

# 川芎嗪与左旋精氨酸对急性心肌梗死大鼠的心肌保护作用

宋张娟 陈 茜 李保罗

**摘要** 目的 比较川芎嗪(TMP)与川芎嗪和左旋精氨酸(L-arg)联合疗法对急性心肌梗死(AMI)大鼠的心肌保护作用,并探讨其作用机制。方法 采用垂体后叶素(pituitrin, Pit)尾静脉注射复制大鼠 AMI 模型,设立正常对照组、模型组、TMP 治疗组、TMP 与 L-arg 联合治疗组,用免疫组化法观察心肌梗死时 P-选择素、E-选择素的表达情况,并测定血清肌酸激酶(CK)、肌钙蛋白 T(TnT)及心肌组织髓过氧化物酶(MPO)的浓度。结果 模型组与正常对照组比较,血清 CK、TnT 浓度、心肌组织 MPO 浓度有明显升高( $P < 0.01$ ),P-选择素、E-选择素的表达明显上调( $P < 0.01$ );TMP 治疗组、联合治疗组分别与模型组比较,上述各指标均下降,联合治疗组下降更为明显( $P$  值均  $< 0.05$ )。结论 TMP 与 L-arg 合用可通过多种环节抑制黏附分子的表达和降低白细胞的浸润,对治疗 AMI 有显著协同作用。

**关键词** 急性心肌梗死;川芎嗪;左旋精氨酸

**Protective Effect of Tetramethylpyrazine and L-Arginine on Rats with Acute Myocardial Infarction** SONG Zhang-juan, CHEN Qian, LI Bao-luo *Department of Pathophysiology, Guiyang Medical College, Guiyang (550004)*

**Objective** To compare the protective effects of tetramethylpyrazine (TMP) alone and TMP and L-arginine (TMP-LA) combination on rats with acute myocardial infarction (AMI), and to explore its mechanism. **Methods** The rat model of AMI was established by via caudal vein injection of pituitrin. Experimental animal groups of normal, model, TMP treated and TMP-LA (via abdominal cavity and caudal vein respectively) treated groups were established. Expression of P- and E-selectin, serum creatine phosphokinase (CK) and troponin T (TnT), and marrow peroxidase (MPO) concentration in myocardial tissue were determined by immunohistochemical stain. **Results** As compared with the normal group, serum CK and TnT level, and MPO concentration in myocardial tissue were significantly higher in the model group ( $P < 0.01$ ), with P- and E-selectin significantly up-regulated ( $P < 0.01$ ). As compared with the model group, the above-mentioned parameters in the TMP or TMP-LA treated group was significantly lower ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Combined use of TMP and LA showed obvious synergism in treating AMI, by way of multi-link inhibition on expression of adhesive factors and decrease of leucocyte infiltration.

**Key words** acute myocardial infarction; tetramethylpyrazine; L-arginine

冠心病的并发症急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)是心血管疾病中引起死亡的重要原因之一。大量研究表明,AMI 发病与多种因素有关。其中由黏附分子(adhesion molecular, AM)介导白细胞通过血管壁浸润到缺血的心肌组织中,并释放氧自由基、血栓素等活性物质造成心肌组织的损伤是心肌细胞损伤的主要原因。AM 的种类很多,选择素是其中的一类,包括血小板选择素(P-选择素)、内皮细胞选择

素(E-选择素)及白细胞选择素(L-选择素)<sup>[1]</sup>。选择素可以影响白细胞在内皮细胞表面滚动,而滚动又是白细胞与血管壁发生黏附的第一步,也是使细胞黏附及细胞外渗的先决条件,因此在 AMI 心肌损伤中具有重要的意义。本实验采用大鼠急性心肌梗死的模型,用中药川芎嗪(Tetramethylpyrazine, TMP)以及西药左旋精氨酸(L-arginine, L-arg)联合使用的方法,探索此二药对 AMI 的心肌保护作用,并探讨其作用机制。

## 材料和方法

1 动物及模型制备 SD 大鼠 40 只,体重 150~250g(雌雄不拘)。大鼠急性心肌梗死模型<sup>[2]</sup>采用尾静

基金项目:贵州省科技厅基金资助(No. D2000-9)

作者单位:贵阳医学院病理生理教研室(贵阳 550004)

