

β 蜕皮素对心脏移植再灌注损伤的保护作用

赵 忠^{*} 杨奋有¹ 吴 旭² 朱朗标[#] (北京 100853 解放军总医院心外科;¹ 石油天然气总公司中心医院;² 第三军医大学大坪医院野战外科研究所)

摘要 目的: 研究植物单体成分 β 蜕皮素(β ecdysone, EDS)是否能减轻心脏移植中的脂质过氧化损伤。方法: SD 大鼠 45 只分为 3 组: (1)假手术组: 仅开腹, 不行心脏移植; (2)对照组: 采用改良心脏移植模型, 行大鼠同种异体异位心脏移植; (3)EDS 组: 大鼠心脏移植术后应用蜕皮甾酮($\text{ig}, 20\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}, 1/\text{d}$, 用 7d), 测定血清心肌酶谱 LDH、GOT、CPK 及 MDA、SOD, 观察心肌组织的病理变化。结果: EDS 组心肌线粒体等结构损伤明显减轻, 血清心肌酶谱明显改善($P < 0.01$), 血清脂质过氧化的终产物 MDA 明显减少($P < 0.01$), 自由基清除剂 SOD 明显增加($P < 0.01$)。结论: 在 EDS 的作用下, 心脏移植大鼠脂质过氧化反应明显减弱, 表现出心肌酶谱改善, 心肌结构特别是线粒体损伤减轻的效应, 提示 EDS 对心脏移植再灌注损伤有一定保护作用。

关键词 心脏移植; β 蜕皮素; 再灌注损伤; 脂质过氧化; 线粒体

Protective effect of β -ecdysone on rat heart transplantation

ZHAO Zhong, YANG Fenyong¹, WU Xu², et al(Department of cardiovascular surgery of general hospital of PLA, Beijing 100853, ¹Central hospital of China National petroleum corporation, LANGFANG 065000 ²Research institute of field surgery, Daping hospital of third military medical university, Chongqing 400042)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To explore whether β ecdysone(EDS) has some protective effect on reperfusion in rat heart transplantation. **METHODS:** Model of rat ectopic heart transplantation was made by transplant donor heart to peritoneal cavity of receptor. EDS ($\text{ig}, 20\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}, 1/\text{d}$, use 7d) was administered to heart transplantation rat. Observation was made on the items of lactate dehydrogenase (LDH), glutamic

* 博士研究生 # 导师

oxaloacetic transaminase (GOT), creating phosphokinase (CPK) in serum. Malondialdehyde(MDA) in serum was measured by radioimmunoassay acid fluorescence methods. Superoxide dismutase (SOD) in serum was determined by radioimmunoassay. Pathological change of myocardium especially mitochondrion was detected by transmission electron microscope. **RESULTS:** EDS is able to decrease lipid oxidation action in rat heart transplantation, cause to reduce the release of myocardium enzymogram and abate the pathological changes of mitochondrion. **CONCLUSION:** EDS may have some protective effect of reperfusion injury in rat heart transplantation. The mechanism of protective effect may be related to EDS's property of antiliperoxidation.

KEY WORDS: Heart transplantation, β Ecdysone Myocardium, Ischemia reperfusion injury, Lipid peroxidation, Mitochondrion

心脏移植的一个重要问题是再灌注损伤^[1]。再灌注损伤的原因之一是自由基所致的脂质过氧化损伤。针对脂质过氧化损伤的环节,研究心脏移植心肌再灌注损伤的防治是有益的。目前心脏移植再灌注损伤的药物保护有较多文献,但鲜见用植物单体进行研究的报道。 β 蜕皮素(β ecdysone, EDS)是植物单体成分^[2],具有促生长的特性。研究还表明EDS是一种抗氧化剂^[3]。本研究拟探讨植物单体 β ecdysone是否能减轻心脏移植的再灌注损伤。

1 材料与方法

1.1 动物模型:健康SD大白鼠,体重(300±50g),雌雄不拘,解放军总医院实验动物中心提供。采用改良大鼠心脏移植模型建立同种异体异位心脏移植^[4]。

1.1.1 供心摘取:大鼠麻醉固定后取正中切口开腹,显露下腔静脉,注入肝素盐水,尽量回吸全身血液,注入冷心停搏液,立即沿腋前线整块剪除前胸壁,于胸主动脉逆行插管至升主动脉,灌心停液,使心脏完全停搏,结扎并切断下腔静脉,尽量向离心端结扎左右上腔静脉及全部肺静脉,于结扎离心端切断。剪断肺动脉,于主动脉弓降部剪断主动脉,取出供心,在4℃平衡液中修剪。

1.1.2 心脏移植:正中开腹,将肠袢推至左侧,在腰静脉以下分离出腹主动脉和下腔静脉,上下各引阻断线一根,间距1cm,将供心按主动脉在前,肺动脉在后放置,作供心主动脉与腹主动脉的端侧吻合。在腔静脉阻断下端前壁作切口,用无创双头针于供心肺动脉和下腔静脉切口下角悬吊,立即放开腔静脉上端阻断线,将供心右室导管经肺动脉逆行插入下腔静脉,收紧阻断线,结扎吻合口下角,将肺动脉与腔静脉左右两吻合边从下到上连续缝合,于吻合口上角打结,松开上下阻断线,将腔静脉导管退于右室腔内,缝合右室切口,心脏自动复跳后,腹腔注庆大,关腹。

