维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253 - 3626(2005)06 - 0831 - 05

益生注射液抗大鼠离体心脏冷缺血损伤的实验研究

李 明[1],严律南[2]

(1、重庆医科大学附属第一医院普外科,重庆 400016;
2、四川大学华西医院普外科,成都 610041)

【摘 要】目的:探讨中药益生注射液对大鼠离体心脏冷缺血损伤的保护作用,为临床应用提供部分实验依据。方法:采用雌性封闭群 SD 大鼠 18 只,分两组,对照组的离体心脏用 4℃生理盐水保存,实验组的离体心脏则用含益生注射液的 4℃生理盐水保存,分别于冷藏 2、6、12、24、48 和 72h 取材作酶组织化学检查。结果:对照组,冷藏 24h,碱性磷酸酶(ALP)、辅酶 II 黄递酶(NADPHD)活性开始下降;冷藏 48h 后,乳酸脱氢酶(LDH)活性开始下降,ALP 和 NADPHD 活性明显下降;冷藏 72h 后,琥珀酸脱氢酶(SDH)和细胞色素氧化酶(CCO)活性开始下降,NADPHD 活性几乎完全丧失;实验组,冷藏 24h、48h 和 72h,NADPHD、LDH 和 CCO 活性分别开始下降,但不如对照组明显;冷藏 48h 后,ALP 活性才开始下降;冷藏 72h,SDH 活性无变化。结论:冷缺血可引起离体心肌损伤,其中血管内皮细胞对冷缺血损伤最敏感,益生注射液对离体心肌冷缺血损伤具有保护作用。

【关键词】益生注射液;冷缺血损伤;大鼠;酶组织化学
【中国图书分类法分类号】R657.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2005 - 06 - 28

Experimental Study on Yisheng Injection for Reducing Cold Ischemia Injury in Isolated Rat Heart

Li Ming, et al

(*Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】Objective: To investigate whether the traditional Chinese medicine Yisheng Injection can reduce the injury on isolated rat heart induced by cold ischemia. Methods: 18 isolated female closed colony SD rats were divided into two groups at random. In the control group, the isolated rat hearts were preserved in 0.9% sodium chlorine solution at 4℃, while in the experimental group, the hearts were preserved in 0.9% sodium chlorine solution containing Yisheng injection at 4℃. The specimens were harvested 2, 6, 12, 24, 48 and 72 hours after preservation. Histochemical changes were observed in two groups. Results: In the control group, the activities of alkaline phosphatase (ALP) and NADPH diaphorase (NADPHD) decreased after cold ischemia for 24 hours. Lactic dehydrogenase (LDH) decreased slightly, while ALP and NADPHD decreased evidently, after cold ischemia for 48 hours. Succinic dehydrogenase (SDH) and cytochrome oxidase (CCO) decreased slightly, and NADPHD disappeared after cold ischemia for 72 hours respectively. In the experimental group, NADPHD, LDH and CCO decreased slightly after cold ischemia for 24, 48 and 72 hours. ALP decreased slightly after cold ischemia for 48 hours, however, SDH showed no changes, after cold ischemia for 72 hours. Conclusion: Cold ischemia can induce cold ischemia injury in isolated rat hearts, especially the vascular endothelial cells being more sensitive. Yisheng injection can reduce this kind of injury to some degree.

【Key words】Yisheng injection; Cold ischemia injury; Closed colony SD rat; Enzyme histochemical staining

本实验选取大鼠离体心脏进行体外冷保存实验,并用益生注射液进行早期干预,了解该药对离体心脏的冷缺血损伤是否具有保护作用。旨在验证以前的研究结果,并为临床器官保存中应用该药提供部分实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雌性封闭群 Sprangue Dawley 大鼠(简称 SD 大鼠)18 只,2 ~ 3 月龄,体重 220 ± 20 克,均购自华西医科大学实验动物中心。

作者介绍:李 明(1973 -),男,主治医师,博士,主要研究方向:肝胆外科及器官移植。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.2 主要药品与试剂

益生注射液(规格 20mg/ml,批号 990705,成都市药物制剂研究所提供);琥珀酸脱氢酶、细胞色素氧化酶、乳酸脱氢酶、辅酶 II 黄递酶和碱性磷酸酶的酶组织化学检测试剂均由四川大学医学中心公共卫生学院毒理研究室提供。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组 将 SD 大鼠随机分为两组,实验组(益生组)和对照组(生理盐水组),对照组的离体心脏用 4℃生理盐水保存;实验组的离体心脏则用含益生注射液(浓度为0.5 mg/ml)的 4℃生理盐水保存。

