

【实验研究】

注射用益气复脉(冻干)改善大鼠急性心肌梗死作用及机制研究

聂永伟¹, 陈璐^{2,3}, 张燕欣^{3,4}, 万梅绪^{3,4}, 李智^{3,4}, 李德坤^{3,4*}

1. 南开大学 医学院, 天津 300071

2. 河北中医学院, 河北 石家庄 050200

3. 天津天士力之骄药业有限公司, 天津 300410

4. 天津市中药注射剂安全性评价企业重点实验室, 天津 300410

摘要:目的 初步研究注射用益气复脉(冻干)(YQFM)对大鼠急性心肌梗死的作用及机制。方法 构建冠状动脉左前降支永久性结扎导致的急性心肌梗死大鼠模型,使用随机数字法将模型成功大鼠分为模型组、卡托普利片(阳性药,3.67 mg/kg)组和YQFM低、中、高剂量(0.433、0.867、1.734 g/kg)组;假手术组进行胸腔切开术,不造模。每天给药1次,连续尾iv给药14 d。心电图检测大鼠的造模情况,超声心动检测大鼠左心室射血分数(LVEF);酶联免疫吸附(ELISA)法检测各组大鼠血清肌钙蛋白(Tn)、肌酸激酶同工酶MB(CK-MB)和乳酸脱氢酶(LDH)水平;心脏组织切片HE和Masson染色观察心肌纤维化程度;免疫组化和Western blotting法检测细胞外调节蛋白激酶1/2(ERK1/2)磷酸化水平变化。结果 与假手术组比较,大鼠造模后心电图均显示ST段抬高,P波波幅异常,表明急性心肌梗死大鼠模型构建成功;与模型组比较,YQFM低、中、高剂量组和卡托普利片组的LVEF显著升高($P<0.01$ 、 0.001);YQFM低、中、高剂量组和卡托普利片组血清Tn和LDH水平均显著降低($P<0.01$ 、 0.001);YQFM中、高剂量组和卡托普利片组CK-MB水平显著降低($P<0.05$ 、 0.01);YQFM明显抑制大鼠心肌纤维化,明显降低p-ERK1/2水平。结论 YQFM明显改善急性心肌梗死大鼠心功能,机制可能与抑制ERK1/2磷酸化、抑制心肌纤维化相关。

关键词: 注射用益气复脉(冻干);急性心肌梗死;心肌纤维化;ERK1/2

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2021)11-2350-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.11.008

Study on effect and mechanism of Yiqi Fumai Lyophilized Injection on acute myocardial infarction in rats

NIE Yongwei¹, CHEN Lu^{2,3}, ZHANG Yanxin^{3,4}, WAN Meixu^{3,4}, LI Zhi^{3,4}, LI Dekun^{3,4*}

1. School of Medicine, Nankai University, Tianjin 300071, China

2. Hebei University of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China

3. Tianjin Tasly Pride Pharmaceutical Co., Ltd., Tianjin 300410, China

4. Tianjin Key Laboratory of Safety Evaluation Enterprise of Traditional Chinese Medicine Injections, Tianjin 300410, China

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of Yiqi Fumai Lyophilized Injection (YQFM) on acute myocardial infarction in rats. **Methods** Rat model of acute myocardial infarction caused by left anterior descending coronary artery permanent ligation was established. The model rats were divided into YQFM low, medium, and high dose (0.433, 0.867, 1.734 g/kg) group, captopril (3.67 mg/kg) group, and model group by random number method. The sham operation group received pleurotomy without modeling. The drug was given once a day for 14 days. The electrocardiogram was used to detect the modeling of rats, and the echocardiography was used to compare the changes of cardiac function before and after treatment in rats with acute myocardial infarction. ELISA was used to detect the changes of serum biomarkers of acute myocardial infarction including Tn, CK-MB and LDH. Degree of myocardial fibrosis were observed by HE and Masson staining of heart tissue sections, and activated state of extracellular regulatory protein kinase 1/2 (ERK1/2) were detected by immunohistochemistry and Western blotting. **Results**

