

# 苗药理气活血滴丸对心肌缺血再灌注损伤模型大鼠的保护作用<sup>△</sup>

李尧锋<sup>1\*</sup>, 徐 剑<sup>2</sup>, 陈向云<sup>1</sup>, 彭 芳<sup>1</sup>, 田紫平<sup>3</sup>, 熊仕芳<sup>3</sup>, 朱 璨<sup>1</sup>, 杨长福<sup>1</sup>, 陈云志<sup>1</sup>, 张永萍<sup>2#</sup>(1.贵阳中医学院基础医学院, 贵阳 550025; 2.贵阳中医学院药学院, 贵阳 550025; 3.贵州益佰制药股份有限公司, 贵阳 550008)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)01-0076-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.01.20

**摘要** 目的:研究苗药理气活血滴丸对心肌缺血再灌注损伤(MIRI)模型大鼠的保护作用。方法:将60只大鼠随机分为假手术组、模型组、辛伐他汀组(阳性对照, 40 mg/kg)和理气活血滴丸低、中、高剂量组(43.75、87.50、175.00 mg/kg), 每组10只。各给药组大鼠每天ig相应药物1次, 连续10 d;假手术组和模型组大鼠ig等体积生理盐水。末次给药45 min后, 除假手术组外其余各组大鼠均复制MIRI模型。复灌后监测大鼠心律失常情况;采用苏木精-伊红染色观察心肌组织病理学变化;采用酶动力学法测定血清中心肌酶[肌酸激酶(CK)、乳酸脱氢酶(LDH)]活性;采用酶联免疫吸附法测定血清中肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素6(IL-6)含量。结果:与假手术组比较, 模型组大鼠心律失常程度较高, 心肌组织损伤严重, 血清中CK、LDH活性及TNF- $\alpha$ 、IL-6含量均明显升高( $P < 0.01$ )。与模型组比较, 辛伐他汀组和理气活血滴丸中、高剂量组大鼠心律失常程度降低, 心肌组织病理损伤得到改善, 血清中CK、LDH活性及TNF- $\alpha$ 、IL-6含量均显著降低( $P < 0.01$ ), 且理气活血滴丸高剂量组与辛伐他汀组各指标水平接近( $P > 0.05$ )。结论:理气活血滴丸对MIRI模型大鼠具有一定保护作用, 其机制可能与减少心肌细胞心肌酶的漏出、降低血清中TNF- $\alpha$ 和IL-6含量、抑制炎症损伤有关。

**关键词** 苗药;理气活血滴丸;心肌缺血再灌注损伤;心肌酶;肿瘤坏死因子 $\alpha$ ;白细胞介素6;大鼠

## Protective Effect of Miao Medicine Liqi Huoxue Dropping Pills on Myocardial Ischemia-reperfusion Injury Model Rats

LI Yaofeng<sup>1</sup>, XU Jian<sup>2</sup>, CHEN Xiangyun<sup>1</sup>, PENG Fang<sup>1</sup>, TIAN Ziping<sup>3</sup>, XIONG Shifang<sup>3</sup>, ZHU Can<sup>1</sup>, YANG Changfu<sup>1</sup>, CHEN Yunzhi<sup>1</sup>, ZHANG Yongping<sup>2</sup>(1.School of Basic Medicine, Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China; 2.School of Pharmacy, Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China; 3.Guizhou Yibai Pharmaceutical Co., Ltd., Guiyang 550008, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To investigate the protective effect of Miao medicine Liqi huoxue dropping pills on myocardial ischemia-reperfusion injury (MIRI) model rats. METHODS: 60 rats were randomized into sham operation group, model group, simvastatin group (positive control, 40 mg/kg) and Liqi huoxue dropping pills low-dose, medium-dose and high-dose groups (43.75, 87.50, 175.00 mg/kg), with 10 rats in each group. Treatment groups were given relevant medicine intragastrically once a day for 10 days. Sham operation group and model group were given constant volume of normal saline intragastrically. 45 min after last administration, MIRI model was induced in those groups except for sham operation group. The situation of cardiac arrhythmia in rats was monitored after reperfusion. The myocardium tissue morphology was observed by hematoxylin-eosin (HE) staining; the activity of myocardial [creatinase (CK) and lactate dehydrogenase (LDH)] in serum were measured by enzyme dynamics method; the contents of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-6 (IL-6) in serum were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). RESULTS: Compared with sham operation group, rats in model group suffered from more serious arrhythmia and myocardial tissue damaged, and the activities of CK and LDH and the contents of TNF- $\alpha$  and IL-6 were increased significantly ( $P < 0.01$ ). Compared with model group, arrhythmia degrees of rats were decreased in simvastatin group and Liqi huoxue dropping pills medium-dose and high-dose groups, and pathological changes of myocardial tissue was improved, while the activities of CK and LDH and the contents of TNF- $\alpha$  and IL-6 in serum were decreased significantly ( $P < 0.01$ ); those indexes of Liqi huoxue dropping pills high-dose group were close to those of simvastatin group ( $P > 0.05$ ). CONCLUSIONS: Liqi huoxue dropping pills have

