

通心络胶囊对异丙肾上腺素致大鼠心肌损伤 保护作用的实验研究*

赵明中 刘 岚 汪家瑞 高承梅 张宇洋 杨 红

内容提要 目的:探讨通心络胶囊对异丙肾上腺素致心肌损伤的保护作用。方法:于大鼠皮下注射异丙肾上腺素(85 mg/kg)制备心肌损伤模型,34 只大鼠随机分成生理盐水对照组、异丙肾上腺素组及通心络胶囊干预组。HE 染色及 DNA 末端标记法(TUNEL)分别检测心肌组织病理改变及心肌细胞凋亡的变化,透射电镜检测心肌细胞超微结构的变化。结果:生理盐水对照组无细胞变性与坏死,仅见极少凋亡阳性细胞;异丙肾上腺素组有明显心肌组织坏死,心肌凋亡细胞增多,电镜观察有凋亡细胞特征形态改变;通心络干预后心肌细胞坏死及凋亡均显著减轻。结论:异丙肾上腺素可致大鼠心肌组织坏死与凋亡,通心络胶囊可通过抑制心肌细胞坏死与凋亡而减轻心肌损伤。

关键词 通心络胶囊 异丙肾上腺素 心肌损伤 细胞凋亡

Experimental Study of Protective Effect of Tongxinluo Capsule on Isoproterenol Induced Myocardial Injury in Rats ZHAO Ming-zhong, LIU Lan, WANG Jia-rui, et al Department of Internal Medicine, Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing (100053)

Objective: To study the protective effect of Tongxinluo capsule (TXLC) on myocardial injury induced by isoproterenol. **Methods:** Myocardial injury was induced in 34 rats by subcutaneous injection of isoproterenol (85 mg/kg). The experimental animals were randomly divided into the control group, isoproterenol group and TXLC group. The histopathological change of myocardia was investigated by HE staining, the myocardial cell apoptosis were observed by TUNEL method and the ultrastructure of myocardial cell examined by electron microscope. **Results:** No cell degeneration and necrosis, only very few cells of apoptosis positive were found in the control group. While in the isoproterenol group, marked necrosis of myocardial tissue and increase of apoptosis cells were found, and characteristic changes of cell apoptosis were observed under electron microscope. After TXLC treatment, the myocardial necrosis and cell apoptosis were markedly alleviated. **Conclusion:** Isoproterenol could induce myocardial necrosis and apoptosis, TXLC could alleviate the myocardial injury through preventing myocardial cell necrosis and apoptosis.

Key words Tongxinluo capsule, isoproterenol, myocardial injury, cell apoptosis

大剂量异丙肾上腺素(isoproterenol)可复制心肌梗死的动物模型,引起类似于缺血性心肌损伤的病理学改变^[1]。通心络胶囊作为益气、活血、通络的中药制剂,对异丙肾上腺素致心肌损伤模型有何影响,尤其是对该模型心肌细胞凋亡有何作用,目前尚未见有关文献报道,本研究将对此作初步探讨。

材料与方法

1 实验动物及药物 健康雄性 Wistar 大鼠,体重(315±40)g,由卫生部中国药品与生物制品检定所

提供;异丙肾上腺素购自美国 Sigma 公司;通心络胶囊由河北省石家庄新技术开发区医药研究所提供(批号 980121),主要由人参、水蛭、全蝎、蜈蚣、蝉蜕、赤芍及冰片组成。

2 实验方法

2.1 动物模型及分组 参照文献^[2],以 85 mg/kg 异丙肾上腺素皮下注射于大鼠,制备异丙肾上腺素致心肌损伤模型;注射异丙肾上腺素后 1h 可见心律失常(多为室性早搏),ST 段明显抬高。实验随机分成 3 组:生理盐水对照组(10 只),皮下注射生理盐水 0.5 ml/只后观察 24h;异丙肾上腺素组(12 只),以 85 mg/kg 异丙肾上腺素溶解于等量生理盐水中,皮下注射后观察 24h;通心络胶囊干预组(12 只),以通心络

* 国家医药管理局新药研究基金资助项目(No. 93-46-N-24)
首都医科大学宣武医院内科(北京 100053)

胶囊 1.0g/(kg·d) 溶于生理盐水中连续灌胃 5 天后皮下注射异丙肾上腺素,注射后 1h 再灌喂药物 1 次。

2.2 心肌组织切片制备 观察结束后取出心脏标本于 4% 多聚甲醛中固定 24h(4℃),常规石蜡包埋,沿左室长轴线每隔 1mm 横断面切取数张 4μm 厚的切片,分别作 HE 染色及细胞凋亡检测。用于电镜检查的标本则用 3% 戊二醛固定 24h(4℃),1% 锇酸固定 1.5h,逐级乙醇脱水,Epon812 定向包埋,行超薄切片,醋酸铀染色后透射电镜观察。

