

异丙肾上腺素诱发大鼠特异性心肌缺血所引起心肌细胞病理组织的变化^{*}

李 想¹ 向绍杰² 赵 磊² 关敬之³ 齐 越² 孟 莉²
丁春晓² 乔菊久² 甘 雨² 刘小虎²

(1. 辽宁省肿瘤医院, 沈阳 110042) (2. 辽宁省中医药研究院, 沈阳 110034) (3. 内蒙古国际蒙医医院, 呼和浩特 010065)

摘要:目的 观察皮下注射不同天数异丙肾上腺素(1 mg/kg 体质量)诱发大鼠特异性心肌病所引起心肌组织切片 HE 染色、VEGF(血管内皮生长因子)、FGF(成纤维细胞生长因子)表达及心电图 T 波的变化。**方法** 除空白组外各组大鼠皮下多点注射异丙肾上腺素(1 mg/kg), 分别为连续皮下多点注射异丙肾上腺素(1 mg/kg)2 d 组、连续皮下多点注射异丙肾上腺素(1 mg/kg)4 d 组、连续皮下多点注射异丙肾上腺素(1 mg/kg)6 d 组。给药 1 周后, 大鼠麻醉, 测心电图, 取心脏, 采用 HE 染色观察大鼠心肌细胞损伤程度的变化, 采用免疫组化技术染色观察心肌组织切片 VEGF(血管内皮生长因子)、FGF(成纤维细胞生长因子)表达的变化。**结果** 与空白对照组相比连续皮下多点注射异丙肾上腺素(1 mg/kg)6 d 组 HE 染色组织切片镜下观察具有明显差异, 同时随着造模时间的延长模型组心肌组织切片 VEGF(血管内皮生长因子)、FGF(成纤维细胞生长因子)表达情况与空白对照组比也存在显著性差异。**结论** 本研究结果表明与空白对照组相比连续皮下多点注射异丙肾上腺素(1 mg/kg)6 d 组模型大鼠特异性心肌病所引起的心肌组织切片 HE 染色、VEGF(血管内皮生长因子)、FGF(成纤维细胞生长因子)表达及心电图 T 波的变化具有显著性差异, 因此大鼠连续皮下多点注射异丙肾上腺素(1 mg/kg)6 d 可以作为特异性心肌病药效评价的实验动物模型使用。

关键词:异丙肾上腺素; HE 染色; VEGF; FGF; 特异性心肌病

中图分类号: R-332 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)02-0042-05

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.02.008

特异性心肌病是指病因明确的心肌疾病, 这些病称为特异性心肌疾病。特异性心肌病, 包括缺血性心肌病、高血压性心肌、瓣膜性心肌病、代谢性心肌炎病、症性心肌病等。缺血性心肌病表现为扩张型心肌病伴收缩功能损伤而不能以冠状动脉病变或缺血损伤的范围来解释^[1]。瓣膜性心肌病表现为心室功能障碍而超过了其异常负荷。高血压性心肌病常表现为左心室肥大伴扩张型和心力衰竭的特点。异丙肾上腺素对 β 受体有较强的激动作用, 过量时因增加心肌收缩力和耗氧量, 可引起心律失常甚至心肌缺血坏死^[2]。本研究经皮下多点注射不同天数异丙肾上腺素(1 mg/kg)诱发大鼠特异性心肌病, 通过大鼠心肌组织切片 HE 染色、免疫组化检测

VEGF(血管内皮生长因子)、FGF(成纤维细胞生长因子)表达以及心电图 T 波的变化确定最佳的造模时间, 为后续药效学评价提供试验基础。

1 材料与方法

1.1 药品和试剂

盐酸异丙肾上腺素(上海禾丰制药有限公司, 批号 41160302)。VEGFA Polyclonal Antibody (Elabscience Biotechnology CO., Ltd, Catalog No: EGM0307)。FGF2 Polyclonal Antibody (Elabscience Biotechnology CO., Ltd, Catalog No: ESAP12457)。DAB 浓缩型试剂盒 (Beijing Solarbio Science &

