

益气养阴化痰通络方对大鼠急性心肌梗死的保护作用

杨帆¹, 卞海², 倪子婷³, 刘攀⁴, 邵正斌^{1*}

(1. 安徽中医药大学第一附属医院, 安徽 合肥 230031; 2. 安徽中医药大学, 安徽 合肥 230012; 3. 泗县中医院, 安徽 宿州 234300; 4. 安徽省中西医结合医院, 安徽 合肥 230031)

摘要: 目的 探讨益气养阴化痰通络方对大鼠急性心肌梗死的保护作用。方法 将 60 只大鼠随机分为假手术组、模型组、阿托伐他汀组 (0.6 g/kg) 及中药高、低剂量组 (18、4.5 g/kg), 每组 12 只。结扎左前降支复制心肌梗死大鼠模型, 假手术组不结扎仅穿针。造模后, 予以相应药物连续灌胃 14 d, ELISA 法检测大鼠血清炎症及心肌酶指标水平, HE 染色观察大鼠心肌组织病理改变。结果 与假手术组比较, 模型组血清 CK-MB、AST、LDH 活性和 cTnI、CRP、IL-6、TNF- α 、MMP-9 水平升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 各给药组血清 CK-MB、AST、LDH 活性和 cTnI、CRP、IL-6、MMP-9 水平降低 ($P < 0.05$), 并且益气养阴化痰通络方作用呈剂量依赖性。结论 益气养阴化痰通络方可减轻急性心肌梗死导致的大鼠心肌损伤, 降低心肌炎症反应水平。

关键词: 益气养阴化痰通络方; 急性心肌梗死; 心肌酶; 炎症反应

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2023)04-1328-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.04.052

近年来, 随着人们生活水平提高, 冠心病的发病率逐年增高, 严重危害身心健康, 冠心病的防治已成为我国公共卫生急需解决的重大问题^[1]。目前, 大量临床和实验研究表明该病的发生机制主要与冠状动脉内的易损斑块密切相关, 易损斑块在炎症反应介导下出现破裂, 继而形成血栓, 更会导致急性心肌梗死的发生发展^[2-3]。中医药可有效防治急性心肌梗死^[4], 其中经典治法“益气养阴化痰通络法”可多靶点同时作用, 防治结合, 本实验通过观察益气养阴化痰通络方对急性心肌梗死大鼠心肌酶、炎症因子水平及心肌组织病理变化的影响, 以期为临床防治该病提供参考。

1 材料

1.1 动物 健康雄性清洁级 SD 雄性大鼠 60 只, 体质量 225~275 g, 购自安徽医科大学动物实验中心, 实验动物生产许可证号 SCXK (皖) 2017-001, 于安徽中医药大学动物房内喂养, 温度 20~26 ℃, 相对湿度 40%~70%, 明暗循环 12 h/12 h, 予以普通饲料。

1.2 仪器 BL-420S 型心电图记录仪 (成都泰盟软件有限公司); AU460 型奥林巴斯全自动生化仪 (北京拜安吉科技有限公司); BX51 型奥林巴斯光学显微镜 (东莞市时利和电子科技有限公司); ZT-12M 型智能生物组织自动脱水机、RM2016 型徕卡病理组织切片机、YB-7LF 型生物组织包埋机 (武汉市光亚医疗器械科技有限公司)。

1.3 试剂与药物 中药颗粒剂 (党参 20 g、丹参 20 g、川芎 10 g、黄芪 20 g、黄精 20 g、瓜蒌 10 g), 批号

205837291, 购自安徽中医药大学第一附属医院中药房, 由广东一方制药有限公司生产。阿托伐他汀片 (规格 20 mg), 批号 205837156, 购自安徽中医药大学第一附属医院西药房, 由美国辉瑞公司生产。实验所需的试剂盒均由武汉基因美生物科技有限公司提供。

