

· 基础研究 ·

补肾活血方对去卵巢小鼠冠脉微循环的保护作用及机制研究

贾承明 马 静 陈昌波 李颖祺 曹 亮 王方圆 周 倩 王玉珍

摘要 目的 探讨心肌巨噬细胞(macrophages, M)表型 M1/M2 极化在去卵巢小鼠冠脉微循环障碍(CMD)中的作用及补肾活血方的影响。**方法** 将 90 只雌性 C57BL/6 小鼠按随机数字表法分为 9 组: 6 周正常组(6WC 组)、6 周假手术组(6WS 组)、6 周模型组(6WM 组, 去卵巢 6W)、8 周正常组(8WC 组)、8 周假手术组(8WS 组)、8 周模型组(8WM 组, 去卵巢 8W)、巨噬细胞清除组(简称 CM 组, 腹腔注射氯膦酸二钠脂质体 0.01 mL/kg, 每周 1 次)、补肾活血组[简称 BG 组, 补肾活血方灌胃, 5 mL/(kg·d), 每天 1 次]及 miR-155 抑制组(简称 MI 组, 尾静脉注射 miR-155 抑制剂 20 mg/kg, 每周 1 次), 每组 10 只, 持续干预 8 周。采用小动物超声成像系统检测左室短轴缩短率(LVFS)和左室射血分数(LVEF), HE 染色观察心肌组织结构, 麦胚凝集素染色检测心肌细胞横截面积, 免疫荧光染色检测冠脉微血管密度和 CD68⁺ 表达; 实时荧光定量 PCR 检测心肌 miR-155、IL-1 β 、TNF- α 、IL-10 及血管内皮生长因子(VEGF) mRNA 表达。**结果** 与 6WC 组比较, 6WS 和 6WM 组心肌 LVEF 和 LVFS 值、炎症细胞浸润、心肌细胞横截面积、冠脉微血管密度差异均无统计学意义($P > 0.05$); 与 8WC 和 8WS 组比较, 8WM 组心肌 LVEF 和 LVFS 值明显下降, 心肌细胞肿胀和炎症细胞浸润增加, 心肌细胞横截面积增大, 冠脉微血管密度减少, CD68⁺ 表达增加, miR-155、IL-1 β 和 TNF- α mRNA 表达增加, IL-10 和 VEGF mRNA 表达减少($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与 8WM 组比较, BG 组心肌 LVEF、LVFS 值和冠脉微血管密度增加, 炎症细胞浸润、细胞横截面积减小, CM 和 BG 组心肌组织炎症细胞浸润、CD68⁺ 表达均减少, CM、BG 和 MI 组心肌 miR-155、IL-1 β 和 TNF- α mRNA 表达均减少; BG 和 MI 组心肌 IL-10 和 VEGF mRNA 表达均增加, 差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与 MI 组比较, BG 组心肌 miR-155、IL-1 β 、TNF- α 、IL-10、VEGF mRNA 表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 补肾活血方可能通过下调心肌 miR-155 调控 M1/M2 极化抑制冠脉微血管炎症反应。

关键词 补肾活血方; 冠脉微循环障碍模型; 去卵巢小鼠; M1/M2 极化; miR-155

Protective Effect and Mechanism of Bushen Huoxue Recipe on Coronary Microcirculation in Ovariectomized Mice JIA Cheng-ming, MA Jing, CHEN Chang-bo, LI Ying-qi, CAO Liang, WANG Fang-yuan, ZHOU Qing, and WANG YU-zhen *Department of Traditional Chinese Medicine, First Affiliated Hospital of Air Force Military Medical University, the Army Medical Center in Traditional Chinese Medicine, Xi'an (710032)*

ABSTRACT Objective To observe the effect of myocardial macrophage phenotype M1/M2 polarization in ovariectomized mice coronary microvascular dysfunction (CMD) model and the protective role of Bushen Huoxue Recipe. **Methods** Totally 90 female C57BL/6 mice were assigned to 9 groups by random digit table: 6-week control group(6WC), 6-week sham group(6WS), 6-week model group(6WM, ovariectomized 6 weeks), 8-week control group(8WC), 8-week sham group(8WS), 8-week model group(8WM, ovariectomized 8 weeks), clear macrophage group(CM, intraperitoneally injected with Clophosome, 0.01 ml/kg, once a week), Bushen Huoxue group[BG, given Bushen Huoxue Recipe by gavage,

基金项目: 中国医药教育协会孙思邈中医药研究专项课题(No. 2016SKT-M001); 陕西省中医药管理局 10 个重大病种中医药创新计划项目(No. 2015-CXB-02)

作者单位: 空军军医大学第一附属医院中医科暨全军中医内科中心(西安 710032)

