

# 参麦对大鼠急性心肌缺血血管内皮生长因子表达的影响

陈红英<sup>1</sup> 李贤玉<sup>2</sup> 王文杰<sup>1</sup> 彭吉霞<sup>2</sup>

(1 十堰市太和医院(附属湖北医药学院)骨 2 科,湖北,442000; 2 湖北医药学院机能实验室,湖北,442000)

**摘要** 目的:观察参麦对大鼠急性心肌缺血血管内皮生长因子表达的影响,探讨其作用机制。方法:大鼠 40 只,采用结扎左侧冠状动脉前降支 30 min 后松解扎扣再灌注 60 min,反复 3 次以造成心肌缺血再灌注损伤模型,并随机分为对照组、模型组、美托洛尔组及参麦小大剂量组。五组大鼠均经腹腔注射给药,于治疗前及 30 d 后分别采用反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)和免疫组织化学检测心肌 VEGF 和缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ ) HIF-1 $\alpha$  表达情况、受体胎肝激酶 1(FLK-1),籍此考察参麦对大鼠急性心肌缺血血管内皮生长因子表达的影响。结果:参麦明显增高 VEGF 蛋白质及 mRNA、HIF-1 $\alpha$ 、FLK-1 的表达,缩小心肌缺血面积,与模型组比较( $P < 0.05$ ),差异均有统计学意义,参麦小、大剂量组间差异无统计学意义。结论:参麦可减轻大鼠急性心肌缺血缺氧性损伤和血管内皮炎症反应程度,其作用机制可能是其促进大鼠缺血心肌血管内皮再生有关,对改善再灌注损伤血管内皮功能紊乱有一定的防治作用。

**关键词** 大鼠急性心肌缺血;参麦;血管内皮生长因子;缺氧诱导因子-1;受体胎肝激酶-1

## Effect of Shenmai on the Expressions of Myocardial Vascular Endothelial Growth Factors in Rats with Acute Myocardial Ischemia

Chen Hongying<sup>1</sup>, Li Xianyu<sup>2</sup>, Wang Wenjie<sup>1</sup>, Peng Jixia<sup>2</sup>

(1 Taihe Hospital Affiliated to Hubei University of Medicine; 2 Mechanism Laboratory, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China)

**Abstract Objective:** To observe the effect of Shenmai on expressions of myocardial vascular endothelial growth factors in rats with acute myocardial ischemia, and explore its mechanism. **Methods:** 40 rats received ligation of left anterior descending coronary artery. 30 minutes later, release buckles reperfusion for 60 min to cause myocardial ischemia reperfusion injury model. The rats were then randomly divided into control group, model group, positive drug metoprolol group and Shenmai small dose, and Shenmai large dose group. Five groups of rats were treated with intraperitoneal injection, before treatment and 30 days respectively by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunohistochemical detection of myocardial VEGF and hypoxia inducible factor -1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) HIF-1 $\alpha$  expression, receptor in fetal liver kinase 1 (FLK-1), the study of acute effect of nationality myocardial ischemic myocardium in rats of vascular endothelial growth factor expression. **Results:** Shenmai injection significantly increased the expression of VEGF protein and mRNA, HIF-1 $\alpha$ , FLK-1, reduce the myocardial ischemic area, compared with the model group ( $P < 0.05$ ), the difference was statistically significant, no significant difference in small, large dose Shenmai group. **Conclusion:** Shenmai injection can reduce the rat model of acute myocardial ischemia and hypoxia injury and vascular endothelial inflammatory reaction. Its mechanism may be related to the vascular endothelial regeneration in rats with myocardial ischemia reperfusion injury. It helps to improve the prevention of vascular endothelial dysfunction.

