

丹红注射液促进心梗模型大鼠缺血心肌血管新生

殷 英, 卫 国, 王艳华, 牟 菲, 段佳林, 郭 超, 关 月, 朱艳荣, 奚苗苗,
文爱东*

(第四军医大学西京医院药剂科, 陕西 西安 710032)

摘要: **目的** 探讨丹红注射液(丹参和红花)对心梗(MI)模型大鼠缺血心肌血管新生的影响及其作用机制。**方法** 利用Sprague-Dawley (SD)大鼠左前降支冠状动脉结扎法造成急性心梗模型,实验分为假手术组,模型组,丹红注射液低、中、高剂量组(0.5、1、2 mL/kg),静脉给药7 d后处死,检测心梗面积,心肌损伤血清学指标,微血管面密度,血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、基质细胞衍生因子-1(stromal cell-derived factor-1, SDF-1)及其受体CXCR4的表达。**结果** 丹红注射液可显著减小大鼠心肌梗死面积,降低LDH、CK-MB、cTnI血清水平,增加微血管面密度,上调VEGF、SDF-1、CXCR4的表达。**结论** 丹红注射液具有缺血心肌的保护作用,其机制可能与VEGF的高表达及SDF-1/CXCR4生物轴有关。

关键词: 丹红注射液; 心肌梗死; 血管新生; SDF-1/CXCR4

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2016)09-1893-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.09.003

Danhong Injection promotes the acceleration of neovascularization in myocardial infarction rats with myocardial ischemia

YIN Ying, WEI Guo, WANG Yan-hua, MOU Fei, DUAN Jia-lin, GUO Chao, GUAN Yue,
ZHU Yan-rong, XI Miao-miao, WEN Ai-dong*

(Department of Pharmacy, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

ABSTRACT: **AIM** To investigate the neovascular effect of Danhong Injection (*Salviae miltiorrhizae Radix et Rhizoma* and *Carthami Flos*) on myocardial infarction (MI) rats with myocardial ischemia and its mechanism of action. **METHODS** Sprague-Dawley (SD) rats with acute MI induced by ligation of left anterior descending coronary artery were randomly divided into five groups (sham-operated group, model group, 0.5 mL/kg, 1 mL/kg and 2 mL/kg Danhong Injection groups). After intravenous injection for seven days, the rats were sacrificed. Then the infarct size, serum markers of myocardial damage, microvessel density, and expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF), stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) and its receptor CXCR4 were determined. **RESULTS** Danhong Injection significantly decreased the infarct size, serum levels of lactate dehydrogenase (LDH), creatine kinase-MB (CK-MB) and cardiac troponin I (cTnI), increased the microvascular density, and upregulated the expressions of VEGF, SDF-1 and CXCR4 in rats. **CONCLUSION** Danhong Injection has cardioprotective effect, which may be related to the high expression of VEGF and SDF-1/CXCR4 biological axis.

KEY WORDS: Danhong Injection; myocardial infarction; neovascularization; SDF-1/CXCR4

收稿日期: 2015-12-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81403135, 81403134, 81403182)

作者简介: 殷 英(1985—),女,硕士,药师,从事心脑血管保护药物的研究与开发。Tel:(029) 84775475-8203, E-mail: yinying0736@126.com

* 通信作者: 文爱东(1964—),男,主任药师,博士生导师,从事合理用药与新药研发。Tel:(029) 84773636, E-mail: adwen_2014@hotmail.com

冠心病、脑梗死等各种缺血性疾病严重危害人类健康。2000年, Carmeliet^[1]提出了“治疗性血管新生”(therapeutic angiogenesis)的概念,其在缺血性疾病发病机制和治疗中的作用已成为目前医学研究的热点,被认为是治疗冠心病所致心肌梗死最具潜力和研究意义的新思路^[2]。

