

壮通饮对大鼠心肌缺血血瘀证内皮素 1 表达的影响*

张世田¹, 黄小珊², 庞路路², 冯悦², 唐汉庆^{1△}, 黄岑汉¹

(1. 右江民族医学院, 广西 百色 533000; 2. 广西中医药大学, 广西 南宁 530200)

摘要: **目的** 观察壮通饮对心肌缺血血瘀证大鼠血清及心肌组织内皮素 1 (endothelin-1, ET-1) 表达的影响, 探讨壮通饮对冠心病心肌缺血的保护作用机制。**方法** 采用左冠状动脉结扎法制作大鼠心肌缺血血瘀证模型, 并随机分为空白、假手术组、模型组、壮通饮低 (6.8g/kg)、中 (13.6g/kg)、高 (27.2g/kg) 剂量组、阳性对照组 7 个组, 灌胃给药治疗 4 周后, 分别采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 和 WB (Western blotting) 法检测大鼠血清及心肌组织 ET-1 的表达。**结果** 血清 ELISA 结果显示, 与空白组、假手术组相比, 模型组 ET-1 的表达明显升高 ($P<0.05$), 药物干预后, 各组均可使 ET-1 降低, 但中剂量组降低 ET-1 效果最明显 ($P<0.05$)。WB 检测结果显示, 模型组 ET-1 的平均灰度值明显高于空白组、假手术组, 药物干预后, 各组均可使 ET-1 平均灰度值降低, 但中剂量组降低效果最明显。**结论** 壮通饮能减少心肌缺血血瘀证大鼠 ET-1 的表达, 缓解血管收缩, 对大鼠心肌缺血有一定的保护作用。

关键词: 壮通饮; 心肌缺血; 血瘀证; 内皮素 1

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2017)03-0011-04

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2017.03.003

冠心病心肌梗死发生后, 心肌缺血缺氧坏死, 心肌收缩力减弱, 心脏泵血功能障碍, 引发血流不畅, 血液淤积在病变血管、心脏及体循环腔内, 瘀血阻络, 形成气虚血瘀之证候, 导致冠心病心肌缺血血瘀证的发生^[1]。现代多项研究表明: 内皮素 1 (endothelin-1, ET-1) 是目前所知缩血管作用最强的物质, 冠心病心肌缺血、心衰患者中内皮素 1 表达增多, 导致血管收缩, 缺血加重, 降低心功能, 还可进一步刺激心肌细胞肥大、成纤维细胞增殖, 导致心肌肥厚, 引起冠心病的发展和心衰加重的病理过程^[2], 因此, 减少 ET-1 的生成, 对冠心病及心衰引起的心肌缺血血瘀证和心室重构具有积极的保护意义。壮通饮 (Zhuangtongyin, ZTY) 是壮医药治疗冠心病的经验用方, 对冠心病心肌缺血所致的血瘀证有一定的改善和治疗作用^[3]。本实验观察壮通饮 (ZTY) 对心肌缺血大鼠血清及心肌组织 ET-1 的表达及影响, 研究 ZTY 对大鼠心肌缺血的保护机制。

1 材料

1.1 动物

SD 大鼠 100 只, SPF 级, 日龄 90d, 体质量 250~300g, 雄性, 由右江民族医学院动物实验中心提供, 动物许可证号: SCXK-2012-0003, 适应性喂养 1 周后进行实验。

1.2 药品和试剂

生理盐水、碘伏、75%酒精, 水合氯醛 (成都市科龙化工试剂厂, 批号: 20150628); ZTY 水煎液 (右江民族医学院门诊部提供, 由扶芳藤、黄花倒水莲、参三七 3 味药组成); 丹参滴丸 (天士力制药股份有限公司, 批号: 151115); ELISA 检测试剂盒 (伊莱瑞特生物科技有限公司, 批号: E-EL-R0167c); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (增强型) (上海碧云天生物技术有限公司, 批号: 060216160810); Anti-Endothelin 1 抗体 (艾博抗 (上海) 贸易有限公司, 批号: ab117757)。

