

基于情绪应激下心血管疾病大鼠复合模型的构建 探索益气活血方对脂联素水平的影响*

万 婷, 郭书文[△], 吴佳妮, 张 璐, 武建功, 陈 曦, 刘文臣, 苏兆铎

(北京中医药大学, 北京 100029)

摘要: **目的** 在情绪应激下心血管疾病复合模型大鼠构建的基础上, 研究情绪和心血管疾病间的关系。通过观察、对比益气活血方对复合病模型大鼠心肌组织、脑海马体内脂联素含量的影响, 为基础实验研究和临床心血管疾病预防、用药提供新的理论设想和依据。 **方法** 采取腹腔注射异丙肾上腺素合并慢性不可预见性情绪刺激法构建大鼠复合模型。将实验动物分为空白组、ISO 模型组(单纯心肌缺血模型)、复合模型组(心肌缺血合并情志刺激模型)、中药组、西药组 5 组。采用超声心动图监测和行为学实验作为模型大鼠构建成功的依据。观察、对比大鼠心脏功能、行为学指标、心肌组织和脑海马体中脂联素各组用药后的变化情况。 **结果** 实验 32d 后, 复合模型组和 ISO 模型组射血分数(EF)和短轴缩短率(FS)均低于空白组, 差异有统计学意义($P<0.01$); 复合模型组、ISO 模型组心肌组织、脑海马体中的脂联素含量均低于空白组, 差异有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$); 中药组、西药组大鼠脂联素含量均高于复合模型组, 差异有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。 **结论** 益气活血药可以改善复合模型大鼠心脏功能和行为学指标, 从而使模型大鼠机体走上良性循环道路, 其原因可能与其对脂联素的作用有关。

关键词: 脂联素; 慢性应激; 心血管疾病; 益气活血药; 情绪刺激

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2015)03-0001-04

随着现代都市人们生活方式, 生活状态的改变, 各方面压力的增加以及环境的污染, 心血管疾病已然成为威胁现代社会人类健康的主要疾病之一。在跟随导师门诊过程中, 发现心血管疾病收录近 2 年明显相对增多, 并且呈年轻化趋势, 情绪主诉增多明显。有相当一部分患者, 在心血管疾病症状临床相关指标改变的基础上, 描述有内心的压抑、恐惧、焦躁、易怒以及失眠等情绪改变。心血管疾病和神经内分泌系统联系紧密, 情绪和心血管疾病的关系在现代医学界也越来越多的促进了心血管、抑郁症临床治疗方案的调整^[1]。本实验就是立足于这样的现实状况, 通过对导师益气活血中药临床疗效以及相关中医理论的研究进行了设计, 以期进一步揭示益气活血药的作用机制, 以及心脑血管疾病以及情绪的相关作用机制, 为临床用药、组方以及后续相关实验研究做出一定的探索。

1 材料

1.1 实验动物

清洁级的 8 周龄健康雄性 SD(Sprague-Dawley)大鼠, 体质量(200 ± 10)g, 由维通利华实验动物有限公司提供, 许可证号: SCXK(京)2012-0001。饲养于北京东直门医院动物实验室, 除情绪造模刺激需要外, 整个实验均常规饲养, 室温: $21\sim 23^{\circ}\text{C}$, 照明节律。

1.2 药品

1.2.1 造模用药

盐酸异丙肾上腺素注射液, 由上海禾丰制药有限公司提供, 批准文号: 国药准字: H31021344, 批号: 131103, 规格: 2mL:1mg。

1.2.2 治疗用药

中药组: 取人参、生黄芪、川芎、当归、三七制成颗粒剂(由北京中医药东直门医院药房提供, 溶于

* 基金项目: 国家自然科学基金(81173142)

收稿日期: 2015-04-14

作者简介: 万婷(1988-), 女, 湖南岳阳人, 在读硕士研究生, 研究方向: 中医药防治心血管疾病的相关研究。

[△]通信作者: 郭书文, E-mail: guo1163@163.com

烧开的蒸馏水中,配比组方用量比例为导师多年临床总结经验,服药量为:1次/d,21g/(kg·d)(前期研究确立)^[2]。

西药组,阳性对照用药:培哚普利(雅施达),由天津施维雅制药有限公司提供,批准文号:国药准字:H20034053,批号:2004788,规格:4mg×30片/盒。服药量为:1次/d,剂量为0.4mg/(kg·d)(临床等效剂量),将药物溶于蒸馏水中,调整药物浓度达到10mL/(kg·d)的用药容积。