通讯作者:宋张娟,现在温州医学院病理生理教研室(浙江 325000),Tel:13777784213, E-mail: szj121@tom.com

脉缓慢注入垂体后叶素(pituitrin, Pit)18U/kg 体重制成。

2 药物及试剂 垂体后叶素注射液,上海第一生化药业公司出品,6U/ml,批号 990801。盐酸川芎嗪注射液,由无锡第七制药有限公司生产,每支 40mg/2ml,批号 0108211。盐酸精氨酸注射液,每支 5g/20ml,上海生物化学制药厂出品,批号 010912。

3 实验分组及方法 40 只大鼠随机分为 4 组,每组 10 只。(1)正常对照组。(2)模型组:尾静脉内分别缓慢推注 1ml/kg 体重的生理盐水和 18U/kg 体重的 Pit。(3)TMP 治疗组:在尾静脉注射 Pit 的当天,同时腹腔注射 TMP 80mg/kg 体重<sup>[3]</sup>。(4)TMP 与 L-arg 联合治疗组:在尾静脉注射 Pit 的当天,同时腹腔注射 TMP 80mg/kg 体重,尾静脉注射 L-arg 40mg/kg 体重<sup>[4]</sup>,以上两组均为每 18h 1 次,连续 3 次。末次给药后 15h,股动脉放血取血后,处死动物。分离血清并测定肌酸激酶(creatine kinase, CK)的浓度。另取血 1~2ml,放入已加抗凝剂的试管中,用于测定肌钙蛋白 T(Troponin T, TnT)。取适量心肌组织称重并剪碎,参照南京建成生物工程研究所实验方法制成 5% 组织匀浆,放入 -20℃ 保存,用于测定心肌髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)浓度。另沿心脏横轴取约 2~3mm 心肌组织,生理盐水冲洗干净,吸干水分,10% 福尔马林液固定,常规脱水、包埋、切片、染色,用于 P、E-选择素的免疫组化检测。

#### 4 指标测定与观察

4.1 血清 CK、心肌组织 MPO 的测定 均按南京建成生物工程研究所生产的试剂盒要求进行测定。

4.2 血清 TnT 的测定 送交贵阳医学院附属医院生化科测定。

4.3 P-选择素、E-选择素的免疫组化测定 各组心肌组织石蜡标本按照 SABC 试剂盒(购自武汉博士德)要求进行操作。结果判定标准:(1)E-选择素的表达:以血管内皮细胞胞浆呈棕黄着色为阳性染色。(2)P-选择素的表达:以每张切片细胞浆呈现清晰黄褐色者为阳性。任意观察 5 个视野(400×),结果评定分级:—、+、++、+++ 分别为阳性血管内皮细胞占血管内皮细胞总数的 <5%、5%~10%、10%~50%、>50%。

5 统计学方法 结果用平均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用成组 *t* 检验。E、P-选择素表达率采用秩和检验。统计数据用 SPSS 软件系统进行处理。

## 结 果

1 生化指标测定结果 见表 1。血清 CK、TnT

及心肌组织 MPO 浓度变化。模型组血清 CK、TnT 及心肌组织 MPO 浓度较正常对照组明显升高( $P < 0.01$ );TMP 组血清 CK、TnT 及心肌组织 MPO 浓度较模型组有所降低,仍明显高于正常对照组( $P < 0.05, P < 0.01$ );联合治疗组血清 CK、TnT 及心肌组织 MPO 浓度与模型组比较有明显降低,差异有显著性( $P$  均  $< 0.05$ ),与 TMP 组比较也有所下降,其中 TnT、MPO 浓度的下降差异有显著性( $P$  均  $< 0.05$ ),但仍略高于正常对照组。

表 1 各组血清 CK、TnT 及心肌组织中 MPO 浓度比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别   | <i>n</i> | 血清 CK 浓度<br>(U/ml) | 血清 TnT 浓度<br>(μg/L)    | 心肌组织 MPO 浓度<br>(U/g wet wt) |
|------|----------|--------------------|------------------------|-----------------------------|
| 正常对照 | 10       | 19.44 ± 11.02      | 0.02 ± 0.06(4)         | 0.20 ± 0.08                 |
| 模 型  | 10       | 46.85 ± 19.54 **   | 0.30 ± 0.06(4) **      | 0.39 ± 0.05 **              |
| TMP  | 10       | 39.06 ± 20.52 *    | 0.18 ± 0.02(4) * △ △   | 0.34 ± 0.08 **              |
| 联合治疗 | 10       | 28.61 ± 7.63 △     | 0.08 ± 0.03(4) △ △ △ ▲ | 0.24 ± 0.11 △ △ ▲           |

