

鹿茸液对慢性心衰大鼠心肌细胞凋亡和 I、III 型胶原表达的实验研究

宋业琳¹ 孙兰军² 赵英强² 徐强²

(1 山东省青岛海慈医疗集团, 山东省青岛市人民路 4 号, 266033; 2 天津中医药大学第二附属医院)

摘要 目的: 研究鹿茸液对慢性心衰大鼠心肌细胞凋亡和 I、III 型胶原表达的影响, 讨论鹿茸液治疗心衰的作用和机制。方法: 实验采用 SD 大鼠冠状结扎方法制备心梗后慢性心衰动物模型, 随机分为鹿茸液高、中、低剂量组、卡托普利组、模型组和空白组, 给予相应的药物干预, 4 周后观察心肌细胞凋亡, 心基质 I、III 型胶原的变化情况。结果: 鹿茸液各剂量组和卡托普利组 CHF 大鼠心肌细胞凋亡及 I、III 型胶原表达与模型组相比较低, 具有统计学差异 ($P < 0.05$), 鹿茸液中剂量组和卡托普利组之间无统计学差异 ($P > 0.05$), 均优于鹿茸液高剂量组和低剂量组 ($P < 0.05$), 鹿茸液高剂量组优于低剂量组 ($P < 0.05$)。结论: 鹿茸液能够减少 CHF 大鼠心肌细胞凋亡, 减少 I、III 型胶原沉淀, 从而抑制左室重构, 具有良好的临床研究前景。

关键词 慢性心衰 中医药疗法; @ 鹿茸液

Experimental Study on Impact of Hairy Antler Liquid on Apoptosis and Expression of I and III Type Collagen in Cardiac Myocytes of CHF

Song Yelin¹, Sun Lanjun², Zhao Yingqiang², Xu Qiang²

(1 Hainan Medical Group, Qingdao 266033; 2 Second Affiliated Hospital of Tianjin University of Chinese Medicine)

Abstract Objective To investigate the treatment effect and its mechanism of Hairy Antler Liquid on CHF by discovering its impact on apoptosis and expression of collagen and III collagen. **Methods** SD rats with chronic heart failure established by coronary artery ligation were randomly divided to high-dose Hairy Antler Liquid group, middle-dose group, low-dose group, Captopril group, model group and blank group. Intervened with relevant measures, and observed for apoptosis of cardiac myocytes, I collagen and III collagen in cardiac muscles. **Results** Compared with those of the model group, all indices of each treatment groups were significantly different ($P < 0.05$). Both being significantly better than other treatment groups in all indices ($P < 0.05$), middle-dose and Captopril group were not significantly different from each other ($P > 0.05$), while the high-dose group was better than low-dose group ($P < 0.05$). **Conclusion** Inhibiting left ventricular remodeling by reducing apoptosis of cardiac myocytes and expression of collagen and III collagen. Hairy Antler Liquid is of promising clinical application.

Key Words Chronic Heart Failure/ Chinese Medical Therapy; @ Hairy Antler Liquid

慢性心力衰竭 (Chronic Heart Failure, CHF) 是多种心血管疾病走向死亡的最后转归, 随着人口老龄化进程的加快, CHF 的发病率正逐年升高^[1], 加强对 CHF 的防治已成为心血管研究领域的热点。本实验根据对心衰的病机发展阶段“气阳两虚、心肾同病”的认识, 选取补益肾阳药物鹿茸, 从分子生物学角度深入探讨其对心衰的治疗作用和机制。

1 实验材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 雄性 SD 大鼠 130 只, 体重在 200 - 250g

1.1.2 实验药品 鹿茸液, 由中国航天载人中心提供, 汤液密封袋装, 每 100ml 含生药 50g, 4℃ 保存。卡托普利片 (天津飞鹰制药有限公司, 25mg/片)。