2 方法

2.1 分组、造模及给药 将 60 只大鼠随机分为假手术组、模型组、阿托伐他汀组及中药高、低剂量组, 每组 12 只。参考文献 [5] 报道在无菌条件下结扎左冠状动脉前降支复制急性心肌梗死大鼠模型, 假手术组不结扎仅穿针, 观察大鼠造模前正常心电图和造模后心肌缺血心电图, 以心电图 ST 段抬高超过 0.2 mV 为造模成功, 见图 1。根据人与大鼠给药剂量换算公式, 各给药组剂量为 0.6 g/kg (临床等效剂量) 阿托伐他汀药液, 18、4.5 g/kg (临床等效剂量的 4、1 倍) 益气养阴化痰通络方药液, 假手术组、模型组给予生理盐水, 每天 1 次, 连续灌胃给药 14 d。

2.2 血清炎症和心肌酶指标检测 给药结束后, 大鼠腹主动脉采血, 静置后离心, 取上层血清, 采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测各组大鼠血清肌酸激酶同工酶 MB (CK-MB)、谷草转氨酶 (AST)、乳酸脱氢酶 (LDH) 活性和肌钙蛋白 I (cTnI)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素-6 (IL-6)、基质金属蛋白酶 9 (MMP-9)、C-反应蛋白 (CRP) 水平, 具体检测方法及操作步骤严格按照各试剂盒说明书进行。

收稿日期: 2021-10-06

基金项目: 安徽省科技厅重点项目 (KJ2017A302); 安徽中医药大学探索性科研项目 (2016ts014)

作者简介: 杨帆 (1981—), 女, 硕士, 副主任医师, 从事中西医结合防治心血管疾病临床研究。E-mail: 86896812@qq.com

* 通信作者: 邵正斌 (1974—), 男, 硕士, 主任医师, 从事中西医结合防治心血管疾病临床研究。Tel: (0551) 62850062, E-mail: shaozhengbin@126.com

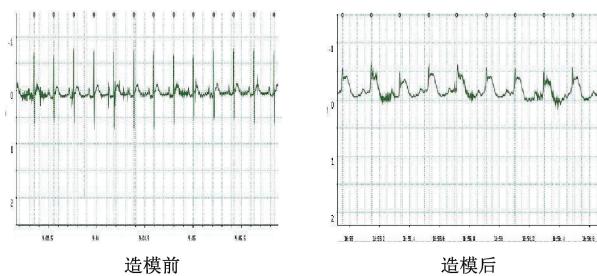
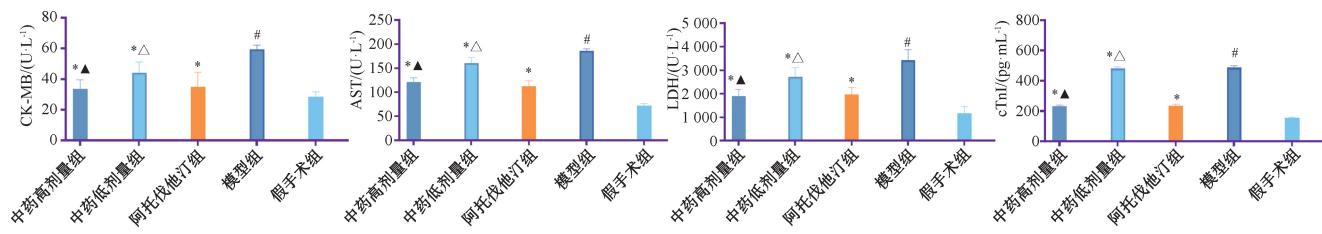


图1 大鼠心电图变化

2.3 HE染色观察心肌组织病理改变 取大鼠左心室组织,于4%多聚甲醛中固定,经脱水、包埋、切片、脱蜡后,行常规HE染色,于光学显微镜下观察心肌组织病理改变。

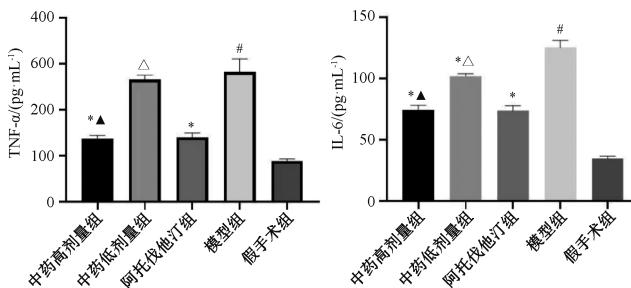
2.4 统计学分析 通过SPSS 24.0软件进行处理,数据以



注:与假手术组比较,[#] $P<0.05$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$;与阿托伐他汀组比较,[△] $P<0.05$;与中药低剂量组比较,[▲] $P<0.05$ 。