中药复方丹红注射液由丹参和红花的提取物制备而成,具有活血化瘀,通脉舒络的功效,临床广泛用于冠心病、心绞痛、心肌梗塞、脑血栓等缺血性疾病的治疗^[3]。本研究在制备大鼠心肌梗死模型的基础上,探讨丹红注射液对心梗大鼠缺血心肌局部血管新生的影响及其可能的分子作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 成年清洁级雄性SD大鼠75只,体质量250~300 g,由第四军医大学实验动物中心提供,生产许可证号SCXK-(军)-2012-007。

1.1.2 仪器 HX-100E小动物呼吸机(成都泰盟科技有限公司);COOLPIX S1型照相机(Nikon公司,日本);5417型低温高速离心机(Eppendorf公司,美国);IX71+DP72荧光倒置显微镜(OLYMPUS公司,日本);MULTISKAN GO全波长酶标仪(Thermo公司,美国);HM340E石蜡切片机(蔡司公司,德国);SSC-DC18P彩色病理图像分析系统(Sony公司,日本);POWERPAC BASIC蛋白电泳系统(BIO-RAD公司,美国)。

1.1.3 药物与试剂 丹红注射液(0.33 g生药/mL),由山东丹红制药有限公司生产(批号14121025);伊文思蓝(Evans Blue, EB)、2,3,5-氯化三苯基四氮唑蓝(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC)染色剂购自美国Sigma公司;乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、肌酸激酶同工酶(creatine kinase-MB, CK-MB)、心肌肌钙蛋白(cardiac troponin I, cTnI)检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所;基质细胞衍生因子-1(SDF-1)检测试剂盒购自美国R&D公司;兔抗大鼠CD34、VEGF、CXCR4、 β -Actin抗体购自美国Abcam公司。

1.2 实验方法

1.2.1 动物模型制作 参考文献[4],大鼠称定质量后用10%水合氯醛(3 mL/kg)腹腔注射麻醉,仰卧固定于大鼠板上,右上、右下和左下肢插入针形电极连接心电监护仪。75%酒精消毒,气管插管并连接于小动物呼吸机(频率为75次/min,潮气

量为8~9 mL,吸:呼=1:2),于左肋第4、5肋间打开胸腔,暴露心脏,于肺动脉圆锥与左心耳之间,左心耳根下方1~2 mm处穿线结扎冠状动脉左前降支,观察心电图显示ST段抬高0.2 mV以上,提示模型成功。关闭胸腔,缝合皮肤。术后肌注青霉素G8万单位/d,共3 d,以预防感染。

1.2.2 分组及给药 实验共分为5组,假手术组,模型组,丹红注射液低(0.5 mL/kg)、中(1 mL/kg)、高剂量组(2 mL/kg),其中假手术组只穿线不结扎,其余操作均同模型组。各治疗组造模24 h内开始给予药物,模型组给予生理盐水,尾静脉注射,每天一次,7 d后处死动物。

1.3 指标检测

1.3.1 心肌梗死面积的测定 术后第8天各组大鼠随机取5只,麻醉后经腹主动脉注射3% EB 2 mL,然后迅速摘取心脏,-20℃冰冻20 min后切成1 mm的薄片,用2% TTC溶液37℃避光孵育15 min,心脏切片压平后再置于4%多聚甲醛中固定24 h,经染色后蓝色代表正常区,白色代表梗死区,红色代表缺血但未梗死区。数码相机拍照后采用Image-Pro Plus 6.0图像分析软件进行分析,梗死面积=梗死区/(梗死区+缺血区) \times 100%。

1.3.2 血清生化指标的测定 大鼠麻醉后从腹主动脉取血,室温放置30 min,4 000 r/min离心15 min收集血清,严格按照试剂盒说明书进行LDH、CK-MB和cTnI的含有量检测。