收稿日期: 2021-07-24

第一作者: 聂永伟,男,实验师,从事实验动物和中药药理研究。E-mail: yongweinie@nankai.edu.cn

*通信作者: 李德坤,男,高级工程师,主要从事中药工艺、质量控制、中药药理及药物警戒研究。E-mail: lidekun@tasly.com

Compared with sham operation group, ST segment elevation and abnormal P wave amplitude were observed in electrocardiogram after modeling, indicating successful establishment of acute myocardial infarction rat model. Compared with model group, LVEF in YQFM low, medium, high-dose groups and captopril tablet group was significantly increased ($P < 0.01$ and 0.001). The serum Tn and LDH levels in YQFM low, medium high-dose groups and captopril tablet groups were significantly decreased ($P < 0.01$ and 0.001). The level of CK-MB in YQFM medium, high dose groups and captopril tablet group was significantly decreased ($P < 0.05$ and 0.01). YQFM significantly inhibited myocardial fibrosis and decreased p-ERK1/2 level in rats. **Conclusion** YQFM significantly improved cardiac function in rats with acute myocardial infarction, and the mechanism may be related to inhibiting ERK1/2 phosphorylation and inhibiting myocardial fibrosis.

Key words: Yiqi Fumai Lyophilized Injection; acute myocardial infarction; myocardial fibrosis; ERK1/2

急性心肌梗死是一种由冠状动脉闭塞引起心肌细胞缺血,最终导致心肌细胞坏死的急性致死性心脏疾病。近年来随着鉴别诊断和迅速的再灌注治疗技术在临床应用中的普及,该病的早期死亡率显著降低,其中ST段抬高的急性心肌梗死(ST-segment elevation myocardial infarction, STEMI)患者的30 d生存率增加到了95%^[1]。然而来源于加拿大和澳大利亚两国的统计数据显示1994—2000年间25%的患者在首次诊断为急性心肌梗死后的1年内仍会心衰,75%的患者在5年内发生了心衰^[2]。2019年12月27日至2020年2月20日间,由于新型冠状病毒肺炎爆发的影响,我国STEMI患者接受再灌注治疗时间较以往延迟了接近20 min,其中湖北省内STEMI患者院内心衰发病率由14.2%增加到了18.4%,湖北省以外STEMI患者院内心衰发病率由13.2%增加到了14%^[3]。

注射用益气复脉(冻干)(YQFM)主要组分为红参、麦冬、五味子,经现代工艺研制而成^[4-5]。临床上主要用于冠心病劳累性心绞痛,以及冠心病所致纽约心脏病协会(New York Heart Association, NYHA)分类为II、III级的心衰^[6]。研究表明临床上急性心肌梗死并发心衰在住院治疗患者中较为常见,在因急性心肌梗死住院治疗的患者中心衰的发病率为14%~36%^[7]。本研究建立STEMI大鼠模型,验证YQFM在改善STEMI所致心衰的早期作用,以期YQFM治疗急性心肌梗死病发心衰病人提供更多参考。

1 材料

1.1 药品和主要试剂

YQFM(天津天士力之骄药业有限公司,批号20190314,规格:每瓶装0.65 g,相当于含红参0.5 g、五味子0.75 g和麦冬1.5 g);0.9%氯化钠注射液(石家庄四药有限公司);卡托普利片(中美上海施贵宝制药有限公司,批号19103113);异氟烷(友诚生物科技有限公司);大鼠肌钙蛋白(Tn)ELISA检测试

剂盒、大鼠肌酸激酶同工酶MB(CK-MB)ELISA检测试剂盒、大鼠乳酸脱氢酶(LDH)ELISA检测试剂盒(上海酶联生物科技有限公司);RIPA裂解液(碧云天生物);BCA蛋白浓度检测试剂盒(赛默飞世尔科技中国有限公司);p44/42 MAPK(ERK1/2)(货号4695S,美国Cell Signaling Technology公司);phospho-p44/42 MAPK(p-ERK1/2)(货号4370S,美国Cell Signaling Technology公司);Masson三色染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);通用型免疫组化检测试剂盒(中国Proteintech Group公司)。

