

· 药理 ·

## 丹萎片对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及机制

李俊平<sup>1</sup>, 郭丽丽<sup>1</sup>, 陈中<sup>1</sup>, 魏本君<sup>1,2</sup>, 袁蓉<sup>1</sup>, 陈恒文<sup>1</sup>, 王阶<sup>1\*</sup>

(1. 中国中医科学院广安门医院, 北京 100053; 2. 湖北中医药大学, 武汉 430065)

**[摘要]** 目的: 观察丹萎片对大鼠心肌缺血再灌注损伤(MIRI)的保护作用, 并探讨其机制。方法: 将80只健康成年雄性Wistar大鼠随机分为假手术组(以0.5%羧甲基纤维素钠溶液10 mL·kg<sup>-1</sup>灌胃)、模型组(以0.5%羧甲基纤维素钠溶液10 mL·kg<sup>-1</sup>灌胃)、丹萎片组(0.9 g·kg<sup>-1</sup>)。预防性给药7 d后, 结扎大鼠心脏冠脉左前降支, 50 min后复灌, 制作大鼠心肌缺血再灌注损伤模型。每组取6只大鼠于复灌2 h检测血清乳酸脱氢酶(LDH), 肌酸激酶同工酶(CK-MB), 内皮素(ET), 一氧化氮(NO)水平及心肌组织丙二醛(MDA)及髓过氧化物酶(MPO)水平。剩余大鼠于造模前及复灌48 h进行心脏射血分数检测, 每组取6只进行原位末端转移酶标记技术(TUNEL)染色评估心肌细胞凋亡指数, 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测心肌含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(Caspase)-3, B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)及Bcl-2相关X蛋白(Bax)蛋白表达。余大鼠行依文思蓝-TTC染色评估心肌梗死面积。结果: 复灌2 h时, 与模型组比较, 丹萎片组血清LDH及CK-MB均明显降低( $P < 0.05$ ), 血清ET-1明显降低, NO明显升高( $P < 0.05$ ), 心肌组织MDA及MPO明显升高( $P < 0.05$ )。复灌48 h时, 与模型组比较, 丹萎片组心脏EF值明显上升( $P < 0.05$ ), 心肌梗死范围明显下降( $P < 0.05$ ), 心肌凋亡指数明显下降( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 丹萎片组心肌Caspase-3, Bax蛋白表达明显升高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), Bcl-2蛋白表达下降( $P < 0.05$ )。结论: 丹萎片在MIRI早期可以保护内皮细胞功能、抑制氧化及炎症浸润, 在MIRI晚期可能通过抑制细胞凋亡, 缩小心肌梗死面积, 改善心功能来实现对心脏的保护作用。

**[关键词]** 丹萎片; 心肌缺血再灌注损伤; 内皮功能; 脂质氧化; 心肌细胞凋亡

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)01-0095-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017010095

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161027.1506.038.html>

**[网络出版时间]** 2016-10-27 15:06

## Protective Effect and Mechanism of Danlou Tablets on Myocardial Ischemia Reperfusion Injury in Rats

LI Jun-ping<sup>1</sup>, GUO Li-li<sup>1</sup>, CHEN Zhong<sup>1</sup>, WEI Ben-jun<sup>1,2</sup>,  
YUAN Rong<sup>1</sup>, CHEN Heng-wen<sup>1</sup>, WANG Jie<sup>1\*</sup>

(1. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China;

2. Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the protective effect and mechanism of Danlou tablets (DT) on myocardial ischemia reperfusion injury (MIRI) in rats. **Method:** The 80 male healthy Wistar rats with body weight of (300 ± 20) g were randomly divided into sham operation group, model group and Danlou tablets group. Rats in sham operation group and model group were administered with 0.5% CMC-Na solution at the daily dose of 10 mL·kg<sup>-1</sup> by ig, and rats in the DT group were administered with 0.9 g·kg<sup>-1</sup> Danlou tablets. After prophylactic administration for 7 days, the left anterior descending branch of the rats heart were ligatured for 50 minutes to