**Key Words** Acute myocardial ischemia of rats; Shenmai injection; Vascular endothelial growth factor; Hypoxia inducible factor-1 receptor in fetal liver kinase-1

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2015.09.025

血管内皮生长因子(Vascular Endothelial Growthfactor, VEGF)具有增加微、小静脉血管的通透性、促使血管内皮细胞分裂增殖及诱导血管生成再生等作用<sup>[1]</sup>。VEGF 对急性缺血区侧枝循环的建立及改善缺血心肌血流量具有特异性,已有实验证实其对实验性急性心肌梗死有明显疗效<sup>[2]</sup>。在心肌梗

死、冠脉搭桥术、再通术等疾病及手术时常伴随心肌缺血再灌注损伤<sup>[3]</sup>,参麦常用于治疗此类疾病,由于其对大鼠缺血心肌血管内皮再生的影响及其机制鲜有临床及实验报道,故本实验制备大鼠心肌缺血再灌注损伤模型,系统观察了其对心肌血管内皮生长因子表达的影响,为其临床应用提供实验及理论依

据。

## 1 材料与方法

1.1 实验动物 SD 大鼠 40 只, 体质量(200 ± 20) g, 实验动物由湖北医药学院实验动物中心提供, 实验动物设施使用许可证 SYXK(鄂)2011-0031, 实验动物生产许可证 SCXK(鄂)2011-0008。选取 40 只健康大鼠, 采用随机数字表编号随机分为对照组、模型组、美托洛尔组及参麦小、大剂量组。

1.2 仪器及药品 参麦注射液(杭州正大青春宝药业有限公司, 10 mL/支, 国药准字 Z330220021, 批号: 010873); VEGF、FLK-1 试剂盒(武汉博士德生物工程技术有限公司); HIF-1(北京博奥生生物技术公司); 提取 mRNA 试剂及反转录试剂(美国 Invitrogen 公司)。

1.3 大鼠心肌缺血动物模型制备 参照文献<sup>[4]</sup>, 所有动物在造模前夜停止喂食, 不禁水, 采用腹腔注射 2% 戊巴比妥钠(120 mg/kg) 方法将已分组的大鼠麻醉, 仰卧位固定于手术台, 接 II 导联心电图及小动物呼吸机, 于胸骨左缘第 4~5 肋间隙开胸暴露心脏, 术中保持胸膜完整, 以丝线距心脏根部 0.2 cm 处结扎左冠状动脉前降支 30 min 后松解扎扣复灌 60 min, 反复 3 次后抽出丝线关闭胸腔, 所有动物以结扎后局部心肌颜色变浅, 心电图 II 导联 ST 段抬高并(或)出现心律失常为造模成功标准。对照组仅开胸但不结扎左冠状动脉前降支造模。对照组及模型组术后腹腔注射 0.9% 氯化钠注射液 4 mL/(kg·d) (按此剂量连续给药 2 周)。阳性药美托洛尔组(50 mg/(kg·d)) 腹腔注射, 参麦大剂量组再灌注腹腔注射参麦 4 mL/(kg·d)、参麦小剂量组 2 mL/(kg·d) [按成人体表面积换算: 大鼠(200 g)/人(70 kg) = 0.018/1; 按此剂量连续治疗 30 d]。

1.4 检测指标 参照文献<sup>[5]</sup>, 取对照组及模型组大鼠各 8 只断头处死取心, 取出心肌组织在液氮中暂存后转移至 -70 °C 低温冰箱保存, 以备 VEGF 蛋白分析。取出心肌组织冰水浴下机械匀浆 1 500 r/min 离心后心肌组织液, 30 d 后同上步骤分别断头处死美托洛尔组及参麦大小剂量组取心研磨 2 000 r/min 离心后心肌组织液, 严格按 SP 试剂盒说明操作, 采用反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)和免疫组织化学检测心肌 VEGF、VEGFmRNA、HIF-1α、HIF-1αmRNA、FLK-1 表达。

