维普资讯 http://www.cqvip.com



文章编号:0253－3626(2005)02－0220－04

# 参附注射液预干预对大鼠心肌缺血/再灌注损伤的保护作用

陈玉培[1]，牟崇明[1]，季道如[1]，但　伶[1]，龚文婷[1]，马　英[2]

(重庆医科大学第二临床学院:1.麻醉科;2.病理科,重庆　400010)

【摘　要】目的:研究参附注射液(SF)对大鼠心肌的保护效应与 $HSP_{70}$ 的关系。方法:采用整体缺血再灌注(I/R)模型,35 只大鼠随机分为假手术组(C 组)、I/R 组 2 组、SF 组 2 组,心肌缺血 40min 再灌注 30min 或 120min 检测血流动力学参数,心肌 MDA 含量、SOD 活性、HSP70 的表达及超微结构。结果:与 I/R 组比较:SF 组的 LVSP、± dp/d/max 均升高而 LVEDP 降纸($P<0.05$);I/R120min 后 SF 组 SOD 活性增加、MDA 含量减少($P<0.05$)、$HSP_{70}$ 的表达增强($P<0.05$);电镜显示 SF 组的心肌损伤程度均轻于 I/R 组。结论:参附对 I/R 心肌的保护效应与其抗氧自由基及抗脂质过氧化反应作用和促进 $HSP_{70}$ 的表达有关。

【关键词】参附注射液;心肌再灌注损伤;血流动力学;热休克蛋白

【中国图书分类法分类号】R282;R542.2　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2004－07－05

# Protective effect of shenfu preconditioning on myocardium against ischemia－reperfusion injury in rats

*CHEN Yupei, et al*

(*Department of Anesthesiology, the Second College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the relationship between the protective effect of shenfu parenteral solution (SF) on myocardium in rats and $HSP_{70}$. *Methods*: To establish general ischemia reperfusion(I/R) model. Thirty－five healthy white rats were divided into five groups randomly: sham operation group(group C), I/R30 group (including 2 groups), SF group(including 2 groups). After myocardial ischemia lasting for 40min, then reperfusing for 30min or 120min. To detect hemodynamic parameter, myocardium MDA content, SOD activity, $HSP_{70}$ expression and ultrastructure were examined. *Results*: Compare with I/R group: LVSP and ± dp/d/max rose up, however, LVEDP decreased($P<0.05$) in SF group. After mycocardial ischemia lasting for 120min, SOD activity in SF group increased, MDA content decreased($P<0.05$) and $HSP_{70}$ expression reinforced($P<0.05$). Electron microscope showed myocardium injury was lighter in SF group than in I/R group. *Conclusion*: The SF protective effect on myocardium was connected with its anti－oxygen－derived free radicals and anti－lipid peroxiaation response, as well as with acceleration of $HSP_{70}$ expression.

【Key words】Shenfu; Myocardial ischemia/reperfusion injury; Hemodynamics; Heat shock protein

心肌缺血/再灌注损伤(ischemia reperfusion injury, IRI)是心脏缺血性疾病和心脏手术体外循环致病的病理生理基础,心肌缺血再灌注损伤的药物性干预及其作用机制的研究是一个热点,而中药对心脏保护作用的研究也愈来愈受到重视。参附注射液源自于祖国医学"回阳救逆"参附汤的中药配方,通过分离灭菌水溶液制成,其主要成分是人参皂甙和乌头碱。经临床研究证实,参附对各种休克、心力衰竭、心肌缺血以及室上性和室性心律失常有改善治疗作用,但对其作用机理研究甚少。本研究通过研究参附对大鼠心肌缺血/再灌注损伤的影响,探讨其作用机制,旨在为临床用药提供理论依据。

## 1　材料和方法

### 1.1　药品与试剂

参附注射液,雅安三九药业有限公司出品,规格 10ml/安瓿,批号 030110;乌拉坦,化学醇,中国医药(集团)上海化学试剂公司,批号 020312;SOD、MDA、考马斯亮蓝蛋白试剂盒和抗鼠 $HSP_{70}$ 抗体均购于南京建成生物工程研究所。

