

地奥心血康对大鼠心肌缺血再灌注损伤的干预作用

赵胜¹,冯国清²,付润芳²,张贺鸣²,胡香杰²,张新勇²(1.杭州市萧山区妇幼保健院,浙江 杭州 311201;2.郑州大学医学院药理学教研室,河南 郑州 450052)

摘要:目的 观察地奥心血康(DK)对大鼠心肌缺血再灌注损伤的影响。方法 48只Wistar大白鼠随机分为正常对照组、模型对照组与DK组。前2组每日灌胃0.5%CMC 10mL/kg,DK组每日灌胃DK 70mg/kg,共10天。末次给药后24h结扎大鼠冠状动脉左前降支30min,再灌注90min复制大鼠心肌缺血再灌注损伤模型,观察心律失常评分、心肌梗死面积、心功能、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、心肌Na⁺-K⁺-ATP酶和Ca²⁺-ATP酶活性及丙二醛(MDA)含量等的变化。结果 与模型对照组相比,DK组心律失常评分明显降低,心肌梗死面积明显缩小,心功能明显改善,SOD、CAT及GSH-Px、Na⁺-K⁺-ATP酶、Ca²⁺-ATP酶活性显著升高,MDA含量显著降低。结论 DK对大鼠心肌缺血再灌注损伤有保护作用。其机制可能与清除自由基,抑制脂质过氧化有关。

关键词:地奥心血康 心肌缺血 再灌注损伤

中图分类号:R285.5 文献标识码:A 文章编号:1007-7693(2005)05-0364-03

The effects of Diao Xinxuekang (DK) on myocardial ischemia reperfusion injury in rats

ZHAO Sheng¹, FENG Guo-qing², FU Run-fang², ZHANG He-ming², HU Xiang-jie², ZHANG Xin-yong² (1. Xiaoshan Women and Children Health Hospital of Hangzhou, Hangzhou 311201, China; 2. Department of Pharmacology in Medical College of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe the effects of DK on myocardial ischemia reperfusion injury in rats. **METHODS** 48 Wistar rats were randomly divided into three groups: normal control group, model control group and DK treatment group. Those of the former two groups were treated with gastrogavage of 0.5% CMC 10mL/kg·d for 10 days, and the treatment group with DK 70mg/kg·d. Myocardial ischemia reperfusion injury models were established by the ligation of left descending coronary artery for 30min and reperfusion for 90min in rats and the influence on scores of arrhythmia, myocardial infarction size, cardiac function, the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px), Na⁺-K⁺-ATPase, Ca²⁺-ATPase, and the content of malondialdehyde (MDA) were determined. **RESULTS** In DK-treatment group, the score of arrhythmia decreased, the myocardial infarction size diminished, the cardiac function was markedly improved, the activities of SOD, CAT, GSH-Px, Na⁺-K⁺-ATPase and Ca²⁺-ATPase significantly increased while MDA content reduced markedly in myocardium compared with the model control group. **CONCLUSION** DK can protect myocardium against ischemia reperfusion injury. The action is perhaps relate to the inhibition of the free radical and subsequent lipid peroxidation.

KEY WORDS Diao Xinxuekang; myocardial ischemia; reperfusion injury

地奥心血康(DK)是中国科学院成都生物研究所从药用植物中提取的一种甾体总皂苷,其胶囊作为治疗冠心病的有效药物已广泛应用于临床。本研究观察地奥心血康对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用,为临床用药提供一定依据。

1 材料和方法

1.1 动物

健康Wistar大鼠,雌雄各24只,体重250~300g,由河南省实验动物中心提供,实验动物合格证号:410116。

1.2 药品与试剂

地奥心血康胶囊(每粒含甾体总皂苷100mg),成都地奥

制药集团有限公司出品,批号02121054,取出胶囊中内容物,以0.5%羧甲基纤维素钠(CMC)配制含甾体总皂苷7mg/mL混悬溶液。戊巴比妥钠粉剂、红四氮唑(TTC),上海试剂三厂分装。伊文思蓝,美国Sigma公司产品。SOD, CAT, GSH-Px, MDA及Na⁺-K⁺-ATP酶、Ca²⁺-ATP酶等测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.3 仪器

RM-6200四道生理记录仪(成都电子仪器厂);XD-7100单道心电图机(上海医疗器械高技术公司生产);ZS-83-1型内切式组织匀浆器(浙西机械厂生产);BP310S电子天平(德国Sartorius);721分光光度计(上海分析仪器厂)。

