丹酚酸B预处理对心肌缺血/再灌注损伤能量代谢的影响

夏　杨，张惠军，聂亚莉
武警北京总队医院内四科，北京 100027

摘　要：目的　观察丹酚酸B预处理对大鼠心肌缺血/再灌注损伤（MI/RI）能量代谢的作用。**方法**　通过结扎冠状动脉30 min再灌注2 h建立大鼠MI/RI模型，随机分为4组：假手术组、模型组及丹酚酸B高、低（20、10 mg/kg）组，于建立模型前7 d开始ip给药，每天1次；再灌注结束后，采用比色法测定血清乳酸脱氢酶（LDH）、肌酸激酶（CK）活力，染色法测定心肌梗死面积（MIA），定磷法测定心肌组织Na^+-K^+-ATP酶、Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP酶活性。**结果**　与模型组（42.60%）比较，丹酚酸B高、低剂量组的MIA分别缩小至35.93%和37.21%，差异显著（P＜0.05）；与模型组比较，丹酚酸B高、低剂量组血清CK、LDH活力均显著降低（P＜0.05、0.01）；与模型组比较，丹酚酸B高、低剂量组心肌组织Na^+-K^+-ATP酶、Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP酶活性均显著升高（P＜0.05、0.01）。**结论**　丹酚酸B预处理可保护MI/RI所致心肌损伤，作用途径可能与改善心肌组织的能量代谢相关。

关键词： 丹酚酸B；心肌缺血/再灌注损伤；大鼠；能量代谢；Na^+-K^+-ATP酶；Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP酶
中图分类号： R962.2　　**文献标志码：** A　　**文章编号：** 1674-6376（2018）12-2210-04
DOI： 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.12.014

Salvianolic acid B pretreatment protects myocardial ischemia / reperfusion injury through improvement of energy metabolism

XIA Yang, ZHANG Huijun, NIE Yali
Fourth Department of Internal Medicine, Beijing Armed Police Forces Hospital, Beijing 100027, China

Abstract: Objective　To investigate the effects of Salvianolic acid B (Sal B) pretreatment against myocardial ischemia/reperfusion injury (MI/RI) in rats. **Methods**　MI/RI rats model was established by 30 min of coronary artery ligation and subsequent 2 h of reperfusion. Rats were randomly divided into four groups (n = 10): sham group, model group, and Sal B low (10 mg/kg) and high dose (20 mg/kg) group. Before the modeling operation, Sal B was injected intraperitoneal once daily for 7 d. After the modeling operation, the activities of creatine kinase (CK) and lactate dehydrogenase (LDH) in serum of rats were detected by chromatometry, myocardial infarction area (MIA) in rats were examined by staining method and Na^+-K^+-ATPase and Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATPase activities in myocardial tissues were determined by phosphorus method. **Results**　Compared with model group, high and low doses of Sal B significantly reduced MIA to 35.93% and 37.21%, respectively (P < 0.05). Compared with model group, the activities of serum CK and LDH activities in Sal B high and low dose groups were significantly decreased (P < 0.05, 0.01); Compared with model group, the activities of Na^+-K^+-ATPase and Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATPase in myocardium of Sal B high and low dose groups were significantly increased (P < 0.05 and 0.01). **Conclusion**　Sal B pretreatment could protect MI/RI, and its effects maybe related with the improvement of myocardial energy metabolism.

Key words: Salvianolic acid B; myocardial ischemia/reperfusion injury; Rat; energy metabolism

丹酚酸B为唇形科鼠尾草属植物丹参*Salvia miltiorrhiza* Bge.的根或根茎中的活性成分，现代药理学研究表明，丹酚酸B具有抗脂质过氧化、抗肝纤维化、抗动脉粥样硬化、清除自由基、钙拮抗及改善记忆功能障碍等多种生物学活性[1-2]。近年文献报道，丹酚酸B可改善实验动物的心肌细胞损伤[3-4]，然机制尚未阐明。本研究拟应用心肌缺血/再灌注损伤（myocardial ischemia/reperfusion，MI/RI）大鼠模型，探讨丹酚酸B保护心肌的作用机制。

收稿日期： 2018-06-28
第一作者： 夏　杨，女，硕士，主治医师。研究方向为心血管疾病的防治。Tel：（010）56391188 E-mail：jiazhijiao@126.com

1 材料

1.1 药品及主要试剂

丹酚酸B，质量分数100%，批号100081-201604，由中国食品药品检定研究院提供，以生理盐水配成所需浓度。氯化硝基四氮唑蓝（NBT）、考马斯亮蓝试剂盒、乳酸脱氢酶（LDH）试剂盒、肌酸激酶（CK）试剂盒、ATP酶试剂盒，均由南京建成生物工程研究所提供。

