

中药复方心肌 1 号对大鼠异丙肾上腺素心肌损伤修复及基质细胞衍生因子 -1、干细胞因子的影响

沈利水 屈百鸣

摘要 **目的** 观察中药复方心肌 1 号对异丙肾上腺素心肌损伤大鼠的心功能及基质细胞衍生因子 -1 (SDF - 1)、干细胞因子(SCF)的影响。**方法** 选取 Wistar 大鼠 30 只,连续 3 天腹部皮下注射异丙肾上腺素 15mg/kg,第 4 天行心脏超声,挑出 EF < 60% 大鼠 20 只,随机分入治疗组和对照组,分别给予心肌 1 号和生理盐水灌胃,测量不同时间段外周血 SDF - 1、SCF 浓度。治疗期间观察两组大鼠的进食、活动量及精神状态。连续灌胃 4 周后心超复测 EF 值,随后处死 2 组大鼠,取出大鼠心脏,行 HE 染色,测定心肌组织匀浆中 SDF - 1 及 SCF 浓度。**结果** 心肌 1 号治疗组大鼠的心功能较对照组明显改善,精神状态、活动量及进食情况较对照组佳,EF 值 $78.8\% \pm 7.0\%$ vs $67.7\% \pm 10.3\%$;两组大鼠灌胃前外周血 SDF - 1、SCF 浓度无统计学差异,灌胃 4 周后,治疗组外周血和心肌匀浆中 SDF - 1 及 SCF 浓度皆明显高于对照组。**结论** 心肌 1 号能修复大鼠的心肌损伤,同时可促进 SDF - 1 及 SCF 的分泌,这可能揭示了心肌 1 号修复大鼠异丙肾上腺素所造成的心肌损伤的部分机制。

关键词 心肌 1 号 心肌损伤 SDF - 1 SCF

Effects of Chinese Herbal Compound Myocardial NO.1 on Myocardial Repair and Stromal Cell - derived Factor -1、Stem Cell Factor Level of Myocardial Injury - rats Induced by Isoproterenol. Shen Lishui, Qu Baiming. Zhejiang Chinese Medical University, Zhejiang 310053, China

Abstract Objective To observe the influence of Chinese medicine myocardial NO.1 to the myocardial function and the expression of stromal cells derived factor -1 (SDF - 1), stem cell factor(SCF) in rats with isoproterenol - induced myocardial injury. **Methods** A total of 30 rats were selected. They were injected isoproterenol 15mg/(kg · d) through subcutaneous way for 3 days and given a cardiac ultrasonic examination on the fourth day. Then 20 rats with EF < 60% were picked out and randomly divided into treatment group, savaged with myocardial NO.1, and control group, savaged with physiological saline. The level of SDF - 1 and SCF in the peripheral blood were measured in different time. The eating status, activity and mental status of rats were observed during the treatment. After savaging for 4 weeks, all rats were given another cardiac ultrasonic examination. Then the rats were sacrificed, the hearts were taken out to make HE stain and the concentrations of SDF - 1、SCF in the myocardial slurry were measured. **Results** Compared with the control group, the cardiac function, eating status, activity and mental status in treatment group improved significantly, EF values $78.8\% \pm 7.0\%$ vs $67.7\% \pm 10.3\%$. The blood SDF - 1, SCF level showed no statistical difference in two groups before intragastric administration. After 4 weeks, the SDF - 1 and SCF concentrations in blood and myocardial slurry of treatment group were significantly higher than the control group. **Conclusion** Myocardial NO.1 can repair the myocardial injury. It can also promote the secretion of SDF - 1、SCF in rats, which may reveal its partial mechanism of repairing myocardial injury caused by isoproterenol.

