

健心平律丸对大鼠心肌缺血再灌注心律失常和水通道蛋白 4 的影响

何绪屏¹ 陈东风² 郑建宏³ 杜少辉¹ 邓斌¹ 张尚斌¹

摘要 目的 探讨健心平律丸对大鼠心肌缺血再灌注心律失常和水通道蛋白 4 (aquaporin-4, AQP4) 的作用。方法 应用阻断左冠状动脉造成大鼠心肌缺血再灌注损伤模型。应用心电图 II 导联记录、HE 染色和 AQP4 免疫组化染色方法, 观察健心平律丸对心肌缺血再灌注心律失常、死亡率、AQP4 的影响。结果 健心平律丸可明显减少再灌注心律失常发生率及死亡率, 有减轻心肌缺血水肿损伤, 增强心肌组织 AQP4 表达的作用。结论 健心平律丸具有抗心肌缺血再灌注心律失常的作用, 可能与其上调缺血心肌 AQP4 表达水平, 减轻细胞内水肿有关。

关键词 健心平律丸; 心肌缺血再灌注损伤; 心律失常; 水通道蛋白 4

Effect of Jianxin Pinglu Pill on Arrhythmia and Aquaporin 4 Expression in Rats with Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury HE Xu-ping, CHEN Dong-feng, ZHENG Jian-hong, et al *Department of Internal Medicine, Shenzhen Municipal Hospital of TCM, Guangdong (518033)*

Objective To explore the effect of Jianxin Pinglu Pill (JPP) on arrhythmia and aquaporin 4 (AQP4) in rats with myocardial ischemia/reperfusion (I/R) injury. **Methods** The effects of JPP on arrhythmia, mortality and AQP4 on I/R injured rats model induced by blocking left coronary artery were observed using II lead of ECG, HE stain and AQP4 immunohistochemical stain. **Results** JPP showed significant effect in lowering the arrhythmia occurrence and mortality, reducing myocardial ischemic edema and injury, strengthening AQP4 expression in myocardial tissue. **Conclusion** JPP has the effect of preventing I/R induced arrhythmia, it might be related with its action in up-regulating AQP4 expression level in myocardium and reducing the intracellular edema.

Key words Jianxin Pinglu Pill; myocardial ischemia/reperfusion injury; arrhythmia; aquaporin-4

心肌缺血再灌注造成心肌细胞水肿是心肌再灌注损伤病理机制的重要环节, 近年来发现水通道蛋白 (aquaporin, AQP) 在介导自由水被动跨生物膜转运, 维持细胞内外环境的稳定平衡中具有特殊作用。AQP 有多个亚型, 水通道蛋白 4 (AQP4) 为其中的一个亚型。研究 AQP 与心肌细胞水肿和心律失常之间的关系, 可为阐明心肌缺血再灌注损伤分子机制开辟新途径。健心平律丸是在总结我国名老中医邓铁涛教授治疗心血管病经验的基础上筛选研制的复方制剂, 具有理气化痰、养心安神的作用。临床用于治疗各种

类型的心律失常取得了较好的疗效^[1]。本实验应用大鼠心肌缺血再灌注损伤模型, 进一步探讨健心平律丸对心肌缺血再灌注损伤所致心律失常的作用, 并从 AQP4 角度探讨其作用机理。

材料和方法

1 材料 清洁级 Sprague-Dawley 大鼠 120 只, 220~250g, 雌雄不限, 雌鼠无孕, 由广州中医药大学实验动物中心提供。健心平律丸, 主要由太子参、黄芪、麦冬、竹茹、半夏、橘红、枳壳、丹参、田七、酸枣仁等药组成, 每克含生药 3.945g, 由深圳市中医院提供。复方丹参滴丸, 主要由丹参、冰片、三七组成, 天津天士力集团制药有限公司生产。AQP4 单抗、SABC 免疫组化试剂盒、DAB 试剂盒, 武汉博士德生物工程有限公司产品。

2 分组及处理 SD 大鼠随机分成缺血对照组、复方丹参滴丸组、健心平律组。分 3 批进行实验, 每批

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 30371837), 深圳市医药卫生科技项目 (No. 199904017)

