

归芪胶囊对家兔心肌缺血-再灌注 损伤作用的实验研究

刘建鸿^{1*}, 姚凝¹, 陈健², 滕政杰², 王昕³

(1. 甘肃中医学院, 甘肃 兰州 730000; 2. 甘肃中医学院附属医院, 甘肃 兰州 730000;
3. 西安交通大学医学院, 陕西 西安 710061)

[摘要] 目的: 探讨归芪胶囊对家兔心肌缺血-再灌注损伤(MIRI)保护作用的可能机制。方法: 青紫蓝家兔 45 只, 用随机数字表法分为 5 组, 分别为假手术组、模型组、归芪胶囊小剂量组、归芪胶囊大剂量组和地奥心血康对照组。采用冠状动脉前降支结扎法复制 MIRI 损伤动物模型, 实验过程中动态观察心电图(ECG), 以家兔血浆内皮素(ET)、血清一氧化氮(NO)、心肌钠泵($\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$)和钙泵($\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$)为指标进行实验观察, 用 SPSS10.0 统计软件进行数据分析。结果: 归芪胶囊对 MIRI 损伤家兔心电图 ST 段抬高后的恢复性下降, 血清 NO 的升高, 血浆 ET 的降低, 心肌 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 和 $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$ 的升高有显著作用($P < 0.01$)。结论: 归芪胶囊通过对血浆 ET, 血清 NO, 心肌 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 和 $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$ 含量的影响, 对再灌注心肌损伤有保护作用。

[关键词] 归芪胶囊; 心肌缺血-再灌注损伤; 心电图; 内皮素; 一氧化氮; 钠-钾-ATP 酶; 钙-镁-ATP 酶

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2009)12-0072-03

近年来, 心肌缺血性疾病的死亡率由于溶栓、球囊扩张等治疗手段的不断发展而有所下降。但是, 伴随而来的血液复流所致的心肌缺血-再灌注损伤(myocardial ischemic reperfusion injury, MIRI)却降低了溶栓等血液复流成功的净效应, 甚至导致缺血梗死范围的进一步扩大, 使病情反而加重。

本实验以中医药理论为指导, 以补阳还五汤为基础加减进行组方, 制成归芪胶囊, 方中岷归补血活血, 红芪补气固表、益气活血, 再配以川芎等药物, “以补为主”, “以通为用”, 通过整体调理, 达到对抗

MIRI 的目的。通过观察归芪胶囊对心肌 MIRI 损伤家兔心电图 ST 段改变, 血浆中内皮素(ET), 血清一氧化氮(NO), 心肌钠泵($\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$)和钙泵($\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$)的变化, 探讨药物作用机制, 以期为中医药治疗此病提供有意义的线索。

1 材料

1.1 动物 青紫蓝家兔 45 只, 雌雄兼用, 体重(2.4 ± 0.1) kg, 兰州生物制品研究所提供(合格证: 医动字第 14-004 号)。

1.2 药物 归芪胶囊组方: 当归 18 g, 红芪 30 g, 川芎 12 g, 麦冬 15 g, 丹参 18 g, 地龙 9 g, 五灵脂 9 g, 熟地黄 18 g, 炙甘草 6 g 等。当归: 采自甘肃岷县当归规范化种植(GAP)基地, 为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv) Diels 的根; 红芪: 采自甘肃宕昌, 为豆科植物多序黄芪 *Hedysarum polybotrys* Hand.-Mazz. 的干

[收稿日期] 2008-12-09

[基金项目] 甘肃省科学技术攻关项目(GS022A43-140)

[通讯作者] * 刘建鸿, Tel: (0931) 8765410; E-mail: ljhong666@

126.com

燥根茎。以上药材经甘肃中医学院中药教研室邓毅教授鉴定。将原药材按比例称取,每 1 kg 生药加水 6 L,煎煮得煎液 2.18 L,再加水 4 L,煎煮得煎液 2.43 L,合并煎液,共得煎液 4.61 L,浓缩至 1.0 L,加吸收剂 80 g,得半流体 1 261 g,低温干燥 2 h,得固体 92.997 g。制成胶囊,1 g 药粉相当于原药材 10.753 g。经计算,家兔用量 $0.286 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$;地奥心血康为成都地奥制药集团有限公司生产(批号:91 卫药准字 Z-51 号),用温生理盐水配成体积分数为 50% 的混悬液。

1.3 试剂及仪器 血清 NO, 心肌 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 和 $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$ 测定试剂盒(均购于南京建成生物工程研究所,批号:20030412, 20030429, 20030422); ET 测试盒(购于解放军总医院科技开发中心放免所,批号:2003-4-24);全自动 γ 免疫计数器(FJ-2008 型,西安 266 厂);紫外分光光度计(UV-120-02 型,日本岛津);电热恒温水浴锅(H. H. S 21-4 型,上海医疗器械五厂生产);高速离心沉淀机(D-37520 Osterode 型,德国);心电图仪(EG-6511 型,上海 Konden 医药电子公司)。

