

• 药理学 •

益心口服液药物预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤的影响

卫洪昌¹, 王秀薇², 吕 嵘¹, 程金波¹, 朱晓梅¹, 吴 倩³, 章 忱¹, (1. 上海中医药大学病理教研室, 上海 200032; 2. 上海中医药大学附属龙华医院, 上海 200032; 3. 上海中医药大学测试中心, 上海 200032)

摘要: 目的: 研究益心口服液药物预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用。方法: 设正常、假手术、缺血再灌注、经典缺血预处理及益心口服液组, 观察各组大鼠的血流动力学以及心肌细胞内钙离子浓度变化。结果: 经典预处理组、益心口服液组再灌注 60min 后 $LVSP$ 、 $\pm dp/dt$ 均显著高于缺血再灌注组 ($P < 0.05$); 预处理组再灌注 60min 后 $LVSP$ 、 $\pm dp/dt$ 均显著高于益心口服液组 ($P < 0.05$)。经典预处理组、益心口服液组钙离子浓度低于缺血再灌注组 ($P < 0.05$), 益心口服液组钙离子浓度高于经典预处理组 ($P < 0.05$)。结论: 益心口服液预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤具有一定保护作用, 部分机制可能是减轻心肌细胞内钙离子超载所带来的损害。

关键词: 益心口服液; 血流动力学; 细胞内钙离子

中图分类号: R282.710.5 文献标识码: A 文章编号: 1006-0111(2001)03-0157-03

Pharmacological preconditioning of Yixin Oral Liquid (YOL) during myocardium ischemia and reperfusion in rat

WEI Hong-chang, WANG Xi-wei, LU Rong, SHENG Jin-bo, ZHU Xiao-mei, WU Qian, ZHANG Chen (Shanghai TCM University, Shanghai 200032, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE: To investigate the protective mechanism of YOL on ischemia/reperfusion (I/R) myocardium. **METHODS:** 48 male SD rats, weighting (260±30)g, were divided into 6 groups. They were normal control, I/R, classical ischemic precondition (C-IPC), sham-operated, Isosorbide dinitrate and YOL. The intracellular calcium concentration of the cardiomyocyte and hemodynamic changes were measured in all groups. **RESULTS:** $LVSP$ 、 $\pm dp/dt$ in C-IPC and YOL tread with ischemia 30 min and followed by reperfusion 60 min were obviously higher in I/R ($P < 0.05$) while $LVSP$ 、 $\pm dp/dt$ of C-IPC was also definitely high compared with YOL ($P < 0.05$). The intracellular calcium concentration in C-IPC and YOL were lower in I/R ($P < 0.05$), while $[Ca^{2+}]_i$ of YOL was increased in C-IPC ($P < 0.05$). **CONCLUSIONS:** Yixin oral Liquid (YOL) preconditioning can protect the myocardium from I/R. The possible protective mechanism may be due to decrease calcium overload in cardiomyocyte.

KEY WORDS: YOL; hemodynamics; calcium

近年研究发现, 心脏一次或多次短暂缺血后, 对随后长时间的更为严重的缺血再灌注损伤的耐受性明显增加, 但经典缺血预处理由于本身对机体是一种创伤, 因此很难在临床广泛应用。本次实验通过监测血流动力学指标及测定心肌细胞内钙离子浓度, 比较药物预处理与经典预处理二者的疗效, 为寻找一种能使心肌长期处于预处理状态的药物打下基础。

1 材料和方法

1.1 动物分组

雄性成年 SD 大鼠体重 (260±30)g, 由上海中医药大学动物实验中心提供。随机分成 5 组, 每组 8 只。①正常组、假手术组、缺血再灌注组、经典预处理组: 每日灌胃 2ml 饮用水 1 次; ②益心口服液组: 每日灌胃 2ml 益心口服液 (每 ml 含生药 6g) 1 次。造模前连续喂药 3wk, 末次给药后 1h 造模。