通讯作者:冯国清,女,46岁,副教授,硕士生导师。电话:0371-7665118, E-mail: FENG-Gq202@sohu.com

1.4 实验方法

48只大鼠随机分为正常对照组,模型对照组和DK组,每组16只,前两组给予10mL/kg的0.5%CMC,后者给予70mg/kg地奥心血康药液灌胃,连续10d。末次灌胃24h后,大鼠经腹腔注射戊巴比妥钠(45mg/kg)麻醉,分离右颈总动脉,暴露气管,建立左下肢股静脉通道,推注0.5%肝素钠(1mL/kg)。经右颈总动脉插入导管至左心室并连接四道仪,切开气管,插入气管套管作正压呼吸。记录左室收缩压(LVSP)和左室内压最大变化速率($\pm dp/dt_{max}$),同步记录肢体II导联心电图,开胸暴露心脏,5/0丝线结扎左冠状动脉前降支中上1/3处。缺血区发绀,心电图ST段抬高为结扎成功指标。30min后解除结扎,再灌注90min。再灌注毕各组均有一半动物立即取出心脏,用4℃生理盐水冲洗,剪去心耳及心房,滤纸吸干称重,匀浆制成10%心肌组织生理盐水匀浆,用以测定生化指标。SOD, CAT, GSH-Px, MDA, $Na^+ - K^+ - ATP$ 酶和 $Ca^{2+} - ATP$ 酶测定按试剂盒说明,采用发色底物法进行测定。另一半动物再次原位结扎冠状动脉并经股静脉推注2%伊文思蓝1mL,待大鼠巩膜蓝染后迅速取出心脏,4℃生理盐水中剪去心房,右心室游离壁,滤纸吸干冷冻。冷冻后的标本沿左室长轴切成1.5mm厚的薄片5~6片,置于1%TTC溶液中37℃孵育20min,放入10%甲醛中固定24h。标本的蓝、红、苍白色区分别为正常组织、缺血损伤组织和坏死组织,计算心肌缺血范围(红色和苍白色重量/三色总重量),梗死范围(苍白色重量/红色和苍白色重量)。

心律失常参考文献^[1]进行评分,0分:无室性心律失常或仅发生室早且<5次/min;1分:仅发生室早≥5次/min,2分:仅发生一阵室速且<60s;3分:发生一阵≥60s的室速,或发生多阵室速且累积时间≤60s;4分:发生多阵室速且累积时间≥60s;5分:可发生室颤但能够自动恢复;6分:出现不可恢复的室颤或在观察期内死亡。

1.5 统计学处理 计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据处理以SPSS10.0统计软件进行单因素方差分析,并以LSD法进行多组间两两比较,以 $\alpha = 0.05$ 作为差异显著性标准。

2 结果

2.1 心律失常评分

DK组心律失常评分明显低于模型对照组($P < 0.05$),提示DK能减轻心肌缺血再灌注损伤心律失常的发生。见表1。

2.2 缺血范围及梗死范围

缺血范围各组无显著差异,梗死范围DK组显著低于模型对照组($P < 0.01$),表明DK能缩小缺血再灌注后心肌梗死范围。见表1。

2.3 心功能的变化

大鼠心肌缺血再灌注的心功能变化见表2,各组LVSP、 $\pm dp/dt_{max}$ 普遍随时间延长而下降,但模型对照组尤为明显。缺血及再灌注期,模型对照组各指标明显低于同时间段正常对照组($P < 0.05, P < 0.01$)。再灌注期,DK组各指标明显优于模型对照组($P < 0.05, P < 0.01$),虽低于正常对照组但

差异无显著性。表明DK有改善缺血再灌注损伤后心功能作用。

表1 DK对心律失常评分、缺血范围和梗死范围的影响($\bar{x} \pm s, n = 16/8$)

Table 1 Effects of DK on the score of arrhythmia, ischemic zone size and infarction size ($\bar{x} \pm s, n = 16/8$)

组别	心律失常评分 (n=16)		损伤范围 (%) (n=8)	梗死范围 (%) (n=8)
	缺血期	再灌注期		
正常对照组	0	0	0	0
模型对照组	2.94 ± 1.24	3.63 ± 0.96	33.30 ± 0.98	21.42 ± 1.28
DK组	1.94 ± 1.29 ¹⁾	2.75 ± 1.00 ¹⁾	32.85 ± 0.91	11.30 ± 1.18 ²⁾

注:与模型对照组比较:¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$

Note: ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ vs model control group