**[收稿日期]** 20160603(009)

**[基金项目]** 国家“重大新药创制”科技重大专项(2013ZX09301307)

**[第一作者]** 李俊平, 在读博士, 从事中西医结合心血管疾病防治研究, Tel:13121372830, E-mail:lpp19860@126.com

**[通讯作者]** \* 王阶, 博士, 主任医师, 从事中西医结合心血管疾病防治研究, Tel:010-88001817, E-mail:gamwangjie@163.com

create the models of myocardial ischemia reperfusion injury in rats. The levels of lactate dehydrogenase (LDH), creatine kinase isoenzyme (CK-MB), endothelin (ET) and nitric oxide (NO) in serum, and malondialdehyde (MDA) and myeloperoxidase (MPO) in myocardial tissues were detected after 2 h reperfusion in 6 rats of each group. Ultrasound was used to observe the cardiac ejection fraction (EF) before and after 48 h reperfusion. The 6 rats in each group were selected for TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) staining to assess the apoptosis index of myocardial cells, and then the protein expression levels of Caspase-3, Bax and Bcl-2 protein in cardiac muscle tissues were detected by Western blot. Evans blue-TTC staining was used to assess the myocardial infarction area in the remaining rats. **Result:** After reperfusion for 2 h, as compared with model group, the levels of serum LDH, CK-MB and ET-1 in DT group were significantly reduced ( $P < 0.05$ ), while the levels of NO, MDA and MPO were significantly elevated ( $P < 0.05$ ). After reperfusion for 48 h, as compared with model group, the EF values in Danlou tablets group were significantly elevated ( $P < 0.05$ ), with obvious decreases in the myocardial infarction size and myocardial apoptosis index ( $P < 0.05$ ), myocardial Caspase-3 and Bax protein expression levels in Danlou tablets group were significantly increased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), and Bcl-2 protein expression levels were decreased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Danlou tablets can protect endothelial cells, inhibit oxidative and inflammatory infiltration in the early stage of MIRI. The protective effect on myocardial ischemia reperfusion injury in rats of Danlou tablets may be related to inhibiting apoptosis, reducing myocardial infarct size and improving cardiac function in the late stage of MIRI.

[**Key words**] Danlou tablets; myocardial ischemia reperfusion injury; endothelial function; lipid peroxidation; myocyte apoptosis

再灌注治疗能快速打开堵塞血管、恢复冠脉血供,是治疗冠心病急性心肌梗死的重要手段,据统计我国 2013 年冠状动脉经皮介入术(percutaneous coronary intervention, PCI)的病例数超过 40 万例,位居世界第 2 位<sup>[1]</sup>。但再灌注治疗只是一种局部治疗,并不能终止冠心病的病理发展进程,加之治疗后出现的一系列心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia reperfusion injury, MIRI),严重制约了冠心病的治疗效果。有研究证实,急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)患者即使接受最佳的再灌注治疗,仍有 10%~30% 出现 MIRI, MIRI 被认为是导致心梗后心力衰竭发生率高达 25% 及年死亡率达 10% 的主要原因<sup>[2]</sup>,因此防治 MIRI 是临床亟需解决的问题。动物实验发现内皮功能障碍、脂质氧化损伤、炎症反应、钙超载及能量代谢等在 MIRI 的发生发展中起重要作用。

MIRI 目前临床尚缺乏有效的干预药物,中医药具有作用通路广泛、作用靶点多样的特点,在临床应用中具有独到的优势。丹蒞片是痰瘀同治的上市药物,临床用于治疗各类冠心病心绞痛,临床疗效良好<sup>[3-4]</sup>,目前关于丹蒞片的实验研究大都针对心肌梗死后对心脏的保护作用,而对 MIRI 后心脏保护作用的研究鲜有报道。课题组前期实验研究发现,丹蒞片能降低大鼠心肌缺血程度,增加离子转运

通道相关酶活性,减少短暂心肌缺血再灌注诱导的致命性及非致命性室颤发生率、室性心动过速及室性早搏的发生频率及持续时间<sup>[5]</sup>。在此基础上,为阐明丹蒞片对已有心肌不可逆坏死的心肌缺血再灌注治疗后的心脏保护作用,本研究观察其对大鼠心肌坏死程度及心脏射血分数的影响,并从内皮功能保护、抑制脂质过氧化及细胞凋亡方面探讨其作用机制,为扩大丹蒞片的临床应用范围提供数据支撑。