Key words Myocardial NO.1; Myocardial injury; SDF - 1; SCF

心肌梗死和扩张型心肌病的预后一直以来都是心血管领域内关注的热点^[1]。以往观点认为,心肌细胞不可再生,大面积损伤坏死后意味着心肌数量的绝对减少,即便通过胶原纤维的增生及残存心肌的代偿肥大,也仅能弥补部分失去的心功能,多数患者晚

期可出现不同程度的心功能不全,而现有治疗手段对其预后的改善并不理想。在治疗扩张型心肌病患者的过程中发现,给予中药复方心肌 1 号 1~2 个疗程后,患者的临床症状可有较大程度改善,活动耐量增加,超声心动图提示左心室射血分数可有不同程度提高,左心室舒张内径较前缩小。国内外研究显示,基质细胞衍生因子 -1 (SDF - 1) 和干细胞因子 (SCF) 在组织损伤的再生修复过程中具有重要作用^[2]。本次研究将评价心肌 1 号治疗大鼠心肌损伤的疗效,同

作者单位:310014 杭州,浙江中医药大学第二临床医学院(沈利水);浙江省人民医院心内科(屈百鸣)

通讯作者:屈百鸣,硕士生导师,主任医师,电子信箱:qubaiming@163.com

时探讨其对 SDF-1 及 SCF 的影响。

材料与方法

1. 药品与试剂: 心肌 1 号中药复方: 黄茂、茯苓等, 将上述药材用蒸馏水浸泡 30min 后, 煎煮 2 次, 取 2 次滤液合并, 蒸发浓缩至生药含量 2.04g/ml, 4℃ 冰箱保存, 临用前充分摇匀并加热至室温。中药材由浙江省人民医院药房提供, 盐酸异丙肾上腺素注射液 (ISO) 0.5mg/ml (上海禾丰制药有限公司)。SDF-1、SCF、ELISA 试剂盒 (美国 RD 公司)。

2. 仪器: 美国伯乐 Bio-rad680 酶标仪; Olympus 显微镜; 飞利浦 HDI3000 彩超仪、飞利浦 LI2-5 线阵高频探头; 高速离心机、水浴箱等。

3. 动物: Wistar 大鼠 30 只, 6 周龄, 雌性, 清洁级, 体重为 150~160g, 由浙江中医药大学动物实验中心提供。

4. 实验方法: (1) 心肌损伤大鼠模型制备^[3]: 30 只大鼠连续 3 天腹部皮下注射 ISO15mg/kg, 第 4 天行超声心动图检查, 选取大鼠左心室短轴二维图像和左心室乳头肌水平 M 型超声, 测定左心室射血分数 (LVEF), LVEF < 60% 即为造模成功。筛选符合标准的大鼠 20 只, 随机分入治疗组和对照组, 每组 10 只。(2) 给药方案: 治疗组每天同一时间灌胃心肌 1 号 10ml/(kg·d) (生药含量 2.04g/ml), 对照组灌胃同样剂量的生理盐水, 连续灌胃 4 周。(3) 观察指标及检测方法: ① 大鼠的一般情况: 观察造模前后及 4 周疗程前后两组大鼠的精神状态、进食情况、活动量; ② 大鼠心功能测定: 灌胃 4 周结束后次日空腹检测两组大鼠的左心室射血分数; ③ ELISA 实验方法: 采用 ELISA 检测外周血及心肌组织中 SDF-1、SCF 水平。以 OD 值为纵坐标, 以标准品浓度为横坐标, 使用 Excel 2003 绘制标准曲线得出曲线方程, 根据样品的 OD 值可用曲线方程计算其浓度; ④ 外周血及心肌组织 SDF-1、SCF 样品留置: 首次灌胃前及灌胃 4 周后分别采集两组大鼠内眦血 1ml, 高速离心, 分离血清待测; 用水合氯醛麻醉处死两组大鼠, 取出大鼠心脏, PBS 冲洗干净, 在心尖部切取 200mg 心肌组织加入 2ml 低温 PBS (常温 4℃) 匀浆后, 离心取上清液待测; ⑤ 心肌常规病理染色: 在近心尖部, 与心脏长轴垂直切取约 2mm 厚心肌组织 1 块, 置于 4% 多聚甲醛溶液中常温固定 24h, 脱水包埋后制作 4μm 厚度石蜡切片, 行 HE 染色, 光镜下观察并采集图片。

