

丹参联合缺血预适应对缺血性心肌损伤的保护作用

梁国庆 孙霞 亢晓冬 缪利英 汪传英(杭州 310012 杭州医学高等专科学校生理学教研室)

摘要 目的:研究丹参(SM)联合缺血预适应(IP)对缺血性心肌损伤的保护作用。方法:以整体麻醉SD大鼠心脏冠状动脉左前降支结扎/松开作为缺血/再灌注动物模型,观察对心律失常程度和心肌梗塞范围的影响。结果:IP能减轻复灌性心律失常的严重程度,缩小心肌梗塞范围;SM能缩小心肌梗塞范围;SM联合IP与单纯IP比较,心肌梗塞范围进一步缩小;SM联合IP与单纯SM比较,心律失常严重程度和心肌梗塞面积均进一步减小。结论:SM能加强IP的心肌保护作用。

关键词 丹参;缺血预适应;心肌保护作用

Salvia Miltiorrhiza Enhances the Cardioprotective Effects of Ischemic Preconditioning in the Rat

Sun Xia, Liang Guoqing, Kang Xiaodong *et al* (Department of Physiology, Hangzhou Medical College, Hangzhou 310012)

ABSTRACT **OBJECTIVE:**To investigate the effect of salvia miltiorrhiza (SM) on the cardioprotection of ischemic preconditioning (IP) in the anaesthetized rat. **METHOD:**Sprague-Dawley rats were used. The left anterior descending artery was ligated as ischemia. Reperfusion induced arrhythmias and infarct size were measured. **RESULTS:**IP reduced the severity of reperfusion-induced arrhythmias and limited the infarct size and SM limited the infarct size. SM plus IP significantly reduced the infarct size compared with IP that was used alone and significantly decreased both the infarct size and the severity of reperfusion-induced arrhythmias when compared with SM alone. **CONCLUSION:**The results suggest that SM will enhance the cardioprotective effects of IP.

KEY WORDS salvia miltiorrhiza, ischemic preconditioning, cardioprotective effect

心肌缺血再灌注后氧自由基生成、细胞内 Ca^{2+} 超载、能量耗竭、去甲肾上腺素释放和凋亡是引起心肌损伤的主要原因。缺血预适应(ischemic preconditioning, IP)通过阻止这些因素的产生而发挥对心肌的保护作用^[3,6]。丹参(salvia miltiorrhiza, SM)研究证明能对抗氧自由基和超钙负荷的毒性,改善心肌能量的代谢,具有较好的防治心肌缺血再灌注损伤的疗效。^[1]从药理学和心肌病理生理学角度推测,外源性SM应该能加强IP的内源性心肌保护作用。本实验采用整体麻醉SD大鼠心脏冠状动脉左前降支结扎/松开作为心肌缺血/再灌注动物模型,研究SM在加强IP的心肌保护中的作用。

1 材料与方

1.1 实验分组

雄性SD大鼠,体重220~270g(浙江医科大学实验动物中心提供),随机分成A、B、C、D4组,采用尾静脉给药法。A组为单纯缺血/复灌对照组:手术后稳定10min,注射生理盐水2.5ml,继续灌流24min,然后缺血20min,复灌80min;B组为IP组:手术后稳定10min,注射生理盐水2.5ml,行IP,然后缺血20min,复灌80min;C组为SM组:手术后稳定10min,注射SM,剂量4ml/kg,外加生理盐水1.5ml,继续灌流24min,然后缺血20min,复灌80min;D组为SM+IP组:手术后稳定10min,注射SM,剂量4ml/kg,外加生理盐水1.5ml,行IP,然后缺血20min,复灌80min。

1.2 冠状动脉结扎法

雄性SD大鼠腹腔注射戊巴比妥钠(45mg/kg)麻醉,待

动物麻醉后,仰卧位固定。颈部行气管插管,接上动物人工呼吸机(浙江医科大学医学仪器实验厂)控制呼吸,呼吸频率 55 次/min,潮气量 20 ml/kg。切开左胸壁,暴露心脏。在左心耳与主动脉圆锥之间的冠状动脉左前降支(left anterior descending branch, LAD)下方穿线(5-0 医用无损伤缝线),两个线头穿过一小段细硅胶管。以在另一小段细硅胶管上打结作为缺血,以松开结扣作为复灌处理。采用标准肢体 II 导联记录动物心电信号,经 PcLab 生物信号记录分析系统记录。以心电图上出现 ST 段抬高及心肌局部出现紫绀表示缺血成功,以心电图上 ST 段降低和心肌局部紫绀消失作为冠脉再通成功的指标。