通讯作者: 马 静, Tel: 13096909166, E-mail: jingma@fmmu.edu.cn

DOI: 10.7661/j.cjim.20181112.236

5 mL/(kg · d), once a day] and miR-155 inhibitor group(MI, injected miR-155 antagomir, 20 mg/kg, once a week). 10 in each group, sustained intervention for 8 weeks. Small animal ultrasound imaging system was used to collect echocardiography to analyze left ventricular fraction shortening(LVFS) and left ventricular ejection fraction(LVEF). HE staining was used to observe the myocardial structure. Wheat germ agglutinin staining was used to observe myocyte cross-sectional area. Immunofluorescence was used to observe coronary microvascular density, the expression of CD68⁺. Real-time quantitative PCR was used to detect the expression of microRNA-155(miR-155), interleukin (IL)-1 β , tumor necrosis factor (TNF)- α , IL-10 and vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA. Results Compared with 6WC group, there was no statistically significant difference in LVFS and LVEF levels, the myocardial cell swelled, inflammatory cells infiltration, the cross-sectional area of cardiac cells, and coronary microvascular density in 6WS and 6WM groups ($P > 0.05$). Compared with 8WC and 8WS group, LVFS and LVEF levels decreased, and the myocardial cell swelled, inflammatory cells infiltration increased, the cross-sectional area of cardiac cells increased, coronary microvascular density decreased, the expression of CD68⁺, miR-155, IL-1 β , TNF- α mRNA increased, the expression of IL-10 and VEGF mRNA decreased in 8WM group, all the above differences were statistically significant($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with 8WM group, LVFS and LVEF levels, coronary microvascular density increased, inflammatory cells infiltration and the cross-sectional area of cardiac cells decreased in BG group; inflammatory cells infiltration and the expression of CD68⁺ decreased in CM and BG group; the expression of miR-155, IL-1 β , TNF- α mRNA decreased in CM, BG and MI group; the expression of IL-10 and VEGF mRNA increased in BG and MI group; all the above differences were statistically significant($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with MI group, there was no statistically significant difference in the expression of miR-155, IL-1 β , TNF- α , IL-10 and VEGF mRNA in BG group ($P > 0.05$). Conclusion Bushen Huoxue Recipe may inhibit the inflammatory response of coronary microcirculation by down-regulating the expression of miR-155 regulating M1/M2 polarization.

KEYWORDS Bushen Huoxue Recipe; coronary microvascular dysfunction model; ovariectomized mice; M1/M2 polarization; microRNA-155

冠脉微循环障碍 (coronary microvascular dysfunction, CMD) 已成为心血管病防治的研究热点之一^[1]。炎症细胞浸润和促炎因子增多导致血管内皮细胞受损,降低冠状动脉功能和血流储备,影响心肌收缩功能,进而加速了 CMD 发生发展^[2,3];巨噬细胞 (macrophages, M) 表型 M1/M2 极化在这一进程中发挥了重要的作用^[4],以及 miR-155 会促进 M1 极化,抑制 M2 极化^[5]。但目前尚无 M1/M2 极化在去卵巢 CMD 中的作用及中药对其影响的报道。补肾活血方有育阴助阳、活血止痛之功,在治疗女性绝经后 CMD 中疗效显著^[6]。同时,补肾活血方可防治去卵巢大鼠心肌微血管内皮细胞形态和功能损伤及炎症反应,其抗炎作用与阻断 NF- κ Bp50 (I κ B α)-IL-1 β 信号通路有关,并以含生药 3 g/mL 最为明显^[7,8]。由于 IL-1 β 是 M1 型巨噬细胞的标志炎症因子^[9],故本研究推测 CMD 的发生发展可能与 miR-155 调控巨噬细胞 M1/M2 极化有关以及补肾活血方防治绝经后 CMD 的作用机制可能是通过调控 miR-155 表达,影响巨噬细胞 M1/M2 极化。因此,本研究拟通过创建

去卵巢小鼠 CMD 模型,观察心肌组织结构、冠脉微血管密度和心肌收缩功能的损伤与 M1/M2 的标志炎症因子表达的关系,探讨补肾活血方的保护作用机制,为其防治绝经后 CMD 提供可靠实验依据。

材料与方法

1 动物 SPF 级 8 周龄雌性 C57BL/6 小鼠,体重(20.88 \pm 0.17)g 适应性喂养 1 周,饲养环境为昼夜 12 h 交替,室内温度控制在 18 ~ 22 $^{\circ}$ C,湿度控制在 50% ~ 60%,食物和水自由摄取。动物合格证号: SCXK (陕)2014—002,本实验通过空军军医大学实验动物中心福利与伦理委员会审查 (No. 20150903)。

2 药物 补肾活血方由仙茅 0.5 g 淫羊藿 0.5 g 知母 2.5 g 黄柏 1.0 g 当归 0.5 g 制香附 0.5 g 远志 0.7 g 葛根 1.5 g 配方颗粒组成,分别相当于生药仙茅 10 g 淫羊藿 10 g 知母 6 g 黄柏 10 g 当归 10 g 制香附 10 g 远志 10 g 葛根 15 g,并由广州一方制药有限公司提供,产品批号: 412191L。用 100 $^{\circ}$ C 的蒸馏水将以上颗粒剂冲调至