作者单位: 1. 深圳市中医院内科 (广东 518033) 2. 广州中医药大学解剖学教研室 3. 深圳市福田区梅林医院

通讯作者: 何绪屏, Tel 0755-26233316, Fax 0755-83332062,

E-mail: hxp-sz@163.com

每组 10 只。健心平律组又分为低剂量组和高剂量组，低剂量组灌服根据成人日服药量(成人日服量:每天 3 次,每次 6g)折算成大鼠灌胃剂量的健心平律丸,高剂量组为低剂量剂量的 1 倍;复方丹参滴丸组灌服根据成人日服药量(按说明书)折算成大鼠灌胃剂量的复方丹参滴丸,缺血对照组灌服等量的生理盐水,各组均连续灌服 7 天。第 7 天后进行心肌缺血再灌注实验。

3 心肌缺血再灌注模型制备 腹腔注射 10% (W/V)水合氯醛(0.3ml/kg)麻醉,气管插管,行正压人工呼吸,开胸,暴露心脏,于左冠状动脉主干下穿线,将丝线两端一起穿入直径 2mm 的聚乙烯管中稳定 5min 后,抽紧丝线阻断冠脉血流 5min,然后放松丝线,造成心肌缺血再灌注损伤。

4 心电图观察 用心电示波器观察心电图变化,记录 10 个心动周期 II 导联心电图。在冠脉结扎前和结扎后,每隔 1min 记录心电图 1 次,共 5min;随后解除结扎后每隔 15min 记录 1 次,共 2h。

5 AQP4 免疫组化染色和 HE 染色 各组实验结束,即时以 4%(W/V)多聚甲醛灌注固定,取心脏组织块,梯度酒精脱水,浸蜡包埋,切片,片厚 5 μ m,脱蜡至水,分别进行 AQP4 和 HE 染色。AQP4 免疫组化染色按链酶亲和素-过氧化物酶免疫组化试剂盒说明操作,DAB 显色,苏木素复染,以 PBS 代替一抗作为阴性对照。

6 统计学分析 每例取 10 张阳性细胞染色切片,在显微镜下(20 \times)对每张切片阳性细胞进行计数,取其平均值。所得数据用标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用方差分析。

结 果

1 抗缺血再灌注心律失常、死亡率结果 见表 1。抗缺血再灌注心律失常健心平律大、小剂量组及复方丹参滴丸组与缺血对照组比较差异均有显著性($P < 0.01$),同时减少再灌注所致死亡率($P < 0.01$);抗缺血再灌注心律失常健心平律组心律失常发生率低于复方丹参滴丸组,但复方丹参滴丸组死亡率与健心平律大、小剂量组间差异无显著性($P > 0.05$)。结果表明健心平律丸与复方丹参滴丸对缺血再灌注心律失常、死亡率有拮抗作用;健心平律组两种剂量作用相似,大剂量作用并无加大。

2 HE 染色结果 见图 1。在心肌横切面上,缺血对照组(图 A)心肌细胞水肿明显,胞体增大,核深紫浓缩并明显偏移,部分胞核、胞质消失;而健心平律低剂量组(图 B)与复方丹参滴丸组(图 C)心肌细胞水肿

表 1 各组大鼠心肌缺血再灌注心律失常和死亡率的影响 [只(%)]

组别	n	心律失常	死亡
缺血对照	30	24(80.00)	19(63.33)
复方丹参滴丸	30	12(40.00)*	4(13.33)*
健心平律高剂量	30	7(23.33)*	3(10.00)*
健心平律低剂量	30	6(20.00)*	3(10.00)*

注:与对照组比较,* $P < 0.01$

明显减轻,胞体比对照组小,胞核、胞质消失减少,结果表明健心平律低剂量组与复方丹参滴丸组均能减轻心肌缺血水肿损伤。

3 心肌组织 AQP4 表达 见表 2。健心平律丸与复方丹参滴丸均能增强心肌组织 AQP4 的表达($P < 0.05$),健心平律组效果优于复方丹参滴丸组($P < 0.05$)。