## 1 材料

**1.1 动物** 清洁级雄性健康 Wistar 大鼠 80 只,体重(300 ± 20)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号 SCXK(京)2012-0001,在中国中医科学院广安门医院动物中心适应性喂养 3 d。

**1.2 药品及试剂** 丹蒞片(吉林康乃尔药业有限公司,国药准字 Z20050244);羧甲基纤维素钠,2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC),伊文思蓝,水合氯醛(国药集团化学试剂有限公司,批号分别为 20081023,20140507,20140228,20130201);乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒,肌酸激酶同工酶(CK-MB)试剂盒(贝克曼库尔特实验系统有限公司,批号分别为 AUZ1443,OSR61155);大鼠内皮素(ET)试剂盒(北京北方生物技术研究所,批号 S20083014);大鼠一氧化氮(NO),丙二醛(MDA)及髓过氧化物酶(MPO)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号

分别为 A012, A003-1, A044); Protease inhibitor cocktail(Roche 公司,批号 11684817910);蛋白免疫印迹法(Western blot)抗体含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(Caspase)-3, B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)及 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)(CST 公司,批号分别为 12768, 2772, 2870); $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体(中杉金桥公司,批号 TA-09);DNA 断裂的原位末端标记法(TUNEL)反应液(Roche 公司,货号 11684817910)。

**1.3 主要仪器** RM6240BD 型多通道生理信号采集处理系统, HX-300 型小动物呼吸机(成都泰萌科技有限公司); Pro Sound 5000 SSD-SV B 型超声仪(日本 Aloka 株式会社 ALOKA 医用仪器有限公司); AU640 型全自动生化分析仪(美国 Olympus 公司); Image Pro Plus 6.0 图像分析系统软件(美国 Media Cybernetics 公司); UV-2000 型紫外分光光度计(上海尤尼柯公司); TGL-16 型台式高速冷冻离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司); SPR-960 型全自动酶标仪(美国 Thermo 科技公司); VE186 型小型高通量垂直电泳槽 VE180 及转移电泳槽(上海天能公司)。

## 2 方法

**2.1 分组及给药** 大鼠按体重随机分为假手术组、模型组、丹萎片组,假手术组 22 只,模型组 30 只,丹萎片组 28 只,预防性给药 7 d, 然后进行造模手术。其中假手术及模型组均以 0.5% 的羧甲基纤维素钠灌胃,根据文献丹萎片给药剂量选择  $0.9 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1[6-7]}$ ,丹萎片研碎后溶于 0.5% 羧甲基纤维素钠制成混悬液,灌胃体积为  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

**2.2 模型建立** 以 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉,经口腔行气管插管,连接小动物呼吸机,呼吸频率约 70 次/min,潮气量 7~8 mL,呼吸比 1:3,连接多通道生理信号采集系统,描记术前 II 导联心电图。于左侧第 3 或第 3 肋间切口,钝性分离皮下组织及肌肉,打开心包膜,在左心耳下缘距肺动脉弓根部 2 mm 处结扎(3/8 圆针),进针深度约 1 mm,宽度约 2 mm,在冠脉前降支面置硅胶管连同冠脉用 4 号医用缝合线一起结扎。50 min 后,剪去结扎线,连同硅胶管一同取出,进行再灌注。假手术组只在相应部位穿线不结扎。关闭胸腔,逐层缝合肌肉、皮肤,术后腹腔注射青霉素 10 万单位预防感染。结扎成功标志:结扎下方心肌颜色变灰白,同时心电图 ST 段进行性抬高甚至弓背向上(较正常至少抬高 2 mm)。复灌成功标志:心脏颜色由灰白逐渐恢复正常,或 30 min 内心电图 ST 下降至少 50%。造模前心率 <

350 次/min 者,未到规定时间死亡者及造模不成功者予以剔除。

## 2.3 标本采集及指标检测

**2.3.1 再灌注 2 h 心肌酶、内皮功能检测** 每组取 6 只大鼠,采集血清,以全自动生化分析仪检测 LDH 及 CK-MB,以放射免疫法检测血清 ET-1,紫外分光光度计检测血清 NO 水平,紫外分光光度计检测心肌 MDA, MPO 水平。