### 1.2　动物及实验仪器

健康成年 Wistar 大鼠,重庆医科大学实验动物中心提

作者介绍:陈玉培(1965－　),男,副教授,
主要研究方向:临床麻醉与心肌保护。

基金项目:重庆市卫生局课题资助(No. 2004－B－77)。

维普资讯 http://www.cqvip.com



供,雌雄不拘,体重 200～300g;DH－150 动物呼吸机,浙江大学医学仪器厂:MPA 心功能分析系统,上海生产;751GD 紫外分光光度仪;透射电子显微镜。

1.3 缺血－再灌注模型制作

心肌缺血/再灌注损伤动物模型:大鼠在腹腔注射 20% 乌拉坦 5ml/kg 的麻醉后,仰卧位固定于鼠台上,以针状电极插入右前肢和左后肢皮下,连续监测标准Ⅱ导联心电图;颈部正中气管切开术(第 3、4 气管软骨环间)作气管插管,连接动物呼吸机进行人工通气(潮气量 8～10ml,呼吸频率 60～70 次/min);分离右颈总动脉插入硅胶管,导管另一端通过压力传感器连接于 MPA 心功能分析系统,然后缓慢插入导管至左心室,测定左心室收缩压(left ventricular systolic pressue,LVSP)、左心室舒张末压(left ventriculare end－diastolic pressure,LVEDP)、左室内压最大上升速率(+dp/dtmax)和左室内压最大下降速率(－dp/dtmax);分离颈外静脉并插入导管以备给药。沿胸骨左缘旁 0.5cm 切开皮肤,剪断第 3、4、5 根肋骨,进入胸腔,打开心包暴露心脏,在左心耳根部下缘 2mm 处进针,用 5/0 无损伤缝合针穿过左冠状动脉前降支(LAD)下方的心肌表层,从肺动脉圆锥左缘出针穿线,待心电图恢复稳定 10min 后记录正常参数,然后在 LAD 表面穿线处置一双折的 10 号丝线活结结扎 LAD,以造成左心室前壁缺血 40min。然后松开活结,恢复左冠状动脉血液灌注 30min 和 120min。LAD 结扎成功标准[1]:心电图显示 ST 段抬高、QRS 波变高变宽和缺血心肌变为青紫色。LAD 再通成功标准:解开结扎线后 QRS 波振幅逐渐回落、抬高的 ST 段回落和缺血区心肌变红。

1.4 实验分组

大鼠随机分为 5 组,每组 7 只,假手术组(C 组):只穿线不结扎,静脉注射生理盐水 8ml/kg,观察 120min;参附 30min 组(SF30 组):在结扎前 15min 静脉注射 SF8ml/kg,结扎冠脉 40min,再灌注 30min;参附 120min 组(SF120 组):再灌注 120min,余同 SF30 组;生理盐水 30min。对照组(I/R30 组):在结扎前 15min 静脉注射 NS 8ml/kg,结扎冠脉 40min,再灌注 30min;生理盐水 120min 对照组(I/R120 组):再灌注 120min,余同 I/R30 组。

1.5 观察指标及测定方法

1.5.1 心肌组织 MDA 含量及 SOD 活性测定 实验结束后立即摘取心脏,置于 4℃ 的生理盐水中,剪取左心室前壁缺血和再灌注部位的心肌组织,横切成两份,一份切成 3～5 块 1mm×1mm×1mm 大小,4% 戊二醛固定 2～4h 后,放入 PBS 缓冲液中送电镜室,标本经反复冲洗后,1% 锇酸固定 3h,酒精梯度脱水,环氧树脂渗透、包埋,超薄切片,醋酸铀和枸橼酸铅双染色后进行电镜观察超微结构变化;一份称重后,放入匀浆器中制成 10% 的匀浆,3000r/min 低温(4℃)离心 10～15min 后抽取上清液,采用黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 活性,硫代巴比妥酸比色法测定 MDA 含量,考马斯亮蓝法测定心肌匀浆上清液蛋白含量。

1.5.2 血流动力学测定 采用 MPA 分析系统测定冠状动脉缺血前、缺血后 40min、再灌注后 30min、再灌注后 120min 的心功能参数:LVSP、LVEDP、+dp/dtmax、－dp/dtmax。