图2 各组大鼠血清心肌酶活性 ($\bar{x}\pm s$, n=10~12)

3.3 益气养阴化痰通络方对急性心肌梗死大鼠血清炎症因子水平的影响 与假手术组比较,模型组大鼠血清TNF- α 、IL-6、MMP-9、CRP水平均升高($P<0.05$);与模型组比较,各给药组大鼠血清IL-6、MMP-9、CRP水平均降低



注:与假手术组比较,[#] $P<0.05$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$;与阿托伐他汀组比较,[△] $P<0.05$;与中药低剂量组比较,[▲] $P<0.05$ 。

图3 各组大鼠血清炎症因子水平 ($\bar{x}\pm s$, n=10~12)

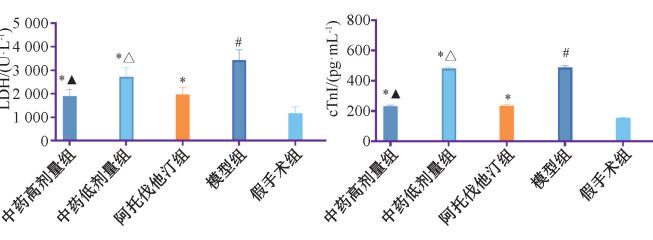
3.4 益气养阴化痰通络方对急性心肌梗死大鼠心肌组织病理改变的影响 假手术组大鼠心肌细胞排列整齐且细胞核染色清晰有规律,无明显病理改变;模型组大鼠心肌细胞出现空泡合并变性,细胞核染色不清晰,排列混乱,甚至消失,细胞浸润面积大;中药低剂量组大鼠心肌细胞排列松散,空泡变性,炎性细胞浸润、纤维组织增生,间质水肿;中药高剂量组大鼠多数心肌细胞排列结构规律,少数细胞核肥大,间质轻度水肿,散在炎细胞浸润;阿托伐他汀组大鼠心肌组织结构尚规律且呈完整样,少量间质水肿,较少炎性细胞浸润,细胞核偶见肥大,见图4。

($\bar{x}\pm s$) 表示,组间比较采用单因素方差分析,方差不齐时采用Dunnett T3检验,方差齐时采用SNK-q检验。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

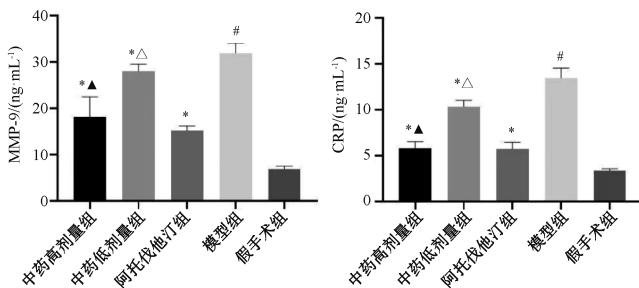
3 结果

3.1 大鼠一般情况 模型组术中死亡1只,术后死亡1只,最终剩余10只;中药低剂量组术后死亡1只,最终剩余11只;其余各组均无死亡,为12只。

3.2 益气养阴化痰通络方对急性心肌梗死大鼠血清心肌酶活性的影响 与假手术组比较,模型组大鼠血清CK-MB、AST、LDH活性和cTnI水平均升高($P<0.05$);与模型组比较,各给药组大鼠血清CK-MB、AST、LDH活性和cTnI水平均降低($P<0.05$);中药高剂量组大鼠血清CK-MB、AST、LDH活性和cTnI水平均低于低剂量组($P<0.05$),与阿托伐他汀组比较无显著差异($P>0.05$),见图2。



($P<0.05$),而中药高剂量组大鼠血清TNF- α 、IL-6、MMP-9、CRP水平低于低剂量组($P<0.05$),其中TNF- α 、IL-6、CRP水平与阿托伐他汀组比较无显著差异($P>0.05$),见图3。



注:与假手术组比较,[#] $P<0.05$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$;与阿托伐他汀组比较,[△] $P<0.05$;与中药低剂量组比较,[▲] $P<0.05$ 。