注:与正常对照组比较,\*  $P < 0.05$ ,\*\*  $P < 0.01$ ;与模型组比较,△  $P < 0.05$ ,△△  $P < 0.01$ ;与 TMP 组比较,▲  $P < 0.05$ ,▲▲  $P < 0.01$ ;( )数据内为样本数

2 免疫组化结果 E-选择素的表达在模型组可见于细动脉血管内皮细胞胞膜呈棕黄的阳性着色,而联合治疗组仅少量血管内皮细胞胞膜呈棕黄着色;P-选择素在模型组可见胞膜呈棕褐着色的阳性细胞及白细胞,联合治疗组仅见散在的白细胞及血管内皮细胞胞膜呈棕黄着色。各组 P、E-选择素的表达,见表 2。

表 2 TMP 和 L-arg 对心肌组织 P、E-选择素表达的影响

| 组别   | <i>n</i> | P-选择素表达率等级 |   |    |          |      | E-选择素表达率等级 |   |    |      |      |
|------|----------|------------|---|----|----------|------|------------|---|----|------|------|
|      |          | —          | + | ++ | +++      | ++++ | —          | + | ++ | +++  | ++++ |
| 正常对照 | 10       | 7          | 3 | —  | —        | —    | 8          | 2 | —  | —    | —    |
| 模 型  | 10       | —          | 1 | 3  | 6*       | —    | —          | 1 | 4  | 5*   | —    |
| TMP  | 10       | —          | 4 | 3  | 3*       | —    | —          | 2 | 6  | 2*   | —    |
| 联合治疗 | 10       | 2          | 6 | 2  | —* △ △ ▲ | —    | 1          | 3 | 5  | 1* △ | —    |

注:与正常对照组比较,\*  $P < 0.01$ ;与模型组比较,△  $P < 0.05$ ,△△  $P < 0.01$ ;与 TMP 组比较,▲  $P < 0.05$

模型组与正常对照组比较,P、E-选择素的表达明显上调( $P < 0.01$ );TMP 组与模型组比较,其选择素的表达有所降低,与正常对照组比较则表达仍处于高水平( $P < 0.01$ );而联合治疗组与模型组比较,选择素的表达明显下调( $P$  值均  $< 0.05$ ),其中 P-选择素的表达下调较 TMP 组明显,其差异也有显著性( $P < 0.05$ ),但仍高于正常对照组。

## 讨 论

AMI 是由于急性心肌严重缺血缺氧而坏死的疾病。早在 1974 年,就有 Friedman<sup>[5]</sup>等学者提出,白细胞与心肌梗死的危险程度有密切关系。事实证明,白细胞,尤其是中性粒细胞,呈一种潜在损伤细胞状态,

一旦被激活,可以释放多种活性物质,导致内皮细胞和心肌细胞损伤。选择素家族与白细胞沿血管内皮滚动并黏附于内皮表面有密切关系。E-选择素主要介导白细胞在炎症部位的血管内皮处滚动与聚集;P-选择素<sup>[6]</sup>参与介导中性粒细胞、单核细胞及肿瘤细胞等与活化内皮细胞或血小板的黏附,还可能参与由内皮细胞触发的血栓形成。由此可见,白细胞在组织间的浸润程度与黏附分子的表达有着直接的关系。本实验结果显示,模型组 CK、TnT 浓度较正常对照组明显升高( $P < 0.01$ ),且光镜下,可见明显心肌细胞坏死灶、胞浆溶解等心肌急性损害表现,符合急性心肌梗死的病变特点。另外,模型组心肌组织 MPO 的浓度及 P、E-选择素的表达显著上调,MPO 是白细胞浸润的敏感性指标,表明白细胞在心肌的浸润大大增加,这一结果证实白细胞及黏附分子与心肌梗死的发生有着密切关系。

与模型组相比,TMP 组的血清 TnT 浓度明显下降( $P < 0.01$ );光镜下观察到心肌细胞的损伤也有所减轻,炎性细胞的浸润减少等,以上表明 TMP 可减轻 AMI 时心肌的损伤,这一结果可能与 TMP 有效保护 SOD 活力,提高清除氧自由基的能力,减少脂质过氧化物的形成有关。另有实验证明<sup>[7,8]</sup>,TMP 还可通过调节一氧化氮合酶(NOS)的活性,控制 NO 水平,使其在缺血早期含量增加,从而使黏附分子的表达下降,白细胞浸润减少,继而减轻其对心肌细胞的毒性损害作用。实验也发现:TMP 组的血清 CK,心肌组织 MPO 浓度,P、E-选择素的表达比模型组也略有所下降,但无明显差异( $P > 0.05$ )。故可推断,TMP 对黏附分子的表达,及中性粒细胞在心肌组织的浸润,并无明显的抑制作用。

