

# 益气活血组方对大鼠缺血心肌血管新生作用及对血管内皮生长因子和碱性成纤维生长因子的影响

胡国恒<sup>1</sup> 朱荣华<sup>2</sup> 肖 青<sup>2</sup> 边冠积<sup>2</sup>

(1 湖南中医药大学第一附属医院,长沙,410007; 2 湖南中医药大学研究生院,长沙,410208)

**摘要** 目的:探讨益气活血组方对急性心肌梗死后大鼠缺血心肌组织血管新生作用和对血管内皮生长因子(VEGF)和碱性成纤维生长因子(bFGF)表达的影响。方法:建立心梗模型后,将 40 只雄性 SD 大鼠,采用随机数字表法分为 4 组:模型组、假手术组、麝香保心丸、益气活血组方。运用免疫组化法检测梗死心肌边缘区微血管计数(MVC)和微血管密度(MVD)及 VEGF 和 bFGF 表达;同时应用 Western blot 技术检测各组大鼠缺血心肌 VEGF 和 bFGF 蛋白质水平表达变化。结果:益气活血组方和麝香保心丸组分别与模型组比较,梗死心肌边缘区微血管计数和微血管密度都显著高于后者( $P < 0.01$ )。益气活血组方、麝香保心丸组中缺血心肌 VEGF 和 bFGF 表达以及其蛋白表达水平较其余组显著升高( $P < 0.01$ )。结论:益气活血组方能明显促进心梗后大鼠缺血心肌血管新生,上调心肌 VEGF 和 bFGF 蛋白表达可能是其中一个重要的作用机制。

**关键词** 益气活血;血管新生;血管内皮生长因子;碱性成纤维生长因子

## Effect of Yiqi huoxue Decoction on Angiogenesis and Expression of VEGF and bFGF in the Ischemic Myocardium of Rats

Hu Guoheng<sup>1</sup>, Zhu Ronghua<sup>2</sup>, Xiao Qing<sup>2</sup>, Bian Guanji<sup>2</sup>

(1 The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China;

2 Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

**Abstract Objective:** To investigate the effects of Yiqi Huoxue Decoction on the angiogenesis and the protein expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor(bFGF) in the ischemic myocardium of rats with acute myocardial infarction. **Methods:** After the animal model of acute myocardial infarction (AMI) in rats is established, 40 males SD rats were divided into 4 groups by random number table: model group, sham operation group, Shexiangbaixin group and Yiqi Huoxue Formula group. The microvessel count(MVC), microvessel density (MVD) and expression of VEGF and bFGF in the ischemic myocardium were detected by immunohistochemistry. The change levels of VEGF and bFGF protein in the ischemic myocardium were detected by Western blot. **Results:** Yiqi Huoxue Formula group and Shexiangbaixin group were compared with the model group, the infarcted myocardium edge area of microvessel count and microvessel density were significantly higher than that of the latter( $P < 0.01$ ). The expression of VEGF and bFGF about Yiqi Huoxue Formula group and Shexiangbaixin group and its protein expression level was significantly increased compared with the other groups( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Yiqi Huoxue Formula group can significantly promote local angiogenesis in ischemic myocardium of rats after myocardial infarction, upregulation of myocardial VEGF and bFGF protein may be one of important mechanisms.

**Key Words** Yiqi Huoxue; Angiogenesis; VEGF; bFGF

中图分类号:R289.9;R364 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2017.10.036

本实验通过对益气活血组方对急性心肌梗死大鼠缺血心肌血管新生的影响的观察,并且应用免疫组织化学法检测大鼠缺血心肌微血管计数(MVC)和微血管密度(MVD)及血管内皮生长因子(VEGF)和碱性成纤维生长因子(bFGF)表达,更进一步地解释益气活血组方保护缺血心肌细胞,恢复心肌细胞功能,以及促进血管新生的机制,为急性心肌梗死的

中医治疗提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 动物 健康雄性 SD 大鼠,体重(230 ± 20)g,所有实验大鼠均由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供。

1.1.2 药物 益气活血组方(湖南中医药大学第一

附属医院研制)总共由4味药组成:黄芪50 g、当归10 g、川芎25 g、丹参25 g;麝香保心丸:批准文号为国药准字Z31020068;由上海和黄药业有限公司提供。