含生药量为 6 g/mL 的混悬液, 4 ℃ 保存备用。

3 试剂与仪器 CD31 兔抗大鼠单克隆抗体(批号: SAB5600061)、CD68 兔抗小鼠多克隆抗体(批号: SAB1401062)、FITC-/Rho 交联二抗(批号: FITC1)均购自美国 Sigma 公司, TRizol 提取液(美国 Invitrogen 公司, 批号: 15596-018)、M-MLV 反转录酶(Invitrogen 公司, 批号: 28025-014)、SYBR green qRT-PCR 检测试剂盒(批号: 13417000 日本 TaKaRa 公司)、氯膦酸二钠脂质体 Clophosome(批号: F70101C-N, FormuMax 公司)、miRNA 试剂盒(天根生物科技有限公司, 批号: FP401-01-50)、miR-155 抑制剂 miR-155 antagomir(广州锐博生物科技有限公司)。正置荧光显微镜(日本 Olympus 公司)、激光共聚焦显微镜、NIS-Viewer 图像处理软件系统(日本 Nikon 公司)、Bio-Rad CFX96 型实时定量定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)。

4 动物分组及模型建立 将 90 只雌性 C57BL/6 小鼠按随机数字表法分为 9 组, 每组 10 只。分别为 6W 正常组(6WC)、6W 假手术组(6WS)、6W 模型组(6WM)、8W 正常组(8WC)、8W 假手术组(8WS)、8W 模型组(8WM)、巨噬细胞清除组(CM)、补肾活血组(BG)及 miR-155 抑制组(MI)。参照参考文献[10], 用 1% 戊巴比妥钠(30 mg/kg, 腹腔注射)麻醉雌性小鼠后, 俯卧位固定, 腰椎后侧正中切口约 1 cm, 切除双侧卵巢后将输卵管、血管等结扎, 缝合皮肤并消毒, 制备小鼠去卵巢模型; 假手术组不切除卵巢, 仅切除少许卵巢周围的脂肪组织; 正常组不作任何处理; 6 周和 8 周后分别观察以上各组处理后的心肌组织及冠脉微血管密度等指标。BG 组: 参照参考文献[8], 选用大鼠灌服的补肾活血方混悬液的最佳剂量(含生药 3 g/mL, 相当于成人服用剂量的 6.45 倍), 按照体表面积法, 换算成含生药 6 g/mL 给去卵巢手术 8 周后的小鼠灌服, 5 mL/(kg · d), 每天 1 次, 连续 8 周; CM 组: 参考文献[11], 给去卵巢手术 8 周后的小鼠腹腔注射氯膦酸二钠脂质体(Clophosome), 0.01 mL/kg, 每周 1 次, 连续 8 周; MI 组: 参考文献[12], 给去卵巢手术 8 周后的小鼠尾静脉注射 miR-155 抑制剂 miR-155 antagomir, 20 mg/kg, 每周 1 次, 连续 8 周。

5 观察指标及方法

通过观察去卵巢手术后 6、8 周时小鼠心肌收缩功能、心肌组织结构、心肌细胞横截面积、冠脉微血管密度, 建立小鼠去卵巢 CMD 模型; 在该模型的基础上, 通过清除 M, 观察 CD68⁺ 和 M1、M2 标志炎症因子、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth

factor, VEGF) mRNA 表达, 探究冠脉微血管修复与巨噬细胞 M1/M2 极化的关系; 通过抑制心肌 miR155 表达, 观察巨噬细胞 M1、M2 标志炎症因子、VEGF mRNA, 及 CD68⁺ 表达水平, 探究 miR155 对巨噬细胞 M1/M2 极化的影响。

5.1 心肌收缩功能 采用小动物超声成像系统。使用戊巴比妥钠(30 mg/kg, 腹腔注射)麻醉实验小鼠后, 将其仰面固定于 37 ℃ 恒温固定台上, 左前胸进行脱毛处理。用高分辨小动物超声成像系统, 将探头放置于雌性小鼠左胸前, 2D 超声显示左室短轴切面, 然后, 在乳头肌水平位置, 采用 M 式超声记录左室运动情况, 测量雌性小鼠左室舒张末内径以及左室收缩末内径, 计算左室短轴缩短率(left ventricular fraction shortening, LVFS)和左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)。用以衡量心肌收缩功能。

5.2 心肌组织形态结构 采用 HE 染色。经 9% 福尔马林液固定心肌组织, 石蜡包埋, 切片, 厚约 4 μm。经过二甲苯和梯度酒精脱水脱蜡, 苏木精染色 3~5 min, 1% 盐酸乙醇分化 30 s, 1% 氨水返蓝 10 s, 1% 伊红染色 1 min, 酒精脱水, 封片。用光学显微镜观察并采集图片, 用以检测心肌组织形态结构。

5.3 心肌细胞横截面积 参照参考文献[13], 采用麦胚凝集素染色。将放于 OCT 的心肌组织置于冰冻切片机中切片, 厚约 10 μm。取浓度为 2 mmol/L 的麦胚凝集素(wheat germ agglutinin, WGA)覆盖心肌组织, 37 ℃ 避光孵育 15 min。PBS 洗 3 次, 每次 3~5 min。Hoechst(10 nmol/L)染核, PBS 洗 3 次, 每次 3~5 min, 封片。用激光共聚焦显微镜采集图片, 用以检测心肌细胞横截面积。

