

壮通饮对大鼠心肌缺血血瘀证血清炎症因子表达的影响^①

张世田¹, 黄小珊², 庞路路², 冯悦², 唐汉庆^{1②}, 黄岑汉¹

(1. 右江民族医学院, 广西 百色 533000 E-mail: 93625430@qq.com;

2. 广西中医药大学, 广西 南宁 530000)

摘要: **目的** 通过建立心肌缺血血瘀证大鼠模型, 观察壮通饮对大鼠心肌缺血血瘀证血清炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-10 表达的影响, 探讨壮通饮对冠心病心肌缺血的保护机制。 **方法** SD 雄性大鼠 70 只, 随机分为空白组、假手术组、模型组、壮通饮(低、中、高剂量)组、复方丹参滴丸对照组(阳性药物组), 每组 10 只。假手术组只开胸不结扎; 造模组通过开胸结扎左冠状动脉前降支制作大鼠心肌缺血血瘀证模型。按照壮通饮低剂量组(6.8 g·kg⁻¹)、壮通饮中剂量组(13.6 g·kg⁻¹)、壮通饮高剂量组(27.2 g·kg⁻¹)、复方丹参滴丸对照组(80 mg·kg⁻¹)的用量配成不同浓度等体积药液灌胃, 余组给予等体积蒸馏水灌胃, 每天 1 次, 连续 4 周后, 大鼠腹主动脉取血, 采用酶联免疫吸附法(ELISA)测定血清 TNF- α 、IL-6、IL-10 表达水平, 心肌 HE 染色。 **结果** ELISA 结果显示, 与空白组、假手术组相比, 模型组 TNF- α 、IL-6、IL-10 的表达明显升高($P < 0.01$), 与模型组相比, 壮通饮组、阳性药物组 TNF- α 、IL-6 的表达明显降低($P < 0.01$), IL-10 的表达明显升高($P < 0.01$), 且中剂量组总体效果较好。HE 染色结果显示, 模型组心肌细胞溶解坏死, 淡染明显, 纤维组织增生, 大量炎症细胞浸润; 药物干预组心肌细胞损伤明显好转、炎症细胞浸润较少。 **结论** 壮通饮能减少冠心病缺血心肌炎症细胞浸润, 降低血清致炎因子、升高抗炎因子的表达, 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; 炎症因子

中图分类号: R542.2

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2017)04-0251-05

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2017.04.001

Effects of Zhuangtongyin (Chinese medicine) on expressions of serum inflammatory factors in rats with myocardial ischemia and blood stasis syndrome

Zhang Shitian¹, Huang Xiaoshan², Pang Lulu², Feng Yue², Tang Hanqing¹, Huang Cenhan¹

(1. Youjiang Medical University For Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China

E-mail: 93625430@qq.com;

2. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530000, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To observe the effects of Chinese medicine Zhuangtongyin (ZTY) on the expressions of serum inflammatory factors TNF- α , IL-6 and IL-10 in rats with myocardial ischemia and blood stasis syndrome by developing rat models of myocardial ischemia and blood stasis syndrome, and to explore the protective mechanism of ZTY on myocardial ischemia in patients with coronary heart disease. **Methods** Seventy SD male rats were randomly divided into a blank control group, a sham operation group, a model group, ZTY low-, medium- and high- dosage groups, and a Compound Danshen Dripping Pills (DSP) group (a positive drug group), 10 rats in each group. The sham group received thoracotomy without ligation; and in the modeling groups, the rat models of myocardial ischemia and blood stasis were developed by ligation the anterior descending branch of the left coronary artery. The rats received intragastric administration with equal volume drug solutions of different concentrations based on the drug dosage using of ZTY low-dosage group (6.8 g/kg), ZTY medium-dosage group (13.6 g/kg) and ZTY high-dosage group (27.2 g/kg) and positive drug control group (80 mg/kg), the rest groups received intragastric administration with equal volume stiller water, once a day.