1.2 实验动物

SPF级雄性大鼠145只,8周龄,体质量为220~250 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物生产许可证号SCXK(京)2016-0006,质量合格证编号为1100112011041892。饲养环境为SPF级,温度(23±1)℃、湿度(30%~40%)和光照控制(12 h/12 h明暗循环),饲养期间自由采食商业标准的固体啮齿动物食物和水。动物实验严格按照天津天士力之骄药业有限公司动物伦理委员会标准执行,伦理号为TSLZJ2020006。

1.3 主要仪器

PowerLab生物信号采集系统(埃德仪器国际贸易有限公司);DW-3000小动物人工呼吸机(北京众实迪创科技发展有限公司);迈瑞M9彩色多普勒超声诊断仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司);ASP300全自动脱水机、EG1150包埋机、RM2235切片机、HI1210展片机、HI1220烘片机(德国Leica公司);图像分析系统(美国Motic Digital Pathology公司);凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 动物模型构建及心电图检测

采用麻醉机,放入异氟烷麻醉大鼠,仰卧位固定,在胸部3~5肋间脱毛,进行皮肤消毒,连接人工呼吸机。参照Ilayaraja Muthuramu等方法^[8],在胸部左侧第四根肋骨位置处切口,钝性分离肌肉,暴

露第四根肋骨,用止血钳打开胸腔,撕开心包,轻压胸廓将心脏挤出胸腔外。用6-0 prolene缝合线在冠状动脉左前降支起源下方3 mm左右处结扎,结扎完成后迅速将心脏放回胸腔,挤出胸腔内过多气体并缝合切口。假手术组与模型大鼠处理一致,但不进行冠状动脉结扎。使用PowerLab生物信号采集系统收集大鼠心电图描记数据。造模后10 min左右检测其心电图的变化判断造模是否成功。

2.2 动物分组与给药

将造模成功的大鼠,使用随机数字法分为模型组、卡托普利片(3.67 mg/kg)组和YQFM低、中、高剂量(0.433、0.867、1.734 g/kg)组,模型组和假手术组大鼠给予等体积的0.9%氯化钠注射液,造模后即开始给药,每天给药1次,连续尾iv给药14 d。

2.3 心动超声检测

分别于给药前(造模后)和给药14 d后,使用超声诊断仪采集大鼠心脏左心室舒张末期容积(LVVD)和收缩末期容积(LVVS)。计算大鼠左心室射血分数(LVEF)值。

$$LVEF = (LVVD - LVVS) / LVVD$$

2.4 血液生化指标检测

给药14 d后,经腹主动脉取血,离心收集血清。使用ELISA试剂盒检测各组大鼠血清中Tn、CK-MB和LDH含量。用酶标仪在450 nm波长下依次测定各孔吸光度(A)值,根据使用蛋白标准品绘制的标准曲线计算各组血清样本的Tn、CK-MB和LDH浓度。

2.5 心脏组织病理学检查

在给药14 d后,采用腹主动脉放血法使大鼠致死,打开胸腔取出心脏,并将心脏用10%中性福尔马林灌注进行固定,常规脱水、包埋、切片,分别使用HE和Massom染色试剂进行组织切片染色。使用Motic Digital Pathology图像分析系统对心脏组织病变及心肌纤维化进行评估。

2.6 磷酸化ERK1/2表达水平变化检测

取大鼠心脏左心室游离壁的心肌组织,经4%多聚甲醛固定,常规脱水,石蜡包埋,使用通用型免疫组化检测试剂盒,进行免疫组化染色,p-ERK1/2一抗的稀释比例为1:50。

使用RIPA裂解液提取各组大鼠心脏左心室游离壁的心肌组织总蛋白,使用BCA蛋白浓度检测试剂盒进行总蛋白含量检测。分别使用ERK1/2、p-ERK1/2和GAPDH抗体分别进行Western blotting检测,具体实验方法参见文献报道^[9]。

