

川芎嗪对心肌梗死大鼠交感神经重构的抑制作用及其机制

赵自冰¹, 马英东², 牛燕运¹, 张志勇¹, 陈剑²

(1. 邯郸市中医院心内科, 河北省邯郸市 056001; 2. 中山大学附属第五医院心血管内科, 广东省珠海市 519000)

[关键词] 川芎嗪; 心肌梗死; 交感神经重构; 氧化应激

[摘要] **目的** 探讨川芎嗪是否拮抗氧化应激并减轻心肌梗死(MI)后交感神经重构。**方法** 将40只成年雄性Sprague-Dawley大鼠随机分为对照组($n=10$)、模型组($n=15$)和治疗组($n=15$),后两组采用结扎左前降支的方法制作MI模型,对照组行假手术。治疗组术后24 h腹腔注射川芎嗪注射液120 mg/kg,每天1次,连续6周;另两组腹腔内注射等量生理盐水。术后6周行多普勒心脏彩超检查测定心脏指标,检测血浆超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)含量;检测大鼠MI边缘区酪氨酸羟化酶(TH)阳性神经纤维密度,并对氧化应激与交感神经重构程度进行相关分析。**结果** 模型组左心室舒张期末内径(LVEDD)和左心室收缩期末内径(LVESD)均高于对照组,射血分数(EF)、短轴缩短率(FS)均低于对照组($P<0.05$);治疗组LVEDD、LVESD均低于模型组,EF、FS均高于模型组($P<0.05$)。治疗组血浆SOD含量高于模型组($P<0.05$),MDA含量低于模型组($P<0.01$)。模型组TH阳性神经纤维密度明显高于对照组,治疗组TH阳性神经纤维密度明显低于模型组($P<0.01$)。MDA/SOD与TH阳性神经纤维密度存在直线相关($r=0.909, P<0.01$)。**结论** 川芎嗪抑制MI后交感神经重构,与其拮抗氧化应激作用密切相关。川芎嗪抑制MI后交感神经重构为减少MI后室性心律失常提供新的治疗思路。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Suppression Effect and Underlying Mechanisms of Tetramethylpyrazine on Sympathetic Neural Remodeling in Rats Following Myocardial Infarction

ZHAO Zi-Bing¹, MA Ying-Dong², NIU Yan-Yun¹, ZHANG Zhi-Yong¹, and CHEN Jian²

(1. Department of Cardiology, Handan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Handan, Hebei 056001, China; 2. Department of Cardiology, The Fifth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Zhuhai, Guangdong 519000, China)

[KEY WORDS] Tetramethylpyrazine; Myocardial Infarction; Sympathetic Neural Remodeling; Oxidative Stress

[ABSTRACT] **Aim** To investigate whether tetramethylpyrazine can suppress oxidative stress and improve sympathetic neural remodeling in rats following myocardial infarction (MI). **Methods** A total of 40 male Sprague-Dawley rats were involved in this study. The animals were randomly divided into three groups: control group ($n=10$), MI group ($n=15$) and treated group ($n=15$). MI model was established by ligating left anterior descending artery of rats. Rats in treated group were intraperitoneally injected with tetramethylpyrazine at 120 mg/kg per day for 6 weeks post MI. The control group experienced the same procedure but ligation. Six weeks after operation, echocardiography and serological examination were performed to determine cardiac function, superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) in each group. Myocardial nerve density was determined in infarct marginal zone by immunohistochemistry staining with anti-tyrosine hydroxylase (TH) antibodies. Linear regression analyses were also performed to examine whether level of oxidative stress were associated with sympathetic neural remodeling. **Results** The left ventricular end diastolic diameter in diastole (LVEDD) and left ventricular end systolic diameter (LVESD) of MI group were higher than those of control group, while ejection fraction (EF) and fractional shortening (FS) were lower than those of control group (all $P<0.05$). LVEDD and LVESD were significantly reduced in treated group, as compared with the MI group, while EF and FS were significantly increased in treated group, as compared with the MI group (all $P<0.05$). SOD content was significantly in-

