

川芎嗪注射液对心梗后大鼠缺血心肌血管新生及 VEGF-mRNA 表达的影响

张淑娟,王振涛*,韩丽华,柴松波

(河南中医学院第二临床医学院,郑州 450002)

[摘要] 目的:观察川芎嗪注射液对心肌梗死后大鼠缺血心肌血管新生和缺血心肌血管内皮生长因子 mRNA (VEGF mRNA) 表达的影响。方法:结扎大鼠左冠状动脉,造成急性心肌梗死动物模型,随机分为川芎嗪注射液组 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, ip, 麝香保心丸组(阳性对照) $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, ig, 模型组,并设假手术组。6 周后检测各组大鼠缺血心肌中微血管密度(MVD)及 VEGFmRNA 的表达及其灰度值。结果:模型组、麝香保心丸组及川芎嗪注射液组大鼠心肌梗死边缘区 MVD 较假手术组明显增多($P < 0.05$);川芎嗪注射液组较模型组明显增加($P < 0.05$),与麝香保心丸组作用相似。模型组 VEGFmRNA 表达及其灰度值高于假手术组($P < 0.05$);川芎嗪注射液组明显高于模型组($P < 0.05$),低于麝香保心丸组,但无统计学差异。结论:川芎嗪注射液可促进心肌梗死后大鼠缺血心肌血管新生,其机制可能与促进 VEGFmRNA 的表达有关。

[关键词] 川芎嗪注射液;心肌梗死;血管新生;血管内皮生长因子 mRNA

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)07-0170-04

Effects of Tetramethylpyrazine Injection on Angiogenesis and Expression of VEGF mRNA in Ischemic Myocardium of Rats with Myocardial Infarction

ZHANG Shu-juan, WANG Zhen-tao*, HAN Li-hua, CHAI Song-bo

(Cardiology Department of Internal Medicine, The Second Clinical Medical College of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450002, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of tetramethylpyrazine injection on the angiogenesis and expression of vascular endothelial growth factor(VEGF)mRNA in ischemic myocardium of the rats with myocardial infarction(MI). **Method:** The left coronary artery of male Wistar rat was ligated to make the model of acute myocardial infarction. All rats were randomly divided into Tetramethylpyrazine injection group, Shexiang Baoxin Pills group(positive control group), model group and sham operation group. Microvasscular vascular density(MVD) and VEGF mRNA in ischemic myocardium of rats with MI were detected six weeks later. **Result:** MVC and MVD in ischemic myocardium of rats with MI in modle group, tetramethylpyrazine injection group and Shexiang Baoxin Pills group were higher than that in sham operation group. In tetramethylpyrazine injection group they were the same as Shexiang Baoxin Pills group, which were higher than that in modle group. The expression of VEGFmRNA in modle group were elevated compared with that in sham operation group. It was significantly elevated in tetramethylpyrazine injection group compared with that in modle group and lower than that in Shexiang Baoxin Pills group. **Conclusion:** tetramethylpyrazine injection may promote angiogenesis in ischemic myocardium of the rats with MI. One of the

[收稿日期] 2010-12-13

[基金项目] 河南省杰出青年科学基金项目(0312002200)

[第一作者] 张淑娟,硕士研究生,主治医师,从事中医药防治心血管疾病的研究,Tel:18710111066,E-mail:ZSJTCM@163.com

[通讯作者] *王振涛,Tel:13803817796,E-mail:wzht62@163.com

mechanisms might be that tetramethylpyrazine injection could promot the expression of VEGFmRNA in ischemic myocardium of the rats with MI.

[Key words] tetramethylpyrazine injection;myocardium infarction;angiogenesis;VEGFmRNA

冠心病(CHD)是严重危害人类健康,甚至引起死亡的重要疾患之一,促进缺血心肌血管新生,形成侧枝循环,改善心肌血液供应成为治疗 CHD 新的靶向和热点。本研究观察心肌梗死后大鼠在使用川芎嗪注射液后缺血心肌中血管新生及 VEGF mRNA 的表达情况,以评价川芎嗪注射液是否有促心肌梗死后大鼠缺血心肌血管新生的作用,并探讨其作用机制。

1 材料

1.1 药物和试剂 川芎嗪注射液,北京市永康药业有限公司,批号 04020901;麝香保心丸,上海和黄药业有限公司,批号 A040214。小鼠抗大鼠 CD34 单克隆抗体,购自美国 Santa 公司;VEGF 原位杂交试剂盒、DAB 浓缩显色液试剂盒购自武汉博士德生物工程有限责任公司。

