国 Santa Cruz 公司), β -actin 抗体 (M0001) 购于 CMC 公司, HRP 标记山羊抗小鼠 IgG (JES-2), HRP 标记山羊抗兔 IgG (JES-3) 购于巧伊生物技术有限公司。

1.3 仪器 ALC-V8 型小动物呼吸机 (上海奥尔科特生物科技有限公司), 心电图机 (Shanghai Kohden Medical Electronic Instrument Corporation), 2100 型小动物高频彩色超声仪 (Visual Sonics Vevo), MS-250 探头 (频率 21 MHz), 221BR48803 型蛋白半干转印仪 (Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 动物模型制备 56 只 SD 大鼠适应性喂养 1

周后称重, 随机分为空白组、假手术组、模型组、冠心 V 号合剂临床等剂量组、冠心 V 号合剂临床 2 倍剂量组、冠心 V 号合剂临床 4 倍剂量组、血脂康组。造模动物经 10% 水合氯醛 3 mL $\cdot$ kg⁻¹ 腹腔麻醉后, 四肢皮下连接心电图机电极, 记录标准 II 导联心电图, 经口行气管插管后接小动物呼吸机通气, 潮气量 7~8 mL, 吸呼比 3:2, 呼吸频率 90 次/min。沿左胸第 3~4 肋间水平依次剪开皮肤, 逐层分离皮下组织、肌肉, 暴露心脏, 撕开心包, 用 6-0 号线于左心耳下缘 2 mm 缝扎左前降支; 观察到结扎线以下心肌变白, 心肌运动减弱 (连接心电图见 II 导联 ST 段上抬 0.2 mV) 提示心肌梗死。逐层关闭胸腔 (边缝合边挤压胸腔内的残余气体)。假手术组手术方法同前, 但在该血管下穿线后不打结。空白对照组不作任何手术。

2.2 给药 除空白组外的 6 组大鼠于术后 24 h 开始灌胃, 每只大鼠 ig 体积为 10 mL $\cdot$ kg⁻¹ $\cdot$ d⁻¹, 冠心 V 号合剂按生药含量计为 5, 10, 20 g $\cdot$ kg⁻¹ $\cdot$ d⁻¹, ig, 阳性药物组血脂康胶囊 0.125 g $\cdot$ kg⁻¹ $\cdot$ d⁻¹, ig; 每日 1 次; 模型组、假手术组均 ig 给予等容量生理盐水, 每日 1 次。

2.3 心脏超声心动图评价心功能 每只大鼠在造模后 28 d 时行超声心动图检查, 使用超声仪, 探头频率 21 MHz。大鼠麻醉后固定于鼠板上, 取胸骨旁左室长轴切面, 由二维超声引导 M 型曲线进行测量 EF, FS, 左室质量 (LVmass), 计算大鼠体表面积 (BSA, m²) = 0.09 $\times$ [体重 (kg)]^{2/3}; 左室心肌质量指数 (LVMI, g $\cdot$ m⁻²) = 实测 LVM/BSA。

2.4 梗死区心肌组织 TLR4, MyD88, NF- κ B/p65 蛋白表达 称取梗死区心肌组织, 混合球磨仪研磨后, 15 000 r $\cdot$ min⁻¹ 4 $^{\circ}$ C 离心 30 min, 取上清, BCA 试剂盒进行蛋白定量。每孔上样量为 10 μ L, 10% SDS-PAGE 电泳, 转 PVDF 膜, 封闭, 一抗处理 4 $^{\circ}$ C 过夜, 洗膜后加入酶标二抗室温孵育 2 h, 洗膜, 曝光。用 PS 软件进行图像分析, 以待测蛋白灰度值与 β -actin 蛋白灰度值的比值作为待测蛋白相对含量。