图3 各组大鼠血清炎症因子水平 ($\bar{x}\pm s$, n=10~12)

4 讨论

急性心肌梗死是我国乃至全世界公民猝死的首要原因^[6]。目前,临幊上西医以介入配合药物治疗为主,虽可以及时开通闭塞血管,有效抗血小板聚集,稳定斑块,但总体疗效仍不理想,如出现介入治疗后再狭窄、再灌注后无复流等^[7]。研究表明,在急性心肌梗死发生发展的过程中,炎症反应扮演着重要的角色,与多个信号通路相关,现单一干预某一通路虽疗效确切,但总体作用有限,仍不具备“治愈”潜力^[8]。近年来,中医药在配合西药从多途径、多靶点治疗急性心肌梗死上,能有效改善术后患者的临床症状,提高患者生活质量^[9],故开发和证实有确切疗

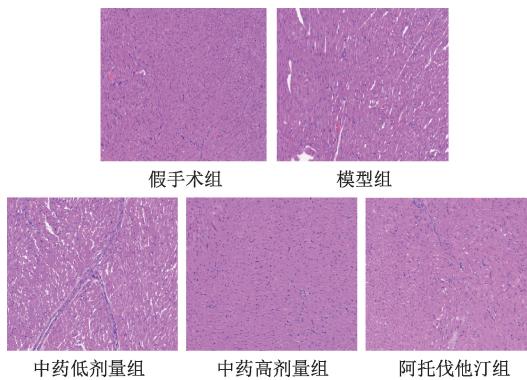


图4 各组大鼠心肌组织HE染色(×400)

效的中医药方剂对治疗急性心肌梗死有重要价值。

既往研究表明，在机体受到创伤、感染和氧化应激等反应后，肝脏在TNF- α 等多种炎症细胞因子的作用下分泌CRP^[10]。CRP不仅是一种非特异性的炎症标志物，其本身也直接参与炎症与动脉粥样硬化等心血管疾病，是心血管疾病最强有力的预示与危险因子^[11]。除此之外，TNF- α 是炎症反应的关键调节因子^[12]，在冠状动脉粥样硬化进程中发挥重要作用。IL-6是一种上游炎症细胞因子^[13]，对冠状动脉粥样硬化过程的启动和下游CRP的产生至关重要。另外，MMP-9与冠状动脉内斑块破裂以及炎症反应相关^[14]，当MMP-9水平升高时，血管内斑块稳定性降低，发生破裂加重冠状动脉粥样硬化进程。

CK-MB对诊断早期急性心肌梗死特异性及灵敏度高，心梗发生时其血清水平立即升高，并与梗死面积呈正相关^[15]。cTnI在心梗初期即入血，升高水平与损害程度一致，在血中持续时间长，可作为急性心肌梗死诊断“金标准”^[16]。AST主要分布于心肌细胞，心梗时心肌细胞膜通透性增加，其血清水平增加，对早期急性心肌梗死诊断意义重大，可有效评估患者预后^[17]。LDH诊断急性心肌梗死的特异性低，其血清水平与AST呈正相关，结合其他心肌酶可提高急性心肌梗死检出率，评估心肌缺血严重程度^[18]。而观察心肌病理可直接证明心肌损伤^[19]。

冠心病中医属“胸痹心痛”范畴，其基本病机为心脉痹阻，病理性质为本虚标实，虚实夹杂。本虚有气虚、阴伤、阳衰；标实有瘀血、痰浊、寒凝、气滞。益气养阴化痰通络方具益气养阴、化痰通络之功效，前期临床研究显示，该方可改善经皮冠状动脉介入治疗患者冠脉生化环境，提高患者生活质量^[20]，但其发挥效应的机制尚不清楚。本实验结果表明，益气养阴化痰通络方能有效降低急性心肌梗死大鼠血清炎症因子水平，减轻心肌组织病理损伤以保护心肌，可为临床联合西药多靶点防治冠心病提供参考。