收稿日期: 2018-08-05

^{*} 基金项目: 辽宁省科技厅基金资助项目 (No.2004226010-6)

作者简介: 李 想 (1983—), 女, 硕士, 主管药师, 研究方向: 中药药理。E-mail: 15940112466@163.com

通信作者: 刘小虎 (1985—), 男, 硕士, 副研究员, 研究方向: 中药药理。E-mail: haibianhandsome@126.com

Technology CO., Ltd, 20170419)。PBS 磷酸缓冲液 (Solarbio, 20170531)。

1.2 动物

SD 大鼠 90 只,雌雄各半,体质量 180~200 g, SPF 级,由辽宁长生生物技术有限公司提供,许可证号:SCXK(辽)2015-0001。

1.3 仪器

ML785 型多道生理记录仪,澳大利亚 AD 公司生产;光电显微镜:奥林巴斯中国有限公司生产, BX53 型;电热恒温培养箱:厦门医疗电子仪器厂生产, JKDP2 型; TP1020 自动脱水机,德国(徕卡)生产; YG-280KX 摊片机,湖北孝感市阳光神琦医用科技有限公司; YG-280KX 烤片机,湖北孝感市阳光神琦医用科技有限公司; Leica 切片机,德国(徕卡)生产。

1.4 方法

1.4.1 特异性心病模型的建立^[3-6]

将 SD 大鼠 90 只适应性饲养 7 d,所有大鼠用 2%戊巴比妥钠(50 mg/kg 体质量)麻醉,测基础心电图。剔除心电图异常大鼠 10 只,然后抽取 80 只大鼠随机分成空白对照组、皮下多点注射异丙肾上腺素(1 mg/kg) 2 d 组、4 d 组、6 d 组,每组 20 只。除空白对照组外各组大鼠腹腔注射异丙肾上腺素(1 mg/kg)^[3-7]。分别于皮下多点注射异丙肾上腺素(1 mg/kg·d⁻¹) 2 d、4 d、6 d 后停止注射,于首次注射异丙肾上腺素后第 13 天在各组存活的大鼠中随机抽取 10 只用 2%戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉,测心电图,迅速处死大鼠,取下心脏,用 4%甲醛溶液固定,取左心室心尖,进行 HE 染色,并通过免疫组化法检测心肌血管内皮生长因子和碱性成纤维细胞生长因子在心肌细胞的表达。

1.4.2 HE 染色心脏病理分级

0 级,正常心肌,无病变;1 级,局灶性的间质反应;2 级,多处局灶性损害,心室有散在小灶性坏死及条索状坏死,肌纤维肿胀和断裂;3 级,退行性损害伴随玻璃样坏死、肌纤维断裂以及水肿,部分心肌细胞溶解消失,中性白细胞浸润,右心室亦有灶性坏死;4 级,左心室片状透壁坏死,心肌细胞溶解消失,肉芽组织增生,呈片状淋巴细胞、单核细胞及中性白细胞浸润,右心室亦有灶性坏死。HE 积分平均值等于每组大鼠心脏病理分级之和除以每组大鼠动物数。

1.4.3 免疫组织化学染色

按照 DBA 试剂盒说明书操作进行免疫组化染色,心肌血管内皮生长因子抗体稀释比例为 1:300,碱性成纤维细胞生长因子抗体稀释比例为 1:200,观察左心室心肌细胞的病理变化,并使用 ImageJ 软件对免疫组化染色病理切片进行半定量分析,计算相对光密度值(A)。A=log[gv0/gv](gv0 为背景区灰度值,gv 为阳性反应区域灰度值)。