2.5 统计学方法 所有数据统计均用 SPSS 15.0 统计软件进行统计分析, 实验数据经正态性检验后以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间多样本均数的比较经方差齐性检验后采用单因素方差分析。P<0.05 为有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠基本情况 实验过程中, 因呼吸暂停死亡 7 只, 心脏骤停死亡 8 只, 灌胃死亡 2 只。实验各组大鼠最后处死取材时的存活数分别为: 空白组 7 只、

假手术组 6 只、模型组 5 只、冠心 V 号临床等剂量组 5 只、冠心 V 号临床 2 倍剂量组 6 只、冠心 V 号临床 4 倍剂量组 5 只、血脂康组 5 只。

3.2 心脏彩超检测 模型组实验大鼠心功能指标 EF,FS 明显下降,LVMI 增加,与空白组、假手术组

比较,差异有统计学意义($P<0.05$);药物干预组各组 EF,FS 均低于模型组,LVMI 增高,差异有统计学意义($P<0.05$);冠心 V 号各组 EF,FS,LVM 值与药物浓度成反比,且各组间差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 冠心 V 号合剂对急性心肌梗死大鼠治疗 28 d 后心脏彩超心功能指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	<i>n</i>	EF/%	FS/%	LVMI/ $\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$
空白	—	7	73.9 $\pm$ 1.0	43.5 $\pm$ 0.5	0.134 $\pm$ 0.005
假手术	—	6	71.4 $\pm$ 1.1	40.2 $\pm$ 2.0	0.141 $\pm$ 0.006
模型	—	5	52.0 $\pm$ 1.8 ¹⁾	27.8 $\pm$ 1.1 ¹⁾	0.240 $\pm$ 0.013 ¹⁾
血脂康	0.125	5	61.1 $\pm$ 1.1 ²⁾	33.6 $\pm$ 1.6 ²⁾	0.168 $\pm$ 0.006 ²⁾
冠心 V 号	5	5	59.1 $\pm$ 1.3 ²⁾	31.9 $\pm$ 1.1 ²⁾	0.176 $\pm$ 0.006 ²⁾
	10	6	60.7 $\pm$ 0.9 ²⁾	33.6 $\pm$ 1.5 ²⁾	0.167 $\pm$ 0.008 ²⁾
	20	5	62.6 $\pm$ 1.3 ²⁾	35.2 $\pm$ 0.7 ²⁾	0.157 $\pm$ 0.006 ²⁾

注:与空白组、假手术组比较¹⁾ $P<0.05$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$ 。

3.3 梗死区心肌组织 TLR4,MyD88,NF- κ B/p65 蛋白表达 与空白组、假手术组比较,模型组大鼠梗死区心肌组织 TLR4,MyD88,NF- κ B/p65 蛋白表达上调,差异有统计学意义($P<0.05$);冠心 V 号各组 TLR4,MyD88,NF- κ B/p65 蛋白表达均低于模型组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 2,图 1。

表 2 冠心 V 号对 AMI 大鼠心肌组织 TLR4,MyD88,NF- κ B/p65 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s,n=3$)

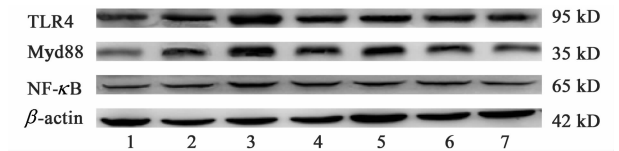
Table 2 Effect of Guanxin V mixture on the protein expression of myocardial TLR4,MyD88, NF- κ B/p65 ($\bar{x} \pm s,n=3$)