1.5.3 $HSP_{70}$的测定 再灌注 30min 或 120min 后取心肌以上缺血处横切 2mm 厚心肌,4% 戊二醛固定 24h 后脱水、浸蜡、切片、烤片,将切片放入鼠抗 HSP70 抗体孵育 2h(湿温),经 PBS 洗约 10min 后切片浸入生物素结合兔抗鼠 IgG 孵育 20mm(37℃),再经 PBS 洗后,再显色,以颜色棕黄为阳性细胞,用图象分析系统计算灰度值。

1.6 统计学处理

实验数据均以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。统计学处理应用 SAS8.1 软件完成。

## 2 结 果

2.1 参附对心肌缺血再灌注大鼠血流动力学的影响

C 组、I/R 组和 SF 组在结扎冠状动脉前的 LVSP、LVEDP、±dp/dtmax 无显著差异($P>0.05$);与 C 组比较:I/R 组在缺血 40min、再灌注 30min 后和再灌注 120min 后各时点的 LVSP、±dp/dtmax 均明显降低,LVEDP 均明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),尤以再灌注 30min 后最甚,提示心肌缺血可导致心功能低下,再灌注可加重心功能进一步降低;与 I/R 组比较:SF 组在缺血 40min、再灌注 30min 后和再灌注 120min 后各时点的 LVSP、±dp/dtmax 明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),LVEDP 均明显降低($P<0.05$),提示参附可以改善 I/R 引起心功能低下时的血流动力学变化(见表 1)。

2.2 参附对缺血再灌注大鼠心肌 SOD 活性和 MDA 生成的影响

缺血再灌注各组与对照组比较心肌 SOD 活性下降,MDA 含量升高($P<0.05$);SF30 组与 I/R30 组比较,SOD 活性和 MDA 含量无差异($P>0.05$);SF120 组与 I/R120 组比较,SOD 活性显著升高($P<0.01$),MDA 含量显著下降($P<0.01$);SF120 组与 SF30 组比较,SOD 活性升高($P<0.05$),MDA 含量显著下降($P<0.01$)(见表 2)。

2.3 HSP70 的表达

C 组、I/R30 组、SF30 组与 I/R120 组 $HSP_{70}$无统计学差异($P>0.05$),SF120 组的 $HSP_{70}$与上述 4 组比较有显著增加($P<0.05$)(见表 3),且增多的 $HSP_{70}$多分布于血管周围。

维普资讯 http://www.cqvip.com



表 1 各组大鼠血流动力学的变化($\bar{x} \pm s$, $n=7$)

| 参数 | 组别 | 缺血前 | 缺血 40min | 再灌注 30min | 再灌注 120min |
|---|---|---|---|---|---|
| LVSP(mmHg) | C 组 | 98.0±16.2 | 99.5±14.5 | 98.5±13.7 | 98.4±14.3 |
| | I/R 组 | 100.2±17.0 | 74.0±13.2* | 64.4±11.5* | 83.2±12.9* |
| | SF 组 | 99.5±15.0 | 88.7±17.6▲ | 84.41±13.56▲ | 91.50±9.66▲ |
| LVEDP(mmHg) | C 组 | 39.2±4.7 | 40.0±7.2 | 37.0±6.2 | 41.0±5.7 |
| | I/R 组 | 40.0±4.0 | 89.5±7.0* | 95.5±7.2* | 65.5±6.6* |
| | SF 组 | 40.7±5.5 | 47.5±6.2▲ | 51.47±41.75▲ | 45.55±4.55▲ |
| +dp/dtmax(mmHg/s) | C 组 | 15750±2700 | 15600±3112 | 15407±2968 | 15574±2951 |
| | I/R 组 | 15937±2962 | 10850±2925** | 9968±2425** | 11621±2275** |
| | SF 组 | 15675±3037 | 13950±3000▲▲ | 14744±317▲▲ | 16813±412▲▲ |
| −dp/dtmax(mmHg/s) | C 组 | 13839±2435 | 13162±2512 | 13753±2211 | 13112±2612 |
| | I/R 组 | 14137±2625 | 10362±2462** | 9362±2142** | 10002±2265** |
| | SF 组 | 13837±2550 | 12635±2434▲▲ | 11911±2206▲▲ | 14108±2164▲▲ |