2.7 统计学分析

实验结果均用 $\bar{x} \pm s$,采用GraphPad Prism软件进行数据分析,两组间比较采用2-tailed Student's *t*检验。

3 结果

3.1 造模后大鼠心电图演变

如图1所示,造模后10 min左右心电图检测结果显示ST段抬高,P波波幅异常。结果与Gehrmann等^[10]报道的心肌梗死FVB小鼠检测结果一致,表明STEMI大鼠模型构建成功。

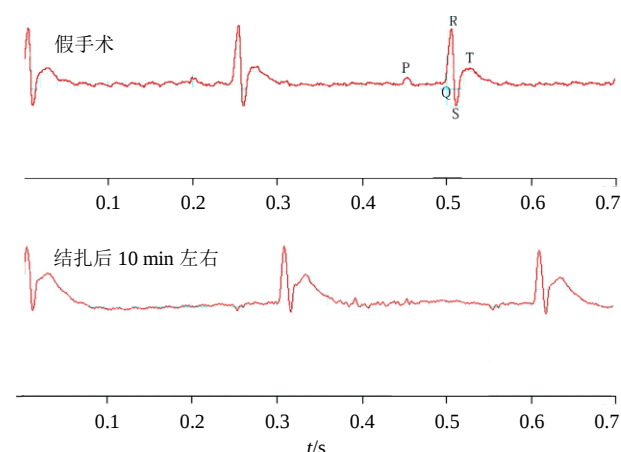


图1 大鼠冠状动脉左前降支结扎前后心电图检测

Fig. 1 Electrocardiogram from sham-operated rat and infarcted rat

3.2 YQFM对STEMI大鼠LVEF的影响

如表1所示,给药前,各组LVEF差异不显著。给药14 d后,与假手术组比较,模型组大鼠LVEF显著降低($P < 0.001$);与模型组比较,YQFM低、中、高剂量组和卡托普利片组的LVEF显著升高($P < 0.01, 0.001$)。结果表明YQFM能够保护心肌梗死后大鼠的心脏功能。

表1 YQFM对STEMI大鼠LVEF的影响($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 1 Effects of YQFM on LVEF in STEMI rats ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	LVEF/%	
		治疗前	治疗后
假手术	—	52.34±3.50	54.51±1.88
模型	—	51.60±3.49	35.10±5.40***
YQFM	0.433	48.99±3.40	42.69±3.53###
	0.867	45.86±4.15	50.53±5.57###
	1.734	51.60±3.49	47.08±4.15###
卡托普利片	0.003 67	49.20±3.70	50.13±3.97###

与假手术组比较:*** $P < 0.001$;与模型组比较:## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$

*** $P < 0.001$ vs sham-operated group; ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group

3.3 血液生化指标检测结果

如表2所示,与假手术组比较,模型组大鼠血清Tn、CK-MB和LDH水平均显著升高($P<0.001$);与模型组比较,YQFM低、中、高剂量组和卡托普利片组血清Tn和LDH水平均显著降低($P<0.01$ 、 0.001);YQFM中、高剂量组和卡托普利片组CK-MB水平显著降低($P<0.05$ 、 0.01)。结果表明YQFM低、中、高剂量能够在不同程度降低心肌梗死后大鼠的心肌损伤标志物含量。

3.4 HE和Masson染色结果

如图2所示,HE染色结果显示,假手术大鼠心脏组织心肌纤维排列规整,无明显组织病理学改变;模型组大鼠心脏组织心肌细胞排列紊乱,肌纤维有明显减少并被结缔组织替代,YQFM低、中、高剂量组和卡托普利片组心肌细胞的排列及心肌纤维化程度均有较明显改善。Masson染色结果显示,与模型组比较,YQFM低、中、高剂量组和卡托普利片组胶原纤维增加不明显。结果表明YQFM对模型大鼠的心肌纤维化有抑制作用。

