

麝香保心丸对急性心肌梗死大鼠梗死边缘带心肌中 IL-18 时间差异性表达与室性心律失常的影响

徐 标, 曾 昆, 黄 妍

华中科技大学同济医学院附属普爱医院(西区) 急诊部, 湖北 武汉 430030

摘要: 目的 探讨麝香保心丸对急性心肌梗死后室性心律失常的抑制作用及机制。方法 90 只雄性急性心肌梗死大鼠随机分为麝香保心丸高、低剂量(45.0、22.5 mg/kg)组及模型组, 每组 30 只, 每组大鼠再均分为第 1、2 周末 2 个亚组, 每组 15 只。另取 20 只大鼠作为假手术组, 均分为第 1、2 周末 2 个亚组, 每组 10 只。麝香保心丸组第 1、2 周末 2 个亚组分别于术后第 2 天起 ig 给药 1、2 周, 假手术组和模型组给予等量生理盐水。第 1、2 周末时以程序电刺激诱发各组大鼠室性心律失常后, 假手术组取位于左心室游离壁心肌组织, 心肌梗死各组取位于左心室梗死边缘带心肌组织, 检测白细胞介素-18(IL-18)表达。结果 第 1、2 周末时模型组大鼠梗死边缘带心肌组织中 IL-18 表达水平及室性心律失常诱发率均高于假手术组($P < 0.01$)。麝香保心丸低剂量组第 2 周末时梗死边缘带心肌组织中 IL-18 表达水平及室性心律失常诱发率显著低于模型组($P < 0.05$), 而第 1 周末时则无显著差异。麝香保心丸高剂量组第 1、2 周末梗死边缘带心肌组织中 IL-18 表达水平及室性心律失常诱发率显著低于模型组($P < 0.01$)。麝香保心丸高剂量组梗死边缘带心肌组织中 IL-18 表达水平及室性心律失常诱发率在第 1 周末($P < 0.01$)、第 2 周末($P < 0.05$)时均显著低于低剂量组。结论 麝香保心丸可通过抑制 IL-18 过度表达而降低急性心肌梗死后室性心律失常诱发率, 其作用呈剂量相关性。

关键词: 急性心肌梗死; 麝香保心丸; 白细胞介素-18; 梗死边缘带; 室性心律失常

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)08-1195-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.08.018

Effect of Shexiang Baoxin Pill on time difference expression of IL-18 in border zone myocardium and ventricular arrhythmia of rats with acute myocardial infarction

XU Biao, ZENG Kun, HUANG Yan

Emergency Department, Puai Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Abstract: Objective To investigate the effect of Shexiang Baoxin Pill (SBP) on the inhibition of ventricular arrhythmia of rats with acute myocardial infarction. **Methods** Ninety male model rats induced by left anterior descending branch ligation were randomly divided into model group, high-dose SBP treatment group, and low-dose SBP treatment group (45.0 and 22.5 mg/kg) equally ($n = 30$). Every group was further divided into the 1st weekend and the 2nd weekend subunits equally ($n = 15$). Twenty rats were taken as the Sham operation group which was further divided into the 1st weekend and the 2nd weekend subunits equally ($n = 10$). The rats in the high- and low-dose groups were respectively treated by ig administration of SBP for 1 or 2 weeks from day 2 after the administration, whereas the rats in the Sham operation group were not given any treatment. At the 1st weekend and the 2nd weekend, programmed electrical stimulus was imposed on the rat hearts to induce the ventricular arrhythmia. Then the left ventricle free wall tissue in the Sham operation group and the border zone myocardium in the rest of rats were preserved. The expression of myocardial IL-18 was determined. **Results** Compared to the Sham operation group, there were higher expression of myocardial IL-18 and the induced ratio of ventricular arrhythmia at 1st weekend and 2nd weekend in the model group ($P < 0.01$). Compared to the model group, low-dose SBP treatment could reduce the expression of myocardial IL-18 and the induced ratio of ventricular arrhythmia at 2nd weekend ($P < 0.05$), but there was no difference on the expression of myocardial IL-18 and the induced ratio of ventricular arrhythmia at the 1st weekend. Compared to the model group, high-dose SBP treatment could reduce the expression of myocardial IL-18 and the induced

