

葛根素对心肌缺血再灌注损伤的保护作用

卢金萍,任江华,姚述远(武汉大学中南医院心内科 湖北 武汉 430071)

摘要:目的 探讨葛根素对心肌缺血再灌注损伤的保护作用,并初步探讨其作用机制。方法 19 只家兔随机分为 3 组:①假手术组(S 组, $n=6$):开胸,左冠状动脉前降支(LAD)只穿线不结扎,旷置 20 min,再观察 6h;②缺血/再灌注组(IR 组, $n=7$);③葛根素治疗组(P 组, $n=6$):两组均开胸结扎免 LAD 20 min,然后松扎 6h。以电镜下心肌超微结构、心率、再灌注心律失常、左室功能、右室血清 SOD 活性和 MDA 的含量及心肌组织中 SOD、MDA、ATP 水平为观察指标。结果 3 组心率均呈进行性下降趋势,其中 IR 组下降幅度最大。P 组左室内压力上升和下降速率及左室内压峰值均显著高于 IR 组($P<0.01$),血清及心肌组织中 SOD 活性和心肌组织中 ATP 含量显著高于 IR 组($P<0.01$),而 MDA 含量明显低于 IR 组($P<0.01$),再灌注心律失常发生率低于 IR 组($P<0.01$),P 组心肌超微结构损害较轻。与 S 组比较,P 组上述各指标均无显著差异($P>0.05$)。结论 葛根素可促进心肌缺血/再灌注损伤心功能的恢复,其作用机制可能与清除氧自由基、改善心肌能量代谢等有关。

关键词:心肌再灌注损伤;葛根素;心室功能;氧自由基;三磷酸腺苷

中图分类号:R986

文献标识码:A

文章编号:1007-7693(2004)04-0268-04

Protective effect of puerarin on myocardial ischemia and reperfusion injury

LU Jing-ping, REN Jiang-hua, YAO Shu-yuan (Department of Cardiology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China)

ABSTRACT:OBJECTIVE To explore the protective effect of puerarin on myocardial ischemia/reperfusion injury (MIRI) and its mechanism. **METHOD** Nineteen rabbits were randomized into three groups: ①sham group (S group, $n=6$): Not ligate the left anterior descending coronary artery after exposing the heart, ②Ischemia/Reperfusion group (IR group, $n=7$), myocardial ischemia was induced by ligating the left anterior descending coronary artery, the ligature was untied 20 minutes later, ③Puerarin group (P group, $n=6$): The I/R rabbits were treated with puerarin. All the indexes (left ventricular function, heart rate, reperfusion arrhythmia,

myocardial ultrastructure, myocardial SOD activity, MDA concentration and ATP level, blood serum SOD activity and MDA concentration) were measured. **RESULTS** The HR of three groups, especially the IR Dengzhanhuasu group, was progressively decreased. Compared with the IR group, both the $+dp/dt_{max}$ and the LVSP of P group were increased evidently ($P < 0.01$ vs IR group), the blood serum and myocardial SOD activity and ATP level were increased obviously ($P < 0.01$, vs IR group), the MDA concentration and reperfusion arrhythmia were reduced markedly ($P < 0.01$, vs IR group), the myocardial ultrastructure of rabbits were improved after treated with puerarin. Compared with the S group, all the indexes of P group were not obviously changed ($P > 0.05$ vs S group). **CONCLUSION** Puerarin may improve MIRI through clearing oxygen derived free radicals and restoring myocardial energy metabolism.

