

[文章编号] 1007-3949(2008)16-11-0861-04

• 实验研究 •

## 通心络对大鼠冠状动脉微栓塞后心肌 间质重塑及左心室功能的影响

傅发源, 李淑梅, 陈良龙

(福建医科大学附属协和医院内科, 福建省福州市 350001)

[关键词] 内科学; 通心络; 冠状动脉微栓塞; 心肌间质; 重塑; 左心室功能

[摘要] 目的 探讨通心络干预对冠状动脉微栓塞后心肌间质重塑及左心室功能的影响。方法 雄性 SD 大鼠 60 只, 随机分为对照组、微栓塞组和通心络组, 每组分为术后 3 天和 4 周两个观察时间点, 每时间点 10 只。术后 3 天观察冠状动脉微栓塞后心肌病理学改变; 术后 4 周观察心肌间质胶原纤维面积、小冠状动脉血管密度及左心室功能变化情况。结果 术后 3 天, 微栓塞组心肌内点状分布的坏死灶形成, 多位于心内膜下, 周围炎症细胞浸润明显增多, 符合微栓塞病理学改变。与微栓塞组比较, 通心络干预 4 周后心肌间质胶原纤维沉积明显减轻, 小冠状动脉密度显著增加; 同时左心室腔减小, 左心室壁增厚, 心功能明显改善。结论 大鼠冠状动脉微栓塞后, 予通心络干预 4 周能减轻心肌间质的重塑, 并改善左心室功能。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

### Effect of Tongxinluo Capsules on Cardiac Interstitium Remodeling and Left Ventricular Function After Coronary Microembolization in Rats

FU Fa-Yuan, LI Shu-Mei and CHEN Liang-Long

(Department of Cardiology, the Union Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China)

[KEY WORDS] Tongxinluo Capsules; Coronary Microembolization; Cardiac Interstitium; Remodeling; Left Ventricular Function

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of Tongxinluo capsules on cardiac interstitium remodeling and left ventricular function after coronary microembolization. **Methods** 60 male SD rats were randomly separated into three groups: control group, coronary microembolization group and tongxinluo group, each group consisted of 20 rats. After 3 days for operation, morphological characteristics were evaluated by HE staining; after 4 weeks for operation, collagen deposition were calculated by Sirius-red staining; intramyocardial arteriole detected by immunostaining for factor  $\alpha$ -actin antibody; left ventricular function measured by echocardiography. **Results** After 3 days for operation, HE staining showed multifocal myocardial necrosis with inflammatory cells infiltration and necrosis with more involvement in subendocardial region. After 4 weeks for operation, compared with coronary microembolization group, the area of myocardial collagen were decreased in tongxinluo group, and the density of intramyocardial arteriole increased. Left ventricular end-diastolic dimension (LVEDD), left ventricular end-systolic dimension (LVESD) were smaller; left ventricular posterior wall thickness (LVPWT) thicker and left ventricular ejection fraction (LVEF) higher in tongxinluo group than those in coronary microembolization group. **Conclusion** Intervention with tongxinluo capsules for 4 weeks can reduce cardiac interstitium remodeling and improve left ventricular function after coronary microembolization in rats.

在急性冠状动脉综合征和各种冠状动脉血运重建治疗中, 常见到冠状动脉粥样硬化斑块破裂<sup>[1,2]</sup>, 斑块破裂后释出的致栓物质及脱落的小血栓会随血流流向远端, 阻塞微血管, 造成冠状动脉微栓塞, 使心肌组织水平的灌注发生障碍, 严重影响患者的预后<sup>[3,4]</sup>。冠状动脉微栓塞发生后, 除了影响急性期

冠状动脉血流动力学外, 更重要的是它可导致慢性期心脏的重塑和心功能下降。研究证实通心络胶囊在抗血栓、减轻心肌梗死后心肌重塑、保护血管内皮及改善微循环方面具有良好作用, 但其在冠状动脉微栓塞领域的研究未见报道。本实验室通过注射自体微血栓的方法, 已建立了大鼠冠状动脉微栓塞模型<sup>[5]</sup>; 在此基础上, 探讨通心络干预对大鼠冠状动脉微栓塞后慢性期心肌间质重塑及心功能的影响, 为临床应用通心络治疗冠状动脉微栓塞提供实验依据。