收稿日期: 2014-07-09

作者简介: 徐 标 (1979—), 男, 硕士, 主治医师, 研究方向为心血管疾病。Tel: (027)68831420 E-mail: xubiao110@126.com

ratio of ventricular arrhythmia at the 1st weekend and the 2nd weekend ($P < 0.01$). Compared to the low-dose SBP group, high-dose Shexiang Baoxin Pill treatment could reduce the expression of myocardial IL-18 and the induced ratio of ventricular arrhythmia at the 1st weekend ($P < 0.01$) and the 2nd weekend ($P < 0.05$). **Conclusion** SBP may reduce the induced rate of ventricular arrhythmia of rats after acute myocardial infarction by inhibiting the over-expression of myocardial IL-18, which is in a dose dependent manner.

Key words: acute myocardial infarction; Shexiang Baoxin Pill; IL-18; infarction border zone; ventricular arrhythmia

致死性室性心律失常是急性心肌梗死后严重并发症之一,炎症细胞因子在急性心肌梗死后室性心律失常发生过程中发挥了重要作用^[1]。麝香保心丸具有扩张冠状动脉、促进梗死周围区缺血心肌新生血管形成、防治心肌梗死后心室重构的作用^[2],近年研究发现麝香保心丸对冠心病合并心律失常亦有治疗作用^[3],但未见其作用于急性心肌梗死后心律失常的报道。本研究选择急性心肌梗死大鼠为研究对象,观察麝香保心丸对不同时间点梗死边缘带心肌组织中炎症细胞因子白细胞介素-18(IL-18)表达以及室性心律失常诱发率的影响,探讨麝香保心丸对急性心肌梗死后室性心律失常的作用及机制。

1 材料

1.1 药物与试剂

麝香保心丸(22.5 mg/丸),上海和黄药业有限公司产品,批号 101209。兔抗大鼠 IL-18 单克隆抗体、过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 抗体、FITC 标记的山羊抗兔 IgG、BCA 蛋白定量试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司。ECL 试剂盒购自美国 Pierce 公司。

1.2 实验动物

清洁级雄性 Wistar 大鼠,体质量(250±30)g,购自华中科技大学同济医学院动物实验中心,动物许可证号 SCXK(鄂)2010-0009。

1.3 仪器

BL-420F 生物信号采集处理系统,成都泰盟科技有限公司;DYCZ-25D 电泳仪,北京六一仪器厂;荧光激光共聚焦显微镜(LSCM),德国 Leica 公司。

2 方法

2.1 动物模型制备、分组与给药

按文献报道方法^[4]结扎大鼠左冠状动脉前降支制备大鼠急性心肌梗死模型,术后 24 h 存活 90 只大鼠,随机分为模型组和麝香保心丸高、低剂量(45.0、22.5 mg/kg^[5])组,每组 30 只。每组大鼠依观察时间不同再分为第 1、2 周末 2 个亚组,每个亚组 15 只。麝香保心丸组第 1、2 周末 2 个亚组分别于术后第 2 天起 ig 给药 1、2 周。另设 20 只大鼠

为假手术组,仅在左冠状动脉前降支穿线不结扎,术后分为第 1、2 周末 2 个亚组,每组 10 只。假手术组和模型组每日 ig 给予等量生理盐水。第 1 周末时模型组,麝香保心丸高、低剂量组,假手术组大鼠分别存活 12、14、13、10 只。第 2 周末时模型组,麝香保心丸高、低剂量组,假手术组大鼠分别存活 10、13、11、10 只。第 1、2 周末大鼠称质量后,ip 3%戊巴比妥 30 mg/kg 麻醉,迅速开胸,以程序电刺激诱发各组大鼠室性心律失常后取出心脏。假手术组取位于左心室游离壁心肌组织、心肌梗死各组取位于左心室梗死边缘带(以结扎线为标志,梗死苍白区边缘至边缘 3 mm 以内),心肌组织保存待检。