1.2 模型复制

参照文献造模^[1], 大鼠用 20% 乌拉坦 (1.6g/kg) 腹腔和注射麻醉, 仰卧位固定于手术台上, 气管插管行人工机械通气 (频率 54 次/min, 流量 2ml/100g)。然后于胸骨左缘第三肋间开胸, 剪开心包, 在主动脉圆锥与左心耳之间用 5-0 号线穿过冠状

动脉左前降支。假手术组只穿线,不结扎,缺血再灌注组结扎 30min,再灌注 60min,经典预处理组按经典 Murry 法结扎 5min,再灌注 5min,反复 4 次,以后处理同缺血再灌注组。

1.3 主要试剂及仪器

Fura-2/AM (500 μ g, 美国 Sigma 公司); 胶原酶 II 型 (358IU/mg, 美国 Worthington Biochemical Corporation 公司); 血流动力学系统 (F2-98 型三道前置放大器, 第二军医大学); 荧光分光光度计 (F-4500 型, 日本 HITACHI 公司)

1.4 血流动力学测定

心脏穿线后稳定 5min, 分离股动脉, 插管经压力换能器, 通过 F2-98 型三道前置放大器, 测定动脉压; 分离右颈总动脉, 肝素化导管后左心室插管, 分别于结扎前、结扎第 30min、再灌注第 60min 记录 SBP、DBP、MBP、HR、LVSP、 $\pm dp/dt$ 。

1.5 大鼠心肌细胞内钙离子测定^[2-4]

实验完毕, 用 Langerdroff 法进行心脏逆行灌流。先用无钙的 K-H 液 (NaCl 118, KCl 4.74, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 7H₂O 1.2, CaCl₂ 2H₂O 1.0, NaHCO₃ 25, Glucose 10) 恒压灌流 5min (6~8ml/min), 然后用含 50 μ m CaCl₂、0.1% II 型胶原酶的 K-H 液恒压灌流 30min, 取下心脏, 剪去心房和大血管组织, 用含 0.1% II 型胶原酶、50 μ m CaCl₂、1% BSA 的 K-H 液恒温震荡消化心肌组织, 连续 3 次, 200 目筛网过筛, 500r/min 离心 5min, 逐步提高钙离子浓度。最后以 K-H 液悬浮, 台盼蓝排斥试验检查, 细胞存活率 85% 以上。心肌细胞悬液中加入 Fura-2/AM (终浓度 5 μ m), 37 $^{\circ}$ C 恒温震荡孵育

40min, 负载后用 K-H 液洗涤并调整细胞数 $10^6 \sim 10^7$ /ml。上机检测采用发射光波长 510nm, 激发光波长 340nm、380nm, 激发光栅 5nm, 发射光栅 10nm, 最大值通过加入 10% Triton-X-100 测得, 最小值通过加入 120mMEGTA 测得, 根据公式计算: $[Ca^{2+}]_i = Kd(F - F_{min}) / (F_{max} - F) Kd = 224nmol/L$

1.6 统计学方法

统计学处理采用单因素方差分析 q 检验。

2 结果

2.1 各组大鼠心肌细胞内钙离子浓度的比较 (见表 1)

结果表明: 缺血再灌注组、经典预处理组和益心口服液组的钙离子浓度明显高于假手术组、正常组 ($P < 0.01$), 而经典预处理组、益心口服液组钙离子浓度低于缺血再灌注组 ($P < 0.05$), 益心口服液组钙离子浓度高于经典预处理组 ($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠心肌细胞内钙离子浓度的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	钙离子浓度 (nmol/L)
正常组	8	154 \pm 32
假手术组	8	175 \pm 47
缺血再灌注组	8	619 \pm 51*
经典预处理组	8	328 \pm 28* Δ
益心口服液组	8	463 \pm 82* Δ #

* 与正常组相比 $P < 0.01$; Δ 与缺血再灌注组相比 $P < 0.05$; # 与经典预处理组相比 $P < 0.05$ 。

2.2 各组大鼠血流动力学指标比较 (见表 2, 3)