5.4 CD31⁺/CD68⁺ 免疫荧光染色检测微血管密度/心肌组织巨噬细胞阳性表达 取适量山羊血清将组织切片进行封闭, 滴加一抗 CD31⁺ 兔抗大鼠单克隆抗体(1:250 稀释)或 CD68⁺ 兔抗小鼠多克隆抗体(1:250 稀释)4 ℃ 孵育过夜, PBS 洗 3 次后滴加二抗 FITC-/Rho(1:200 稀释), 37 ℃ 孵育 1 h, PBS 洗 3 次, 每次 3~5 min。Hoechst(10 nmol/L)染核, PBS 洗 3 次, 每次 3~5 min, 封片。用激光共聚焦显微镜采集图片。按照 Weidner N 标准^[14]进行微血管密度计数, 内皮细胞或内皮细胞簇会被 CD31⁺ 抗体染成红色, 不管其是否有管腔, 均算作一个微血管计数, 厚的平滑肌壁以及管腔直径大于 8 倍红细胞直径的血管排除在外。首先在 100 倍镜下观察组织切片, 寻找血管高密度区域, 再在高倍镜(×400)下记录 5 个随机视

野的血管数,统计后取其平均值作为微血管密度。

5.5 实时荧光定量 PCR 取新鲜心肌采用 TR-lzol 试剂盒提取总 RNA,定量后,使用反转录试剂盒将 RNA 反转录成 cDNA,将 cDNA 用荧光定量检测试剂盒(SYBR Green)在 Bio-Rad CFX96 实时荧光定量 PCR 仪上进行检测相关 mRNA 的表达。反应条件为:94 ℃ 变性 2 min,94 ℃ 20 s,60 ℃ 34 s,44 个循环;最后加熔解曲线检测。

表 1 实时定量 PCR 的引物列表

名称	引物序列(5'-3')	引物长度(bp)
β-actin	上游:CTGTATCCCCTCCATCGTG	20
	下游:TACTCCTGCTTGTGATCCA	20
VEGF	上游:AGGCAGACTATTCAGCGGACTC	22
	下游:CTCAAACCGTTGGCACGA	19
IL-1β	上游:GCAACTGTTCTGAACTCAACT	22
	下游:ATCTTTTGGGGTCCGTC AACT	21
TNF-α	上游:CGCGGATCCATGAGCACTGAAAGCATG	27
	下游:CCGCTCGAGTCACAGGGCAATGATCCCAAAG	31
IL-10	上游:TTTAGGCGAGAAGCTGAAGG	20
	下游:TCTCACAGGGCAGGAATCT	20
U6	上游:CTCGCTTCGCGACGACA	17
	下游:AACGCTTCACGAATTGCGT	19
miR-155	上游:ATGGTTCGTGGGTTAATGCTAATCGTG	27
	下游:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGC ACTGGATACGACACCCCTAT	52

通过检测 M1 型巨噬细胞标志炎症因子 IL-1β、TNF-α 和 M2 型巨噬细胞标志炎症因子 IL-10 及 VEGF 表达,间接反映 M1 或 M2 型巨噬细胞数量。

6 统计学方法 应用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组心肌 LVEF、LVFS 值比较(表 2) 与 6WC 组比较,6WS、6WM、8WC、8WS 组心肌 LVEF、

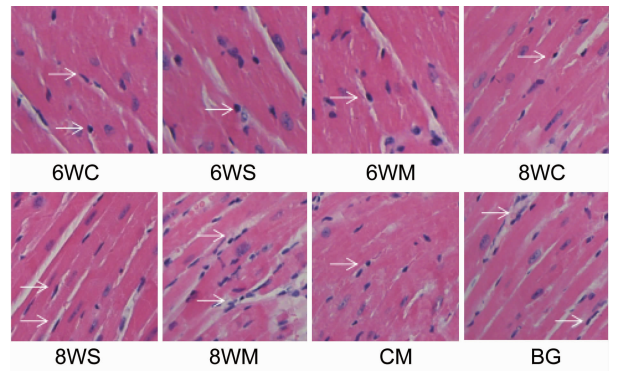
表 2 各组小鼠心肌收缩功能比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	n	LVFS	LVEF
6WC	10	47.05 ± 1.19	56.40 ± 1.78
6WS	10	44.83 ± 1.43	57.42 ± 1.37
6WM	10	45.67 ± 1.66	57.17 ± 1.97
8WC	10	43.93 ± 1.63	55.46 ± 1.85
8WS	10	45.06 ± 1.42	54.60 ± 1.52
8WM	10	38.84 ± 1.67*	47.02 ± 2.35*△
CM	10	42.14 ± 1.32	44.46 ± 2.14
BG	10	43.94 ± 1.56▲	54.71 ± 1.44▲

注:与 8WC 组比较,* $P < 0.05$;与 8WS 组比较,△ $P < 0.05$;与 8WM 组比较,▲ $P < 0.05$

LVFS 值比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$);与 8WC 和 8WS 组比较,8WM 组心肌 LVEF、LVFS 值降低 ($P < 0.05$);与 8WM 组比较,CM 组心肌 LVEF、LVFS 值差异无统计学意义 ($P > 0.05$),BG 组心肌 LVEF、LVFS 值升高 ($P < 0.05$)。