KEY WORDS: myocardial reperfusion injury; puerarin; ventricular function; oxygen derived free radicals; adenosine triphosphate

长时间缺血可造成组织损伤,早期再灌注可挽救缺血的心肌组织。但再灌注本身可引起细胞损伤进一步加重,即再灌注损伤。我们利用家兔缺血再灌注模型来模拟人类心肌梗后的再通过程,以了解再灌注损伤,并加用葛根素进行干预,初步探讨葛根素对缺血再灌注损伤的保护作用及可能机制。

1 材料与方法

1.1 模型制作

健康大耳白家兔 19 只,体重 $2 \sim 2.5$ kg,由武汉生物制品研究所实验动物中心提供。心肌缺血/再灌注模型参照 Simpson 法^[1]进行。经 3%戊巴比妥钠($30 \sim 50$ mg·kg⁻¹)静脉麻醉,气管切开插管以保持呼吸通畅,经左颈总动脉用自制导管插管至左心室,记录左室内收缩峰压(LVSP)、左室内压最大上升和下降速率($\pm dp/dt_{max}$)。以心电图(ECG)测心率(HR),并以 ST 段变化确认心肌缺血及再灌注。

1.2 实验分组

19 只兔随机分为 3 组,①假手术组(S, $n = 6$),开胸后 LAD 只穿线不结扎,旷置 20 min,再观察 6 h;②缺血/再灌注组(IR, $n = 7$),结扎 LAD 20 min,松扎后观察 6 h,其中一例死于再灌注早期室颤。③葛根素治疗组(P, $n = 6$),结扎 LAD 20 min,于结扎前 5 min 于耳缘静脉缓慢注射葛根素(100 mg·kg⁻¹,用生理盐水稀释),松扎后观察 6 h;其它 2 组均由耳缘静脉以静脉输液泵恒速(每小时 10 mL·kg⁻¹)输入等量生理盐水。

1.3 测定指标和方法

1.3.1 心肌组织透射电镜观察 实验终止时取左室缺血区小块心肌组织,置于 2.5%戊二醛中固定,常规脱水,环氧树包埋,超薄切片,在投射电镜下观察心肌组织超微结构并摄片。放大倍数为 20 000 倍。

1.3.2 心率 分别于手术前、处理(旷置或结扎)20 min、再灌注后 0.5、1、2、4、6 h 时用多导生理记录仪记录心电图,计算各时相心率。并观察缺血及再灌注后心律的改变。

1.3.3 心功能参数 用多导生理记录仪分别于开胸前、处理 20 min、再灌注后 0.5、1、2、4、6 h 时记录 LVSP, $\pm dp/dt_{max}$,以 LVSP、 $+ dp/dt_{max}$ 作为收缩功能的指标,以 $- dp/dt_{max}$ 作为舒张功能的指标。

1.3.4 心肌组织中 ATP 含量 实验终止时取心尖部心肌组织 $50 \sim 80$ mg 迅速置于液氮中制成冰冻薄片,称重后以 3.

6%高氯酸(每 1 mg 组织加高氯酸 20μ L)在冰浴玻璃匀浆器中制成匀浆。低温($0 \sim 4$ °C)离心 5 min,取上清液以 0.5 mol·L⁻¹ KOH 调至 PH $7.6 \sim 7.8$,再低温离心 5 min,取上清液 15μ L,采用生物发光法上机检测。

1.3.5 血清超氧化物歧化酶(SOD)及丙二醛(MDA)检测 于实验终止时由右心室抽血 2 mL,按试剂盒说明书操作(由南京建成生物公司提供试剂盒)。

1.3.6 心肌组织中 SOD 及 MDA 检测 实验终止时,取缺血区心肌组织约 200 mg,放入冰盐水中漂洗,称重,用 PBS 缓冲液制成 10%的匀浆,4 °C 500 r/min,离心 15 min,取上清液测定 MDA, SOD,蛋白定量。

1.4 统计学分析

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用成组资料 t 检验,组间总体率的比较用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 认为有显著性差异。