1.3 动物 体重(200±20)g 的 Wistar 雄性大鼠由郑州大学动物中心提供,合格证号 410116。

1.4 仪器 小动物呼吸机(江西特力麻醉呼吸设备公司);显微镜(日本 Olympus 光学有限公司);彩色病理图象分析系统(日本 Sony 公司)。

2 方法

2.1 造模及分组给药 参照文献方法^[1],1%戊巴比妥钠 ip(35 mg·kg⁻¹)麻醉,背位固定行气管插管术,连接小动物呼吸机,人工呼吸,开胸结扎左冠脉根部,经体表心电图监测显示造成急性心肌梗死后,缝合胸壁,观察大鼠生理状态平稳后,停止人工呼吸。术后注射青霉素 3 d 预防感染,成活动物随机分为川芎嗪注射液组、麝香保心丸组、模型组,假手术组。造模后 24 h 内开始药物干预:ip 川芎嗪注射液 20 mg·kg⁻¹·d⁻¹,管饲麝香保心丸 30 mg·kg⁻¹·d⁻¹;假手术组和模型组 ig 同容积生理盐水 10 mL·kg⁻¹·d⁻¹,1 次/d,连续 6 周后处死动物。

2.2 取材 取心肌组织(包括心梗区、移行区、健存区),10%福尔马林液固定,常规制片。

2.3 大鼠心肌梗死边缘区心肌微血管密度(MVD)测定 免疫组织化学法染色组织切片,以 CD34 单抗检测大鼠心肌组织中血管内皮细胞 CD34 表达来反映血管新生情况。一抗工作浓度为 1:100,染色

后血管内皮细胞被染成黄、棕色。微血管判断标准:按参考文献方法^[2],凡染成棕黄色单个内皮细胞或内皮细胞簇均作为 1 个血管计数,凡管腔大于 8 个红细胞大小、带有较厚肌层的血管区域血管均不计数。在 40 倍视野下找到心肌梗死边缘区,然后在 400×视野下进行微血管计数(MVC),每张切片随机选取 5 个视野,计数每个视野的 MVC,取其均值,因 MVD 以毛细血管个数/视野表示,故每例 MVC 值即为该大鼠的 MVD 值。

2.4 大鼠心肌梗死边缘区心肌 VEGF mRNA 表达的检测 用原位杂交法染色组织切片,VEGF mRNA 的表达以细胞内出现棕黄色颗粒沉着为阳性反应,用病理图象分析系统计算心梗边缘区心肌每 100 倍视野中平均灰度值,每张切片随机测定 6 个视野,取其均值作为该大鼠的灰度值。

2.5 统计学方法 数据用 SPSS11.0 软件处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠心肌梗死边缘区 MVD 的比较 在镜下各组均可看到新生的微血管。显示与假手术组相比,模型组、麝香保心丸组及川芎嗪注射液组 MVD 明显增多($P < 0.01$);川芎嗪注射液组、麝香保心丸组 MVD 较模型组明显增多($P < 0.01$);川芎嗪注射液组和麝香保心丸组作用相似。见表 1。

表 1 川芎嗪注射液对大鼠心肌梗死边缘区

MVD 的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)			个/视野
组别	剂量/mg·kg ⁻¹	MVD	
假手术	-	42.41 ± 2.31 ¹⁾	
模型	-	56.96 ± 10.53 ²⁾	
麝香保心丸	30	82.69 ± 4.89 ^{1,2)}	
川芎嗪注射液	20	80.86 ± 4.90 ^{1,2)}	

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$;与假手术组比较²⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.2 各组大鼠心肌梗死边缘区 VEGF mRNA 的表达及其灰度值 光镜下,各组 VEGF mRNA 的阳性染色呈棕黄色,阳性区域主要分布于心肌细胞胞浆,各组大鼠心肌梗死边缘区 VEGF mRNA 的表达情况