参考文献：

- [1] Gimbrone M A Jr, García-Cardeña G. Endothelial cell dysfunction and the pathobiology of atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2016, 118(4): 620-636.
- [2] Godo S, Shimokawa H. Endothelial functions [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017, 37(9): e108-e114.
- [3] Onat D, Brillon D, Colombo P C, et al. Human vascular endothelial cells: A model system for studying vascular inflammation in diabetes and atherosclerosis [J]. *Curr Diab Rep*, 2011, 11(3): 193-202.
- [4] Trepels T, Zeiher A M, Fichtlscherer S. The endothelium and inflammation [J]. *Endothelium*, 2006, 13(6): 423-429.
- [5] Sun Q, Kang Z M, Cai J M, et al. Hydrogen-rich saline protects myocardium against ischemia/reperfusion injury in rats [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2009, 234 (10): 1212-1219.
- [6] 胡盛寿, 高润霖, 刘力生, 等.《中国心血管病报告2018》概要[J].中国循环杂志, 2019, 34(3): 209-220.
- [7] van Niekerk G, Welzel T, Stassen W. Clinical interventions account for scene time in a helicopter emergency medical service in South Africa[J]. *Air Med J*, 2018, 37(6): 357-361.
- [8] Wu M Y, Yang G T, Liao W T, et al. Current mechanistic concepts in ischemia and reperfusion injury [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 46(4): 1650-1667.
- [9] 沈晓璞, 李冀.心肌缺血再灌注损伤的中医研究进展[J].陕西中医, 2017, 38(2): 271-272.
- [10] Sullivan S, Young A, Hammadah M, et al. Sex differences in the inflammatory response to stress and risk of adverse cardiovascular outcomes among patients with coronary heart disease[J]. *Brain Behav Immun*, 2020, 90: 294-302.
- [11] Král Z, Adam Z, Folber F, et al. Systemic inflammatory response with high CRP values as the dominant symptom of multiple myeloma[J]. *Vnitr Lek*, 2019, 65(1): 37-44.
- [12] Nie N, Bai C, Song S, et al. Bifidobacterium plays a protective role in TNF- α -induced inflammatory response in Caco-2 cell through NF- κ B and p38MAPK pathways [J]. *Mol Cell Biochem*, 2020, 464(1-2): 83-91.
- [13] Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. Interleukin (IL-6) immunotherapy [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2018, 10 (8): a028456.
- [14] Zhu S H, Liu B Q, Hao M J, et al. Paeoniflorin suppressed high glucose-induced retinal microglia MMP-9 expression and inflammatory response via inhibition of TLR4/NF- κ B pathway through upregulation of SOCS3 in diabetic retinopathy [J]. *Inflammation*, 2017, 40(5): 1475-1486.
- [15] Fan J B, Ma J, Xia N, et al. Clinical value of combined detection of CK-MB, MYO, cTnI and plasma NT-proBNP in diagnosis of acutemyocardial infarction [J]. *Clin Lab*, 2017, 63(3): 427-433.
- [16] Lee C C, Huang S S, Yeo Y H, et al. High-sensitivity-cardiac troponin for accelerated diagnosis of acute myocardial infarction: A systematic review and meta-analysis [J]. *Am J Emerg Med*, 2020, 38(7): 1402-1407.
- [17] Young J L, Cai L, States J C. Impact of prenatal arsenic exposure on chronic adult diseases [J]. *Syst Biol Reprod Med*, 2018, 64(6): 469-483.
- [18] Teng Y, Ding M, Wang X, et al. LncRNA RMRP accelerates

- hypoxia-induced injury by targeting miR-214-5p in H9c2 cells [J]. *J Pharmacol Sci*, 2020, 142(2): 69-78.
- [19] 邵正斌, 戴小华, 夏铭蔚, 等. 益气养阴、化痰通络法干预冠心病合并2型糖尿病PCI术后病人的临床研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2016, 14(18): 2088-2091.
- [20] 倪子婷, 邵正斌. 益气养阴、化痰通络法治疗冠心病合并2型糖尿病PCI术后心绞痛临床研究[J]. 海南医学院学报, 2020, 26(6): 439-443.

