DOI:10.16016/j.1000-5404.201409150

论著

芒果苷联合卸负荷改善压力超负荷大鼠心室肥厚

邹书帆,焦蔡领,蹇 朝,肖颖彬,唐富琴,陈 林 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院全军心血管外科研究所)

[摘要] **目的** 通过卸负荷及药物干预相结合建立大鼠胸骨上小切口缩窄及松解模型,探讨芒果苷对大鼠压力超负荷后卸负荷的心室肥厚转归的影响。**方法** 选用5周龄、体质量150~180 g雄性SD大鼠48只,行非人工通气下胸骨上小切口升主动脉缩窄术致大鼠左心室肥厚,利用单一去缩窄以及去缩窄联合应用芒果苷干预方法,将所有存活动物随机分为假手术组、超负荷组(升主动脉缩窄6周)、卸负荷组(升主动脉缩窄术后6周后松解4周)以及芒果苷组[缩窄术后6周后松解,松解术后以芒果苷干预4周,20 mg/(kg·d).i.g],通过心肌大体标本、动物超声心动图,病理学染色比较大鼠在此过程中的心脏形态、质量,左室壁厚度及心肌病理学改变。**结果** 与假手术组相比,超负荷组心肌左室后壁收缩期厚度(4.25±0.43)mm、舒张期厚度(2.89±0.42)mm及室间隔收缩期厚度(3.92±0.71)mm、舒张期厚度(2.59±0.49)mm显著增厚($P<0.01$),心脏体积增大、心脏质量体质量比(4.44±0.77)mg/g明显升高($P<0.01$)、心肌细胞排列紊乱,胞质增多,间质纤维化明显。卸负荷后左室后壁收缩期厚度(3.85±0.56)mm、舒张期厚度(2.47±0.52)mm及室间隔收缩期厚度(3.81±0.53)mm、舒张期厚度(2.51±0.54)mm有一定程度的改善,但不明显。心脏体积减小、心脏质量体质量比(3.03±0.18)mg/g降低($P<0.01$)、心肌细胞体积缩小但排列紊乱,间质纤维化程度无明显减轻。芒果苷联合卸负荷干预后较单一卸负荷组左室后壁收缩期厚度(2.80±0.37)mm、舒张期厚度(1.94±0.27)mm,室间隔收缩期厚度(2.90±0.51)mm、舒张期厚度(1.89±0.38)mm及心脏质量体质量比(2.32±0.33)mg/g改善明显($P<0.01$),心脏体积进一步减小,心肌细胞体积缩小且排列规则,间质纤维化程度有一定改善。**结论** 芒果苷联合卸负荷可显著改善超负荷大鼠心室肥厚。

[关键词] 卸压力负荷;芒果苷;左心室肥厚
[中图法分类号] R542.205;R965;R972.9 [文献标志码] A

Reversal effect of mangiferin combined with pressure unloading on left ventricular hypertrophy in rats

Zou Shufan, Jiao Cailing, Jian Zhao, Xiao Yingbin, Tang Fuqin, Chen Lin (Institute of Cardiaouascular Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the reversal effect of mangiferin combined with pressure unloading on left ventricular hypertrophy (LVH) through the pressure overload-unload model of rats. **Methods** The pressure overload-induced LVH rat model was established by aortic coarctation. All surviving rats were randomly divided into a sham group, an overload group (ascending aorta coarctation for 6 weeks), an unload group (release of aorta coarctation for 4 weeks) and a mangiferin group (aorta coarctation release combined with 20 mg/(kg·d), i.g. mangiferin gavage for 4 weeks 3. The myocardial gross specimen, animal echocardiography and myocardial pathological staining were used to observe the heart appearance, heart mass, left ventricular thickness and myocardial pathological changes. **Results** Compared with the sham