1.3 仪器设备

心电图机 (上海光电医用电子仪器有限公司)

* 基金项目: 国家自然科学基金 (81460658); 广西高校右江流域特色民族药研究重点实验室开放课题 (kft2016026)

收稿日期: 2017-05-15

作者简介: 张世田 (1980-), 男, 山东潍坊人, 在读硕士研究生, 研究方向: 冠心病中西医结合治疗的基础与临床研究。

△通信作者: 唐汉庆, E-mail: phdtanghanqing@163.com

ECG-6511),动物呼吸机(上海玉研科学仪器有限公司 V-100 型),酶标仪(深圳雷杜生命科学股份有限公司 RT-6000)。

2 方法

2.1 动物模型的制备

将 100 只 SPF 级 SD 大鼠给予普通饲料、自由饮水,适应性饲养 1 周后,随机取 10 只为空白对照组,15 只为假手术组,其余 75 只为造模组。假手术组与造模组皆以 10%的水合氯醛 0.35mL/100g,腹腔注射麻醉,气管切开机机械通气,经左侧开胸,暴露心脏,辨认并结扎左冠状动脉前降支^[4],心肌颜色变黯,如果四肢心电图 II 导联出现 R 波高尖、ST 段抬高,缝合切口后置笼中饲养,连续 3d 于大鼠大腿肌肉注射青霉素 10 万 U 预防感染,1 周后测得病理性 Q 波出现并加深,即完成冠心病心肌缺血血瘀证模型制备,造模成功。假手术组,只开胸不结扎。

2.2 分组及给药

造模成功后继续喂养 1 周,随机抽取 12 只一组分别为模型组,治疗组(ZTY 低、中、高剂量组),阳性药物对照组。ZTY 原方由扶芳藤 30g,田七 15g,黄花倒水莲 20g 组成,具体各药用量按 6:3:4 折算。药物文火水煎 2 次过滤去渣,合并水煎液后在液体包装机中浓缩成含生药 1.0g/mL 溶液,过滤除菌,4℃冰箱保存。术后第 1 周起,ZTY 组每天早上 8:00 开始按 6.8g·kg⁻¹(低剂量)、13.6g·kg⁻¹(中剂量)、27.2g·kg⁻¹(高剂量)灌胃,阳性对照组,用复方丹参滴丸同样 8:00 开始按 80mg·kg⁻¹灌胃。余组给予等体积蒸馏水。每天 1 次,连续 4 周。末次给药后 2h 从腹主动脉取血离心后留血清备检,心肌组织梗区用生理盐水冲洗后-80℃冰箱保存。

2.3 ELISA 法检测血清 ET-1 的浓度

取出冰冻血清解冻,按照 ELISA 试剂盒的要求操作配制标准液及样品液体,然后用酶标仪检测标准品和样本的 OD 值,并通过标准曲线计算相应的样本浓度。

2.4 Western blotting 检测心肌组织 ET-1 的表达

取出冰冻心肌组织,用 BCA 法测定上样蛋白浓度,调整上样蛋白浓度达到一致,经过制胶、电泳、转膜、封闭、孵育一抗二抗,曝光条带、扫描胶片取得结果。

2.5 结果处理方法

(1)统计学方法

数据采用 SPSS 23.0 统计软件进行分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,多组计量资料采用单因素方差分析,多样本均数的多重比较采用 LSD 法检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

(2)用医学影像处理软件 Image J2x 分析各组 WB 条带,并求得平均灰度值进行比较。

3 结果

3.1 血清 ET-1 的浓度

大鼠各组血清 ET-1 浓度(表 1),与空白组、假手术组相比,模型组的浓度明显升高($P < 0.05$),与模型组相比,对照组、ZTY 组的浓度降低($P < 0.05$),且 ZTY 中剂量组改善最明显。

