

## 甘松对大鼠心肌梗死后交感神经重构的影响\*

唐昱<sup>1</sup> 刘燕锋<sup>1</sup> 詹俊锋<sup>1</sup> 江春媛<sup>1</sup> 祝志云<sup>1</sup> 葛郁芝<sup>1</sup>

**[摘要]** **目的:**探讨甘松对大鼠心肌梗死后交感神经重构的影响。**方法:**将SD大鼠随机分为假手术组、模型组和甘松组,每组15只。采用结扎大鼠左冠状动脉前降支制备心肌梗死模型。免疫组织化学法检测各组大鼠梗死周边区生长相关蛋白43(GAP43)和酪氨酸羟化酶(TH)阳性神经纤维密度。采用程序刺激各实验组大鼠,诱发室性心律失常。检测心肌组织中超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)含量。**结果:**与假手术组比较,模型组阳性神经纤维密度明显增加,室性心律失常诱发率明显升高(均 $P<0.05$ );与模型组比较,甘松组大鼠阳性神经纤维密度降低,室性心律失常诱发率减少(均 $P<0.05$ )。与假手术组相比,模型组大鼠MDA水平增高,SOD活力降低(均 $P<0.05$ );与模型组比较,甘松组大鼠MDA水平降低,SOD活力升高(均 $P<0.01$ )。**结论:**甘松可以有效改善心肌梗死大鼠交感神经重构,预防室性心律失常,其机制可能与改善氧化应激有关。

**[关键词]** 心肌梗死;甘松;交感神经重构

doi:10.13201/j.issn.1001-1439.2016.10.019

**[中图分类号]** R542.2 **[文献标志码]** A

### Effects of nardostachyos on cardiac sympathetic nerve remodeling after myocardial infarction in rats

TANG Yu LIU Yanfeng ZHAN Junfeng JIANG Chunyuan ZHU Zhiyun GE Yuzhi  
(Department of Cardiology, Jiangxi Provincial People's Hospital, Nanchang, 330006, China)

**Abstract Objective:** To investigate the effects and the mechanism of nardostachyos on cardiac sympathetic nerve remodeling after myocardial infarction in rats. **Method:** SD rats were randomly divided into sham group, model group and nardostachyos group (15 in each group). Left anterior descending coronary artery was ligated to creat myocardial infarction model. Immunohistochemical technique was used to detect the distribution and density of growth associated protein-43 (GAP-43) and tyrosine hydroxylase (TH) positive staining nerve fibers at peri-infarct zone after myocardial infarction. The procedure was used to stimulate rats to induce ventricular arrhythmias. The content of heart tissue malondialdehyde (MDA) and the activity of the superoxide dismutase(SOD) were detected. **Result:** Compared with sham group, the densities of both GAP-43 and TH positive staining nerve fibers and the incidence of ventricular arrhythmias were significantly higher in model group. Nardostachyos markedly reduced the incidence of ventricular arrhythmias and the densities of both GAP-43 and TH positive staining nerve fibers(all  $P<0.05$ ). Compared with sham group, the activity of MDA the modle group increased, the activity of SOD decreased significantly, nardostachyos markedly reduced the activity of MDA and increased the activity of SOD of model group (all  $P<0.05$ ). **Conclusion:** The amelioration of oxidative stress by nardostachyos may attribute to the improvement in cardiac sympathetic nerve remodeling and the reduction of the ventricular arrhythmia.

**Key words** myocardial infarction; nardostachyos; sympathetic nerve remodeling

研究表明,心肌梗死后心脏交感神经重构不仅使神经分布不均一,而且使局部心室跨室壁复极离散度增加,促进心肌梗死后恶性心律失常的发生,是猝死发生的重要机制<sup>[1-2]</sup>。因此,改善交感神经重构是降低心血管疾病致死和致残率的关键。甘松,又名甘松香,具有抗心肌缺血和抗心律失常等多种药理功效<sup>[3]</sup>。本文通过结扎左冠状动脉(冠脉)前降支制备大鼠心肌梗死模型,旨在探讨甘松对心肌梗死后交感神经重构的影响及其可能机制。