[收稿日期] 2015-01-19

[修回日期] 2015-09-08

[基金项目] 广东省自然科学基金资助项目(S2013040014921);广东省医学科研基金资助项目(B2012144)

[作者简介] 赵自冰,副主任医师,主要从事心血管临床与基础研究,E-mail为273371029@qq.com。马英东,主管护师,主要从事冠心病介入研究。牛燕运,硕士,主治医师,主要从事心血管临床与基础研究,E-mail为nyy_tiantian@sina.com。通讯作者陈剑,主要从事心血管临床与基础研究,E-mail为chenjn@mail.sysu.edu.cn。

creased and MDA significantly reduced in treated group, as compared with MI group ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively). TH-positive nerves were more abundant in the infarct marginal zone in MI group compared to control group, while TH-positive nerve density were reduced in treated group compared to MI group (all $P < 0.01$). Linear correlation between value of MDA/SOD and density of TH-positive nerve has been determined ($r = 0.909$, $P < 0.01$). **Conclusion** Tetramethylpyrazine can suppress sympathetic neural remodeling process after MI via attenuated oxidative stress, which may in turn leads to a promising treatment for the malignant ventricular arrhythmias post MI.

心肌梗死 (myocardial infarction, MI) 后的室性心律失常和心源性猝死仍然是当前世界上的主要死亡原因。然而, MI 后的致命性室性心律失常的发生机制仍不清楚。最近, 研究表明, 交感神经重构是 MI 后致命性心律失常及心源性猝死发生发展的重要机制之一, 逐渐成为当前的研究热点之一^[1-3]。越来越多的证据显示, 氧化应激和炎症反应通过增加局部的或循环中的神经生长因子, 进而促进 MI 后的交感神经重构^[4-6]。

川芎嗪是中药川芎的有效单体成分, 化学名为四甲基吡嗪, 具有抗血小板聚集、改善微循环及活血化淤等作用, 在脑、肾再灌注损伤模型中, 有抗炎、抗氧化等保护作用^[7]。近年来, 有学者观察到川芎嗪对 MI 大鼠心肌具有保护作用^[8-9]。研究表明, 川芎嗪减少缺血相关的室性心动过速与心室颤动的发生率达到 50% 以上。如果室性心动过速与心室颤动的减少与交感神经重构的改善有关, 本研究旨在探讨川芎嗪能够通过拮抗氧化应激和抗炎作用减轻交感神经重构。

1 材料和方法

1.1 实验动物

清洁级成年雄性 Sprague-Dawley 大鼠 40 只, 体重 300 ~ 340 g, 由中山大学实验动物中心提供, 实验动物质量合格证号: SCXK 粤 2009-0011。

1.2 主要药物、试剂与仪器

川芎嗪注射液 (哈尔滨三联药业); HX-300S 动物呼吸机 (四川成都泰盟科技有限公司); TH 兔抗大鼠多克隆抗体 (美国 Abcam 公司); MP150 多通道监测系统 (美国 BIOPAC 公司); Vivid7 Dimension 超声诊断仪 (美国 GE 公司, 10 S 探头, 频率为 8 MHz)。

1.3 大鼠 MI 模型制作及干预

将 40 只 SD 大鼠随机分为对照组 ($n = 10$)、模型组 ($n = 15$) 和治疗组 ($n = 15$)。后两组制作 MI 模型: 手术当天按 0.45 mL/100 g 给予腹腔内注射 1% 戊巴比妥麻醉, 术区备皮。用 14 G 的穿刺针套管作为气管插管插入。连接呼吸机, 术区消毒后从左侧

第 4 肋间打开胸腔, 结扎左冠状动脉前降支。结扎后肉眼见结扎区域变白、收缩力降低, MP150 多通道监测见 I、II 导联 J 点上移、ST 段明显抬高, 证明结扎前降支成功。术毕肌注青霉素 400 kU 以预防感染。对照组行假手术 (同法行手术操作暴露心脏, 但不结扎冠状动脉)。治疗组术后 24 h 腹腔注射川芎嗪注射液 120 mg/kg, 每天 1 次, 连续 6 周。另两组腹腔内注射等量生理盐水。对照组、模型组和治疗组术中及术后 4 周各死亡 1、6 和 3 只, 各组最后纳入后续实验的动物数分别为 9、9 和 12 只。