1.1.3 试剂与仪器 进口石蜡购于徕卡仪器有限公司(德国);苏木素-伊红购于Sigma公司(美国);兔抗鼠多克隆抗体CD34、VEGF、bFGF,山羊抗兔IgG均购于Proteintech三鹰(德国);DAB显色试剂盒购于博士德生物公司(武汉);红细胞裂解液购于Solarbio公司(上海);DH-140小动物呼吸机购于奥尔特生物科技有限公司(上海);Nihon Kohden型心电图机购于光电医用电子仪器公司(上海);低温高速台式离心机购于贺利氏公司(德国);石蜡切片机、石蜡包埋机及冷冻台购于Leica公司(德国);流式细胞计数仪购于BD公司(美国)。

## 1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 将40只雄性SD大鼠采用完全随机的原则,共等分成假手术组、模型组、麝香保心丸组、益气活血组方组,每组10只大鼠。大鼠饲养1周后开始造模,心肌梗死模型参照文献<sup>[1-2]</sup>复制。首先用10%水合氯醛按0.3 mL/100 g比例,经腹腔麻醉动物,然后气管切开,插管,连接小动物呼吸机,在第3~4肋间逐层打开胸腔,剪开心包膜、彻底暴露心脏,最后用1根零号医用缝合线结扎左前降支,以心电图出现QRS波群增高、增宽、ST段抬高为结扎成功标志,逐层关胸。假手术组只穿线不结扎,余步骤基本相同。

1.2.2 给药方法 假手术组:每日用等体积蒸馏水灌胃。模型组:每日用等体积蒸馏水灌胃。麝香保心丸组:正常60 kg体重的成人,每日所需剂量为135 mg,大鼠给药剂量的换算按成人与大鼠剂量的体表面积系数来计算,大鼠每日所需剂量为3.10 mg,将其溶于等体积蒸馏水中灌胃。益气活血组方:正常60 kg体重成人,每日剂量为原方粉碎后100 g,计算方法同上,换算成大鼠的剂量为2.29 g,同样溶于等体积蒸馏水中灌胃。手术后24 h开始进行灌胃,每天只灌胃1次,持续2周。

1.2.3 标本留取 最后1次灌胃后,所有大鼠禁止喂食24 h,只给水,予以颈髓离断法处死后,立即开胸,留心脏标本。因造模手术后大鼠死亡及取材时心脏标本筛选,最后从4个组里面选取了6个心脏标本用于指标检测。在约为心脏乳头肌平面将心脏横切为上下两份,近心尖部梗死区用10%甲醛液固定,4℃冰箱保存,用于免疫组织化学染色及心肌微

血管数及微血管密度等检测;近心底部迅速冻存于-80℃冰箱。

1.2.4 大鼠梗死心肌边缘区MVC和MVD指标和检测方法 血管内皮细胞被CD34标记后,采用免疫组织化学染色的方法,通常会被染成棕黄色。至于判断微血管的标准以及微血管计数的方法则完全按照参考文献<sup>[3-4]</sup>进行。每张切片采用随机的原则,选取5个视野,分别测定MVC、MVD的数值,取它们的平均数作为最后的数据。

1.2.5 大鼠梗死心肌边缘区VEGF和bFGF表达的检测(免疫组织化学法) 在光镜下面观察,VEGF和bFGF的阳性表达以细胞内出现棕黄色或黄色颗粒沉着。最后使用病理图像分析系统,计算梗死边缘区心肌每视野( $\times 400$ )中平均吸光度。每张切片随机选取5个视野,取其平均值作为本例大鼠的吸光度(A)值。

1.2.6 大鼠梗死心肌边缘区VEGF和bFGF蛋白水平检测(Western blot) 首先将心肌匀浆蛋白从-80℃冰箱中取出后,然后对浆液进行复温处理,取蛋白上清,按照SDS-PAGE凝胶配置试剂盒说明书的要求,进行电泳,转膜,封闭,然后加入一抗(1:1 000)(兔抗鼠VEGF、bFGF),将其放置在室温环境下,孵育2 h,洗涤后加入二抗,同样在室温条件下再孵育2 h,再洗涤,放置ECL发光剂中,显影,定影,蒸馏水冲洗终止,再使用凝胶图像处理系统分析结果。内参使用 $\beta$ -actin,以VEGF/ $\beta$ -actin和bFGF/ $\beta$ -actin灰度比值作为统计量。

1.3 统计学方法 选用SPSS 19.0统计软件处理数据,所有实验数据采用平均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 大鼠梗死心肌边缘区MVC和MVD比较 益气活血组方分别与模型组和假手术组比较,麝香保心丸与模型组和假手术比较,益气活血组方与麝香保心丸组比较,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表1。