1.5 统计方法

数据结果应用 SPSS17.0 软件处理,计量资料满足正态性和方差齐性者进行方差分析,以 P<0.05 或 0.01 为有统计学意义。

2 结果

2.1 造模后大鼠心电图 T 波变化的结果

注射异丙肾上腺素 6 d 组与空白对照组 T 波具有显著性差异(P<0.05),见表 1。

表 1 对心电图 T 波变化的影响
Table 1 Influence of T-wave changes in ECG($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	动物数(n)	T 波变化(mv)
空白对照组	10	-0.019±0.005
注射异丙肾上腺素 2 d 组	10	-0.013±0.009
注射异丙肾上腺素 4 d 组	10	-0.008±0.024
注射异丙肾上腺素 6 d 组	10	0.005±0.016*

注: * 与空白对照组比较 P<0.05, T 波变化: F=4.50。T 波变化值=造模前 T 波值-造模后 T 波值
Note: * was compared with the blank control group P<0.05, T-wave change: F=4.50. T-wave change value = pre-modelling T-wave value-post-modelling T-wave value

2.2 大鼠心肌细胞 HE 染色及免疫组织化学染色结果

注射异丙肾上腺素 4 d 组、异丙肾上腺素 6 d 组 HE 染色积分平均值与空白对照组比,具有显著性差异(P<0.05, P<0.01)。异丙肾上腺素 4 d 组、异丙肾上腺素 6 d 组 VEGF(血管内皮生长因子)表达相对光密度值与空白对照组比较,具有显著性差异(P<0.01, P<0.01)。异丙肾上腺素 6 d 组 FGF(成纤维细胞生长因子)表达相对光密度值与空白对照组比,具有显著性差异(P<0.01),见表 2、图 1、图 2、图 3。

表 2 心肌细胞 HE 染色及免疫组织化学染色

Table 2 HE staining and immunohistochemical staining of myocardial cells($\bar{x}\pm s,n=10$)

组别	动物数 (<i>n</i>)	HE 积分平均值	VEGF(血管内皮生长 因子)表达 ROD 值	FGF(成纤维细胞 生长因子)表达 ROD 值
空白对照组	10	0.000±0.000	0.019±0.006	0.030±0.007
注射异丙肾上腺素 2 d 组	10	0.800±1.033	0.020±0.005	0.032±0.006
注射异丙肾上腺素 4 d 组	10	1.000±1.155*	0.031±0.013**	0.035±0.008
注射异丙肾上腺素 6 d 组	10	2.200±1.033**	0.040±0.009**	0.049±0.010**

注: *与空白对照组比较 $P<0.05$, **与空白对照组比较 $P<0.01$ 。F=9.53,F=12.72,F=12.64

Note: * Compared with the blank control group $P<0.05$, ** Compared with the blank control group $P<0.01$. F=9.53,F=12.72,F=12.64

