

杜仲多糖对兔心肌缺血再灌注损伤的保护作用

郭晓臣, 欧阳辉*, 张近宝, 岳 琴, 辛 东, 李运明

中国人民解放军成都军区总医院心血管外科中心, 四川 成都 610083

摘 要: 目的 探讨杜仲多糖对兔心肌缺血再灌注损伤的保护作用。方法 将兔随机分为4组(每组8只), 即假手术组、缺血再灌注组、丹参片预处理组、杜仲多糖预处理组。监测各组兔血清心肌酶谱、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)等水平的变化。结果 杜仲多糖预处理组心肌酶、SOD、MDA含量与缺血再灌注组、丹参预处理组比较差异显著($P < 0.05$)。

结论 杜仲多糖对兔心肌缺血再灌注损伤能够产生较好的保护作用。

关键词: 心肌缺血; 缺血再灌注损伤; 杜仲多糖; 杜仲

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2014)01-0034-03

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2014.01.008

Preservation of *Eucommia ulmoides* polysaccharides on rabbit with myocardial ischemia-reperfusion injury

WU Xiao-chen, OUYANG Hui, ZHANG Jin-bao, YUE Qin, XIN Dong, LI Yun-ming

Department of Cardiovascular Surgery Center, Chengdu Military General Hospital, Chengdu 610083, China

Abstract: Objective To demonstrate the effect of *Eucommia ulmoides* polysaccharides (EUP) on rabbit myocardial ischemia-reperfusion injury model. **Methods** Rabbits were divided into four groups including Sham group, ischemia-reperfusion group, groups pretreated with *Salvia miltiorrhiza* and EUP. And the indexes of CK, CK-MB, LDH, AST, SOD, and MDA were detected. **Results** Results showed that those indexes in group pretreated with EUP differed significantly from other groups ($P < 0.05$). **Conclusion** It shows that EUP may decrease the injury of myocardial ischemia-reperfusion so as to get the better protection of rabbits.

Key words: myocardial ischemia; ischemia-reperfusion injury; *Eucommia ulmoides* polysaccharides; *Eucommia ulmoides* Oliv.

杜仲多糖是从杜仲科植物杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. 的干燥树皮中提取的水溶性糖性成分, 是近年来研究较为活跃的活性成分。这些多糖参与了生物体中细胞的各种活动, 具有抗肿瘤和免疫促进、抗炎、抗病毒、抗凝血、降血糖、降血脂、抗疲劳、抗衰老等作用^[1]。为明确杜仲多糖对心肌缺血的保护作用, 本研究在兔心肌梗死模型上进行动物实验, 观察杜仲多糖对兔实验性心肌缺血再灌注损伤的影响。

1 材料与方法

1.1 动物与试剂

取清洁级健康家兔32只, 体质量2.0~3.0 kg, 雌雄各半, 由四川省成都达硕生物科技有限公司提供, 动物许可证号: SCXK(川)2013-24。丹参片, 规格0.26 g/片, 由山东鲁药制药有限公司提供, 研

磨成粉末后以灭菌注射用水调成260 mg/mL悬液备用^[2]。血清肌酸激酶(CK)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)、乳酸脱氢酶(LDH)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)试剂盒, 北京众生康生物工程公司; 超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)试剂盒, 上海佳和生物科技有限公司提供。

1.2 动物模型制备^[3]

家兔麻醉采用3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)经耳缘iv麻醉, 同时经耳缘iv利多卡因(1 mg/kg), 以防手术过程中突发心律失常死亡。整个手术过程不用气管插管和呼吸机, 麻醉后将动物仰卧位固定于手术台, 剪除胸前区兔毛, 碘伏消毒后沿胸骨左缘切开皮肤及皮下, 剪断左侧第3和第4肋软骨, 暴露兔纵隔和心脏, 务必保持两侧胸膜完整, 否则易至家兔死亡。纵行切开心包, 显露左室支, 于左

收稿日期: 2013-08-26

作者简介: 郭晓臣(1981—), 男, 博士, 研究方向为杜仲多糖预处理在体外循环中的心肌保护作用。

*通信作者 欧阳辉, 男, 副主任医师。Tel: (028)86571263 E-mail: nowwilson@yeah.net

心耳下约 2 mm 处缝扎左室支。左心室前壁及心尖部颜色变暗、搏动减弱,表明左室支完全结扎。心肌缺血的方法为:将缝线缝好后,打结的同时将一小段 8 号导尿管打入节中,起到压迫冠脉的作用,同时观察心肌颜色及搏动反应结扎效果。再灌注的方法:将导尿管小心取出即可。逐层关胸。术后每日 2 次 im 0.3 g 头孢唑林钠。术后经心功能超声心动图评价。

假手术组做心肌缝合结扎,但不结扎冠状动脉,其余包括术后处理同冠脉结扎组。

1.3 杜仲多糖萃取^[4]