2 结果

2.1 电镜下心肌超微结构改变

假手术组(S):心肌纤维排列连续规则,Z 线明显,H 带可辨,闰盘处肌丝结构完整。线粒体结构完整、清晰,嵴排列整齐,嵴间隙明显。并可见较丰富糖原颗粒。

缺血/再灌注组(IR):肌丝结构不完整,部分肌丝断裂。线粒体排列紊乱,部分线粒体肿胀,脊紊乱、稀疏,呈细颗粒状。无明显糖原颗粒可见。

葛根素治疗组(P):肌丝结构完整连续。线粒体嵴排列整齐,肿胀及空泡明显减轻。并可见较多糖原颗粒。

2.2 心率

3 组不同时相的心率比较,基础值各组心率无显著差别,而缺血 20 min 及再灌注 0.5、1、2、4、6 h 时出现显著变化,表现为 3 组心率均呈渐进性下降趋势,其中 IR 组下降最为显著,至再灌 6 h,几乎为严重心动过缓,与 S 组及 P 组比较, P 均 < 0.01 。而 S 及 P 组至再灌注 6 h,仍能保持一定的心率水平。见表 1。

2.3 心功能(表 1)

P 组与 S 组 LVSP、 $\pm dp/dt_{max}$, 各时相无显著性差异($P > 0.05$)。P 组与 IR 组比较, LVSP、 $\pm dp/dt_{max}$ 基础值无显著性差异($P > 0.05$),而缺血及再灌注后各时相, P 组 LVSP、 $\pm dp/dt_{max}$ 均明显高于 IR 组(P 均 < 0.01)。见表 1。

表 1 三组各时相心功能指标的比较($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab 1 The comparison of myocardial function indexes of three groups during different phases 较($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	指标	基础值	处理		再灌注			
			20 min	30 min	60 min	120 min	240 min	360 min
S	HR(bpm)	290 ± 24.5	263 ± 9.6 ¹⁾	258 ± 12.6 ²⁾	250 ± 8.2 ²⁾	253 ± 17.1 ¹⁾	200 ± 17.2 ¹⁾	198 ± 12.6 ¹⁾
	LVSP(mmHg)	110 ± 15.8	85 ± 20.8 ²⁾	86.3 ± 21.4 ²⁾	102 ± 19.4 ¹⁾	92.5 ± 15.5 ¹⁾	91.3 ± 11.1 ¹⁾	90 ± 10.8 ¹⁾
	+ dp/ dt (mmHg · s ⁻¹)	3950 ± 100	3463 ± 471 ¹⁾	3463 ± 471 ¹⁾	3650 ± 332 ¹⁾	3550 ± 507 ¹⁾	3150 ± 843 ¹⁾	3225 ± 427 ¹⁾
	s ⁻¹ dp/ dt (mmHg · s ⁻¹)	3155 ± 459	2463 ± 594 ¹⁾	2488 ± 622 ²⁾	2820 ± 618 ¹⁾	3025 ± 591 ¹⁾	2700 ± 672 ¹⁾	2488 ± 598 ¹⁾
IS	HR(bpm)	294 ± 13.4	234 ± 13.7	213 ± 34.2	214 ± 27.9	178 ± 23.4	173.21 ± 7	162 ± 17.8
	LVSP(mmHg)	109 ± 12.5	76.3 ± 10.7	74.3 ± 17.2	70.5 ± 14.1	80 ± 8.0	68.5 ± 10.5	57.3 ± 18.0
	+ dp/ dt (mmHg · s ⁻¹)	3825 ± 222	2615 ± 464	251.5 ± 355	2265 ± 338	2577 ± 373	2015 ± 572	1725 ± 352
	s ⁻¹ dp/ dt (mmHg · s ⁻¹)	3025 ± 814	2063 ± 379	2050 ± 368	2050 ± 368	2063 ± 390	1830 ± 366	1600 ± 346
P	HR(bpm)	291 ± 15.5	262 ± 18.4 ¹⁾	256 ± 13.5 ²⁾	248 ± 16.3 ²⁾	240 ± 22.6 ¹⁾	208 ± 25.3 ¹⁾	200 ± 20.9
	LVSP(mmHg)	110 ± 16.9	87 ± 21.4 ²⁾	89 ± 19.6 ²⁾	101 ± 19.8 ¹⁾	90 ± 15.8 ¹⁾	90 ± 11.5 ¹⁾	90 ± 11.2 ¹⁾
	+ dp/ dt (mmHg · s ⁻¹)	3900 ± 100	3432 ± 321 ¹⁾	3411 ± 346 ¹⁾	3588 ± 309 ¹⁾	3600 ± 305 ¹⁾	3299 ± 353 ¹⁾	3265 ± 358 ¹⁾
	s ⁻¹ dp/ dt (mmHg · s ⁻¹)	3167 ± 418	2458 ± 603 ¹⁾	2550 ± 632 ²⁾	2847 ± 796 ¹⁾	3033 ± 681 ¹⁾	2732 ± 823 ¹⁾	2456 ± 612 ¹⁾