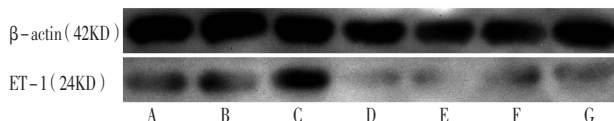
表 1 ZTY 对大鼠心肌缺血血瘀证各组血清 ET-1 浓度的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/(g·kg ⁻¹)	ET-1/(pg·mL ⁻¹)
空白组	8	—	87.50 ± 4.62
假手术组	8	—	93.32 ± 5.94
模型组	8	—	140.82 ± 6.26 ^①
ZTY 低剂量组	8	6.8	107.27 ± 6.24 ^②
ZTY 中剂量组	8	13.6	101.36 ± 5.86 ^②
ZTY 高剂量组	8	27.2	120.97 ± 6.65 ^②
对照组	8	0.08	104.34 ± 4.34 ^②

注:与空白组、假手术组比较,^① $P < 0.05$;与模型组相比,^② $P < 0.05$

3.2 心肌组织 ET-1 的表达

大鼠各组心肌组织 ET-1 的表达如图 1,平均灰度值如表 2,数据结果与肉眼观察基本等同。实验 ET-1 条带中模型组平均灰度值明显高于空白组和假手术组,说明造模后 ET-1 明显升高;用药后,低剂量组、中剂量、对照组平均灰度值较模型组明显降低,而中剂量组降低最明显,说明中剂量药物降低 ET-1 效果最佳。



A.空白组;B.假手术组;C.模型组;D.低剂量组;E.中剂量组;F.高剂量组;G.对照组

图 1 ET-1 表达结果图

表2 Image J2x 分析 WB 条带各组平均灰度值

	空白组	假手术组	模型组	低剂量组	中剂量组	高剂量组	对照组
β -actin	227.86	221.19	220.73	207.82	204.11	195.60	207.81
ET-1	148.50	131.68	176.81	96.08	89.30	133.24	123.08

4 讨论

ET-1 在血管内皮细胞、心肌细胞、平滑肌细胞和成纤维细胞等心血管细胞中均可合成并分泌,是心血管活动的重要调节因子之一,在心血管疾病的病理生理过程中扮演着重要角色^[5]。ET-1 具有丰富的生物学活性。炎症介质如 TNF- α 、干扰素(IFN)- γ 等可增加血管 ET-1 的表达,在高血压患者中,其血浆水平明显升高,可引起平滑肌细胞收缩,血压升高。动脉粥样硬化疾病中,ET-1 可引起阻力血管结构重塑和内皮功能障碍,诱导引起动脉粥样硬化的类脂代谢基因的表达,加速动脉粥样硬化病变。在心衰患者中,ET-1 形成、释放以及 ET 受体表达增加或清除 ET-1 能力下降,使得 ET-1 水平进一步升高,增强了心肌局部的收缩力,具有强烈的正性肌力、诱导心肌肥厚的作用。在糖尿病患者中,循环 ET-1 水平增加,且血浆 ET-1 水平与微血管病变及冠状动脉血管的狭窄程度成正相关,可引起心肌纤维化^[6]。总之,ET-1 是心血管疾病动态平衡的一个关键因素,其循环水平的高低变化将影响许多心血管疾病的发生发展。

ET-1 是最重要的缩血管物质,在动脉粥样硬化和心衰的发生发展过程中起着重要的预示作用,血浆 ET-1 含量变化可以作为判断冠心病严重及冠脉狭窄程度和预后的一个新指标^[7],有研究认为,ET-1 引起的冠脉痉挛被认为是心绞痛发作的原因;在急性冠脉综合征中,ET-1 已被认为是一种新的预后指标;稳定型冠心病患者,ET-1 是心血管预后的独立危险指标^[8];急性心肌梗死患者,ET 早期升高,发病数小时达到高峰,以后逐渐下降,ET-1 水平与有无并发症、心功能状态明显相关,冠心病所致心衰患者,ET 浓度与冠心病的严重程度相平行^[9],因此,降低冠心病和心衰患者 ET-1 的表达,对冠心病及心衰的预后具有一定的保护作用。