3.5 ERK1/2磷酸化水平检测结果

结果如图3所示,Western blotting检测结果显

示,与假手术组比较,模型组p-ERK1/2水平明显升高;与模型组比较,YQFM中、高剂量明显抑制p-ERK1/2水平。组织切片P-ERK1/2免疫组化染色结果显示,与假手术大鼠左心室游离壁心肌组织切片ERK1/2磷酸化水平相比,模型组心肌细胞更加深染,表明冠状动脉左前降支结扎后大鼠ERK1/2激活,该结果与Das等^[9]报道一致。与模型组心肌组织切片比较,YQFM低、中和高剂量组p-ERK1/2染色变浅,且呈剂量相关性。结果表明YQFM可抑制心肌细胞中ERK1/2的磷酸化。

4 讨论

冠心病包括不稳定性心绞痛、非ST段抬高型心肌梗死(non ST-segment elevation myocardial infarction, NSTEMI)和STEMI,是导致心衰的最常见疾病^[11]。在世界范围内,冠心病是第一大致死性疾病^[12]。在1990—2017年间,约38.2%的缺血性心脏疾病致死病例发生在中国,与其他国家相比,中国在这一期间的死亡人数增加最多^[13]。当发生急性心肌梗死时,以溶栓治疗或经皮冠状动脉介入治疗(PCI)为主要手段的早期的成功的再灌注治疗是减小心肌梗死面积和提高临床效果的最有效

表2 YQFM对STEMI大鼠血清Tn、CK-MB和LDH水平的影响($\bar{x}\pm s$, $n=12$)
Table 2 Effects of YQFM on Tn, CK-MB, and LDH in rats with STEMI ($\bar{x}\pm s$, $n=12$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	Tn/(pg·mL ⁻¹)	CK-MB/(ng·mL ⁻¹)	LDH/(ng·mL ⁻¹)
假手术	—	427.44±51.94	4.07±0.50	21.31±1.75
模型	—	728.59±13.01***	6.33±0.58***	27.84±1.31***
YQFM	0.433	608.24±46.57##	6.08±0.24	26.45±0.68#
	0.867	514.66±52.78###	5.34±0.37##	24.71±1.33##
	1.734	481.69±53.49###	4.71±0.44##	23.83±1.59##
卡托普利片	0.003 67	556.63±53.42###	5.54±0.41#	24.17±1.22##

与假手术组比较:*** $P<0.001$;与模型组比较:## $P<0.01$ ### $P<0.001$

*** $P<0.001$ vs sham-operated group;# $P<0.05$ ## $P<0.01$ ### $P<0.001$ vs model group

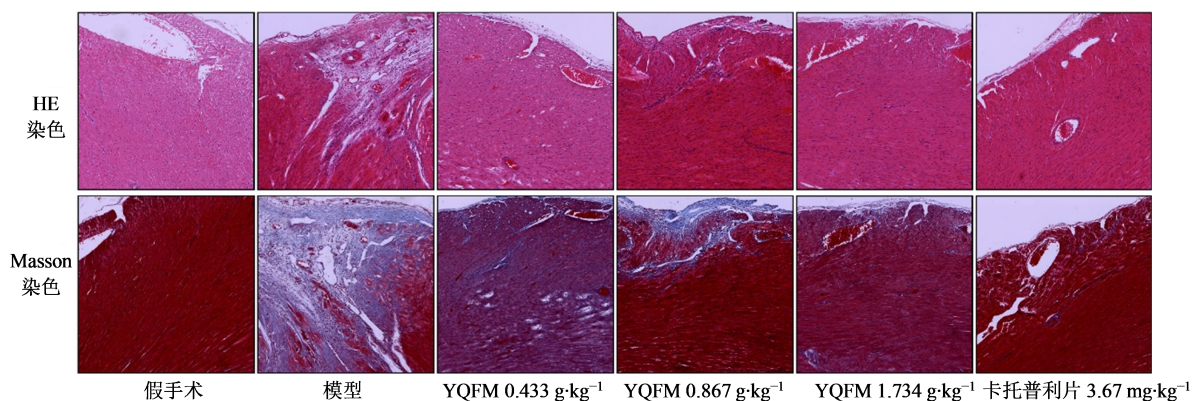


图2 YQFM对STEMI大鼠心肌纤维化的影响($\times 100$)

