

丹参总酚酸对离体心脏缺血再灌注损伤的保护作用

陈雯¹, 郭丽丽^{1*}, 周婷婷², 王阶¹, 崔翰明¹

(1. 中国中医科学院广安门医院心血管病证结合实验室, 北京 100053;

2. 沈阳药科大学生命科学与生物制药学院, 沈阳 110016)

[摘要] 目的: 观察丹参总酚酸(TSA)对离体大鼠心肌缺血再灌注(I/R)心脏的保护作用。方法: 采用 Langendorff 离体心脏恒压灌流模型, 大鼠分为空白对照组、模型组、停灌前给药组、复灌给药组。停灌前给药组为正常灌流平衡 20 min 后, 分别用质量浓度 0.2, 0.1 g·L⁻¹ 的 TSA 灌流液灌注 10 min, 停灌 31 min, 复灌 30 min, 用于观察 TSA 对再灌注后心律失常的影响; 复灌给药组正常灌流平衡 30 min, 停灌 31 min, 复灌分别给予质量浓度 0.2, 0.1 g·L⁻¹ TSA 灌流液 15 min, 再用正常灌流液灌注 15 min, 用于观察 TSA 对心功能的影响。结果: 停灌前给药, TSA 能明显减少 I/R 后大鼠心律失常发生次数和持续时间 ($P < 0.05 \sim 0.01$); 复灌后给药, 与模型相比 TSA 高剂量组可显著减轻缺血再灌注诱导的冠脉流量, 左室发展压(LVDP), 左室内压最大变化速率($\pm dp/dt_{max}$)下降, 左室舒张末压(LVEDP)的升高 ($P < 0.05 \sim 0.01$), 低剂量组仅冠脉流量, $\pm dp/dt_{max}$ 的恢复高于模型组 ($P < 0.05$)。结论: TSA 能减轻离体心脏缺血再灌注诱导的冠脉损伤, 促进复灌心肌功能恢复, 具有明显保护作用。

[关键词] 心肌缺血再灌注; 丹参总酚酸; 心功能参数

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)09-0173-04

Protective Effect of Total Salvianolic Acids on Myocardium Injury Induced by Ischemia-reperfusion in Isolated Rat Heart

CHEN Wen¹, GUO Li-li^{1*}, ZHOU Ting-ting², WANG Jie¹, CUI Han-ming¹

(1. Cardiovascular Disease-Syndrome Pattern Research Laboratory, Guang'anmen Hospital,

China Academy of Chinese Medicine Sciences, Beijing 100053, China;

2. Life science and Biopharmaceutical College, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

[Abstract] Objective: To observe the direct protective effect of total salvianolic acids(TSA) on myocardium injury induced by ischemia-reperfusion in isolated rat heart. **Method:** Heart ischemia-reperfusion model was induced in the isolated rat heart subjected to 31 min ischemia and 30 min reperfusion at constant pressure. The left ventricular pressure(LVP), coronary flow(CF) were recorded and the influences of different doses of TSA in KH solution on the changes of heart function parameter were observed. **Result:** TSA treated hearts showed significant recovery of post-ischemic contractile function(The levels of LVDP, $\pm dp/dt_{max}$, CF and LVEDP($P < 0.05-0.01$)). **Conclusion:** TSA has direct protective effect on myocardium injury induced by ischemia-reperfusion.

[Key words] ischemia-reperfusion; total salvianolic acids; heart function parameter

随着血管再通方法(介入和溶栓)的广泛应用, 缺血再灌注造成的心肌损伤(ischemia-reperfusion, I/

R)成为心血管疾病防治领域面临的主要问题之一^[1]。丹参是中医治疗冠心病疗效确切的常用中药, 含有多种成分, 具有广泛的药理活性, 可通过多条途径发挥心血管保护作用。对缺血再灌注损伤的细胞及在体心脏有一定的保护作用。但作用机制未完全明了, 对去除神经和体液因素后缺血再灌注心脏的直接靶向作用的研究报道较少^[2-3]。为了观察

[收稿日期] 20101105(005)

[基金项目] 科技部“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09103-355)

[通讯作者] *郭丽丽, 副研究员, Tel: 010-88001473, E-mail: guolili0815@yahoo.com.cn

丹参的主要活性组分丹参总酚酸(total salviannolic acid, TSA)对缺血再灌注心脏的直接作用,我们进行了 TSA 对大鼠离体心肌缺血再灌注模型干预效果的观察。

1 材料

1.1 动物 健康成年雄性 Wistar 大鼠, 48 只, 体重 250 ~ 300 g, 购于军事医学科学院动物中心, 许可证号 SCXK-(军)2007-004。本院动物室适应性饲养 3 天后用于实验。