[收稿日期] 2008-07-26 [修回日期] 2008-10-02

[基金项目] 福建省卫生厅青年基金课题 (2004-1-17)

[作者简介] 傅发源, 博士研究生, 主治医师, 研究方向为冠状动脉微栓塞的诊治, Email为 fufayuan@hotmail.com。李淑梅, 博士, 主治医师, 主要从事冠状动脉微栓塞的基础研究。通讯作者陈良龙, 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要从事冠心病的诊断与治疗, Email为 lianglongcher@126.com。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

天狼猩红 (Cell Signaling公司), 兔抗鼠  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -actin) 抗体 (北京中山生物技术有限公司), 即用型免疫组织化学超敏 SP 试剂盒、AEC 显色剂 (福州迈新生物技术开发公司), 通心络药粉含人参、水蛭、全蝎、土鳖虫、蜈蚣、蝉蜕、赤芍和冰片等成份 (河北以岭集团), TKR-200C 小动物呼吸机 (江西省特力麻醉呼吸设备公司), GE SYSTEM 90 超声心动图仪及 5 MHz 多平面经食道超声探头 (美国 GE 公司), MAGE PRO 4.0 显微镜结合计算机显微图像分析系统 (日本 Olympus 公司)。

### 1.2 动物分组

清洁级健康雄性 SD 大鼠 60 只, 体重 230~250 g 由福建医科大学实验动物中心提供, 动物及实验步骤符合国家实验动物管理条例。随机分为对照组、微栓塞组和通心络组, 每组分为术后 3 天和术后 4 周两个观察时间点, 每时间点 10 只。

### 1.3 冠状动脉微栓塞模型的复制及术后给药

本实验室利用自体微血栓已成功构建稳定、重复性好的大鼠冠状动脉微栓塞模型<sup>[5]</sup>, 主要步骤如下: 术前取尾静脉血 1 mL 烘干成血凝块, 研碎后用孔径 38  $\mu$ m 的滤网过筛, 显微镜下 8~38  $\mu$ m 微血栓颗粒累计约  $(3 \sim 3.8) \times 10^{12}$  个/g。次日动物麻醉后, 气管插管, 呼吸机辅助通气, 切开胸部, 环绕胸骨高位结扎双侧内乳动脉, 分离升主动脉, 升主动脉根部夹闭的同时以微量注射器自左心室前壁中段 (前降支左侧 2~3 mm) 处向左心室腔内注入自体微血栓 5 mg (以生理盐水稀释成 0.3 mL), 约 10 s 后松开主动脉, 止血后逐层缝合胸腔, 待大鼠恢复自主呼吸后拔管。对照组则注入等量生理盐水 (其余步骤同微栓塞组和通心络组), 青霉素腹腔注射预防感染。术后通心络组以通心络药粉 1 g/(kg·d) (用生理盐水稀释到 3 mL) 灌胃, 每日一次; 对照组及微栓塞组则予生理盐水 3 mL 灌胃, 每日一次。

### 1.4 冠状动脉微栓塞后病理学改变

术后 3 天, 经大鼠股静脉注入 10% 氯化钾 2 mL, 使心室停搏于舒张期, 迅速开胸取出心脏, 肝素生理盐水冲洗后去除大血管及心房组织, 平行房室间沟方向将心室横切为 2 mm 厚组织块, 10% 中性甲醛固定 24 h 埋蜡、切片、HE 染色, 显微镜结合计算机及显微图像分析系统观察心肌病理学改变。