与 C 组比较：* $P<0.05$ ** $P<0.01$；SF 组与 I/R 组比较：▲ $P<0.05$ ▲▲ $P<0.01$

表 2 各组大鼠心肌 MDA、SOD 的变化($\bar{x} \pm s$, $n=7$)

| 组别 | MDA(nmol/mgprot) | SOD(NU/mgprot) |
|---|---|---|
| C 组 | 0.74±0.07**# | 315.46±22.92**# |
| I/R30 组 | 1.64±0.49##▲▲ | 211.73±31.90#▲▲ |
| SF30 组 | 1.61±0.35##▲▲ | 219.30±35.06#▲▲ |
| I/R120 组 | 1.44±0.19##▲▲ | 202.93±28.52#▲ |
| SF120 组 | 1.09±0.09*▲ | 264.05±50.15*▲ |

与 SF30min 比较：* $P<0.05$ ** $P<0.01$ 与 SF120min 比较，# $P<0.05$ ## $P<0.01$ 与对照组比较：▲ $P<0.05$ ▲▲ $<0.01$

表 3 各组 $HSP_{70}$ 的免疫组化的灰度值* 比较

| 组别 | HSP70 |
|---|---|
| C 组 | 187.40±41.30 |
| I/R30 组 | 182.50±13.07▲ |
| SF30 组 | 176.45±12.01▲ |
| I/R120 组 | 172.24±16.28▲ |
| SF120 组 | 131.62±11.85▲▲ |

*灰度值为反应免疫组化结果的深浅程度，大级别分为 0～255 共 256 个等级，无单位，数值越小表示颜色越深，阳性程度越高；与 C 组比较▲ $P>0.05$，▲▲ $<0.01$。

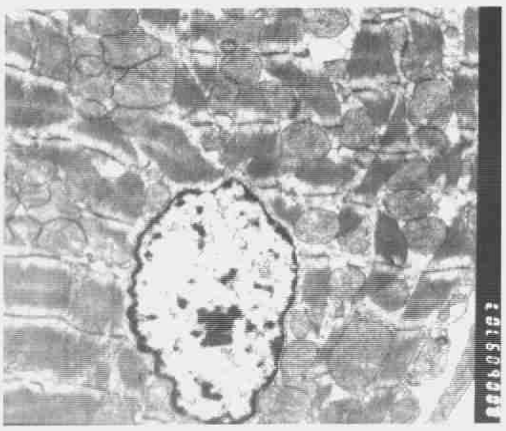


图 1 正常组，心肌细胞超微结构基本正常

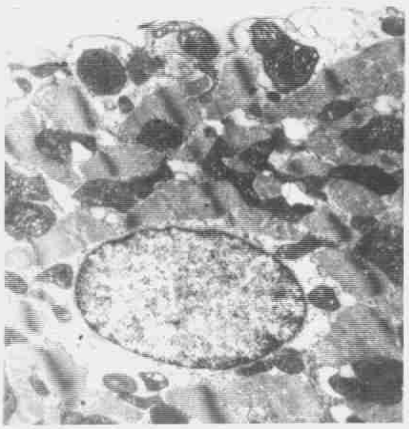


图 2 I/R30 组，心肌细胞肌丝不同程度溶解，以灶性溶解为主，偶见大片溶解，线粒体明显肿胀

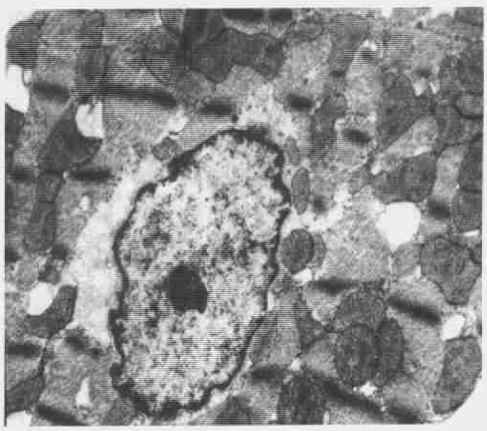


图 3 SF30 组，心肌细胞肌丝灶性溶解，肌浆网扩张，线粒体轻度肿胀

2.4 参附对缺血再灌注大鼠心肌超微结构的影响

C 组心肌超微结构基本正常，SF30 组和 SP120 组线粒体轻度肿胀，肌丝灶性溶解，肌浆网扩张，间质毛细血管内皮细胞异染色质边集；I/R30 组和 I/R120 组肌丝呈灶性或片状溶解，以片状为主，线粒体内室和外室明显肿胀，Z 线明显增粗(见图 1、2、