1.2 药物 TSA (本实验室药学组提供, 批号 20100203), 纯度 $\geq 70\%$; 临用前将 TSA 溶于空白灌流液, 使含药灌流液质量浓度分别为 0.2, 0.1 g·L⁻¹。

1.3 仪器与试剂 生物机能检测系统(澳大利亚 AD Instruments 公司 PowerLab 系统); 离体工作心灌流装置(美国 Radnoti 公司); 压力球囊为 Kent 公司产品; 肝素钠注射液(江苏常州千红生化制药股份有限公司, 批号 081208); 戊巴比妥钠(国药集团化学试剂有限公司, 批号 WS20051129)。其余试剂均为国产分析纯。

2 方法

2.1 模型制备 参考文献[4]方法, 大鼠腹腔注射肝素 1 000 U·kg⁻¹ 抗凝, 30 min 后腹腔注射戊巴比妥钠 50 mg·kg⁻¹ 麻醉。取出心脏置于 0 ~ 4 °C 的生理盐水中, 轻轻挤出瘀血, 经主动脉将其固定于体外灌流装置, 逆行恒压灌注。灌注压 60 mmHg。灌流液组成^[4] (mmol·L⁻¹): NaCl 118, NaHCO₃ 23.8, KCl 4.7, MgSO₄ 1.2, KH₂PO₄ 1.2, CaCl₂ 2.5, 葡萄糖 11.0。向上述灌流液中通入 95% O₂ 和 5% CO₂ 混合气体调 pH 7.4 (37 °C)。灌注液及心脏周围温度用恒温循环水浴维持在 37 °C ± 0.5 °C。平衡灌注 30 min, 待心脏各项功能稳定, 关闭灌流液停止灌流, 造成全心缺血, 31 min 后打开灌流液再复灌 30 min。

2.2 分组与灌流方案 将大鼠分为空白对照组、模型组、停灌前给药低剂量组/高剂量组、复灌给药低剂量组/高剂量组, 每组 8 只。临用前将 TSA 受试物溶于灌流液中, 使终浓度分别为 0.1 g·L⁻¹ (低剂量) 和 0.2 g·L⁻¹ (高剂量)。空白对照组用正常灌流液灌注 100 min。模型组用正常灌流液灌注, 平衡 30 min 后, 停止灌注 31 min, 复灌 30 min。停灌前给药高、低剂量组正常灌流平衡 20 min 后, 分别用含有 0.2, 0.1 g·L⁻¹ 的 TSA 灌流液灌注 10 min 后, 停止

灌注 31 min, 复灌 30 min, 用于观察 TSA 对再灌后心律失常的影响。复灌给药高、低剂量组用正常灌流液平衡 30 min 后, 停灌 31 min, 继而分别复灌给予含有 0.2, 0.1 g·L⁻¹ TSA 灌流液 15 min 后, 用正常灌流液继续灌注 15 min 共计复灌 30 min 结束实验, 用于观察 TSA 对心功能的影响。

2.3 监测指标

2.3.1 心功能参数 将心脏置于 Langendorff 灌流模式后, 左心耳剪一小口, 将压力球囊插入左心耳并通过房室瓣插入左心室, 导管的另一端连接压力换能器, 输入至 PowerLab 生物信号采集与处理系统, 实时记录左室内压力(LVP)变化, 调节压力球囊内的充水量, 使正常左心室舒张末期压(LVEDP)稳定在 5 ~ 10 mmHg。分别于停灌前、复灌 30 min 时记录左室内收缩峰值值(LVSP)、左室舒张末压(LVEDP), 通过系统数据处理软件计算并输出心率、左室内压最大变化速率($\pm dp/dt_{max}$), 并计算左室发展压(LVDP = LVSP - LVEDP), 作为评价心功能的参数^[5]。部分参数以 I/R 后恢复百分率表示^[6]:

$$\text{恢复率} = \frac{\text{再灌后某时间数值}}{\text{缺血前数值}} \times 100\%$$

2.3.2 心律失常率、发生频率及持续时间 将两根电极分别插在心尖部(+)和主动脉根部(-)监测心电图变化。采用停灌前给予受试物, 复灌即刻至再灌注 30 min 时, 计算室性心动过速(VT)和室性纤维颤动(VF)发生的次数和持续时间, 单位用次数(次)和时间(s)表示, 并计算心率失常发生动物数占每组的百分率。