1.3 实验仪器与实验试剂

1.3.1 实验仪器

JAI10003 电子天平(上海精密科学仪器有限公司);Vev770 超声检测仪(加拿大 visualsonics 公司);荧光定量 PCR 仪:Thermo,美国;荧光 PCR 板:Thermo,美国;恒温水浴箱:J-MAX,中国;旋涡混合器:其林贝尔,中国;电泳仪:北京六一,中国;水平琼脂糖电泳槽:北京六一,中国;-8℃冰箱:中科美菱,中国;电动玻璃匀浆器:新芝,中国;摇床:其林贝尔,中国;台式冷冻离心机:eppendorf,德国。

1.3.2 手术器械及其他物品

眼科剪、眼科镊,直剪刀 4 把,镊子 4 把,大剪子 1 把,剥离钳 1 把(180~200℃,烘烤 4~6h)。

1.3.3 实验试剂与溶液配方

琼脂糖:西班牙,逆转录试剂盒:Fermentas,ED-TA, Sigma; Tris; Sigma; Trizol; Invitrogen, Taq 酶: Genstar,引物:上海生工,DEPC:Sigma,DL2000 DNA Marker: Genstar, dNTP: Genstar, E.B: Sigma, SYB-GREEN PCR Mix;冷生理盐水(氯化钠注射液),由国药集团化学试剂有限公司提供,批号:国药准字 H11021192;70%酒精(医用乙醇),由新乡市三伟消毒制剂有限公司提供,批号:20141005;水合氯醛(水合三氯乙醛),由国药集团化学试剂有限公司提供,批号:20140619。

2 方法

2.1 造模方法

动物在适应性饲养后,进行腹腔注射异丙肾上腺素[5mg/(kg·d)]3 d,制造心肌缺血、心力衰竭模型^[3]。注射后观察 48h,稳定后,对所有造模动物进行心率、心跳强度的观察和记录,根据心率结合随机数字表进行随机分组,分组情况如表 1。

在心血管疾病造模基础上,模仿现代人压力、孤独、欲求不满等状态,连续 30 d,灌服药物的同时,对

药物组以及复合模型组大鼠进行情志干扰^[4-5],制造复合模型。空白组和 ISO 模型组常规饲养,不进行情绪刺激。造模过程中西药组和 ISO 模型组分别死亡 2 只。

2.2 实验分组

表 1 实验分组

组别	空白组	ISO 模型组	复合模型组	中药组	西药组
只数	10	10	10	10	10

称量动物体质量,标记。

2.3 给药方法

中药、西药药物组每天上午,按量(2mL/200g·d⁻¹)按时分组灌服益气活血中药、西药阳性对照药。空白组和模型两组动物灌服等量蒸馏水。后期根据大鼠重量的增加,监测体质量,不断进行剂量的调整。灌胃过程中可能由于人为操作不当,中药组死亡 1 只。

2.3 检测指标及检测方法

2.3.1 超声检查

给药造模情绪干扰 32d 后,对所有大鼠行超声检查,麻醉大鼠后,仰卧位固定,涂抹膏状绿色透明药物导体,采用高频探头 RMV716 对大鼠心脏进行定位,在二尖位,水平部进行探测,取胸骨旁短轴切面,由二维超声引导 M 型曲线进行测定,每组原始数据取连续 3 个心动周期测量的平均值,记录保留 3 次数值,本实验根据实验动物造模类型和实验目的,主要对短轴缩短率(FS)、射血分数(EF)指标进行了超声检测,作为心血管疾病成模标准^[6]。

2.3.2 旷场实验行为学观察

于情绪干扰前,干扰 14d,干扰 32d 3 个时间点,对大鼠进行行为学观察。将大鼠放置于 75×75×50cm,四周为黑色,底部呈白色,且被划分为 25 格的箱子中央。整个实验在安静通风昏暗室内进行,为防止干扰,实验开始前让大鼠提前进行环境的熟悉,整个实验过程中减少人员干扰。观察记录大鼠纵向,横向行动,每只 3min,间隔清理排泄物,并且用酒精消毒,防止不同大鼠气味的诱导。横向运动计数标准:三只足进入一格记录为横向运动一次;纵向运动记录标准:攀爬一次记录为纵向运动一次^[7]。