2 各组心肌组织结构比较(图 1) 6WC、6WS、6WM、8WC、8WS 组小鼠心肌均胞浆丰富,结构完整,细胞排列整齐;8WM 组心肌细胞肿胀,横纹模糊,炎症细胞浸润增多,心肌间质充血;CM 组心肌组织浸润的炎症细胞较少;BG 组心肌组织浸润的炎症细胞较少,损伤程度较轻。

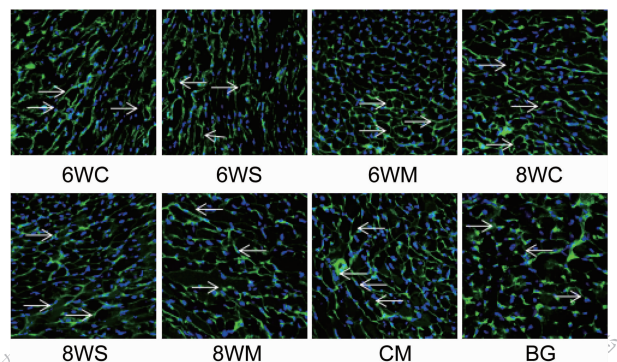


注:箭头所指为炎症细胞

图 1 各组心肌组织形态结构比较 (HE, ×400)

3 各组心肌细胞横截面积比较(图 2,表 3) 与 6WC 组比较,6WS、6WM、8WC、8WS 组心肌细胞横截面积差异无统计学意义 ($P > 0.05$);与 8WC 和 8WS 组比较,8WM 组心肌细胞横截面积增大 ($P < 0.05$);与 8WM 组比较,CM 组心肌细胞横截面积差异无统计学意义 ($P > 0.05$),BG 组心肌细胞横截面积减小 ($P < 0.05$)。

4 各组冠脉微血管密度比较(表 4,图 3) 与



注:绿色标记的是心肌细胞膜,其面积为心肌细胞横截面积,蓝色标记的是细胞核;箭头所指为心肌细胞膜

图 2 各组心肌细胞横截面积 (WGA, ×400)

表 3 各组心肌细胞横截面积比较 ($\mu\text{m}^2, \bar{x} \pm s$)

组别	n	心肌细胞横截面积
6WC	10	1.67 ± 0.04
6WS	10	1.79 ± 0.04
6WM	10	1.72 ± 0.05
8WC	10	1.81 ± 0.06
8WS	10	1.79 ± 0.06
8WM	10	2.01 ± 0.06* Δ
CM	10	2.05 ± 0.07
BG	10	1.82 ± 0.05 Δ

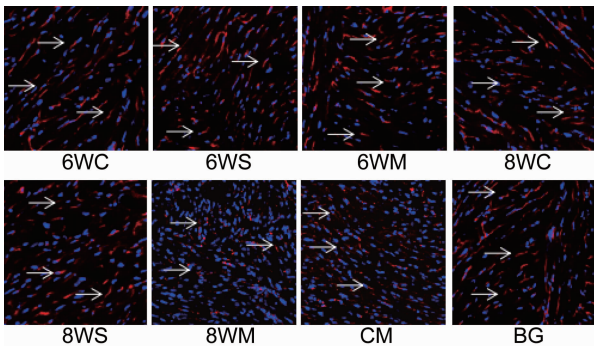
注:与 8WC 组比较,* $P < 0.05$;与 8WS 组比较, $\Delta P < 0.05$;与 8WM 组比较, $\Delta P < 0.05$

6WC 组比较,6WS、6WM、8WC、8WS 组冠脉微血管密度差异无统计学意义($P > 0.05$);与 8WC 和 8WS 组比较,8WM 组冠脉微血管密度减少($P < 0.01$);与 8WM 组比较,CM 组冠脉微血管密度无明

表 4 各组小鼠冠脉微血管密度计数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	微血管密度计数
6WC	10	89.70 ± 0.91
6WS	10	90.40 ± 1.17
6WM	10	89.80 ± 1.25
8WC	10	87.10 ± 1.32
8WS	10	88.30 ± 1.19
8WM	10	57.50 ± 1.72* Δ
CM	10	60.70 ± 1.45
BG	10	80.70 ± 1.18 Δ

注:与 8WC 组比较,* $P < 0.01$;与 8WS 组比较, $\Delta P < 0.01$;与 8WM 组比较, $\Delta P < 0.01$



注:箭头所指为 CD31⁺ 表达

图 3 各组小鼠冠脉微血管 CD31⁺ 表达 (免疫荧光, ×400)