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81170216)
[通信作者] 陈 林,电话:(023)68774107,E-mail: chenlin_xwk@yahoo.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141208.1431.021.html (2014-12-08)

group, the left ventricular posterior wall thickness in systole (LVPWs, 4.25 ± 0.43 mm), left ventricular posterior wall thickness in distole (LVPWd, 2.89 ± 0.42 mm), interventricular septal thickness in systole (IVSs, 3.92 ± 0.71 mm), interventricular septal thickness in diastole (IVSd, 2.59 ± 0.49 mm), heart size, heart weight, and heart weight/body weight (HW/BW, 4.44 ± 0.77 mg/g) were increased obviously in the overload group ($P < 0.01$), and meanwhile, myocyte disarray, increased cytoplasm, and interstitial fibrosis appeared in pathological staining. In the unload group, LVPWs (3.85 ± 0.56 mm), LVPWd (2.47 ± 0.52 mm), IVSs (3.81 ± 0.53 mm), and IVSd (2.51 ± 0.54 mm) were improved to a certain extent, and the heart size, heart weight and HW/BW (3.03 ± 0.18 mg/g) decreased ($P < 0.01$) compared with overload group. Pathological staining of the unload group demonstrated that myocardial cells were shrunk and disorganized, and interstitial fibrosis was not significantly alleviated. In the mangiferin group, the LVPWs (2.80 ± 0.37 mm), LVPWd (1.94 ± 0.27 mm), IVSs (2.90 ± 0.51 mm), IVSd (1.89 ± 0.38 mm), HW/BW (2.32 ± 0.33 mg/g) further decreased compared with the unload group ($P < 0.01$), and pathology staining showed that myocardial cells showed obvious shrinkage and regular arrangement, and interstitial fibrosis was slightly alleviated. **Conclusions** Mangiferin combined with pressure unloading has significant reversal effect on the pressure overload-induced LVH rats.

[**Key words**] pressure unloading, mangiferin, left ventricular hypertrophy

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81170216); Corresponding author: Chen Lin, Tel: 86-23-68774107, E-mail: chenlin_xwk@yahoo.com

风湿性主动脉瓣狭窄是临床常见的导致左心室超负荷的疾病,左心室肥厚是心脏对压力超负荷的适应性反应[1],手术行主动脉瓣膜置换术是典型的卸负荷过程。但在临床实践过程中,通过手术解除心室负荷并不能使所有患者左心室肥厚得到有效的改善[2]。

芒果苷是从芒果属籼稻的茎秆和树叶中提取出来的一种活性物质,属双苯吡酮类黄酮类化合物[3]。前期研究表明,芒果苷对心肌缺血再灌注损伤有保护作用[4]。本研究结合前期研究,建立大鼠主动脉瓣上缩窄[5]-松解模型,探寻芒果苷在逆转卸负荷后左心室肥厚的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

选用5周龄SPF级雄性SD大鼠48只,体质量150~180 g,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供,第三军医大学新桥医院实验动物中心喂养。金属棍(直径为1.4 mm),4/0 Prolene线,芒果苷(mangiferin from mangifera indica bark) SIGMA-ALDRICH,小动物超声机(VEVO 2100 Imaging system),显微图像采集系统(Leica DMIRB),三溴乙醇SIGMA-ALDRICH等试剂。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 实验动物随机分为4组,每组12只。①假手术组:行假缩窄及松解术,即开胸分离出升主动脉后关胸,并在6周后植物油2 mL灌胃,1次/d,连续4周。②超负荷组:SD大鼠升主动脉缩窄6周;③卸负荷组:SD大鼠行升主动脉缩窄术后6周后松解,松解术后植物油2 mL灌胃,1次/d,连续4周;④芒果苷组:SD大鼠行升主动脉缩窄术后6周后松解,松解术后以20 mg/kg芒果苷溶解于2 mL植物油中灌胃[4],1次/d,连续4周。