<sup>△</sup> 基金项目:贵阳中医学院博士科研项目启动基金(No.中医研[2015]017);贵阳中医学院中西医结合基础学科资助项目(No.黔学位合字ZDXK[2016]25号)

\* 讲师, 博士。研究方向:中药防治心血管疾病。E-mail: lyfengcxy2010@163.com

# 通信作者:教授, 硕士生导师。研究方向:中药、民族药新制剂与新剂型开发。电话:0851-5652056。E-mail: zgygpg@sohu.com

the protective effect on MIRI model rats, and its mechanism may be related to decreasing myocardial enzyme leaking of cardiac muscle cell, decreasing the serum contents of TNF- $\alpha$  and IL-6 and inhibiting the inflammatory injury.

**KEYWORDS** Miao medicine; Liqi huoxue dropping pills; Myocardial ischemia-reperfusion injury; Myocardial enzyme; Tumor necrosis factor- $\alpha$ ; Interleukin-6; Rats

对急性心肌梗死患者采用再灌注治疗是改善心肌缺血的有效办法,然而随着血流的畅通,部分患者在再灌注后会出现室性早搏、室性心动过速和室颤等现象,甚至发生死亡,即发生了心肌缺血再灌注损伤(Myocardial ischemia-reperfusion injury, MIRI)<sup>[1]</sup>。治疗 MIRI 的药物主要有他汀类、血管紧张素转化酶抑制剂、血管紧张素 II 受体拮抗药、硝酸酯类等,但常引起不同程度的副作用<sup>[2]</sup>。中药因具有毒副作用小,多靶点、多环节作用的优点,备受国内、外医学研究者青睐<sup>[3]</sup>。

理气活血滴丸是贵州益佰制药股份有限公司生产的新药,是根据贵州苗族民间验方和传统中医药理论研制而成,组方包括苗药米槁精油(又名大果木姜子油)、薤白、川芎、艾片等药材,具有温阳宽胸、理气活血的功效,临床试验证明其治疗冠心病、心绞痛等疗效较好<sup>[4]</sup>,但是其具体作用机制尚不清楚。故本研究通过建立大鼠 MIRI 模型,通过观察大鼠心律失常情况,心肌组织形态学变化,血清中心肌酶[肌酸激酶(CK)、乳酸脱氢酶(LDH)]活性及炎性细胞因子[肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和白细胞介素 6(IL-6)]含量的变化,探讨其对 MIRI 模型大鼠的保护作用机制。

## 1 材料

### 1.1 仪器

BL-420F 生物机能实验系统、HX-101E 动物呼吸机(成都泰盟科技有限公司);BX53 显微镜(日本奥林巴斯有限公司);GLAMOUR 1600 全自动生化分析仪(美国贝克曼库尔特有限公司)。

### 1.2 药品与试剂

理气活血滴丸(贵州益佰制药股份有限公司,批号:20140802,规格:25 mg/丸);辛伐他汀片(杭州默沙东制药有限公司,批号:141107,规格:20 mg/片);CK、LDH 测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:20151003、20151011);大鼠 TNF- $\alpha$ 、IL-6 酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(深圳欣博盛生物科技有限公司,批号:20151110、20151104)。

