

定位超声辐照微泡联合红花黄色素对急性心肌梗死模型大鼠心功能与左室重塑的影响^Δ

周志益^{1*}, 张兴平^{1#}, 任建丽², 刘 茜¹, 刘兴钊²(1.重庆市第三人民医院, 重庆 400016; 2.重庆医科大学附属第二医院, 重庆 400010)

中图分类号 R285;R542 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)27-2501-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.27.02

摘要 目的:研究定位超声辐照微泡联合红花黄色素对急性心肌梗死模型大鼠心功能与左室重塑的影响。方法:以结扎冠脉前降支复制大鼠急性心肌梗死模型。实验分为假手术(等容生理盐水,腹腔注射)、模型(等容生理盐水,腹腔注射)、定位超声辐照微泡(辐照10 s,停10 s,共2 min)、红花黄色素(40 mg/kg,腹腔注射)、定位超声辐照微泡+红花黄色素(辐照10 s,停10 s,共2 min+40 mg/kg,腹腔注射)组。术后立即给药,每天1次,连续28 d;术后3 d开始辐照,每周1次,连续28 d。彩色多普勒超声诊断仪检测大鼠心功能,计算左室质量指数,RT-PCR法检测白细胞介素(IL)-1 β mRNA水平表达。结果:与模型组比较,定位超声辐照微泡、红花黄色素、定位超声辐照微泡+红花黄色素组大鼠心功能显著改善,左室质量指数、IL-1 β mRNA的表达显著下降($P < 0.05$),其中定位超声辐照微泡+红花黄色素组上述各项指标改善最显著。结论:定位超声辐照微泡促血管再生治疗与红花黄色素均可以改善心功能,抑制炎症细胞因子IL-1 β mRNA的表达,降低左室质量指数,改善左室重塑,二者联合治疗具有协同作用。

关键词 定位超声辐照微泡;红花黄色素;心肌梗死;心功能;左室重塑

Effect of Targeted Ultrasound Irradiation Microbubble Combined with Carthamin Yellow on Cardiac Function and Left Ventricular Remolding in Rats with Acute Myocardial Infarction

ZHOU Zhi-yi¹, ZHANG Xing-ping¹, REN Jian-li², LIU Xi¹, LIU Xing-zhao²(1.Chongqing Third People's Hospital, Chongqing 400016, China; 2. The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To investigate the effect of targeted ultrasound irradiation microbubble (TUIM) combined with carthamin yellow on cardiac function and left ventricular remolding in rats with acute myocardial infarction. **METHODS:** Rat model with acute myocardial infarction was established using ligation of left anterior descending branch. Model rats were divided into sham operation group (constant volume of normal saline, intraperitoneal injection), model group (constant volume of normal saline, intraperitoneal injection), UTIM group (intermittent irradiation 10 s, 10 s interval, 2 min in total), CY group (40 mg/kg, intraperitoneal injection), UTIM+CY group (intermittent irradiation 10 s, 2 min in total+40 mg/kg, intraperitoneal injection). The rats were given medicines after operation, once a day for consecutive 28 days. The rats were irradiated 3 days after operation, once a week for consecutive 28 days. The cardiac functions were detected by Color Doppler ultrasound. Left ventricular weight index were calculated. The mRNA expression of IL-1 β was detected by RT-PCR. **RESULTS:** Compared with model group, cardiac functions of UTIM group, CY group and UTIM +CY group were improved significantly, and left ventricular weight index and mRNA expression of IL-1 β were decreased significantly ($P < 0.05$); the improvement of above index in UTIM +CY group were more significant than in other 2 groups. **CONCLUSIONS:** Both UTIM revascularization therapy and carthamin yellow can improve cardiac function, inhibit the mRNA expression of inflammatory cytokines IL-1 β , reduce left ventricular mass index and improve left ventricular remodeling. Combination of both therapies has a synergistic effect.

