

川芎嗪后处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用

顾迎春 于晓玲 郭维军

【摘要】 目的:观察川芎嗪后处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及探讨其可能的作用机制。 方法:采用结扎大鼠左冠状动脉前降支方法制备心肌缺血再灌注损伤模型,记录各组心律失常发生情况,测定肌酸激酶(CK)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、一氧化氮(NO)、一氧化氮合酶(NOS)含量,HE 染色光镜下观察心肌组织形态学改变并称重检测心肌梗死面积。 结果:川芎嗪组的心律失常发生率明显降低,心肌细胞肿胀明显减轻,血中 SOD、NO、NOS 含量增加,MDA、CK 的生成减少。(P<0.05)。 结论:川芎嗪后处理能降低心律失常发生、减少坏死面积,其作用可能与提高 SOD、NO、NOS 含量,减少 MDA 生成有关。

【关键词】 川芎嗪;后处理;缺血再灌注损伤

Protective effect of tetramethylpyrazine postconditioning on ischemia-reperfusion injured myocardium in rats GU Ying-chun¹, YU Xiao-ling², GUO Wei-jun³ (1. Department of Cardiology, Huai Yin Hospital, Huai An 223300, China; 2. Department of Senior Clinical Center, the First Affiliated Hospital of Liao Ning Medical College, Jin Zhou 121001, China; 3. Department of Cardiology, Huai Yin Hospital, Huai An 223300, China)

【Abstract】 **Objective:** To observe the protective effect of tetramethylpyrazine (TMP) postconditioning on the ischemia-reperfusion injured myocardium in rats. **Methods:** Rat models with myocardial ischemia/reperfusion injury were made by ligating anterior descending branch of the left coronary artery. The arrhythmias occurred in rats from every group were recorded. The creatine kinase (CK), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), nitric oxide (NO), and nitric oxide synthase (NOS) were measured. The changes in histological morphology of myocardium were observed by HE dyeing under optical microscopy. The myocardium from various parts of the heart was weighed and the area of infarcted myocardium was calculated. **Results:** Compared with control group, there was significantly reduced occurrence of arrhythmias, increased SOD, NO, and NOS, and decreased MDA and CK in blood samples of rats in the postconditioning group and the TMP group (P<0.05). **Conclusions** TMP postconditioning may exert the protective effect on the ischemia-reperfusion injured myocardium by reducing the incidence of arrhythmias and the area of infarcted myocardium, which is associated with increased SOD, NO, and NOS, and decreased MDA.

【Key words】 Tetramethylpyrazine; Postconditioning; Ischemic reperfusion injury

多年来研究人员为减轻缺血再灌注损伤,先后进行了缺血预处理^[1]、缺氧预处理、药物预处理

等有效方法的研究,然而因很难预测急性缺血事件的发生,预处理的临床应用受到限制。2003 年 Zhao 等^[1]首先提出缺血后处理并证实其与预处理有类似的保护效果,但后处理是一个附加的缺

作者单位:223300 江苏,淮阴医院心内科(顾迎春,郭维军);
121000 辽宁医学院附属一院高级诊疗中心(于晓玲)

血干预,操作复杂有创,临床应用受限,故而对药物后处理展开了研究。川芎嗪是从中药川芎的生物碱中分离得到的有效单体,有改善微循环、扩张冠状动脉、抗凝、抗血小板聚集等多种作用,已广泛用于心脑血管疾病的治疗,但川芎嗪后处理对心肌缺血再灌注损伤保护作用的研究尚少见。

1 材料和方法

1.1 模型制作与分组

健康雄性 SD 大鼠(辽宁医学院实验动物中心提供)40 只,体重 250~300 g。

1.1.1 心肌缺血再灌注损伤模型的制备 大鼠用乌拉坦 1g/kg 麻醉,描记肢导心电图,气管插管,上呼吸机,分离左侧颈总动脉留用;沿左锁骨中线纵行切开皮肤,分别在 2、3、4 肋间隙进针穿线,分开肋间隙和软组织,剪断肋骨,暴露心脏,以左冠状动脉主干为标志,在左心耳下缘 2~3 mm 处进针,5/0 丝线穿过,用一长约 5 mm,直径 1.5 mm 的乳胶管垫于血管与结扎线之间,打活结,以收紧结扎线时 S-T 段抬高。放松后 S-T 段下降 1/2 以上为模型成功,关闭胸腔。