ZTY 是依据壮医“三道两路”理论由扶芳藤、参三七、黄花倒水莲 3 味广西特色壮药配伍而成,根据壮医药理论其能疏通“龙路”和“谷道”“水道”“气道”

三道,具有益气活血、补虚消肿、祛风除痛、活血化瘀功效,根据现代药理学研究证实扶芳藤具有抗炎、抗氧化、增强免疫、改善血流变学等保护心脑血管作用^[10],其提取物可下调 ET-1 蛋白表达,维持 ET/NO 平衡,对心微血管内皮细胞缺氧损伤的修复具有一定的作用^[11];参三七就具有抗炎、抗氧化、免疫调节作用^[12],其提取物三七皂苷具有抗动脉粥样硬化、保护缺血损伤的心肌组织、促进血管新生的作用^[13];黄花倒水莲具有清除氧自由基^[14]、抗病毒、抗炎^[15]、抗应激、调节血脂^[16]等作用,3 味药均对心血管具有很好的保护作用^[17]。

本实验研究通过外科手术造成大鼠心肌缺血损伤、心功能降低、血液淤积,建立大鼠心肌缺血血瘀证模型,根据证候辨证,其符合气虚血瘀型心肌缺血血瘀证模型,并通过检测观察到大鼠血清和心肌组织 ET-1 表达增高,其升高原因可能与炎症介质的释放、心功能的降低导致血管内皮细胞、心肌细胞、平滑肌细胞和成纤维细胞合成并分泌 ET-1 有关,用 ZTY 干预后,ET-1 的表达量明显降低,说明 ZTY 能够影响该模型大鼠 ET-1 的表达,使其下调,对大鼠心肌缺血起到较好的保护作用。实验中不同浓度 ZTY 干预的效果差异,可能与药物有效成分的纯度、有效浓度和副作用有关,低剂量可能药效不足,达不到最佳效果,而高剂量可能与其代谢或副作用有关,干扰 ET-1 表达,造成各组数据之间存在差异。

本研究初步证明 ZTY 能减少 ET-1 的生成,缓解血管的收缩,减少心肌缺血缺氧,对冠心病心肌缺血具有较好的保护作用,但对冠心病心肌缺血其他有关发病机制的影响,有待进一步地深入研究和探索。

参考文献:

- [1] 苏鑫. 冠心病血瘀证诊断标准的临床评价研究[D]. 北京:中国中医科学院,2013.
- [2] 刘立旻,张荣成,杨伟宪,等. 大内皮素-1 与肥厚型梗阻性心肌病患者心脏重构的相关性分析[J]. 中国循环杂志,2017,32(1):58-62.
- [3] 庞路路,冯悦,王志威,等. 壮通饮对心血管作用的研究进展[J]. 西部中医药,2016,29(10):142-144.
- [4] 裴之俊,李伏燕,陈义加,等. 新型心肌梗死大鼠模型制备方法的建立和模型鉴定[J]. 检验医学与临床,2015,12(7):937-939.
- [5] Qing P, Li XL, Zhang Y, et al. Association of Big En-