表 2 各组大鼠血流动力学比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

各组	时间点 (min)	SBP (kPa)	DBP (kPa)	MBP (kPa)	HR (次/min)
假手术组	前	16.9 \pm 3.3	8.4 \pm 1.1	11.1 \pm 1.2	422 \pm 59
	30	17.0 \pm 3.5	8.1 \pm 1.0	11.1 \pm 1.6	402 \pm 44
	60	17.3 \pm 5.1	7.7 \pm 1.1	10.9 \pm 2.3	459 \pm 53
缺血再灌注组	前	14.2 \pm 5.9	7.1 \pm 1.6	9.5 \pm 2.2	448 \pm 42
	30	13.5 \pm 3.3	7.2 \pm 2.6	9.3 \pm 1.8	453 \pm 59
	60	7.9 \pm 2.3*	4.16 \pm 1.67*	5.4 \pm 1.4*	433 \pm 38
预处理组	前	16.2 \pm 2.5	7.47 \pm 1.50	10.4 \pm 1.8	400 \pm 46
	30	16.3 \pm 2.9	6.99 \pm 2.06	10.1 \pm 1.9	422 \pm 42
	60	13.1 \pm 3.4	5.45 \pm 3.28	7.9 \pm 3.1	345 \pm 120
中药组	前	15.5 \pm 1.9	6.70 \pm 1.58	9.5 \pm 1.4	381 \pm 51
	30	16.6 \pm 4.3	8.45 \pm 2.77	11.2 \pm 2.8	414 \pm 27
	60	12.3 \pm 3.7	6.22 \pm 1.94	8.3 \pm 2.3	393 \pm 116

* 与结扎前比较, $P < 0.05$

表 3 各组大鼠血流动力学比较(二)($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	时间点 (min)	<i>LVSP</i> (kPa)	+ <i>dp/dt</i>	- <i>dp/dt</i>
假手术组	前	22.4 ± 2.7	1471 ± 268	899 ± 165
	30	21.2 ± 2.4	1432 ± 470	762 ± 165
	60	21.3 ± 2.9	1552 ± 411	765 ± 228
缺血再灌注组	前	21.2 ± 2.8	1407 ± 379	788 ± 189
	30	18.5 ± 2.4	1192 ± 379	686 ± 217
	60	11.1 ± 3.1 [*]	681 ± 363 [*]	447 ± 184 [*]
预处理组	前	19.8 ± 1.2	1239 ± 185	652 ± 82
	30	19.1 ± 1.0	1262 ± 356	744 ± 329
	60	15.8 ± 1.8 [*] Δ	887 ± 376 [*] Δ	541 ± 381 [*] Δ
中药组	前	20.8 ± 2.7	1524 ± 193	884 ± 243
	30	21.6 ± 1.5	1642 ± 148	895 ± 278
	60	17.4 ± 3.8 [*] Δ#	1159 ± 344 [*] Δ#	701 ± 244 [*] Δ#

* 与结扎前比较 $P < 0.05$; Δ 与缺血再灌注组比较 $P < 0.05$; # 与预处理组比较 $P < 0.05$

结果表明: 除缺血再灌注组再灌注 60min 后 SBP、DBP、MBP 明显下降 ($P < 0.05$) 外, 其余各组间 SBP、DBP、MBP、HR 及各时间点均无显著差别 ($P > 0.05$)。缺血再灌注组、预处理组、益心口服液组再灌注 60min 后 *LVSP*、 $\pm dp/dt$ 均显著低于结扎前 ($P < 0.05$); 预处理组、益心口服液组再灌注 60min 后 *LVSP*、 $\pm dp/dt$ 均显著高于缺血再灌注组 ($P < 0.05$); 预处理组再灌注 60min 后 *LVSP*、*dp/dt* 均显著高于益心口服液组 ($P < 0.05$)。

3 讨论

1986 年 Murry 等在给犬进行冠脉阻塞实验时发现多次的短暂缺血发作可以减轻心肌对随后发生的缺血再灌注损伤, 从而提出了缺血预处理的概念。1990 年 Deutsch 首先发现人类重复血管球囊扩张可诱发心肌缺血预处理。预处理的保护机制目前尚未十分清楚, 认为可能与内源性保护介质(如腺苷、肾上腺素等)产生增加有关。本试验的目的在于比较中药药物预处理与经典预处理二者的疗效, 为临床寻找能使心肌长期处于预处理状态的药物, 从而达到抗心肌缺血的作用。