1.5 组织学检查及心肌梗死范围 模型组及参麦 2 组大鼠于治疗 30 d 后断头处死, 迅速取心后滤纸吸干称重, 20 °C 冰冻 30 min, 冠状面均匀切成 2 mm

组织切片, 37 °C 的 1% TTC 避光染色 30 min 后用 4% 多聚甲醛固定。由于梗死区着色加深, 精确剥离梗死部位, 精密电子天平精确称量并记录重量, 计算梗死范围[梗死率(%) = (梗死部位质量/脑总质量) × 100%]。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 15.0 软件进行统计处理, 实验数据以表示, 组间比较采用 Dunnett 检验对计数资料进行检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义<sup>[6]</sup>。

## 2 结果

2.1 参麦注射液对心肌缺血再灌注大鼠心肌组织学形态学及梗死范围的影响 在治疗 30 d 后, 对照组心肌组织病理图片显示着色均匀, 平滑肌排列整齐, 无坏死溶解现象; 模型组梗死区着色加深, 其平滑肌细胞排列紊乱且有部分溶合, 缺血区出现大量坏死灶; 参麦大小两剂量组组织形态学观察类似, 梗死区着色加深, 但比模型组浅, 梗死区域明显减少, 仅见少量坏死灶, 梗死区仅有少量平滑肌细胞溶合, 平滑肌细胞排列紊乱但明显好于模型组, 参麦大小两剂量组梗死范围为(11.02 ± 0.23, 10.04 ± 0.31) 明显低于模型组, 与模型组比较,  $P < 0.05$ , 差异有统计学意义, 提示参麦具有扩张微动脉减少心肌梗死范围的作用。见表 1。

2.2 参麦注射液对大鼠心肌 VEGF、VEGFmRNA 表达的影响 如表 2, 模型组在 30 d 后 VEGF、VEGFmRNA 表达明显升高, 与对照组比较,  $P < 0.05$ , 差异有统计学意义, 提示缺血、缺氧是促进 VEGF 分泌的最主要因素, 此时心肌损伤严重。美托洛尔组大鼠心肌 VEGF、VEGFmRNA 明显增高, 与对照组及模型组比较,  $P < 0.05$ , 差异有统计学意义。参麦大小剂量组均呈升高趋势, 与对照组及模型组比较,  $P < 0.05$ , 差异有统计学意义, 但大小剂量组无统计学意义。说明参麦注射液有与美托洛尔类似的提高 VEGF、VEGFmRNA 的作用。

2.3 参麦注射液对大鼠 HIF-1α、HIF-1αmRNA 表达的影响 见表 2, 参麦大小剂量组 HIF-1α、HIF-1αmRNA 均有上升, 与对照组及模型组比较,  $P < 0.05$ , 差异有统计学意义, 但大小剂量组无统计学意义。说明参麦注射液有与美托洛尔类似的提高 HIF-1α、HIF-1αmRNA 的作用。

2.4 参麦注射液对大鼠 FLK-1、FLK-1mRNA 表达的影响 参麦大小剂量组均有上升, 与对照组及模型组比较,  $P < 0.05$ , 差异有统计学意义, 但大小剂量组无统计学意义。见表 2。

表1 大鼠心肌缺血梗死范围( $n=8, \bar{x} \pm s$ )

组别	坏死区(g)	非坏死区(g)	心肌总质量(g)	梗死范围(%)
模型组	0.23 ± 0.04	0.81 ± 0.05	1.11 ± 0.05	20.72 ± 0.57
参麦小剂量组	0.12 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.99 ± 0.08 <sup>b</sup>	1.09 ± 0.04	11.02 ± 0.23 <sup>b</sup>
参麦大剂量组	0.11 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.10 ± 0.09 <sup>b</sup>	1.10 ± 0.09	10.04 ± 0.31 <sup>b</sup>

注:与模型组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

表2 参麦注射液对心肌梗死大鼠血管内皮 VEGF 各指标的影响( $n=8, \bar{x} \pm s$ )