### 1.3 动物

健康 SD 大鼠 60 只,♂,体质量 250~280 g,购自长沙天勤生物技术有限公司[动物生产许可证号:SCXK(湘)2014-0010]。

## 2 方法

### 2.1 分组与给药

将 60 只 SD 大鼠适应性饲养 1 周后随机分为 6 组,每组 10 只,分别为假手术组、模型组、辛伐他汀组(阳性对照组,40 mg/kg,剂量根据参考文献[5]和预实验结果设定)和理气活血滴丸低、中、高剂量组[43.75、87.50、175.00 mg/kg,分别根据人临床用量的 3.5、7、14 倍剂量换算而得]。各给药组大鼠均按 1 mL/100 g ig 给药(溶剂

均为生理盐水),每天 1 次,连续 10 d;假手术组和模型组大鼠 ig 等体积生理盐水。

### 2.2 MIRI 大鼠模型的建立

大鼠术前禁食、禁水 12 h,末次给药 45 min 后,ip 25% 乌拉坦麻醉,仰卧固定于手术台上。做气管插管,连接动物呼吸机(频率为 80~90 次/min,潮气量为 2 mL/100 g,呼、吸比为 3:2)。接肢体导联线,连接生物机能实验系统,记录 II 导联心电图。将左胸部备皮、消毒,在第三、第四肋骨间剪开胸膛,打开心包,暴露心脏,造模组(除假手术组外的其余组)大鼠用 5 号缝合丝线结扎左冠状动脉前降支中上部位,假手术组大鼠只穿线不结扎,然后将心脏送回胸腔。以左室前壁呈紫绀或蓝紫色及同步心电图显示 QRS 波幅度升高、ST 段抬高为结扎成功标志。结扎 30 min 后,松开丝线,复灌 60 min,建立 MIRI 大鼠模型<sup>[6]</sup>。

### 2.3 心律失常评价

给大鼠接肢体导联线,连接生物机能实验系统,监测大鼠体表 II 导联心电图,记录再灌注 20 min 后室性早搏、室性心动过速及室颤情况。参照 Ravingerova T 等<sup>[7]</sup>的方法进行室性心律失常(Ventricular arrhythmia, VA)评分,评分标准见表 1。

表 1 心律失常评分标准

Tab 1 Criteria for arrhythmia score

VA 评分	VA 类型
0	无 VA 或有,但小于 5 次的室性早搏
1	仅有大于 5 次的室性早搏
2	仅有一阵小于 60 s 的室性心动过速
3	有一阵大于 60 s 的或多阵累计小于 60 s 的室性心动过速
4	多阵累积大于 60 s 的室性心动过速
5	出现室颤
6	出现持续 5 min 以上的室颤或死亡

### 2.4 标本取材

再灌注 60 min 后,大鼠腹主动脉取血,置于采血管中,以 4 ℃、2 500 r/min(离心半径为 13.5 cm)离心 15 min,无菌分离血清,-20 ℃保存,待测。然后摘取心脏,用生理盐水洗净血渍,切取左心室,用滤纸吸干,置于 4% 多聚甲醛溶液中固定,待测。

### 2.5 心脏组织病理观察

取出置于固定液中的心脏,流水冲洗,然后纵向切取心肌组织,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,常规石蜡包埋、切片(厚度为 6  $\mu$ m),行苏木精-伊红(HE)染色后显微镜下观察大鼠心脏组织病理变化。

### 2.6 生化指标检测

取血清,冰上融化后,采用酶动力学法检测血清中 CK、LDH 活性;采用 ELISA 双抗体夹心法检测血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 含量。试验操作均按照试剂盒说明书进行。

### 2.7 统计学方法

采用 SPSS 15.0 软件进行统计学分析。计量资料用



$\bar{x} \pm s$  表示。对实验数据进行正态性和方差齐性检验,符合正态分布和方差齐性检验者采用单因素方差分析;不符合正态分布和方差不齐者采用非参数秩和检验。检验水准 $\alpha=0.05, P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 理气活血滴丸对MIRI模型大鼠心律失常的影响