1.2.2 大鼠非人工通气下主动脉瓣上缩窄-松解模型制备 参照文献[5]:大鼠经三溴乙醇常规麻醉后,仰卧位固定。暴露气管,沿气管向下扩大切口分离胸腺暴露升主动脉。用4/0 Prolene线环绕于主动脉根部,将1.4 mm不锈钢丝置于丝线与主动脉之间,以制造出主动脉狭窄50%后撤出钢丝,逐层关胸。去缩窄术手术路径与缩窄术相同,剪开胸骨后仔细寻找结扎线头,并从线头追踪升主动脉结扎部位,用眼科剪剪掉结扎线,即可完成松解。松解后仔细检查升主动脉周围组织,确认对其无粘连压迫后,分层关闭切口。各组大鼠术后行超声心动图检查,以明确缩窄术及松解术的有效性。

1.2.3 超声心动图检查 主动脉缩窄术后6周及松解术后4周,异氟烷麻醉老鼠后仰卧位固定,胸前区备皮,使用探头频率21 MHz的小动物超声机(VEVO 2100 Imaging system)检测收缩期左室后壁厚度(LVPWs)、舒张期左室后壁厚度(LVPWd)、收缩期室间隔厚度(IVSs)、舒张期室间隔厚度(IVSd)、左室舒

张末内径(LVIDd)、左室收缩末内径(LVIDs)[6-8]。

1.2.4 心脏质量测定 各组观察到期后称量大鼠体质量(body weight,BW),采用断颈法处死并迅速开胸取出心脏,剪除多余血管及脂肪组织,用 4 ℃ PBS(中性磷酸盐)缓冲液冲洗干净心腔内残留血液,滤纸吸干后电子天平称取心脏质量(heart weight,HW)[9]并计算心脏质量与体质量比值(HW/BW)。

1.2.5 心肌组织病理学检测 取心脏经福尔马林溶液固定 36 h,经脱水透明处理后石蜡包埋切片,分别行 HE 及 Masson 染色,用显微图像采集系统(Leica DMIRB)观察心肌改变并采图。

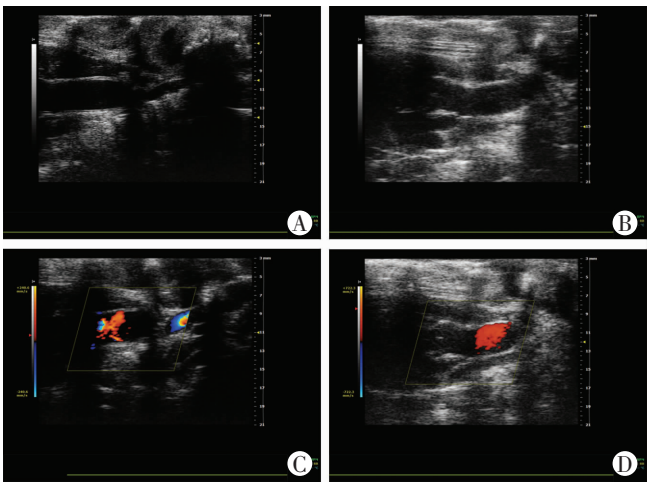
1.3 统计学方法

实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 SPSS 13.0 统计软件,各组采用单因素方差分析方法进行比较分析。

2 结果

2.1 手术情况

升主动脉缩窄术后死亡 6 只大鼠,死亡率 16.7%;剩余 30 只大鼠分为 3 组,其中一组设为超负荷组,另两组行松解术,术后死亡 4 只,死亡率 20.0%;建模完成后假手术组 12 只大鼠、超负荷组 10 只大鼠、卸负荷组及芒果苷组各 8 只大鼠。超声心动图可见大鼠主动脉瓣上缩窄术后升主动脉明显缩窄,且该缩窄部位血流紊乱,出现湍流;而卸负荷后升主动脉未见明显缩窄部位,提示缩窄部位消失,血流恢复层流(图 1);即大鼠左室超负荷及卸负荷模型均成功建立并具有研究意义。

