

丹参注射液加强缺血预处理对大鼠心肌的保护作用[△]

浙江医科大学生理学教研室(杭州 310031)

鲁巍峰 夏 强* 张 雄 沈岳良

摘 要 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,研究丹参注射液(SM)在加强缺血预处理(IP)的心肌保护中的作用。结果显示,IP 能减轻复灌性心律失常的严重程度,缩小心肌梗死范围;SM 能缩小心肌梗死范围;SM 联合 IP 与单纯 IP 比较,心肌梗死范围进一步缩小;SM 联合 IP 与单纯 SM 比较,心律失常严重程度减弱且心肌梗死面积进一步减小。结果表明,SM 能加强 IP 的心肌保护作用,特别是加强 IP 的抗心肌梗死作用。

关键词 丹参注射液 缺血预处理 心律失常 心肌梗死

Murry 和 Reimer(1986)在犬心实验中首次发现多次短暂缺血/再灌注后,心肌可耐受随后长时间的缺血,梗死面积减少。这种一次或多次短暂的缺血/再灌注称为缺血预处理(ischemic preconditioning, IP)。IP 能显著减少缺血/再灌注性心律失常的发生、缩小心肌梗死面积、促进缺血/再灌注区域心肌舒缩功能的恢复。IP 是心脏的一种自身保护机制,触发心脏在缺血早期释放某些内源性物质调节心脏功能,从而提高心肌对长时间缺血的耐受性。

丹参注射液(SM)是由活血化瘀中药丹参制成的注射剂,主要药理作用有抗心肌缺血/再灌注损伤、改善微循环、扩张冠状动脉、抗凝血及抗血小板聚集等^[1],临床上用于冠心病、心绞痛和心肌梗死的治疗。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。我们采用整体麻醉 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 材料和方法

1.1 实验动物:雄性 Sprague-Dawley 大鼠,

体重 220 g~270 g,由浙江医科大学实验动物中心提供。

1.2 实验仪器:人工呼吸机(浙江医科大学医学仪器实验厂);LMS-2B 型二道生理记录仪(成都仪器厂)。

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 1.5 g 生药,批号 961230;氯化三苯基四氯唑(TTC),美国 Sigma 公司生产;苔盼蓝(trypan blue),上海化学试剂采购供应站提供。

1.4 动物手术和冠状动脉结扎法:雄性 SD 大鼠,ip 45 mg/kg 戊巴比妥钠麻醉,仰卧位固定。颈部手术,行气管插管,接上动物人工呼吸机控制呼吸,频率为每分钟 55 次,潮气量 20 mL/kg。胸部手术,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(LAD)下方穿线,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 LMS-2B 型二道生理记录仪放大后描记,用示波器作连续心电监护。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,

* Address: Xia Qiang Department of Physiology, Zhejiang University of Medical Sciences, Hangzhou

夏 强 浙江医科大学生理学教研室主任、教授、博士生导师。主要研究方向为心律失常的机制及其防治。已在国内外专业杂志发表论文 40 余篇,在研国家级及省级课题 8 项。

[△] 卫生部、浙江省自然科学基金,浙江省中医局资助项目

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。

1.5 缺血预处理方法:采用建立的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。

1.6 实验分组:动物随机分成 A~D 4 组,采用尾 iv 给药。A 组为单纯缺血/复灌对照组:手术后稳定 10 min,注射生理盐水 2.5 mL,继续灌流 24 min,然后缺血 20 min,复灌 80 min;B 组为 IP 组:手术后稳定 10 min,注射生理盐水 2.5 mL,行 IP,然后缺血 20 min,复灌 80 min;C 组为 SM 组:手术后稳定 10 min,注射 SM,剂量 4 mL/kg,外加生理盐水 1.5 mL,继续灌流 24 min,然后缺血 20 min,复灌 80 min;D 组为 SM+IP 组:手术后稳定 10 min,注射 SM,剂量 4 mL/kg,外加生理盐水 1.5 mL,行 IP,然后缺血 20 min,复灌 80 min。

1.7 心律失常评分法:采用 Curtis 和 Walker(1988)^[2]心律失常评分法,并经适当改良,用于对心律失常严重程度进行定量分析。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 次~2 次)
4	室性心动过速(≥3 次)或心室纤颤

1.8 心肌梗死范围测定法: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% 苝吩蓝 0.8 mL,然后在 -8 ℃ 冰箱内放置 2 h 使其冷冻。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 片~10 片。此时在切面上可清晰地区分被苝吩蓝染蓝的非缺血区和未染蓝的危险区(area at risk, AAR)。将切片放入 38 ℃ 的 1%TTC 溶液中(TTC 溶于 pH 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。梗死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,所以梗死区心肌呈灰白色。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死区和灰白色的梗死区。然后在解剖镜下分离蓝色的非缺血区、红色的缺血未梗死区和灰白色的缺血梗死区,分别称重。以梗死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(%)作为衡量梗死范围的指标。

1.9 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 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,(1)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);(2)IP 组心脏的复灌性心律失常评分显著低于对照组($P < 0.01$);(3)IP 能缩小随后长时间缺血引起的心肌梗死范围,其差异具有统计学意义($P < 0.01$);(4)IP 对心率没有明显影响($P > 0.05$)(表 3)。

表 2 丹参注射液和缺血预处理对麻醉大鼠心脏复灌性心律失常的影响

组别	<i>n</i>	室颤发生率 (%)	室性早搏次数	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 丹参注射液和缺血预处理对麻醉大鼠心率(次/分)的影响

组别	n	处理前	缺血 (min)		再灌注 (min)		
			1	20	1	30	60
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