表 2 各组心脏组织 AQP4 免疫阳性细胞数 (个 $\bar{x} \pm s$)

组别	n	切片数	心外膜	血管	心肌
缺血对照	30	300	9.6 \pm 2.2	14.6 \pm 2.3	6.2 \pm 1.3
复方丹参滴丸	30	300	15.5 \pm 2.4	18.4 \pm 2.6	12.3 \pm 1.7
健心平律高剂量	30	300	22.3 \pm 2.6	23.3 \pm 2.2	15.3 \pm 1.5
健心平律低剂量	30	300	20.5 \pm 2.3	21.7 \pm 1.9	13.8 \pm 1.6

注:各组两两比较, $P < 0.05$

3.1 各组心外膜 AQP4 阳性细胞表达 见图 2。AQP4 阳性细胞为细胞膜染深棕黄色,分布于心外膜、血管和心肌。在心外膜 AQP4 阳性细胞胞体小,呈扁平形或椭圆形。缺血对照组心外膜 AQP4 阳性细胞染色较浅,数量少(图 A);健心平律低剂量组心外膜 AQP4 阳性细胞染色强、数量多,广泛分布于心外膜(图 B);复方丹参滴丸组心外膜 AQP4 阳性细胞染色居于两者之间(图 C)。

3.2 各组血管 AQP4 阳性细胞表达 见图 3。AQP4 阳性细胞胞体呈扁平形,分布于血管内层和外层。缺血对照组 AQP4 阳性细胞染色较浅,分布局限于血管内层(图 A);健心平律低剂量组血管 AQP4 阳性细胞染色强、分布广泛(图 B);复方丹参滴丸组血管 AQP4 阳性细胞染色稍弱、分布较少(图 C)。

3.3 各组心肌 AQP4 阳性细胞表达 见图 4。在心肌 AQP4 阳性细胞染色呈深褐色,呈斑片状分布于心肌细胞膜表面,在心肌横切面上,细胞膜部分较均匀斑片状分布。缺血对照组心肌 AQP4 阳性细胞染色明显弱而浅,数量少(图 A);健心平律低剂量组心肌 AQP4 阳性细胞染色强而明显,数量多(图 B);复方丹参滴丸组心肌 AQP4 阳性细胞染色稍弱、分布较少(图 C)。结果表明健心平律与复方丹参滴丸均能增强心肌组织 AQP4 的表达($P < 0.05$),健心平律低剂量组效果优于复方丹参滴丸组($P < 0.05$)。

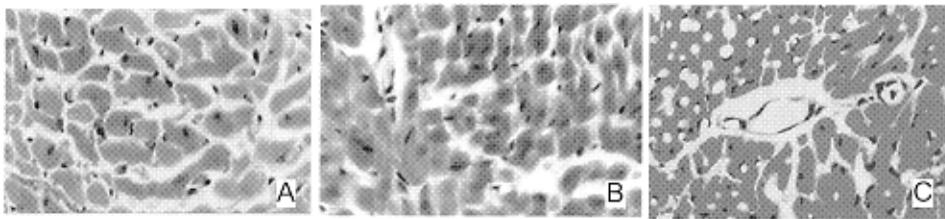


图 1 各组 HE 染色(40×)

注:A:缺血对照组,心肌细胞水肿明显,胞体增大,核深紫浓缩并明显偏移,部分胞核、胞质消失;B:健心平律低剂量组,心肌细胞水肿明显减轻,胞体比对照组小,胞核、胞质消失减少;C:复方丹参滴丸组,心肌细胞水肿明显减轻,胞体比对照组小,胞核、胞质消失减少



图 2 各组心外膜 AQP4 阳性细胞表达(10×)

注:A:缺血对照组,心外膜 AQP4 阳性细胞染色较浅,数量少;B:健心平律低剂量组,心外膜 AQP4 阳性细胞染色强,数量多;C:复方丹参滴丸组,心外膜 AQP4 阳性细胞染色居于 A 与 B 两者之间