1.4 心脏结构和功能的指标检测

术后 6 周各组均行心脏彩色多普勒超声检查。以 1% 戊巴比妥钠按 0.45 mL/100 g 进行腹腔注射麻醉, 麻醉满意后固定于恒温手术板上, 胸前区备皮, MP150 多通道监测, 应用超声心动图仪检查心脏结构和功能。超声诊断仪获取胸骨旁左心室长轴和乳头肌水平短轴切面。检查指标包括左心室收缩期末内径 (left ventricular end systolic diameter, LVESD)、左心室舒张期末内径 (left ventricular end diastolic diameter, LVEDD)、室间隔厚度 (interventricular septal thickness, IVST)、左心室射血分数 (ejection fraction, EF) 和左心室短轴缩短分数 (fractional shortening, FS)。

1.5 血生物化学指标检测

超声检查后大鼠眼眶取血, 肝素抗凝, 置冷冻离心机中, 3000 r/min 离心 10 min, 取上清, -20°C 保存待用。按试剂盒说明采用紫外分光光度计检测血浆超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 和丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 含量。SOD 活性降低, MDA 水平升高, 提示氧化应激反应增强。

1.6 大鼠 MI 边缘区酪氨酸羟化酶阳性神经纤维密度检测

石蜡包埋后, 从心尖部到心底部垂直于心外膜切片, 片厚 5 μm 。按以下步骤进行免疫组织化学检测: ①切片脱蜡至水; ②枸橼酸钠修复液高压修复 1.5 min, 自然冷却; ③3% 双氧水作用 10 min, PBS 冲洗 5 min \times 3 次, 羊血清封闭 15 min; ④用 PBS 缓冲液按 1:750 稀释酪氨酸羟化酶 (tyrosine hydroxy-

lase, TH) 抗体, 对应加入 50 μL 抗体, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, PBS 冲洗 5 min \times 3 次; ⑤应用兔 SP 检测试剂盒, 滴加生物素二抗工作液 (IgG/Bio) 室温或 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 ~ 15 min, PBS 冲洗, 5 min \times 3 次; ⑥滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液 (S-A/HRP), 室温或 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 ~ 15 min, PBS 冲洗, 5 min \times 3 次; ⑦DAB 显色, 自来水冲洗, 苏木素复染细胞核, 切片脱水, 透明, 中性树胶封片。参照 Zhou 等^[10] 的方法用 Image Plus 6.0 软件及专用显微镜组成的图像分析系统检测 TH 阳性神经纤维密度, 每张玻片在物镜 40 \times 下进行测量, 取每个标本 MI 边缘区神经密度最高的区域, 选择合适的分割阈值进行单点分割, 然后用阳性神经纤维面积除以所选区域总面积。

表 1. 各组心脏结构和功能的超声心动图结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1. Comparison of cardiac structure and function by echocardiography in the three groups ($\bar{x} \pm s$)

分 组	n	LVEDD(mm)	LVESD (mm)	EF	FS
对照组	9	6.98 \pm 0.58	6.07 \pm 0.68	61.99% \pm 5.16%	33.24% \pm 4.65%
模型组	9	10.72 \pm 0.84 ^a	8.43 \pm 0.89 ^a	37.23% \pm 4.04% ^a	18.91% \pm 2.46% ^a
治疗组	12	8.63 \pm 0.59 ^{ab}	7.71 \pm 0.62 ^{ab}	43.55% \pm 4.29% ^{ab}	27.64% \pm 3.00% ^{ab}

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与模型组比较。

2.2 川芎嗪对 MI 后血浆 SOD 和 MDA 的影响

与对照组相比, 模型组血浆 SOD 含量明显降低, MDA 含量增高 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 治疗组血浆 SOD 含量增加 ($P < 0.05$), MDA 含量降低 ($P < 0.01$; 图 1)。