益心口服液由黄芪、益母草、红花及川芎组成, 既往的临床与动物试验均证明其对于冠心病心肌缺血有较好的防治作用^[5]。本次实验发现益心口服液组、经典预处理组大鼠缺血再灌注 60min 后 *LVSP*、 $\pm dp/dt$ 均显著高于缺血再灌注组, 表明二者能较好地改善缺血再灌注大鼠心功能。另外, 经典预处理组血流动力学各项指标均明显高于中药组, 与以往文献报道相似, 也证实了经典预处理是最有效的

抗心肌缺血的保护措施。实验证明^[6,7] 心内膜内皮细胞有增强心肌收缩的功能, 这种调节作用表现为钙离子依赖性。即在低钙时作用显著, 随着细胞内钙浓度的增加而逐渐减弱, 在所谓钙饱和浓度时, 调节作用消失, 可能是通过影响心肌收缩蛋白对钙的敏感性产生的^[8]。本次试验还利用荧光指示剂 Fura-2 测定大鼠心肌细胞内的钙离子浓度的变化, 发现益心口服液组、经典预处理组大鼠, 在经历了缺血再灌注损伤过程后, 其细胞内 Ca^{2+} 浓度明显低于缺血再灌注组, 说明益心口服液、经典缺血预处理可缓解大鼠急性心肌缺血再灌注损伤时 Ca^{2+} 的内流, 减轻细胞内 Ca^{2+} 超载。其可能机理一方面与黄芪皂甙减轻心肌细胞内钙聚集、保护钙泵功能有关, 另一方面, 川芎嗪有抑制胞内贮存 Ca^{2+} 的释放, 且能阻止细胞外 Ca^{2+} 内流^[9~12]。但经典缺血预处理是通过何种途径减轻细胞内钙离子的, 目前还不清楚, 这也是我们下一步研究的内容。

参考文献:

- [1] Fishbein MC, Maclean D, Maroko PR. Experimental Myocardial infarction in the rat[J]. Am J Pathol, 1978, 90: 57.
- [2] Farmer BB, Mancian M, Williams ES. Isolation of calcium tolerant myocytes from adult rat heart: review of the literature and description of method[J]. Life Science, 1983, 33: 1.
- [3] Tytgat J. How to isolate cardiac myocytes[J]. Cardiovascular Research, 1994, 28: 53.
- [4] Qian LI, Ruth AA, Bradford TS. Myocyte deenergization and intracellular free calcium dynamics[J]. Am J Physiol, 1988, 255: C162.
- [5] 卫洪昌, 朱冬胜, 朱晓梅, 等. 益心口服液预处理对急性心肌缺血大鼠 CEC、血浆 ET、CGRP 及心肌病理形态的影响[J]. 药学实践杂志, 1999, 17(4): 202.
- [6] 陈修, 陈维洲, 曾贵云. 心血管药理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1989: 139.
- [7] Li K, Sirois P, Rouleau JL, et al. Role of endothelial cells in cardiovascular function[J]. Life Science, 1994, 54: 579.
- [8] Wang J, Morgan JP. Endocardial endothelium modulates myofilament Ca^{2+} responsiveness in acquirin-loaded ferret myocardium[J]. Circ Res, 1992, 70: 754.
- [9] Kwan CY. Plant-derived drugs acting on cellular Ca^{2+} mobilization in vascular smooth muscle: tetramethylpyrazine and tetrandine[J]. Stem Cell, 1994; 12: 64.
- [10] 顾娟红, 沈惟堂, 李自善, 等. 黄芪对缺血大鼠心肌钙及脂质过氧化物的影响[J]. 上海医科大学学报, 1997, 24(4): 270.
- [11] 赵根尚. 超氧化物歧化酶及川芎嗪对家兔缺血心肌再灌注损伤的影响[J]. 中西医结合杂志, 1988, 8(5): 284.
- [12] 黄才. 川芎嗪对猪血小板浆游离钙浓度的影响[J]. 中国药理学通报, 1993, 9(4): 316.