2.3.3 RT-PCR(脂联素检测)

引物设计:脂联素以及内参 Rat-Actin PCR 的

引物序列(由生工生物工程有限公司合成),见表2。

表2 脂联素以及内参 Rat-Actin PCR 的引物序列

引物	序列
Adiponectin Forward Primer	TTCCTTCTCTACCATGATACCAACTG
Adiponectin Reverse Primer	TGTCGCCTGTCTCTTTGATTCTC
Rat -Actin Forward Primer	TCTGTGTGGATTGGTGGCTCTA
Rat -Actin Reverse Primer	CTGCTTGCTGATCCACATCTG

PCR 免疫印迹分析,从 100mg 心肌和海马体组织中提取总蛋白质(从心尖上剪取心肌组织),分析其浓度。填充于 12%的聚丙烯酰胺,进行凝胶电泳。用公司提供的 Rat-Actin 作为内标标准化,同时进行检测。通过溶解曲线分析,实验各组结果均为单一峰,说明 PCR 扩增特异性较好,样本 3 次重复实验数据的重复性较好。结果使用 $\Delta\Delta C_t$ 法进行数据分析整理后得到如表 5。

2.4 统计学处理

全部数据经过记录和归类整理编号区分,用 Excel 和 SPSS17.0 统计软件进行分析处理,数据结果均用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,对单变量计量资料样本均数间进行比较,若符合正态分布,用单因素方差进行处理(One-Way ANOVA)。多重比较,用 LSD 或者 SNK 法。若方差不齐,则用 Games-Howe

II 进行分析,双侧检验,检验水准为 $P<0.05$ 。

3 结果

3.1 超声心动图结果

表3 超声心动图各组结果对比($\bar{x}\pm s$,%)

组别	<i>n</i>	EF	FS
空白组	10	63.32 $\pm$ 6.20	43.48 $\pm$ 4.24
ISO 模型组	8	43.33 $\pm$ 6.10 ^{##}	30.58 $\pm$ 4.14 ^{##}
复合模型组	10	42.8 $\pm$ 5.66 ^{##}	28.26 $\pm$ 2.92 ^{##}
中药组	9	52.80 $\pm$ 9.32 [*]	39.42 $\pm$ 2.53 [*]
西药组	8	52.70 $\pm$ 11.70 [*]	38.90 $\pm$ 3.88 [*]
<i>F</i>		5.759	8.079
<i>P</i>		<0.05	<0.01

注:与复合模型组比较,^{*} $P<0.05$;与空白组比较,^{##} $P<0.01$

各组对比,第 32 天超声心动图测试,有一定的差异性:2 个模型组较空白组射血分数(EF)和短轴缩短率(FS)明显缩小,有显著统计学差异($P<0.01$),中药组、西药组较模型两组左室射血分数(EF)和短轴缩短率(FS)有所增加,有显著统计学差异($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。见表 3。

3.2 旷场实验结果

通过数据分析:空白组前后差异不大,ISO 模型组前后对比无统计学意义,复合模型组服药后 32d 横向与情志造模前横向对比有统计学意义($P<0.01$);中药

表4 造模前,第 14,30 天旷场实验平均值($\bar{x}\pm s$)对比(单位:次)

组别	情志造模前			情志造模后 14 d			服药后 32 d		
	<i>n</i>	横向	纵向	<i>n</i>	横向	纵向	<i>n</i>	横向	纵向
空白组	10	73 $\pm$ 23	15 $\pm$ 7	10	83 $\pm$ 26	13 $\pm$ 5	10	75 $\pm$ 5	15 $\pm$ 3
ISO 模型组	10	79 $\pm$ 36	15 $\pm$ 5	8	73 $\pm$ 33	8 $\pm$ 2	8	58 $\pm$ 26	10 $\pm$ 2
复合模型组	10	86 $\pm$ 44	15 $\pm$ 6	10	71 $\pm$ 31	15 $\pm$ 7	10	5 $\pm$ 2 ^{**}	13 $\pm$ 5
中药组	10	77 $\pm$ 32	13 $\pm$ 8	10	76 $\pm$ 34	10 $\pm$ 5	9	13 $\pm$ 5 ^{**}	13 $\pm$ 2
西药组	10	78 $\pm$ 32	16 $\pm$ 5	8	68 $\pm$ 30	8 $\pm$ 2	8	5 $\pm$ 3 ^{**}	4 $\pm$ 1