1.3.3 微血管面密度的测定 每组剩余10只大鼠心脏,选取左心室灰白色区域边缘缺血心肌组织,分为两份,一份以4%多聚甲醛固定,另一份于-80℃保存。心肌组织脱水、包埋后用超薄切片机切成4 μ m厚度的薄片,用免疫组织化学法染色心脏切片,CD34工作浓度(1:100),DAB显色,染色后血管内皮细胞被染成棕黄色。微血管面密度的(MVD)计数方法参照Weidner法^[5],用40 \times 光镜扫视整块切片,找到梗死边缘区血管密度最高的区域,再在200 \times 光镜视野下计数该区域的血管数目,凡是染成棕黄色单个内皮细胞或内皮细胞簇均作为一个血管计数,官腔内径大于20 μ m(8个红细胞直径)或有较厚肌层(3层以上)的血管不予计数。每张切片随机选取8个视野(200 \times)计数微血管数目(MVC),取其平均值为该份标本的平均微血管数(MMVC),以MMVC/mm²表示微血管面密度(MVD)。

1.3.4 VEGF、SDF-1、CXCR4蛋白表达的检测

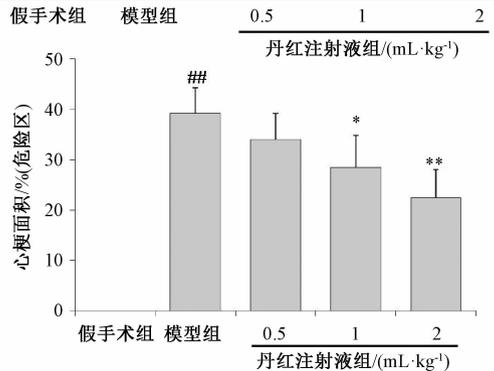
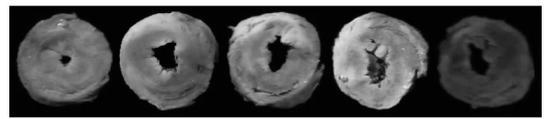
剩余左心室缺血组织剪碎后，加入蛋白裂解液，在冰上用高速分散器匀浆约 1 min，4 ℃ 离心取上清。其中，SDF-1 含有量的检测严格按照 ELISA 试剂盒说明书进行，VEGF、CXCR4 蛋白表达的检测采用 Western blot 实验。

1.4 数据处理与统计分析 数据用 SPSS 19.0 统计分析软件处理，以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，组间比较采用 One-way ANOVA 分析，Tukey's test 统计实验结果， $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 实验结果

2.1 丹红注射液对模型大鼠心肌梗面积的影响 结果如图 1 所示。假手术组未见心肌梗死，模型组心肌梗面积 [(39.2 ± 5.1)%] 显著增加 ($P < 0.01$)，而给予不同质量浓度的丹红注射液治疗后，大鼠心肌梗面积均有不同程度的减小，呈现剂量依赖关系。其中，丹红注射液中 (1 mL/kg)、高剂量组 (2 mL/kg) 的心梗面积分别为 (28.4 ± 6.4)% 和 (22.4 ± 5.7)%，与模型组比较，差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

2.2 丹红注射液对模型大鼠血清生化指标的影响 结果如图 2 所示。与假手术组相比，心梗模型组大鼠血清中 LDH、CK-MB 和 cTnI 的水平均显著升高，且差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。给予不同

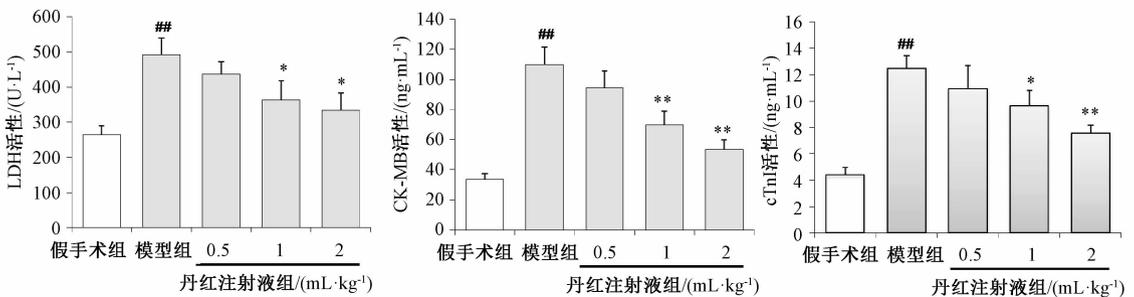


注：与假手术组比较， $## P < 0.01$ ；与模型组比较， $* P < 0.05$ ， $** P < 0.01$

图 1 丹红注射液对心肌梗死大鼠心肌梗面积的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Fig. 1 Effect of Danhong Injection on the infarct size in MI rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