KEY WORDS Targeted ultrasound irradiation microbubble; Carthamin yellow; Myocardial infarction; Cardiac function; Left ventricular remodeling

缺血性心脏病已经成为危害人类生命健康的主要疾病之

^Δ 国家自然科学基金资助项目(No.81000621);教育部博士点(新教师类)基金资助课题(No.20105503120008);重庆市卫生局中医药科研计划立项项目(No.2011-3-2)

* 主治医师, 博士后。研究方向:心脏超声分子成像。E-mail: zzy16966@163.com

通信作者:主任医师。研究方向:心血管学。E-mail: zxp24680@163.com

一,虽然心脏介入及搭桥技术的发展可以明显改善该病的预后,但仍有部分复杂弥散性病变缺乏有效治疗手段。近年来,血管再生治疗成为研究热点及希望,但单一血管再生治疗因多种原因尚不能满足临床要求。因此,笔者设想利用血小板活化因子(Platelet activating factor, PAF)拮抗药红花黄色素的抗凝血、抑制血栓形成、抑制血管平滑肌增殖等多重心血管保护作用^[1],以及超声破坏微泡增加内源性血管内皮生长因子(VEGF)表达、促进血管新生、改善缺血心肌供血^[2]、改善缺血

后左室重塑的协同作用,提供一种中西医结合治疗缺血性心脏病的策略,评价其对急性心肌梗死模型大鼠心功能及左室重塑的影响,并初步探讨其可能机制。

1 材料

1.1 仪器

ALC-V8型动物呼吸机(上海奥尔科特生物科技有限公司);RM6240系列多道生理信号采集处理系统(成都仪器厂);Vivid 7型多普勒超声仪(美国GE公司,探头频率:10 MHz);5810R型高速低温离心机(德国Eppendorf公司);DNAEngine PTC-200型PCR仪、凝胶成像分析仪(美国Bio-Rad公司)。

1.2 药品与试剂

注射用红花黄色素(浙江永宁药业股份有限公司,批号:100305);Trizol[天根生化科技(北京)有限公司];GoldView核酸染料(北京赛百盛基因技术有限公司);Taq酶(成都微克生物技术有限公司);RT-PCR试剂盒(日本TaKaRa公司)。

1.3 动物

SD大鼠40只,♂,体质量(220±20)g,由重庆医科大学实验动物中心提供[动物使用许可证号:SCXK(渝)2012-0001]。

2 方法

2.1 复制模型与分组、给药

结扎大鼠冠脉前降支以复制心肌梗死模型(心电图ST段抬高为准)。实验分为5组,即假手术(等容生理盐水,ip)、模型(等容生理盐水,ip)、定位超声辐照微泡(辐照10 s,停10 s,共持续2 min)、红花黄色素(40 mg/kg, ip)、定位超声辐照微泡+红花黄色素(辐照10 s,停10 s,共持续2 min+40 mg/kg, ip)组。于手术后3 d开始辐照,每周辐照1次,连续28 d;术后立即给药,每天1次,连续28 d。

2.2 大鼠心脏超声检查

应用多普勒超声仪检测大鼠的心功能,测量参数包括左室后壁厚度、左室舒张末期内径、左室收缩末期内径、左室射血分数。

2.3 左室质量指数的测定

用天平称取大鼠体质量后断颈处死,仰卧固定于操作台,置于超净台上,用消毒好的手术刀、剪刀、镊子迅速取出心脏,分离出左心室,轻轻挤压出心腔内的残余血液,用生理盐水冲洗净,用天平称取左心室的湿质量。左室质量指数=左心室湿质量/体质量。

2.4 RT-PCR法检测大鼠心肌组织白细胞介素(IL)-1 β mRNA的表达

采用Trizol法提取大鼠心肌总RNA,根据RT-PCR试剂盒说明进行反应。IL-1 β 引物由上海生物工程技术公司合成,序列如下:上游引物5'-GTCACCTCATTGTGGC TGTGGA-3',下游引物5'-GTCGTTGCTGTCTCTCCTTGT-3',扩增片段长度:319 bp。 β -actin:上游引物5'-GTGCTGAGTATGTCGTG-GAGTCT-3',下游引物5'-GTGGAAGAATGGGAGTTGCTG-T-3',扩增片段长度:610 bp。反应条件:(1)94℃ 5 min;(2)94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 1 min,30个循环;(3)72℃ 10 min。反应完后取5 μ l PCR扩增产物在同一2%琼脂糖凝胶上以100 V电压电泳30 min,凝胶图像扫描系统拍照。以 β -actin为内参,采用Quantity One软件计算IL-1 β mRNA的相对含量,结果以IL-1 β 条带吸光度值与 β -actin条带吸光度值的比值表示。

2.5 统计学方法

采用SAS17.0统计软件对数据进行分析,数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组之间比较采用方差分析,两两比较使用LSD法。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠心脏超声检查

与假手术组比较,模型组大鼠左室后壁厚度、左室舒张末期内径和左室收缩末期内径显著增大,左室射血分数显著降低($P<0.05$);与模型组比较,定位超声辐照微泡、红花黄色素、定位超声辐照微泡+红花黄色素组大鼠左室后壁厚度、左室舒张末期内径和左室收缩末期内径显著减少,左室射血分数显著升高($P<0.05$),其中定位超声辐照微泡+红花黄色素组改善更明显。大鼠心脏超声检查结果见表1。

