

水苏碱对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用

马玉红, 杨解人

(皖南医学院药理教研室, 安徽 芜湖 241000)

[摘要] 目的: 研究水苏碱对大鼠急性心肌缺血再灌注损伤的保护作用。方法: 冠脉结扎法复制大鼠急性心肌缺血再灌注模型。测定给药后 145min 血清和心肌组织中乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)、肌钙蛋白(cTnT)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)和一氧化氮(NO)。结果: 水苏碱(3、6、12mg/kg, iv)可降低缺血再灌注损伤时 LDH、CK 活性和 cTnT 浓度, 减少 MDA 含量, 升高 SOD 活性及 NO 水平。结论: 水苏碱对大鼠急性心肌缺血再灌注损伤具有保护作用。

[关键词] 水苏碱; 心肌缺血再灌注; 肌钙蛋白; 一氧化氮

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2006)05-0040-03

Protective Effect of Stachydrine on Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury in Rats

MA Yu-hong, YANG Jie-ren

(Department of Pharmacology, Wannan Medical College, Wuhu, 241000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the protective effect of stachydrine on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. **Methods:** Myocardial ischemia-reperfusion injury model was made by ligating the coronary artery for 30min followed by reperfusion for 120min in anesthetized rats. All animals were given the stachydrine or normal saline, danshen after ligation. LDH and CK and SOD activity, MDA content, NO level in serum and in myocardial homogenate and cTnT content in serum were measured. **Results:** The results showed that stachydrine(3, 6, 12mg/kg, iv) could inhibit the activity of LDH and CK and cTnT ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), decrease MDA content ($P < 0.01$), and increase the SOD activity and NO level ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) in comparison with model group. **Conclusion:** Stachydrine can protect the effect of myocardial ischemia-reperfusion injury in rats.

[Key words] stachydrine; myocardial ischemia-reperfusion injury; cardiac troponin T; nitric oxide

冠心病是一种严重危害人类健康的常见病、多发病^[1]。随着溶栓治疗、冠状动脉搭桥术、气囊成形术等治疗的广泛应用和发展, 缺血再灌注损伤日益受到重视。在尽量缩短缺血发作与冠脉再通同时, 寻找有效防治药物, 最大程度地改善缺血再灌注心肌的代谢状态, 在某种程度上对减轻再灌注损伤有着重要的意义^[2]。益母草为传统妇科良药, 其主要

有效成分包括水苏碱、益母草碱等。现代药理学证实益母草粗制剂具有抗栓、抗凝、降脂、降血黏度, 抑制红细胞及血小板聚集, 改善微循环, 抗氧自由基, 减少细胞内钙超载等诸多作用^[3,4], 但有关水苏碱抗心肌缺血研究尚未见相关报道。本文采用大鼠冠脉结扎法观察水苏碱对心肌缺血再灌注损伤的保护作用。

1 材料和方法

1.1 药品及试剂 水苏碱由安徽恢宏药业有限公司人工合成, 纯度为 98.36%, 基本结构为 L-脯氨酸二甲内盐, 分子量 $M = 143.18$, $pH = 7^{[5]}$ 。用生理盐水配制, 药物浓度分别为: 0.1%、0.2%、0.4% (批

[收稿日期] 2005-07-07

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学基金(No. 2003kj322)

[通讯作者] 杨解人, Tel: (0553) 3932264; E-mail: wnmcyao@sina.com

号:040906); 50% 丹参注射液(安徽阜阳制药厂提供,批号:990907);一氧化氮(nitric oxide, NO)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、肌酸激酶(creatine kinase, CK)试剂盒(均由南京建成生物工程研究所提供,批号:20041130);肌钙蛋白(cardiac troponin T, cTnT)试剂盒(北京北方生物科技有限公司提供,批号:20050130);其它试剂均为分析纯。

1.2 动物 健康雄性 SD 大鼠 48 只,体重(300 ± 30) g,清洁级,合格证号:SCXK(苏)2002-0018,由南京市青龙山动物繁殖场提供。

1.3 仪器 ALC-V8 型小动物呼吸机(上海奥尔科特生物科技有限公司);MPA-2000M 型心功能分析仪(上海奥尔科特生物科技有限公司);TGL-16G-A 冷冻离心机(上海安亭科技有限公司);XD 81 型半自动生化分析仪(上海迅达医疗仪器公司)。

1.4 实验方法^[6] 将动物随机分成假手术组(NS, 3mL/kg)、模型组(NS, 3mL/kg)、水苏碱高、中、低剂量组(12、6、3mg/kg)、丹参阳性对照组(2g/kg),每组 8 只。采用 25% 乌拉坦(4mL/kg, ip)麻醉,气管插管行人工呼吸(频率 60~70 次/min,潮气量 3~4mL)。于胸骨左缘第三、四肋间开胸暴露心脏,在肺动脉圆锥和左心耳之间左冠状动脉处穿一丝线,将线两端穿入一聚乙烯小管以形成闭环,拉紧闭环并用止血钳固定持续缺血 30min,放松止血钳再灌注 120min。假手术组穿线不结扎。并于结扎后 5min 按上述设定剂量分别尾静脉注射相应药物。