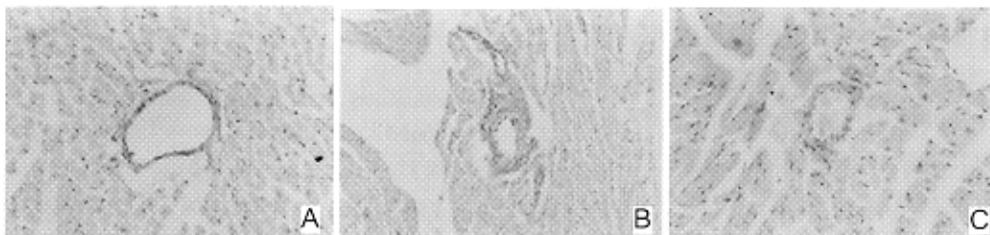


图 3 各组血管 AQP4 阳性细胞表达(20×)

注:A:缺血对照组,血管 AQP4 阳性细胞染色较浅,分布局限于血管内层;B:健心平律低剂量组,AQP4 阳性细胞染色强,分布广泛;C:复方丹参滴丸组,血管 AQP4 阳性细胞染色稍弱,分布较少

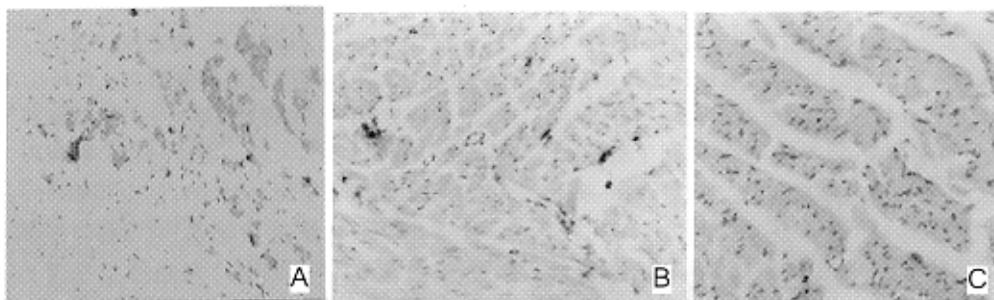


图 4 各组心肌 AQP4 阳性细胞表达(20×)

注:A:缺血对照组,心肌 AQP4 阳性细胞染色明显弱而浅,数量少;B:健心平律低剂量组,心肌 AQP4 阳性细胞染色强而明显,数量多;C:复方丹参滴丸组,心肌 AQP4 阳性细胞染色稍弱,分布较少

万方数据

讨 论

本研究表明健心平律丸对心肌缺血再灌注心律失常具有拮抗作用。邓铁涛教授在几十年治疗心血管病的基础上,提出了“痰瘀相关”的理论,认为痰是瘀的初期阶段,瘀是痰浊的进一步发展,心悸多是以心阴心阳虚为本,痰瘀闭阻为标,以温胆汤去生姜加党参为主方治疗^[2]。健心平律丸在此基础上加上养心安神之品而成。方中以半夏、橘红、竹茹、枳壳理气化痰为主,麦冬、养心安神为辅。本实验证实健心平律丸减少心肌缺血再灌注大鼠心律失常发生率和死亡率。

本研究又发现健心平律丸能减轻心肌缺血水肿损伤及增强心肌组织 AQP4 表达。心肌水肿的实质是心肌细胞内、外的水电解质分布失衡,破坏了心肌细胞赖以生存及发挥生理功能的内环境。AQP 是对水专一的通道蛋白,广泛存在于动物、植物及微生物中,它所介导的自由水快速被动的跨生物膜转运,是水进出细胞的主要途径。1988 年 Agre 等在哺乳动物红细胞和肾近曲小管分离成功,于 1993 年正式命名为水通道蛋白,目前已成功分离出 9 个亚型^[3]。AQP 在细胞膜中以四聚体形式存在,每一个单体都是独立的功能性水通道^[4,5]。生理情况下,水通过细胞膜包括磷脂双层的简单扩散和通过特殊跨膜转运蛋白的快速转运两个过程。由于跨膜水转运是基本的生理功能,因此水通道蛋白的表达必然与机体的生理病理状态有密切关系。已有证据显示 AQP4 参与许多生理、病理过程,但在心脏中的分布与功能尚无文献报道。中医学所说的痰湿,均可以认为是水液代谢失调的产物,与水通道蛋白相关。HE 染色结果表明缺血对照组心肌的细胞水肿