#### 1 材料与方法

##### 1.1 动物模型建立和分组

将45只雄性SD大鼠(由南昌大学医学院实验动物科学部提供)随机分为:假手术组、模型组和甘松组。模型组和甘松组制作心肌梗死模型:开胸暴露心脏,用6/0的细针穿线结扎前降支。假手术组在相同部位仅穿线但不结扎。甘松组术后第1天即给予甘松煎剂(含原药10g)灌胃,模型组和甘松组给予相应量0.9%氯化钠溶液,共12周。

##### 1.2 室性心律失常的诱发

将1对针形电极间隔3mm插入心肌梗死的周边区域,应用心脏程序刺激仪进行S1S1定数和S1S2程序刺激,计算并分析各实验组室性心律失

\* 基金项目:江西省卫生厅基金项目(No:20165012)

<sup>1</sup>江西省人民医院心内科 江西省心血管病研究所(南昌, 330006)

常的诱发率。

### 1.3 心肌标本的留取

术后第12周,处死各实验大鼠迅速取出心脏,用0.9%氯化钠溶液冲洗,取0.6 cm×0.8 cm大小的左心室梗死周边区的心肌置于4%甲醛中固定1 h,然后置于70%乙醇中保存。

### 1.4 免疫组织化学检测

取甲醛固定的心肌组织,酒精脱水,石蜡包埋制成蜡块,切片成3 μm。按照试剂盒步骤进行操作,一抗采用生长相关蛋白43(GAP-43)抗体和小鼠抗酪氨酸羟化酶(TH)抗体,二抗采用SP抗体,DAB显色,复染,封片。神经密度采用计算机图像处理系统和Image-Pro Plus5.0软件进行定量测定和分析。

### 1.5 心肌组织MDA、SOD活性测定

取左心室梗死周边区组织,按1:10制成10%匀浆,4℃下3 000×g离心15 min,取上清待测。按照试剂盒说明书进行操作,采用硫代巴比妥酸法测定丙二醛(MDA)活性,采用黄嘌呤氧化酶法测心肌组织中超氧化物歧化酶(SOD)活性。

### 1.6 统计学处理

采用SPSS15.0统计软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间采用单因素方差分析比较,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 室性心律失常的诱发

与假手术组比较,模型组室性心律失常诱发率明显增多(87.1%:19.3%, $P < 0.05$ )。与模型组比较,甘松组室性心律失常诱发率明显减少(28.4%:81.1%, $P < 0.05$ )。

### 2.2 各实验组神经纤维密度情况

与假手术组比较,模型组阳性神经纤维密度明显增多;与模型组比较,甘松组阳性神经纤维密度显著降低(均 $P < 0.05$ )。见表1。

表1 各组神经纤维密度值

Table 1 density of nerve fibers

组别	$\mu\text{m}^2/\text{mm}^2, \bar{x} \pm s$	
	GAP43	TH
假手术组(15只)	1 568±209	1 279±301
模型组(15只)	5 014±301 <sup>1)</sup>	3 949±229 <sup>1)</sup>
甘松组(15只)	3 458±172 <sup>2)</sup>	2 160±170 <sup>2)</sup>

与假手术组比较,<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>2)</sup> $P < 0.05$ 。

### 2.3 甘松对心肌梗死大鼠MDA、SOD浓度的影响

与假手术组比较,模型组大鼠心肌组织匀浆中MDA水平增高,SOD活力降低(均 $P < 0.01$ );与模型组比较,甘松组大鼠心肌组织MDA水平降

低,SOD活力升高(均 $P < 0.01$ )。见表2。

表2 各组心肌组织MDA含量和SOD活力测定

Table 2 MDA content and SOD activity in cardiac tissue

组别	$\bar{x} \pm s$	
	MDA /(nmol·mg <sup>-1</sup> )	SOD /(U·mg <sup>-1</sup> )
假手术组(15只)	41±2	116±10
模型组(15只)	72±5 <sup>1)</sup>	62±3 <sup>1)</sup>
甘松组(15只)	48±7 <sup>2)</sup>	95±9 <sup>2)</sup>

与假手术组比较,<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>2)</sup> $P < 0.05$ 。