1.1.2 动物分组 40 只大鼠随机分 4 组,每组 10 只。(1)假手术组(空白组):开胸后穿线,不收紧扎线;(2)再灌注损伤组(I/R 组):收紧结扎线,造成缺血 30 min;(3)缺血后处理组(后处理组):打活结结扎 30 min,再通 10 s,结扎 10 s 重复 4 次;(4)川芎嗪后处理组(川芎嗪组):结扎 30 min,松扎前 2 分钟尾静脉注入药物(川芎嗪 50 mg/kg,加生理盐水稀释至 2 ml);以上各组剪断结扎线后均再灌 180 min,除川芎嗪组外,各组均于松扎前尾静脉注入生理盐水 2 ml。

1.2 检测指标及方法

1.2.1 心律失常评分 计录缺血和再灌期间室早发生次数,室速、室颤发生率及累计持续时间。参照文献^[2]进行评分,0 分:无室性心律失常或仅发生室早,且 ≤ 5 次/分;1 分:仅发生室早 ≥ 5 次/分;2 分:仅发生一阵室速且 ≤ 60 s;3 分:发生一阵 ≥ 60 s 的室速或发生多阵室速但累计时间 ≤ 60 s;4 分:发生多阵室速且累计时间 ≥ 60 s;5 分:发生室颤但能够自动恢复;6 分:出现不可恢复的室颤或在观察期内死亡。

1.2.2 心肌梗死范围测量 取血毕,原位结扎冠状动脉,1%伊文思蓝 2ml 由主动脉逆行注入左心室,剔出心房和右室及蓝染区域,-20℃冰冻 20 min,取出后将心脏横切成 1~2 mm 的短轴切片,放入 1% TTC 0.1 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 值 7.4)中,37℃孵育 20 min。TTC 染色后梗死心肌不染色,呈灰白色,缺血区心肌呈红色,分离后滤纸吸干,称重,梗死范围以坏死心肌重量与左室重量(坏死+非坏死)之比表示。

1.2.3 光镜下观察大鼠心肌形态改变 实验结束立即取下心脏,4%甲醛固定,从心尖始间距为 0.3 cm 横向连续切片,石蜡包埋切片(5 μ m 厚),HE 染色,光镜下观察病理改变。

1.2.4 血清生化指标测定 于 180 min 再灌注末,颈总动脉取血 4 ml,1 500 r/min 离心 10 min,取上清液,测定血中磷酸肌酸激酶(CK)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、一氧化氮(NO)及一氧化氮合酶(NOS)含量,各项均按试剂盒方法测定及计算。

1.3 统计学方法 全部数据分析采用 Spss 11.5 统计分析软件进行,计量资料以均数 \pm 标准差表示($\bar{x} \pm s$),采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 为差异有统计学意义和显著统计学意义。

2 结果

2.1 心律失常评分比较

缺血期及再灌注期间后处理组、川芎嗪组心律失常评分明显高于空白组、I/R 组($P < 0.01$)见表 1。

表 1 各组心律失常评分比较($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	缺血期	再灌注期
空白组	0.2 \pm 0.42	0.1 \pm 0.32
I/R 组	1.2 \pm 1.03 [*]	2.7 \pm 1.77 [*]
后处理组	1.1 \pm 0.88 [*]	1.4 \pm 0.97 [*] ▲
川芎嗪组	1.0 \pm 0.82 [*]	1.2 \pm 0.92 [*] ▲

注:与空白组比较,^{*} $P < 0.01$,与 I/R 组比较,▲ $P < 0.01$

2.2 心肌梗死范围测量

空白组未测得坏死区;I/R 组、后处理组、川芎嗪组 3 组间左室重量相当;川芎嗪组、后处理组梗死范围明显低于 I/R 组($P < 0.01$),见表 2。

表 2 大鼠梗死范围、左室重量的比较 (n = 10, $\bar{x} \pm s$)