取杜仲皮,粉碎,经无水乙醇回流后冷却滤过,加入纯化水反复 3 次提纯滤过,合并 3 次滤液浓缩得粗提液。取粗提液经三氯甲烷和正丁醇反复萃取、分离,直到最后一次的水相 Molish 反应为阴性即得最终的水相溶液,将该水相溶液依次经过无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤沉淀,沉淀后烘干,即得杜仲多糖。采用硫酸-苯酚法鉴定^[5],即取本品 4.2 mg 加蒸馏水配成 100 mL 溶液,吸取 2 mL,加 5 mL 5% 的苯酚溶液后再加 7.5 mL 浓硫酸,以蒸馏水为空白对照,观察颜色变化。

1.4 分组与给药

家兔随机分为 4 组,每组 8 只:假手术组:完成相同的各项手术操作,只缝线,不结扎冠状动脉;缺血再灌注组:将缝线收紧使心肌持续缺血 30 min,将缝线松开使心肌再灌注 2 h,术前采用每日生理盐水 10 mL ig 1 次,连续 7 d,本组也作为安慰剂对照组;丹参片组:持续缺血 30 min,再灌注 2 h;手术前每日丹参片 260 mg/kg ig 1 次,连续 7 d。杜仲多糖组:持续缺血 30 min,再灌注 2 h。手术前每日杜仲多糖 200 mg/kg ig 1 次,连续 7 d。

1.5 指标测定

实验结束后抽取各组兔右心房血 2 mL,用全自动生化分析仪测定血清心肌酶(CK、CK-MB、LDH、AST)活性。血清 SOD、MDA 水平测定分别按试剂盒说明进行操作。

1.6 统计学方法

采用 SPSS16.0 进行统计学分析。计量变量采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数变量采用频数和百分比表示。计量变量组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验。计数变量组间比较采用 χ^2 检验,组间两两比较采用分割 χ^2 检验。

2 结果

2.1 心肌缺血再灌注损伤家兔模型

动物模型制作后经心功能超声心动图评价(图 1)模型制作是否成功。在二维切面上显示胸骨旁左心短轴乳头肌水平观察,前侧壁变薄,运动减弱且僵硬,表示模型制作成功。

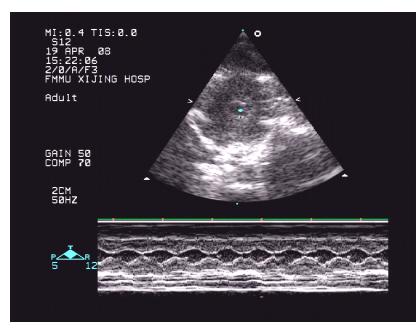


图 1 心肌缺血再灌注损伤家兔超声心动图

Fig. 1 Echocardiography of Myocardial ischemia-reperfusion injury in rabbits

2.2 对血清心肌酶谱的影响

结果见表 1,缺血再灌注组心肌酶水平升高,与假手术组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。缺血再灌注组升高最为显著,与其他组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。杜仲多糖组与丹参片组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 对血清 SOD 和 MDA 的影响

结果见表 2,缺血再灌注组、丹参片组、杜仲多糖组血清 SOD 活性均降低,MDA 含量均增高,与假手术组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$),杜仲多糖组 SOD 水平与丹参片组比较差异也有统计学意义($P < 0.001$),但 MDA 无统计学意义。

表 1 各组血清心肌酶谱水平

Table 1 Myocardium-enzymogram of rabbits in each group

组别	CK/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	CK-MB/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	LDH/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	AST/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
假手术	208.37 $\pm$ 21.09	28.7 $\pm$ 4.39	137.42 $\pm$ 30.13	48.73 $\pm$ 16.42
缺血再灌注	1 879.29 $\pm$ 228.34*	101.07 $\pm$ 19.34*	467.88 $\pm$ 50.23*	221.48 $\pm$ 41.39*
丹参片	1 312.52 $\pm$ 141.23 [#]	78.72 $\pm$ 11.15 [#]	308.07 $\pm$ 31.87 [#]	112.69 $\pm$ 28.88 [#]
杜仲多糖	989.77 $\pm$ 103.67 ^{#Δ}	47.3 $\pm$ 8.54 ^{#Δ}	201.25 $\pm$ 26.77 ^{#Δ}	79.64 $\pm$ 18.58 ^{#Δ}

与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与缺血再灌注组比较: [#] $P < 0.05$; 与丹参片组比较: ^Δ $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs ischemia-reperfusion group; ^Δ $P < 0.05$ vs danshen group

表2 各组血清 SOD 和 MDA 水平
Table 2 Blood serum levels of SOD and MDA of rabbits in each group

组别	SOD/(nU·mL ⁻¹)	MDA/(nmol·L ⁻¹)
假手术	166.12±6.88	2.17±0.38
缺血再灌注	79.22±5.14*	3.67±0.77*
丹参片	98.42±5.78 [#]	2.76±0.55 [#]
杜仲多糖	124.33±10.56 ^{##}	2.19±0.61 [#]