2.3 心肌细胞凋亡原位标记检测及计算机图像分析 每张标本取 3 个不同部位的切片各 2 张,以脱氧核苷酸转移酶(TdT 酶)介导的带荧光的 dUTP 缺口末端标记法(TdT-mediated fluorescein-dUTP nick end labeling, TUNEL)标记凋亡细胞核 DNA 3'-OH 末端^[3]。其主要步骤为:将切片脱蜡入水后以蛋白酶 K (20μg/ml)消化 15min;0.3% H₂O₂ 甲醇溶液灭活内源性过氧化物酶(POD)活性,加入 TUNEL 混合液(含 TdT 酶及 fluorescein-dUTP),湿盒 37℃ 孵育 1h;加 POD 转换液,37℃ 孵育 30min,DAB 显色,苏木素复染。正常细胞核呈蓝色,凋亡细胞核则为深浅不一的棕色。将切片于光镜下放大 200 倍,于图像分析仪(Noesis S.A.France)上随机选择 10 个视野,检测阳性染色的平均光密度(MOD)与阳性表达面积率(阳性核总面积占视野中所有细胞核总面积百分比),计算细胞凋亡指数(Apoptosis Index, AI):AI = MOD × 表达面积率 × 100。

2.4 透射电镜检测 分析各组心肌细胞超微结构的变化。

2.5 统计学分析 所有数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较用方差分析,多组间两两比较用 q 检验。

结 果

1 心肌组织病理学观察 心肌组织切片经 HE 染色,参照 Rona 等^[4]方法对心肌病理损伤程度进行分级分析。生理盐水对照组心肌细胞未见明显变性与坏死,为 0 度;异丙肾上腺素组见心肌组织呈灶性坏死,偶见灶间相互连接,部分心肌细胞收缩带形成,组织病理损伤程度为 II ~ III 度,病理改变多位于心尖部心内膜下层;通心络胶囊干预组也可见心肌坏死灶形成,但多为点片状坏死,病理损伤程度多为 I 度。

2 心肌细胞凋亡变化 生理盐水对照组仅见极少数散在性细胞凋亡存在;异丙肾上腺素组见灶性心肌坏死周围有明显的心肌细胞凋亡现象;通心络胶囊

干预组心肌凋亡细胞数量减少(见表 1)。

3 心肌细胞超微结构改变 生理盐水对照组心肌细胞亚细胞结构正常,肌膜及细胞器完整;异丙肾上腺素组有不同程度的线粒体肿胀,内质网扩大,胞内有脂滴,肌丝排列紊乱,甚至肌膜断裂,尚可见部分心肌细胞核染色质边集,块集成凋亡的形态改变。通心络干预组心肌细胞变性、坏死及凋亡改变较少。

表 1 3 组大鼠心肌细胞凋亡图像分析结果 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	n	阳性表达面积率	心肌组织 AI
生理盐水对照	10	1.26 ± 0.52	0.38 ± 0.04
异丙肾上腺素	12	40.53 ± 16.64 [*]	16.77 ± 7.24 [*]
通心络干预	12	23.78 ± 9.03 [*] ^A	8.69 ± 3.57 [*] ^A

注:与生理盐水对照组比较,^{*} $P < 0.01$;与异丙肾上腺素组比较,^A $P < 0.01$

讨 论

异丙肾上腺素作为 β 受体兴奋剂,其对心肌的正性变力与变时作用可使心肌收缩力加强,心率加快,致使心肌氧耗量增加;本研究中大剂量异丙肾上腺素引起部分心肌细胞变性与坏死,其光镜及超微结构改变类似于缺血性心肌坏死。此外本实验初步研究表明大剂量异丙肾上腺素尚可引起部分心肌细胞凋亡,凋亡细胞主要位于心肌坏死灶周边区。异丙肾上腺素诱导心肌细胞凋亡的机制尚不十分清楚,可能一方面与异丙肾上腺素使心肌需氧量增加,需氧、供氧失去平衡,导致心肌细胞缺氧、缺血有关,因心肌细胞缺血、缺氧可导致心肌细胞凋亡^[5];另一方面异丙肾上腺素通过激活 β 受体提高细胞内 cAMP 依赖性蛋白激酶,使胞膜慢钙通道通透性增加,促进钙内流^[6],胞内钙超载是致心肌变性坏死的重要因素,在诱导心肌细胞凋亡中也具有重要意义^[7]。

通心络胶囊主要由人参、水蛭、全蝎、蜈蚣、蝉蜕、赤芍及冰片组成,临床观察对冠心病心绞痛及缺血性心电图改变有良好的改善作用^[8]。本研究显示通心络胶囊可明显减轻异丙肾上腺素致心肌变性与坏死改变,同时显著抑制心肌细胞凋亡的发生,表明通心络胶囊对大剂量异丙肾上腺素引起的心肌细胞变性及细胞两种死亡形式——坏死与凋亡均有明显的保护作用。有实验研究证实通心络胶囊可增加心脏做功,但不增加心肌氧耗量,且明显增加心脏冠脉血流量,改善心肌的血液供应^[9]。提示通心络胶囊保护大鼠异丙肾上腺素所致心肌损伤,减轻心肌细胞变性与坏死,抑制心肌细胞凋亡可能与其抗心肌缺血有关,其确切机制有待进一步研究。