2.2 大鼠梗死心肌边缘区VEGF和bFGF的表达

在光镜下,4组大鼠心肌组织都可见棕黄色或黄色阳性表达。益气活血组方分别与假手术组和模型组比较,麝香保心丸分别与假手术和模型组比较,益气活血组方与麝香保心丸组比较,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表2。

表 1 4 组大鼠梗死心肌边缘区微血管计数 (MVC) 和微血管密度 (MVD) 比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别     | 鼠数 | MVC                | MVD               |
|--------|----|--------------------|-------------------|
| 假手术组   | 6  | 120.00 ± 19.59     | 0.014 ± 0.004     |
| 模型组    | 6  | 161.17 ± 12.42 *   | 0.023 ± 0.004 *   |
| 麝香保心丸组 | 6  | 207.67 ± 31.46 *△  | 0.039 ± 0.004 *△  |
| 益气活血方组 | 6  | 252.67 ± 37.56 *△▲ | 0.049 ± 0.009 *△▲ |

注:与假手术组比较,\* $P < 0.05$ ;与模型组比较,△ $P < 0.05$ ;与麝香保心丸组比较,▲ $P < 0.05$

表 2 4 组大鼠梗死心肌边缘区血管内皮生长因子 (VEGF) 和碱性成纤维生长因子 (bFGF) 的表达 ( $\bar{x} \pm s, A$ )

| 组别     | 鼠数 | VEGF              | bFGF              |
|--------|----|-------------------|-------------------|
| 假手术组   | 6  | 0.158 ± 0.031     | 0.160 ± 0.042     |
| 模型组    | 6  | 0.257 ± 0.041 *   | 0.255 ± 0.018 *   |
| 麝香保心丸组 | 6  | 0.380 ± 0.024 *△  | 0.347 ± 0.026 *△  |
| 益气活血组方 | 6  | 0.433 ± 0.039 *△▲ | 0.393 ± 0.031 *△▲ |

注:与假手术组比较,\* $P < 0.05$ ;与模型组比较,△ $P < 0.05$ ;与麝香保心丸组比较,▲ $P < 0.05$

2.3 VEGF 和 bFGF 的免疫组织化学染色结果 镜下观察 (×400),在假手术组中,可见少许散在的棕黄色淡染细胞;模型组可见梗死周边阳性细胞有少量片状分布;麝香保心丸组见梗死周边区有较多 VEGF 阳性表达;益气活血方组见梗死周边有大量 VEGF 阳性表达。bFGF 与 VEGF 阳性表达结果相近,益气活血方组稍高于麝香保心丸组,两者阳性表达显著高于假手术组和模型组 (图 1,图 2)。

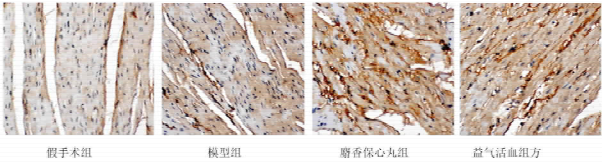


图 1 4 组心肌 VEGF 免疫组织化学染色 (×400)

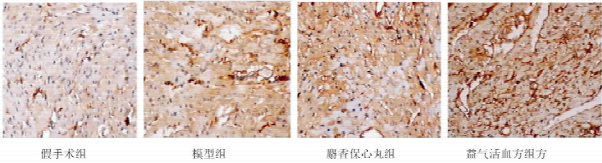


图 2 4 组心肌 bFGF 免疫组织化学染色 (×400)

2.4 4 组大鼠的梗死心肌的边缘区域 VEGF, bFGF 蛋白的表达 益气活血组方分别与假手术组和模型组比较,麝香保心丸组与假手术组和模型组比较;模型组和假手术组比较,差异均统计学意义 ( $P < 0.05$ ) (图 3,图 4)。

3 讨论

急性心肌梗死 (Acute Myocardial Infarction, AMI) 是心肌的急性缺血性坏死,它是在冠状动脉病变的基础上,出现冠状动脉供血急剧减少或者中断<sup>[5]</sup>。目前治疗 AMI 的方法主要有以下 4 种:药物

治疗;经皮冠状动脉介入治疗 (PCI);经冠状动脉旁路移植术 (CABG);骨髓间充质干细胞 (BMSCS) 移植术。由于受多种因素应用的限制,目前临床常应用前 3 种治疗方案进行治疗<sup>[6]</sup>。药物治疗是最基本的治疗措施,西药治疗有许多不良反应,且单用西药疗效不是很好,在这方面,中医药对 AMI 的治疗具有良好的疗效。