2 方法

2.1 造模 用 25% 乌拉坦麻醉($4 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)家兔,仰位固定,沿胸骨左缘剪断 2~3 肋软骨,用小开胸器撑开胸腔切口,可见搏动的的心脏,剪开心包,用止血钳将左心耳提起,用持针器将小弯针在冠状动脉前降支根部(离冠状动脉起始约 3~5 mm)穿一丝线结扎之,并同时结扎入 1 cm 长硅胶管一根,使家兔心肌缺血。观察 40 min,然后将结扎丝线剪断,使实验家兔心肌开始再灌注,观察 90 min。实验过程中动态观察心电图(ECG),以结扎后出现心电图 ST 段呈弓背向上抬高, T 波高耸,放松结扎后抬高的 ST 段下降 1/2 以上为 MIRI 成功。

2.2 分组及给药 实验家兔共分 5 组:假手术组、模型组、归芪胶囊小剂量组、归芪胶囊大剂量组、地奥心血康对照组,每组 9 只。其中假手术组只做家兔开胸、暴露心脏、剪开心包并在冠状动脉前降支根部穿线,但不结扎;其余各组均按上述方法造模。假手术组与模型组以等量温生理盐水于实验家兔实验前 4 d 开始 ig,其余各组均在实验家兔实验前 4 d 用温生理盐水溶解实验药物成混悬液 ig,分别给予归芪胶囊小剂量($0.286 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),大剂量($0.858 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)以及地奥心血康($0.021 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)。

kg^{-1})以及地奥心血康($0.021 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)。

2.3 NO, ET, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$, $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$ 测定 心肌 MIRI 90 min 时经颈静脉抽血 3 mL 制备血清,同时抽血 5 mL 制备血浆, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存待用。取血后处死动物,取缺血区心肌组织, $0 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰浴匀浆, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下 $3\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min,留取上清液 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存待用。

以上指标检测均按说明书进行。血浆 ET 由兰州大学第一附属医院核素室采用放射免疫分析法进行检测; NO, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$, $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$ 均采用比色法测定,于甘肃中医学院科研实验中心生物化学实验室进行。

2.4 统计学处理 所有数据采用以 SPSS 10.0 统计软件,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,数据采用 F 检验比较差异程度,组间对比用 *t* 检验。

3 结果

3.1 对家兔 MIRI 损伤中心心电图 ST 段的影响 结果表明:归芪胶囊能使家兔冠脉结扎 30 min 后心肌缺血和 MIRI 60 min 后导致的心电图 ST 的抬高有恢复性下降,差异有显著性($P < 0.01$),见表 1。

表 1 对心肌缺血一再灌注损伤家兔肢体 II 导联心电图的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 9$)

组别	剂量 ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	ST 段抬高(mV)	
		冠脉结扎后 30 min	再灌注 60 min 后
假手术组	—	$0.06 \pm 0.02^{1)}$	$0.07 \pm 0.02^{1)}$
模型组	—	0.45 ± 0.13	0.23 ± 0.05
归芪胶囊组	0.286	$0.29 \pm 0.09^{1)}$	$0.12 \pm 0.04^{1)}$
	0.858	$0.25 \pm 0.05^{1)}$	$0.09 \pm 0.02^{1)}$
地奥心血康组	0.021	$0.32 \pm 0.07^{1)}$	$0.13 \pm 0.03^{1)}$

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$ (下同)

3.2 对家兔 MIRI 损伤中血清 NO, 血浆 ET, 心肌组织 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 和 $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$ 含量的影响 结果表明:归芪胶囊升高 MIRI 损伤家兔血清 NO 含量,降低 ET 含量,升高心肌组织 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 和 $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$ 活性,差异有显著性($P < 0.01$),见表 2。

4 讨论

在心肌缺血时,心肌细胞发生了严重的缺血性损伤,但 MIRI 有时并不能使损伤减轻,反而加速了心肌细胞的死亡,即发生了再灌注损伤。

表 2 对心肌缺血-再灌注损伤家兔血清一氧化氮(NO), 血浆内皮素(ET), 心肌组织 Na⁺-K⁺-ATPase 和 Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	NO ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	ET (ng·L ⁻¹)	Na ⁺ -K ⁺ -ATPase [$\mu\text{molPi}\cdot(\text{mg prot}\cdot\text{hour})^{-1}$]	Ca ²⁺ -Mg ²⁺ -ATPase [$\mu\text{molPi}\cdot(\text{mg prot}\cdot\text{hour})^{-1}$]
假手术组	—	14.49 ± 5.22 ¹⁾	627.26 ± 312.14 ¹⁾	1.94 ± 0.25 ¹⁾	1.54 ± 0.41 ¹⁾
模型组	—	4.13 ± 3.34	1 226.43 ± 543.27	0.52 ± 0.17	0.52 ± 0.13
归芪胶囊组	0.286	9.98 ± 8.69 ¹⁾	842.82 ± 509.09 ¹⁾	1.44 ± 0.31 ¹⁾	1.16 ± 0.36 ¹⁾
	0.858	12.82 ± 15.20 ¹⁾	786.53 ± 439.47 ¹⁾	1.72 ± 0.38 ¹⁾	1.48 ± 0.29 ¹⁾
地奥心血康组	0.021	8.20 ± 7.94 ¹⁾	904.86 ± 422.42 ¹⁾	1.33 ± 0.29 ¹⁾	0.94 ± 0.21 ¹⁾

