维普资讯 http://www.cqvip.com

成纤维细胞生长因子和丹参对实验性心肌缺血再灌注损伤的预防作用

周志强[1],方光辉[2],任春兰[1],张志坚[1],狄荣科[1] (1.江苏大学医学院,江苏 镇江 212001;2.镇江市丹徒区疾病预防控制中心,江苏 镇江 212000)

[摘 要] **目的** 观察碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)和丹参(SM)对缺血再灌注心肌组织脂质过氧化反应的预防作用。**方法** 采用新西兰长耳大白兔,心脏左前支冠状动脉结扎,制作心肌缺血动物模型。观察经bFGF和SM预处理的缺血再灌注2 h的心肌组织中琥珀酸脱氢酶(SDH)、脂质过氧化代谢产物MDA含量;抗脂质过氧化酶性指标超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSHpx)活性和非酶性指标MDA、还原性谷胱甘肽(GSH)、一氧化氮(NO)含量。**结果** bFGF和SM联合预处理组心肌中SDH、SOD、GSHpx活性明显高于缺血再灌注组,抗氧化物GSH和NO的含量明显高于缺血再灌注组,心肌病理改变明显好于未用bFGF和SM组。而MDA的含量比未用SM和bFGF组低。尤其是bFGF和SM联合用药效果更为明显。**结论** bFGF和SM能有效地减轻心肌缺血再灌注所致的损伤,二者联合使用的抗氧化效果好于单独使用。

[关键词] 碱性成纤维细胞生长因子;丹参;缺血再灌注;心肌;兔
[中图分类号] R541 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2007)06-0379-03

Prevention of basic fibroblast growth factor and salvia miltiorrhiza on experimental myocardial ischemia reperfusion

ZHOU Zhi-qiang, FANG Guang-hui, REN Chun-lan, ZHANG Zhi-jian, DI Rong-ke (Medical College of Jiangsu University, Zhenjiang Jiangsu 212001, China)

Abstract: Objective To investigate the protective effects of salvia miltiorrhiza(SM) and basic fibroblast growth factor(bFGF) on lipid peroxidation induced by myocardial ischemia reperfusion(I/R). **Methods** The myocardial ischemia reperfusion model in rabbits was established by anterior left coronary artery ligation. Activity of succinct dehydrogenate(SDH), superoxide dismutase(SOD) glutathione peroxides(GSHpx) and levels of glutathione(GSH) malanldehyde (MDA) and nitric oxide(NO) were measured. **Results** Both doses of SM and bFGF pretreatment before I/R, decreased the MDA, increased the activities of SOD and GSHpx, evocate levels of GSH and NO. When rabbit were pretreated with combination of SM and bFGF, the changes of the substance above were less than that when pretreatment of SM or bFGF alone. **Conclusion** SM and bFGF can significantly reduce lipid peroxidation following myocardial I/R injury, and combination of SM and bFGF can produce better protective effects.

Keywords: basic fibroblast growth factor; salviae miltiorrhiza; ischemia reperfusion; myocard; rabbit

心肌缺血是临床上常见的心血管疾病,心肌缺血所引起的损伤以及再灌注后细胞功能和结构的破坏加重其机制已有较深入的研究。有文献报道用丹参(salvia miltiorrhiza,SM)和碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor,bFGF)来减轻缺血再灌注(ischemia reperfusion,I/R)所引起的损伤的实验研究,bFGF以及bFGF和SM联合用药对缺血心肌的作用还未见报道。琥珀酸脱氢酶(SDH)是三羧酸循环中与细胞氧化及线立体氧化磷酸化有关的重要酶,超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSHpx)、还原性谷胱甘肽(GSH)、一氧化氮(NO)是体内重要的抗脂质过氧化酶和抗氧化物质,其活性和含量的改变标志着心肌细胞受损、心肌血管内皮细胞损伤程度和功能的改变,可以作为心肌有无损伤的指标。本实验以SDH、SOD、GSHpx、GSH和NO为观察对象,探讨bFGF以及bFGF和SM联合用药在心肌缺血再灌注中的预防作用以及作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

bFGF(针剂)北京双鹭药业有限公司产品。丹参(针剂)上海中西药业股份有限公司产品。

1.2 动物模型与分组

选用健康新西兰长耳大白兔40只,体重2.0~2.5 kg,雌雄不限,将兔随机分为对照组、缺血再灌组(I/R)、bFGF组、SM组、bFGF+SM联合应用组等5组,每组8只。20%乌拉坦5 ml/kg经耳缘静脉麻醉,SM和bFGF组分别在结扎冠状动脉前