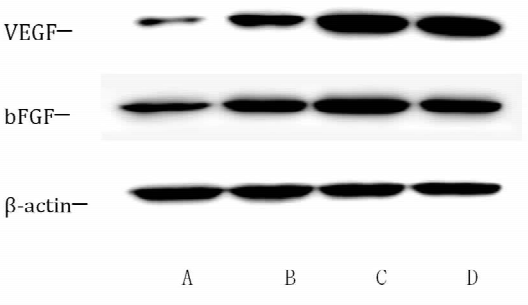


图 3 4 组 Western blot 结果条带

注:A 为假手术组,B 为模型组 (B),C 为益气活血组方组,D 为麝香保心丸组

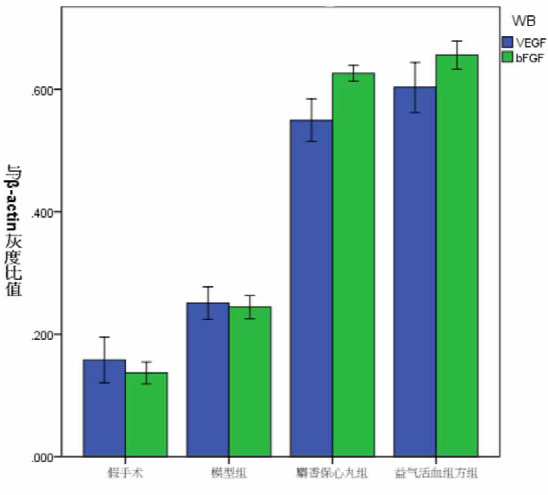


图 4 4 组大鼠梗死心肌的边缘区域 VEGF, bFGF 蛋白表达比较

AMI 在中医属于为“胸痹”“心痛”范畴,张仲景就曾在《金匱要略》中写道:“夫脉当取太过不及,阳微阴弦,即胸痹而痛”<sup>[7]</sup>。阳微即是本虚,阴弦即是标实,而气虚血瘀是 AMI 最常见的发病机制。一切疾病的发生都离不开邪盛与正虚 2 个方面,因此治疗上应祛邪与扶正相结合。益气活血组方正是基于此病机而创立的,全方由黄芪、当归、丹参、川芎四药组成。全方共奏益气活血通络。本方中黄芪<sup>[8-9]</sup>、当归<sup>[10-11]</sup>、川芎<sup>[12]</sup>等药物,能够增加侧支循环,增加血流灌注量,保护缺血心肌。并且既往实验研究表明<sup>[13]</sup>,益气活血组方可以通过防治和逆转心肌缺血这一机制得以防止心梗症状的加重,且其改善心肌缺血与促进缺血心肌血管新生具有相关性,提示益

气活血中药治疗冠心病的重要机制之一可能就是促血管新生。

VEGF 和 bFGF 是促血管新生因子中最主要的 2 个。在血管新生中, VEGF 是最为关键的一个因子, 它可以调节内皮细胞胞外基质溶解、内皮细胞迁移、增生和管腔形成。bFGF 是当前研究最多、生物效应最强、作用最广泛的成纤维细胞生长因子 (FGF) 之一<sup>[14]</sup>, 在体内和体外均能明显促进新生血管形成<sup>[15]</sup>。近来有研究证实, 两者在促进血管新生方面有着十分紧密的联系。

本实验结果显示: 益气活血组方与模型组比较, 微血管计数与微血管密度显著增加 ( $P < 0.01$ ); 益气活血组方稍高于麝香保心丸组 ( $P < 0.05$ ); 表明益气活血组方确实能够促进血管新生。通过对各组大鼠梗死边缘区心肌 VEGF 和 bFGF 表达的检测, 结果显示: 益气活血组方与模型组比较, 心梗边缘区域 VEGF 和 bFGF 阳性表达显著增加 ( $P < 0.01$ ); 益气活血组方与麝香保心丸比较阳性表达稍高 ( $P < 0.05$ ); 表明益气活血组方促进血管新生, 可能与促进 VEGF 和 bFGF 的表达有关。同时通过运用 Western blot 技术, 检测各组大鼠梗死心肌边缘区域中的 VEGF, bFGF 的蛋白水平, 结果显示: 益气活血组方大鼠梗死心肌边缘区域 VEGF 和 bFGF 蛋白水平显著提升, 明显高于模型组 ( $P < 0.01$ ), 稍高于麝香保心丸组 ( $P < 0.05$ )。通过对本实验数据进行整理, 分析, 不难得出 MVC、MVD 与 VEGF 和 bFGF 蛋白表达呈正相关这一结论, 这一结果表明益气活血组方促进缺血心肌血管新生的机制与促进 VEGF 和 bFGF 蛋白的表达相关。但具体作用机制, 还有待进一步研究。

#### 参考文献

[1] 李鑫辉, 张炳填, 喻嵘. 栝蒌薤白半夏汤对急性心肌缺血大鼠保护

作用的研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2009, 29(1): 19-21, 25.