维普资讯 http://www.cqvip.com



3、4、5）。

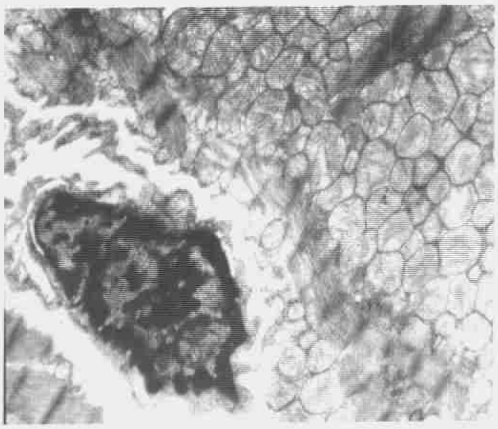


图 4 I/R120 组，肌丝不同程度溶解，以肌肌膜下为重，线粒体肿胀以外室为主，Z 线增粗呈团块状

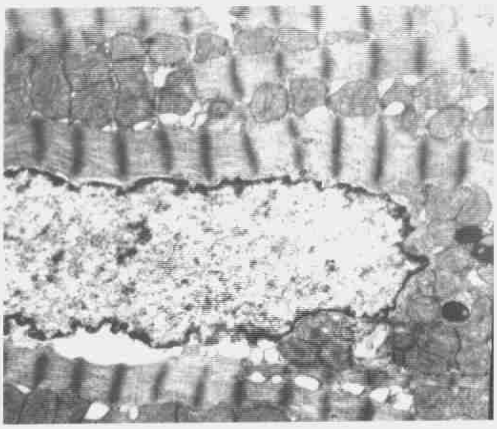


图 5 SF120 组，肌丝灶性溶解，肌浆网轻度扩张，Z 线轻度增粗，线粒体基本正常

## 3 讨 论

心肌缺血再灌注损伤是心脏缺血性疾病和心脏外科手术围术期常见的一种病理生理现象，其损伤机制与氧自由基大量（OFR）释放、脂质过氧化以及细胞内钙超载等有关。因此探索药物性预干预对 IRI 的保护效应及其机制具有非常重要的意义。本研究以参附注射液为研究对象，观察其对 IRI 的保护效应及作用机制。参附的主要成分是人参皂甙和乌头碱，研究报道，参附注射液对心、肾、脑缺血/再灌注损伤，难治性内毒素休克肺损伤具有保护作用[2~5]。

+dp/dtmax 在一定程度上反映室壁张力的变化速度，它受心脏的前后负荷影响较大，受心肌收缩力影响强，是评价心肌收缩性能的重要指标；-dp/dtmaxm 指等容舒张期左室压力下降最大速度，其主要受心肌收缩和舒张的影响；LVEDP 代表左心室前负荷，其大小取决于心室收缩前的回心血量及心脏排血功能。通常，当心肌收缩性能受到抑制时，±dp/dtmax 降低，LVEDP 升高。本文研究发现，大鼠心肌 I/R 后，LVSP、±dp/dtmax 均明显降低，LVEDP 均明显升高，提示 I/R 可引起心功能低下，而采用参附注射液干预后，LVSP、±dp/dtmax 比单纯 I/R 组均明显升高，LVEDP 明显降低，说明参附可以改善 I/R 引起心功能低下时的血流动力学变化，对心肌的 I/R 损伤具有明显的保护效应。

丙二醛（MDA）是 OFR 与细胞膜中多价不饱和脂肪酸发生过氧化反应的产物，其含量高低可间接反映 OFR 的浓度，因而通过测定心肌组织 MDA 含量可间接反映 OFR 活性。SOD 是组织的一种抗氧化酶，能使 OFR 发生歧化生成 $H_2O_2$，使脂质过氧化物生成减少，而免除对组织细胞的破坏和损伤。本文研究显示，参附注射液干预组中 SOD 活性比 I/R120 组显著升高，MDA 含量显著下降，并且电镜显示 I/R 心肌细胞线粒体的肿胀、肌丝溶解、肌浆网的扩张以及毛细血管内皮细胞的损伤程度均比理盐水组轻，提示参附具有抗氧自由基和抗脂质过氧化作用，能一定程度地减轻心肌的缺血再灌注损伤。