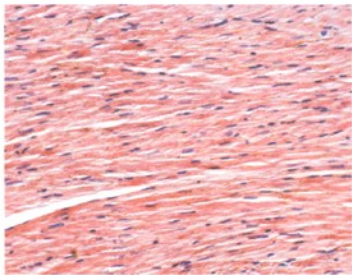
组别	坏死区(g)	非坏死区(g)	梗死范围(%)	左室重量(g)
I/R 组	0.1754 ± 0.194	0.2812 ± 0.0324	38.50 ± 4.41	0.4579 ± 0.334
后处理组	0.1144 ± 0.101 *	0.3548 ± 0.228 *	22.59 ± 1.75 *	0.4487 ± 0.254
川芎嗪组	0.1038 ± 0.093 *	0.3397 ± 0.0177 *	25.24 ± 2.43 *	0.4541 ± 0.136

注:与 I/R 组比较, * P<0.01

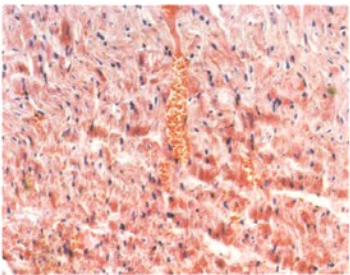
2.3 光镜下观察大鼠心肌形态改变

空白组心肌纤维染色均匀、横纹清晰,心肌间质未见出血坏死及炎性细胞浸润;I/R 组心肌组织有不同程度肿胀,心肌纤维断裂,间质有较多炎

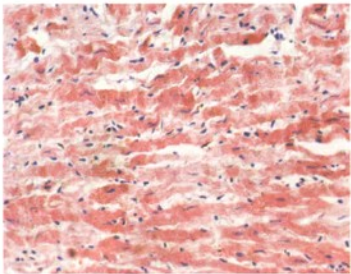
性细胞浸润,肌间质有瘀血;川芎嗪组与后处理组心肌细胞肿胀明显减轻,心肌纤维呈波浪状,肌浆分布不均匀,心肌间质无出血,有少量炎性细胞浸润,见图 1-4。



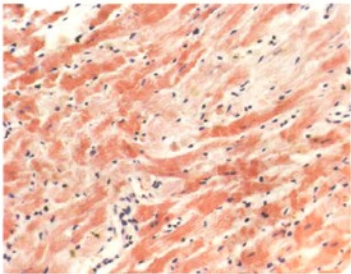
a 空白组 (×200)



b I/R 组 (×400)



c 缺血后处理保护组 (×400)



d 川芎嗪后处理保护组 (×400)

图 1 光镜下观察 4 组心肌组织形态变化, HE 染色

2.4 血清生化指标测定

川芎嗪组和后处理组 CK、MDA 含量明显低

于 I/R 组; SOD、NOS 含量明显高于 I/R 组, 见表 3。

表 3 各组大鼠血清生化指标的比较 (n = 10, $\bar{x} \pm s$)

组别	CK(U/L)	SOD(U/ml)	MDA (nmol/ml)	NO(μmol/ml)	NOS(nmol/ml)
空白组	38.29 ± 11.94	75.7 ± 6.90	4.07 ± 0.95	102.06 ± 18.71	45.24 ± 6.37
I/R 组	183.99 ± 32.91 *	38.53 ± 5.87 *	10.86 ± 1.88 *	63.12 ± 10.20 *	28.88 ± 4.56 *
后处理组	98.98 ± 18.57 *▲	60.17 ± 6.33 *▲	8.94 ± 1.81 *△	76.96 ± 13.33 *△	38.14 ± 6.04 *▲
川芎嗪组	115.27 ± 20.78 *▲	62.39 ± 6.55 *▲	9.08 ± 2.13 *△	78.31 ± 14.25 *△	36.01 ± 6.32 *▲

注:与空白组比较, * P<0.01, 与 I/R 组比较, △P<0.05, ▲P<0.01

3 讨论

心肌缺血再灌注损伤是指心肌经过一定时间缺血后恢复血流灌注,出现不可逆性损伤的现象。研究表明,氧自由基产生增多介导的脂质过氧化反应、钙超载、微血管损伤和炎症反应是缺血再灌注损伤的重要环节^[3]。