Fig. 2 Effects of YQFM on myocardial fibrosis in rats with STEMI ($\times 100$)

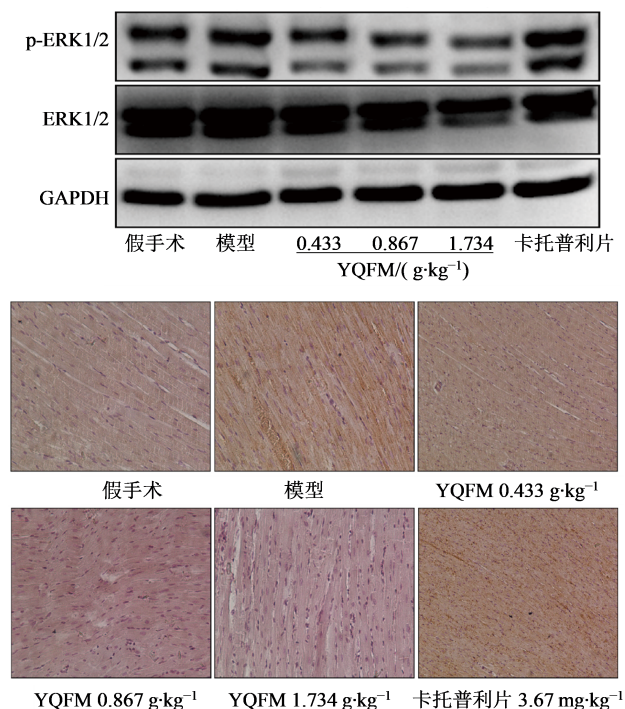


图3 YQFM对STEMI大鼠磷酸化ERK1/2表达水平的影响($\times 100$)

Fig. 3 Effects of YQFM on phosphorylated ERK1/2 expression in STEMI rats ($\times 100$)

策略^[12]。

一旦心肌细胞缺血到了不能恢复的地步,心肌细胞就会开始坏死。心肌细胞的死亡会引发一系列的炎症反应,并产生促炎症和细胞外基质降解牵涉的创伤愈合用以清除坏死心肌细胞残骸,随后炎症反应消失并刺激细胞外基质形成疤痕组织。心肌细胞、中性粒细胞、巨噬细胞、成纤维细胞、内皮细胞和神经细胞均参与心肌缺血-损伤修复过程,但成纤维细胞和巨噬细胞参与整个创伤愈合过程,发挥中心作用^[14]。本研究发现YQFM可以抑制急性心肌梗死大鼠的心肌纤维化,并通过p-ERK1/2的免疫组织化学染色和Western blotting发现YQFM能够抑制STEMI大鼠左心室游离壁组织ERK1/2的磷酸化。考虑到抑制ERK1/2的磷酸化可以抑制成纤维细胞NIH3T3的增殖^[15],本课题组推测YQFM抑制STEMI大鼠的心肌纤维化,在一定程度上可能是通过其抑制心肌组织中的成纤维细胞的增殖发挥作用。

缺血再灌注损伤也是导致心肌细胞死亡和心肌梗死面积增加的重要因素,约30%的心肌梗死面积由致死性再灌注损伤导致^[12]。动物模型研究表明大于50%的最终心肌梗死面积是由于致死性再灌注损伤引起的^[16]。本研究构建了大鼠冠状动脉