1.3.2 标本制备 大鼠称重后,腹腔内注射 10% 水合氯醛 3ml/kg 进行麻醉,麻醉成功后,取仰卧位,固定肢体。取胸部正中切口,开胸后迅速取出心脏,立即置于 4℃生理盐水中洗尽血液,再将心脏分为两部分,分别置于实验组和对照组的冷保存液中。

1.3.3 冷保存实验 分别于冷藏后 2、6、12、24、48 和 72h 取材,每组每一时间点取三只标本,标本大小为 4mm × 4mm × 4mm,将每一时间点的两组标本合包在同一包埋框内,两组标本间用薄的组织(大鼠膈肌)隔开,实验组中同时用大鼠的小肠作标记。将装有组织块的包埋框移入液氮浴内,迅速骤冷,保存备用。

1.3.4 酶组织化学染色 将标本收集齐后,恒冷(-15℃)切片,片厚 8μm,作 5 种酶的组织化学观察,所做酶及方法见表 1,具体的操作方法见文献[1]。以 -(阴性)、±(可疑阳性)、+(弱阳性)、+ +(阳性)、+ + +(强阳性)表示酶活性强弱。

表 1 酶的命名和方法

命名	定位	方法
SDH(琥珀酸脱氢酶)	线粒体	标准脱氢酶法
CCO(细胞色素氧化酶)	线粒体	DAB 法
LDH(乳酸脱氢酶)	细胞胞浆	标准脱氢酶法
NADPHD(辅酶 II 黄递酶)	内质网	标准脱氢酶法
ALP(碱性磷酸酶)	细胞膜	偶氮偶联法

1.2.5 统计学方法 所得计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组数据进行组间方差分析。

2 结 果

LDH、SDH 和 NADPH,阳性反应为蓝色沉淀;CCO 阳性反应为褐色沉淀;ALP 阳性反应为红色沉淀。以 -(阴性)、±(可疑阳性)、+(弱阳性)、+ +(阳性)、+ + +(强阳性)表示酶活性强弱。结果见表 2 和表 3。

表 2 不同冷缺血时间大鼠心肌组织 SDH、CCO 和 LDH 酶活性变化

冷缺血时间(h)	SDH		CCO		LDH	
	对照组	益生组	对照组	益生组	对照组	益生组
2	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
6	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
12	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
24	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
48	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + ~ + + +	+ + ~ + + +
72	+ + ~ + + +	+ + +	+ +	+ + ~ + + +	+ +	+ + ~ + + +

注:+ 表示酶活性为弱阳性,+ + 表示酶活性为阳性,+ + + 表示酶活性为强阳性。

表 3 不同冷缺血时间大鼠心肌组织 NADPHD 和 ALP 酶活性变化

冷缺血时间(h)	NADPHD		ALP	
	对照组	益生组	对照组	益生组
2	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
6	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
12	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
24	+ +	+ + ~ + + +	+ +	+ + +
48	+	+ +	+	+ +
72	±	+	+	+ +

注:+ 表示酶活性为弱阳性,+ + 表示酶活性为阳性,+ + + 表示酶活性为强阳性。

SDH 分布于心肌细胞胞浆,在对照组,冷保存 2、6、12、24 和 48h 酶活性无变化,冷保存 72h,酶活性开始下降;而益生组,心脏冷保存 72h,SDH 活性无变化。CCO 分布于心肌细胞胞浆,在对照组,冷

维普资讯 http://www.cqvip.com

保存 2、6、12、24 和 48h 酶活性无变化,冷保存 72h,酶活性下降;而益生组、心脏冷保存 72h,CCO 活性开始下降,但下降不如对照组明显。LDH 分布于心肌细胞胞浆,在对照组,冷保存 2(图 1)、6、12 和 24h 酶活性无变化,冷保存 48h,酶活性开始下降;益生组,心脏冷保存 48h 后,LDH 活性开始下降,但下降不如对照组明显。冷保存 72h,对照组酶活性下降明显(图 2,图 3)。NADPHD 分布于心肌细胞胞浆,在对照组,冷保存 2、6 和 12h 酶活性无变化,冷保存 24h,酶活性开始下降,冷保存 48h 后,NADPHD 活性明显下降,冷保存 72h,这种酶活性几乎完全丧失;而益生组,心脏冷保存 24h 后,NADPHD 活性开始下降,但下降不如对照组和益生组明显,冷保存 72h,该酶活性虽明显下降,仍可检测到。ALP 分布于心脏毛细血管动脉端和小动脉内皮,在对照组,冷保存 2(图 4)、6 和 12h 酶活性无变化,冷保存 24h,酶活性开始下降,冷保存 48h(图 5),ALP 活性明显下降;益生组,冷保存 48h(图 6),ALP 活性才开始下降。