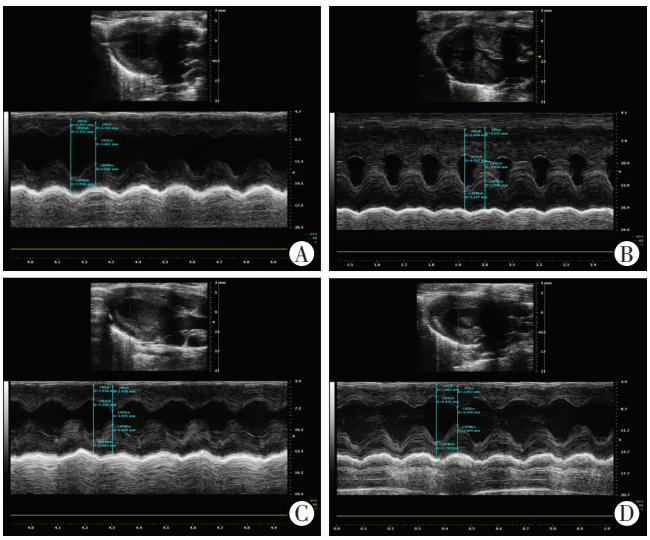


A:超负荷大鼠升主动脉缩窄部位;B:卸负荷大鼠升主动脉缩窄处消失;C:超负荷大鼠升主动脉缩窄部位血液湍流;D:卸负荷大鼠升主动脉处血液恢复层流

图 1 超-卸负荷大鼠心脏超声心动图缩窄部位及血流动力学检查

2.2 各组大鼠 M 型超声心动图检查

主动脉去缩窄术后 4 周超声心动图显示:与假手术组(图 2A)相比,超负荷组(图 2B)、卸负荷组(图 2C)的左室后壁厚度(LVPW)、室间隔厚度(IVS)明显增厚($P<0.05$),室壁回声显著增强,而芒果苷组(图 2D)则无明显差异,;与超负荷组比较,卸负荷组左室后壁舒张末厚度(LVPWd)有较明显减小($P<0.05$),左室后壁收缩末厚度(LVPWs)、IVS 虽有减小,但差异无统计学意义,而芒果苷组的 LVPW、IVS 有较为显著的减小($P<0.01$);与卸负荷组相比,芒果苷组的 LVPW、IVS 恢复更为明显($P<0.01$)。各组左室舒张末内径(LVIDd)、左室收缩末内径(LVIDs)稍有差异,但差异无统计学意义。见表 1。

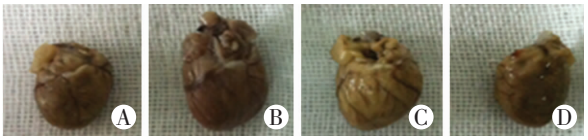


A:假手术组;B:超负荷组;C:卸负荷组;D:芒果苷组

图 2 各组大鼠 M 型超声心动图左心室厚度检查

2.3 心脏大体形态

各组观察到期后,大鼠心脏体积与 HW/BW 如下:与假手术组(图 3A)相比,超负荷组(图 3B)、卸负荷组(图 3C)心脏体积以及心脏质量与体质量比(HW/BW)明显增大($P<0.01$),而芒果苷组(图 3D)则无明显差异;与超负荷组比较,卸负荷后心脏体积有一定程度减小,HW/BW 有显著的缩小($P<0.01$);与卸负荷组相比,芒果苷组心脏体积以及 HW/BW 也有一定程度的缩小($P<0.01$,表 2)。



A:假手术组; B:超负荷组;C:卸负荷组; D:芒果苷组

图 3 各组大鼠心脏大体形态外观

表1 各组大鼠超声心动图检测指标比较（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	LVPWs(mm)	LVPWd(mm)	IVSs(mm)	IVSd(mm)	LVIDs(mm)	LVIDd(mm)
假手术组	12	2.87±0.36	1.95±0.43	2.62±0.53	1.62±0.41	3.10±0.71	5.61±0.64
超负荷组	10	4.25±0.43[a]	2.89±0.42[a]	3.92±0.71[a]	2.59±0.49[a]	3.11±1.42	5.63±1.07
卸负荷组	8	3.85±0.56[a]	2.47±0.52[ab]	3.81±0.53[a]	2.51±0.54[a]	2.86±0.54	5.81±0.61
芒果苷组	8	2.80±0.37[cd]	1.94±0.27[cd]	2.90±0.51[cd]	1.89±0.38[cd]	3.11±0.70	5.80±0.89