### 1.5 超声心动图仪检测心脏的重塑

术后 4 周, 动物予腹腔注射复合麻醉后, 剔除胸

部体毛, 取仰卧位, 应用超声心动图仪及 5 MHz 多平面经食道超声探头进行体表经胸 M 型及二维超声心动图检查, 二维超声扫查角度为 15~20°、深度 2~3 cm, 以使帧数至少达 200 Hz。调整多平面经食道超声探头声束方向, 取得腱索水平左心室短轴切面图像, 应用 M 型超声心动图连续测量 3 个不同心动周期左心室收缩期末内径 (left ventricular end-systolic dimension, LVESD)、舒张期末内径 (left ventricular end-diastole dimension, LVEDD)、左心室后壁厚度 (left ventricular posterior wall thickness, LVPWT)、左心室射血分数 (left ventricular ejection fraction, LVEF) 及左心室短轴缩短率 (left ventricular fractional shortening LVFS), 取平均值。

### 1.6 天狼猩红饱和苦味酸液染色观察细胞间质中胶原纤维的面积

超声心动图仪测定结束后, 按上述方法制作大鼠石蜡切片, 常规脱蜡至水, 天青石蓝液染色 5 min, 蒸馏水洗 3 次, 天狼猩红饱和苦味酸液染色 15 min, 无水乙醇直接分化与脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。观察胶原纤维染成红色, 心肌细胞呈黄色。显微镜结合计算机及显微图像分析系统随机观察 20 个 100 倍视野, 计算每个视野下胶原纤维所占面积的百分比, 取平均值。

### 1.7 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白抗体染色观察心肌内小冠状动脉密度

上述大鼠石蜡切片常规脱蜡至水, 微波抗原修复 (柠檬酸缓冲液, pH = 6.0), 1%  $H_2O_2$  阻断内源性过氧化物酶 10 min, 并根据 SP 免疫组织化学试剂盒说明书依次加入: 兔抗鼠  $\alpha$ -actin 抗体 (1:100 稀释) 4℃孵育过夜、二抗、三抗, AEC 显色, 苏木素复染, Clearmount 封片后显微镜下观察。阴性对照以 PBS 代替一抗。显微镜结合计算机显微图像分析系统随机观察 20 个 200 倍视野, 计算单位面积下管壁外径 50~200  $\mu$ m 的小冠状动脉 (显微镜下血管壁染成红色) 密度 (根/mm<sup>2</sup>)。

### 1.8 统计学分析

所有数据均用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用 One-Way ANOVA 分析,  $P < 0.05$  为差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 冠状动脉微栓塞后病理学改变

术后 3 天对照组心肌细胞排列整齐、间质无水肿, 无心肌细胞坏死; 微栓塞组心肌内点状分布坏死灶形成, 多位于心内膜下, 周围炎症细胞浸润明显增

多;通心络组坏死灶减少,炎症反应减轻(图 1)。

## 2.2 细胞间质中胶原纤维的面积

术后 4 周,微栓塞组胶原纤维所占面积百分比比对照组明显增加( $11.39\% \pm 0.63\%$  比  $1.06\% \pm 0.14\%$ ,  $P < 0.01$ ),提示大鼠自身的血栓微粒造成冠状动脉微栓塞后,胶原纤维明显增生,形成微小纤维化灶。而通心络组胶原纤维所占面积百分比与微栓塞组比明显减少( $6.87\% \pm 0.99\%$  比  $11.39\% \pm 0.63\%$ ,  $P < 0.01$ ),表明冠状动脉微栓塞后,用通心络干预 4 周可显著抑制胶原纤维的增生(图 1)。

## 2.3 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白抗体染色观察心肌内小冠状动脉密度

微栓塞组心肌内小冠状动脉密度比对照组明显减少( $4.35 \pm 0.43$  根/ $\text{mm}^2$  比  $6.35 \pm 0.29$  根/ $\text{mm}^2$ ,  $P < 0.01$ ),提示冠状动脉微栓塞后慢性过程可造成心肌内小血管床密度的减少。与微栓塞组比较,通心络组心肌内小冠状动脉密度明显增加( $5.30 \pm 0.29$  根/ $\text{mm}^2$  比  $4.35 \pm 0.43$  根/ $\text{mm}^2$ ,  $P < 0.01$ ),表明冠状动脉微栓塞后,用通心络干预 4 周可增加心肌小血管床的密度(图 1)。