质量浓度的丹红注射液治疗后，大鼠血清中 LDH、CK-MB 和 cTnI 的水平有不同程度的下降，且与模型组相比，丹红注射液中剂量组 (1 mL/kg) 和高剂量组 (2 mL/kg) 的差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。



注：与假手术组比较， $## P < 0.01$ ；与模型组比较， $* P < 0.05$ ， $** P < 0.01$

图 2 丹红注射液对心肌梗死大鼠心肌损伤血清学指标的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Fig. 2 Effects of Danhong Injection on the serum markers of myocardial damage in MI rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

2.3 丹红注射液对 MVD 的影响 结果如表 1 所示。心梗模型组大鼠左室梗死边缘区 MVD 大于假手术组，但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。给予不同质量浓度的丹红注射液治疗后，大鼠左室梗死边缘区 MVD 有不同程度的增大，且与模型组相比，丹红注射液中剂量组 (1 mL/kg) 和高剂量组 (2 mL/kg) 的差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.4 丹红注射液对 VEGF 表达的影响 结果如图 3 所示。给予不同质量浓度的丹红注射液治疗后，

表 1 丹红注射液对心肌梗死大鼠 MVD 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

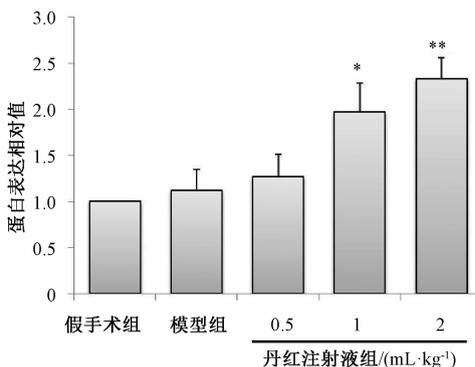
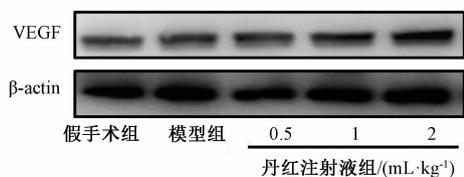
Tab. 1 Effect of Danhong Injection on MVD in MI rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	剂量/(mL·kg ⁻¹)	MVD
假手术组	-	15.17 ± 3.66
模型组	-	19.73 ± 5.48
丹红注射液低剂量组	0.5	24.46 ± 4.50
丹红注射液中剂量组	1	28.31 ± 4.97**
丹红注射液高剂量组	2	33.43 ± 6.08**

注：与模型组比较， $** P < 0.01$

大鼠左室梗死边缘区 VEGF 的表达有不同程度的增加, 且与模型组相比, 丹红注射液中剂量组

(1 mL/kg) 和高剂量组 (2 mL/kg) 的差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。



注: 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图3 丹红注射液对心肌梗死大鼠 VEGF 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Fig. 3 Effect of Danhong Injection on VEGF expression in MI rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

2.5 丹红注射液对 SDF-1、CXCR4 表达的影响

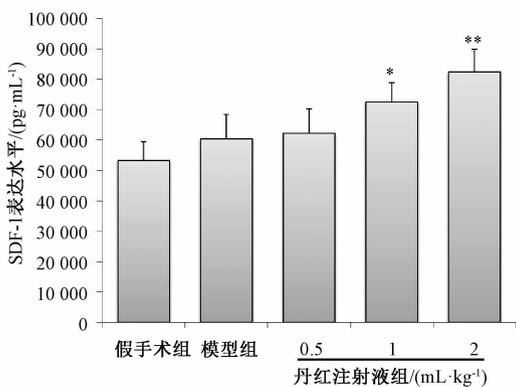
SDF-1 检测结果如图 4 所示, CXCR4 检测结果如图 5 所示。给予不同质量浓度的丹红注射液治疗后, 大鼠左室梗死边缘区 SDF-1、CXCR4 的表达有不同程度的增加, 且与模型组相比, 丹红注射液中剂量组 (1 mL/kg) 和高剂量组 (2 mL/kg) 的差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