2.3 川芎嗪对 MI 边缘区 TH 阳性神经纤维密度的影响

对照组、模型组和治疗组 MI 边缘区 TH 阳性神经纤维密度分别为 $951.7 \pm 355.5 \mu\text{m}^2/\text{mm}^2$ 、 $3920.6 \pm 550.8 \mu\text{m}^2/\text{mm}^2$ 和 $2341.3 \pm 419.7 \mu\text{m}^2/\text{mm}^2$, 模型组 TH 阳性神经纤维密度较对照组明显增高, 治疗组 TH 阳性神经纤维密度较模型组降低 ($P < 0.01$; 图 2)。

2.4 MDA/SOD 与 TH 阳性神经纤维密度的相关性分析

通过散点图可见, MDA/SOD 与 TH 阳性神经纤维密度可能存在直线相关; 经过直线回归分析, 相关系数为 0.909 ($P < 0.01$), 提示两者密切相关 (图 3)。

1.7 统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 如数据符合正态分布且方差齐性则组间比较采用方差分析, 两两比较采用 SNK 法, 否则应用秩和检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 大鼠心脏彩色多普勒超声检查情况

MI 后模型组和治疗组 LVEDD 和 LVESD 较对照组增加, EF 和 FS 较对照组降低, 川芎嗪治疗后上述指标较模型组有所改善 ($P < 0.05$; 表 1)。