a:$P<0.05$,与假手术组比较;b:$P<0.05$,与超负荷组比较;c:$P<0.01$,与超负荷组比较;d:$P<0.01$,与卸负荷组比较

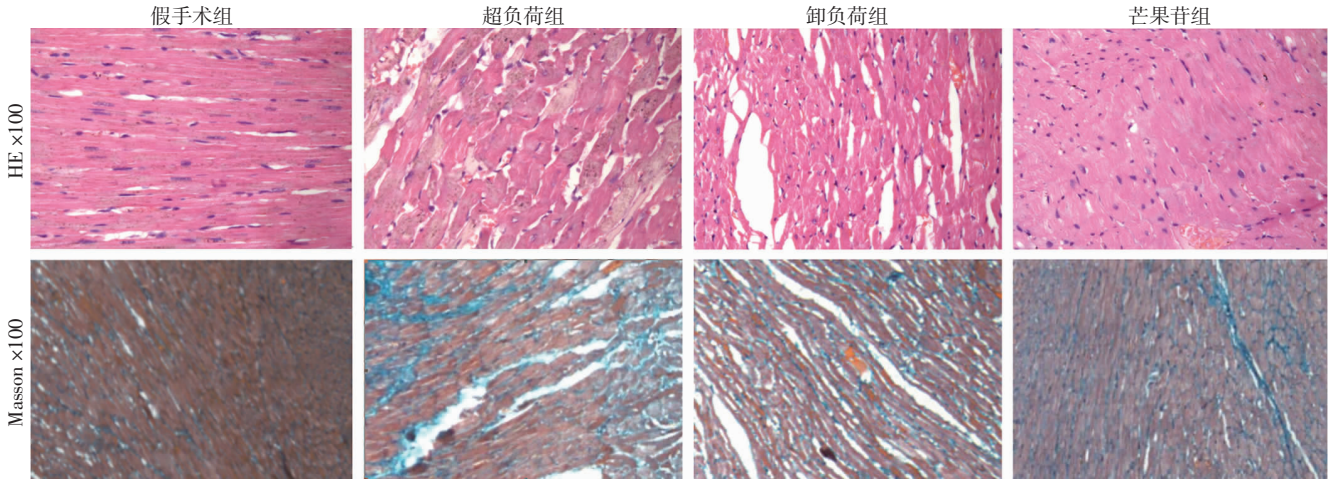


图4 各组大鼠心肌组织病理学检查

表2 各组大鼠心脏质量检测指标比较（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	BW（g）	HW（g）	HW/BW(mg/g)
假手术组	12	455.50±24.42	1.06±0.15	2.32±0.27
超负荷组	10	358.00±16.67	1.59±0.30[a]	4.44±0.77[a]
卸负荷组	8	440.50±22.82	1.34±0.14[ab]	3.03±0.18[ab]
芒果苷组	8	458.50±29.56	1.06±0.19[bc]	2.32±0.33[bc]

a:$P<0.05$,与假手术组比较;b:$P<0.05$,与超负荷组比较;c:$P<0.01$,与卸负荷组比较

2.4 心肌组织病理学观察

HE染色可见,与对照组相比,左室超负荷6周后,心肌细胞直径明显增粗,体积变大,胞质明显增多,细胞间距增加,排列不规则,细胞核深染;与超负荷组相比,卸负荷组心肌细胞体积变小,但排列仍疏松紊乱;与卸负荷组相比,芒果苷组心肌细胞体积进一步变小,排列更加紧密规则(图4)。Masson染色可见左室超负荷6周后心肌间质胶原纤维增生明显,卸负荷组心肌间质纤维化程度改善不明显,芒果苷组心肌间质纤维化一定程度的改善(图4)。