[基金项目] 江苏省科技厅社会发展计划资助项目(BS99388)
[作者简介] 周志强(1968-),男,江苏省镇江市人,实验师,学士,主要从事人体解剖学教学与实验等方面的研究。电话:(0511)85038553
[收稿日期] 2007-09-20 [修回日期] 2007-11-05

维普资讯 http://www.cqvip.com

2 min和灌注后即刻由耳缘静脉给药(SM组:各1.8 g/kg,bFGF组:各0.32 μg/kg)。仰卧固定,胸部剪毛并常规消毒,胸部心前区开胸,左前支上1/3处结扎冠状动脉,结扎点以下心脏外观苍白继而紫绀并出现明显的心肌缺血心电图改变,表明结扎成功,关闭胸壁,40 min后再灌注,灌注2 h后处死动物立刻取出心脏。观察并记录心脏外形及色泽的变化。

1.3 心肌组织中琥珀酸脱氢酶组织化学染色观察

开胸取出以上各组的心脏,用生理盐水洗去血液,沿平行于冠状沟方向将心脏左室前壁剪下,-20 ℃恒冷箱制备20 μm厚的冰冻切片,切片按下列程序进行组织化学染色。切片浸于孵育液中37 ℃恒温水浴箱孵育,孵育液成分为:磷酸缓冲液(0.1 mol/L, pH7.6)、琥珀酸钠(0.1 mol/L)、Nitro-BT(1.0 g/L)各10 ml,孵育时间为30 min。再将切片固定于10%甲醛生理盐水中10 min,流水轻轻冲洗1 min,用甘油封固切片。对照组用0.05 mol/L丙二酸钠代替琥珀酸钠进行孵育。图像的定性分析采用四川大学的mias软件处理。

1.4 心肌组织中各项生化指标的测定

取心脏左室前壁缺血区心肌,用pH7.6 PBS洗涤后取适量心肌组织制成10%的匀浆,3 000 r/min离心10 min,取上清液进行以下检测:GSHpx活性和GSH含量采用二硫代双-二硝基苯甲酸比色法,SOD采用亚硝酸比色法,MDA采用二硫代巴比妥酸比色法,NO采用硝酸还原酶法,上述试剂和测定方法均由南京建成生物工程研究所提供。

1.5 统计方法

用Excel建库,定量数据采用SPSS10.0,进行单因素方差分析。图像数据用mias软件处理。

2 结果

2.1 心肌组织的大体观察

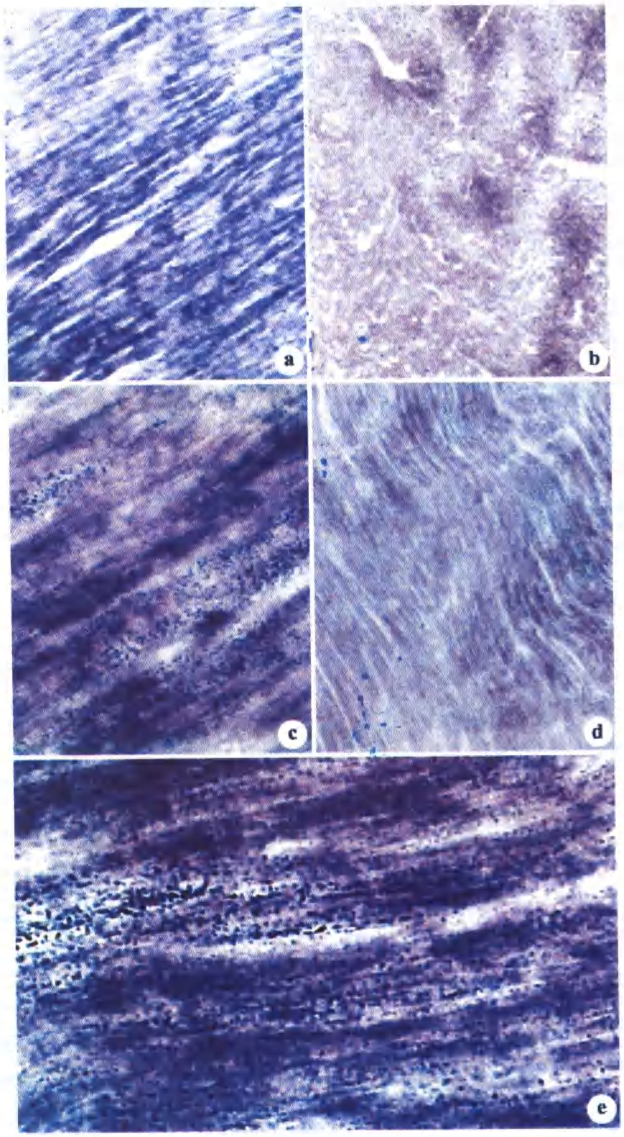
正常对照组心肌组织肉眼观察色泽鲜红,实验性I/R心肌色泽变暗,肌肉变薄,弹性变差,其他各组均好于I/R组。