注: P 组及 S 组与 IS 组比较: ¹⁾ $P < 0.01$, ²⁾ $P < 0.05$; P 组与 S 组比较: $P > 0.05$

Note: P group and S group compared with the control group, ¹⁾ $P < 0.01$, ²⁾ $P < 0.05$; P group compared with the S group, $P > 0.05$

2.3 心电图 (表 2)

结扎左冠状动脉前降支期间, IR 组 7 例中 4 例, P 组 6 例中有 2 例 ECG 出现心律失常, 主要表现为室性早搏, 所有动物均出现 ST 段抬高, T 波高耸或倒置, R 波低电压。再灌注期, 所有动物抬高的 ST 段均回到等电位线, IR 组有 5 例于再灌注早期出现室性心律失常, 其中 1 例为室速, 静脉推注利多卡因后恢复, 1 例死于心室纤颤。心律失常大多出现在再灌注后 0.5h 至 1h, 2h 后可自行消失。P 组有 1 例于再灌注后 0.5h 至 1h 出现偶发室性早搏, 未经处理, 自行消失。S 组未见明显心律失常。见表 2。

表 2 三组再灌注心律失常发生率比较

Tab 2 Comparison of reperfusion arrhythmia incidence rate of three groups

表 3 三组 SOD, MDA 及 ATP 的比较($\bar{x} \pm s$)

Tab 3 The comparison of SOD, MDA and ATP of three groups($\bar{x} \pm s$)

组 别	SOD 活性		MDA 含量		ATP 含量
	血 清 ($\text{NU} \cdot \text{mL}^{-1}$)	心肌组织 ($\text{NU} \cdot \text{mL}^{-1}$)	血 清 ($\text{nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$)	心肌组织 ($\text{nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$)	心肌组织中 ($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$)
S	420.02 ± 27.93 ²⁾	226.50 ± 36.35 ²⁾	3.30 ± 0.52 ²⁾	1.67 ± 0.21 ²⁾	0.409 ± 0.102 ²⁾
IR	314.76 ± 28.06	98.51 ± 18.36	5.17 ± 0.76	3.68 ± 0.59	0.116 ± 0.094
P	412.70 ± 30.11 ²⁾	207.09 ± 40.12 ²⁾	3.87 ± 0.58 ²⁾	1.88 ± 0.38 ²⁾	0.398 ± 0.104 ²⁾

注: P 组及 S 组与 IS 组比较: ²⁾ $P < 0.01$; P 组与 S 组比较: $P > 0.05$

Note: P group and S group compared with the IS group, ²⁾ $P < 0.01$; P group compared with the S group, $P > 0.05$

3 讨论

3.1 葛根素的抗心肌缺血再灌注损伤作用

本研究结果显示, 再灌注期虽然血管完全再通, 但心脏收缩功能障碍持续存在, 同时也存在舒张功能的减弱。此时心率与心脏做功都下降, 心脏处于相对低水平状态。本实验研究表明, 葛根素可改善心脏的舒缩功能, 具有抗心律失常作用, 降低再灌注心律失常的发生率; 同时明显减轻心肌超微结构损害, 对心肌缺血再灌注损伤具有明显的保护作用。