组别	对照组		模型组		美托洛尔组		参麦大剂量组		参麦小剂量组	
	给药前	给药后 30 d	给药前	给药后 30 d	给药前	给药后 30 d	给药前	给药后 30 d	给药前	给药后 30 d
VEGF(PU)	4.33 ± 0.54	4.51 ± 0.32	4.33 ± 0.54	5.51 ± 0.32 <sup>a</sup>	4.40 ± 0.67	8.87 ± 1.05 <sup>ab</sup>	4.39 ± 0.57	6.44 ± 0.85 <sup>ab</sup>	4.51 ± 0.73	6.58 ± 1.11 <sup>ab</sup>
VEGFmRNA	0.52 ± 0.01	0.47 ± 0.01	0.52 ± 0.01	0.69 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.53 ± 0.01	0.92 ± 0.02 <sup>ab</sup>	0.51 ± 0.03	0.75 ± 0.05 <sup>ab</sup>	0.52 ± 0.02	0.77 ± 0.05 <sup>ab</sup>
HIF-1a(PU)	5.39 ± 0.76	5.43 ± 0.72	5.39 ± 0.76	6.43 ± 0.72 <sup>a</sup>	5.40 ± 0.39	11.47 ± 2.21 <sup>ab</sup>	5.62 ± 0.72	8.47 ± 0.93 <sup>ab</sup>	5.67 ± 0.73	8.36 ± 1.07 <sup>ab</sup>
HIF-1amRNA	0.46 ± 0.06	0.45 ± 0.05	0.48 ± 0.06	0.57 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.46 ± 0.06	0.94 ± 0.03 <sup>ab</sup>	0.46 ± 0.06	0.55 ± 0.05	0.46 ± 0.06	0.62 ± 0.06 <sup>ab</sup>
FLK-1(PU)	4.33 ± 0.54	4.51 ± 0.32	4.33 ± 0.54	5.99 ± 0.27 <sup>a</sup>	4.40 ± 0.67	8.87 ± 1.05 <sup>ab</sup>	4.39 ± 0.57	6.44 ± 0.85 <sup>ab</sup>	4.51 ± 0.73	6.58 ± 1.11 <sup>ab</sup>
FLK-1mRNA	4.33 ± 0.54	4.51 ± 0.32	4.38 ± 0.54	5.51 ± 0.39 <sup>a</sup>	4.40 ± 0.67	8.87 ± 1.05 <sup>ab</sup>	4.39 ± 0.57	6.44 ± 0.85 <sup>ab</sup>	4.51 ± 0.73	6.58 ± 1.11 <sup>ab</sup>

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

### 3 讨论

近年来心肌缺血再灌注损伤的防治已取得了明确的成果,大量中草药被应用到临床防治缺血再灌注损伤,其中参麦注射液在临床上大量应用并取得可靠疗效,其主要有效成分为人参皂苷、麦冬皂苷等<sup>[7-8]</sup>。通过调节血小板源生长因子(PDGF)、显著增加 Bcl-2 基因表达、减少 c-fos 基因的表达及细胞凋亡数,增加 VEGF 以促进血管内皮增生重建等<sup>[9-10]</sup>。现已广反泛应用于临床治疗心脑血管栓塞及缺血再灌注类疾病并取得了良好的疗效。