5. 统计学方法: 统计学分析采用 SPSS 11.0 软件包进行, 所有数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两样本均数间的比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. 大鼠的一般情况: 造模后两组大鼠精神状态萎靡、进食及活动量减少, 4 周疗程后, 对照组上述指标改善部明显, 但心肌 1 号治疗组精神状态较对照组佳, 且进食及活动量明显多于对照组。

2. 大鼠心功能: 灌胃 4 周后心肌 1 号治疗组心功能明显改善, EF 值 $78.8\% \pm 7.0\%$ 显著高于对照组

$67.7\% \pm 10.3\%$, 差异具有统计学意义 (*P* < 0.05), 详见图 1。

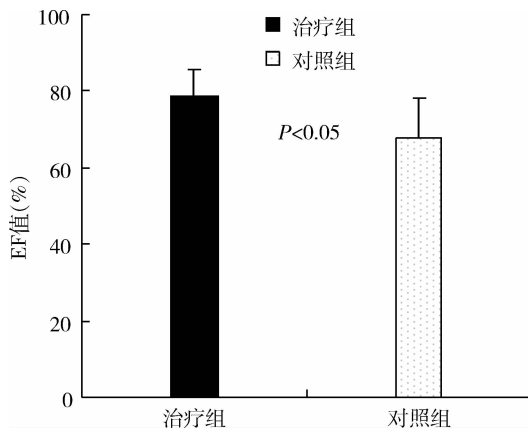


图 1 灌胃 4 周后大鼠 EF 值

3. 两组大鼠 SDF-1 浓度: ① 灌胃治疗前治疗组大鼠外周血 SDF-1 浓度 315.9 ± 70.8 pg/ml 与对照组 337.3 ± 54.4 pg/ml 相比, 无统计学差异 (*P* > 0.05); ② 灌胃 4 周后治疗组大鼠外周血 SDF-1 浓度 256.4 ± 47.9 pg/ml 明显高于对照组 204.2 ± 57.8 pg/ml, 差异具有统计学意义 (*P* < 0.05); ③ 灌胃 4 周后治疗组大鼠心肌组织匀浆中 SDF-1 浓度 567.3 ± 94.6 pg/ml 显著高于对照组 450.2 ± 70.7 pg/ml, 差异具有显著统计学意义 (*P* < 0.01), 详见图 2。

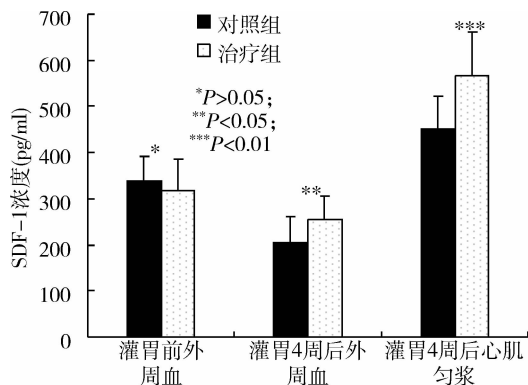


图 2 两组大鼠外周血及心肌匀浆中 SDF-1 水平

4. 两组大鼠 SCF 浓度: ① 灌胃治疗前治疗组大鼠外周血 SCF 浓度 1944.4 ± 428.0 pg/ml 与对照组 1847.9 ± 307.4 pg/ml 相比, 无统计学差异 (*P* > 0.05); ② 灌胃 4 周后治疗组大鼠外周血 SCF 浓度 1808.9 ± 302.1 pg/ml 明显高于对照组 1501.1 ± 244.2 pg/ml, 差异具有统计学意义 (*P* < 0.05); ③ 灌胃 4 周后治疗组大鼠心肌组织匀浆中 SCF 浓度 2986.7 ± 567.1 pg/ml 高于对照组 2474.8 ± 385.0 pg/ml