2.2 程序电刺激诱发各组大鼠室性心律失常变化

大鼠腹腔麻醉后固定、气管插管。连接肢体导联心电图后于左前胸第 3、4 肋间开胸,暴露心脏,以双极针形电极刺入左室心尖部作为刺激电极,进行程序电刺激诱发室性心律失常并同步记录心电图,电生理参数采用 BL-420F 生物信号采集与处理系统记录^[6]。程序电刺激 S1S2 周长为 100 ms,波宽 2 ms,电压 5 mV,脉冲数为 8 个;S2 强度为 5 mV,波宽为 2 ms,脉冲数为 1 个,步长为 -2 ms,直至 S2 后不再出现 R2,即不应期或诱发出室性心律失常。如果未能诱发出室性心律失常,将 S1S2 间期设为不应期加 10 ms,并加用期前刺激 S3,以 2 ms 递减刺激直到不应期或诱发出室性心律失常。此处室性心律失常特指连续出现 6 个及 6 个以上宽 QRS 波的室性心动过速(室速)或者心室颤动(室颤)。

2.3 LSCM 观察各组大鼠心肌组织 IL-18 表达

取各组大鼠部分心肌组织制备 10 μm 厚的冰冻切片,组织切片与心肌纵轴平行,经固定、洗脱后以 1:100 兔抗大鼠 IL-18 单克隆一抗孵育过夜,再予 1:100 FITC 标记的山羊抗兔 IgG 常温孵育 2 h,封片后即在 LSCM 下观察, FITC 激发波长为 492 nm,发射波长为 520 nm,每张切片取 4~6 个视野,选择细胞纵行走向区域进行观察。

2.4 Western blotting 检测各组心肌组织 IL-18 表达

取大鼠部分心肌组织 100 mg, 匀浆后加入适量组织蛋白裂解液, 离心后吸取上清, 按照 BCA 蛋白定量试剂盒说明进行蛋白定量测定。在电泳仪上用等量蛋白质样品经 15% SDS-PAGE 分离后, 转移于硝酸纤维素膜 (PVDF) 上。以 1:1 000 的兔抗大鼠 IL-18 单克隆一抗 4 ℃ 静置孵育过夜, 再以 1:10 000 过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 二抗室温孵育 2 h, 在暗室用 ECL 试剂盒发光显影, 同时检测 GAPDH 的表达作为内参对照。图片经光密度图像扫描仪扫描, 以 Quantity One 软件对结果进行分析, 检测各组大鼠心肌组织 IL-18 与 GAPDH 表达灰度的比值。

2.5 统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SAS 软件行方差分析, 两组均数间的比较采用 *t* 检验, 率的比较采用 χ^2 检验。

3 结果

3.1 大鼠心律失常诱发结果

第 1、2 周末时模型组室性心律失常诱发率均高于假手术组 ($P < 0.01$)。麝香保心丸低剂量组第 2 周末时室性心律失常诱发率显著低于模型组 ($P < 0.05$), 而第 1 周末时则无显著差异。第 1、2 周末麝香保心丸高剂量组室性心律失常诱发率显著低于模型组 ($P < 0.01$)。麝香保心丸高剂量组室性心律失常诱发率在第 1 周末 ($P < 0.01$)、第 2 周末 ($P < 0.05$) 时均显著低于低剂量组, 见图 1 和表 1。

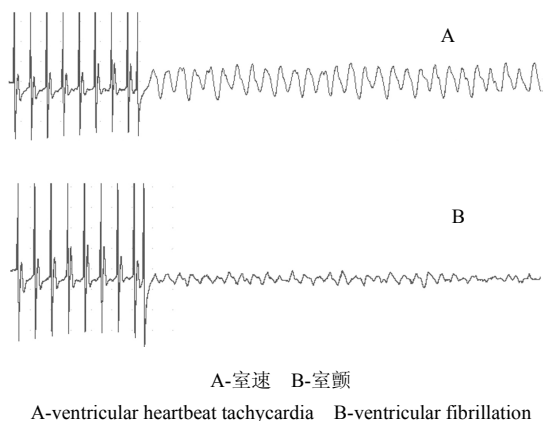


图 1 程序电刺激诱发室性心律失常
Fig. 1 Ventricular arrhythmia induced by programmed electrical stimulus