- dothelin-1 with Coronary Artery Calcification [J]. PLoS One, 2015, 10(11): e0142458.
- [6] 董武松, 李馨欣, 杨俊. 内皮素-1 在心血管系统中的作用[J]. 国际心血管病杂志, 2012, 39(3): 153-156.
- [7] Chen J, Chen MH, Guo YL, et al. Plasma big endothelin-1 level and the severity of new-onset stable coronary artery disease [J]. J Atheroscler Thromb, 2015, 22(2): 126-135.
- [8] Zhou BY, Guo YL, Wu NQ, et al. Plasma big endothelin-1 levels at admission and future cardiovascular outcomes: A cohort study in patients with stable coronary artery disease[J]. Int J Cardiol, 2017, 230: 76-79.
- [9] Fan Y, Li S, Li XL, et al. Plasma endothelin-1 level as a predictor for poor collaterals in patients with $\geq 95\%$ coronary chronic occlusion [J]. Thromb Res, 2016, 142: 21-25.
- [10] 许楠, 王旭, 王栋颖. 扶芳藤药理学研究进展[J]. 河南中医, 2014, 34(6): 1179-1181.
- [11] 李成林, 熊世磊, 卢健琪, 等. 扶芳藤对缺氧/复氧损伤后人心内膜微血管内皮细胞内皮素-1 和一氧化氮水平的影响[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(7): 2835-2837.
- [12] 李娟, 王如锋, 杨莉, 等. 三七皂苷类成分及对心血管作用的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(17): 3480-3487.
- [13] 国晶晶, 李来来, 朱会超, 等. 三七主要成分及其免疫调节作用的研究进展 [J]. 天津中医药大学学报, 2014, 33(2): 119-124.
- [14] 李洪亮, 程齐来, 刘涛, 等. 赣南黄花倒水莲水提取物体外清除超氧阴离子活性的实验研究 [J]. 赣南医学院学报, 2016, 36(2): 176-178.
- [15] 寇俊萍, 马仁强, 朱丹妮, 等. 黄花倒水莲水提液的活血、抗炎作用研究[J]. 中药材, 2003, 26(4): 268-271.
- [16] 黄金兰, 钟振国. 黄花倒水莲皂苷类成分调血脂作用及临床应用的研究进展 [J]. 世界中西医结合杂志, 2010, 5(10): 919-920.
- [17] 刘燕平, 黄岑汉. 壮医经验方壮通饮组成药物现代研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2012, 19(6): 111-112.

(编辑: 徐建平)

Effect of Zhuangtongyin on Expression of ET-1 in Rats with Myocardial Ischemia and Blood Stasis Syndrome

ZHANG Shitian¹, HUANG Xiaoshan², PANG Lulu², FENG Yue², TANG Hanqing¹, HUANG Cenhao¹

(1. Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, China;

2. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China)

ABSTRACT: **Objective** To observe the effect of Zhuangtongyin on the expression of ET-1 in serum and myocardium of rats with myocardial ischemia and blood stasis syndrome, and to explore the protective mechanism of Zhuangtongyin on myocardial ischemia in patients with coronary heart disease. **Methods** Rat model of myocardial ischemic blood stasis was established by left coronary artery ligation. The rats were randomly divided into blank, sham operation group, model group, Zhuangtongyin low dose (6.8g/kg), medium (13.6g/kg) (27.2g/kg) and positive control group 7 groups. After 4 weeks of intragastric administration, the expression of ET-1 in serum and myocardium was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and WB (Western blotting). **Results** Serum ELISA results showed that, Compared with the blank group and the sham operation group, the expression of ET-1 in the model group was significantly increased ($P < 0.05$), after treatment, ET-1 could decrease ET-1, but the effect of ET-1 was lower in middle dose group ($P < 0.05$). WB results showed that, the mean gray value of ET-1 in model group was significantly higher than that in blank group, sham operation group, after the intervention, the average gray value of ET-1 was decreased, but the effect of the middle dose group was the most obvious. **Conclusion** Zhuangtong can reduce the expression of ET-1 in rats with myocardial ischemia and blood stasis syndrome, alleviate vasoconstriction, and protect the myocardial ischemia in rats.

KEY WORDS: Zhuangtongyin; myocardial ischemia; blood stasis syndrome; endothelin 1