L-arg 在体内经 NOS 作用后生成 NO 发挥作用。NO 的生物学效应主要为:扩张局部血管、阻止血小板聚集、中和或直接清除氧自由基等作用。另有资料显示<sup>[9]</sup>,NO 可影响黏附分子的活性或抑制其表达,是一种非常重要的内源性中性粒细胞黏附调节剂。本实验结果显示,当给予外源性 L-arg 及腹腔注射 TMP 后,与模型组比较,上述各指标均有明显下降( $P$  值均  $< 0.05$ ),并且与 TMP 组相比,血清 TnT、心肌组织 MPO、P-选择素的变化程度差异有显著性( $P < 0.05$ );在光镜下可观察到心肌细胞的损伤更为减轻,仅有少量的炎性细胞浸润。提示,经过 TMP + L-arg 治疗后,其心肌保护作用较单一 TMP 治疗效果更为显著。

综上所述,可以推断二药合用对缺血心肌保护作用的可能机制为:(1)L-arg 在体内转变为 NO,它可抑制 P、E-选择素的表达,从而抑制白细胞黏附于内皮细胞

上,使其浸润到缺血心肌的量减少,减轻内皮和心肌的损伤。(2)TMP 一方面通过调节 NOS,使 NO 的含量增加从而协同 L-arg 保护作用,使 AM 表达下降,白细胞浸润减少;另一方面,通过保护 SOD 活力,抑制黄嘌呤氧化酶的生成,以减少体内的氧自由基含量,降低对心肌组织的损害。(3)TMP 可直接抑制  $TXA_2$ 、 $LTB_4$  等一些活性物质的生成,从而减少其对中性粒细胞的趋化作用,同时又可改善心肌组织的缺血缺氧状态。

## 参 考 文 献

- 1 周同,宋长玲.细胞黏附分子与心血管疾病.中国循环杂志 1995;10(8):502—503.  
Zhou T, Song CL. Cell adhesion molecule and cardiovascular diseases. Chin Circ J 1995;10(8):502—503.
- 2 郭鹞.人类疾病的动物模型.北京:人民卫生出版社,1982:367—369.  
Guo Y. Animal models of human disease. Beijing: People's Medical Publishing House, 1982:367—369.
- 3 王志维,高尚志,程邦昌,等.丹参、川芎嗪、三七治疗失血性休克晚期实验研究.中国中西医结合杂志 1997;17(5):292—294.  
Wang ZW, Gao SZ, Cheng BC, et al. Observation of therapeutic effect by combined administration of salvia miltiorrhiza, ligustrazine and panax notoginseng on late hemorrhagic shock of rabbits. Chin J Integr Tradit West Med 1997;17(5):292—294.
- 4 Andrew S, Xin-liang Ma, Allan M. The L-arginine in ameliorating reperfusion injury after myocardial ischemia in cat. Circulation 1992;86:279—288.
- 5 Friedman GD, Kiatsky AL, Siegel AB. The leukocyte count as a predictor of myocardial infarction. N Engl J Med 1974;290:1275—1278.
- 6 Bevilacqua M, Butcher E, Furie B, et al. Selectins: a family of adhesion receptors. Cell 1991;67:233—236.
- 7 樊光辉,肖剑青,陈菊梅,等.川芎嗪对冠心病患者血脂过氧化物质等含量的影响.中国中西医结合杂志 1994;14(1):26—28.  
Fan GH, Xiao JQ, Chen JM, et al. The influence of ligustrazine on the quantity of blood lipid peroxidant in coronary disease patients. Chin J Integr Tradit West Med 1994;14(1):26—28.
- 8 苗里宁,李红,顾华,等.川芎嗪对老龄鼠再灌注肾损伤中一氧化氮的作用研究.中国老年学杂志 2000;20(7):242—243.  
Miao LN, Li H, Gu H, et al. Investigation of ligustrazine on the effect of NO in old rat renal reperfusion injury. Chin J Geront 2000;20(7):242—243.
- 9 Ma LX, Weyrich AS, Lefer JD, et al. Diminished basal nitric oxide release after myocardial ischemia and reperfusion promotes neutrophil adherence to coronary endothelium. Circ Res 1993;72(2):403—407.

(收稿:2003-06-30 修回:2004-07-18)