1.5 血样采集及心肌匀浆制备 于再灌注 120min 后自腹主动脉取血 6mL,静置 30min,按 3000r/min 4℃离心 10min,分离血清;取缺血区心肌制备 10% 心肌匀浆,按 3000r/min 4℃离心 10min,分离上清液 -20℃保存备用。

1.6 指标检测 严格按试剂盒说明书操作:放射免疫法测定 cTnT;考马斯亮兰法测定心肌组织蛋白含量;黄嘌呤氧化酶法、硫代巴比妥酸盐法、硝酸还原酶法分别测定血清和心肌匀浆中的 SOD、MDA 和 NO;化学比色法测定 LDH 和 CK。

1.7 统计学处理 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差齐性检验,方差齐采用 *t* 检验,方差不齐采用 *t'* 检验;量效关系采用成组直线回归;显著性水平 *P* = 0.05。

2 结果

2.1 对心肌酶谱 LDH 和 CK 活性的影响 由表 1 可见,模型组血清及心肌 LDH、CK 显著高于假手术组(*P* < 0.01);除水苏碱 3.6mg/kg 组对血清 LDH 无统计学意义外(*P* > 0.05),其余各剂量组和水苏碱组血清及心肌 LDH、CK 活性明显低于模型组(*P* < 0.05 或 *P* < 0.01);水苏碱 6.12mg/kg 降低血清及心肌 CK 效应与丹参相当(*P* > 0.05);水苏碱各剂量组之间无明显量效关系(*P* > 0.05),但作用有一定增强趋势。

表 1 水苏碱对大鼠心肌缺血再灌注损伤时 LDH、CK 的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 (mg/kg)	LDH		CK	
		血清 U/L	心肌 U/mg (pro)	血清 U/L	心肌 U/mg (pro)
假手术组	-	6000 ± 2218	1687 ± 552	255 ± 57	36 ± 17
模型组	-	11633 ± 3841 ²⁾	4228 ± 275 ²⁾	499 ± 73 ²⁾	172 ± 76 ²⁾
丹参组	2000	7175 ± 1901 ³⁾	2671 ± 480 ^{2,4)}	351 ± 84 ^{1,4)}	37 ± 16 ⁴⁾
水苏碱组	3	8400 ± 2825	3454 ± 431 ^{2,4,6)}	397 ± 68 ^{2,3)}	76 ± 24 ^{2,3,6)}
水苏碱组	6	8200 ± 2463	3437 ± 281 ^{2,4,6)}	377 ± 59 ^{2,4)}	57 ± 26 ⁴⁾
水苏碱组	12	7733 ± 1702 ³⁾	3409 ± 383 ^{2,4,6)}	369 ± 66 ^{2,4)}	52 ± 21 ⁴⁾

注:与假手术组比较:¹⁾ *P* < 0.05, ²⁾ *P* < 0.01;与模型组比较:³⁾ *P* < 0.05, ⁴⁾ *P* < 0.01;与丹参组比较:⁵⁾ *P* < 0.05, ⁶⁾ *P* < 0.01,下同。

2.2 对 MDA 含量及 SOD 活性的影响 由表 2 可见,与假手术组相比,模型组血清及心肌 MDA 含量显著升高,SOD 活性显著降低(*P* < 0.01);给予丹参及 3 种剂量的水苏碱后,可明显降低模型大鼠血清及心肌 MDA 含量,升高 SOD 活性(*P* < 0.01),其中各剂量组降低心肌 MDA 作用量效关系有显著的统计学意义(*r* = -0.877 ± 0.213, *P* < 0.01);各剂量组与丹参组比较降低血清 MDA 效应相当。

表 2 水苏碱对大鼠心肌缺血再灌注损伤时 MDA 含量及 SOD 活性影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 (mg/kg)	MDA		SOD	
		血清 nmol/mL	心肌 nmol/mg (pro)	血清 U/mL	心肌 U/mg (pro)
假手术组	-	3.98 ± 0.54	2.22 ± 0.38	142.25 ± 29.25	154.44 ± 3.37
模型组	-	8.27 ± 0.16 ²⁾	6.44 ± 0.48 ²⁾	65.23 ± 18.96 ²⁾	83.54 ± 20.76 ²⁾
丹参组	2000	4.18 ± 0.75 ⁴⁾	2.57 ± 0.33 ⁴⁾	124.43 ± 18.39 ⁴⁾	137.16 ± 4.56 ^{2,4)}
水苏碱	3	4.95 ± 0.54 ^{4,5)}	4.82 ± 0.45 ^{2,4,6)}	103.07 ± 20.70 ^{2,4,5)}	122.29 ± 17.04 ^{2,4,5)}
水苏碱	6	4.79 ± 0.07 ⁴⁾	3.95 ± 0.39 ^{2,4,6)}	108.37 ± 12.94 ^{1,4)}	122.36 ± 16.35 ^{2,4,5)}
水苏碱	12	4.56 ± 0.15 ⁴⁾	3.13 ± 0.21 ^{2,4,6)}	116.15 ± 24.88 ⁴⁾	129.65 ± 19.45 ^{1,4)}