1.3 实验药品

丹参注射液:江苏省东台市制药厂生产,每毫升注射液相当于 1.5g 生药,批号 991028;氯化三苯基四氮唑(triphenyltetrazolium chloride, TTC):美国 Sigma 公司生产;苔盼兰(trypan blue):上海化学试剂采购供应站提供。

1.4 缺血预适应方法

采用局部冠脉阻塞停灌的预处理方法。以缺血 3 min,复灌 5 min,循环 3 次,作为 IP 过程。

1.5 心律失常评分法

采用改良 Curtis 和 Walker(1988)^[2]心律失常评分法,对心律失常严重程度进行定量分析。该评分法的基本原则是:(1)室性心律失常比房性心律失常严重;(2)在室性心律失常中,其严重程度按心室纤颤(VF)、室性心动过速(VT)、频发室性早搏和偶发性室性早搏的顺序依次递减;(3)心律失常的持续时间越长或发生频率越高,其程度越严重。每个心脏取其最严重的一种复灌性心律失常相对应的分数作为其心律失常评分。具体评分方法见表 1。

表 1 心律失常评分系统

心律失常评分	心律失常类型
0	无心律失常
1	房性心律失常或偶发性室性早搏
2	频发室性早搏
3	室性心动过速(1-2 次)
4	室性心动过速(≥3 次)或心室纤颤

1.6 心肌梗塞范围测定法

灌流结束后,永久结扎冠状动脉 LAD。迅速取下心脏置于生理盐水中,洗净心腔内残存血液。从主动脉逆行推注 1%苔盼兰 0.8 ml,在 -8℃冰箱内放置 2h 使其冰冻。从心尖向心底平行于房室沟方向将心室切成相等厚度的 8-10 片。此时在切面上可清晰地分辨被苔盼兰染兰的非缺血区和未染兰的危险区(area at risk, AAR)。将切片放入 38℃的 1% TTC 溶液中(TTC 溶于 pH 为 7.8 的磷酸缓冲液)。正常心肌细胞因含有脱氢酶,在 NADH 存在的条件下,能将无色的氧化型 TTC 还原成红色的还原型 TTC,从而使活体心肌染色。梗塞区的心肌细胞由于细胞膜损伤而使脱氢酶释放丢失,不能还原 TTC,所以梗塞区心肌呈灰白色。心脏切片浸入 TTC 溶液 15 min 后取出,此时在切面上可清晰地看到红

色的未梗塞区和灰白色的梗塞区。然后在解剖镜下分离蓝色的非缺血区、红色的缺血未梗塞区和灰白色的缺血梗塞区,分别称重。以梗塞区心肌重量占危险区心肌重量(红色+灰白色心肌重量之和)的百分比(%)作为衡量梗塞范围的指标。

1.7 统计分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,室颤发生率采用 χ^2 检验,室性早搏次数与心率采用 Wilcoxon 秩和检验,其余采用 Student-t 检验。

2 结果

2.1 IP 和 SM 对随后的心肌缺血-复灌过程中心脏功能的作用

与单纯缺血/复灌对照组(A组)相比:IP 能消除复灌性心室纤颤的发生,显著降低复灌过程中室性早搏的发生次数($P < 0.05$),明显缩短室性心动过速的持续时间($P < 0.01$) (表 2);IP 组心脏的复灌性心律失常评分显著低于对照组($P < 0.01$) (表 4);IP 能缩小随后长时间缺血引起的心肌梗塞范围,其差异具有统计学意义($P < 0.01$) (表 4);IP 对心率没有明显影响($P > 0.05$) (表 3)。