1.2 实验分组:SD大鼠45只,分为3组,每组15只。(1)假手术组:大鼠仅开腹。(2)移植组:开腹后行同种异位心脏移植

表1 大鼠血浆中LDH, GOT, CPK, MDA, SOD的变化(n=15)

植。(3)EDS组:心脏移植后即予EDS(ig, 20mg·kg⁻¹, 1/日, 用7d)。该剂量的选择参照文献^[2,8],及经预实验摸索而定。

1.3 指标检测:术后7d活杀大鼠,取心脏血3ml,全自动生化分析仪常规测定血清心肌酶谱(LDH、GOT、CPK),硫代巴比妥酸法测定丙二醛(MDA)含量,放射免疫法测定超氧化物歧化酶(SOD)。

1.4 形态学检查:移植后7d剖腹取心脏。心脏用10%福尔马林固定,石蜡包埋,常规切片作HE染色,光镜观察心肌细胞改变。电镜检查:以1%锇酸固定,丙酮逐级脱水,环氧树脂包埋,超薄切片,用Hitachi-500型透射电镜观察。用UIDSIII型计算机图像分析系统对心肌线粒体进行分析,再按公式计算有关数据^[5],即:面密度(N_A)= n/A (个/cm²)。数密度(N_V)= N_A/D (个/cm²)。体密度(V_V)= $a_1 + a_2 + a_3 + a_4 + a_5 + a_6 + a_7 + a_8 + a_9 + a_{10}/A$ 。平均体积(V)= $V_V + V_N$ 。体密度表示单位参考系统中某一成份所占的份数,即 V_V 等于其结构的体积 V_i 除以参考系统的体积 V_r 。根据体视学Delesse原理,物体切面上某一成分的平均面积与这一成分的分体积相等。因此,线粒体的分体积,可转换成线粒体的分面积。将所测得的线粒体面积 a ,除以总面积 A ,取每组平均值代表线粒体的体密度。

1.5 统计学处理:采用Microsoft Excel软件行组间t检验。

2 结果

2.1 EDS对心脏移植大鼠血清心肌酶谱、脂质过氧化反应的影响从表1中可见:与假手术组相比,心脏移植组血清心肌酶谱(LDH、GOT、CPK)明显增加($P < 0.01$),脂质过氧化代谢终产物MDA明显增加($P < 0.01$),自由基清除剂SOD明显减少($P < 0.01$),提示心脏移植大鼠发生了脂质过氧化反应,造成心肌一定程度损伤。与移植组相比,EDS组LDH、GOT、CPK、MDA明显减少($P < 0.01$),SOD明显增加($P < 0.01$),提示在EDS的作用下,移植心肌的酶谱释放量减少,脂质过氧化反应减轻。

组别	LDH (U·mL ⁻¹)	GOT (U·mL ⁻¹)	CPK (U·mL ⁻¹)	MDA (nmol·mL ⁻¹)	SOD (μg·mL ⁻¹)
假手术15只	70.7±11.4	90.4±13.3	200.7±28.2	30.7±4.9	47.4±5.1
移植15只	130.3±17.3 ^A	218.6±28.8 ^A	441.8±60.4 ^A	84.9±10.3 ^A	22.5±3.3 ^A
EDS15只	109.4±15.8 ^{AB}	174.4±21.3 ^{AB}	374.5±53.2 ^{AB}	67.2±9.2 ^{AB}	38.5±4.8 ^{AB}

A: vs 假手术组 $P < 0.01$; Bvs 移植组 $P < 0.01$

2.2 形态学观察: 术后 7d 光镜下可见移植组心肌纤维肿胀, 空泡变形, 心肌纤维断裂、紊乱, 心肌纤维出血及灶性坏死。电镜可见移植组细胞皱褶、部分断裂, 细胞器外溢, 胞核不规则, 染色体边集, 线粒体嵴模糊、部分消失、线粒体间空泡较多、线粒体内出现空泡及致密颗粒。肌原纤维排列紊乱、表 2 心肌线粒体形状因子的变化

组 别	形状因子 (FF)	面密度(N_A) (个/ cm^2)	数密度(N_V) (个/ cm^2)	体密度 (V_V)	平均体积 (V)
假手术 15 只	0.702±0.102	0.197±0.027	0.179±0.023	16.5±2.2	88±15
移 植 15 只	0.602±0.087 ^A	0.131±0.021 ^A	0.124±0.015 ^A	26.1±3.3 ^A	167±27 ^A
EDS 15 只	0.651±0.074 ^{AB}	0.158±0.018 ^{AB}	0.148±0.019 ^{AB}	21.7±2.9 ^{AB}	128±26 ^{AB}