表 1 第 1、2 周末时麝香保心丸对急性心肌梗死大鼠室性心律失常诱发率的影响

Table 1 Effect of SBP on ventricular arrhythmia inducibility in rats at 1st and 2nd weekends after acute myocardial infarction

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	时间	动物/只	诱发率/%
假手术	—	第 1 周末	10	0.00**
		第 2 周末	10	0.00**
模型	—	第 1 周末	12	91.67
		第 2 周末	10	60.00 ^Δ
麝香保心丸	45.0	第 1 周末	14	42.86*** [#]
		第 2 周末	13	30.77*** ^Δ
	22.5	第 1 周末	13	92.31
		第 2 周末	11	45.46* ^Δ

同一时间点时, 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与麝香保心丸低剂量组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 同一组内, 与第 1 周末比较: ^Δ $P < 0.05$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group at same time point, # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs low dose SBP group, ^Δ $P < 0.05$ vs 1st weekend in same group

3.2 LSCM 观察各组大鼠心肌 IL-18 的表达部位

第 1、2 周末时模型组和高、低剂量麝香保心丸组 IL-18 表达主要在心肌间质, 少量分布于心肌细胞内。第 1、2 周末时假手术组仅细胞间质有微弱 IL-18 表达, 见图 2。

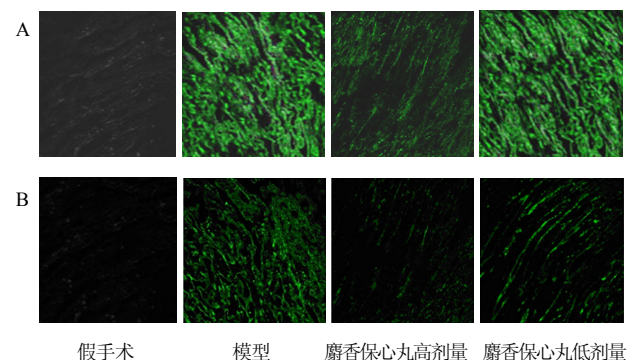


图 2 LSCM 观察急性心肌梗死第 1 周末 (A) 和第 2 周末 (B) 时各组大鼠梗死边缘带心肌组织中 IL-18 的表达

Fig. 2 Expression of myocardial IL-18 in border zone myocardium of rats in each group at 1st weekend (A) and 2nd weekend (B) after acute myocardial infarction by immunofluorescence LSCM

3.3 大鼠心肌组织 IL-18 蛋白表达变化

第 1、2 周末时模型组大鼠梗死边缘带心肌组织中 IL-18 表达水平均高于假手术组 ($P < 0.01$)。麝香保心丸低剂量组第 2 周末时边缘带心肌组织 IL-18 表达水平显著低于模型组 ($P < 0.05$), 而第 1 周末时则无显著差异。麝香保心丸高剂量组第 1、2

周末边缘带心肌组织 IL-18 表达水平显著低于模型组 ($P < 0.01$)。麝香保心丸高剂量组边缘带心肌组织 IL-18 表达水平在第 1 周末 ($P < 0.01$)、第 2 周末 ($P < 0.05$) 时均显著低于低剂量组, 见图 3 和表 2。