ml, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 3。

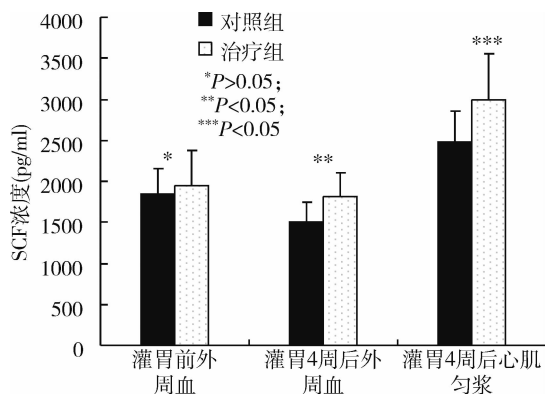


图3 两组大鼠外周血及心肌匀浆中 SCF 水平

5. 两组大鼠心肌 HE 染色结果: 两组皆可见散在、片状的凝固性坏死灶及心肌间质水肿。其中对照组可见多量炎症细胞浸润, 而治疗组炎症细胞相对稀少, 局部有纤维瘢痕形成, 详见图 4。

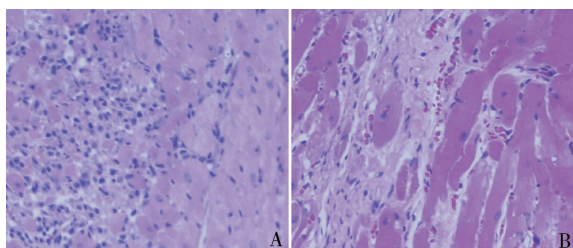


图4 心肌组织 HE 染色 ($\times 200$)

A. 对照组: 可见片状坏死灶, 心肌间质水肿, 伴多量炎症细胞浸润; B. 治疗组: 可见坏死灶处纤维瘢痕形成, 无明显炎症细胞浸润

讨 论

心肌 1 号方由黄芪、茯苓等多味中药配伍而成。黄芪具有扶正固本、补中益气等多种药理作用。现代研究证实, 黄芪能够保护血管内皮细胞, 抑制血管平滑肌细胞的增殖, 增强心肌收缩力, 改变心肌供血和心肌代谢, 清除氧自由基, 减轻心肌细胞钙超载, 抑制心肌细胞凋亡等^[4]。对各种原因引起的心肌细胞损伤具有一定的治疗和预防作用。杨庆有等^[5]还发现黄芪含药血清具有促进骨髓间充质干细胞向心肌样细胞分化的作用。茯苓具有渗湿利水, 健脾和胃, 宁心安神的功效。有实验证明, 茯苓素对钠-钾-ATP 酶和细胞中总 ATP 酶具有激活作用, 提示其可能具有改进心肌运动和促进机体水盐代谢的功能。

研究发现, 经心肌 1 号治疗后, 心肌损伤大鼠的精神状态较治疗前改善明显, 活动量及进食增加, 而

对照组精神状态及活动量改善不明显, 略显萎靡。超声心动图检测, 中药治疗组大鼠的 EF 值明显高于对照组 ($P < 0.05$), 心肌 HE 染色治疗组可见损伤部位纤维组织增生, 修复明显, 而对照组仍有大量炎症细胞浸润, 仅见少量纤维瘢痕。由此可见心肌 1 号确实能够修复心肌损伤, 改善心功能。心肌损伤的修复涉及多种机制, 前期实验发现在组织损伤的修复过程中有骨髓干细胞的参与, 但具体作用机制不明^[6]。近年来国内外研究表明, SDF-1、SCF 在干细胞的动员、归巢及分化过程中有着重要作用, 本次研究对其进行了探讨。