关。现代医学认为“生脉”主要包括 3 层含义: 生成新的血管; 闭塞的血管再通; 血管的管腔变粗, 血流量增大^[6]。丹参与红花是中医治疗冠心病疗效确切的常用中药, 其制剂丹红注射液在临床上用途广泛, 疗效确切, 但其改善心肌缺血与促进缺血心肌血管生成的相关性及其分子作用机制鲜少有文献报导。

实验发现, 丹红注射液可显著减小大鼠心肌梗死面积, 降低血清中心肌损伤血清标志物 LDH、CK-MB 和 cTnI 的水平, 增加大鼠左室梗死边缘区的微血管面密度 (MVD), 且呈剂量依赖关系。因此初步认为, 丹红注射液有促进心肌缺血区血管新生的作用, 并通过此作用保护缺血心肌, 从而减小心肌梗死面积。

VEGF 是一类促进血管新生的生长因子, 在血管生成中起着决定性作用, 许多实验证明, 其可调控血管内皮祖细胞 (EPCs) 的迁移与归巢^[7]。在骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 移植治疗缺血性疾病过程中, VEGF 可促进骨髓细胞移动到血管新生部位诱发血管生成^[8]。实验发现, 丹红注射液能增加大鼠左室梗死边缘区 VEGF 的表达, 说明其促进心肌缺血区血管新生的作用可能与 VEGF 的高表达有关。

基质细胞衍生因子-1 (SDF-1) 是 CXC 趋化因子家族中的成员, CXC 趋化因子受体 CXCR4 是目前已知的 SDF-1 的特异性受体^[9]。目前的研究认为, SDF-1/CXCR4 生物轴在多种血管生成因子影响血管生成的过程中起着关键性作用, 其调节血管



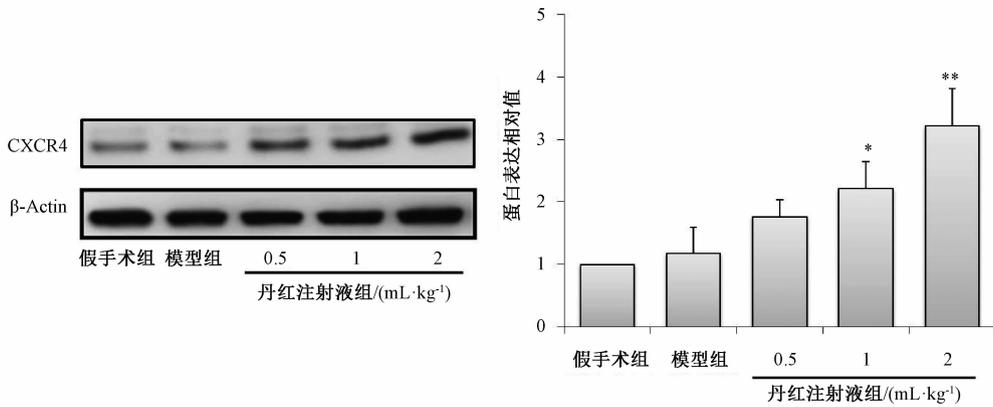
注: 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图4 丹红注射液对心肌梗死大鼠 SDF-1 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Fig. 4 Effect of Danhong Injection on SDF-1 expression in MI rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

3 讨论

目前, “治疗性血管新生”这一治疗理念正在从基础研究、临床研究到临床试验的过程中逐渐成熟。在我国, 几千年的祖国传统医药积淀了深厚的治疗“胸痹”、“真心痛”(冠心病)的中医理论, “治疗性血管新生”与中医学“生脉”理论密切相



注：与模型组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$

图5 丹红注射液对心肌梗死大鼠 CXCR4 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Fig. 5 Effect of Danhong Injection on CXCR4 expression in MI rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