2.3.3 冠脉流量 手工测定冠脉流量(CF), 分别收集缺血前及再灌后 30 min 时 1 min 内的冠脉流出液, 用量筒测量体积, 单位以 mL·min⁻¹ 表示。

2.4 数据统计分析 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 运用 SPSS 16.0 统计软件进行 independent-sample *t* 检验, 比较两组变量间的差异; 两组以上变量之间差异分析用 One-way ANOVA 后的 LSD 分析, *P* < 0.05 有统计学意义。

3 结果

3.1 对复灌后心律失常发生次数和持续时间 结果表明空白对照组大鼠心脏持续灌注 100 min, 没有发生心律失常; 模型组、各给药组离体大鼠心脏停灌 31 min, 复灌后心律失常发生率达 100%, 说明心律失常由 I/R 引起, 以室速、室颤多见, 程度与持续时

间不同,甚者发生致死性室颤。停灌前给予 TSA 虽然没有降低心律失常的发生率,但与模型相比明显降低了其发生次数和持续时间($P < 0.05 \sim 0.01$),说明 TSA 对 I/R 引起的心律失常有一定预防作用。见表 1。

表 1 TSA 停灌前给药复灌心律失常发生次数和持续时间($\bar{x} \pm s, n = 8$)

| 组别 | 剂量 /g·L ⁻¹ | 发生率 /% | 发生数 /次 | 持续时间 /s |
|-----|--------------------------|-----------|--------------------------|----------------------------|
| 对照 | - | 0 | 0 | 0 |
| 模型 | - | 100 | 21.6 ± 7.6 | 860.9 ± 89.8 |
| TSA | 0.1 | 100 | 8.9 ± 2.3 ²⁾ | 298.3 ± 46.7 ²⁾ |
| | 0.2 | 100 | 11.2 ± 5.9 ¹⁾ | 300.5 ± 76.1 ²⁾ |

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 对复灌后冠脉流量的影响 各组在停灌前冠脉流量无显著差异;空白对照组心脏持续灌注 100 min,冠脉流量无显著下降;模型组复灌 30 min 时冠脉流量显著低于对照组和缺血前($P < 0.05$),说明缺血再灌已造成冠脉损伤;而复灌给予 TSA 高、低剂量组,再灌 30 min 时冠脉流量恢复率均显著高于模型组($P < 0.05 \sim 0.01$)。结果见表 2。说明 DSFS 可扩张冠状动脉,增加心脏血氧供应,改善心脏微循环,起到保护心肌的作用,这与之前的文献报道结果一致^[7]。

3.3 对 I/R 过程中心功能参数的影响 结果见图 1,表 2。结果表明空白对照组正常灌注 100 min,离

表 2 复灌给药 TSA 对离体心脏 I/R 心功能参数的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

| 组别 | 剂量 /g·L ⁻¹ | CF/mL·min ⁻¹ [恢复率/%] | | LVDP/mmHg [恢复率/%] | | + dp/dt _{max} /mmHg·s ⁻¹ [恢复率/%] | |
|-----|--------------------------|------------------------------------|---|----------------------|---|---|--|
| | | 缺血前 | 再灌 30 min | 缺血前 | 再灌 30 min | 缺血前 | 再灌 30 min |
| | | | | | | | |
| 对照 | - | 11.2 ± 1.13 | 10.8 ± 0.98 [96.64 ± 8.5] | 112.6 ± 6.3 | 108.3 ± 5.8 [96.42 ± 5.1] | 3 028.5 ± 124.8 | 2 876.7 ± 131.6 [95.2 ± 4.5] |
| 模型 | - | 11.5 ± 0.93 | 6.43 ± 1.1 ³⁾ [55.9 ± 9.9] | 112.9 ± 9.8 | 64.3 ± 5.6 ⁴⁾ [56.7 ± 5.2] | 3 127.9 ± 288.8 | 1 939.3 ± 123.4 ⁴⁾ [62.2 ± 4.3] |
| TSA | 0.1 | 11.4 ± 1.70 | 8.1 ± 0.2 ¹⁾ [71.1 ± 13.3] | 113.3 ± 7.8 | 75.9 ± 7.7 [66.9 ± 9.9] | 2 822.4 ± 137.8 | 2 116.8 ± 132.3 ¹⁾ [75.2 ± 9.6] |
| | 0.2 | 11.0 ± 0.89 | 8.8 ± 0.12 ²⁾ [80.1 ± 11.2] | 113. ± 13.8 | 96.31 ± 14.4 ¹⁾ [84.5 ± 21.0] | 3 054.4 ± 650.3 | 2 412.9 ± 604.5 ¹⁾ [78.5 ± 9.39] |