表2 地奥心血康对大鼠心肌缺血再灌注损伤心功能影响 (n=16, $\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effects of DK on cardiac function of myocardial ischemia reperfusion in rats (n=16, $\bar{x} \pm s$)

组别	时间	LVSP	+ dp/dt	+ dp/dt
		(mmHg)	(mmHg/s)	(mmHg/s)
正常对照组	初始	121 ± 29	3844 ± 1091	2913 ± 932
	30min	118 ± 22	3675 ± 643	2669 ± 815
	60min	120 ± 23	3794 ± 751	2662 ± 722
	90min	113 ± 22	3581 ± 995	2569 ± 719
模型对照组	初始	128 ± 31	3888 ± 1010	2784 ± 888
	30min	106 ± 31	2991 ± 991 ¹⁾	2038 ± 666 ¹⁾
	60min	92 ± 30 ²⁾	2641 ± 882 ²⁾	1919 ± 681 ²⁾
	90min	90 ± 19 ¹⁾	2578 ± 866 ²⁾	1788 ± 568 ²⁾
DK组	初始	124 ± 35	3619 ± 972	2675 ± 847
	30min	109 ± 22	3522 ± 1006	2522 ± 829
	60min	109 ± 21	3475 ± 1036 ³⁾	2416 ± 691 ³⁾
	90min	108 ± 15 ³⁾	3319 ± 954 ³⁾	2313 ± 562 ³⁾
	90min	102 ± 21 ⁴⁾	2950 ± 924 ⁴⁾	2138 ± 598 ⁴⁾

注:与正常对照组比较:¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型对照组比较:³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$; r30, r60和 r90:再灌注30, 60和90min

Note: ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ vs normal control group, ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ vs model control group; r30, r60 and r90: reperfusion 30, 60 and 90 min

2.4 SOD, CAT, GSH-Px, MDA, $Na^+ - K^+ - ATP$ 酶和 $Ca^{2+} - ATP$ 酶 见表3,与正常对照组相比各组SOD, CAT, GSH-Px, $Na^+ - K^+ - ATP$ 酶, $Ca^{2+} - ATP$ 酶活性均明显降低($P < 0.05, P < 0.01$),MDA含量则明显升高($P < 0.01$),但DK组较模型对照组SOD, CAT, GSH-Px, $Na^+ - K^+ - ATP$ 酶、 $Ca^{2+} - ATP$ 酶活性明显升高($P < 0.01$),MDA含量显著降低($P < 0.01$)。表明DK可提高心肌抗氧化剂水平、ATP酶活性和抗脂质过氧化能力。

表 3 DK对心肌 SOD、CAT、GSH-Px、MDA、Na⁺-K⁺ ATP酶及 Ca²⁺-ATP酶的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Tab 3 Effects of DK on SOD, CAT, GSH-Px, MDA, Na⁺-K⁺ ATPase and Ca²⁺-ATPase in myocardium ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	SOD [U/mg(pro)]	CAT [U/mg(pro)]	GSH-Px [U/mg(pro)]	MDA [nmol/mg(pro)]	Na ⁺ -K ⁺ ATP酶 [$\mu\text{molPi}/(\text{mg(pro)} \cdot \text{h})$]	Ca ²⁺ -ATP酶 [$\mu\text{molPi}/(\text{mg(pro)} \cdot \text{h})$]
正常对照组	305.93 ± 12.58	11.38 ± 1.55	24.06 ± 1.01	1.54 ± 0.11	2.58 ± 0.25	2.13 ± 0.28
模型对照组	156.35 ± 12.49 ²⁾	4.54 ± 1.29 ²⁾	17.65 ± 0.82 ²⁾	3.67 ± 0.17 ²⁾	1.72 ± 0.14 ²⁾	1.41 ± 0.11 ²⁾
DK组	221.40 ± 13.26 ²⁾³⁾	9.74 ± 1.29 ¹⁾³⁾	23.03 ± 0.84 ¹⁾³⁾	1.92 ± 0.16 ²⁾³⁾	2.15 ± 0.23 ²⁾³⁾	2.02 ± 0.27 ³⁾

注:与正常对照组比较:¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型对照组比较:³⁾ $P < 0.01$

Note:¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ vs normal control group;³⁾ $P < 0.01$ vs model control group