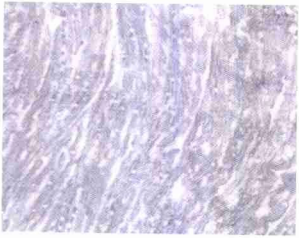


图 1 冷缺血 2h,对照组心肌酶组织化学染色(LDH ×100)

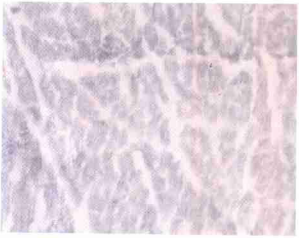


图 2 冷缺血 72h,对照组心肌酶组织化学染色(LDH ×100)



图 3 冷缺血 72h,益生注射液组心肌酶组织化学染色(LDH ×100)

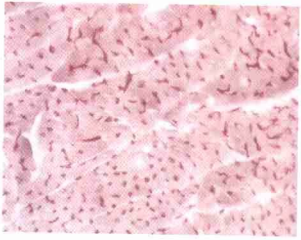


图 4 冷缺血 2h,对照组心肌酶组织化学染色(ALP ×100)

3 讨 论

器官移植后不可避免地存在缺血再灌注损伤(ischemia reperfusion injury, I/R),随着移植物慢性失功(chronic graft failure, CGF)机制研究的深入,尽可能减轻 I/R 损伤以延缓 CGF 的发生发展,从而延长移植物的存活时间逐渐成为引人瞩目的研究课题[2]。

现认为,氧自由基的生成和钙超载是引起 I/R 损伤的两个主要因素,它们都与供器官离体后的能量代谢障碍密切相关。虽然低温保存供器官可明显

维普资讯 http://www.cqvip.com



图 5 冷缺血 48h,对照组心肌酶组织化学染色(ALP ×100)

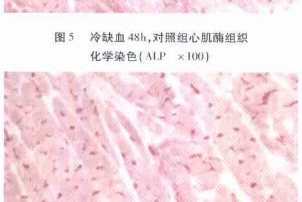


图 6 冷缺血 48h,益生注射液组心肌酶组织化学染色(ALP ×100)

降低离体器官的能耗,但即使在低温下细胞也不能完全停止代谢。因此,器官离体后应尽快移植至受体是公认的原则,另外应用自由基清除剂和钙离子拮抗剂来改善移植器官的功能也受到了人们的重视。目前常用的氧自由基清除剂有:超氧化物歧化酶(SOD),别嘌呤醇、触酶、谷胱甘肽、辅酶 Q_{10}、维生素 E 和有机锗化合物等。钙离子拮抗剂有 Diltiazem、维拉帕米和三氟拉嗪(Trifluoperazine)等[3]。

Atalla 报道,用狗做肝移植研究,给与 SOD(5000u/kg)、触酶(5000u/kg),或两者联合应用,显示肝功能指标和酶学指标明显改善,肝活检细胞损伤较轻。McAnulty 的实验室也证明,在灌注液内加入腺嘌呤和核糖可保存狗肾 5 天,肾组织内 ATP 含量升高,细胞水肿减轻。Paron 的研究也表明,保存肾时在保存液中加入氧自由基清除剂可明显减轻缺血所引起的肾功能损害。甘露醇可作为羟基清除剂,防止氧自由基对细胞的损害。在这方面 Grino 有报道,将 Euro – Collins 液中的葡萄糖改为甘露醇,可明显减低肾移植术后移植物早期无功能的发生。Wagher 等将钙离子拮抗剂 Diltiazem 加到 Euro – Collins 液中,并且于肾移植前及术后 48h 给受者应用此拮抗剂,可预防 Ca^{2+} 在细胞内及线粒体内的积累,减少了移植物早期无功能的发生。Shapiro 的实验证实,钙离子拮抗剂维拉帕米对大鼠的肾冷、热缺血损伤均有明显的保护作用。Nakomoto 报道,灌注液内加入 5μmol/L 的维拉帕米,肾经低温保存 24h,缺血再灌注 60min 后显著改善肾功能。Asari 等发现,用钙调蛋白抑制剂三氟拉嗪(Trifluoperazine)可明显改善肾保存 72h 后的效果[13]。