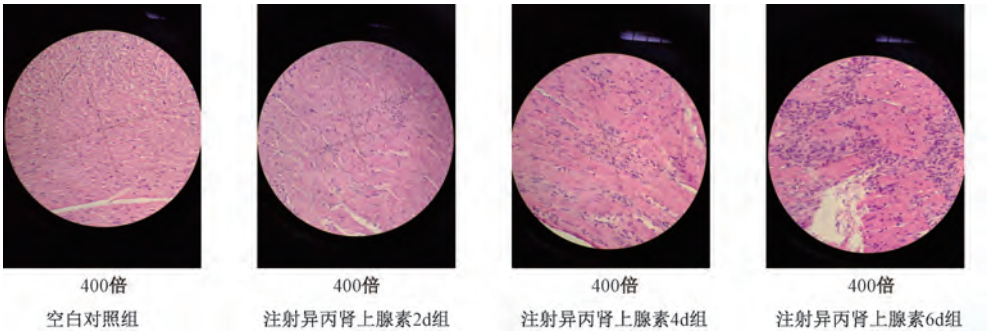


图 1 心肌细胞 HE 染色结果
Fig.1 HE staining of myocardial cells

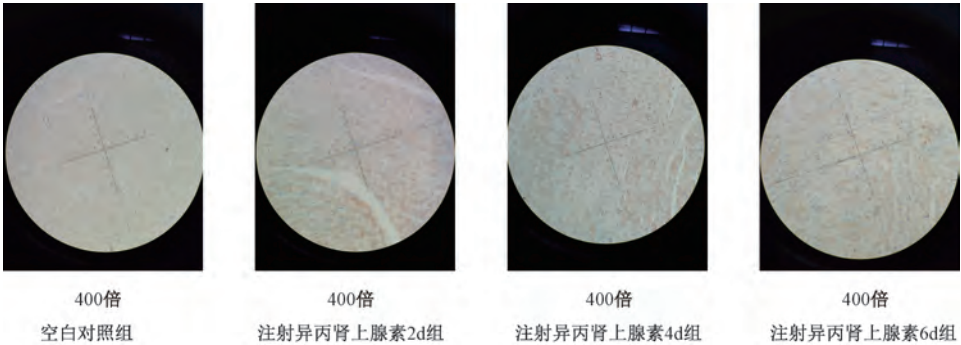


图 2 VEGF 在心肌细胞中的表达
Fig.2 VEGF activity in myocardial cells

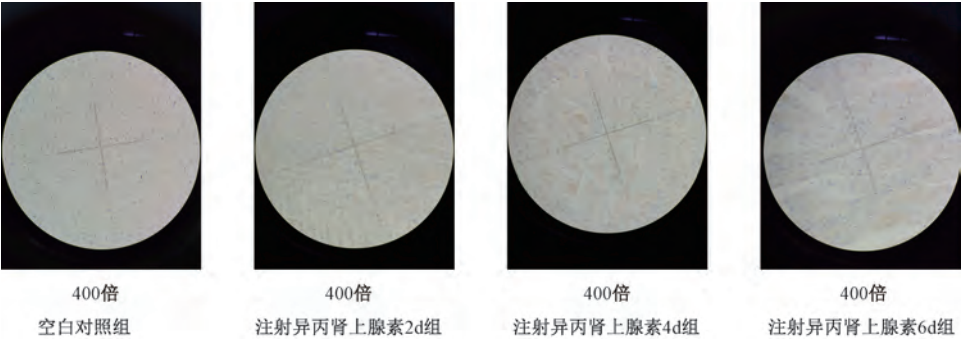


图 3 FGF 在心肌细胞中的表达
Fig.3 FGF activity in myocardial cells

3 讨论

T波位于S-T段之后,是心室复极所产生的,钝圆,占时较长,从基线缓慢上升,然后较快下降,形成前肢较长、后肢较短的波形。正常T波方向常和QRS波群的主波方向一致。在QRS波群主波向上的导联中,T波倒置或低平,常见于心肌缺血^[7]。心肌缺血的心电图改变类型取决于缺血的发生部位、持续时间和严重程度。具有特异性的心肌缺血发作时,面向缺血部位的导联常显示缺血型ST段压低或T波倒置^[8]。本研究结果表明随着造模时间的延长,T波变化值逐渐变大,造模6d后T波变化值与空白对照组具有显著性差异,T波低平或倒置,揭示心肌缺血模型造模成功。

缺血性心肌病指由于长期心肌缺血导致心肌弥漫性纤维化等一系列表现的临床综合征,是心肌供氧量不足以满足心肌的需氧量,使血氧供需失衡引起的一种结果。异丙肾上腺素对 β 受体作用较强;过量时因增加心肌收缩力及耗氧量,引起心律失常和心肌缺血坏死。大鼠经皮下反复给予过量的异丙肾上腺素可引起心肌耗氧量增加,从而引起供氧和需氧之间的不平衡导致心肌细胞变性和坏死,进而引起心肌纤维化心肌瘢痕形成。由HE染色可见,正常心肌,无病变,随着注射异丙肾上腺素时间的增加,心肌细胞损伤程度逐渐加重,注射异丙肾上腺素2d组可见局灶性的间质反应;注射异丙肾上腺素4d组可见多处局灶性损害,心室有散在小灶性坏死及条索状坏死,肌纤维肿胀和断裂;注射异丙肾上腺素6d组出现部分心肌细胞溶解消失,中性白细胞浸润。