1.1.3 主要试剂 原位细胞凋亡检测试剂盒 TUNEL (POD), 编号 TBD2020POD; Collagen I 大鼠 mRNA 原位杂交 DIG 染色系统试剂盒, 编号 FISH2005CO; Collagen III 大鼠 mRNA 原位杂交 DIG 染色系统试剂盒, 编

号 FISH2005CP, 均购自天津灏洋生物试剂有限公司。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的制备 采用结扎大鼠冠状动脉前降支法, 造成心肌梗死后心衰的模型。以 1% 的戊巴比妥钠 40~60mg/kg 腹腔麻醉, 寻心尖搏动最明显处 (胸骨左缘 4~5 肋间) 向上约 1 个肋间, 沿肋骨走向作横切口, 层层分离暴露心脏, 用眼科直镊、直剪挑破心包膜。心脏随心跳向外跃, 卡住心脏将底面反转, 于左心耳下缘 3mm 处用 6/0 带针缝合线结扎冠状动脉前降支, 观察生理记录仪, 以心电图出现 ST 段弓背向上抬高为心肌梗死模型的成功标志。术后 3 周行超声心动检查, 以 EF 值降至 60% 以下或较前下降 30%, 为慢性心衰模型成功标志。

1.2.2 动物分组及给药 模型成功后开始给药。根据人和动物间按体表面积折算的等效剂量分别灌胃给药: 鹿茸液高剂量组给予鹿茸液 $5\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$; 中剂量组给予 $2.5\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$; 低剂量组给予 $1.25\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$; 卡托普利组给予卡托普利 $50\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$; 模型

组给予蒸馏水 $10\text{ml kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$; 空白组不进行药物干预, 常规饲养。

1.2.3 检测指标及方法 1) 心肌细胞凋亡采用 TUNEL 法检测。棕黄色或棕褐色细胞核为凋亡细胞, 蓝紫色为非凋亡细胞; 阴性对照片无棕黄色着色。在 200 倍光镜下随机选取 5 个无重叠视野, 计算在 100 个细胞中的凋亡细胞数, 以平均计数阳性细胞核数所占的百分比作为凋亡细胞阳性指数 (Apoptotic Index, AI)。2) 心肌 I、II 型胶原表达采用原位杂交法检测。细胞浆显棕黄色颗粒为阳性反应, 胞核为蓝色。在 200 倍光镜下随机选取 5 个无重叠视野, 计算阳性细胞的个数, 取其平均值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较用 *t* 检验, 多组间用方差分析。

2 实验结果

2.1 一般情况 共造模 120 只, 实验进行中由于失血、心肌梗死、心脏穿孔、气胸引起呼衰、气道阻塞、麻醉过量等原因死亡 50 只, 术后 5 日之内由于心肌梗死面积过大失代偿死亡 7 只 (尸体解剖见伤口处无明显红肿渗出, 见大量胸腔积液)、不明原因背部脓肿死亡 1 只、伤口缝合不严密, 被同伴撕咬致死 1 只, 术后 3 周尚成活 61 只, 手术成活率约 51%; 造模后 CHF 大鼠出现不同程度的活动量减少, 口唇四肢爪甲紫绀, 四肢尾巴水肿, 张口呼吸, 少力, 被抓取时少挣扎等心衰典型症状。行超声心动检查有 53 只符合心衰标准, 造模成功率约 44%。

2.2 各组心肌细胞凋亡指数 (AI) 的变化 模型组可见大量黄褐色凋亡细胞, 鹿茸液中剂量组和卡托普利组偶见凋亡细胞染色, 两者之间 AI 无差异 ($P > 0.05$), 但与模型组相比差异显著 ($P < 0.01$); 鹿茸液高剂量组和低剂量组 AI 较模型组小, 但高于鹿茸液中剂量组和卡托普利组 ($P < 0.05$), 空白组未见凋亡细胞染色。见表 1。