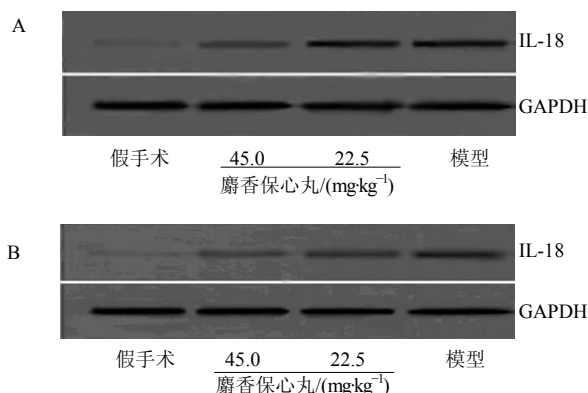


图 3 急性心肌梗死第 1 周末 (A) 和第 2 周末 (B) 各组大鼠梗死边缘带心肌组织中 IL-18 蛋白表达

Fig. 3 Expression of myocardial IL-18 in border zone myocardium of rats in each group at 1st weekend (A) and 2nd weekend (B) after acute myocardial infarction

表 2 麝香保心丸对急性心肌梗死后第 1、2 周末大鼠梗死边缘带心肌组织 IL-18 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of SBP on expression of IL-18 in border zone myocardium in rats at 1st weekend and 2nd weekend after acute myocardial infarction ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	时间	动物/只	IL-18
假手术	—	第 1 周末	10	0.040 ± 0.003**
		第 2 周末	10	0.038 ± 0.002**
模型	—	第 1 周末	12	0.318 ± 0.025
		第 2 周末	10	0.208 ± 0.014 ^Δ
麝香保心丸	45.0	第 1 周末	14	0.107 ± 0.030***
		第 2 周末	13	0.058 ± 0.021*** ^Δ
	22.5	第 1 周末	13	0.297 ± 0.031
		第 2 周末	11	0.108 ± 0.022* ^Δ

同一时间点时, 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与低剂量麝香保心丸组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$; 同一组内, 与第 1 周末比较: ^Δ $P < 0.05$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group at same time point, [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs low-dose SBP group; ^Δ $P < 0.05$ vs 1st weekend in same group

4 讨论

冠状动脉阻塞后形成的心肌梗死区周围往往存在一层功能异常但尚未坏死的心肌, 即所谓边缘带或边缘层。随着梗死时间的延长, 边缘带不断向外扩展, 在各种因素的综合作用下形成特殊的心肌病理状态。边缘带心肌病理生理状态与急性心肌梗死后出现的心律失常等密切相关^[7]。心肌梗死后周围

边缘带出现交感神经再生, 交感神经密度和活性的增加, 导致动作电位时程 (APD) 延长和细胞间 APD 的异步性, 增加发生室速、室颤等严重心律失常的可能性^[8]。边缘带中的细胞离子通道异常也是心律失常发生的重要原因之一。边缘带钠离子通道功能发生改变、快钠电流密度降低、失活后恢复缓慢, 导致心肌兴奋性和传导性异常, 极易出现室性心律失常。

IL-18 是一种多效能的致炎细胞因子, 其可诱导产生 γ 干扰素 (IFN- γ), 通过激活单核细胞、巨噬细胞、淋巴细胞而促发炎症反应, 在 TH1 型免疫应答中发挥重要作用。研究发现 IL-18 水平在急性心肌梗死时显著升高^[9]。IL-18 增高的冠心病患者致命性心血管事件 (如致命性室性心律失常等) 发生率明显高于低 IL-18 水平者, 其对冠心病死亡的预测价值大于其他炎性标志物^[10], 是预测缺血性心脏病并发心律失常的独立危险因素^[11]。

本研究发现急性心肌梗死后第 1、2 周末时各组心肌梗死大鼠室性心律失常的诱发率均随边缘带心肌组织中 IL-18 表达增高而升高, 表明急性心肌梗死后早期室性心律失常的发生与边缘带心肌中 IL-18 表达升高密切相关。各组心肌梗死大鼠第 2 周末均较第 1 周末时 IL-18 表达明显下降, 室性心律失常的诱发率亦随之下降, 表明急性心肌梗死后 IL-18 表达及室性心律失常诱发率随时间延长而呈下降趋势, 亦从侧面反映出急性心肌梗死后早期边缘带 IL-18 表达快速、明显地升高在室性心律失常发生过程中发挥重要作用。第 1 周末时只有麝香保心丸高剂量组能降低 IL-18 表达及室性心律失常的诱发率而低剂量组无此作用, 推测早期大剂量应用麝香保心丸可使血药浓度快速达到足以抑制 IL-18 等炎性细胞因子过度表达的稳态水平, 进而降低室性心律失常的诱发率。随着时间延长, 第 2 周末时麝香保心丸低剂量亦能降低 IL-18 表达水平及室性心律失常诱发率, 推测通过较长时间的低剂量麝香保心丸治疗亦能使血药浓度达到抑制 IL-18 等炎性细胞因子过度表达的稳态水平, 但与高剂量组比较, 其边缘带心肌 IL-18 表达及室性心律失常诱发率的下降程度明显偏低, 表明麝香保心丸降低急性心肌梗死后室性心律失常诱发率的作用与抑制边缘带心肌 IL-18 过度表达有关, 其作用呈剂量相关性。