血管内皮生长因子通过提高血浆酶原活化因子和血浆酶原活化因子抑制因子-1的mRNA表达,来提高血浆酶原活化因子的活性,能够促进细胞外蛋白水解,然后促进新生毛细血管的形成^[9]。血管内皮生长因子可通过细胞小囊泡器增加血管通透性,血管内皮生长因子是最强的可增加血管通透性的因子。血管内皮生长因子可以诱导血浆蛋白溶酶原激活物和血浆溶酶原激活物抑制剂-1,以及基质胶原酶、诱导组织因子等在内皮细胞的表达。在动物和成人的正常心肌细胞也有低水平表达,当心肌细胞因缺血缺氧受到损伤时,血管内皮生长因子可在体内诱导血管新生因此表达增加。成纤维细胞生长因子(FGF)在动脉粥样硬化病灶中促进内皮细胞的游

走和平滑肌细胞的增殖,还可以促进新血管形成,修复受损害的内皮细胞^[10-12]。成纤维细胞生长因子一直被认为是病灶形成促进因子,但其又可加强左心室厚度,增强心肌弹性力,防止在血管壁沉积,治疗血栓。因此在心肌细胞受到损伤时,成纤维细胞生长因子表达也会增加。由实验结果可知随着注射异丙肾上腺素天数延长VEGF和FGF表达也在逐渐增加,注射异丙肾上腺素4d组、异丙肾上腺素6d组VEGF表达与空白对照组比较具有显著性差异。注射异丙肾上腺素6d组FGF表达与空白对照组比较具有显著性差异。

本研究结果表明随着皮下多点注射异丙肾上腺素时间的延长,大鼠特异性心肌病所引起的心肌缺血更加显著,表现为心电图T波低平或倒置,与空白对照组比异丙肾上腺素6d组HE染色、VEGF(血管内皮生长因子)、FGF(成纤维细胞生长因子)表达均具有显著性差异,因此大鼠连续皮下多点注射异丙肾上腺素($1\text{ mg/kg}\cdot\text{d}^{-1}$)6d以上可以作为特异性心肌病药效评价的可靠实验动物模型使用。

参考文献

- [1] 唐朝文.特异性心肌病的分类及特征[J].现代临床医学生物工程学杂志,1999,(1):68.
- [2] 冷雪,宋园,臧安缘,等.JAK2/STAT3信号通路在人参皂苷Re预处理预防异丙肾上腺素致急性心肌梗死损伤中的作用[J].中国药理学通报,2018,34(1):103-107.
- [3] 张芹,李根,唐辉,等.天山花椒不同的提取部分对心肌缺血性保护作用的筛选[J].中国药理学通报,2009,25(2):277-278.
- [4] 杨梅,寇毅英,冯伟力,等.三味檀香散对大鼠心肌缺血损伤的保护作用及机制[J].中国药理学通报,2008,(4):485-488.
- [5] 凌峰,段徐,杨建敏,等.吴茱萸次碱对异丙肾上腺素致心肌缺血损伤及心律失常的作用[J].中华中医药学刊,2007,(11):2244-2245.
- [6] 肖芳,于小风,曲绍春,等.复方刺五加注射液对大鼠实验性心肌缺血的保护作用[J].人参研究,2007,(1):2-4.
- [7] 钟杭美.T波低平的诊断与临床意义[J].临床心电学杂志,2013,22(2):87-88.
- [8] 高淑丹,吴阳静.心肌缺血心电图ST段与T波及心率变化关系[J].中国医药指南,2012,10(4):148-149.
- [9] 晋军,黄岚向,常青,等.蛻皮甾酮对大鼠急性心肌梗塞侧支循环形成及VEGF产生的影响[J].中国药理学通报,2000,(4):459-461.
- [10] 王勤,于俊民,张小波,等.中药对缺血心肌血管内皮细胞生长因子、碱性成纤维细胞生长因子水平的影响[J].中国医药导报,2013,10(7):30-31.