**2.3.2 心肌梗死面积测定** 未取血大鼠于再灌注 48 h 时处死,术前与取材前 B 超检测心脏射血分数,从大鼠左肺静脉注射 0.5% 依文思蓝约 1.5 mL,待大鼠口唇爪甲变蓝后摘取心脏,以冰盐水冲洗,擦干,置于  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  冻存 20 min 后,沿结扎线以下切成等厚的 4~5 片,放入 1% TTC 溶液中,  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  孵育 15~20 min,流水冲洗。非缺血区呈蓝色,缺血未梗死区呈砖红色,缺血区(area at risk, AAR)为灰白区与砖红色区域之和,梗死区(area of necrosis, AN)呈灰白色,放置于 10% 甲醛中室温固定 24 h。然后用 L2035AW Pioneer 数码照相机进行图像采集,以 Version 6.0 Media Cybernetics Image-Pro Plus 图像分析软件分别计算出梗死区、占缺血区面积的比例,缺血区占左室面积的比例。

**2.3.3 Western blot 法检测心肌 Caspase-3, Bax 及 Bcl-2 蛋白表达** 每组取 6 只大鼠分别检测心肌 Caspase-3, Bax 及 Bcl-2 蛋白表达。根据试剂说明书提取蛋白,BCA 法检测组织蛋白浓度,调整蛋白浓度,上样,根据蛋白目的分子量设定电泳条件,转膜,封闭,经一抗(1:1 000),二抗孵育,显色曝光,将显色后的图片扫描后,使用 Gel Image system ver. 4.00 软件(上海天能科技有限公司)对图像进行灰度分析。以目的蛋白灰度值/ $\beta$ -actin 灰度值表示目的蛋白相对表达量。

**2.3.4 TUNEL 法检测细胞凋亡** 每组取 6 只大鼠做心脏石蜡切片,脱水,蛋白酶 K 中孵育后避光条件下加稀液, TUNEL 反应液,  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  放置 1 h 转化 converter-POD(POD),  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  烤箱中放置 30 min,取出冲洗后加 DAB,经苏木素复染,梯度酒精脱水,二甲苯溶液透明,封片。于光学显微镜下观察,其中正常心肌细胞核呈蓝色,凋亡细胞核呈现出深浅不一的棕褐色。每张切片于凋亡细胞分布相同区域随机选取 5 个高倍视野,计算平均每个视野中的凋亡细胞数占总细胞数的百分比,即为凋亡指数。

**2.4 统计学处理** 采用 SPSS 17.0 统计软件。计量资料结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用单因素

方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 丹莪片对再灌注 2 h 心肌酶的影响** 与假手术比较, 模型组及丹莪片组 LDH 及 CK-MB 均显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 丹莪片组 LDH 及 CK-MB 均明显降低 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 丹莪片对再灌注 2 h 心肌酶的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 1 Effect of Danlou tablets on myocardial enzyme after reperfusion for 2 h ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	LDH /U·L <sup>-1</sup>	CK-MB /mmol·L <sup>-1</sup>
假手术	-	1 341.29 ± 331.43	8 056.29 ± 3 461.84
模型	-	4 113.50 ± 799.94 <sup>2)</sup>	27 904.17 ± 8 084.16 <sup>2)</sup>
丹莪片	0.9	3 202.00 ± 720.44 <sup>2,3)</sup>	19 026.17 ± 4 654.30 <sup>2,3)</sup>

注: 与假手术比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; 与模型组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$  (表 2~5 同)。