组别	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	TLR4 / β -actin	MyD88 / β -actin	NF- κ B/p65 / β -actin
空白	—	0.518 $\pm$ 0.019	0.407 $\pm$ 0.009	0.327 $\pm$ 0.012
假手术	—	0.604 $\pm$ 0.034	0.479 $\pm$ 0.017	0.421 $\pm$ 0.026
模型	—	0.860 $\pm$ 0.035 ¹⁾	0.683 $\pm$ 0.013 ¹⁾	0.572 $\pm$ 0.022 ¹⁾
血脂康	0.125	0.649 $\pm$ 0.021 ²⁾	0.596 $\pm$ 0.019 ²⁾	0.493 $\pm$ 0.006 ²⁾
冠心 V 号	5	0.705 $\pm$ 0.021 ²⁾	0.632 $\pm$ 0.005 ²⁾	0.526 $\pm$ 0.014 ²⁾
	10	0.659 $\pm$ 0.010 ²⁾	0.593 $\pm$ 0.016 ²⁾	0.495 $\pm$ 0.012 ²⁾
	20	0.615 $\pm$ 0.005 ²⁾	0.556 $\pm$ 0.011 ²⁾	0.464 $\pm$ 0.011 ²⁾

注:与空白组、假手术组比较¹⁾ $P<0.05$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$ 。

4 讨论

TLR4 是天然免疫系统的一种模式识别受体,介导机体的天然免疫反应。TLR-4 介导的信号转导根据衔接蛋白的不同分为髓样分化蛋白 88(MyD88)依赖性和非依赖性 2 个途径。MyD88 途径介导炎性细胞因子产生。研究发现抑制 TLR 下游信号通



1. 空白组;2. 假手术组;3. 模型组;4. 血脂康 0.125 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;5. 冠心 V 号 5 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;6. 冠心 V 号 10 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;7. 冠心 V 号 20 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组

图 1 冠心 V 号对 AMI 大鼠心肌组织 TLR4,MyD88,NF- κ B/p65 蛋白表达的影响

Fig.1 Effect of Guanxin V mixture on the protein expression of myocardial TLR4,MyD88, NF- κ B/p65

路分子如 MyD88,NF- κ B 也能减轻心肌缺血再灌注损伤,TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路的激活参与了缺血再灌注心肌损伤的发生和进展^[5-6]。TLR4 的表达水平与左室心肌纤维化呈正相关^[7],与左室心肌肥厚程度收缩功能指数显著相关^[8]。Timmers 等^[9]研究表明,TLR4 基因缺陷的小鼠相比正常小鼠在急性心肌梗死后左心室重构面积缩小,TLR4 基因缺陷的小鼠,实验性心梗模型致死率及心室重构情况较野生性大鼠明显减轻^[10]。TLR4 可能成为干预心肌梗死后心室重构的目标,而已有研究表明丹皮酚可通过抑制 TLR4 信号通路下调下游炎症因子 TNF- α 的基因表达,改善家兔 MI 后的心室重构^[11]。

冠心 V 号由党参、麦冬、丹参、赤芍、制五味子、地黄组成,方中党参功补中益气、健脾益肺,麦冬养阴润燥、清心除烦,五味子敛肺止汗、生津止渴、补肾宁心。三药合用,一补、一清、一敛,收拾虚脱之阴。

赤芍行瘀止痛、凉血消肿,丹参活血祛瘀、安神宁心,生地黄清热凉血、养阴生津。三药联用,则活血、化瘀、凉血之功效显著。本方六味药物合用,益气、养阴、凉血、化瘀相得益彰。本课题组前期研究表明:冠心 V 号合剂联合西医常规疗可有效提高冠心病心功能不全患者的运动耐量,调节血流动力学,改善心功能^[12]。现代药理研究表明,党参水溶液可调节心肌收缩力,增强心脏泵血功能及心输出量,从而营养保护缺血再灌注损伤后的心肌组织^[13]。赤芍总苷则可稳定心肌细胞膜、清除自由基和抑制心肌细胞早期凋亡,保护心肌细胞^[14]。麦冬通过抑制 p-Smad2/3 及 Smad2/3 及 TGF-β₁ 蛋白表达,减少大鼠心肌纤维化^[15]。丹参水溶性提取物具有增强冠状动脉血流量、抗脂质过氧化、抑制血小板聚集、血栓形成及改善微循环等作用^[16-17]。

本实验结果显示 AMI 大鼠心肌梗死区心肌组织 TLR4,MyD88,NF-κB/p65 蛋白表达上调,治疗后各组蛋白表达明显下降,且与药物浓度成反比,表明冠心 V 号合剂能够抑制 TLR4/MyD88/NF-κBp65 信号通路,改善心室结构及心功能,从而干预心肌梗死后心室重构。

[参考文献]

[1] 吴锡桂.我国人群冠心病流行现状与趋势[J]. 中国慢性病预防与控制,2003,11(4):190-191.