见图 1。灰度值见表 2。

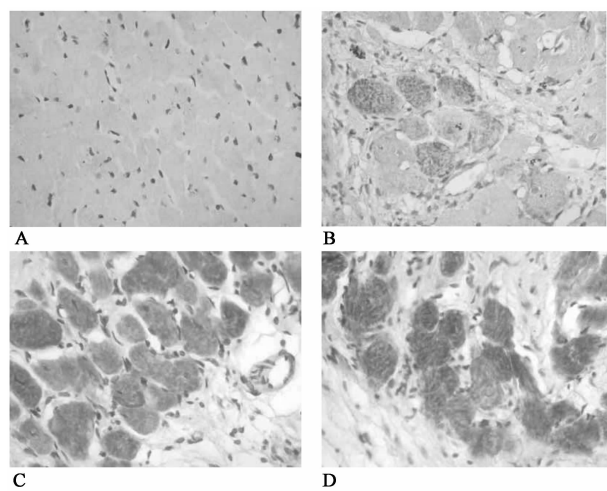


图 1 各组大鼠心肌梗死边缘区 VEGF mRNA 表达(组化×400)
A. 假手术组;B. 模型组;C. 麝香保心丸组;D. 川芎嗪注射液组

表 2 川芎嗪注射液对大鼠心肌梗死边缘区 VEGF mRNA 表达(灰度值)的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)		
组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	VEGF mRNA
假手术	—	$50.93 \pm 7.19^{(1)}$
模型	—	$65.41 \pm 5.93^{(2)}$
麝香保心丸	30	$91.30 \pm 7.98^{(1,2)}$
川芎嗪注射液	20	$82.26 \pm 6.37^{(1,2)}$

结果显示:模型组 VEGF mRNA 表达明显高于假手术组($P < 0.01$);川芎嗪注射液组、麝香保心丸组 VEGF mRNA 表达高于模型组($P < 0.01$);川芎嗪注射液组 VEGF mRNA 表达虽低于麝香保心丸组,但差异无统计学意义。

4 讨论

川芎嗪是川芎的生物碱中分离得到的有效单体,是临床上治疗 CHD 较常用且业已证实很有效的活血化瘀药,研究表明该药有众多的心血管药理作用。本研究通过动物实验手段观察川芎嗪注射液是否有促心肌梗死后大鼠缺血心肌血管新生的作用并探讨其分子机制。有报道,麝香保心丸有促心肌梗死后大鼠缺血心肌血管新生及促进 VEGF 和 bFGF 表达的作用^[3],故选该药作为对照。

MVD 是普遍采用的能够反映血管新生强度的有效指标。目前认为 CD 34 是较特异和敏感的生长中的血管内皮细胞表面标志,其特异性最高,有较强的可重复性^[4],优于内皮细胞的其他标记物^[5],故本研究检测大鼠心肌组织中血管内皮细胞 CD34 的

表达以反映血管新生状况。本研究显示,川芎嗪注射液能使心肌梗死后大鼠心肌梗死边缘区 MVD 显著增加,表明川芎嗪注射液有促进或诱导心肌梗死后大鼠缺血心肌血管新生的作用。

分子生物学研究表明,心肌缺血缺氧时的血管新生均是通过生长因子的作用而引起的^[6],以 VEGF 和 bFGF 为最重要。VEGF 是促进血管生成特异性最高、功能最强的调控因子^[7-9],VEGF 水平可反映心肌缺血程度,并与冠状动脉病变程度密切相关^[10],故采用原位杂交方法检测川芎嗪注射液对心肌梗死后大鼠缺血心肌 VEGF mRNA 表达的影响,在 mRNA 水平探讨其促血管新生作用机制。心肌缺血缺氧时,VEGF 和 bFGF 及受体的表达增强^[11]。本研究也发现模型组 VEGF mRNA 的表达高于假手术组,提示缺血缺氧可诱导 VEGF mRNA 的表达。

本研究表明,应用川芎嗪注射液后心肌梗死大鼠缺血心肌中 VEGF mRNA 表达明显增加,且发现 VEGF mRNA 表达水平与促血管新生的水平大体上是一致的,提示其促心肌梗死后大鼠缺血心肌血管新生作用与促进 VEGF mRNA 表达有关。

[参考文献]

[1] 王振涛,王硕仁,赵明镜,等.活血和益气方药对心肌梗死后左心衰大鼠左心室重构影响的比较研究[J].中国中西医结合杂志,2002,22(5)376.

[2] Masaharu T, Hiroyasu I, Miyako B, et al. Attenuation by genistein of sodium-chloride-enhanced gastric carcinogenesis induced by N-Methyl-N-Nitro-N-Nitrosoguanidine in wistar rats[J]. Int J Cancer, 1999, 80:396.

[3] 王大英,李勇,范维琥.麝香保心丸对心肌梗死大鼠梗死面积和血管新生的作用[J].中成药,2004,26(11):912.