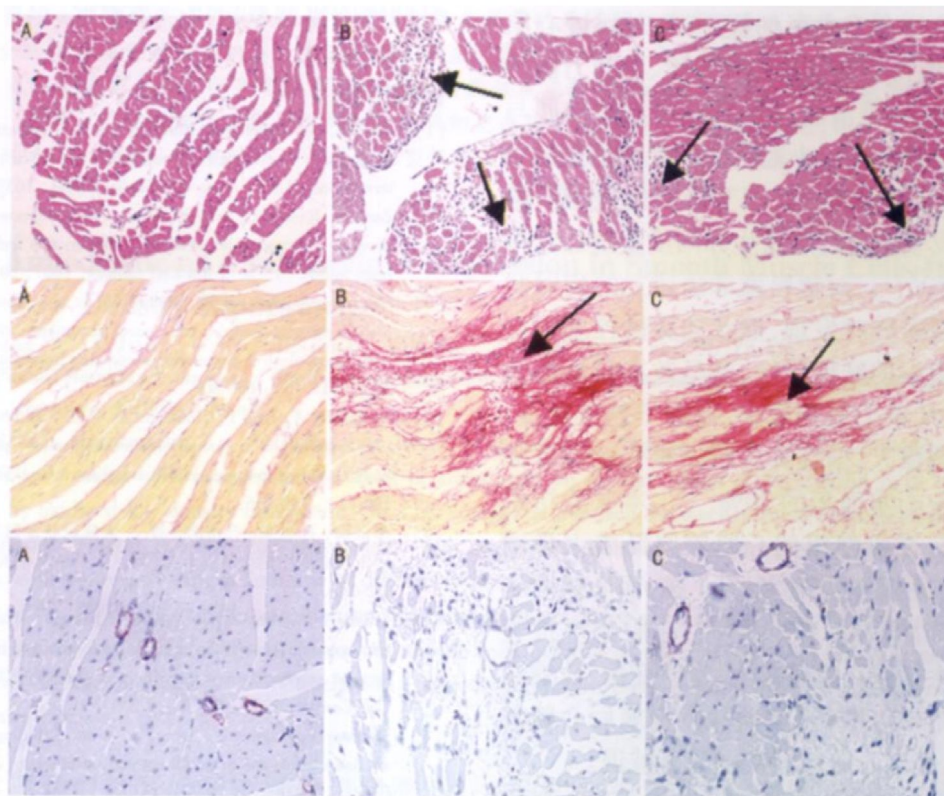


图 1 术后 3 天心肌病理学改变(上图,  $\times 100$ )及术后 4 周心肌细胞间质胶原纤维的面积(中图,  $\times 100$ )和心肌内小冠状动脉密度(下图,  $\times 200$ ) A 为对照组, B 为微栓塞组, C 为通心络组。

## 2.4 大鼠存活情况及超声心动图仪检测心脏重塑

对照组 20 只大鼠全部存活;微栓塞组共死亡 4 只(20%),存活大鼠出现活动力下降,进食减少,呼吸困难;通心络组共死亡 1 只(5%),存活大鼠活动力较微栓塞组有所增强,食欲增加;死亡大鼠尸检发现,双肺淤血、胸腔血性积液,表明可能死于心功能衰竭。术后 4 周,与对照组比,微栓塞组 LVEDD 和 LVESD 增大, LVPWT 减小, LVFS 和 LVEF 降低( $P < 0.01$ ),提示冠状动脉微栓塞后 4 周,大鼠左室内径扩大、心室壁厚度变薄、收缩功能减退,心脏发生明显重塑;与微栓塞组比,通心络组 LVEDD 和 LVESD 减小而 LVPWT 增大( $P < 0.01$ ), LVEF 升高

( $P < 0.05$ ), LVFS 有所升高,但差异无显著性( $P > 0.05$ ),表明冠状动脉微栓塞后,用通心络干预 4 周可明显改善左心室重塑,增强心脏收缩功能(表 1)。