基质细胞衍生因子-1 (SDF-1) 是趋化因子 CXC 超家族中的一员, 在多种组织和细胞中表达分泌。其特异性受体 CXCR4 为 G 蛋白偶联受体, 表达于多种干细胞表面, 当与 SDF-1 结合后可以活化 G 蛋白, 通过多条信号转导途径促进干细胞趋化、迁移。Abbott 等^[7]报道, 静脉给予骨髓来源的细胞 48h 后, 心肌梗死区较正常心脏组织骨髓来源细胞的募集多 80.5%, 而使用 SDF-1 抑制剂 AMD3100 后, 其募集量减少 64.2%, 增加 SDF-1 的表达水平则使心肌梗死区的募集较对照组增加了一倍, 表明 SDF-1 在趋化干细胞迁移到梗死区进行组织修复的过程中发挥重要作用。

干细胞因子 (SCF) 是一类重要的造血生长因子, 是骨髓干细胞强有力的动员剂, 其特异性受体 C-kit 为 III 型酪氨酸蛋白激酶亚家族成员, 表达于多种干细胞表面。两者结合后可通过细胞内的蛋白酪氨酸激酶的自磷酸化作用募集信号蛋白质、使底物酪氨酸磷酸化、激活多种信号通路, 进而动员大量骨髓干细胞向外周迁移。杨敏等^[8]研究发现, 经干细胞因子治疗后, 大量骨髓干细胞向心肌梗死部位迁移, 并呈现心肌样分化。谭艳芳等^[9]发现黄芪甲甙能促进骨髓间充质干细胞的体外增殖, 并可诱导和促进其分泌 SCF, 揭示了黄芪促进骨髓间充质干细胞增殖和分化的部分机制。

本次实验观察了两组大鼠外周血及心肌中 SDF-1、SCF 水平的差异。研究发现, 灌胃治疗前, 大鼠外周血上述两种因子不存在统计学差异, 而治疗 4 周后, 治疗组外周血 SDF-1 及 SCF 水平明显高于对照组, 同时心肌组织匀浆中上述因子水平也显著高于对照组。提示中药复方心肌 1 号可提高心肌损伤大鼠外周血及心肌组织中 SDF-1 及 SCF 的水平, 结合国内外有关 SDF-1 及 SCF 对骨髓干细胞向心肌

损伤部位迁移分化的一系列相关研究,笔者推测,该中药经验方可能在一定程度上提高上述两类因子的水平,进而影响到骨髓干细胞的迁移分化,改善部分心功能。本实验由于未对骨髓干细胞的迁移分化进行相关验证,上述推测目前仅存在理论依据。骨髓干细胞迁移分化的程度如何,心肌 1 号究竟通过何种机制改善心功能,如何促进组织分泌 SDF-1、SCF,这些因子的表达水平与中药方剂的浓度及疗程长短是否存在相关性等问题,皆有待进一步的研究。随着医学的不断进步,中医药治疗由经验医学逐渐迈向循证医学模式,必将在治疗心肌损伤性疾病的领域中发挥越来越大的作用。

参考文献

- 1 Arad M, Freimark D. Predicting prognosis in dilated cardiomyopathy [J]. *Isr Med Assoc J*, 2012, 4(11): 687-689
- 2 Penn MS, Pastore J, Miller T, *et al*. SDF-1 in myocardial repair [J]. *Gene Ther*, 2012, 19(6): 583-587
- 3 屈自鸣, 俞坚武, 赵仲牛, 等. β -肾上腺素受体过度激动致大鼠心肌细胞凋亡及 Fas, Bcl-2 蛋白表达的实验研究[J]. *心脏杂*