2.2 琥珀酸脱氢酶检测

各组心肌组织切片经Nitro-BT染色后,在光镜下观察心肌组织着色程度有较明显不同。正常对照组可见着色较均匀且色泽较深,SDH均匀分布于心肌细胞内,活性较高(图1a);实验性I/R组着色明显浅于其他各组(图1b);bFGF和SM联合应用组SDH活性明显好于bFGF或SM单独应用组(图1c、d、e),经mias软件统计分析$P<0.001$。

2.3 抗氧化酶活性和抗氧化物水平检测

bFGF组、SM组以及bFGF和SM联合应用组SOD和GSH-px活性和抗氧化物质GSH含量明显高于I/R组($P<0.001$),其中bFGF和SM联合应用组的GSHpx活性和GSH含量明显高于其他各组。SM组NO含量与I/R组差别无显著性意义($P>0.05$),但bFGF及bFGF和SM联合应用组与I/R组差别均有显著性意义($P<0.001$),结果见表1。



a: 对照组;b: I/R组;c: SM组;d: bFGF组;e: bFGF+SM组

图1 各组心肌组织Nitro-BT染色(×400)

表1 SM和bFGF对I/R心肌抗氧化酶活性和抗氧化物含量的影响($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	SOD	GSHpx	GSH	MDA	NO
对照	15.00±0.81*	61.63±4.49*	46.84±1.70*	1.88±0.17*	15.00±0.81*
I/R	11.38±0.45	32.77±6.07	36.23±2.54	2.55±0.17	11.38±0.45
SM	12.13±0.45*	57.00±4.05*	38.95±1.78*	2.04±0.25#	12.13±0.57
bFGF	14.46±0.77*	55.14±5.74*	40.11±1.56*	1.88±0.25*	14.46±0.77*
bFGF+SM	13.99±0.82*	65.51±3.61*	42.41±1.99*	1.89±0.30*	13.99±0.82*