大黄水提物对正常大鼠干预机制的代谢组学研究

刘振¹, 周宁^{1,2}, 刘通¹, 刘振辉¹, 张雅文¹, 冯卫生^{1,2}, 郑晓珂^{1,2*}

(1. 河南中医药大学, 河南郑州 450046; 2. 河南省中药开发工程技术研究中心, 河南郑州 450046)

摘要: 目的 基于HPLC-Q/TOF-MS代谢组学技术研究大黄水提物对正常大鼠的干预作用及相关机制。方法 将大鼠分为正常组和大黄水提物组, 给药2周后收集各组大鼠尿液、血清样本, 处理后进样分析, 并对采集的数据进行多元统计分析、代谢网络富集、生物学功能解析。结果 尿液和血清样本的主成分分析得分图显示, 大黄组与正常组均显著分离。经正交偏最小二乘判别分析, 分别鉴定出生物标志物52个(尿液)、38(血清)个。代谢网络富集和生物学功能解析显示, 这些生物标志物主要涉及酮体的合成与降解、谷氨酸和谷氨酰胺代谢、牛磺酸和亚牛磺酸代谢、淀粉和蔗糖代谢、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酰胺代谢、咖啡因代谢、三羧酸循环等代谢途径。结论 大黄可影响机体的脂质代谢、氨基酸代谢、神经递质以及肠道微生物等代谢途径, 从而发挥其泻下通便、降血脂、改善胃肠道疾病等作用。

关键词: 大黄水提物; 代谢组学; UPLC-Q/TOF-MS

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2023)04-1331-08

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.04.053

大黄为蓼科大黄属多年生高大草本植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* L.、唐古特大黄 *Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf. 或药用大黄 *Rheum officinale* Baill. 的干燥根及根茎, 是中国传统中药之一^[1], 始载于《神农本草经》, 云“味苦寒, 主下淤血, 血闭, 寒热, 破症瘕积聚, 留饮宿食, 荡涤肠胃, 推陈致新, 通利水谷”。现代药理学研究发现大黄具有调节胃肠功能、心脑血管保护、抗炎、抗肿瘤及免疫调节等药理作用^[2-4], 但其泻下之性峻烈, 不可长期大量服用^[5]。

代谢组学是继基因组学、蛋白组学之后发展起来的一门新兴系统生物学方法, 是对机体内源性小分子代谢物的定性定量分析, 具有整体性、系统性的特点^[6-7], 在医药领域中的各个方面得到广泛应用, 包括疾病诊断、药理毒理研究、新药研发以及药物筛选等。

大黄成分复杂, 临床功效众多, 目前对其研究多为单个疾病的机制阐释, 缺乏整体性、系统性的研究。因此, 本实验利用代谢组学技术研究大黄水提物对正常大鼠整体代谢的干预作用, 全面系统地分析其对正常机体的影响, 以期从多方面、多角度阐释大黄的现代临床药理功效机制。

1 材料

1.1 动物 SD雄性大鼠16只, SPF级, 体质量180~220g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 实验动物生产许可证号SCXK(京)2016-0006。大鼠分为正常组和大黄水提物组, 每组8只, 饲养于18~22℃清洁级动物实验室内, 自由进食能水, 适应性喂养1周。

1.2 药材 大黄购自河南中药材市场, 加10倍量蒸馏水煎煮2次, 每次1h, 合并2次煎煮滤液, 浓缩。

1.3 试剂 甲醇、乙腈、甲酸(分析纯, 美国Thermo Scientific公司); 水为超纯水。

1.4 仪器 Advantage A10型超纯水仪、BT25S型十万分之一精密分析天平(德国Sartorius公司); 5810R型高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司); SK-1型快速混匀器(常州国宇仪器制造有限公司); 移液器(法国Gilson公司); Genesys 10型分光光度计、Ultimate 3000型超高效液相色谱仪(美国Thermo Scientific公司); BCD-206TAS型低温冰箱(青岛海尔股份有限公司); maXis HD Q-TOF四极杆-飞行时间质谱(德国Bruker公司)。

2 方法

2.1 样本处理 大黄水提物组按10.5g/kg剂量灌胃给药,

收稿日期: 2021-11-08

基金项目: 国家重点研发计划—中药现代化研究专项(2019YFC1708802); 国家自然科学基金项目(81903805)

作者简介: 刘振, 男, 硕士, 从事中药活性成分及作用机制研究。Tel: 15538155471, E-mail: 1115171023@qq.com

*通信作者: 郑晓珂, 女, 教授, 博士生导师, 从事中药药效物质基础及作用机制研究。Tel: (0371) 60190296, E-mail: zhengxk@163.com