2.3 对 cTnT 和 NO 含量的影响 如表 3 所示,与假手术组相比,模型组血清 cTnT 显著升高,血清及心肌 NO 显著降低(*P* < 0.01);与模型组相比,水苏碱

各剂量组血清 cTnT 浓度显著降低 ($P < 0.01$), 效应与丹参相似, 水苏碱 12mg/kg(血清) 和 6、12mg/kg(心肌) NO 水平显著增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 水苏碱各剂量组之间无明显量效关系 ($P > 0.05$), 但作用有一定增强趋势。

表 3 水苏碱对大鼠心肌缺血再灌注损伤时 cTnT 浓度、NO 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 (mg/kg)	cTnT 血清 ng/mL	NO	
			血清 $\mu\text{mol/L}$	心肌 $\mu\text{mol/g}(\text{pro})$
假手术组	-	0.08 \pm 0.04	57.85 \pm 15.40	156.42 \pm 57.00
模型组	-	1.54 \pm 0.65 ²⁾	23.31 \pm 7.10 ²⁾	41.19 \pm 18.14 ²⁾
丹参组	2000	0.31 \pm 0.09 ^{2,4)}	45.39 \pm 11.85 ^{1,3)}	126.94 \pm 44.56 ⁴⁾
水苏碱	3	0.63 \pm 0.32 ^{2,4)}	21.53 \pm 8.96 ^{2,6)}	50.04 \pm 15.24 ²⁾
水苏碱	6	0.57 \pm 0.26 ^{2,4)}	29.03 \pm 8.22 ^{2,6)}	120.17 \pm 38.78 ⁴⁾
水苏碱	12	0.49 \pm 0.22 ^{2,4)}	39.10 \pm 14.38 ^{2,3)}	145.93 \pm 33.62 ⁴⁾

3 讨论

心肌缺血再灌注损伤是心血管疾病治疗中常见的病理生理过程, 一直被认为是心肌缺血治疗的关键问题, 也是应用基础研究中的一个热点^[7]。

心肌缺血再灌注时, 氧自由基大量产生导致心肌细胞死亡。大量 CK 和 LDH 从坏死的心肌细胞中漏出, SOD 等内源性氧自由基清除剂活性降低^[2,8]。同时由于心肌缺血, 蛋白水解导致心肌发生不可逆的损伤, 受损心肌细胞释放出 cTnT^[9,10]。研究结果表明, 水苏碱 iv 后 115min, 随着剂量增加, 保护因子 SOD 活性明显升高, 损伤因子 MDA 含量明显减少, 血清及心肌组织 CK、LDH 活性及 cTnT 浓度明显降低, 且有一定的量效关系。提示水苏碱对大鼠心肌缺血再灌注损伤具有保护作用。

NO 是血管内皮细胞合成释放的一种舒血管因子。其具有维持心血管系统恒定的舒张状态, 调节冠状动脉基础张力, 保持心肌血流灌注等重要作用^[2]。本研究发现水苏碱(6、12mg/kg) 在一定程度上能增加血清及心肌组织中 NO 水平, 表明该药抗

缺血再灌注损伤可能还与其防止 NO 减少, 保护心肌细胞和血管内皮细胞免受缺血损伤有关。

综上所述, 水苏碱对大鼠心肌缺血再灌注损伤具有保护作用, 其机制可能与该药清除氧自由基, 稳定细胞膜, 抑制受损心肌细胞释放 CK、LDH 及 cTnT, 增加 NO 含量等作用有关。其确切作用机制有待进一步研究。

[参考文献]

[1] 王吉耀, 廖二元, 胡品津. 内科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003. 245-252.

[2] 张晓晖, 张斌, 董培力, 等. 葎苈原花青素对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 药学学报, 2004, 39(6): 401-405.

[3] 郑虎占, 董泽宏, 余靖. 中药现代研究与应用[M]. 北京: 学苑出版社, 1998. 4: 3803.

[4] 陈少如, 郑鸿翔, 陈韩秋, 等. 益母草制剂治疗心肌缺血及其机制研究[J]. 中国危重病急救医学, 2002, 14(1): 19-22.

[5] 何黎琴, 王效山. 水苏碱的合成[J]. 化学世界, 2005, 296-298.

[6] 韦开福, 马业新, 林英忠. 褪黑素对在体大鼠心肌缺血再灌注损伤的作用[J]. 中国药理学通报, 2005, 21(4): 468-471.

[7] 都本洁. 实用心脏病学[M]. 北京: 科技出版社, 2000. 59.

[8] Lic, Jackson RM. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia reoxygenation injury[J]. Am Physiol, 2002, 282(2): 227-241.

[9] Roberta Barbato, Roberta Menabo, Paola Dainese, et al. Binding of cytosolic proteins to myofibrils in ischemic rat hearts[J]. Circ. Res., 1996, 78(5): 821-828.

[10] Fuat Gurkan, Asuman Aykaya, Aydin Ece, et al. Cardiac troponin T as a marker of myocardial dysfunction in children with septic shock[J]. Swiss Med Wkly 2004, 134: 593-596.