表 1 心肌凋亡指数 (AI) 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	AI (%)
鹿茸液高剂量组	11	21.67 ± 5.06*
鹿茸液中剂量组	11	3.25 ± 1.04**
鹿茸液低剂量组	11	40.25 ± 6.17*
卡托普利组	10	1.08 ± 0.14**
模型组	10	68.76 ± 9.27
空白组	7	/

注: 与同期模型组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

2.3 各组胶原 I、III 含量的变化 光镜下观察, 可见模型组心肌细胞束的间隙增宽, 心肌胞束之间观察到

大量条索状, 细胞浆显棕黄色颗粒的阳性反应, 胞核为蓝色, 分布不均匀。鹿茸液中剂量组和卡托普利组大鼠心肌组织情况明显改善, 心肌纤维化程度较模型组大鼠明显减轻 ($P < 0.01$)。鹿茸液高、低剂量组胶原合成情况较模型组也有减低 ($P < 0.05$), 但仍高于鹿茸液中剂量组和卡托普利组 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 胶原 I、胶原 III 计数 (个, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	胶原 I 计数	胶原 III 计数
鹿茸液高剂量组	11	21.67 ± 6.56	7.58 ± 1.27
鹿茸液中剂量组	11	15.25 ± 4.82*	5.63 ± 2.78
鹿茸液低剂量组	11	26.25 ± 7.25	9.18 ± 2.67
卡托普利组	10	10.08 ± 3.56**	4.16 ± 1.76
模型组	10	34.76 ± 9.27	12.24 ± 2.32
空白组	7	1.5 ± 0.75	1.2 ± 0.35

注: 与同期模型组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

3 讨论

越来越多的研究表明逆转心肌重塑是降低心衰发病率和死亡率首要的治疗目标^[2-4]。心肌细胞的凋亡和 I、II 型胶原的沉淀在心肌重塑过程中起着重要的作用。加强对心室重构的早期抑制, 阻断心力衰竭的发生链, 我们才能掌握心衰治疗的主动权。本实验表明, 鹿茸液能够减少心肌细胞凋亡, 减少 I、II 型胶原沉淀, 延缓左室重构和其恶化进程。因此应用温阳益气药鹿茸有益于从细胞、组织和器官水平逆转左室重构, 这为我们今后临床应用提供了依据。

鹿茸可维持心肌细胞膜和微粒体膜的稳定性^[5], 胶原是心脏细胞外基质最主要的成分^[6], 以 I、II 型胶原为主。I、III 型胶原的沉淀与基质金属蛋白酶 (MMPs) 和它的组织抑制物 (TIMPs) 2 者活性密切相关。本研究表明, 鹿茸液减少心衰大鼠的 I、II 型胶原的表达, 可能是通过对 MMPs/TIMPs 的调节发挥作用。

参考文献

[1] 顾东风, 黄广勇, 吴锡柱, 等. 中国心力衰竭流行病学调查及其患病率. 中华心血管病杂志, 2003, 31: 3-6

[2] Spinale FG, Coker ML, Bond BR, et al Myocardial matrix degradation and metalloproteinase activation in the failing heart: a potential therapeutic target. Cardiovasc Res 2000; 46(2): 225-238

[3] Silver MA, Maisel A, Yancy CW, et al BNP Consensus Panel 2004: A clinical approach for the diagnostic, prognostic, screening, treatment monitoring and therapeutic roles of natriuretic peptides in cardiovascular diseases. Congest Heart Fail 2004, 10(5): 1-30

[4] Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling—concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behav of an International Forum on Cardiac Remodeling. J Am Coll Cardiol 2000; 35(3): 569-582

[5] 屈立新, 唐越, 王向东, 等. 鹿茸精的心肌保护作用机理. 中华实验外科杂志, 1999, 16(1): 66-67

[6] Booz GW, Baker KM. Molecular signalling mechanisms controlling growth and function of cardiac fibroblasts. Cardiovasc Res 1995; 30(4): 537-543

(2007-11-16 收稿)