3 讨论

心功能状态改变为心肌缺血再灌注损伤主要表现之一,具体表现为再灌注损伤后血流的恢复与心功能恢复不一致,甚至恶化。本实验动态观察了心肌缺血前后及再灌注时 ECG及心功能变化,各组 LVSP及 $\pm dp/dt_{\max}$ 随时间呈下降趋势,除缺血再灌注损伤的影响外可能还与手术创伤使血容量下降及开胸使心脏活动环境改变有关,但模型对照组更为明显,术后各时间段尤其再灌注期各项均显著低于正常对照组,说明缺血再灌注损伤使心肌舒缩功能下降。DK治疗组使心功能指标明显优于模型对照组,几乎与正常对照组相同,心律失常评分及心肌梗死范围亦明显低于模型对照组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),手术初始各组心功能指标无明显差异,说明 DK连续 10d 应用对心肌缺血再灌注损伤有保护作用并对正常功能无明显影响。

氧自由基的作用是引起心肌细胞损伤和死亡的重要机制之一,因为它可导致脂质过氧化和蛋白质巯基基团的氧化,并由此引起膜通透性和构型改变。有研究表明,DK可提高 SOD 等内源性抗氧化剂活性,降低脂质过氧化水平,从而对心肌缺血再灌注损伤表现出保护作用^[2]。尽管内源性抗氧化剂之间的作用关系不甚明了,但它们间的平衡作用维持了细胞氧化还原的平衡,阻滞或延缓了自由基对蛋白质、脂质及 DNA 等生物大分子的氧化作用。

ATP酶在心肌生理功能中发挥着重要作用。Ca²⁺-ATP酶是肌浆网的主要成分,负责调控肌浆网 Ca²⁺的摄取,将胞浆内的 Ca²⁺摄入肌浆网中,其转运速率高,在心肌舒张期降低胞浆内 Ca²⁺浓度起着关键作用。若 Ca²⁺-ATP酶的量或活性降低,则会引起肌浆网摄取 Ca²⁺功能的下降,而延缓心肌细胞舒张期 Ca²⁺的下降,导致舒张功能异常。同时使肌浆网 Ca²⁺储备量减少,影响 Ca²⁺释放,从而影响心肌收缩功

能,并且舒张期心肌细胞内 Ca²⁺升高,易诱发心律失常。Na⁺-K⁺-ATP酶主要分布于质膜上,通过细胞内 Na⁺和细胞外 K⁺的跨膜主动交换,使细胞外与细胞内产生 Na⁺浓度梯度,然后通过膜上 Na⁺-Ca²⁺交换器将胞浆中 Ca²⁺排出胞外,维持心肌细胞正常膜电位和生理功能。当 Na⁺-K⁺-ATP酶受抑制时细胞内 Na⁺增多,细胞内 Na⁺, Ca²⁺交换增加,因而促进或加重另一致损伤重要机制 - 钙超载的发生。同时,细胞内钙超载又使黄嘌呤脱氢酶转换为黄嘌呤氧化酶,进而又导致氧自由基产生^[3]。心肌缺血再灌注时产生大量的氧自由基,心肌细胞膜结构上的 Ca²⁺-ATP酶及 Na⁺-K⁺-ATP酶受自由基氧化作用影响而活性下降^[4,5],成为心肌舒缩功能异常乃至心律失常的分子基础。本实验进一步表明 DK可提高心肌内源性抗氧化剂活性和降低脂质过氧化作用,并对心肌 Ca²⁺-ATP酶及 Na⁺-K⁺-ATP酶活性具有保护作用,从而表现出减轻心肌缺血再灌注损伤的作用。

参考文献

- [1] 张立克,王雯,陈瑞芬,等. 细胞色素 p450对大鼠心肌缺血再灌注损伤的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 1999, 15(6): 518.
- [2] 李杨,赵丹,刘子红,等. 地奥心血康对犬心肌缺血再灌注损伤心功能保护作用的细胞学研究 [J]. 白求恩医科大学学报, 1995, 21(3): 238.
- [3] Goldhaber JT, Weiss JN. Oxygen free radicals and cardiac reperfusion abnormalities [J]. Hypertension, 1992, 20(1): 118.
- [4] Dixon IM, Kaneko M, Hata T, et al. Alterations in cardiac membrane Ca²⁺ transport during oxidative stress [J]. Mol Cell Biochem, 1990, 99(2): 125-133.
- [5] Netticadan T, Temsah R, Osada M, et al. Status of Ca²⁺ / calmodulin protein kinase phosphorylation of cardiac SR proteins in ischemia-reperfusion [J]. Am J Physiol, 1999, 277(3 Pt 1): C384.

收稿日期: 2004-03-25