[2] 臧文华, 殷沈华, 唐德才, 等. 补气活血药对急性心肌梗死模型大鼠梗死心肌边缘区域新生血管的影响[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(5): 901-906.

[3] 胡国恒, 胡哲, 盛望, 等. 益气活血方对大鼠缺血心肌血管新生及 HGF 影响的研究[J]. 中国中医急症, 2013, 22(9): 1478-1479, 1484.

[4] 何涛, 胡姗, 侯小涛, 等. 甘蔗叶多糖对大鼠心肌梗死心电图及微血管生成的影响[J]. 广西医科大学学报, 2016, 33(2): 229-231.

[5] 王旭东. 急性心肌梗死的早期诊断与治疗[J]. 中国医刊, 2009, 44(7): 2-4.

[6] 赵艳. 急性心肌梗死治疗进展[J]. 数理医药学杂志, 2016, 29(4): 563-564.

[7] 陈颖. 张仲景治疗胸痹思想探析[J]. 亚太传统医药, 2015, 11(6): 59-60.

[8] 王欣昌. 参麦联合黄芪治疗对冠心病心功能不全患者 BNP 的影响[J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2015, 3(35): 55-56.

[9] 刘暖, 杨雷, 毛秉豫, 等. 黄芪提取物对大鼠心肌梗死后心肌组织血管新生的作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(19): 92-96.

[10] 陈海军, 潘立群. 当归补血微囊促血管新生中 JAK2/STAT3 通路的作用研究[J]. 南京中医药大学学报, 2016, 32(4): 342-346.

[11] 董晴, 陈明苍. 当归化学成分及药理作用研究进展[J]. 亚太传统医药, 2016, 12(2): 32-34.

[12] 胡代槐. 川芎清脑颗粒治疗椎基底动脉供血不足致脑性眩晕的临床观察[J]. 中国医药, 2014, 9(1): 54-57.

[13] 吴成哲, 黄朝忠, 纪凯, 等. 益气活血方对实验性心肌梗死大鼠促血管新生机制研究[J]. 云南中医中药杂志, 2014, 35(9): 83-85.

[14] 张秋雁, 苏剑峰, 王权礼, 等. 血府逐瘀汤超微饮片和传统饮片对急性心肌梗死大鼠缺血心肌血管新生及 bFGF、ANG-1 表达影响的比较研究[J]. 中医研究, 2010, 23(11): 21-24.

[15] 伊海英, 孙晓艳, 付小兵, 等. 碱性成纤维细胞生长因子的研究进展[J]. 解放军医学杂志, 2008, 33(6): 776-778.

(2016-12-22 收稿 责任编辑: 杨觉雄)

(上接第 2418 页)

[18] Creatsas G, Deligeorgiou E, Zachari A, et al. Prostaglandins; PGF2 alpha, PGE2, 6-keto-PGF1 alpha and TXB2 serum levels in dysmenorrheic adolescents before, during and after treatment with oral contraceptives[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 1990, 36(3): 292-298.

[19] 华永庆, 洪敏, 朱荃. 原发性痛经研究进展[J]. 南京中医药大学学报: 自然科学版, 2003, 19(1): 62-64.

[20] 李炳如, 樊菁. 痛经宁对大鼠子宫微循环的影响[J]. 中草药,

1990, 21(7): 22-24.

[21] 孙宁铃, 林雅, 张从羽, 等. 痛经散治疗原发性痛经的临床与机制初探[J]. 中西医结合杂志, 1996, 6(12): 711-713.

[22] 贾瑞喆, 刘晓梅. 缩宫素与前列腺素对子宫平滑肌细胞缩宫素受体表达的影响[J]. 中国生化药物杂志, 2009, 30(6): 379-382.

[23] 杨宝峰, 苏定冯, 周宏灏. 药理学[M]. 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 187.

(2016-11-13 收稿 责任编辑: 王明)