*:与I/R组比较,$P<0.001$;#:与I/R组比较,$P<0.05$

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.4 脂质过氧化代谢产物MDA含量测定

bFGF组、bFGF和SM联合应用组MDA含量显著低于I/R组($P<0.001$),SM组效果稍差($P<0.05$),结果见表1。

3 讨论

缺血再灌注损伤是在缺血损伤的基础上发展而来,涉及许多疾病的发病机制,损伤机制可分为自由基损伤作用机制,钙超载机制,微血管损伤机制和白细胞作用机制等[1-5]。心肌缺血期,由于产生大量黄嘌呤和次黄嘌呤,灌注期黄嘌呤氧化酶活性增加导致氧自由基大量生成。另一方面,在缺血缺氧时,Ca^{2+}进入线粒体增多,有学者认为Ca^{2+}进入线粒体可使锰-超氧化物歧化酶活性降低,使清除自由基能力下降,最终导致自由基增多[6]。其机制可能为线粒体Ca^{2+}增加,可通过增强Ca^{2+}依赖性蛋白酶活性而加速黄嘌呤脱氢酶转化为黄嘌呤氧化酶,进一步促进自由基的生成[1-2]。本实验结果I/R组MDA含量明显增加,抗氧化物质GSH消耗性降低,同时抗氧化酶SOD和GSHpx活性明显下降。本实验结果还显示在I/R后2 h,心肌组织中NO的含量下降,原因可能是由于在缺血缺氧早期,Ca^{2+}进入线粒体增多使得胞浆中Ca^{2+}浓度降低,当胞浆中钙离子浓度降低到50 nmol/L时NOS失活[1-2],从而导致NO合成减少。另一方面,缺血再灌注后,心肌缺血缺氧,血管内皮细胞和白细胞被激活也使NO合成减少。NO是一种潜在的舒血管物质,具有舒血管、抑制血小板聚集和粘连,对维持内皮细胞的功能具有重要的作用[2-3]。NO含量降低对血液流变学、微血管管径及血管通透性均产生影响。

目前临床上用来预防和治疗I/R的药物主要是针对上述四个缺血再灌的机制来考虑的。SM作为活血化瘀药已有悠久历史。SM能使缺血再灌注兔心肌坏死程度显著减轻,SDH活性受抑制明显好转。具有明显的抑制氧自由基反应,并具有扩张收缩的动脉,调节、改善微循环障碍和钙拮抗作用[6-7]。bFGF是广泛存在于心肌细胞、成纤维细胞和细胞基质中,具有广泛生物活性的物质,能调节中胚层和神经外胚层来源的多种细胞的分裂,其中对血管内皮细胞有显著的增殖效应,是有效的血管生成因子之一。近年来发现用bFGF预处理可以改善I/R后大鼠心脏功能[3]。本实验结果表明bFGF、SM和bFGF加SM联合预处理可以减轻I/R引起的心肌细胞的坏死和琥珀酸脱氢酶活性的下降。脂质过氧化损伤程度减弱、MDA、GSH、NO含量恢复正常,抗脂质过氧化酶GSHpx和SOD的活性趋于正常,与其他学者报道的结果一致。本实验结果还发现当用bFGF与SM联合预处理时这种效应更为明显。

[参考文献]

[1] Leone AM, Palmer RMJ, Know les RG, et al. Constitutive and inducible nitric oxide syntheses in corporate molecular oxygen into both nitric oxide and coralline[J]. J Biol Chem., 1991,266:23790-23795.

[2] Mishra OP, Delivoria-Papdopoulos M. Nitric oxide-mediated Ca^{2+}-influx in neuronal nuclei and cortical synaptosomes of normoxic and hypoxic newborn piglets [J]. Neurosci Lett, 2002,318(2):93-97.

[3] 武旭东,徐成斌,陈 红. 碱性成纤维细胞生长因子对老龄大鼠心脏缺血/再灌注损伤的影响[J]. 泰山医学院学报,1998,19(1):4-7.

[4] 高云仙,甘子明. 脑组织c-fos的表达和急性高眼压诱导的视网膜缺血再灌注损伤研究进展[J]. 局解手术学杂志,2005,14(4):272-273.

[5] 黄 悦,胡 蓉,苏 敏,等. 缺血再灌注损伤对豚鼠小肠Cajal间质细胞的影响[J]. 局解手术学杂志,2007,16(5):317-319.

[6] 袁庆文,盛茂鑫,熊吉信. 钙离子在肝缺血再灌注损伤中的作用及丹参的抗损伤作用[J]. 江西医药,1997,32(3):133-135.

[7] 梁国标,沈寅初,陈代雄,等. 丹参对大鼠缺血再灌注肾组织一氧化氮合成酶mRNA表达的影响[J]. 中国中西医结合外科杂志,2002,8(2):107-110.

(编辑:余汇洋)

关于计数和计量的用法

计数和计量(整数、小数、分数、百分数、约数)包括序数、编号4位和4位以上的数字采用三位分节法,不用"千分撇",节与接之间留半个数字的空隙(2,431改为2 431)。年份、部分代号、仪器型号等非计量数字不用分节,也不加千分撇。尾数"0"多,5位以上的数字,可以用"万""亿"表示,但不得以十、百、千、百、万、十亿等汉字表示,例如3 579 000可写成357.9万但不能写成3百57万千或357万9千。

(本刊编辑部)