与单纯缺血/复灌对照组(A组)相比:SM(4 ml/kg)处理大鼠后,心脏在复灌过程中未发生心室纤颤,室性早搏次数有所减少,但无统计学意义($P > 0.05$),室性心动过速的持续时间未见缩短($P > 0.05$) (表 2);SM 组心脏的复灌性心律失常评分与对照组比较无显著差异($P > 0.05$) (表 4);SM 能显著缩小随后长时间缺血所引起的心肌梗塞范围,其差异具有统计学意义($P < 0.05$) (表 4);SM 对心率没有明显影响($P > 0.05$) (表 3)。

2.2 SM 联合 IP 对随后的心肌缺血/复灌过程中心脏功能的作用

与单纯缺血/复灌对照组(A组)相比:SM 联合 IP 能消除复灌性心室纤颤的发生,显著减少复灌过程中室性早搏的发生次数($P < 0.05$),明显缩短复灌性室性心动过速的持续时间($P < 0.05$) (表 2);SM+IP 组心脏的心律失常评分明显低于对照组($P < 0.01$) (表 4);SM 联合 IP 能显著缩小随后长时间缺血所引起的心肌梗塞范围($P < 0.01$) (表 4);SM 联合 IP 对心率没有明显影响($P > 0.05$) (表 3)。

与 IP 组(B组)相比:SM+IP 组与 IP 组比较心肌梗塞范围明显缩小,其差异具有统计学意义($P < 0.05$) (表 4);SM+IP 组心脏的复灌性心室纤颤发生率、复灌过程中室性早搏的发生次数和室性心动过速的持续时间与 IP 组比较无显著差异($P > 0.05$) (表 2),复灌性心律失常评分也没有明显下降($P > 0.05$) (表 4);SM+IP 组心脏的心率与 IP 组比较无显著差异($P > 0.05$) (表 3)。

与 SM 组(C组)相比:SM+IP 组的心肌梗塞范围明显低于 SM 组($P < 0.05$) (表 4);SM+IP 组的复灌性心律失常评分显著低于 SM 组,其差异具有统计学意义($P < 0.05$) (表 4)。SM 联合 IP 能明显缩短复灌过程中室性心动过速的持续时间($P < 0.05$),降低室性早搏的发生次数,但无统计

学意义 ($P > 0.05$) (表 2); SM + IP 组心脏的心率与 SM 组比较无显著差异 ($P > 0.05$) (表 3)。

表 2 丹参和缺血预适应对麻醉大鼠心脏复灌性心律失常的影响

组别	n	室颤发生率(%)	室性早博次数	室速持续时间(s)
对照	10	20	9.10 ± 7.67	11.71 ± 6.17
IP	10	0	2.56 ± 2.51*	3.82 ± 5.24**
SM	10	0	4.56 ± 5.53	13.26 ± 9.37
SM + IP	8	0	3.00 ± 2.83*	5.26 ± 3.37*#

与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

与 SM 组比较, # $P < 0.05$ 。

表 3 丹参和缺血预适应对麻醉大鼠心率(次/min)的影响

组别	n	处理前	缺血		再灌注		
			1 min	20 min	1 min	30 min	60 min
对照	10	479 ± 20	445 ± 28	415 ± 19	400 ± 25	384 ± 22	376 ± 20
IP	10	491 ± 24	455 ± 12	422 ± 11	415 ± 14	397 ± 12	386 ± 14
SM	10	498 ± 57	463 ± 59	434 ± 60	410 ± 55	395 ± 54	385 ± 57
SM + IP	8	486 ± 24	458 ± 25	429 ± 24	423 ± 27	408 ± 33	383 ± 30

表 4 丹参和缺血预适应对麻醉大鼠心律失常评分和心肌梗塞范围的影响

	Control	IP	SM	SM + IP
心律失常评分	3.62 ± 0.61	2.31 ± 1.03**	3.54 ± 0.75	2.69 ± 0.81**#
梗塞区心肌重量/AAR (%)	17.25 ± 8.06	6.98 ± 8.73**	11.74 ± 8.77*	2.67 ± 1.83**#