再生的功能已成为缺血性疾病治疗的研究热点^[10-11]。在胚胎发育期，SDF-1 可以介导造血干细胞到达骨髓，成年后也可以监管和调控骨髓中的造血干细胞，在组织受损后能动员骨髓中干细胞移动到外周血并进入损伤的部位^[12-13]。另外，Li 等^[14]研究发现，用 CXCR4 的抑制剂 AMD 3100 可以阻断 VEGF 的血管生成作用，说明 VEGF 引发的骨髓细胞迁移和归巢对 SDF-1/CXCR4 生物轴也有依赖性。实验发现，丹红注射液能上调大鼠左室梗死边缘区 SDF-1 和 CXCR4 的表达，初步说明其促进心肌缺血区血管新生的作用以及 VEGF 的高表达可能与 SDF-1/CXCR4 生物轴参与调控有关。

中医对缺血性疾病的研究治疗历史悠久，并取得了显著的疗效，因此从中药中寻找具有促血管新生作用的药物是一个比较有意义的研究方向。丹参与红花均为活血要药，有祛瘀通络之功效，祛瘀则能生新。本研究从药效和机制两个方面初步验证了丹红注射液可能通过 SDF-1/CXCR4 生物轴调控 VEGF 的高表达，促进梗死大鼠缺血心肌血管再生，从而减小心肌梗死面积，保护缺血心肌，为中医药防治缺血性疾病提供了新的实验依据，也为阐明活血化瘀中药“祛瘀生新”的科学内涵提供了一个新的思路。

参考文献:

[1] Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis [J]. *Nat Med*, 2000, 6(4): 389-395.
 [2] Cochain C, Channon K M, Silvestre J S. Angiogenesis in the infarcted myocardium [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2013, 18 (9): 1100-1113.
 [3] 柳青, 雷招宝. 丹红注射液不良反应及合理应用[J]. 中成药, 2010, 32(11): 1964-1966.

[4] Li Y J, Duan C L, Liu J X. Salvianolic acid A promotes the acceleration of neovascularization in the ischemic rat myocardium and the functions of endothelial progenitor cells[J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 151(1): 218-227.
 [5] Weidner N, Carroll P R, Flax J, et al. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma [J]. *Am J Pathol*, 1993, 143(2): 401-409.
 [6] 陈圆, 杨博华. 中药促进血管新生研究进展[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2008, 14(6): 597-599.
 [7] Herrmann M, Verrier S, Alimi M. Strategies to stimulate mobilization and homing of endogenous stem and progenitor cells for bone tissue repair[J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2015, 3: 79.
 [8] Zentilin L, Tafuro S, Zacchigna S, et al. Bone marrow mononuclear cells are recruited to the sites of VEGF-induced neovascularization but are not incorporated into the newly formed vessels[J]. *Blood*, 2006, 107(9): 3546-3554.
 [9] 吴广升, 惠光艳. 基质细胞衍生因子-1α 在组织修复再生领域的研究进展[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2014, 24 (11): 677-680.
 [10] Zaruba M M, Franz W M. Role of the SDF-1-CXCR4 axis in stem cell-based therapies for ischemic cardiomyopathy[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2010, 10(3): 321-335.
 [11] Takahashi M. Role of the SDF-1/CXCR4 system in myocardial infarction[J]. *Circ J*, 2010, 74(3): 418-423.
 [12] Yin T, Bader A R, Hou T K, et al. SDF-1α in glycan nanoparticles exhibits full activity and reduces pulmonary hypertension in rats [J]. *Biomacromolecules*, 2013, 14 (11): 4009-4020.
 [13] Bromage D I, Davidson S M, Yellon D M. Stromal derived factor 1α: a chemokine that delivers a two-pronged defence of the myocardium[J]. *Pharmacol Ther*, 2014, 143(3): 305-315.
 [14] Li B, Sharpe E E, Maupin A B, et al. VEGF and PlGF promote adult vasculogenesis by enhancing EPC recruitment and vessel formation at the site of tumor neovascularization [J]. *FASEB J*, 2006, 20(9): 1495-1497.