表1 大鼠心脏超声检查结果($\bar{x}\pm s$)
Tab 1 Results of echocardiography in rats($\bar{x}\pm s$)

组别	n	左室后壁厚度,mm	左室舒张末期内径,mm	左室收缩末期内径,mm	左室射血分数,%
假手术组	8	1.23±0.14	5.17±0.32	3.01±0.38	70.25±4.95
模型组	8	1.76±0.12*	6.84±0.59*	5.84±0.56*	38.63±4.84*
定位超声辐照微泡组	8	1.54±0.13**	6.22±0.64*	5.03±0.63*	46.50±6.07*
红花黄色素组	8	1.52±0.12*	6.21±0.58*	4.96±0.67*	47.88±6.15*
定位超声辐照微泡+红花黄色素组	8	1.38±0.11*	5.65±0.48*	4.07±0.46*	56.63±4.63*

与假手术组比较:* $P<0.05$;与模型组比较:** $P<0.05$

vs.sham operation group:* $P<0.05$;vs.model group:** $P<0.05$

3.2 大鼠体质量、左室质量、左室质量指数测定结果

各组大鼠体质量无显著性差异($P>0.05$)。与假手术组比较,模型组大鼠左室质量、左室质量指数显著增加($P<0.05$);与模型组比较,定位超声辐照微泡、红花黄色素、定位超声辐照微泡+红花黄色素组大鼠左室质量、左室质量指数显著减少($P<0.05$),其中定位超声辐照微泡+红花黄色素组改善更明显。大鼠体质量、左室质量、左室质量指数测定结果见表2。

表2 大鼠体质量、左室质量、左室质量指数测定结果($\bar{x}\pm s$)
Tab 2 Results of body weight, left ventricular mass and left ventricular mass index in rats($\bar{x}\pm s$)

组别	n	体质量,g	左室质量,mg	左室质量指数,mg/g
假手术组	8	318.50±9.24	569.13±12.05	1.78±0.03
模型组	8	319.50±7.62	816.38±18.22*	2.56±0.04*
定位超声辐照微泡组	8	319.63±8.18	705.25±14.49*	2.21±0.04*
红花黄色素组	8	318.25±7.72	702.25±12.93*	2.20±0.03*
定位超声辐照微泡+红花黄色素组	n	319.88±7.34	640.63±12.02*	1.98±0.03*

与假手术组比较:* $P<0.05$;与模型组比较:** $P<0.05$

vs.sham operation group:* $P<0.05$;vs.model group:** $P<0.05$

3.3 RT-PCR法检测大鼠心肌组织IL-1 β mRNA的表达

与假手术组比较,模型组大鼠IL-1 β mRNA表达显著增强($P<0.05$);与模型组比较,定位超声辐照微泡、红花黄色素、定位超声辐照微泡+红花黄色素组大鼠IL-1 β mRNA表达显著减弱($P<0.05$),其中定位超声辐照微泡+红花黄色素组改善更明显。IL-1 β mRNA的表达见图1。

4 讨论

急性心肌梗死后,炎症因子的表达以及神经内分泌系统的激活启动并促进心室重塑,严重影响患者心功能及预后。心脏血管再生治疗是应用促血管生长因子刺激心肌缺血区小



图1 IL-1 β mRNA的表达

Fig 1 mRNA expression of IL-1 β

M.蛋白mark;SH.假手术组;MI.模型组;UTMD.定位超声辐照微泡组;

SY.红花黄色素组;UTMD+SY.定位超声辐照微泡+红花黄色素组

M.mark; SH.sham operation group; MI.model group; UTMD.ultrasound targeted microbubbles destruction group; SY.safflower yellow group; UTMD+SY.ultrasound targeted microbubbles destruction + safflower yellow group

血管生长和侧枝循环形成,即心肌缺血区的自我搭桥^[3]。研究表明,定位超声辐照破坏微泡后产生的空化或机械效应可使细胞膜通透性增加,使中性粒细胞聚集,产生炎症反应,内皮细胞间隙增宽,并致直径 $\leq 7\ \mu\text{m}$ 的微血管破裂,而微血管破裂及其引起的炎症反应可作为刺激因素,促进内源性VEGF生成增加,促进血管新生^[4]。