A: vs 假手术组 $P < 0.01$; B vs 移植组 $P < 0.01$

3 讨 论

随着克隆器官出现、免疫药物的进展, 心脏移植术越来越得到肯定。人们在移植后急性排斥反应、移植供体保存、冠状血管病变等方面进行了许多研究。心脏移植的再灌注损伤防治也是研究的一个重要方面。这方面的研究途径^[6]包括能量代谢(如 ATP、腺苷)、膜稳定(如 Propranolol)、血管紧张素酶抑制剂(如 Captopril)、一氧化氮途径(如 L-Arg, L-NAME)、自由基(如 Vit E)、天然植物(如人参皂甙、三七皂甙)。

再灌注损伤与自由基所致的脂质过氧化有很大关系。移植心肌缺血再灌注时, 由于组织缺氧、呼吸链抑制、NADH 堆积、儿茶酚胺增多、和游离脂肪酸堆积, 使得心肌细胞膜脂质的分子氧不能完全还原, 而经加氧酶系产生大量自由基。ATP 缺氧分解时也产生氧自由基和羟自由基。高反应的氧自由基使心肌细胞膜脂质发生过氧化, 引起膜的完整性、流动性和通透性的有害变化, 导致心肌损伤。因此, 针对脂质过氧化损伤的环节, 研究心脏移植再灌注损伤的防治是可能的。我们注意到一种植物单体成分—— β 蜕皮素(β ecdysone, EDS)。它是一种特殊的甾体成分, 又被称为昆虫变态激素^[2], 其不仅存在昆虫体内, 许多中药如怀牛膝、川牛膝、桑叶、白毛夏枯草、泽泻、罗汉松、紫杉、乌毛蕨、祁州漏芦等都含有类似物。值得注意的是其抗氧化特性^[3], 研究报道 EDS 可能通过其分子结构中的羟基和氨基团削弱自由基反应^[7]。因此我们推测 EDS 可能减轻心脏移植的脂质过氧化损伤。实验结果显示: 在心脏移植大鼠, EDS 减少了脂质过氧化反应的代谢总产物丙二醛(MDA)含量、增加了自由基清除剂超氧化物歧化酶(SOD)含量, 说明 EDS 减轻了移植心肌再灌注引起的脂质过氧化反应, 此结果与文献有相似之处^[8]。心肌损伤时, LDH、GOT, 特别是 CPK 可从心肌细胞溢出到血浆, 因此它们可比较特异地标志心肌细胞的损伤。从实验中可看出: EDS 减少了心肌酶谱的释放, 提示 EDS 可减轻移植心肌细胞的损伤。病理形态也可见: 在 EDS 的作用下, 移植心脏心肌线粒体等结构的损害减轻了。以上两方面

均质化, 肌节模糊、明暗带模糊; 而 EDS 组肌原纤维, 较完整, 偶有致密颗粒。表 2 可见移植组心肌线粒体形状因子降低。面密度、数密度下降($P < 0.01$), 而体密度、平均体积显著增加($P < 0.01$), 提示移植组心肌线粒体肿胀、线粒体膜等基本结构发生病变, EDS 组心肌上述改变减轻。

结果共同显示出 EDS 确实产生了减轻移植心脏损伤的效应。

本研究通过移植心肌酶谱及病理形态的变化, 明确了 EDS 对减轻心脏移植心肌再灌注损伤的效应, 证实了 EDS 抗移植后心肌过氧化损伤的作用, 目前尚未见类似报道, 值得进一步研究。

参考文献

- 1 Baldwin WM 3rd, Samaniego Picota P Complement deposition in early cardiac transplant biopsies is associated with ischemic injury and subsequent rejection episodes. Transplantation, 1999; 68(6): 894.
- 2 江苏新医学院. 中药大辞典. 第 1 版. 上海: 上海人民出版社, 1977. 417.
- 3 Ossyskaya LP, Saad LM, Kholodova YuD. Antiradical properties and antioxidative activity of ecdysterone. Ukr Biokhim Zh, 1992, 64: 114.
- 4 Ritter T, Schroder G, Risch K, Vergopopulos A, et al. Ischemia/reperfusion injury-mediated down-regulation of adhenoxirus-mediated gene expression in a rat heart transplantation model is inhibited by co-application of a TNFRp55-Ig Chimeric construct. Gene Ther, 2000, 7(14): 1238.
- 5 Campbell HA, Pitot HA, Potter VR, et al. Application of quantitative stereology to the evaluation of enzyme-altered foci in rat liver. Cancer Res, 1982, 42(2): 465.
- 6 Blum A, Aravot D. Heart transplantation-an update. Clin Cardiol, 1996, 19(12): 930.
- 7 Kuzmenko AI, Morozova RP, Nicklenko IA, et al. Influence of vitamin D₃, arginine and specimens from Serratula coronata on lipid free-radical oxidation in D-hypovitaminosis. Uki Biokhim Zh, 1999, 71(2): 69.
- 8 吴 旭, 蒋耀光, 范士志, 等. 蜕皮甾酮对肺再灌注损伤的影响. 中国药理学通报, 1998, 14(3): 256.

收稿日期: 2001- 03- 23