[11] 杨孝芳,崔瑾,刘小雨,等.心肌缺血损伤小型猪模型内关穴位埋针后血管新生及成纤维细胞生长因子 mRNA 和蛋白的表达[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,15(46):

8630-8634.

[12] 范英兰,胡丽萍,朱竟赫,等.心肌缺血动物模型实验研究进展[J].实验动物科学,2018,35(1):72-75.

Pathological Changes of Specific Myocardial Ischemia Induced by Isoproterenol in Rats Cardiomyocytes

LI Xiang¹, XIANG Shaojie², ZHAO Lei², GUAN Jingzhi³, QI Yue², MENG Li²,
DING Chunxiao², QIAO Jujiu², GAN Yu², LIU Xiaohu²

(1.Liaoning Provincial Tumor Hospital, Shenyang 110042, China)

(2. Liaoning Province Chinese Medicine Research Institute, Shenyang 110034, China)

(3.Inner Mongolia international Mongolian hospital, Hohhot 010065, China)

Abstract: Objective To observe the changes of HE staining, VEGF and FGF expression in rat myocardial tissue slices induced by subcutaneous injection of isoproterenol (1 mg/kg) in different days. **Method** Except for the natural control group, rats were injected subcutaneously with isoproterenol (1 mg/kg) 2-day group, 4-day group, 6-day group. One week after injection, the rats were anesthetized, the ECG was measured, and the heart was taken. HE staining was used to observe the changes of rat myocardial cell damage. Immunohistochemical staining was used to observe the changes of VEGF and FGF expression. **Result** Compared with the natural control group, continuous subcutaneous injection of isoproterenol (1 mg/kg) at 6-day group showed significant differences in HE staining. Expression of VEGF (vascular endothelial growth factor) and FGF (fibroblast growth factor) in the model group was also significantly different from that in the natural control group. **Conclusion** Rats were injected subcutaneously with isoproterenol (1 mg/kg) 6 days can be used as an experimental animal model for evaluating the efficacy of heterosexual cardiomyopathy.

Key words: Isoproterenol; HE staining; VEGF; FGF; Heterosexual cardiomyopathy

(上接第 41 页)

Effects of Different Concentrations of Tea Polyphenols on Intestinal Flora in Mice

YU Ziting

(BeiJing Laboratory Animal Research Center, Beijing 100012, Chian)

Abstract: Objective To study the effects of different concentrations of tea polyphenols on intestinal flora in mice. **Method** Twenty four C57BL/6 mice were randomly divided into 4 groups, control group (CK, no tea polyphenols added), low-dose tea polyphenols group (LTP, 0.4 g/L GTP added in drinking water), medium dose tea polyphenols group (MTP, 0.8 g/L GTP added in drinking water), high-dose tea polyphenols (TP, 1.6 g/L GTP added in drinking water), 4 groups are given regular feed, and tea polyphenols are replaced once a day for 14 consecutive days. Analysis of intestinal microbial diversity in mice by MiSeq sequencing and bioinformatics. **Result**

High concentration of tea polyphenols could increase the diversity of intestinal flora. The content of *Lactobacillus* in medium dose group and high dose group was significantly higher than that in low dose and control group ($P = 0.038$). **Conclusion** Tea polyphenols can increase the diversity of intestinal microorganisms, increase the proportion of probiotics and change the composition of flora.

Key words: intestinal flora; Tea polyphenol; diversity; *Lactobacillus*