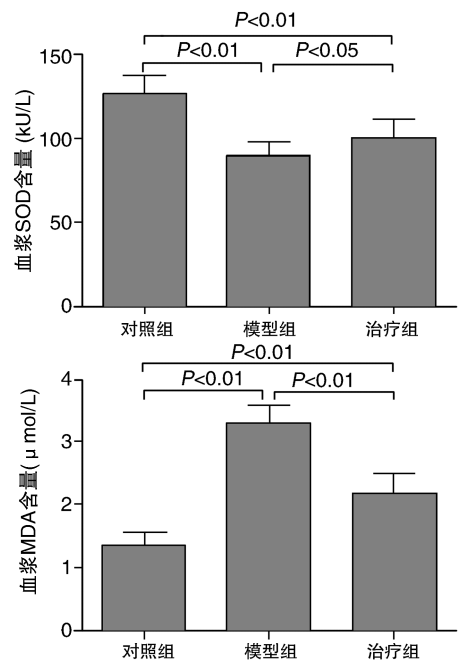


图 1. 各组血浆 SOD 和 MDA 含量比较

Figure 1. Comparison of the content of plasma SOD and MDA in the three groups

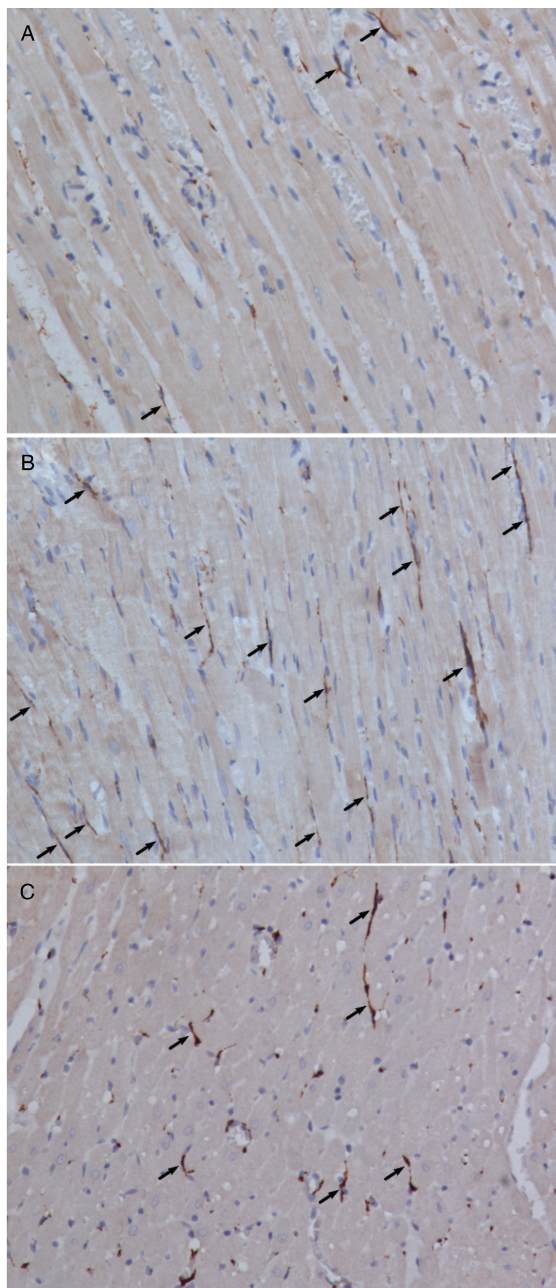


图 2. 各组 MI 边缘区 TH 阳性神经纤维密度比较 ($\times 200$)
A 为对照组, B 为模型组, C 为治疗组。箭头所示为 TH 阳性神经纤维。

Figure 2. Comparison of TH positive nerve fiber at infarct marginal zone in the three groups ($\times 200$)

3 讨论

在本研究中,我们观察到川芎嗪治疗大鼠 MI 增高了血浆 SOD 并同时降低 MDA,抑制了 MI 后氧化应激反应,同时抑制了 MI 边缘区 TH 阳性神经纤维密度,提示交感神经重构改善,进一步的相关分析显示,氧化应激反应降低与交感神经重构改善呈正相关。

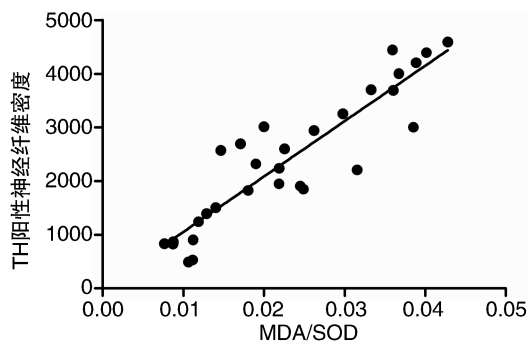


图 3. MDA/SOD 与 TH 阳性神经纤维密度呈直线相关的散点图

Figure 3. Scatter diagram and linear correlation between MDA/SOD and TH positive nerve fiber density

川芎嗪是从川芎中提取的有效成分,属于酰胺类生物碱,具有抑制炎症细胞激活、减少促炎症反应细胞因子产物、拮抗氧化应激、抗凋亡等作用,能够减轻细胞缺血再灌注损伤,临床已广泛应用于心、脑、肾等重要器官缺血性疾病的治疗。近年来,有学者观察到川芎嗪能降低心肌缺血再灌注时氧化应激反应对心肌的损害,对 MI 大鼠心肌具有保护作用^[11]。本研究中,彩色多普勒超声检查各组 LVEDD、LVESD、EF 和 FS 等指标,MI 后上述指标均较假手术组明显恶化,经过川芎嗪治疗,LVEDD、LVESD、EF 和 FS 均较模型组有所改善,表现出川芎嗪对 MI 有一定程度的保护作用。

交感神经重构是指 MI 时局部自主神经发生损伤,MI 后慢性期存在着神经修复反应,表现为神经鞘细胞和轴突再生或过度再生。多个研究发现 MI 后在一定时间内于 MI 边缘区出现以交感神经为主的新生神经纤维^[12],而且这些纤维更粗更多,空间分布更乱。交感神经重构常常使用 TH 阳性神经纤维密度来表示,TH 是交感神经胞浆去甲肾上腺素合成的限速酶,可以作为交感神经的标记。越来越多的证据显示,MI 后的氧化应激和炎症反应通过增加局部的或循环中的神经生长因子,进而促进 MI 后的交感神经重构。而交感神经重构是 MI 后致命性心律失常及心源性猝死发生发展的重要机制。近年有研究川芎嗪对兔缺血性室性心律失常时心外膜单相动作电位的影响发现,川芎嗪能减轻缺血后心外膜单相动作电位改变程度,具有抗缺血性室性心律失常作用。本研究中,与无川芎嗪治疗的 MI 大鼠比较,川芎嗪治疗大鼠 MI,抑制了 MI 边缘区 TH 阳性神经纤维密度,减轻了局部的交感神经重构。此外,本研究检测三组血浆 SOD 和 MDA 水平,