| 组别 | 剂量 /g·L ⁻¹ | - dp/dt _{max} /mmHg·s ⁻¹ [恢复率/%] | | HR /b·min ⁻¹ | | LVEDP/mmHg | |
|-----|--------------------------|---|---|-------------------------|-----------|-------------|-----------------------------|
| | | 缺血前 | 再灌 30 min | 缺血前 | 再灌 30 min | 缺血前 | 再灌 30 min |
| | | | | | | | |
| 对照 | - | -2 502.6 ± 129.2 | -2 326.8 ± 144.1 [93.2 ± 6.2] | 260 ± 24 | 256 ± 32 | 8.45 ± 0.62 | 9.58 ± 4.25 |
| 模型 | - | -2 378.2 ± 123.7 | -1212.8 ± 98.4 ⁴⁾ [51.4 ± 8.1] | 256 ± 26 | 238 ± 45 | 8.62 ± 0.87 | 33.23 ± 5.84 ⁴⁾ |
| TSA | 0.1 | -2 571.0 ± 289.8 | -1 439.8 ± 213.6 [56.3 ± 15.8] | 253 ± 19 | 242 ± 36 | 7.92 ± 0.53 | 34.51 ± 15.90 |
| | 0.2 | -2 343.2 ± 317.3 | -1 804.3 ± 233.6 ¹⁾ [76.9 ± 23.7] | 248 ± 30 | 239 ± 42 | 8.86 ± 0.74 | 15.13 ± 12.55 ¹⁾ |

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与缺血前比³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ 。

体心脏搏动平稳,各心功能参数下降 < 10%。停灌造成全心缺血后,心脏收缩明显减弱,通常在 10 min 左右停于舒张期,缺血 20 min 左右,LVP 逐渐升高,约 25 min 时达到最大(图 1),表明此时心肌静止张力增加或有所挛缩。各组心脏缺血前各指标数值无明显差异。全心缺血 31 min,复灌后模型组心功能参数 LVDP, ± dp/dt_{max} 明显低于对照组和缺血前,LVEDP 明显高于对照组和缺血前,二者差异皆具有极其显著统计学意义($P < 0.01$),表明再灌注后左心室收缩及舒张功能皆受损。TSA 大剂量组再灌 30 min LVDP, + dp/dt_{max}, - dp/dt_{max} 恢复率均显著高于

模型组($P < 0.05 \sim 0.01$),再灌 30 min,LVEDP 的升高值显著低于模型组($P < 0.05$),说明 TSA 大剂量时对 I/R 后心功能的恢复有明显促进作用,对 I/R 造成

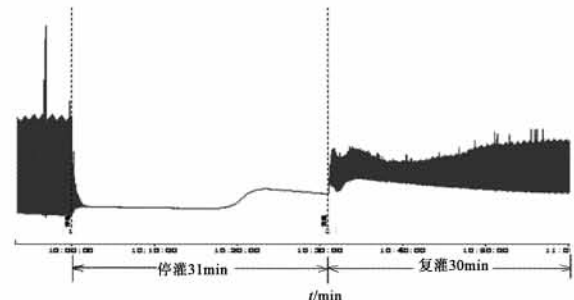


图 1 离体心脏 I/R 过程中 LVP 的变化

心功能损伤有保护作用。TSA 小剂量组仅对再灌 30 min 时 + dp/dt_{max} 恢复率有影响 ($P < 0.05$)。

4 讨论

采用离体心脏可避免神经体液等因素对心脏功能影响,便于观察干预因素对心脏的直接效应^[8],我们采用停灌 31 min,复灌 30 min 的方法在同一心脏复制出了兼有心律失常发生、冠脉流量减少、心功能受损等临床常见的再灌注病理变化的模型^[9]。用此模型研究 TSA 对缺血再灌注心脏的作用效果及作用机制客观可靠。

再灌注性心律失常是再灌注后最常见的并发症之一,主要表现为室速、室颤,对其防治研究已成为当前一大热点^[10]。研究表明缺血持续 20 ~ 30 min 再灌注心律失常发生率最高,我们的实验结果也证明了这一点,停灌 31 min,复灌时心律失常发生率为 100%。缺血前用 TSA 灌注 10 min 可使心律失常发生次数和持续时间大大降低。其作用机制可能与 TSA 的抑制钙超载作用密切相关^[11],因为研究已证明细胞内钙超载是心肌缺血再灌注损伤的特征之一,钙超载引发延迟后除极,可能是心肌再灌注心律失常发生的原因之一^[12]。