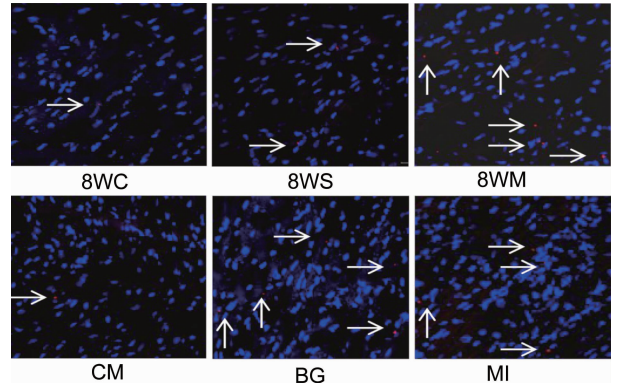
显变化 ($P > 0.05$), BG 组冠脉微血管密度增加 ($P < 0.01$)。

5 各组心肌 CD68⁺ 表达(表 5,图 4) 与 8WC 和 8WS 组比较,8WM 组心肌 CD68⁺ 表达明显增加 ($P < 0.01$);与 8WM 组比较,CM 组心肌 CD68⁺ 表达明显减少($P < 0.01$),BG 和 MI 组 CD68⁺ 表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 5 各组小鼠心肌 CD68⁺ 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CD68 ⁺ 表达数
8WC	10	1.10 ± 0.23
8WS	10	0.90 ± 0.23
8WM	10	4.50 ± 0.27* Δ
CM	10	0.80 ± 0.25 Δ
BG	10	5.00 ± 0.26
MI	10	4.60 ± 0.22

注:与 8WC 组比较,* $P < 0.01$;与 8WS 组比较, $\Delta P < 0.01$;与 8WM 组比较, $\Delta P < 0.01$



注:箭头所指为 CD68⁺ 表达

图 4 各组小鼠心肌 CD68⁺ 表达 (免疫荧光, ×400)

6 各组心肌 miR-155、IL-1 β 、TNF- α 、IL-10、VEGF mRNA 表达比较(表 6) 与 8WC 和 8WS 组比较,8WM 组心肌 IL-1 β 、TNF- α 和 miR-155 mRNA 表达均增加($P < 0.01$);IL-10 和 VEGF mRNA 表达降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。与 8WM 组比较,CM、MI 和 BG 组心肌 IL-1 β 、TNF- α 和 miR-155 mRNA 表达均降低 ($P < 0.01$),CM 组 IL-10、VEGF mRNA 表达差异无统计学意义($P > 0.05$),MI 和 BG 组 IL-10、VEGF mRNA 表

表 6 各组心肌 IL-1 β 、IL-10、TNF- α 、VEGF、miR-155 mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-1 β	IL-10	TNF- α	VEGF	miR-155
8WC	10	1.01 ± 0.06	1.80 ± 0.12	0.77 ± 0.06	3.47 ± 0.11	1.06 ± 0.07
8WS	10	1.06 ± 0.07	1.72 ± 0.13	0.86 ± 0.07	3.46 ± 0.11	0.99 ± 0.07
8WM	10	2.29 ± 0.11* $\Delta\Delta$	1.31 ± 0.13* Δ	2.69 ± 0.10** $\Delta\Delta$	1.49 ± 0.09** $\Delta\Delta$	2.45 ± 0.11** $\Delta\Delta$
CM	10	1.04 ± 0.07 $\Delta\Delta$	1.06 ± 0.09	0.95 ± 0.10 $\Delta\Delta$	1.39 ± 0.10	0.78 ± 0.08 $\Delta\Delta$
BG	10	1.38 ± 0.08 $\Delta\Delta$	1.74 ± 0.14 Δ	1.23 ± 0.11 $\Delta\Delta$	2.79 ± 0.09 $\Delta\Delta$	1.60 ± 0.09 $\Delta\Delta$
MI	10	1.49 ± 0.09 $\Delta\Delta$	1.65 ± 0.10 Δ	1.28 ± 0.10 $\Delta\Delta$	2.66 ± 0.09 $\Delta\Delta$	1.61 ± 0.10 $\Delta\Delta$

注:与 8WC 组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 8WS 组比较, $\Delta P < 0.05, \Delta\Delta P < 0.01$;与 8WM 组比较, $\Delta P < 0.05, \Delta\Delta P < 0.01$

达均增加($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与 MI 组比较, BG 组心肌 IL-1 β 、TNF- α 、IL-10、VEGF 和 miR-155 mRNA 表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。

讨 论

女性绝经后 CMD 高发病率, 被国内外心血管领域学者广泛重视。目前尚无较好的治疗药物及手段, 所以, 探讨绝经后 CMD 的中医药防治, 对绝经后女性心血管病的防治有重要的意义。