## 3 讨论

心肌梗死后会伴随交感神经出芽和过度再生,以梗死周边区域最明显,称为“交感神经重构”<sup>[4]</sup>。研究表明,交感神经重构引起交感神经的空间分布和密度发生改变,是心肌梗死后恶性心律失常和猝死的主要机制<sup>[5]</sup>。GAP43是反映神经生长的重要指标,可反映神经生长的范围和密度;TH是肾上腺素合成过程中的关键酶,分布在肾上腺素能神经轴突的胞质中,其阳性神经水平可反映心室总体神经元和交感神经水平<sup>[6-7]</sup>。在本研究中,采用结扎大鼠左冠脉前降支制备成心肌梗死模型,运用免疫组织化学法检测各组大鼠梗死周边区GAP43和TH阳性神经纤维密度发现,与假手术组相比较,模型组GAP43和TH阳性神经纤维密度明显增多。研究表明,氧化应激在心肌梗死后的交感神经重构方面发挥着重要的作用。目前主要认为氧化应激导致的细胞损伤可激活体内炎症反应,诱导神经细胞自身和附近的炎性细胞合成神经生长因子,进而促进交感神经的重新生长和分布,即交感神经重构<sup>[8]</sup>。在本实验中,与假手术组相比,心肌梗死模型组大鼠心肌组织中MDA水平增高,SOD活力降低,差异具有统计学意义,这与研究报道一致。

交感神经重构引起交感神经活性亢进,心肌细胞长期处于高浓度去甲肾上腺素的作用下,心肌兴奋性增加,同时,交感神经分布紊乱引起局部心肌动作电位时程和不应期产生时间和空间上的一致,心室颤动阈值明显降低,导致临床工作中常见的恶性心律失常<sup>[9]</sup>。在本研究心肌梗死模型中,通过应用程序刺激各实验组心肌,发现与假手术组比较,模型组室性心律失常诱发率明显增多,这说明在心肌梗死后的慢性期中,在心肌结构发生病理改变的基础上,神经重构和电重构相互影响,可促进室性心律失常和猝死的发生。

心肌梗死后交感神经重构的防治策略成为近年来的研究热点<sup>[10]</sup>。近年来随着交感神经重构致心律失常作用的发现,其与心脏组织重构的相互关

系日益被重视,并提出了对交感神经重构进行干预的设想,如果能在心肌梗死早期就采取积极有效的方法改善心肌重构,就有可能对防止室性心律失常和猝死的发生产生积极作用。许多临床试验也提示完整交感神经结构与功能的重要性, $\beta$ 受体阻滞剂是目前证实预防心肌梗死后猝死最有效的药物之一<sup>[11]</sup>。胺碘酮减少心力衰竭患者室性心律失常的作用,也可能与改善交感神经末梢功能有关<sup>[12]</sup>。这些说明交感神经功能的直接干预有可能是将来室性心律失常治疗的一个新方向。人们在长期的临床实践中,发现许多中药在抗心律失常和预防心脏猝死等方面具有独特的功效<sup>[13]</sup>。甘松具有活血通络、温中散寒、理气止痛等功能,现代药理研究结果表明甘松具有中枢抑制、抗心律失常、抗心肌缺血、调节血压等多种功效<sup>[14]</sup>。张旭等<sup>[15]</sup>首次研究了运用水提醇沉淀得到的甘松多糖,发现其抗氧化能力极高,其浓度与抗氧化活性呈现一定的量效关系。目前研究资料表明,氧化应激可以直接导致心肌梗死后心肌交感神经的损害和失神经支配,促使神经萌芽,促进交感神经过度增生<sup>[16]</sup>。有关甘松干预心肌梗死后交感神经重构的研究目前尚未见相关的报道。在本研究中,与模型组比较,甘松组大鼠心肌组织 MDA 水平降低,SOD 活力升高,提示甘松有效降低了心肌梗死心肌氧化应激水平,减轻了心肌细胞的氧化损伤。与模型组比较,甘松组 GAP43 和 TH 阳性神经纤维密度显著降低,室性心律失常诱发率也明显减少,进一步证明了甘松抗心律失常的作用。因此,笔者分析甘松可能通过改善心肌梗死后氧化应激,抑制心肌梗死后心肌周围区交感神经轴突的再生,从而改善心肌梗死大鼠交感神经重构,这对于维护心肌电生理的稳定性和对抗心肌梗死后恶性心律失常的发生发挥着重要作用。