综上所述, 急性心肌梗死后边缘带心肌 IL-18 表达水平随时间延长而呈下降趋势, 急性心肌梗死

后早期大剂量应用麝香保心丸能更有效抑制炎症细胞因子 IL-18 的过度表达, 更有助于防治室性心律失常的发生。随着其抑制急性心肌梗死后心肌炎症反应作用及其机制的研究不断丰富, 麝香保心丸有望进一步地应用于急性心肌梗死后心律失常的治疗。

参考文献

- [1] Elmas E, Popp T, Lang S, *et al.* Sudden death: do cytokines and prothrombotic peptides contribute to the occurrence of ventricular fibrillation during acute myocardial infarction [J]. *Int J Cardiol*, 2010, 145(1): 118-119.
- [2] Xiang L, Jiang P, Zhan C, *et al.* The serum metabolomic study of intervention effects of the traditional Chinese medicine SBP11 and a multi-component medicine polypill in the treatment of myocardial infarction in rats [J]. *Mol Biosyst*, 2012, 8(9): 2434-2442.
- [3] 封茂群. 麝香保心丸辅助治疗冠心病合并急性心律失常疗效观察 [J]. *亚太传统医药*, 2013, 9(12): 204-205.
- [4] 于凤旭, 张英, Tran N, 等. 富含血小板血浆治疗鼠急性心肌梗死的实验研究 [J]. *中华心血管病杂志*, 2012, 40(5): 392-396.
- [5] 张玲姬, 李艳芳, 曹芳芳, 等. 麝香保心丸对心力衰竭大鼠 Th1 和 Th2 型细胞因子水平的影响 [J]. *中华老年医学杂志*, 2011, 30(4): 323-326.
- [6] 陈昱, 陈志坚, 廖玉华, 等. 急性心肌梗死大鼠肿瘤坏死因子 α 表达与室性心律失常的关系 [J]. *中华急诊医学杂志*, 2010, 19(7): 712-716.
- [7] Rubenstein J C, Lee D C, Wu E, *et al.* A comparison of cardiac magnetic resonance imaging peri-infarct border zone quantification strategies for the prediction of ventricular tachyarrhythmia inducibility [J]. *Cardiol J*, 2013, 20(1): 68-77.
- [8] Wang Y, Xuan Y L, Hu H S, *et al.* Risk of ventricular arrhythmias after myocardial infarction with diabetes associated with sympathetic neural remodeling in rabbits [J]. *Cardiology*, 2012, 121(1): 1-9.
- [9] Lu Y F, Lv S Z, Chen Y D. Relationship between serum vasoactive factors and plaque morphology in patients with non-ST-segment elevated acute coronary syndrome [J]. *Chin Med J*, 2010, 123(2): 193-197.
- [10] O'Brien L C, Mezzaroma E, Van Tassel B W, *et al.* Interleukin-18 as a therapeutic target in acute myocardial infarction and heart failure [J]. *Mol Med*, 2014, 20(1): 221-229.
- [11] Furtado M V, Webber Rossini A P, Campani R B, *et al.* Interleukin-18: an independent predictor of cardiovascular events in patients with acute coronary syndrome after 6 months of follow-up [J]. *Coron Artery Dis*, 2009, 20(5): 327-331.