与假手术组比较,模型组大鼠发生心律失常时间较早、持续时间长,频繁发生室性早搏、室性心动过速和室颤,且有1只大鼠死亡,这表明模型组大鼠心律失常程度较高。与模型组比较,理气活血滴丸低剂量组大鼠心律失常现象未见明显改善;理气活血滴丸中、高剂量组和辛伐他汀组大鼠心律失常程度显著减轻,以室性早搏和室性心动过速为主,且理气活血滴丸对大鼠心律失常的改善作用呈剂量依赖性,结果见表2。

表2 各组大鼠室性心律失常评分结果

Tab 2 Results of ventricular arrhythmias score of rats in each group

组别	各鼠室性心律失常评分										平均秩次
假手术组	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5.50
模型组	3	6	5	4	4	6	4	5	5	5	48.70
辛伐他汀组	4	2	2	3	3	2	2	2	3	2	23.00
理气活血滴丸低剂量组	3	4	4	5	5	6	4	5	5	4	47.05
理气活血滴丸中剂量组	2	3	4	3	3	3	4	5	4	3	34.45
理气活血滴丸高剂量组	2	3	2	4	2	3	2	3	3	2	24.30

注: $\chi^2=45.617, P<0.05$

Note: $\chi^2=45.617, P<0.05$

#### 3.2 理气活血滴丸对MIRI模型大鼠心肌组织形态学变化的影响

假手术组大鼠心肌细胞结构完整,肌纤维排列整齐,细胞核形态正常,心肌细胞无水肿;模型组大鼠心肌组织结构损坏严重,出现坏死现象,肌纤维排列紊乱、发生肿胀或断裂,胞浆空泡状改变,细胞核有固缩现象,有炎症细胞浸润。与模型组比较,理气活血滴丸低剂量组大鼠心肌组织病理学无明显改善;理气活血中剂量组大鼠心肌细胞结构稍显正常,肌纤维排列稍整齐,胞浆轻度肿胀,无核固缩现象;理气活血高剂量组和辛伐他汀组大鼠心肌细胞结构完整,肌纤维排列整齐,细胞无肿胀、无核固缩、无炎症细胞浸润等现象,病理变化得到明显改善。以上结果也表明,理气活血滴丸对MIRI模型大鼠心肌组织病理学改变的改善作用具有剂量依赖性,结果见图1。

#### 3.3 理气活血滴丸对MIRI模型大鼠血清中CK、LDH活性的影响

与假手术组比较,模型组大鼠血清中CK、LDH活性显著升高( $P<0.01$ )。与模型组比较,除理气活血滴丸低剂量组大鼠血清中CK、LDH活性降低不显著外,其余各给药组大鼠血清中CK、LDH活性均显著降低( $P<0.01$ ),且理气活血滴丸降低血清中CK、LDH活性的作

用具有剂量依赖性,结果见表3。

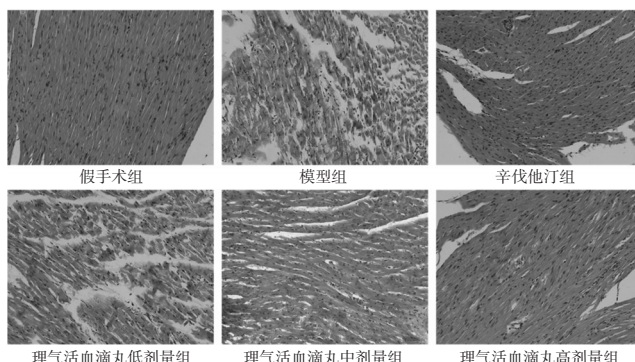


图1 各组大鼠心肌组织形态学观察结果(HE, ×200)

Fig 1 The morphological observation result in myocardial tissue of rats in each group(HE, ×200)