左前降支永久性结扎动物模型,该模型模拟的是病人心肌组织无再灌注状态,因此本研究不适用于YQFM对心肌再灌注损伤作用评估。近年来,由于新型冠状病毒肺炎的爆发,世界卫生组织系统均面临前所未有的压力,也在一定程度上造成了急性心肌梗死病人的再灌注治疗的延迟^[17]。本研究表明YQFM对急性心肌梗死后大鼠心功能有显著改善作用,可能为当前YQFM治疗急性心肌梗死病发心衰病人提供更多参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Uriel N, Sayer G, Annamalai S, et al. Mechanical unloading in heart failure [J]. J Am Coll Cardiol, 2018, 72(5): 569-580.
- [2] Ezekowitz J A, Kaul P, Bakal J A, et al. Declining in-hospital mortality and increasing heart failure incidence in elderly patients with first myocardial infarction [J]. J Am Coll Cardiol, 2009, 53(1): 13-20.
- [3] Xiang D C, Xiang X, Zhang W, et al. Management and outcomes of patients with STEMI during the COVID-19 pandemic in China [J]. J Am Coll Cardiol, 2020, 76(11): 1318-1324.
- [4] 李莉, 文旺, 张磊, 等. 注射用益气复脉(冻干)冲管液安全剂量测定 [J]. 药物评价研究, 2020, 43(8): 1575-1580.
Li L, Wen W, Zhang L, et al. Determination of flushing fluid safe dosage of Yiqi Fumai Lyophilized Injection [J]. Drug Eval Res, 2020, 43(8): 1575-1580.
- [5] 李德坤, 苏小琴, 李智, 等. 注射用益气复脉(冻干)的质量标志物研究 [J]. 中草药, 2019, 50(2): 290-298.
Li D K, Su X Q, Li Z, et al. Study on quality marker of Yiqi Fumai Lyophilized Injection [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2019, 50(2): 290-298.
- [6] 万梅绪, 张燕欣, 李德坤, 等. 注射用益气复脉(冻干)治疗新型冠状病毒肺炎合并心血管疾病的可行性探讨 [J]. 药物评价研究, 2020, 43(3): 384-391.
Wan M X, Zhang Y X, Li D K, et al. Feasibility of Yiqi Fumai Lyophilized Injection in treatment of novel coronary pneumonia (COVID-19) patients combined with cardiovascular disease [J]. Drug Eval Res, 2020, 43(3): 384-391.
- [7] Bahit M C, Kocher A, Granger C B. Post-myocardial infarction heart failure [J]. JACC Heart Fail, 2018, 6(3): 179-186.
- [8] Muthuramu I, Lox M, Jacobs F, et al. Permanent ligation of the left anterior descending coronary artery in mice: A

- model of post-myocardial infarction remodelling and heart failure [J]. *J Vis Exp*, 2014(94): 52206. DOI: 10.3791/52206.
- [9] Das A, Salloum F N, Xi L, et al. ERK phosphorylation mediates sildenafil-induced myocardial protection against ischemia-reperfusion injury in mice [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009, 296(5): H1236-H1243.
- [10] Gehrmann J, Frantz S, Maguire C T, et al. Electrophysiological characterization of murine myocardial ischemia and infarction [J]. *Basic Res Cardiol*, 2001, 96(3): 237-250.
- [11] Steg P G, Dabbous O H, Feldman L J, et al. Determinants and prognostic impact of heart failure complicating acute coronary syndromes: Observations from the Global Registry of Acute Coronary Events (GRACE) [J]. *Circulation*, 2004, 109(4): 494-499.
- [12] Ambrosio G. Myocardial reperfusion injury [J]. *Eur Heart J Suppl*, 2002, 4: B28-B30.
- [13] Dai H J, Much A A, Maor E, et al. Global, regional, and national burden of ischemic heart disease and its attributable risk factors, 1990-2017: Results from the global Burden of Disease Study 2017 [J]. *Eur Heart J Qual Care Clin Outcomes*, 2020: qcaa076.
- [14] Mouton A J, Rivera O J, Lindsey M L. Myocardial infarction remodeling that progresses to heart failure: a signaling misunderstanding [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2018, 315(1): H71-H79.
- [15] Küppers M, Faust D, Linz B, et al. Regulation of ERK1/2 activity upon contact inhibition in fibroblasts [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 406(3): 483-487.
- [16] Bolli R, Becker L, Gross G, et al. Myocardial protection at a crossroads: the need for translation into clinical therapy [J]. *Circ Res*, 2004, 95(2): 125-134.
- [17] Giordano A, Biondi-Zoccai G, Frati G, et al. Management of structural heart disease and acute coronary syndromes in the COVID-19 pandemic [J]. *Curr Atheroscl Rep*, 2020, 22(7): 29.

[责任编辑 兰新新]