CMD 的机制目前尚不完全清楚, 模拟不同发病机制的动物模型在研究疾病发生和药物干预中具有重要作用。目前的动物模型与女性绝经后发生 CMD 存在较大差距^[15]。为研究女性绝经后 CMD 的发病机制及补肾活血方的治疗机理, 本课题组前期研究证实, 补肾活血方治疗女性绝经后 CMD 疗效显著, 能较好的减少心绞痛发作次数, 改善临床症状; 积极改善心电图 ST 段与 T 波形态; 显著提高内皮素-1 水平, 抑制 NO 水平^[6,16]。有研究发现, SD 大鼠去卵巢 60 天后出现微血管损伤, 微血管密度减少, 血清雌激素和一氧化氮水平下降, 内皮素-1 水平升高^[7,8,17]。在此基础上, 本研究选择生长周期短, 经常适用于实验室研究的 C57BL/6 小鼠, 建立模型。参照方喜业主编的《医学实验动物学》^[18]中动物寿命相对表, 推算小鼠可能出现微血管病变的时间为去卵巢后 40 天左右, 故设置去卵巢后 6、8 周两个时间点, 检测小鼠心肌组织结构、微血管密度及心肌收缩功能。结果发现去卵巢 6 周后, 小鼠心肌收缩功能、心肌组织结构、冠脉微血管密度无明显变化; 去卵巢 8 周后, 小鼠心肌组织结构改变, 细胞肿胀变性, 心肌横纹消失, 炎症细胞浸润增多, 心肌细胞肥大, 冠脉微血管密度减少及心肌 LVEF 和 LVFS 值降低, 表明此时小鼠去卵巢 CMD 模型制备成功。该模型模拟了女性绝经后发生 CMD 的病理过程, 但其机制和评价方法仍需进一步研究和完善。

巨噬细胞在心肌内环境稳态中发挥着重要的作用^[19]。巨噬细胞表型 M1/M2 极化是指在不同的刺激因素作用下, 巨噬细胞会形成不同的表型, 在炎症相关疾病中发挥着重要作用^[20]。M1 型巨噬细胞促进炎症反应, 引起组织损伤, 可分泌其标志促炎因子, 如 TNF- α 和 IL-1 β 等^[21]; 同时也会诱使未极化的巨噬细胞向 M1 极化; M2 型巨噬细胞抑制炎症反应, 促进组织修复和再生^[22], 可分泌大量的 IL-10, 并促使未极化的巨噬细胞向 M2 极化^[23]。因此 M1 或 M2 标志炎症因子 mRNA 表达可间接反映 M1 或 M2 型巨噬细胞的数量。为了探讨巨噬细胞 M1/M2 极化在去卵巢小

鼠 CMD 模型中的作用, 本研究清除了模型小鼠心肌组织中的巨噬细胞, 观察相关 mRNA 的表达。结果显示模型小鼠心肌 M1 型巨噬细胞被清除, 心肌收缩功能降低、冠脉微血管损伤未得到改善。所以, 去卵巢小鼠冠脉微血管损伤与巨噬细胞向 M1 极化密切相关。

中医学认为绝经后 CMD 属“胸痹”、“心痛”等范畴, 发病于女性肾精亏虚, 肾阴阳平衡失调之时, 病位在心、病本在肾。补肾活血方由二仙汤化裁而来。方中淫羊藿、仙茅补肾壮阳, 知母、黄柏滋阴泻火清热, 当归补血活血, 葛根、制香附配当归以疏经通络、补血和血, 远志以交通心肾。现已证实, 该复方对去卵巢大鼠冠脉微血管的保护作用, 可能与阻断 NF- κ Bp50 (I κ B α)-IL-1 β 信号通路有关^[8,17]。又有研究表明, 补肾活血方中淫羊藿的主要成分——淫羊藿苷可以诱导 RAW264.7 巨噬细胞系向 M2 型转化^[24]。根据前期研究结果选择含生药 6 g/mL 的剂量给补肾活血组小鼠灌胃^[8], 本研究结果表明, 补肾活血方能够提高去卵巢小鼠冠脉微血管密度, 减少心肌组织结构损伤, 改善心肌收缩功能, 但标志巨噬细胞数量的 CD68⁺ 表达则无影响; 同时, 还可以使心肌 IL-1 β 、TNF- α mRNA 表达降低, IL-10、VEGF mRNA 表达升高。因此, 补肾活血方可能是通过抑制去卵巢 CMD 小鼠心肌组织中的巨噬细胞向 M1 极化, 促进其向 M2 极化, 以抑制冠脉微血管炎症反应的发生发展, 达到修复心肌组织, 改善心肌收缩功能和冠脉微血管形态及功能的目的。

miR-155 是一种内源性非编码小 RNA, 参与多种生理病理反应, 如炎症, 免疫, 肿瘤等^[25]。研究表明, miR-155 高表达会促进炎症的发生发展, 且 miR-155 会抑制巨噬细胞向 M2 型转化^[26]。本研究结果表明, 心肌 miR-155 表达降低, 改变了促炎因子与抑炎因子的比例, 促进了巨噬细胞向 M2 极化, 抑制了 M1 极化, 这有利于抑制炎症的发生发展、改善心肌损伤和 CMD。而且补肾活血方可以降低去卵巢小鼠 CMD 模型心肌 miR-155 mRNA 表达, 因此, 补肾活血方抑制去卵巢小鼠 CMD 模型心肌巨噬细胞向 M1 极化, 促进 M2 极化, 可能与其下调心肌 miR-155 表达有关。

利益冲突: 无。

参 考 文 献

- [1] Pei J, Harakalova M, den Ruijter H, et al. Cardio-renal disease connection during post-menopause: The protective role of estrogen in uremic