综上所述,甘松可以改善心肌交感神经重构,这为交感神经重构的预防和治疗提高了新的治疗靶点,为科学评价甘松的药理作用提供了理论依据,但甘松组成成份独立的药理作用还需要进一步深入研究。

#### 参考文献

- [1] AJIJOLA O A, YAGISHITA D, PATEL K J, et al. Focal myocardial infarction induces global remodeling of cardiac sympathetic innervation: neural remodeling in a spatial context[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2013, 305: 1031–1040.
- [2] GARZA M A, WASON E A, ZHANG J Q. Cardiac remodeling and physical training post myocardial infarction[J]. *World J Cardiol*, 2015, 7: 52–64.
- [3] 张盼,程光宇,程为平. 浅谈甘松的临床应用[J]. *中医药学报*, 2015, 43(2): 99–100.
- [4] MELONI M, CESSSELLI D, CAPORALI A, et al. Cardiac Nerve Growth Factor Overexpression Induces Bone Marrow-derived Progenitor Cells Mobilization and Homing to the Infarcted Heart[J]. *Mol Ther*, 2015, 23: 1854–1866.
- [5] 唐昱,盛国太,葛郁芝,等. 丹参酮 IIA 对豚鼠肥厚心肌延迟整流钾通道的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2012, 28(2): 234–238.
- [6] GAUTHIER-KEMPER A, IGAEV M, S NDERMANN F, et al. Interplay between phosphorylation and palmitoylation mediates plasma membrane targeting and sorting of GAP43[J]. *Mol Biol Cell*, 2014, 25: 3284–3299.
- [7] LEHMANN L H, ROSTOSKY J S, BUSS S J, et al. Essential role of sympathetic endothelin A receptors for adverse cardiac remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A*[J]. 2014, 111: 13499–13504.
- [8] CHEN P S, CHEN L S, FISHBEIN M C, et al. role of the autonomic nervous system in atrial fibrillation: pathophysiology and therapy[J]. *Circ Res*, 2014, 114: 1500–1515.
- [9] YU Y, WEI C, LIU L, et al. Atrial fibrillation increases sympathetic and parasympathetic neurons in the intrinsic cardiac nervous system[J]. *Pacing Clin Electrophysiol*, 2014, 37: 1462–1469.
- [10] WANG H J, WANG W, CORNISH K G, et al. Cardiac sympathetic afferent denervation attenuates cardiac remodeling and improves cardiovascular dysfunction in rats with heart failure[J]. *Hypertension*, 2014, 64: 745–755.
- [11] WANG Y, LIU J, SUO F, et al. Metoprolol-mediated amelioration of sympathetic nerve sprouting after myocardial infarction[J]. *Cardiology*, 2013, 126: 50–58.
- [12] ELDSTROM J, WANG Z, WERRY D, et al. Microscopic mechanisms for long QT syndrome type 1 revealed by single-channel analysis of I(Ks) with S3 domain mutations in KCNQ1[J]. *Heart Rhythm*, 2015, 12: 3863–3894.
- [13] 张莉,汪莲开,陈世键,等. 参松养心胶囊对糖尿病大鼠心房重构及心律失常的影响[J]. *中成药*, 2015, 37(12): 2573–2578.
- [14] 李先进,蒋树中,李为东,等. 甘松对心脏腔内电生理影响的研究[J]. *中国综合临床*, 2010, 26(11): 1136–1138.
- [15] 张旭,兰州,董小萍,等. 甘松有效成分研究[J]. *中药材*, 2007, 22(1): 27–28.
- [16] 辛平,魏盟,黄石安,等. 阿托伐他汀对急性心肌梗死大鼠交感神经重构的影响[J]. *临床心血管病杂志*, 2010, 26(5): 385–388.

(收稿日期:2016-02-18 修回日期:2016-04-25)