NO 和 ET 是一对调节血管舒缩活动作用对抗的因子^[1]。NO 是血管内皮合成并释放的一种作用强大内皮源性舒张因子, 它通过 c-GMP 途径降低细胞内钙离子(Ca²⁺) 浓度或阻断 Ca²⁺ 内流使平滑肌细胞舒张^[2]。有研究表明, MIRI 发生的内皮细胞功能障碍及 NO 合成的减少会导致 PMN 聚集的触发, NO 可通过减少血管内皮细胞(EC) 表达黏附分子而减少中性粒细胞-内皮细胞(PMN-EC) 的黏附; 还具有抑制血小板黏附聚集、抑制平滑肌细胞增殖作用; 还可以抑制自由基诱导的脂质过氧化而减少 MIRI 损伤, 在 MIRI 中具有保护作用^[3]。而 ET 是血管内皮细胞分泌的一种强有力的血管收缩肽, 其通过激活钙通道增加 Ca²⁺ 内流, 促进血管平滑肌收缩^[4]。在 MIRI 血管内皮损伤时合成或释放增加, 并与其在血管平滑肌细胞上的受体结合, 调节血管紧张度而使血管收缩; 并使冠状血管对 ET 的敏感性增加, 冠脉小分支因而易于痉挛, 可导致心肌的无复流现象; 同时作为一种生长因子, ET 通过刺激血管平滑肌细胞增殖, 参与并促进 MIRI 的发生和发展^[5-6]。

Na⁺-K⁺-ATPase 又称为钠泵, 是一类广泛存在于真核生物细胞质膜上的一种跨膜蛋白, 是细胞能量转换的重要系统, 利用水解 ATP 释放的能量将胞内 Na⁺ 运输到胞外, 同时将胞外的 K⁺ 运输到胞内, 对于细胞维持其兴奋性和细胞膜内外的离子分布有极其重要的意义。而 MIRI 时心肌缺血缺氧, 呼吸抑制, ATP 生成减少, Na⁺-K⁺-ATPase 活性降低, 引起细胞内 Na⁺ 无法及时移出, 使细胞膜内 Na⁺ 升高, Na⁺-Ca²⁺ 交换抑制使 Ca²⁺ 在胞浆中增加, 造成心肌细胞 Ca²⁺ 超载^[1,7]。Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase 又称为钙泵, 存在于质膜、内质网膜和线粒体膜上。当 Ca²⁺ 在胞浆中升高到一定程度, 该酶被激活将 Ca²⁺ 泵出细胞或泵入内质网使细胞内 Ca²⁺ 下降。MIRI 时钙泵失灵, 不能将肌浆中过多的 Ca²⁺ 泵出或摄入肌浆网,

也导致 Ca²⁺ 超载。MIRI 时能量代谢障碍所造成的 Ca²⁺ 超载导致细胞超氧自由基生成增多, 进一步促进 Ca²⁺ 震荡释放并形成恶性循环。超氧自由基和 Ca²⁺ 超载成为细胞致死原因^[3]。

本实验显示, 归芪胶囊使心肌缺血和 MIRI 时家兔心电图 ST 段抬高后出现较明显的恢复性下降; 同时具有明显增加 MIRI 时体内 NO 含量, 并减少体内产生的 ET 的含量, 通过对 NO 升高与 ET 的清除, 缓解由于血管内皮损伤、血管收缩所导致的心肌损伤, 达到避免缺血导致的心肌细胞在血液再灌注时更进一步损伤甚至出现细胞死亡的目的; 还可明显缓解 MIRI 时能量代谢障碍, 增加心肌 Na⁺-K⁺-ATPase 和 Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase 含量的影响, 从而减轻细胞内 Ca²⁺ 超载的程度, 对 MIRI 有一定的保护作用。归芪胶囊是否还作用于其他致病因子, 产生协同保护作用, 有待于进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] 姚泰. 生理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 125-126.
- [2] 杨惠玲. 高级病理生理学[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 24.
- [3] 刘胜中. 心肌缺血/再灌注损伤机制研究进展[J]. 实用医院临床杂志, 2007, 4(1): 88-90.
- [4] 江巍, 苏燕生, 张文高, 等. 内皮素与中医药研究[J]. 中国中西医结合杂志, 1999, 19(6): 376.
- [5] 韩雅玲. 内皮素调节心血管功能的分子和细胞机制[J]. 心血管病学进展, 1994, 15(6): 363.
- [6] 吴傅轩, 丁文惠, 李大元, 等. 炎症递质在兔心肌缺血再灌注损伤中的作用[J]. 临床心血管病杂志, 2000, 16(2): 85-87.
- [7] 谷天祥, 张显清. 心肌缺血再灌注损伤亚细胞 Ca²⁺ 反常与 ATP 酶功能抑制[J]. 中华心血管病杂志, 2001, 29(7): 420.