正常情况下,氧自由基的生成与清除维持着动态平衡,血管内皮保持其完整性,但当缺血再灌注损伤时机体会产生大量的氧自由基,且机体清除氧自由基能力下降,血管内皮细胞受损严重<sup>[11]</sup>。美托洛尔具有促进 VEGF 分泌及缺血心肌血管新生,减慢心率、抑制心肌收缩力、降低心肌耗氧量等作用,常用于治疗冠心病<sup>[12]</sup>,故在本研究中作为阳性药对比。VEGF 是一种高度特异性的促血管生长因子,王骏等<sup>[13]</sup>实验结果证实 VEGF 参与冠状动脉侧支循环形成的调节,VEGF 的高低常作为血管内皮功能及冠状动脉侧支循环建立情况的重要指标。本实验结果显示,模型组大鼠在造成心肌缺血再灌注损伤后心肌 VEGF、VEGFmRNA、HIF-1a、HIF-1amRNA、FLK-1 表达均有不同程度升高,血管内皮严重受损,提示缺血、缺氧是促进 VEGF 分泌的最主要因素。在应用参麦注射液后,参麦注射液大小剂量组心肌 VEGF、VEGFmRNA、HIF-1a、HIF-1amRNA、FLK-1 表达均有不同程度的升高,说明参麦注射液具有促进 VEGF 的分泌、诱导缺血心肌的血管再生,促进受损血管内皮修复的功能<sup>[14]</sup>。这可能与参麦注射液促

进  $Ca^{2+}$ -ATP 酶活性恢复,增强钠钾 ATP 酶活力,减少细胞内钙超载,并通过钠钾 ATP 酶调节钠氢交换来抑制钠钙交换,阻止  $Ca^{2+}$  内流,改善心肌组织能量代谢<sup>[15]</sup>,活血化瘀,改善微循环,增加冠脉灌注和心肌供氧,进而改善心肌缺血而起到保护作用有关。由于参麦注射液具有改善心肌组织的能量代谢,改善病灶缺血、水肿,促进细胞功能恢复,减轻缺血再灌注后组织损伤,这与刁玉晶<sup>[16]</sup>增加血供,扩张微动脉进而减少了其梗死面积而对组织起到保护作用相一致。

缺血再灌注后的临床症状和预后有赖于心脏冠状动脉侧支循环重建,因此,积极寻找具有促进缺血心肌血管新生的临床常用药物对缺血性心脏病治疗具有实用价值。侧支循环的形成和开放能够减轻心肌缺血,防止心肌细胞坏死,预防和延缓缺血性心脏病的形成,改善患者的症状。本实验证实参麦注具有增加血管内皮 VEGF 分泌的作用,但缺血再灌注损伤机制是一个多因素参与的复杂过程,参麦注射液如何在各个环节发挥调节和干预并阻断其发生,还有待于深入研究。

#### 参考文献

- [1]尹瑞兴,冯建章,林秋雄,等.静脉应用血管内皮生长因子治疗急性心肌梗死的实验研究[J].中华心血管病杂志,2000,28(4):297-298.
- [2]孙熠瑛,徐鹏霄.血管内皮生长因子的研究和应用进展[J].解剖科学进展,2003,9(4):361-363.
- [3]刘剑刚,张大武,李婕,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.
- [4]李鑫辉,黄政德,葛金文,等.加味丹参饮对心肌 IRI 大鼠骨髓干细胞动员作用的影响[J].中西医结合心脑血管病杂志,2014,12