- 志, 2005, 17: 232-234
- 4 Yang QY, Chen KJ, Lu S, *et al*. Research progress on mechanism of action of Radix Astragalus in the treatment of heart failure [J]. *Chin J Integr Med*, 2012, 18(3): 235-240
- 5 杨庆有, 洗绍祥, 孙慧茹, 等. 黄芪含药血清诱导骨髓间充质干细胞分化为心肌样细胞的实验研究[J]. *辽宁中医杂志*, 2008, 35(6): 832-834
- 6 汪丽芳, 马元, 屈百鸣. 心肌 1 号对大鼠异丙肾上腺素心肌损伤的骨髓干细胞修复作用研究[J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2012, 6(6): 1461-1465
- 7 Abbott JD, Huang Y, Liu D, *et al*. Stromal cell-derived factor-1 alpha plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury[J]. *Circulation*, 2004, 110(21): 3300-3305
- 8 杨敏, 闫纯英, 吴贤仁, 等. 干细胞因子动员骨髓干细胞归巢梗死心肌的特性变化[J]. *中国临床康复*, 2005, 9(26): 67-70
- 9 谭艳芳, 殷小成. 黄芪甲甙对骨髓间充质干细胞分泌干细胞因子的影响[J]. *中国当代儿科杂志*, 2010, 12(4): 290-292

(收稿日期: 2013-07-02)

(修回日期: 2013-07-18)

fgl2 凝血酶原酶在重症急性胰腺炎大鼠肝损伤的表达意义

叶晓华 怀佳萍 丁进 黄智铭

摘要 **目的** 探讨重症急性胰腺炎(SAP)大鼠肝损伤中 fgl2 凝血酶原酶的表达情况及意义。**方法** SD 大鼠采用数表法随机均分为假手术(SO)组和 SAP 组,各 24 只。采用逆行胆胰管注射 4% 牛磺胆酸钠法制备大鼠 SAP 模型。收集术后 1、4 及 8h 时点肝脏标本,行常规病理检查及 Masson 染色随机计数肝脏微血管内微血栓形成的阳性血管数;血样检测丙氨酸氨基转移酶(ALT)及天冬氨酸氨基转移酶(AST);实时定量(real-time)PCR 法、免疫组织化学法测定 fgl2 凝血酶原酶在大鼠肝脏的表达情况。**结果** 组织病理学检查示 SAP 大鼠肝组织内炎细胞浸润及坏死;fgl2 凝血酶原酶在 SAP 大鼠肝脏微血管内皮细胞高表达($P < 0.01$);SAP 组肝脏微血管可见微血栓形成;SAP 大鼠阳性血管率显著高于 SO 组($P < 0.01$),且与肝脏 fgl2 凝血酶原酶表达呈正相关($r = 0.948, P < 0.01$);SAP 组肝脏病理学评分显著高于 SO 组($P < 0.01$)且与 fgl2 凝血酶原酶表达呈正相关($r = 0.704, P < 0.01$)。**结论** fgl2 凝血酶原酶在 SAP 大鼠肝脏中的异常表达可能通过介导微血栓形成导致 SAP 相关性肝损伤的进展;其表达水平可能与 SAP 相关性肝损伤的病理损害程度相关。

关键词 纤维蛋白原样 2 凝血酶原酶 肝损伤 微血栓 重症急性胰腺炎

Significance of Fibrinogen-like Protein 2 in Severe Acute Pancreatitis-associated Liver Injury. Ye Xiaohua, Huai Jiaping, Ding Jin, Huang Zhiming. Department of Gastroenterology, Department of Intensive Care Unit, Jinhua Municipal Central Hospital, Zhejiang 321000, China

Abstract Objective To investigate whether fibrinogen-like protein 2 is involved in severe acute pancreatitis (SAP)-associated liver injury. **Methods** The rats were randomly divided into sham-operation (SO) group and SAP group. SAP rat model was induced by

作者单位: 321000 浙江省金华市市中心医院消化内科(叶晓华、丁进), ICU(怀佳萍); 325000 温州医科大学附属第一医院消化内科(黄智铭)

通讯作者: 丁进, 电子信箱: 45338363@qq.com; 黄智铭, 电子信箱: wzhzm123@163.com