**3.2 丹莪片对再灌注 2 h 内皮功能的影响** 与假手术比较, 模型组血清 ET-1 显著上升 ( $P < 0.01$ ), NO 明显下降 ( $P < 0.05$ ); 与模型比较, 丹莪片组 ET-1 明显下降 ( $P < 0.05$ ), 而 NO 明显上升 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 丹莪片对再灌注 2 h 血清 ET-1, NO 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 2 Effect of Danlou tablets on levels of ET-1 and NO in serum after reperfusion for 2 h ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	ET-1 /ng·L <sup>-1</sup>	NO /μmol·L <sup>-1</sup>
假手术	-	39.05 ± 4.32	8.15 ± 1.66
模型	-	48.31 ± 2.52 <sup>2)</sup>	4.31 ± 2.18 <sup>1)</sup>
丹莪片	0.9	41.62 ± 6.16 <sup>3)</sup>	7.80 ± 3.41 <sup>1,3)</sup>

**3.3 丹莪片对再灌注 2 h 心肌组织氧化损伤的影响** 与假手术组比较, 模型组 MDA 及 MPO 均显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 丹莪片组 MDA 及 MPO 明显降低 ( $P < 0.05$ )。见表 3。

表 3 丹莪片对再灌注 2 h 心肌组织氧化损伤的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 3 Effect of Danlou tablets on oxidative damages in myocardial tissues after reperfusion for 2 h in rats ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	MDA /g·μmol <sup>-1</sup>	MPO /U·g <sup>-1</sup>
假手术	-	1.59 ± 0.21	0.95 ± 0.06
模型	-	2.79 ± 0.37 <sup>2)</sup>	1.34 ± 0.06 <sup>2)</sup>
丹莪片	0.9	2.13 ± 0.31 <sup>3)</sup>	1.04 ± 0.20 <sup>3)</sup>

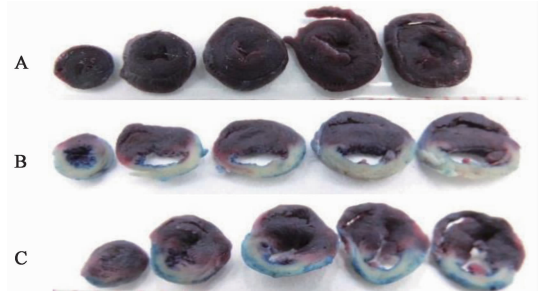
**3.4 丹莪片对再灌注 48 h 心脏射血分数及心肌梗死面积的影响** 与假手术组比较, 模型组及丹莪片

组大鼠 EF 值显著下降 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 丹莪片组大鼠 EF 值明显上升 ( $P < 0.05$ )。假手术组无心肌梗死; 与模型组比较, 丹莪片组心梗/缺血面积比率显著下降 ( $P < 0.01$ )。见表 4, 图 1。

表 4 丹莪片对再灌注 48 h 心脏射血分数及心肌梗死面积的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 4 Effect of Danlou tablets on EF and myocardial infarct size after reperfusion for 48 h ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	n	EF	缺血 /左室面积	心梗 /缺血面积
假手术	-	10	92.07 ± 6.86	0	0
模型	-	12	69.02 ± 12.61 <sup>2)</sup>	52.54 ± 10.88	51.00 ± 5.56
丹莪片	0.9	10	78.41 ± 9.91 <sup>2,3)</sup>	47.73 ± 11.52	43.12 ± 4.06 <sup>2)</sup>



A. 假手术组; B. 模型组; C. 丹莪片组 (图 2~4 同)

图 1 丹莪片对大鼠心脏心肌梗死的影响 (伊文思蓝-TTC 双染)

Fig. 1 Effect of Danlou tablets on myocardial infarction in rats (Evans blue-TTC)

**3.5 丹莪片对再灌注 48 h 心肌细胞凋亡指数影响** 与假手术比较, 各组心肌凋亡指数均有显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 丹莪片能显著降低心肌凋亡指数 ( $P < 0.01$ )。见表 5, 图 2。

表 5 丹莪片对再灌注 48 h 心肌细胞凋亡指数的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 5 Effect of Danlou tablets on apoptosis index after reperfusion for 48 h in rats ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	凋亡指数/%
假手术	-	9.47 ± 0.38
模型	-	48.64 ± 0.33 <sup>2)</sup>
丹莪片	0.9	28.39 ± 0.70 <sup>2,4)</sup>