实验研究显示大剂量异丙肾上腺素可导致大鼠心肌细胞变性、坏死与凋亡,通心络胶囊可通过减轻心肌细胞变性、坏死,抑制心肌细胞凋亡的途径以保护异丙肾上腺素致大鼠心肌损伤。

参 考 文 献

1. Blasig LE, Ventura G, Tennis F, et al. Absolute and relative myocardial ischemia by isoproterenol overdosage. *Biomed Biochim Acta* 1985;44: 1641.
2. 卢显弟,董传仁.大鼠异丙肾上腺素性心肌梗塞检测心功能动态变化.中国病理生理杂志 1992;12: 75.
3. Gavrieli Y, Sherman Y, Shmuel A, et al. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992;119: 493—501.

4. Rona G. An infarct-like myocardial lesion and other toxic manifestations produced by isoproterenol in the rat. *Arch Pathol Lab Med* 1959;67: 443.
5. Fliss H, Gattlinger DA. Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. *Circ Res* 1996;79: 949—956.
6. 徐有秋.心肌电生理研究动态.生理科学进展 1987;18(1): 81.
7. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995;267: 1456—1462.
8. 徐贵成,高荣林,吴以岭,等.通心络胶囊治疗冠心病心绞痛的临床研究.中国中西医结合杂志 1997;17(7): 414—416.
9. 尚晓泓,王 刚,刘建勋,等.通心络胶囊对犬心脏血流动力学及心肌耗氧量的影响.中国中西医结合杂志 1997;17(8): 487—489.

(收稿:1999-06-18 修回:2000-07-27)

中西医结合治疗放疗所致肾损伤 35 例

周家遂 黄 坚

笔者对近两年我院收治的 73 例腹部肿瘤实施放疗者其中的 35 例同时加用中药治疗,收到了较好的疗效,报告如下。

资料与方法

1 全部病例均来源于我院 1998~1999 年收治的腹部肿瘤放射治疗患者,对其中入院时 β_2 微球蛋白(β_2 -MG)、内生肌酐清除率(CCr)、尿素氮(BUN)正常、尿蛋白阴性者 73 例分为两组。治疗组 35 例,男 19 例,女 16 例,年龄 28~60 岁,平均(35±5)岁,肾脏肿瘤 15 例,肾周围肿瘤 20 例;对照组 38 例,男 21 例,女 17 例,年龄 27~62 岁,平均(37±6)岁,肾脏肿瘤 13 例,肾周围肿瘤 25 例。

2 方法 每例患者照射总剂量均为 2640cGY(150cGY×22 次),2~3 周内完成。治疗组于放射治疗的同时加用中药治疗,方用生地黄 30g 玄参 15g 女贞子 12g 草决明 30g 桑寄生 15g 枸杞子 20g 野菊花 10g 党参 10g 灵芝 15g 黄芪 30g 当归 12g 防己 10g 茯苓 10g 白芍 10g 甘草 6g 龟板 20g,水煎服,每日 1 剂,放疗结束后继续服药 1 周。对照组给予对症支持治疗。观察 β_2 -MG、CCr、BUN、蛋白尿等指标,于放疗结束 6 个月检查,统计学处理采用 χ^2 检验。

结 果

结果见表 1,治疗组蛋白尿及血 β_2 -MG 增高的发生率较对

照组低,两组比较差异有显著性($P < 0.05$)。BUN 增高以及 CCr 降低的发生率两组相比差异无显著性。

表 1 两组放疗肾损伤检测结果比较 (例)

组别	例数	蛋白尿		血 β_2 -MG		BUN		CCr	
		阳性	阴性	异常	正常	升高	正常	异常	正常
治疗	35	12	23	8	27	5	30	5	30
对照	38	23	15	14	24	8	30	5	33
		$P < 0.05$		$P < 0.05$		$P > 0.05$		$P > 0.05$	

讨 论 放射性肾损伤在中医属“虚症”范畴,因本病须经一个较长的过程,热毒伤肾,灼精耗液。肝肾同源,故临床上表现为肝肾阴虚或气阴两虚,故用生地黄、玄参、黄芪、党参、当归、女贞子、灵芝、枸杞子、桑寄生益气养阴、清热生津、滋补肝肾,配以龟板、白芍、草决明、防己、茯苓、野菊花滋阴平肝益肾,清肝肾虚火,利尿以祛热毒。

现代研究证明:黄芪、党参、野菊花、灵芝、枸杞子等具有清除氧自由基、抗辐射作用,使放疗时所致肾小球毛细血管损伤得到保护和修复,能显著降低尿中蛋白含量。全方共奏益气养阴、滋补肝肾、补气凉血、清热解毒之功。

(收稿:2000-08-14 修回:2000-10-10)