2.2 SM对随后的心肌缺血/复灌过程中心脏功能的作用:与A组相比:(1)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);(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($P>0.05$);(3)SM能显著缩小随后长时间缺血引起的心肌梗死范围,其差异具有统计学意义($P<0.05$);(4)SM对心率没有明显影响($P>0.05$)(表3)。

2.3 SM联合IP对随后的心肌缺血/复灌过程中心脏功能的作用

2.3.1 与A组相比:(1)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);(2)SM+IP组心脏的心律失常评分明显低于对照组($P<0.01$);(3)SM联合IP能显著缩小随后长时间缺血所引起的心肌梗死范围($P<0.01$);(4)SM联合IP对心率没有明显影响($P>0.05$)(表3)。

2.3.2 与B组相比:(1)SM+IP组与IP组比较心肌梗死范围明显缩小,其差异具有统计学意义($P<0.05$);(2)SM+IP组心脏复灌性心室纤颤的发生率、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($P>0.05$);(3)SM+IP组心率与IP组比较无显著差异($P>0.05$)(表3)。

2.3.3 与C组相比:(1)SM+IP组的心肌梗死范围明显低于SM组($P<0.05$);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($P<0.05$);(3)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);(4)SM+IP组心率与SM组比较无显著差异($P>0.05$)(表3)。

3 讨论

3.1 据报道,在大鼠整体心脏行IP能减少复灌性心律失常的发生,缩小心肌梗死面积,促进缺血区域心肌舒缩功能的恢复,但对心率无明显作用。实验观察到的IP对整体大鼠心肌的保护作用与国内外报道的结果基本一致。研究表明,IP可降低离体灌流大鼠心室的易颤性,表现为心室颤动阈升高,心室肌有效不应期延长。关于IP抗心肌缺血/再灌注损伤的细胞及分子机制已经有了较深入的研究。目前公认氧自由基(OFR)生成、细胞内 Ca^{2+} 超载、能量耗竭和去甲肾上腺素(NE)释放是造成心肌缺血/再灌注损伤的四大因素。IP通过阻止这四大因素的产生,从而发挥对心肌的保护作用。

3.2 观察到SM对整体大鼠心脏缺血/再灌注损伤具有保护作用,这与其它实验报道的结果基本一致。丹参能缩小缺血引起的心肌梗死范围,降低复灌性心室纤颤的发生率,促进复灌后心脏冠脉流量的恢复,防止复灌后心肌收缩力和左室内压的下降,改善复灌后心肌的超微结构^[4]。

3.3 首次发现SM能够加强IP对心肌的保护作用,SM联合IP处理大鼠心脏,心肌梗死范围进一步缩小。通过对IP及SM抗心肌缺血/再灌注损伤机制的分析,可见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

的心肌保护作用的机制可能有:(1)在 IP 过程中,OFR 释放增多,减少了缺血/再灌注过程中 OFR 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 OFR 的清除,进一步减少了 OFR 的产生,从而加强了 IP 抗 OFR 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 IP_3 释放被抑制,减少了细胞内钙库中 Ca^{2+} 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 Ca^{2+} 的内流,进一步降低了细胞的 Ca^{2+} 超载程度,从而加强了 IP 抗 Ca^{2+} 超载损伤的能力;(3)IP 能抑制心肌 F_1F_0 -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 α_1 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。该机制具体环节还有待进一步研究。

3.4 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,降低致命性心室纤颤的发生率,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 陈维洲. 药学报,1984;19(11):876
- 2 Curtis MJ, et al. Cardiovasc Res,1988;22(9):656
- 3 沈岳良,等. 中国应用生理学杂志,1995;11(2):140
- 4 张春芬,等. 济宁医学院学报,1993;16(4):5

(1997-11-18 收稿)

Injection Preparation of Dan-shen (*Salvia miltiorrhiza*) Enhances the Cardioprotective Effects of Ischemic Preconditioning in Rat

Lu Weifeng, Xia Qiang, Zhang Xiong, et al (Department of Physiology, Zhejiang University of Medical Sciences, Hangzhou 310031)

Abstract The role of *injectio Salvia miltiorrhiza* (SM) on enhancing the cardioprotective effects of ischemic preconditioning (IP) in anaesthetized rat was investigated. Results showed that IP reduced the severity of reperfusion-induced arrhythmia and limited the infarct size. SM limited the infarct size; SM + IP significantly reduced the infarct size as compared with IP alone; and significantly decreased both the infarct size and the severity of reperfusion-induced arrhythmia as compared with SM alone. These results suggested that SM can enhance the cardioprotective effects of IP.

Key words *Injectio Salvia miltiorrhiza* Ischemic preconditioning cardioprotective effect

新 书 介 绍

近期由辽宁科技出版社出版的《中草药及其制剂质量分析方法》新书,系统介绍了中草药及其制剂分析中的常用方法,包括高效液相色谱法、气相色谱法、薄层扫描法等,并对这些方法的基本原理、操作条件、定性和定量分析的程度进行了详细的论述。各论介绍了 200 种单味药及其制剂的含量测定方法,是从事中医中药科研、生产、临床特别是开发的工作人员较好的一本工具参考书。

本书作者赵余庆,男,40 岁,现任辽宁中医学院教授,《中草药》杂志副主任编委。从事天然药物研究近 20 年,在国内外刊物上发表学术论文 50 余篇,出版专著三部。该书是作者结合本人多年研究经验编写而成。

本书分精装和简装两种。精装定价 26.00 元,简装定价 19.80 元,另加邮费 5 元,欲购者请将书款寄至:110003 沈阳市和平区文化路 41 号沈阳飞龙保健品有限公司科技发展中心 王月敏收,款到即寄书。