1.2 实验动物

SD大鼠，雌雄各半，体质量（200±20）g，实验动物生产许可证号为SCXK（冀）2015-1003，由河北医科大学实验动物中心提供。

1.3 主要仪器

DW-3000型小动物人工呼吸机，安徽正华生物仪器设备有限公司；ECG-1350P型十二导联心电图机，日本光电工业株式会社；T10型组织电动匀浆机，德国IKA集团；UV-2550型紫外/可见分光光度计，日本岛津公司。

2 方法

2.1 MI/RI大鼠模型的制备

参照文献[5]方法，行冠脉结扎术。取大鼠，麻醉后仰位固定，颈部做切口，接入人工呼吸机（潮气量为20 mL/kg，呼吸频率为60次/min），四肢连接心电图机，于胸骨左旁第三、四肋间开胸，使心脏暴露，用带线缝合针于左心耳下缘的冠脉前降支起始部约4 mm位置处进针，深度约1 mm，取一段直径1.5 mm的乳胶管放于缝合线下方，继而将缝合线结扎致心肌组织缺血。缺血时间30 min后，可观察到大鼠心电图的ST段有显著抬高或者T波高耸，继而松开缝合线再灌注2 h，观察到心电图抬高的ST段下降一半以上或者高耸的T波下降则为再灌注成功。

2.2 分组和给药

将术后成模动物60只随机分为：模型组和丹酚酸B高、低剂量组（20、10 mg/kg），每组20只，另取20只动物仅开胸不结扎冠脉作为假手术组。各组均于术前7 d开始ip给药，每天1次，假手术组和模型组ip等量生理盐水。

2.3 测定血清心肌酶活力

再灌注结束后，各组随机取10只动物由腹主动脉取血，室温静置30 min，2 500 r/min离心10 min后取血清，试剂盒法检测CK、LDH活性，操作严格按试剂盒说明书进行，采用比色法于分光光度计660 nm处测定吸光度（A）值，计算CK活力；于440 nm下测定A值，计算LDH活力。

2.4 测定心肌梗死面积

取采血后动物的心脏，冰浴生理盐水洗净，弃除脂肪、血管及心房组织，将心室（自冠脉结扎线下方至心尖处）平行切成厚度相同的5片，置37 ℃环境下加入0.1% NBT染色15 min。通过数码相机采集图像，利用ImagePro Plus 7.0软件测算心室总面积和梗死区面积（正常心肌呈现蓝色，梗死心肌呈现灰白色），并计算心肌梗死率（%）[6]。

心肌梗死率＝梗死区面积/心室总面积

2.5 测定心肌ATP酶活性

各组取剩余10只动物的心脏，冰浴生理盐水洗净，用组织匀浆机制备匀浆，经低温离心机3 500 r/min离心10 min后取上清，采用考马斯亮蓝法对蛋白浓度定量，采用定磷法于660 nm下测定A值，计算ATP酶活性，操作严格按试剂盒说明书进行。

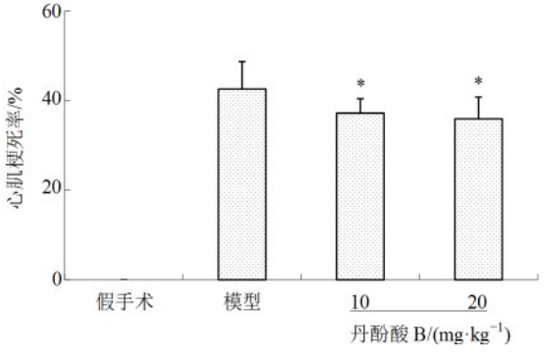
2.6 统计学处理

用SPSS 22.0软件处理数据，结果以$\bar{x} \pm s$表示，采用单因素方差分析进行多组间比较，采用LSD-t检验进行两两比较。

3 结果

3.1 各组心肌梗死情况

结果表明，模型组大鼠心肌梗死率达42.60%，丹酚酸B低、高剂量组动物的心肌梗死率分别缩小至37.21%和35.93%，与模型组比较差异均有统计学意义（$P<0.05$）。假手术组大鼠因未出现心肌梗死，心肌梗死率未纳入统计学比较。见图1。