- toxins induced microvascular dysfunction [J]. *Int J Cardiol*, 2017, 238: 22–30.
- [2] Kakuta K, Dohi K, Sato Y, et al. Chronic inflammatory disease is an independent risk factor for coronary flow velocity reserve impairment unrelated to the processes of coronary artery calcium deposition [J]. *J Am Soc Echocardiogr*, 2016, 29(2): 173–180.
- [3] Kono Y, Fukuda S, Hanatani A, et al. Remote ischemic conditioning improves coronary microcirculation in healthy subjects and patients with heart failure [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2014, 8: 1175–1181.
- [4] Mills CD, Ley K. M1 and M2 macrophages: the chicken and the egg of immunity [J]. *J Innate Immun*, 2014, 6(6): 716–726.
- [5] Laffont B, Rayner KJ. MicroRNAs in the pathobiology and therapy of atherosclerosis [J]. *Can J Cardiol*, 2017, 33(3): 313–324.
- [6] 汶医宁, 马静, 史凡凡, 等. 补肾活血颗粒治疗绝经后微血管性心绞痛的疗效及其对血清 NO、ET-1 的影响 [J]. *陕西中医*, 2016, 37(8): 987–988.
- [7] 张玉芬, 王玉珍, 赵洁, 等. 补肾活血汤对去卵巢大鼠心脏微血管内皮细胞形态及血清 E₂、ET、NO、PGI₂、TXA₂ 含量的影响 [J]. *现代生物医学进展*, 2014, 14(31): 6044–6049.
- [8] 韩为华, 乔黎焱, 刘镗利, 等. 二仙汤加味对去卵巢大鼠心肌 NF-κBp50、IκBα 的影响 [J]. *中国中医急症*, 2011, 20(9): 1440–1441.
- [9] Lv LL, Tang PM, Li CJ, et al. The pattern recognition receptor, Mincle, is essential for maintaining the M1 macrophage phenotype in acute renal inflammation [J]. *Kidney Int*, 2017, 91(3): 587–602.
- [10] Game X, Roumiguie M, Bouali O, et al. Vaginal lubrication after cervicovaginal stimulation is facilitated by phosphodiesterase type 5 inhibition in ovariectomized mice [J]. *J Sex Med*, 2013, 10(6): 1452–1460.
- [11] Cao H, Huang Y, Wang L, et al. Leptin promotes migration and invasion of breast cancer cells by stimulating IL-8 production in M2 macrophages [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(40): 65441–65453.
- [12] Zhou S, Wang Y, Meng Y, et al. *In Vivo* therapeutic success of microRNA-155 antagonist in a mouse model of lupus alveolar hemorrhage [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2016, 68(4): 953–964.
- [13] Grabner A, Amaral AP, Schramm K, et al. Activation of cardiac fibroblast growth factor receptor 4 causes left ventricular hypertrophy [J]. *Cell Metab*, 2015, 22(6): 1020–1032.
- [14] Weidner N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer [J]. *Am J Pathol*, 1995, 147(1): 9–19.
- [15] 卢健棋, 温志浩. 中医药干预冠脉微循环障碍的研究近况 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2013, 19(5): 597–600.
- [16] 张玉芬, 陈艳秋, 陈钧, 等. 二仙汤加味治疗绝经后微血管性心绞痛疗效观察 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2012, 14(10): 96–98.
- [17] 王玉珍, 刘海涛, 宋欢欢, 等. 补肾活血汤对去卵巢大鼠心肌微血管和 CYP2J3 的影响 [J]. *心脏杂志*, 2015, 25(5): 540–546.
- [18] 方喜业主编. *医学实验动物学* [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1995: 177–178.
- [19] Pinto AR, Godwin JW, Rosenthal NA. Macrophages in cardiac homeostasis, injury responses and progenitor cell mobilisation [J]. *Stem Cell Res*, 2014, 13(3 Pt B): 705–714.
- [20] Edvinsson A, Brann E, Hellgren C, et al. Lower inflammatory markers in women with antenatal depression brings the M1/M2 balance into focus from a new direction [J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2017, 80: 15–25.
- [21] Weisser SB, McLaren KW, Kuroda E, et al. Generation and characterization of murine alternatively activated macrophages [J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 946: 225–239.
- [22] Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions [J]. *Immunity*, 2010, 32(5): 593–604.
- [23] Mulder R, Banete A, Basta S. Spleen-derived macrophages are readily polarized into classically activated (M1) or alternatively activated (M2) states [J]. *Immunobiology*, 2014, 219(10): 737–745.
- [24] 张卫萍, 刘超永, 周娟. 淫羊藿苷对脂蛋白多糖诱导的巨噬细胞 RAW264.7 细胞 M1/M2 炎症表型转化的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2016, 31(10): 4239–4242.
- [25] Elton TS, Selemon H, Elton SM, et al. Regulation of the MIR155 host gene in physiological and pathological processes [J]. *Gene*, 2013, 532(1): 1–12.
- [26] Biethahn K, Orinska Z, Vigorito E, et al. miRNA-155 controls mast cell activation by regulating the PI3Kgamma pathway and anaphylaxis in a mouse model [J]. *Allergy*, 2014, 69(6): 752–762.

(收稿: 2017-06-10 在线: 2018-12-27)

责任编辑: 白霞