LVDP 和 + dp/dt_{max} 是反映心脏收缩功能指标, LVEDP 和 - dp/dt_{max} 是反映心脏舒张功能指标。再灌注后 LVDP, + dp/dt_{max} 和 - dp/dt_{max} 皆降低,而 LVEDP 升高,再灌后心脏收缩和舒张功能均下降^[1]。TSA 可抑制再灌后 LVDP, + dp/dt_{max} 和 - dp/dt_{max} 降低,明显抑制 LVEDP 升高,表明 TSA 能全面改善再灌注诱导的心功能减退。

再灌导致的心律失常和心功能的下降具有不同的发生机制,TSA 停灌前后给予显示出不同的作用特点,灌注前给予可显著减少再灌后心律失常的发生次数和持续时间,再灌后给予可全面抑制再灌注损伤造成的心功能全面下降,说明受试物给予时间的差别与其作用效果相关。TSA 是丹参有效组分的水溶性部分,含有多种成分,各成分的结构性质及活性不尽相同^[13]。本实验用 TSA 含有多种成分(指纹图谱见图 2),其中丹参酚酸 B 含量达 70%。各成分在干预缺血再灌注损伤中的作用大小及其机制有待进一步深入研究。

[参考文献]

[1] 陈士萍,杨玉梅. 心肌缺血再灌注损伤的研究指标进展[J]. 医学综述,2007,13(17):1343.
[2] 陈磊,陆茵,郑仕中. 丹参药理活性成分的整合效应

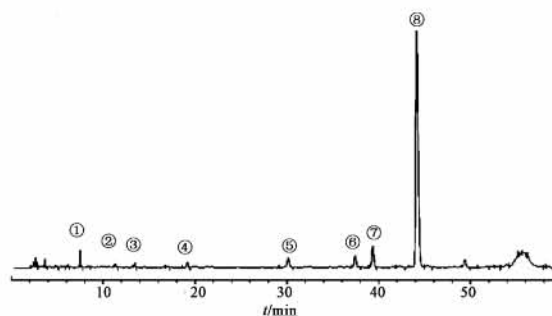


图 2 丹参总酚酸指纹图谱

①丹参素;②原儿茶醛;③咖啡酸;④丹酚酸 C;⑤未知成分;
⑥未知成分;⑦丹酚酸 A;⑧丹酚酸 B

[J]. 中草药,2009,40(3):476.
[3] 齐艳艳,史永照. 丹参对缺血再灌注损伤的保护作用及机制研究进展[J]. 上海中医药大学学报,2010,24(2):89.
[4] Raja B Singh, Vijayan Elimban, Naranjan S Dhalla. Differences in ischemia-reperfusion-induced endothelial changes in hearts perfused at constant flow and constant pressure [J]. J Appl Physiol,2008,105:1779.
[5] Tae-Hoon Kim, Sun-Mee Lee. The effects of ginseng total saponin, panaxadiol and panaxatriol on ischemia/reperfusion injury in isolated rat heart [J]. Food Chem Toxicol,2010,48(6):1516.
[6] 包怡敏,张志雄. 从心肌力学观察银杏酮酯抗心肌缺血再灌注损伤的作用[J]. 北京中医药大学学报,2010,33(1):28.
[7] Atsushi Sugiyama, Bing-Mei Zhu, Akira Takahara, et al. Cardiac effects of salvia miltiorrhiza/dalbergia odorifera mixture, an intravenously applicable chinese medicine widely used for patients with ischemic heart disease in China [J]. Circ J, 2002, 66(2): 182.
[8] 方秋娟,王瑞幸,吴枝娟,等. 大鼠离体心脏缺血-再灌注过程的功能变化[J]. 福建医科大学学报,2007,41(5):409.
[9] 牟崇明,陈玉培. Bay k8644 对心肌缺血再灌注损伤大鼠心功能的影响 [J]. 中国药理学通报,2005,21(10):1224.
[10] 陈清启,杨庭树,卢喜烈,等. 心电图学[M]. 济南:山东科学技术出版社,2002:328.
[11] 李玉梅,陈旭华. 丹参对缺血心肌细胞 L 型钙电流的影响[J]. 安徽中医学院学报,2003,22(4):29.
[12] 钱俊,张亚臣. 再灌注心律失常的发生机制、类型与治疗[J]. 心血管病学进展,2008,29(4):567.
[13] Guang-Rong Zhao, Heng-Ming Zhang, Ting-Xiang Ye, et al. Characterization of the radical scavenging and antioxidant activities of danshensu and salvianolic acid B [J]. Food Chem Toxicol,2008,46(1):73.

[责任编辑 聂淑琴]