PAF是由血小板、内皮细胞、中性粒细胞、巨噬细胞等在各种病理因素的作用下触发合成分泌的一种强效生物活性磷脂,能使炎症及血栓级联反应放大。研究表明,PAF在缺血性心脏病患者体中含量明显增高,表明PAF参与了血小板聚集、冠脉血栓形成过程^[5]。红花黄色素是一种通过阻断PAF途径而发挥抗血小板聚集作用的药物,具有抗炎、抑制血栓形成等心血管保护作用。已有动物与临床研究表明^[6-8],红花黄色素能有效改善不稳定型心绞痛症状,抗心肌缺血,降低血黏度,还具有抗凋亡、抗氧化作用,能通过抑制心肌脂质过氧化、增强细胞抗氧化能力而保护心肌细胞。

IL-1 β 是一种具有高活性的致炎性细胞因子,除参与动脉粥样硬化及血栓性疾病发生外,还通过调节炎症反应以及增加基质金属蛋白酶的表达参与心肌损伤的重塑过程。本研究结果表明,与假手术组比较,模型组大鼠左室后壁厚度、左室舒张末期内径和左室收缩末期内径明显增大,左室射血分数显著降低,左室质量、左室质量指数显著增加,大鼠心肌IL-1 β mRNA表达显著增强($P < 0.05$);与模型组比较,定位超声辐照微泡、红花黄色素、定位超声辐照微泡+红花黄色素组大鼠左室后壁厚度、左室舒张末期内径和左室收缩末期内径明显减少,左室射血分数显著升高,左室质量、左室质量指数显著减少,IL-1 β mRNA表达显著减弱($P < 0.05$),其中定位超声辐照微泡+红花黄色素组改善更明显。提示定位超声辐照微泡促

血管再生治疗与PAF抑制剂红花黄色素均可以改善心功能,抑制炎症细胞因子IL-1 β 的表达,降低左室质量指数,改善左室重塑,二者联合治疗具有协同作用。其机制可能与以下几个方面有关:(1)定位超声辐照微泡促进内源性的VEGF生成增加,促进血管新生,改善缺血区血供,恢复冬眠心肌、顿抑心肌功能,减少心肌梗死面积,改善心肌重塑。(2)红花黄色素抑制炎症细胞因子IL-1 β 的表达,抗氧化,抗细胞凋亡机制,降低脂质过氧化物,清除氧自由基,减少心肌细胞损伤,改善心功能及左室重塑。(3)二者抗炎、抗氧化、抑制细胞凋亡与血管再生、心肌血运重建的协同作用。

综上所述,采用定位超声辐照微泡联合红花黄色素,可以改善大鼠左室重塑,进而改善心功能。其机制可能与红花黄色素抑制炎症细胞因子、抗氧化、抗凋亡和定位超声辐照微泡促血管再生的协同作用有关。本研究对探讨缺血性心脏病联合治疗方案有一定理论和实际指导意义,有望为临床提供一种新的治疗手段。

参考文献

- [1] 杨红,魏宗德.红花黄色素与心血管疾病的研究进展[J].西南军医,2009,11(1):83.
- [2] Wang ZG, Ling ZY, Ran HT *et al.* Ultrasound-mediated microbubble destruction enhances VEGF gene delivery to the infarcted myocardium in rats[J]. *Clin Imaging*, 2004, 28(6):395.
- [3] Annex BH, Simons M. Growth factor-induced therapeutic angiogenesis in the heart: protein therapy[J]. *Cardiovasc Res*, 2005, 65(3):649.
- [4] 凌智瑜,王志刚,冉海涛,等.超声微泡造影剂对心肌组织毛细血管通透性影响的实验研究[J].中国超声医学杂志,2004,20(5):327.
- [5] 曹红翠,杨云梅.血小板活化因子在急性冠脉综合征患者中的变化[J].中华急诊医学杂志,2006,15(5):451.
- [6] 刘建宏,侯晓军.红花黄色素注射液治疗不稳定型心绞痛疗效观察[J].中西医结合心脑血管病杂志,2009,7(6):734.
- [7] Wang C, Ma H, Zhang S, *et al.* Saflor yellow B suppresses p53-mediated apoptosis in PC12 cells induced by oxidative stress via all-tioxidant system and Bcl-2/Bax pathway[J]. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 2009, 380(2):135.
- [8] 王超云,张树平,许勇,等.红花黄色素B对Ang II诱导内皮细胞线粒体损伤的保护作用[J].药学报,2012,47(6):811.

(收稿日期:2013-03-11 修回日期:2013-05-06)

《中国药房》杂志——中国科技核心期刊,欢迎投稿、订阅