明显,而健心平律组心肌的细胞水肿明显减轻。AQP4 免疫组化结果提示缺血对照组 AQP4 表达较弱,而健心平律组 AQP4 表达增强,因而健心平律丸减轻心肌细胞水肿可能与其 AQP4 表达水平上调,增强细胞内液外运有关。本实验结果还表明,复方丹参滴丸也能减轻心肌缺血水肿损伤及增强心肌组织 AQP4 表达,但其增强心肌组织 AQP4 表达的作用不如健心平律丸显著。从两药主要作用来看,健心平律丸偏重于理气化痰,复方丹参滴丸偏重于活血化瘀,似可说明理气化痰更能增强心肌组织 AQP4 表达的作用。

参 考 文 献

- 1 郑建宏,何绪屏. 中医药治疗心律失常 35 例疗效观察. 新中医 1998 5(增刊):52.
Zheng JH, He XP. The clinical observation on 35 cases of arrhythmia treated by Chinese medicine. New J Tradit Chin Med 1998 5:52.
- 2 邓铁涛. 邓铁涛医集. 北京:人民卫生出版社,1995:20.
Deng TT. The medical science thesis collection of Deng Tietao. Beijing: People's Medical Publishing House, 1995:20.
- 3 Ishibashi K, Kuwahara M, Gu Y, et al. Cloning and functional expression of a new aquaporin(AQP9) abundantly expressed in the peripheral leukocytes permeable to water and urea, but not to glycerol. Biochem Biophys Res Commun 1998 244(1):268—274.
- 4 Chen A, Vanter AN, Yeager M, et al. Three dimensional organization of a human water channel. Nature 1997;387(6633):627—630.
- 5 Li H, Lee S, Jap BK, et al. Molecular design of aquaporin-1 water channel as revealed by electron crystallography. Nat Struct Biol 1997 4(4):263—265.

(收稿 2004-03-08 修回 2004-06-28)

《中草药》杂志是由中国药学会和天津药物研究院共同主办的国家级期刊,月刊,国内外公开发刊。

本刊主要报道中草药化学成分,药剂工艺、生药炮制、产品质量、检验方法,药理实验和临床观察,药用动、植物的饲养、栽培、药材资源调查等方面的研究论文,并辟有中药现代化论坛、综述、短文、新产品、企业介绍、学术动态和信息等栏目。科研论文附英文摘要或以英文刊登。本刊从 2004 年第 1 期起扩版为 120 页,定价 16.80 元。国内邮发代号:6-77,国外代号:M221。请到当地邮局订阅。

编辑部地址:天津市南开区鞍山西道 308 号;邮编:300193;电话:(022)27474913,23006821;传真:(022)23006821;电子信箱:zcyzjb@tjpr.com;zcy@tjpr.com 网址:www.tjpr.com

《中成药》杂志是国家食品药品监督管理局信息中心中成药信息站出版的国家级期刊,月刊,国内外公开发刊。

本刊主要报道中成药制剂工艺,药理作用,质量标准,成分分析,饮片炮制,临床应用,综述,古方研究,制药设备,企业管理,植物提取物等方面的研究论文。科研论文附英文摘要,并欢迎英文稿件。本刊为从事中成药及植物药科研、生产、教育、临床及经营、管理人员的必读刊物。本刊从 2005 年第 1 期起扩版为 128 页,定价为 15.00 元,全年 180 元。国内邮发代号:4-249,国外代号:M-1093。欢迎到当地邮局订阅,也可直接向本刊编辑部订阅。

编辑部地址:上海市汉口路 239 号 131 室;邮编:200002;电话(021)63213275,63213363;传真(021)63213363;电子信箱:med@stn.sh.cn;网址:http://www.cherb.com.cn