表 1 冠状动脉微栓塞后心功能指标改变( $\bar{x} \pm s$ )

指 标	对照组	微栓塞组	通心络组
LVEDD(mm)	$4.15 \pm 0.18$	$5.20 \pm 0.21^a$	$4.68 \pm 0.18^c$
LVESD(mm)	$2.20 \pm 0.11$	$3.21 \pm 0.20^a$	$2.75 \pm 0.13^c$
LVPWT(mm)	$2.25 \pm 0.15$	$1.61 \pm 0.24^a$	$1.89 \pm 0.21^c$
LVFS	$46.9\% \pm 3.2\%$	$38.2\% \pm 6.1^a$	$41.1\% \pm 4.9\%$
LVEF	$78.8\% \pm 2.5\%$	$67.5\% \pm 4.4^a$	$71.4\% \pm 3.6^b$

a 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.05$ ; c 为  $P < 0.01$ , 与微栓塞组比较。



### 3 讨论

冠状动脉粥样斑块破裂是急性冠状动脉综合征及冠状动脉介入治疗中的关键事件<sup>[6]</sup>, 冠状动脉主枝的开通并不意味着心肌组织水平血供的恢复<sup>[7]</sup>, 冠状动脉微栓塞的发生意味着患者不良的预后和更高的死亡率。因此, 如何减少冠状动脉微栓塞的发生以及改善冠状动脉微栓塞引起的心脏重塑具有重要的临床意义。

心肌间质由胶原纤维及小冠状动脉等组成。胶原纤维呈网络状分布于有形细胞之间, 对保证心肌组织水平血供、维持心脏结构的完整性、参与力的传递整合、防止心肌纤维滑脱以及影响心肌的伸展与回缩等方面有重要意义。小冠状动脉特别是直径小于 200  $\mu\text{m}$  的血管参与输送、调节心肌的血流。急性心肌梗死后发生胶原纤维增生和间质重塑已经得到许多实验证实<sup>[8-9]</sup>。对塑料微球法建立的狗冠状动脉微栓塞模型研究时发现, 冠状动脉微栓塞后心肌组织可出现微小的纤维化灶, 并呈散在局灶性分布, 这些纤维化灶单个面积虽小, 但由于数量众多, 所以累计的面积惊人, 据估算心肌纤维化灶的总面积可占到整个左心室面积的 20%<sup>[10]</sup>。本实验结果表明, 术后 4 周, 微栓塞组的心肌胶原纤维大量增生, 明显高于对照组, 约是后者的 11 倍, 而心肌内小冠状动脉密度却减少约 31%; 同时, 心脏超声检查显示微栓塞组大鼠左心室腔扩大, 室壁变薄, 收缩功能减退。上述结果表明, 冠状动脉微栓塞后心脏发生了明显重塑, 伴随心脏收缩功能显著减退。

孔强等<sup>[11]</sup>研究表明, 通心络能减轻大鼠心肌梗死后心肌间质胶原纤维沉积, 一定程度上抑制心室重塑; 此外, 通心络在抗血小板聚集、抗凝及保护血管内皮方面也有显著的功效<sup>[12-13]</sup>; 但通心络在冠状动脉微栓塞领域的应用还未见相关报道。本实验结果表明, 冠状动脉微栓塞后用通心络干预 4 周, 心肌间质胶原纤维的含量明显减少, 心肌内小冠状动脉的密度却明显增加, 表明通心络可有效降低间质胶原纤维的含量, 增加心肌内小血管床的密度。超声心动图检查进一步显示, 通心络可使大鼠 LVEDD 和 LVESD 明显变小, LVPWT 增加, LVEF 显著上升, 表明通心络能明显改善冠状动脉微栓塞后心脏的重塑, 增强左心室的收缩功能。大鼠心功能的改善与微栓塞后心肌间质胶原纤维沉积的减轻及小冠状动脉密度增加的趋势是一致的, 提示通心络改善大鼠