与对照组比较, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

与 SM 组比较, # $P < 0.05$

3 讨论

本实验结果发现 SM 能够加强 IP 对心肌的保护作用, SM 联合 IP 处理大鼠心脏, 心肌梗塞范围进一步缩小。SM 和 IP 在抗心肌缺血/再灌注损伤中具有协同作用, 共同发挥对心肌的保护作用。SM 加强 IP 的心肌保护作用的可能机制有:(1) 在 IP 过程中, 氧自由基释放增多, 减少了缺血再灌注过程中氧自由基的生成, SM 通过提高缺血再灌注过程中 SOD 和谷胱甘肽过氧化酶的活性而增加了心肌细胞对氧自由基的清除, 进一步减少了氧自由基的产生, 从而加强了 IP 抗氧自由基所致心肌细胞膜损伤的能力;(2) IP 后, 由缺血再

灌注过程所诱导的 IP₃ 释放被抑制, 减少了细胞内钙库中 Ca²⁺ 的释放, SM 通过阻断细胞膜上的钙通道, 抑制缺血/再灌注过程中细胞外 Ca²⁺ 的内流, 进一步降低了细胞的 Ca²⁺ 超载程度, 从而加强了 IP 抗 Ca²⁺ 超载损伤的能力;(3) IP 能抑制心肌 F₁F₀-ATP 酶, 减少了 ATP 的水解, 有效地保存心肌细胞的能量储备, SM 通过减少缺血/再灌注过程中 ATP 的降解, 促进已降解腺苷酸代谢产物再合成腺苷酸, 进一步提高了心肌细胞的能量储备, 从而加强了 IP 抗能量耗竭的能力;(4) 在 IP 过程中, NE 释放增加, 减少了缺血再灌注时 NE 的释放, SM 通过阻止 α₁ 受体在缺血再灌注过程中的增加, 进一步减轻了 NE 对心肌细胞的损害, 从而加强了 IP 抗 NE 损伤的能力。(5) IP 抑制缺血再灌注心肌细胞凋亡并下调 Fas 基因蛋白表达, [6] SM 具有同样的作用并上调凋亡抑制基因 Bcl-2 的蛋白表达以保护缺血再灌注心肌损伤。[7] 该可能机制的具体环节还有待进一步研究。

本研究具有广阔的临床应用前景。在冠脉溶栓及经皮冠脉腔内成形术(PTCA)中联合使用丹参制剂和 IP, 可加强 IP 的心肌保护作用, 减轻 IP 的短暂缺血对心肌的损伤, 降低致命性室颤的发生率, 有利于病人术后的恢复。使用药物模拟 IP 的心肌保护作用, 避免心肌缺血, 将是一种更安全简便的方法。如丹参可加强心停搏液对心肌的保护作用得以证实, 对心胸外科手术将具有改良作用。

参考文献

- 1 屈松柏, 黎启华. 复方丹参注射液对心肌再灌注损伤保护作用的实验研究. 心血管康复医学杂志, 1999, 8(2):79.
- 2 Curtis MJ, Walker MJ. Quantification of arrhythmias using scoring systems: an examination of seven scores in an in vivo model of regional myocardial ischemia. Cardiovasc Res, 1988, 22(9):656.
- 3 Lawson CS, Downey JM. Preconditioning: state of the art myocardial protein. Cardiovas Res, 1994, 27:542.
- 4 黄熙, 臧益民. 丹参酮 II A 磷酸钠心血管药理. 国外医学, 中医中药分册, 1995, 17(1):9.
- 5 徐长庆, 范劲松, 郝雪梅, 等. 丹参酮 II A 对豚鼠单个心肌细胞 L 型钙电流的阻断作用. 中国药理学与毒理学杂志, 1996, 10(2):81.
- 6 赵明中, 陈运贞, 李媛媛. 大鼠心肌再灌注时心肌细胞凋亡、Fas 基因表达及缺血预处理对其影响. 中华内科杂志, 1999, 38(11):753.
- 7 赵明中, 汪家瑞, 魏嘉平, 等. 复方丹参滴丸对大鼠心肌缺血再灌注时心肌细胞凋亡及凋亡相关基因表达的影响. 中国临床药理学杂志, 1999, 15(4):288.

收稿日期:2001-03-29