再灌注心律失常是心肌缺血再灌注损伤常见的表现形式,也是导致死亡的重要原因之一,其产生与钙超载和自由基造成的心肌损伤有关,是心肌兴奋性、传导性和自律性异常的结果,以室性心律失常多见^[4]。本研究显示,川芎嗪后处理能减少再灌注心律失常的发生,以前的电生理研究证实川芎嗪有阻断心室肌细胞 L 型钙通道电流的作用,拮抗外源性钙离子进入细胞内^[5],故推测川芎嗪后处理可能通过拮抗细胞内钙超载而减少再灌注心律失常的发生。

CK 是一种存在于心肌细胞内的蛋白酶,当心肌细胞损伤或坏死时,CK 便可通过受损的细胞释放到血液中,因此可以作为反映心肌坏死程度的指标。本实验结果显示,川芎嗪后处理组心肌酶 CK 释放明显减少,心肌梗死范围缩小,与缺血后处理的保护效应相当。

再灌注早期,氧自由基的产生/清除严重失调,一方面多种途径使其生成增加,另一方面缺血时组织清除酶的活性受到抑制,造成其大量堆积,氧自由基对心肌的损伤主要为脂质过氧化,形成脂质过氧化物(LPO)而损伤心肌细胞^[6]。LPO 最重要的代谢产物是 MDA,而 SOD 是清除自由基的一种特异酶,故测定 MDA 及 SOD 可反映体内抗氧化功能。本研究显示,川芎嗪后处理组的 MDA 含量降低,SOD 明显增高,表明增强抗氧化能力,减轻脂质过氧化损伤,可能为川芎嗪后处理减少心肌缺血再灌注损伤的机制之一。

研究认为在基础状态下血管内皮细胞释放 NO 对维持心血管系统处于恒定的舒张活性状态、调节血压、冠脉基础张力及心肌血流灌注有重要作用。NO 的合成是以左旋精氨酸为底物在 NOS 和其他辅助因子共同参与下完成的,NOS

及 NO 含量可反映血管内皮功能的变化,而微血管内皮损伤是缺血再灌注损伤的重要机制。本实验观察到,川芎嗪后处理和缺血后处理组均可显著提高 NOS 活性,表明川芎嗪后处理可通过改善血管内皮功能,提高 NOS 活性及 NO 水平,减轻缺血再灌注所造成的心肌损伤。

上述研究表明,川芎嗪后处理与缺血后处理一样对缺血再灌注损伤心肌具有保护作用,效果相当。其机制可能与减轻氧自由基损伤,抗氧化作用增强,保护血管内皮功能等作用有关。由于川芎嗪后处理不附加额外的缺血,且操作简便、无明显不良反应、安全剂量范围宽、货源充足、价格颇廉,在临床上应用前景更为广阔。

参 考 文 献

- [1] Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion; comparison with ischemic preconditioning[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, 285 (2): H579-H588.
- [2] 郭连峰,王雯,张立克. 钾通道阻滞剂对缺血再灌注室性心律失常的影响[J]. 首都医科大学学报, 1999, 20 (2): 128-129.
- [3] Tessier-Vetzel D, Tissier R, Waintraub X, et al. Isoflurane inhaled at the onset of reperfusion potentiates the cardioprotective effect of ischemic postconditioning through a NO-dependent mechanism[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2006, 47 (3): 487-492.
- [4] Li Y, Tao L, Zang YM, et al. Effects of ischemic postconditioning on myocardial apoptosis and infarction in rabbits with acute myocardial ischemia and reperfusion[J]. *J Fourth Mil Med Univ*, 2002, 23(18): 1690-1693.
- [5] Petrishchev NN, Vlasov TD, Galagudza MM, et al. Myocardial ischemic postconditioning; a brief ischemia causes conversion of resistant reperfusion-induced ventricular fibrillation into the normal rhythm[J]. *Russ Fiziol Zh Im IM Sechenova*, 2004, 90(9): 1138-1144.
- [6] Nakano A, Liu GS, Heusch G, et al. Exogenous nitric oxide can trigger a preconditioned state through a free radical mechanism, but endogenous nitric oxide is not a trigger of classical ischemic preconditioning[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2000, 32(7): 1159~1167.

(收稿:2009-01-19 修回:2009-05-31)

(本文编辑:金谷英)