注:在旷场实验中,空白组 3 次测试,前后差异不大。与情志造模前横向对比差异显著,有统计学意义(^{**} $P<0.01$)。

组服药后 32d 横向与情志造模前横向对比有统计学意义($P<0.01$);西药组服药后 32d 横向与情志造模前横向对比有统计学意义($P<0.01$),说明情绪刺激还是起到一定作用。见表 4。

3.3 脂联素的检测结果

心肌组织和脑海马体中均在基因水平检测出脂联素,将心肌组织和脑组织所含脂联素基因层面结果进行各组含量的对比:在脑海马体中,与空白

组相比,两个模型组脂联素水平均显著降低($P<0.05$),空白组、ISO 模型组同复合模型组 3 组的对比,复合模型组较 ISO 模型组脂联素水平有降低的趋势($P=0.056$),两者在基因层面含量上都低于空白组,说明情绪应激、心血管疾病均可能对脑海马体中的脂联素水平造成一定的影响,引起脂联素水平的降低。同样在心肌组织中,也得出如上结论。如上表所示:益气活血药治疗组具备扭转 mRNA 水平的

作用,相对于复合模型组提升了心肌组织和脑海马体中脂联素的含量,有统计学意义($P<0.05$);西药组在对脂联素含量的影响上仅仅起到提升的趋势($P=0.062$),可能由于药物作用时间等各方面因素,在基因层面作用效果不甚显著,存在继续实验研究探索的价值。见表 5。

表 5 脂联素不同组之间,不同脏器部位的含量对比($\bar{x}\pm s$)

组别	32d		
	脂联素含量整理后数值对比 (仅用于同部位各组间的对比)		
	<i>n</i>	心肌	脑海马体
空白组	10	20.68±2.15	13.98±2.01
ISO 模型组	8	15.75±1.01**	10.38±1.58**
复合模型组	10	15.59±1.52**	9.45±3.15**
中药组	9	17.20±2.08 [#]	12.01±2.65 [#]
西药组	8	16.44±2.04	11.97±2.97

注:与空白组相比,** $P<0.01$,或 <0.05 ;与复合模型组相比,[#] $P<0.01$,或 <0.05

4 讨论

脂联素是由脂肪细胞分泌的一种内源性生物活性多肽,其在机体中可以对脂类和糖类的代谢产生影响^[8]。在心血管疾病和情绪应激的关联性中起着很大的作用,情绪可能影响体内脂联素的含量,所谓的心宽体胖和心情不佳时食欲降低和心情不好想吃东西,抑郁症的人容易消瘦等等这些生活现象与脂肪细胞密切相关,与情绪、脂联素水平也密切相关,脂联素这一含量的变化对心血管疾病有重要的影响,情绪和心血管疾病通过脂联素相关联,是心血管疾病的双心医学基础依据之一^[9]。通过对比药物组和空白组、复合模型组的含量,得出益气活血中药在提升脂联素上有很重要的作用。脑海马体和心肌组织中都存在脂联素的表达,说明两者自身均产生脂联素,两者的协调和关联性,需要进一步的实验数据去验证。最近有相关研究发现,血浆脂联素水平在社会挫败压力应激模型中是降低的,小鼠脑室内注射外源性脂联素后,血浆脂联素水平产生变化,那么作为在担负着记忆、空间定位功能承载者的海马体^[10],其中脂联素含量的变化在情绪

应激刺激下基因层面含量的变化同心肌组织间是分开还相互影响的,就有待于在时间点上,进一步进行实验研究。心肌中脂联素 mRNA 降低可能是由脑海马体、血清脂联素下调引起的。然而,低血清浓度最终决定了转运到心肌的脂联素水平偏低。值得注意的是,无论是心肌还是海马,在益气活血药物的干预下,脂联素水平都逐渐在提升接近正常的水平,这可能就是益气活血药物在治疗心血管疾病的同时,具有调整患者情绪,从整体将疾病导向良性循环的部分原因。

参考文献:

- [1] 张宏,田凤石.注重心理心脏疾患的蔓延[J].天津医药,2014,42(6):573-575.
- [2] 黄培培,郭书文,杨蟠储,等.心肌缺血大鼠血清 TNF- α 、IL-6 变化及益气活血药对其的影响[J].北京中医药大学学报,2010,33(9):614-617.
- [3] 周剑宇.益气活血药防治大鼠心力衰竭心脏重塑的调节机制研究[D].北京:北京中医药大学,2011.
- [4] 秦竹,唐瑶瑶,王臻,等.无忧汤对 CUMS 抑郁症大鼠模型行为学的影响研究[J].云南中医学院学报,2013,36(2):36-39.
- [5] 黄琨,郭书文,杨丹丹,等.益气活血中药对心梗大鼠冠脉微循环内皮损伤分子的影响[J].北京中医药大学学报,2013,36(6):398-340.
- [6] 林晓春,李云鹏,卞艳芳,等.大鼠旷场实验指标检测及参考值的探讨[J].毒理学杂志,2010,24(3):224-225.
- [7] Pineiro R,Iglesias M J,Gallego R,et al. Adiponectin is synthesized and secreted by human and murine cardiomyocytes[J].FEBS Lett,2005,579(23):5163-5169.
- [8] Masaki T,Anan F,Shimomura T,et al. Association between hippocampal volume and serum adiponectin in patients with type 2 diabetes mellitus[J].Metabolism- Clinical and Experimental,2012,61(8):1197-1200.
- [9] Cole J,Costafreda S G,McGuffin P,et al. Hippocampal atrophy in first episode depression: A meta-analysis of magnetic resonance imaging studies[J].Journal of Affective Disorders,2011,134(13):483-487.
- [10] 毛宁,徐聪,崔明湖,等.血清脂联素与老年抑郁症的关系[J].中国老年学杂志,2014,24(2):21-26.

(编辑:杨阳)

(英文摘要见第 9 页)

Establishment of Oxidative Injury Model of SVAREC in Vitro

HUANG Jingjing, SHI Xiaofeng, CHEN Yuchi, XIA Weibiao, JIN Bo, DING Zhishan[△]
(Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT: **Objective** To establish the oxidative damage model of SVAREC. **Methods** SVAREC were cultured in vitro and the growth curves were draw. Different concentration of H₂O₂ were stimulated the cells, and the cell viability were measured by the method of MTS at different time. Under the condition of this model, cellular morphology were observed by inverted microscope, the activity of LDH were measured by microplate reader, the apoptosis rate of cells also were detected by flow cytometry, and Caspase-3 expression were tested by Western blotting. **Results** Compared with control, cells were injured at the concentration of H₂O₂ is 100 μmol/L for 2 h, which, the apoptosis rate and protein expression of Caspase-3 were significantly higher. **Conclusion** The best replication model of this experimental condition is exposure the SVAREC at the 100 μmol/L concentration of H₂O₂ for 2 h.

KEY WORDS: endothelial cells; oxidative stress; H₂O₂; cellular damage; apoptosis

(原文见第1页)

To Study the Effect of Yiqi-huoxue Medicine to the Lever of Adponectin Basing on the Emotion-heart Disease Rats Complex Model

WAN Ting, GUO Shuwen[△], WU Jiani, ZHANG Lu, WU Jiangong,
CHEN Xi, LIU Wenchen, SU Zhaoduo
(Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029)

ABSTRACT: **Objective** The purpose of this article is to through the animal experiment, study the effect of Yiqi-huoxue medicine on the emotional stress of myocardial ischemia model rats, adponectin content in heart and brain, to provide a theoretical ideas and basis for Yiqi-huoxue medicine in prevention and treatment of cardiovascular diseases. **Methods** Adopt the method of intraperitoneal injection of epinephrine (5 mg/kg·d), and chronic unpredictability emotional stimuli to make complexrats under emotional stress state. Animals are divided into five group: Blank group, ISO model group, Complex model group, Chinese medicine group, Western medicine groups. Using ultrasonic electrocardiogram, monitoring method to record the heart function, using the RT-PCR method for determinate the level of adponectin in heart and brain. According to these indexes of every group in the experimental process, respectively to observe contrast the changes of different groups after 14 and 28 days, treatment. **Results** After 32 days, the ejection fraction (EF) of complex model group, and fractional shortening (FS) were lower than those of blank group, the difference was statistically significant ($P<0.01$); adponectin contents in complex model group and ISO model group were higher than that in blank group, the difference was statistically significant ($P<0.01$ or $P<0.05$); adponectin contents in traditional Chinese medicine group and Western medicine group were lower than the complex model group, the difference was statistically significant ($P<0.01$ or $P<0.05$). **Conclusion** The reason why Yiqi-huoxue medicine can increase cardiac ejection fraction of rats in complex model group may be according to its effect on adponectin.

KEY WORDS: Adponectin; Chronic stress; cardiovascular disease; Yiqi-huoxue medicine; emotional stimuli