① 基金项目: 国家自然科学基金项目(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(kfkt2016026)

② 通信作者, E-mail: phdtanghanqing@163.com

After 4 weeks of continuous intragastric administration, blood was drawn from the rats abdominal aorta. The expressions of serum TNF- α , IL-6 and IL-10 were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The infiltration of inflammatory cells was observed by myocardial HE staining. **Results** ELISA results showed that compared to the blank and sham operation groups, the expressions of TNF- α , IL-6 and IL-10 in the model group were significantly elevated ($P < 0.01$); compared to the model group, the expressions of TNF- α and IL-6 in the positive drug group and ZTY group were significantly decreased ($P < 0.01$), IL-10 expression was significantly increased ($P < 0.01$), moreover, the ZTY medium-dosage group had better overall results. HE staining results showed that the myocardial cells of the model group presented dissolved necrosis, light staining, fibrous tissues proliferation, and a large number of inflammatory cells infiltration; and in the drug intervention group, the injured cells were significantly improved, and inflammatory cell infiltration was significantly reduced. **Conclusion** ZTY can reduce the infiltration of inflammatory cells and the expression of serum inflammatory factors in ischemic myocardium of coronary heart disease, and can up-regulate the expressions of anti-inflammatory factors, which has protective effect on myocardial ischemia in rats.

Key words: Zhuangtongyin; myocardial ischemia; Blood Stasis Syndrome; inflammatory factor

冠心病心肌梗死发生后,心肌细胞缺血缺氧坏死,坏死心肌局部发生炎症反应同时激活全身系统性炎症反应,炎症细胞发生趋化运动、聚集并释放大炎症因子,导致心肌细胞溶解、损伤、修复、纤维化等复杂的心肌重构改变^[1],心肌收缩力减弱,心脏泵血功能障碍,引发血流不畅、血流动力学发生改变,瘀血阻络,形成气虚血瘀之病理变化,导致冠心病心肌缺血血瘀证的发生^[2]。炎症反应是引起心肌缺血损伤修复的一个重要机制,并贯穿于疾病发展的整个过程,研究发现,炎症细胞(中性粒细胞、单核细胞、淋巴细胞)及其释放的肿瘤坏死因子(TNF- α),白细胞介素6(IL-6)、白细胞介素10(IL-10)参与心肌缺血损伤、修复及重构的病理变化过程,导致病情的进展及恶化^[3]。壮通饮(Zhuangtongyin, ZTY)是壮医药治疗冠心病的经验用方^[4],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。本实验采用酶联免疫吸附实验(ELISA)检测 ZTY 干预心肌缺血大鼠血清 TNF- α 、IL-6、IL-10 的表达水平,HE 染色观察炎症细胞浸润和心肌损伤情况,研究 ZTY 对大鼠心肌缺血的保护机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 SD 大鼠 70 只,SPF 级,日龄 90 d,体重 250~280 g,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],适应性饲养 1 周后进行实验。

1.1.2 主要药品与试剂 ZTY 中药饮片(右江民族医学院门诊,批号:121002);复方丹参滴丸(天士力制药股份有限公司,批号:151115,规格:27mg/粒);TNF- α 、IL-6、IL-10 ELISA 试剂盒(伊莱瑞特生物科技有限公司,批号分别为:E-EL-R0019c, E-EL-R0015c, E-EL-R0016c)。