与模型组比较：*$P<0.05$

*$P < 0.05$ *vs* model group

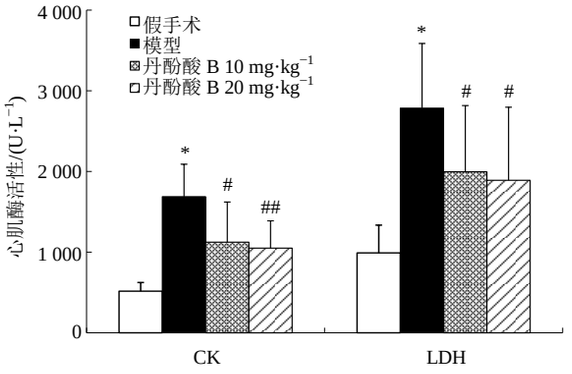
图1 各组心肌梗死率比较（$\bar{x} \pm s$，$n = 10$）

Fig. 1 Comparison of myocardial infarction rates ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

3.2 各组心肌酶活力

假手术组大鼠血清LDH、CK活力分别为990.12、516.33 U/L，模型组动物血清LDH、CK活力

升高至2 784.60、1 688.41 U/L，与假手术组比较差异显著（$P<0.01$）；与模型组比较，丹酚酸B预处理可显著降低动物血清LDH和CK活力，低、高剂量组血清LDH活力分别降低为1 996.28、1 890.77 U/L（$P<0.05$），CK活力分别降低为1 123.80、1 050.66 U/L（$P<0.05$、0.01）。见图2。



与假手术组比较：$^{*}P<0.01$；与模型组比较：$^{\#}P<0.05$ $^{\#\#}P<0.01$

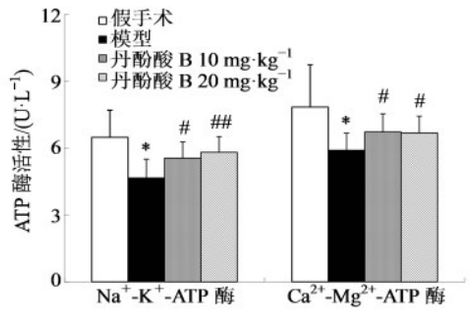
$^{*}P<0.01$ *vs* sham group; $^{\#}P<0.05$ $^{\#\#}P<0.01$ *vs* model group

图2 各组血清CK、LDH活力比较（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

Fig. 2 Comparison of CK and LDH activities in serum of rats（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

3.3 各组ATP酶活性情况

假手术组动物心肌匀浆Na^{+}-K^{+}-ATP酶、Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP酶活性分别为6.49、7.85 mmol/g，模型组动物心肌匀浆Na^{+}-K^{+}-ATP酶、Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP酶活性分别降低为4.67、5.91 mmol/g，与假手术组比较差异显著（$P<0.01$）；与模型组比较，丹酚酸B预处理可不同程度的影响ATP酶活性，低、高剂量组心肌匀浆Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP酶活性显著增高为6.73、6.69 mmol/g（$P<0.05$），低、高剂量组心肌匀浆Na^{+}-K^{+}-ATP酶活性显著增高为5.56、5.82 mmol/g（$P<0.05$、0.01）。见图3。



与假手术组比较：$^{*}P<0.01$；与模型组比较：$^{\#}P<0.05$ $^{\#\#}P<0.01$

$^{*}P<0.01$ *vs* sham group; $^{\#}P<0.05$ $^{\#\#}P<0.01$ *vs* model group

图3 各组心肌ATP酶活性比较（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

Fig. 3 Comparison of ATPase activities in myocardial tissues of rats（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

4 讨论

MI/RI作为一种复杂的生理病理过程，一直是心血管领域的关注焦点。近年文献报道，MI/RI发生时采用药物预处理的方式可改善心脏的舒张收缩功能、降低心律失常的出现频率、加强心脏对损伤的耐受力等，对MI/RI的心肌组织具有保护功能，原因可能与药物直接激活机体的内源性保护机制或促使内源性保护介质的释放等相关[7]。本研究以丹酚酸B为研究对象，通过预处理给药方式探讨其对MI/RI的保护作用，结果发现丹酚酸B预处理给药能够显著减小心肌梗死率，这与范英昌等[8]的报道结果一致。

判断心肌缺血程度的常用手段之一即心肌酶学检查，心肌酶LDH和CK正常情况下存在于心肌细胞的胞浆中，当MI/RI发生时，心肌受损导致细胞膜的通透性升高，LDH和CK溢出胞外进入血清，因而血清LDH和CK活力能够从侧面反映出心肌细胞的坏死程度[9]。本研究结果发现，模型组MI/RI动物血清中LDH、CK活力明显上升，提示MI/RI发生时的心肌细胞处于较严重的受损状态；丹酚酸B预处理给药可明显降低血清LDH活力和CK活力，提示丹酚酸B保护MI/RI受损的心肌组织可能与改善心肌细胞膜的稳定性有关，这与宋延平等[10]的报道结果类似。