表3 各组大鼠血清中CK、LDH活性及TNF- $\alpha$ 、IL-6含量测定结果( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Tab 3 The activities of CK and LDH and the contents of TNF- $\alpha$  and IL-6 in serum of rats in each group( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	CK, U/L	LDH, U/L	TNF- $\alpha$ , pg/mL	IL-6, pg/mL
假手术组	284.84 ± 20.01	2 588.35 ± 201.19	46.56 ± 2.47	61.75 ± 4.72
模型组	534.62 ± 25.63**	3 874.86 ± 213.73**	180.84 ± 1.73*	230.49 ± 3.61**
辛伐他汀组	367.20 ± 18.59**	2 931.49 ± 230.01**	68.32 ± 3.50**	99.32 ± 5.03**
理气活血滴丸低剂量组	510.39 ± 29.32	3 701.52 ± 208.62	162.78 ± 2.83	218.80 ± 3.42
理气活血滴丸中剂量组	400.72 ± 21.28**	3 125.65 ± 230.31**	80.21 ± 2.20**	124.02 ± 3.79**
理气活血滴丸高剂量组	380.16 ± 19.93**	2 986.26 ± 205.21**	67.45 ± 1.86**	95.69 ± 4.52**

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

Note: vs. sham operation group, \*\* $P<0.01$ ; vs. model group, \*\* $P<0.01$

0.01

#### 3.4 理气活血滴丸对MIRI模型大鼠血清中TNF- $\alpha$ 、IL-6含量的影响

与假手术组比较,模型组大鼠血清中TNF- $\alpha$ 、IL-6含量显著升高( $P<0.01$ )。与模型组比较,各给药组大鼠血清中TNF- $\alpha$ 、IL-6含量均有所降低,除理气活血滴丸低剂量组外差异均有统计学意义( $P<0.01$ ),且理气活血滴丸降低血清中TNF- $\alpha$ 、IL-6含量的作用具有剂量依赖性,结果见表3。

### 4 讨论

急性心肌梗死是临床上常见的危重病症之一,进行再灌注治疗可明显降低其病死率。然而潜在的再灌注期心肌细胞损伤、凋亡、坏死是影响其预后的主要因素,且其发生机制也比较复杂。大量研究表明, MIRI的原因主要有活性氧增多、钙超载、炎症损伤和细胞凋亡等<sup>[8-11]</sup>。辛伐他汀不仅能有效降脂,而且具有抗氧化、抑制炎症反应和抗心肌细胞凋亡等作用,可从多层次、多靶点防治MIRI<sup>[12-13,5]</sup>,因此在本研究中以其为阳性对照药。

再灌注期心肌细胞受到严重损伤,细胞膜通透性增加,心肌酶(如CK、LDH等)漏出血。因此,监测心律失常严重情况及血清中CK、LDH活性水平是反映心肌

细胞损伤程度的重要指标。本实验结果发现,心肌缺血再灌注期大鼠心律失常程度较高,血清中CK、LDH活性升高,说明建模成功。理气活血滴丸预处理后能降低再灌注时心律失常的严重程度,提示该药有效地改善了心肌组织的功能。且理气活血滴丸预处理后降低了MIRI大鼠血清中CK、LDH活性,提示该药能有效减少心肌细胞心肌酶CK和LDH的漏出,保护了心肌细胞膜的完整性,减轻了心肌细胞损伤。

另外,研究表明再灌注期TNF- $\alpha$ 、IL-6的合成和释放量会增加,两者在血清中的含量与心肌细胞损伤程度有一定相关性<sup>[14-15]</sup>。TNF- $\alpha$ 是一种具有多种生物效应的细胞因子,参与多种组织再灌注损伤。TNF- $\alpha$ 是在机体处于应激状态下,由单核细胞、巨噬细胞以及内皮细胞等产生的,能激活一系列级联反应,诱导中性粒细胞和血管内皮细胞表达表面黏附因子,促使中性粒细胞聚集在缺血区,加重缺血缺氧程度,释放多种促炎性因子,同时也促进活性氧产生,加重再灌注期心肌组织的损伤<sup>[16]</sup>。IL-6处于炎症反应的枢纽位置,可促使中性粒细胞流入缺血心肌组织,诱导中性粒细胞与心肌细胞结合,损伤心肌<sup>[17]</sup>。本实验结果表明,理气活血滴丸预处理后能显著降低大鼠血清中TNF- $\alpha$ 和IL-6含量,说明该药减少了TNF- $\alpha$ 和IL-6的表达,抑制了中性粒细胞聚集。另外,组织病理学实验也表明理气活血滴丸预处理能改善心肌组织结构,减轻心肌细胞细胞质的肿胀程度,减轻心肌细胞的炎性损伤,且具有剂量依赖性。