**3.6 丹莪片对再灌注 48 h 心肌 Caspase-3, Bax 及 Bcl-2 的蛋白表达的影响** 与假手术比较, 模型组及丹莪片组 Caspase-3 表达明显升高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 与模型比较, 丹莪片组 Caspase-3 表达显著降低 ( $P < 0.01$ )。与假手术比较, 模型组及丹莪片组 Bax 表达明显升高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 与模型比较, 丹莪片组 Bax 表达显著降低 ( $P < 0.01$ )。与假手术比较, 模型组及丹莪片组 Bcl-2 表达显著降低

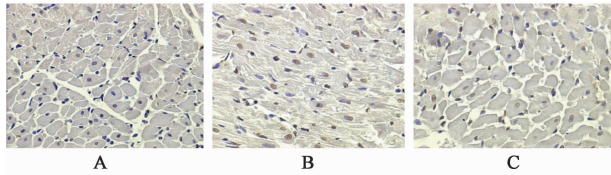
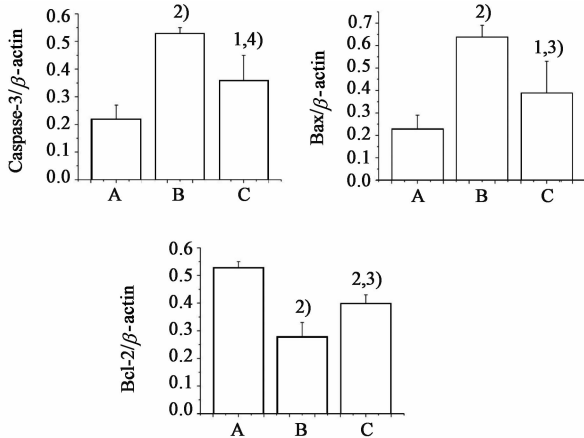


图 2 丹萎片对各组心肌细胞凋亡的影响(TUNEL, ×200)  
Fig. 2 Effect of Danlou tablets on myocyte apoptosis in each group (TUNEL, ×200)

( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 丹萎片组 Bcl-2 表达明显升高( $P < 0.05$ )。见图 3, 4。



与假手术比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; 与模型组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$

图 3 丹萎片对 Caspase-3, Bax, Bcl-2 蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )  
Fig. 3 Effect of Danlou tablets on expression of Caspase-3, Bax, Bcl-2 protein ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

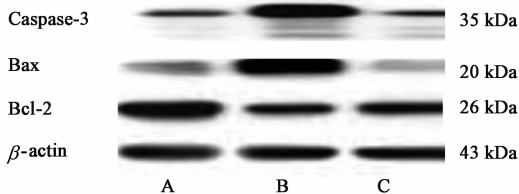


图 4 各组心肌细胞 Caspase-3, Bax, Bcl-2 蛋白电泳  
Fig. 4 Caspase-3, Bax, Bcl-2 protein electrophoresis in myocyte of each group

#### 4 讨论

MIRI 在临床可表现为再灌注心律失常<sup>[8]</sup>, 心肌无复流现象<sup>[9]</sup>及心肌顿抑<sup>[10]</sup>等, 此类患者预后不良, 心力衰竭、心源性猝死等发生机率较高<sup>[11-12]</sup>。其发生机制复杂, 至今还未完全明确, 综合以前研究结果认为, 氧自由基损伤、炎症反应、内皮功能障碍、钙超载等在 MIRI 过程中相互影响, 对心肌造成巨大损害。其中内皮功能障碍是动脉粥样硬化发生发展的始动环节, 更是贯穿心肌缺血及再灌注损伤的全过程。内皮损伤后其分泌功能障碍, 扩血管物质