3.2 葛根素对心肌缺血再灌注损伤的保护机制

3.2.1 抗氧化作用 本研究结果显示, 心肌缺血再灌注后,

心肌组织及血清中具有清除自由基作用的 SOD 活性降低, 脂质过氧化终产物 MDA 含量增高, 与文献报道相符。反映心肌缺血再灌注后确实存在脂质过氧化反应增强, 氧化酶活性下降。

自由基增多和氧自由基触发的脂质过氧化反应是导致缺血性损伤及再灌注损伤的主要病理基础, MDA 是脂质过氧化反应的终产物。因此, MDA 不仅反映脂质过氧化程度, 也间接反映氧自由基生成的量。本实验结果显示, 葛根素使缺血心肌再灌注过程中明显增高的 MDA 浓度很快下降, 并能使 SOD 活性明显升高。说明葛根素具有较强的抗氧自由

基损伤及抗膜脂质过氧化作用。其作用机制可能在于其一方面减少氧自由基的产生,一方面通过激活抗氧化酶 SOD 活性,清除氧自由基,降低脂质过氧化物,从而发挥抗脂质过氧化损伤的作用。

3.2.2 提高心肌组织能源储备 当冠脉血流严重下降或中断时,心肌代谢发生重大变化:葡萄糖供应严重下降或中断,细胞内糖原储存显著消耗;碳水化合物和脂肪酸氧化停止,而糖酵解成为主要能量来源,导致 ATP 生成减少^[2,3]。近年来研究证明,增加心肌糖原含量并不增加缺血期糖原分解的绝对速度,却可促进再灌注后心肌糖原再合成及功能恢复;缺血期心肌糖原含量与再灌注后功能恢复呈正线性关系^[4,5]。现已共识,缺血期糖原分解产生有限的 ATP 通过特异性优先支持细胞膜 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶和肌浆网 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP}$ 酶活性,可更好地维持细胞内稳态,减轻再灌注后 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 超负荷,因此促进了心肌功能恢复。总之,缺血期只要有糖原产能存在就表现其心肌保护作用,一旦糖原分解耗竭则表现其酸中毒作用^[4,5]。而心肌 ATP 与心功能恢复之间,ATP 存在一个阈浓度,低于此浓度心功能的恢复是不可能的,ATP 浓度为零时可致不可逆心肌痉挛。

本实验结果显示葛根素可明显提高再灌注后 6h 心肌组织中 ATP 水平,且糖原颗粒明显可见,心脏舒缩功能明显改善。其机制可能是:①葛根素可增加冠脉血流量,改善心肌

供血,使葡萄糖的摄取增加,进而阻止储存糖原的快速耗竭。

②再灌注期,ATP 主要由二磷酸腺苷和无机磷通过氧化磷酸化再合成,这一过程在线粒体内完成。因此,线粒体的结构和功能对 ATP 的生成有重要作用。本实验表明葛根素组线粒体结构较完整。

参考文献

- [1] Simpson PJ, Fantone JC, Mickelson JK, *et al*. Identification of a time window for therapy to reduce experiment canine myocardial injury: suppression of neutrophil activation during 72 hours of reperfusion[J]. *Circ Res*, 1998, 63: 1070.
- [2] Stanley WC, Lopaschuk GD, Hall JK, McCormack JG. Regulation of myocardial carbohydrate metabolism under normal and ischemic conditions: potential for pharmacological interventions[J]. *Cardiovasc Res*, 1997, 33: 234.
- [3] Opie L. The Heart: physiology, from cell to circulation[M]. Philadelphia: Lippincott - Raven, 1998.
- [4] Cross HR, Opie LH, Radda GK, *et al*. Is a high glycogen content beneficial or detrimental to the ischemic rat heart? A controversy resolved[J]. *Circ Res*, 1996, 78(3): 482.
- [5] Depre C, Hue L. Inhibition of glycogenolysis by a glucose analogue in the waking rat heart[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1997, 29(8): 2253.