冠状动脉微栓塞后心功能可能是通过增加小冠状动脉的密度, 增加心肌组织水平的血供, 以及减轻心肌间质胶原纤维的沉积实现的。有研究表明, 通心络通过下调心肌基质金属蛋白酶 9 的表达, 促进金属蛋白酶组织抑制因子 1 的表达, 减轻大鼠心肌梗死后心肌间质胶原沉积<sup>[11]</sup>。通过降低血中丙二醛浓度, 升高一氧化氮浓度, 保护急性心肌梗死患者再灌注后心肌和微血管<sup>[14]</sup>。冠状动脉微栓塞后, 通心络能增加小冠状动脉的密度, 减轻心肌间质胶原纤维的沉积, 改善大鼠冠状动脉微栓塞后心功能是否也有同样的机制有待进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] Bise D, von Bigelen C, Zhou XY, et al. Impact of atherosclerotic plaque composition on coronary microembolization during percutaneous coronary interventions [J]. *Basic Res Cardiol* 2008; **103** (6): 587-597.
- [2] Zacc V, Rastogi S, Inai M, et al. Chronic monotherapy with rosuvastatin prevents progressive left ventricular dysfunction and remodeling in dogs with heart failure [J]. *J Am Coll Cardiol* 2007; **50** (6): 551-557.
- [3] Bahmann P, Wemer GS, Heusch G, et al. Detection of coronary microembolization by Doppler ultrasound in patients with stable angina pectoris undergoing elective percutaneous coronary interventions [J]. *Circulation* 2007; **115** (5): 600-608.
- [4] Skyschally A, Gres P, Hoffmann S, et al. Bidirectional role of tumor necrosis factor- $\alpha$  in coronary microembolization: progressive contractile dysfunction versus delayed protection against infarction [J]. *Circ Res* 2007; **100** (1): 140-146.
- [5] 李淑梅, 孙旭东, 孙伏清, 等. 大鼠冠状动脉微栓塞后细胞间黏附分子 1 在心肌中的表达及意义 [J]. *中华老年医学杂志*, 2007; **26** (4): 285-288.
- [6] Galute L, Garramone R, Burzotta F, et al. Thrombus aspiration reduces microvascular obstruction after primary coronary intervention: a myocardial contrast echocardiography substudy of the REMEDIA Trial [J]. *J Am Coll Cardiol* 2006; **48** (7): 1355-360.
- [7] Matthew T, Magnus O, Arthur C, et al. Shifting the open-artery hypothesis downstream: the quest for optimal reperfusion [J]. *J Am Coll Cardiol* 2002; **40** (1): 9-18.
- [8] Flaherty JD, Udelsom JE, Gheorghiade M, et al. Assessment and key targets for therapy in the postmyocardial infarction patient with left ventricular dysfunction [J]. *Am J Cardiol* 2008; **102** (5A): 5C-12C.
- [9] French BA, Kramer CM. Mechanisms of post-infarct left ventricular remodeling [J]. *Drug Discov Today Dis Mech* 2007; **4** (3): 185-196.
- [10] Sabbah HN, Stein PD, Kono T, et al. A canine model of chronic heart failure produced by multiple sequential coronary microembolizations [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1991; **29** (1): 379-384.
- [11] 孔强, 华琦, 杨新春, 等. 通心络对大鼠心肌梗死后心肌 MMP-9 及 TIMP-1 表达作用的研究 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2007; **13** (11): 830-832.
- [12] 张路, 丁茹, 梁春, 等. 通心络对不稳定型心绞痛患者血管内皮生长因子水平的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007; **15** (8): 612.
- [13] 关启刚, 曾定尹, 孙喜琢, 等. 通心络抑制白细胞介素 1 $\beta$  介导的小型猪冠状动脉早期炎症反应及内膜增殖 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007; **15** (8): 575-579.
- [14] 尤士杰, 杨跃进, 陈可冀, 等. 通心络对急性心肌梗死患者再灌注后心肌和微血管的保护性研究 [J]. *中华心血管病杂志*, 2005; **33** (5): 45-49.

(此文编辑 许雪梅)