1.1.3 仪器设备 ECG-6511 心电图机(上海光电医用电子仪器有限公司),V-100 型动物呼吸机(上海玉研科学仪器有限公司),RT-6000 酶标仪(深圳雷杜生命科学股份有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组、造模、给药 将 70 只 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,10 只为假手术组,其余 50 只为造模组。假手术组与造模组皆以 10% 的水合氯醛 0.35 ml/100 g,腹腔注射麻醉,气管切开机械通气,经左侧开胸,暴露心脏,辨认并结扎左冠状动脉前降支近段,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,一周后测得病理性 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。造模成功后继续喂养 1 周,随机抽取 10 只为模型组,10 只为 ZTY(低、中、高剂量)组,10 只为复方丹参滴丸对照组。ZTY 原方由扶芳藤 30 g、田七 15 g、黄花倒水莲 20 g 组成,具体各药用量按 6:3:4 折算。药物文火水煎二次过滤去渣,合并水煎液后在液体包装机中浓缩成含生药 1.0 g/ml 溶液,过滤除菌,4℃ 冰箱保存。术后第 1 周起,ZTY 组每天早上 8:00~10:00 开始按低(6.8 g·kg⁻¹)、中(13.6 g·kg⁻¹)、高(27.2 g·kg⁻¹)配制成不同浓度等体积(3 ml)药液灌胃,复方丹参滴丸对照组,用复方丹参滴丸同样早上 8:00 开始按 80 mg·kg⁻¹(3 ml)灌胃。余组给予等体积蒸馏水灌胃。每天 1 次,连续 4 周。

1.2.2 取材 末次给药后 2 h 从腹主动脉取血,离心后留血清备检,心肌梗死边缘区用生理盐水冲洗后以 10% 的甲醛固定做 HE 染色。

1.2.3 检测指标 ①ELISA 法检测大鼠血清 TNF-

α 、IL-6、IL-10 表达水平。②心肌组织 HE 染色。参照常规苏木精-伊红(HE)染色步骤。

1.2.4 统计学方法 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,组间两两比较,方差齐时采用 LSD 法检验,方差不齐时采用秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠血清炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-10 表达水平 大鼠各组血清炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-10 表达的实验结果见表 1,假手术组与空白对照组相比炎症

因子表达无显著变化($P > 0.05$);与空白组、假手术组相比,模型组 TNF- α 、IL-6、IL-10 的表达明显升高($P < 0.01$);与模型组相比,ZTY(低、中、高剂量)组、复方丹参滴丸对照组 TNF- α 、IL-6 的表达明显降低($P < 0.01$),IL-10 的表达明显升高($P < 0.01$);与 ZTY 低剂量组比较,ZTY 中剂量组、ZTY 高剂量组、复方丹参滴丸对照组 TNF- α 、IL-6 的表达明显降低($P < 0.01$),IL-10 的表达差异无统计学意义($P > 0.05$);ZTY 中剂量组、ZTY 高剂量组、复方丹参滴丸对照组组间比较,TNF- α 、IL-6、IL-10 的表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 大鼠各组血清炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-10 表达

组别	<i>n</i>	剂量 (g · kg ⁻¹)	TNF- α ($\bar{x}\pm s$, pg/ml)	IL-6 ($\bar{x}\pm s$, pg/ml)	IL-10 ($\bar{x}\pm s$, pg/ml)
空白组	10	—	101.18±6.53	73.37±3.02	22.75±3.19
假手术组	10	—	103.80±5.84	74.01±3.46	22.64±3.54
模型组	10	—	171.52±6.43 ^a	104.25±4.06 ^a	29.12±3.87 ^a
ZTY 低剂量组	10	6.8	134.25±5.93 ^b	91.87±3.09 ^b	36.87±2.64 ^b
ZTY 中剂量组	10	13.6	119.57±5.64 ^{bed}	81.75±3.19 ^{bed}	37.12±2.85 ^{bd}
ZTY 高剂量组	10	27.2	116.80±6.61 ^{bed}	82.75±3.45 ^{bed}	36.62±3.33 ^{bd}
复方丹参滴丸对照组	10	0.08	121.07±5.85 ^{bed}	83.52±2.45 ^{bed}	36.53±3.07 ^{bd}

注:与空白组、假手术组比较,a: $P < 0.01$;与模型组比较,b: $P < 0.01$;与 ZTY 低剂量组比较,c: $P < 0.01$;ZTY 中剂量组、ZTY 高剂量组、复方丹参滴丸对照组组间比较,d: $P > 0.05$