3 讨论

心室肥厚是在各种机械应力、代谢和遗传的因素作用下产生的以细胞质增多、细胞间基质成分增加和细胞超微结构改变等为特征的心肌细胞适应性改变。而左室超负荷疾病是引起左心室肥厚的重要因素之一。风湿性主动脉瓣狭窄是临床常见的导致左心室超负荷的疾病,通过手术行主动脉瓣膜置换术典型的卸负荷过程。但在临床实践过程中,手术解除心室负荷并不能使所有患者左心室肥厚得到有效的逆转。Stansfield等[10]通过缩窄主动脉弓建成左心室压力超负荷模型,对肥厚左心室全基因组的检测表明,超负荷过程中有288个基因表达发生了变化,而去压力负荷心肌肥厚逆转过程中有265个基因不同,两个过程仅有23个基因相同,提示超负荷的心肌肥厚发展过程和去负荷后的逆转过程各有特点。在大鼠心室超负荷致心肌肥厚再去负荷的过程中,研究发现心肌细胞内应激相关的激酶如P42/44 MAPK、Akt、GSK3β和NF-κB等的活性下降,但是P38 MAPK活性并未下降[2],提示持续活化的P38 MAPK可能是导致去负荷后心室肥厚恢复不良的原因之一。最新的研究[11]发现,在培养出的心肌细胞中加入两种不同的P38 MAPK特异性抑制剂SB203580和SB202190,对于任何一种抑制剂,均减弱了心肌细胞的肥大反应。我们前期研究[4]表明,芒果苷可通过抑制P38 MAPK途径有效改善缺血再灌注后心室重塑的发生发展。因此,本实验在前期研究基础上,探讨外科手术结合药物干预途径对压力超负荷后心室肥厚的逆转作用。

首先,我们建立大鼠非人工通气下升主动脉瓣上缩窄-松解模型,该模型有效的模拟了临床上主动脉瓣置换术前后的左室超负荷、卸负荷过程,研究表明升主动脉缩窄6周可致大鼠左心室肥厚[5]。在左室超负荷模型的建立过程中,大鼠死亡6只,存活率为83.2%;其中1只损伤升主动脉壁导致出血过多而死,另五只

在剪开胸骨及之后游离升主动脉时出现深快呼吸后逐渐停止呼吸,考虑不慎损伤胸膜导致气胸而死。去缩窄过程中大鼠死亡4只,存活率为80.0%;其中4只均死于分离过程中损伤大血管导致的出血过量。由于大鼠胸骨较窄,剪开过程中极易发生偏移,损伤胸膜,因此气胸为缩窄过程中的主要死因。去缩窄因二次手术,胸膜增生粘连,反而减少了气胸的发生率,但由于新生毛细血管密集,正常解剖结构不清晰,因而出血过多为主要死因。

其次,本实验从大体标本形态,动物超声心动图以及病理学染色均证明了卸负荷对超负荷大鼠的左心室肥厚有一定程度的改善作用。但与对照组相比,卸负荷组LVPWS、LVPWd、IVSs、IVSd、心脏质量(BW)与心脏质量体质量比(HW/BW)仍明显大于对照组($P<0.01$);HE染色可见卸负荷组心肌细胞体积较卸负荷前有明显的恢复,但排列疏松紊乱。Masson染色可见单纯卸负荷对压力超负荷导致的心肌纤维化改善不明显。因此,单一去缩窄对改善超负荷后所致心室肥厚有一定效果,但不彻底、不完善。