[2] Oyama J, Blais C J, Liu X, et al. Reduced myocardial ischemia reperfusion in jury in toll like receptor4-deficient mice[J]. Circulation,2004,109(6):784-789.

[3] Shimamoto A, Chong A J, Yada M, et al. Inhibition of Toll-like receptor4 with eritoran attenuates myocardia ischemia-reperfusion injury [J]. Circulation, 2006, 114 (suppl 1):1270-1274.

[4] 张云,王阶,郭丽丽,等. 活血安心方减轻急性心肌梗死大鼠心肌缺血损伤的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志,2012,32(7):939-943.

[5] Frantz S, Tillmanns J, Kuhlencordt P J, et al. Tissue-specific effects of the nuclear factor kappaB subunit p50 on myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. Am J Pathol,2007,171(2):507-512.

[6] Hua F, Ha T, Ma J, et al. Blocking the MyD88-dependent pathway protects the myocardium from ischemia/reperfusion injury in rat hearts [J]. Biochem Biophys Res Commun,2005,338(2):1118-1125.

[7] 和亚萍,曲鹏,李桂华. Toll 样受体在 Goldblatt 鼠左室心肌中的表达炎症与左室心室肥厚相关的一个证据[J]. 高血压杂志,2005,13(8):483-487.

[8] Shishido T, Nozaki N, Yamaguchi S, et al. Toll like receptor-2 modulates ventricular remodeling after myocardial infarction [J]. Circulation,2003,108(23):2905-2910.

[9] Timmers L, Sluijter J P. Toll-like receptor 4 mediates mal adaptive left ventricular remodeling and impairs cardiac function after myocardial infarction [J]. Circ Res,2008,102(2):257-264.

[10] Riad A, Jager S, Sobirey M, et al. Toll like receptor-4 modulates survival by induction of left ventricular remodeling after myocardial infarction inmice [J]. Immunol,2008,180(10):6954-6961.

[11] 周晓慧,任立群,刘维朝,等. 丹皮酚抑制心肌梗死家兔心肌 TLR4 信号通路改善心室重构[J]. 中国老年学杂志,2012,32(21):4690-4692.

[12] 瞿媛,顾宁,周建中. 冠心 V 号合剂联合西医常规疗法对冠心病慢性收缩性心功能不全患者心功能的影响[J]. 上海中医药杂志,2011,45(10):35-36.

[13] 钟灵. 党参对心肌缺血/再灌注损伤家兔血流动力学和心肌酶的影响 [J]. 中国老年学杂志,2012, 32 (21):966-968.

[14] 高丽,张哲,许树钦,等. 赤芍总苷对过氧化氢所致 H9c2 心肌细胞损伤的保护作用[J]. 时珍国医国药,2011,22(5):1194-1195.

[15] 王国钦,李瑞满,金伟,等. 麦冬抑制大鼠心肌成纤维细胞胶原合成的作用及其机制[J]. 中国病理生理杂志,2013,29(4):615-618.

[16] Wang S B, Tian S, Yang F, et al. Effects of salvianolic acids on oxidative stress and hepatic fibrosis in rats [J]. Toxicol Appl Pharmacol,2010,242(2):155.

[17] 刘剑刚,张大武,史大卓,等. 丹参、红花水溶性组分及配伍对大鼠心肌缺血/再灌注损伤作用的实验研究[J]. 中国中药杂志,2011,36(2):189-193.

[责任编辑 聂淑琴]