对照组较其他两组 SOD 均高,MDA 最低,模型组则相反,两者 MDA/SOD 最高,提示 MI 后存在高强度的氧化应激。川芎嗪治疗大鼠 MI,增高了血浆 SOD 并同时降低 MDA,提示川芎嗪抑制了 MI 后氧化应激反应。进一步的相关分析显示氧化应激反应降低与交感神经重构改善呈正相关。这提示川芎嗪通过拮抗氧化应激,进而减轻交感神经重构,对 MI 后室性心动过速与心室颤动的发生有抑制作用。

总之,本研究观察到川芎嗪对大鼠 MI 后氧化应激的抑制作用可改善 MI 边缘区交感神经重构,提示川芎嗪可能是 MI 后室性心律失常和心源性猝死防治有希望的方法之一。

[参考文献]

- [1] Yuan MJ, Huang CX, Tang YH, et al. A novel peptide ghrelin inhibits neural remodeling after myocardial infarction in rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2009, 618 (1-3): 52-57.
- [2] Shen MJ, Zipes DP. Role of the autonomic nervous system in modulating cardiac arrhythmias [J]. *Circ Res*, 2014, 114 (6): 1 004-021.
- [3] Fukuda K, Kanazawa H, Aizawa Y, et al. Cardiac innervation and sudden cardiac death [J]. *Circ Res*, 2015, 116 (12): 2 005-019.
- [4] Wernli G, Hasan W, Bhattacharjee A, et al. Macrophage depletion suppresses sympathetic hyperinnervation following myocardial infarction [J]. *Basic Res Cardiol*, 2009, 104 (6): 681-693.
- [5] Kimura K, Ieda M, Fukuda K. Development, maturation, and transdifferentiation of cardiac sympathetic nerves [J]. *Circ Res*, 2012, 110 (2): 325-336.
- [6] Huang B, Scherlag BJ, Yu L, et al. Renal sympathetic denervation for treatment of ventricular arrhythmias: a review on current experimental and clinical findings [J]. *Clin Res Cardiol*, 2015, 104 (7): 535-543.
- [7] Xiao X, Liu Y, Qi C, et al. Neuroprotection and enhanced neurogenesis by tetramethylpyrazine in adult rat brain after focal ischemia [J]. *Neurol. Res*, 2010, 32 (5): 547-555.
- [8] 吕磊, 孟庆欣, 徐军, 等. 川芎嗪减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤炎症反应及机制 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2012, 20 (6): 514-518.
- [9] Yu L, She T, Li M, et al. Tetramethylpyrazine inhibits angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy and tumor necrosis factor- α secretion through an NF- κ B-dependent mechanism [J]. *Int J Mol Med*, 2013, 32 (3): 717-722.
- [10] Zhou S, Chen LS, Miyauchi Y, et al. Mechanisms of cardiac nerve sprouting after myocardial infarction in dogs [J]. *Circ Res*, 2004, 95 (1): 76-83.
- [11] Lv L, Jiang SS, Xu J, et al. Protective effect of ligustrazine against myocardial ischaemia reperfusion in rats: the role of endothelial nitric oxide synthase [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2012, 39 (1): 20-27.
- [12] 陈剑, 黄穗花, 柯剑婷, 等. 不同位置结扎冠状动脉对大鼠心肌梗死后交感神经重构的影响 [J]. *广东医学*, 2012, 33 (12): 1 712-715.

(此文编辑 文玉珊)