NO 减少, 破坏了与缩血管物质 ET 间的动态平衡, 一方面内皮损伤促进血管收缩心肌缺血进一步加重; 另一方面造成内皮细胞的屏障作用破坏, 为中性粒细胞和单核细胞及炎症细胞物质的浸润提供了场所, 间接加重炎症反应。此外 MIRI 发生时, 缺血区心肌神经末梢释放大量的儿茶酚胺, 被单胺氧化酶分解后产生大量氧自由基 (OFR), 超过机体的清除能力, 引发链式脂质过氧化反应, 损伤细胞膜、细胞器乃至细胞内核酸, 进而导致细胞凋亡甚至坏死, OFR 对组织的损伤要远远大于缺血本身造成的损伤<sup>[13]</sup>。心肌细胞凋亡是 MIRI 的最终环节, 心肌缺血 20 ~ 30 min 即可发生坏死并且具有不可再生的特性, 故坏死周围的濒死心肌是临床治疗上争取的对象, 阻止坏死周边心肌细胞凋亡成为治疗 MIRI 的关键病理基础, 文中提到的氧自由基、炎症因子、钙超载等共同对心肌细胞造成损伤导致细胞凋亡。Bax 和 Bcl-2 是一对调节细胞凋亡的基因, Bax 促进细胞凋亡而 Bcl-2 可抑制细胞凋亡, 激活下一级 Caspases 酶系引起细胞的凋亡。其中 Caspase-3 是细胞凋亡的主要执行者, 活化后可分解细胞内的重要蛋白及底物, 进而导致细胞凋亡<sup>[14]</sup>。

本研究发现, 丹萎片在再灌注损伤发生的早期能促进 MIRI 后内皮细胞 NO 的释放, 抑制缩血管物质的释放, 修复受损的内皮分泌功能。MDA 反应体内自由基的多少, MPO 反应体内中性粒细胞的活动程度, 丹萎片能抑制心肌组织中 MDA 及 MPO 生成, 改善自由基及炎症细胞对心肌的损伤。此外, 丹萎片在减少心肌梗死面积的同时还能有效阻止 MIRI 后心脏射血分数的下降趋势。有临床研究证实, 低 EF 值冠心病患者在冠脉旁路移植术前, 应用主动脉内球囊反搏术可改善心功能后, 能减少术后心梗、低心排量等严重并发症的发生并能降低围术期病死率<sup>[15]</sup>。另对择期 PCI 的患者进行研究发现, 白细胞计数, C 反应蛋白 (CRP) 升高与 EF 值降低有关<sup>[16]</sup>, 提示丹萎片改善心脏 EF 值可能与降低炎症反应的作用有关。本研究结果显示, 丹萎片可抑制心肌促凋亡蛋白 Bax, Caspases-3 的表达, 提高抑制凋亡基因蛋白 Bcl-2 的表达, 丹萎片可能通过抑制细胞凋亡保护梗死区周围的心肌, 从而降低心肌梗死区与缺血区比例, 保护再灌注损伤的心脏。现代药理研究表明, 丹萎片成分中黄芪、丹参、葛根、川芎等诸多药物提取物均有广泛的心血管效应<sup>[17-19]</sup>, 采用生物信息学方法推测它们可能通过环加氧酶 2, 瘦素蛋白, 一氧化氮合酶 3 及低密度脂蛋白受体

起作用<sup>[20]</sup>,但尚缺乏相关实验验证,这些已知化学成分协同作用于心血管系统,从多途径、多靶点发挥MIRI后对心脏的保护作用。

丹莪片具有活血化瘀、宽胸通阳之效,在临床应用中对稳定型心绞痛、支架植入术后患者及非血运重建急性冠脉综合征患者均有确切的疗效<sup>[21-23]</sup>,亦有临床研究表明丹莪片具有一定的降血脂和稳定斑块作用<sup>[24]</sup>,加之其降血压和减慢心率的作用共同组成缓解临床症状的基础<sup>[5]</sup>。MIRI是一个复杂的病理过程,心肌细胞坏死及凋亡是心肌组织学损害的最终结果,该过程有大量信号通路参与,损害通路和救助通路交织成网状。本实验探索了丹莪片治疗MIRI机制,至于其对信号通路及其相关调控蛋白基因的影响有待于进一步研究,明确其作用机制,为丹莪片防治MIRI提供基础数据和实验支撑。

#### [参考文献]

[1] 王勇,范书英. 冠心病介入治疗的现状和展望[J]. 临床内科杂志,2015,32(1):5-9.

[2] Mewton N, Ivanes F, Cour M, et al. Postconditioning: from experimental proof to clinical concept [J]. Dis Model Mech,2010,3(1-2):39-44.