综上所述,理气活血滴丸对心肌缺血再灌注损伤具有保护作用,能改善心肌组织病理学变化,减少心肌细胞心肌酶CK、LDH的漏出,降低血清中TNF- $\alpha$ 和IL-6含量。这提示其对MIRI的防治作用可能与抗炎性损伤有关,但其具体作用机制有待进一步探究。

## 参考文献

- [1] Jennings RB. Historical perspective on the pathology of myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. *Circ Research*, 2013, 113(4):428-438.
- [2] 朱中玉,高传玉,陈岩,等.经皮冠状动脉介入治疗术后患者对二级预防的依从性及其与长期预后的关系[J]. *中国综合临床*, 2008, 24(6):550-553.
- [3] 李伟,沈明勤,陆晓晖.中药防治心肌缺血再灌注损伤作用机制的研究进展[J]. *中华中医药杂志*, 2011, 26(3):549-553.
- [4] 孙刚,周琦.理气活血滴丸治疗冠心病心绞痛临床疗效[J]. *临床合理用药杂志*, 2016, 9(3):141-142.
- [5] 廖小龙,王首红,王中华,等.辛伐他汀对老年小鼠心肌缺血再灌注时氧化应激及细胞凋亡的影响[J]. *中国药房*, 2016, 27(19):2626-2629.
- [6] 邓宇珺,符永恒,谭宁,等.大鼠活体心肌缺血再灌注损伤模型的建立与综合评估[J]. *中国病理生理杂志*, 2011, 27(2):412-416.
- [7] Ravingerova T, Tribulova N, Slezak J, et al. Brief, intermediate and prolonged ischemia in the isolated crystalloid perfused rat heart: relationship between susceptibility to arrhythmias and degree of ultrastructural injury[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1995, 27(9):1937-1951.
- [8] Sanada S. Myocardial ischemia-reperfusion injury: major pathobiology and putative cardioprotection[J]. *J Jpn Soc For Clin Anesth*, 2010, 30(1):40-51.
- [9] Kawaguchi M, Takahashi M, Hata T, et al. Inflammatory activation of cardiac fibroblasts is essential for myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. *Circulation*, 2011, 123(6):594-604.
- [10] Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target[J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(1):92-100.
- [11] Christiane, Neuhof, Heinz, et al. Calpain system and its involvement in myocardial ischemia and reperfusion injury[J]. *World J Cardiol*, 2014, 6(7):638-652.
- [12] Ankur R, Gurfateh S, Khan MU, et al. Amelioration of myocardial ischemia reperfusion injury by simvastatin in rats[J]. *IRJP*, 2011, 2(10):51-55.
- [13] Hadi NR, Alamran F, Yousif M, et al. Antiapoptotic effect of simvastatin ameliorates myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. *ISRN Pharmacol*, 2013, doi: 10.1155/2013/815094.
- [14] Jia P, Wang J, Wang L, et al. TNF- $\alpha$  upregulates Fgl2 expression in rat myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. *Microcirculation*, 2013, 20(6):524-533.
- [15] McGinnis GR, Ballmann C, Peters B, et al. Interleukin-6 mediates exercise preconditioning against myocardial ischemia reperfusion injury[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2015, 308(11):1423-1433.
- [16] Wang C, Sun H, Song Y, et al. Pterostilbene attenuates inflammation in rat heart subjected to ischemia-reperfusion: role of TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(2):1737-1746.
- [17] Zhao XJ, Liu XL, He GX, et al. Effects of single-dose atorvastatin on interleukin-6, interferon gamma, and myocardial no-reflow in a rabbit model of acute myocardial infarction and reperfusion[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2014, 47(3):245-251.

(收稿日期:2016-08-30 修回日期:2016-10-30)

(编辑:林静)