[4] Tanigawa N, Lu C, Mitsui T, et al. Quantitation of sinusoidlike vessels in hepatocellular carcinoma; Its clinical and prognostic significance[J]. Hepatol, 1997, 26:1216.

[5] Kimura H, Nakajima T, Kagawa K, et al. Angiogenesis in hepatocellular cacinoma as evaluated by CD34 immunohistochemistry[J]. Liver, 1998, 18:14.

[6] Harada K, Friedman M, Lopez J J, et al. Vascular endothelial growth factor administration in chronic myocardial ischemia [J]. Am J Physiol, 1996, 270(5Pt2):H1791.

补阳还五汤干预代谢综合征血管性血友病因子的研究

崔翰博¹, 韩涛^{2*}, 张东钰¹, 鞠翡翠¹

(1. 山东中医药大学, 济南 250355; 2. 山东中医药大学教学实验中心, 济南 250355)

[摘要] 目的:观察补阳还五汤干预代谢综合征(MetS)模型血管性血友病因子(vWF)的作用和初步探讨其机制。方法:52 只雄性 Wistar 大鼠随机分为正常、模型对照、补阳还五汤、补阳还五汤去黄芪方 4 组,采用高糖脂餐加链脲佐菌素建立 MetS 模型,补阳还五汤组按 7.02 g·kg⁻¹ ig,1 次/d 给药,补阳还五汤去黄芪方组按 1.07 g·kg⁻¹ ig,1 次/d 给药,造模和给药同时进行并持续 8 周,观察补阳还五汤及其去黄芪方对空腹血糖(FBG),血清胰岛素(Ins),稳态模型评价胰岛素抵抗(HOMA-IR)和血清 vWF 水平的影响。结果:模型组 Ins,HOMA-IR,vWF 较正常组明显升高($P<0.05$);与模型组比较,补阳还五汤组的 Ins,HOMA-IR,vWF 明显降低($P<0.05$);补阳还五汤去黄芪方组 Ins,HOMA-IR 与模型组比较无统计学差异,FBG 明显升高($P<0.01$),vWF 明显降低($P<0.05$)。结论:补阳还五汤能够改善 MetS 模型的胰岛素抵抗和降低 vWF 水平;方中黄芪是改善胰岛素抵抗的有效成分,6 味活血药是降低 vWF 的有效成分。

[关键词] 补阳还五汤;代谢综合征;血管性血友病因子

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)07-0173-03

Experimental Study of Intervention of Buyang Huanwu Decoction
on Metabolic Syndrome and von willebrand Factor

CUI Han-bo¹, HAN Tao^{2*}, ZHANG Dong-yu¹, JU Fei-fei¹

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China;

2. Teaching Experimental Center, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

[Abstract] Objective: To study the interventive affect and mechanism of Buyang Huanwu decoction (BYHW decoction) on von Willebrand factor (vWF) of animal with metabolic syndrome (MetS). Method: Rats

[收稿日期] 20100909(006)

[第一作者] 崔翰博, 博士研究生, 从事中医药防治内分泌与代谢性疾病的临床研究, Tel:13210550463, E-mail:pantheri@163.com

[通讯作者] * 韩涛, 博士, 教授, 博士生导师, 从事方剂临床应用与疗效客观化研究, Tel:0531-89628567, E-mail:ht526@sina.com

[7] Harada Y, Ogata Y, Shirouzu K. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor KDR (kinase domain-containing rreceptor)/Fek-1 fetal liver kinase-1) as prognostic factors in human colorectal cancer[J]. In J Clin Oncol, 2001, 6(5):221.

[8] Dong E, Han Y, Sui L N. Diabetic retinopathy: VEGF, bFGF and retinal vascular pathology[J]. Song Chin Med J(Engl), 2004, 117(2):247.

[9] Ehrlich M, Rao J, Pabby A, et al. Improvement in the appearance of wrinkles with topical transforming growth factor beta and 1-ascorbic acid [J]. Dermatol Surg, 2006, 32(5):618.

[10] 黄晨, 张春蕾, 李源, 等. 老年大鼠心肌缺血后心脏 VEGFR-1 和 VEGFR-2 表达的研究[J]. 中国老年医学杂志, 2007, 27:113.

[11] 尹瑞兴, 冯建章, 姚震. 急性心肌梗死大鼠血清血管内皮生长因子含量的变化[J]. 中国病理生理杂志, 2000, 16(1):30.

[责任编辑 何伟]