2.2 心肌组织 HE 染色结果 大鼠各组心肌组织 HE 染色结果见图 1,空白对照组、假手术组(图 1A、图 1B):心肌细胞排列整齐,层次清楚,染色、胞质均匀,细胞核清晰可见,未见炎症细胞浸润。模型组(图 1C):心肌细胞溶解坏死、肿胀、断裂、淡染,大量纤维组织增生、结构排列紊乱,并有大量炎症细胞浸润。ZTY(低、

中、高剂量)组及复方丹参滴丸对照组(图 1D、图 1E、图 1F、图 1G):心肌细胞溶解坏死、淡染减轻,纤维组织增生不明显,炎症细胞浸润相对较少,炎症反应较模型组明显好转,中剂量组炎症反应较其他用药组好转明显。

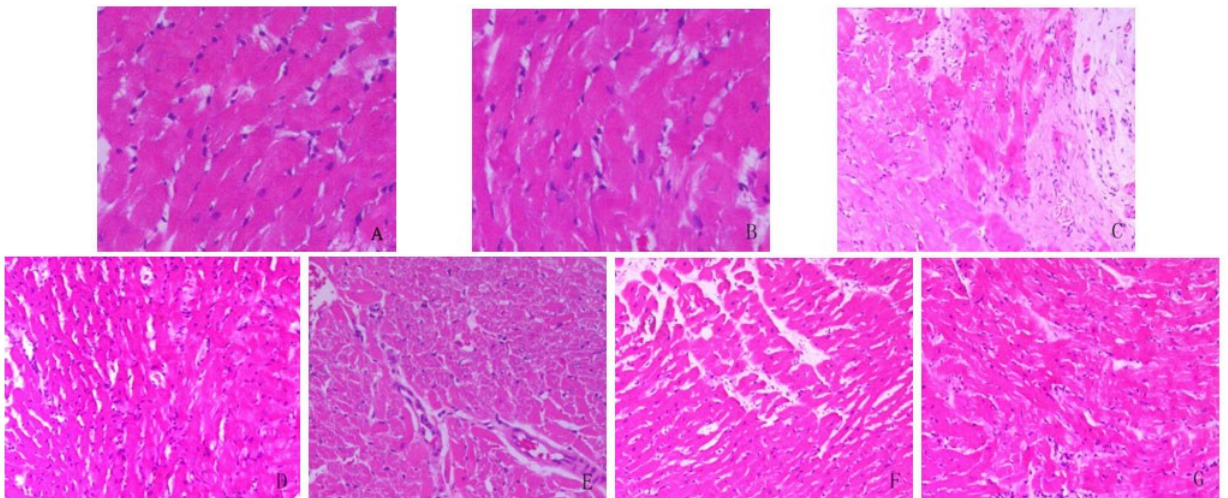


图 1 大鼠各组心肌组织 HE 染色(10×20 倍)

注:A:空白对照组;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:复方丹参滴丸对照组

3 讨论

现代研究证实^[5],冠心病的发生发展与内皮损伤引起的炎症反应密切相关,心肌梗死后心肌缺血坏死会加剧炎症反应,引发白细胞趋化运动,单核-巨噬细胞、淋巴细胞在坏死心肌部位聚集,局部发生炎症反应同时激活全身炎症反应系统,引起炎症细胞活化和炎症因子释放,淤血症状加重、血栓形成,心肌持续缺血损伤,增强嗜中性粒细胞与心肌细胞的粘附作用,形成恶性循环,进一步加重心肌细胞的损伤和心脏功能的减弱^[6]。炎症细胞的浸润情况和炎症因子水平的高低反映冠心病急性心肌梗死的严重程度^[7],因此,控制炎症反应,对心肌缺血损伤具有较好的保护作用。