与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与缺血再灌注组比较: [#] $P < 0.05$; 与丹参片组比较: ^{##} $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs ischemia-reperfusion group;

^{##} $P < 0.05$ vs danshen group

3 讨论

中药在心血管疾病的基础与临床研究中应用较广, 尤其是有关抗心肌缺血的研究一直是现代中药药理及临床应用研究的热点, 其中主要涉及的中药以复方和中药单体较多^[6]。

杜仲为杜仲科杜仲属植物杜仲的干燥树皮, 是我国仅存的植物“活化石”^[7]。有研究表明杜仲多糖能降低心肌低氧小鼠的耗氧量^[8], 延长心肌低氧小鼠的低氧存活时间, 延长失血性休克小鼠的心搏时间和离体鼠头的呼吸维持时间, 增强心肌和脑的耐低氧能力, 对心肌耗氧量增加、急性脑缺血和失血性休克小鼠的心脑功能具有保护作用。

本研究为进一步证实杜仲多糖对心肌缺血再灌注损伤的保护作用, 采用家兔心肌梗死模型, 以杜仲多糖和丹参为预处理试验组, 以假手术组和缺血再灌注安慰剂组为对照组, 观察杜仲多糖预处理对心肌缺血再灌注损伤的保护作用。采用结扎冠状动脉造成急性心肌梗死的外科手术方法建立实验性家兔缺血再灌注应模型。实验结果显示, 缺血再灌注组心肌酶水平升高最为明显, 说明心肌损伤最为严重、梗死范围大, 杜仲多糖预处理组的心肌损伤较轻, 丹参预处理对心肌缺血再灌注损伤也有一定的保护作用, 但本实验数据看其作用不如杜仲多糖显著, 当然, 两组 MDA 水平无统计学意义($P=0.070$)有可能是实验样本较小的原因。

研究表明氧自由基的生成是心肌缺血再灌注损伤的主要机制之一^[9]。心肌缺血再灌注损伤时, 自由基产生增加, 同时体内 SOD 等自由基清除酶活

性降低, 组织内抗氧化能力下降, 其过氧化产物 MDA 对细胞膜有很强的破坏作用^[10], 最终导致心肌细胞从可逆性损伤发展至不可逆损伤, 直至细胞死亡。本实验发现心肌缺血再灌注组家兔 SOD 活性降低、MDA 的量增高明显, 说明了体内脂质过氧化反应比较强烈, 细胞膜、线粒体膜和磷脂膜等受到严重损伤, 器官损害程度较重, 而杜仲多糖有抗氧化及对网状内皮系统有活化作用, 增强机体非特异免疫功能^[11], 杜仲多糖预处理组家兔血清中 SOD 活性升高、MDA 的量降低, 通过保护 SOD 活力、提高清除氧自由基的能力、减少脂质过氧化物的形成、抑制氧自由基介导的心肌细胞损害等机制对心肌缺血再灌注损伤起保护作用。

参考文献

- [1] 谭周进, 谢达平. 多糖的研究进展 [J]. 食品科技, 2002, 3(1): 10-12.
- [2] 李春杰, 曹洪欣, 余柏林. 中药预处理对家兔心肌缺血再灌注损伤保护作用的实验研究 [J]. 2004, 22(10): 1872-1873.
- [3] 董安平, 韩克, 马爱群, 等. 兔心肌梗死模型的建立及心功能的超声评价 [J]. 中国医学影像技术, 2003, 19(8): 964-966.
- [4] Suzuki I. *Immunomodulation by Microbial. Products and related synthetic compounds* [M]. Amsterdam: Excerpta Medica, 1981. 347-349.
- [5] 辛晓明, 王浩, 冯蕾, 等. 杜仲总多糖对环磷酸腺苷致免疫低下小鼠的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2007, 14(10): 28-29.
- [6] 唐铁军. 抗心肌缺血中药实验研究进展 [J]. 深圳中西医结合杂志, 2003, 13(2): 111-113.
- [7] 陈建明. 关于杜仲的概述 [J]. 遵义科技, 2004, 11(3): 142-146.
- [8] 辛晓明, 王远丽, 王浩, 等. 杜仲总多糖对小鼠耐缺氧能力的影响 [J]. 医药导报, 2009, 28(2): 160-162.
- [9] Heares D J, Bolli R. Reperfusion induced injury manifestations, mechanism and clinical relevance [J]. *Cardiovas Res*, 1992, 26(2): 101-108.
- [10] 华钊, 程时. 心肌缺血再灌注损伤与生物膜损伤 [J]. 基础医学与临床, 1993, 13(1): 26-29.
- [11] 杜红岩. 杜仲活性成分与药理研究的新进展 [J]. 经济林研究, 2003, 21(2): 58-61.