- (6):723-725.
- [5] Ozmen S, Ayhan S, Demir Y, et al. Impact of gradual blood flow increase on ischemia-reperfusion injury in the rat cremaster microcirculation model [J]. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 2008, 61(8): 939-948.
- [6] 李英, 陈德森, 李莉, 等. 阿托莫兰联合百令胶囊治疗糖尿病肾病合并高血压的临床研究[J]. *世界中医药*, 2014, 9(3): 311-312.
- [7] 曹旭东, 丁志山, 陈建真, 等. 参麦注射液药理及临床研究进展[J]. *中国中医药信息杂志*, 2010, 17(3): 104-106.
- [8] 李丽, 黄启福. 参麦注射液对大鼠急性心肌缺血再灌注损伤的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2003, 19(11): 1472-1475.
- [9] 俞锐敏, 熊爱华, 杨钦河, 等. 参麦注射液对大鼠急性心肌缺血及 e-NOS mRNA 表达的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2006, 22(6): 1083-1086.
- [10] 曹旭东, 丁志山, 陈建真, 等. 参麦注射液药理及临床研究进展[J]. *中国中医药信息杂志*, 2010, 17(3): 104-106.
- [11] 王艳蕾, 景友玲, 赵景霞, 等. 参麦注射液对肢体缺血/再灌注时肺脂质过氧化损伤的防护作用[J]. *中国应用生理学杂志*, 2006, 22(1): 3-15.
- [12] 张莉, 刘海燕. 通心络胶囊联合美托洛尔治疗冠心病心力衰竭 92 例[J]. *国际中医中药杂志*, 2014, 36(1): 57-58.
- [13] 王骏, 励建安, 金挺剑, 等. 心肌缺血日负荷对新西兰兔血管内皮生长因子表达的影响[J]. *中国康复医学杂志*, 2005, 20(3): 165-167.
- [14] 温晓亮, 朱秀燕, 张敏, 等. 参麦注射液对大鼠心肌缺血再灌注中一氧化氮、一氧化氮合酶和内皮素的影响[J]. *陕西中医*, 2009, 30(12): 1680-1681.
- [15] 贾凤玖, 姚卫华, 赵青山, 等. 参麦注射液和参麦注射液联合应用对急性心肌梗死患者肌钙蛋白 T 的影响[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2013, 11(11): 1385-1386.
- [16] 刁玉晶, 赵明, 蒋鹏, 等. 参麦注射液对心肌缺血再灌注损伤大鼠 PECAM-1 表达的影响[J]. *重庆医学*, 2010, 39(15): 1973-1974.

(2014-10-13 收稿 责任编辑: 张文婷)

## 《世界中医药杂志》英文刊获国际影响力提升计划项目资助

2015年6月11日,中国科协等部门联合组织的中国科技期刊国际影响力提升计划2015年D类项目评审结果出炉,由世界中医药学会联合会主办、《世界中医药》杂志社出版的《世界中医药杂志》英文刊(World Journal of Traditional Chinese Medicine, WJTCM)获得该项目资助。

为促进我国科技期刊国际化发展,提升英文科技期刊国际影响力与核心竞争能力,中国科协、教育部、国家新闻出版广电总局、中国科学院、中国工程院等部门共同实施中国科技期刊国际影响力提升计划。该计划D类项目的目标是创办一批代表我国前沿学科、优势学科,或能填补国内英文科技期刊学科空白的高水平英文科技期刊,引导期刊大幅度提升期刊学术引证指标,建立科学规范的编辑出版运行机制,提升管理效能,尽快进入SCI等国际知名检索系统,成为国际化科技期刊。

《世界中医药杂志》英文刊(ISSN 2311-8571,季刊)由世界中医药学会联合会(WFCMS)主办,是WFCMS、中医药规范化研究学会GP-TCM的官方

杂志。本刊采用国际标准化办刊工作流程及 ScholarOne 投审稿系统,以国际化的编委专家团队和中医药学科领域前沿学者作者群为支撑,经过严格的编审,刊登高质量的中医学术论文,全部论文在官方网站(www.wjtcn.org)优先出版,以供免费阅读和下载。内容涵盖中医药四个重点领域,聚焦于中医药具有代表性的研究方向,以现代医学语言对中医药学进行阐释,特色明确,收文范围明晰,旨在向全世界的医生和生物医药研究者介绍中医、中药、针灸的临床疗效、作用机理,为解决复杂性疾病和疑难病症提供新的思路、方法和措施。

投稿及论文发布:

您可登陆杂志 ScholarOne 投稿系统(<https://mc03.manuscriptcentral.com/wjtcn>)投递您的稿件,投稿指南请在上述网址的“Instruction & Forms”中或杂志官网 www.wjtcn.org 中查看。

WJTCM 所有文章已在官网(www.wjtcn.org)发布,PDF 电子版文件可供全球读者免费下载阅读使用。