[3] 王师菡,王阶,李霁,等. 丹莪片治疗痰瘀互阻型冠心病心绞痛的疗效评价[J]. 中国中西医结合杂志,2012,32(8):1051-1055.

[4] 李文平,吴宗贵. 丹莪片治疗冠心病临床疗效的Meta分析[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2016,14(3):241-247.

[5] 郭丽丽,王阶,林飞,等. 丹莪片对短暂性心肌缺血再灌注诱导的心律失常模型大鼠的保护作用及机制[J]. 中国中西医结合杂志,2014,34(9):1125-1129.

[6] 红梅. 丹莪片对大鼠心肌梗死面积和心室重构的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(10):208-211.

[7] 红梅,朝鲁门,斯庆格. 丹莪片对心肌梗死大鼠心肌Bcl-2,Caspase-3表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(8):216-219.

[8] 查克岚,曾瑜,李家富. 急诊冠状动脉介入治疗后再灌注心律失常的临床分析[J]. 重庆医学,2014,43(7):798-800.

[9] Reffelmann T, Kloner R A. The "no-reflow" phenomenon: basic science and clinical correlates [J]. Heart,2002,87(2):162-168.

[10] Vatner S F, Heyndrickx G R. Ubiquity of myocardial stunning [J]. Basic Res Cardiol, 1995, 90 (4): 253-256.

[11] Tanaka K, Hearse D J. Reperfusion-induced arrhythmias in the isolated rabbit heart: characterization of the

influence of the duration of regional ischemia and the extracellular potassium concentration [J]. J Mol Cell Cardiol,1988,20(3):201-211.

[12] Reffelmann T, Kloner R A. The no-reflow phenomenon: a basic mechanism of myocardial ischemia and reperfusion [J]. Basic Res Cardiol, 2006, 101 (5): 359-372.

[13] Majmundar A J, Wong W J, Simon M C. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress [J]. Mol Cell,2010,40(2):294-309.

[14] SHI Y. Caspase activation: revisiting the induced proximity model [J]. Cell,2004,117(7):855-858.

[15] 屈云飞,孙晓宁,张红强,等. 预防应用主动脉内球囊反搏在低射血分数患者非体外循环冠状动脉旁路移植术的临床研究 [J]. 临床与病理杂志,2015,35(7):1344-1350.

[16] 白书玲,刘文玲,胡大一,等. 炎症标记物与冠脉介入并发症及EF值的关系 [J]. 中国医药导刊,2009,11(12):2004-2005.

[17] HU H, ZHAI C, QIAN G, et al. Protective effects of tanshinone IIA on myocardial ischemia reperfusion injury by reducing oxidative stress, HMGB1 expression, and inflammatory reaction [J]. Pharm Biol,2015,53(12):1752-1758.

[18] 都晓辉,曹霞. 黄芪皂苷IV对大鼠心肌缺血-再灌注损伤的保护及机制研究 [J]. 医学信息,2015,28(32):65.

[19] 于俊民,张小波,姜文,等. 黄芪总皂苷对大鼠缺血心肌血管内皮生长因子蛋白表达的影响 [J]. 中国急救医学,2014,34(11):1033-1035.

[20] 王富江,张鹏,于春泉,等. 丹莪片对心血管疾病的作用及相关成分的生物网络关系的探讨 [J]. 中草药,2015,46(5):774-777.

[21] 许祥坤,杨强. 丹莪片治疗痰瘀互阻型老年冠心病心绞痛的临床疗效 [J]. 中国老年学杂志,2013,33(20):5126-5127.

[22] 袁峰,管春静. 丹莪片治疗高龄患者冠脉支架植入治疗后心绞痛的疗效 [J]. 中国老年学杂志,2013,33(22):5603-5604.

[23] 鲜玉琼,李岩松,夏静雯,等. 丹莪片治疗痰瘀互结型非血运重建急性冠脉综合征的临床观察 [J]. 南京中医药大学学报,2015,31(2):129-133.

[24] 任得志,张军茹,申仙利. 丹莪片治疗痰瘀互结型冠心病不稳定型心绞痛的临床观察 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2014,12(8):1022-1023.

[责任编辑 张丰丰]