此外,如复方丹参、黄芪、附子和川芎嗪等,这些药多为活血化淤、改善微循环的药物。复方丹参为其典型代表,张显等[4]研究了在体和离体大鼠心脏缺血再灌注损伤模型中,心肌脂质过氧化物和钙离子的变化,并用复方丹参进行干预,结果表明复方丹参对在体和离体大鼠心脏缺血再灌注损伤均有明显的保护作用。李幼生等[5]证实丹参对低温保存的小肠具有保护作用。冯再留等[3]研究了大鼠胰组织热缺血 45min、再灌流 60min 时,其脂质过氧化物的变化、同时发现丹参、SOD 和辅酶 Q10 可减轻胰缺血再灌注损伤。其可能是通过改善血液循环,减少 I/R 心肌的钙聚积,保护线粒体功能以及抑制黄嘌呤氧化酶的生成,防止脂质过氧化等途径来实现的。

益生注射液是从我国活血化淤药物中提取出来的有效成分,杨华蓉等的研究结果显示,在体外实验中,其对静态缺氧/再给氧损伤下培养的人胎儿脐毛细血管内皮细胞具有保护作用[6];在大鼠腹主动脉移植硬化模型中,证实其可有效清除氧自由基,减少脂质过氧化引起的损伤[7]。在血瘀型大鼠模型中,其可降低全血粘度,减少血小板聚集,抑制血小板血栓素 A_2(TXA_2)释放[8]。为进一步研究益生注射液的抗 CGF 机理,本实验采用大鼠离体心脏为研究对象,4℃生理盐水作为保存液,中药复方丹参注射液作为阳性对照,观察冷缺血不同时间大鼠离体心肌酶活性的变化。由于在器官保存过程中,缺血期出现的损伤几乎不引起组织学的改变,然而在缺血再灌注期间引起的细胞损害却是严重的。因此,我们采用酶组织化学染色法,通过观察心肌酶活性的变化来了解心肌的受损情况。

维普资讯 http://www.cqvip.com

我们知道,缺氧时 SDH、CCO 等有氧代谢酶系活性将下降,酵解酶 LDH 活性将代偿性增高。本实验发现,冷缺血 72h 后,SDH、CCO 等有氧代谢酶系和 LDH 酵解酶活性均下降,不符合缺氧所致酶活性改变。其机理在于 LDH 是胞浆的可溶性酶,质膜损伤后,其扩散出细胞,导致酶活性下降,因此,LDH 活性下降说明细胞质膜受损[9]。在 5 种酶中,ALP 的变化出现最早,在冷缺血 24h 就能见到该酶活性明显下降,该酶存在于具有活跃转运功能的血管内皮细胞上,说明血管内皮细胞对缺血最敏感。从加入益生注射液后的冷保存结果来看,该药对离体心肌冷缺血损伤具有保护作用,特别是心脏的血管内皮细胞。

由此可见,冷缺血可引起离体心肌损伤,其中血管内皮细胞对冷缺血损伤最敏感,益生注射液对离体心肌冷缺血损伤具有保护作用。

参 考 文 献

[1] 王伯云,李玉松,黄高昇,等,编著. 病理学技术[M]. 北京:人民卫生出版社,2000;236 - 240.

[2] Azuma H, Nadeau K, Takada M, et al. Cellulur and molecular predictors of chronic renal dysfunction after initial ischemia/reperfusion injury a single kidney[J]. Transplantion,1997;64(2):190.

[3] 夏穗生,主编。临床移植医学[M]. 杭州:浙江科学技术出版社. 1999;95 - 103.

[4] 张 昱,王绵之,黄启福,等. 复方丹参片对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 河南中医药学刊,1997;12(6):15.

[5] 李幼生,黎介寿,李 宁,等. 丹参对低温保存小肠的保护作用. 中华实验外科杂志[J], 1997; 14: 178.

[6] 杨华蓉. 中药注射液 A、B 抗移植物慢性失功机理研究[J]。华西医科大学研究生学位论文。2000;5.

[7] 步 宏,陈卫国,刘于宾,等. 益生注射液抗大鼠腹主动脉移植硬化的实验研究[J]. 华西药学杂志,2000;15(3):185.

[8] 杨华蓉,陈嘉珏,蔡绍晖,等. YMA 注射液对大鼠血液流变学的影响[J]。华西医科大学学报,2000;31(2):230.

[9] 程微波,程 滔. γ - 射线照射所致肝组织损伤性质的观察[J]. 华西医科大学学报,2000;33(2):183.