心肌细胞活动的物质基础即能量代谢，因此，可反映心肌细胞能量水平高低的三磷酸腺苷（ATP）酶活性已成为判断缺血性心脏病严重程度的重要衡量指标[11]。MI/RI发生时，心肌细胞内能量代谢出现障碍，ATP合成量明显下降，ATP酶（包括Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP酶、Na^{+}-K^{+}-ATP酶等）活性随之下降，能量缺乏造成心肌组织离子分布失衡，如细胞内Na^{+}浓度增高和酸中毒、细胞内外Ca^{2+}和Mg^{2+}分布异常，引起心肌细胞内Ca^{2+}超载[12]；Ca^{2+}超载则会触发一系列损伤机制，包括损伤线粒体导致心肌能量进一步缺乏、激活磷脂酶导致细胞膜结构受损、激活蛋白水解酶导致迟发性细胞死亡等[13]，最终加重了MI/RI的细胞受损程度。本研究结果表明，MI/RI发生后，心肌细胞中Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP酶和Na^{+}-K^{+}-ATP酶活性均有明显降低，提示再灌注后心肌组织发生能量代谢障碍，使心肌细胞的功能受抑；与MI/RI模型组比较，丹酚酸B预处理给药则可明显增高心肌细胞中Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP酶和Na^{+}-K^{+}-ATP酶活性，提示丹酚酸B通过纠正心肌细胞内外离子失衡尤其是调整Ca^{2+}稳态，改善心肌细胞的能量代谢障碍，从而阻

止了MI/RI的进一步加重。

丹酚酸B预处理给药可保护MI/RI的受损心肌组织，其作用途径可能与保护心肌的胞浆膜ATP酶活性、改善心肌的能量代谢等相关。

参考文献

[1] Cao W, Guo X W, Zheng H Z, et al. Current progress of research on pharmacologic actions of salvianolic acid B [J]. Chin J Integr Med, 2012, 18(4): 316-320.

[2] 鞠爱春, 耿诗涵, 杨欣鹏, 等. 丹酚酸B鼻腔给药对脑缺血损伤大鼠学习记忆能力及神经再生的影响 [J]. 中草药, 2017, 48(12): 2481-2485.

[3] 林 超, 刘兆国, 钱 星, 等. 丹酚酸B在心血管疾病中药理作用研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2015, 31(4): 449-452.

[4] 杨 华, 董 兵, 宋莹莹. 葛根素配伍丹酚酸B注射使用对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 中国药房, 2017, 28(25): 3525-3527.

[5] 刘新义, 李健和, 向大雄, 等. 聚乙二醇化葛根素对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 中草药, 2013, 44(3): 327-330.

[6] 杨建业, 张迎春, 唐俊明, 等. 大鼠心肌缺血再灌注后心功能变化与心肌梗死面积的相关性分析 [J]. 实验动物与比较医学, 2008, 28(1): 4-9.

[7] 张宝红. 药物预处理与缺血预处理对心肌缺血再灌注损伤保护作用的实验研究 [D]. 太原: 山西医科大学, 2003.

[8] 范英昌, 赵桂峰, 张文治. 丹酚酸B对大鼠心肌梗死过程中病理形态学的影响 [J]. 天津中医学院学报, 2004, 23(1): 12-14.

[9] Nakai K, Nakai K, Suwabe A. Biochemical marker for myocardial injury [J]. Rinsho Byori, 2002, 50(12): 1140-1145.

[10] 宋延平, 孔令姗, 吴 静, 等. 丹酚酸A与丹酚酸B改善大鼠心肌缺血作用比较 [J]. 中国中医药信息杂志, 2007, 14(9): 36-38.

[11] Qin H, Walcott G P, Killingsworth C R, et al. Impact of myocardial ischemia and reperfusion on ventricular defibrillation patterns, energy requirements, and detection of recovery [J]. Circulation, 2002, 105(21): 2537-2542.

[12] Inserte J, Garcia-Dorado D, Hernando V, et al. Calpain-mediated impairment of Na^+/K^+- ATPase activity during early reperfusion contributes to cell death after myocardial ischemia [J]. Circ Res, 2005, 97(5): 465-473.

[13] Liou Y M, Hsieh S R, Wu T J, et al. Green tea extract given before regional myocardial ischemia-reperfusion in rats improves myocardial contractility by attenuating calcium overload [J]. Pflugers Arch, 2010, 460(6): 1003-1014.