芒果苷(mangiferin)作为一种有药理作用的植物活性物质,有研究显示其具有抗炎[12]、抗氧化[13]、抗病毒[14]等作用。我们前期研究[4,15]表明,芒果苷有助于心肌保护及改善心血管紊乱的功能。本实验在超负荷大鼠模型卸负荷后联合芒果苷[20 mg/(kg·d),i.g.]进行干预,并在4周后与单一卸负荷的超负荷模型大鼠进行对比研究,结果显示,与单一卸负荷相比,联合芒果苷干预能更有效的降低超负荷大鼠的心脏体积、质量及心脏质量体质量比($P<0.01$),超声心动图提示芒果苷组左室后壁厚度($P<0.01$)及室间隔厚度($P<0.01$)较卸负荷组均减小,与心脏质量及心脏质量体质量比具有一致性。而左室内径(LVIDs、LVIDd)各组之间无统计学差异可能是由于此时心脏尚处于向心性肥厚的代偿期阶段,还未出现失代偿期的离心性肥厚。HE染色可见芒果苷组较单一卸负荷组心肌细胞的排列更加紧密、规则。对于超负荷后的心肌间质胶原沉积,卸负荷后改善并不明显,而芒果苷组一定程度上减轻了其纤维化程度,这可能是与逆转纤维化时间较长有关。

参考文献:

[1] Bernardo B C, Weeks K L, Pretorius L, *et al*. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies [J]. Pharmacol Ther, 2010, 128(1): 191-227.

[2] Xu R, Lin F, Zhang S, *et al*. Signal pathways involved in reverse remodeling of the hypertrophic rat heart after pressure unloading[J]. Int J Cardiol, 2010, 143(3): 414-423.

[3] Wang H L, Li C Y, Zhang B, *et al*. Mangiferin facilitates islet regeneration and β-cell proliferation through upregulation of cell cycle and β-cell regeneration regulators[J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(5): 9016-9035.

[4] Zheng D, Hou J, Xiao Y, *et al*. Cardioprotective effect of mangiferin on left ventricular remodeling in rats [J]. Pharmacology, 2012, 90(1/2): 78-87.

[5] 马杰, 余杨, 蹇召, 等. 胸骨上小切口大鼠主动脉瓣上缩窄模型的建立[J]. 中华实验外科杂志, 2014, 31(5): 1147-1149.

[6] Nakamura A, Rokosh D G, Paccanaro M, *et al*. LV systolic performance improves with development of hypertrophy after transverse aortic constriction in mice[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001, 281(3): H1104-H1112.

[7] Gullace G, Demicheli G, Monte I, *et al*. Reclassification of echocardiography according to the appropriateness of use, function and competence-based profiles and application[J]. J Cardiovasc Echogr, 2012, 22(3): 91-98.

[8] 田亚强, 苏旭东, 赵家军, 等. 吡格列酮对高脂饮食SD大鼠心功能的影响[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(1): 65-68.

[9] 于学军, 何作云, 黄岚, 等. 血管紧张素(1-7)对不同模型高血压大鼠左心室结构的影响[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(18): 1753-1756.

[10] Stansfield W E, Charles P C, Tang R H, *et al*. Regression of pressure-induced left ventricular hypertrophy is characterized by a distinct gene expression profile [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2009, 137(1): 232-238, 238e1-238e8.

[11] Leenders J J, Wijnen W J, Hiller M, *et al*. Regulation of cardiac gene expression by KLF15, a repressor of myocardin activity[J]. J Biol Chem, 2010, 285(35): 27449-27456.

[12] Gong X, Zhang L, Jiang R, *et al*. Anti-inflammatory effects of mangiferin on sepsis-induced lung injury in mice *via* up-regulation of heme oxygenase-1[J]. J Nutr Biochem, 2013, 24(6): 1173-1181.

[13] Prabhu S, Narayan S, Devi C S. Mechanism of protective action of mangiferin on suppression of inflammatory response and lysosomal instability in rat model of myocardial infarction [J]. Phytother Res, 2009, 23(6): 756-760.

[14] Lai L, Lin L C, Lin J H, *et al*. Pharmacokinetic study of free mangiferin in rats by microdialysis coupled with microbore high-performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr A, 2003, 987(1/2): 367-374.

[15] Hou J, Zheng D, Zhong G, *et al*. Mangiferin mitigates diabetic cardiomyopathy in streptozotocin-diabetic rats[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2013, 91(9): 759-763.

(**收稿**:2014-09-15;**修回**:2014-11-05)

(编辑 栾 嘉)