炎症细胞趋化、聚集后可激活补体,并刺激肥大细胞释放 TNF- α 、白细胞、单核巨噬细胞聚集可释放 IL-6^[8]。TNF- α 、IL-6 可诱导心肌炎症反应,促进心肌细胞凋亡、坏死和纤维化,并参与心肌梗死心肌细胞的修复和重塑过程^[9],使心功能得以代偿,但其炎症反应可使心肌细胞造成持续缺血损伤,本实验病理结果显示模型组心肌炎症细胞浸润明显,血清 TNF- α 、IL-6 显著高于空白组、假手术组,证实了心肌缺血坏死的发生与炎症细胞和炎症因子引起炎症损伤有关,而用药后炎症细胞浸润减少、炎症因子下降,说明 ZTY 可抑制炎症细胞聚集和炎症因子的生成,抑制炎症反应,对心肌缺血和损伤有一定的保护作用。

IL-10 是一种公认的炎症与免疫抑制因子,由单核细胞、T 淋巴细胞生成,具有多种免疫活性^[10]。IL-10 可调控炎症反应,抑制炎症细胞、炎性因子生成,降低血清中炎症细胞的聚集和趋化运动,升高血液中的抗炎因子,减少 TNF- α 、IL-6 等促炎因子生成,调控纤维蛋白原和调节 ICAM 的表达,抑制或促进炎症初期单核巨噬细胞对血管内皮的吸附、调节 T 细胞(Th1/Th2)间的活化平衡,影响动脉平滑肌细胞的增生,对血管内皮细胞、心脏及血管功能的恢复有很好的保护作用^[11];其还可改善机体免疫状态,诱导缺血心肌血管新生和侧枝循环形成,改善心脏供血。本实验结果显示模型组 IL-10 升高,可能与对抗炎症因子引起的炎症反应性增高有关,而用药后 IL-10 各剂量组高于模型组,可能与缺血损伤持续存在有关,并起到持续抑制炎症的作用。

ZTY 是依据壮医“三道两路”理论,由“扶芳藤、参三七、黄花倒水莲”三味广西特色壮药配伍而成,能疏通人体“龙路”,协调“谷道”、“水道”、“气道”三道作用,以改善人体血液循环,保持代谢通畅^[12-13]。依据中医学理论,其具有益气活血、补虚消肿、祛风除痛、活血化瘀之功效^[14],而在现代实验及药理学研究中,多种研究证实扶芳藤具有抗氧化、增强免疫、改善血流变学等保

护心脑血管的作用,其提取物对心微血管内皮细胞缺氧损伤的修复具有一定的作用^[15];参三七具有抗炎、免疫调节作用,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^[16];黄花倒水莲具有清除氧自由基、抗病毒、抗炎、抗应激、调节血脂等作用^[17-18],三味药对心血管损伤均具有较好的保护作用。

观察本实验结果发现,心肌缺血坏死,炎症细胞聚集,心肌细胞溶解坏死,血清炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-10 升高,用 ZTY 干预后,血清 TNF- α 、IL-6 降低,IL-10 升高,说明 ZTY 具有对抗炎症细胞聚集和炎症因子释放的作用,能够对大鼠心肌缺血起到较好的保护作用,其机制可能是与调节白细胞趋化运动,单核细胞、淋巴细胞等炎症细胞的聚集、释放有关。实验中不同剂量组的 ZTY 干预的效果有较大差异,虽然中高剂量组效果最好,与阳性药物组疗效相似,但高剂量组大鼠精神状态、手术耐受性较中剂量组明显较差,其组间数据差异可能与药物的最低有效量、代谢及毒副作用有关,低剂量可能药效不足,达不到最佳效果,而高剂量可能超过自身代谢能力、毒副作用较大,结合上述分析,中剂量组总体疗效最好。

参考文献:

- [1] Montecucco F, Liberale L, Bonaventura A, et al. The Role of Inflammation in Cardiovascular Outcome [J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2017, 19(3):11.
- [2] 郭书文,杨蟠储,郑承龙,等. 益气活血中药联合常规西药治疗冠心病心肌缺血气虚血瘀证临床研究[J]. *中国中医药信息杂志*, 2012, 19(9):15-17.
- [3] 杨亚莉,李艳红,刘艳琼. 丹参注射液对急性心肌梗死患者炎症因子的影响[J]. *陕西中医*, 2015, 36(3):282-283.
- [4] 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.
- [5] Meeuwse JAL, Wesseling M, Hoefler IE, et al. Prognostic Value of Circulating Inflammatory Cells in Patients with Stable and Acute Coronary Artery Disease [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2017, 4:44.
- [6] Madrid-Miller A, Chavez-Sanchez L, Careaga-Reyna G, et al. Clinical outcome in patients with acute coronary syndrome and outward remodeling is associated with a predominant inflammatory response [J]. *BMC Res Notes*, 2014, 7:669.
- [7] Patel KD, Duggan SP, Currid CA, et al. High sensitivity cytokine detection in acute coronary syndrome reveals up-regulation of interferon gamma and interleukin-10 post myocardial infarction [J]. *Clin Immunol*, 2009, 133(2):251-256.
- [8] 王皓娟,赵晓辉. 急性心肌梗死患者 PCI 后白介素-6 与 10

- 的变化及其意义[J]. 心血管康复医学杂志, 2012, 21(4): 372-374.
- [9] Cen W, Chen Z, Gu N, et al. Prevention of AMI Induced Ventricular Remodeling: Inhibitory Effects of Heart-Protecting Musk Pill on IL-6 and TNF-Alpha[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2017, 2017: 3217395.
- [10] 刘虹, 徐庆科, 夏伟, 等. 冠心病与炎症因子 IL-6、IL-8、IL-10、hs-CRP 及 TNF 的相关性研究[J]. 实用心脑血管病杂志, 2011, 19(9): 1446-1447.
- [11] 张洋, 王明春, 阿日棍, 等. 丹参(冻干)粉针对大鼠心肌缺血/再灌注损伤的 IL-6 和 IL-10 的影响[J]. 中医药学报, 2016, 44(3): 30-32.
- [12] 唐汉庆, 黄岑汉, 赵玉峰, 等. 壮医“三道两路”理论的辨析及应用[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(12): 4236-4239.
- [13] 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.
- [14] 李云鹤, 王晓梅. 试论中药三七对血液系统的药理药效作用[J]. 中国现代药物应用, 2016, 10(8): 253-254.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] 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, 189.
- [18] 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.

收稿日期: 2017-05-07; 修回日期: 2017-08-21

《右江民族医学院学报》采编系统启用通告

为适应信息化时代期刊发展的需要, 缩短审稿流程, 加快稿件处理速度, 方便作者投稿和专家审稿, 本刊自 2015 年 10 月 1 日起至 2015 年 10 月 31 日期间试运行期刊采编系统, 2015 年 11 月 1 日起正式投入使用。

登录本刊网站 <http://yjmzyxy.cnjournals.com/> 即可进入采编系统平台进行投稿或审稿。该采编系统平台由作者在线投稿、专家在线审稿、主编在线办公和编辑在线办公四部分组成。作者进行在线投稿并可查询稿件的处理进度, 审稿专家从专家登录口进入审稿中心可进行稿件审阅。试运行期间作者可使用原学报投稿邮箱 yyxb1979@126.com, 自 2015 年 11 月 1 日起正式启用期刊采编系统后, 学报投稿邮箱停止使用投稿功能。敬请广大读者、投稿作者、审稿专家使用本系统, 并向编辑部反馈意见, 以不断对系统进行改进。如您在操作上遇到任何问题, 请与编辑部联系: 0776-2843414。感谢您对本刊的关注与支持! 欢迎踊跃投稿!



扫一扫

《右江民族医学院学报》编辑部