HSP 是生物界广泛存在的具有高度同源性的一组应激蛋白，根据分子量的大小主要分为 $HSP_{90}$、$HSP_{70}$、$HSP_{60}$以及小分子 HSP4 个家族，$HSP_{70}$是其中最丰富的一种，具有“分子伴侣”（molecular chaperones）的作用。在应激状态下，可结合于新生多肽或蛋白质，使之处于正常构象，使受破坏的蛋白质解聚，重新折叠成生物活性蛋白。大量实验证明 $HSP_{70}$对心肌缺血再灌注损伤具有良好的保护效应[6~8]。本实验采用 $HSP_{70}$的单克隆抗体行免疫组化检查，假手术组、I/R30 组、I/R120 组和 SF30 组的表达呈弱阳性，而 SF120 组 $HSP_{70}$表达明显增强，提示参附可促进 I/R 心肌细胞 $HSP_{70}$的表达上调，并且在再灌注 2h 后更明显，因此，促进 $HSP_{70}$表达也可能是参附对心肌 I/R 损伤具有保护作用的机制之一。本实验同时观察到 SF120 组表达的 $HSP_{70}$多集中在血管周围，Hall[7]等观察到地塞米松可促进 $HSP_{70}$的表达，Udelsman[9]观察到循环系统（动脉和静脉）$HSP_{70}$部分为垂体促肾上腺皮质激家所调节。因此，可以推测参附促进 $HSP_{70}$表达增多可能是通过垂体途径实现。

（下转第 288 页）

维普资讯 http://www.cqvip.com



因此,在使用 Apofix 进行固定时,应对其适应征进行仔细的选择。对于各种原因引起的寰枢椎不稳及牵引后能完全复位的寰枢椎脱位病例均可选择 Apofix 进行固定。本组 17 例寰枢椎不稳及脱位患者,除 2 例指征选择不当造成 1 例死亡,1 例寰椎再脱位外,其余病例随访 3～24 个月,均获得了较满意的结果。

## 参 考 文 献

[1] McGraw RW, Rusch RM. Atlanto－axial arthodesis[J]. J Bone Joint Surg(Br), 1973;55:482－489.

[2] Statham P, O' Sullivan M, Russell T. The Halifax interlaminar clamp for posterior cervical fusion: Initial experience in the United Kingdom[J]. Neurosurg, 1993;32:396－399.

[3] 倪 斌,贾连顺,谭 军,等. 椎板夹加压内固定在寰枢椎融合术中的应用[J]. 骨与关节损伤杂志,2000;15(1):3－5.

[4] 金大地,江建明,瞿东滨,等. 介绍一种新的颈椎后路内固定装置——APOFIX 系统[J]. 中国脊柱脊髓杂志,1999;9(5):280－281.

[5] Holness RO, Huestis WS, Howes WJ, et al. Posterior stabilation with an interlaminar clamp in cervical injuries; Technical note and review of the long term experience with the method [J]. Neurosurgery, 1984;14(3):318－323.

[6] Hadley MN, Spetzler RF, Sonntag VKH. The transoral approach to the superior cervical spine[J]. JNeurosurg, 1989;71:16－23.

[7] Subin B, Liu JF, Marshall GJ, et al. Transoral anterior decompression spinal cord compression[J]. Spine, 1995;20:1233－1240.

[8] 王 超,闫 明,周海涛,等. 前路松解复位后路内固定治疗难复性寰枢关节脱位[J]. 中国脊柱脊髓杂志,2003;13(10):583－586.

(上接第 223 页)

综上所述,参附注射液对大鼠的心肌缺血再灌注损伤具有明显的保护效应,其机制可能与其抗氧自由基及抗脂质过氧化反应作用和促进 $HSP_{70}$ 的表达有关。至于是否还有其它的作用机制,尚有待进一步研究。

## 参 考 文 献

[1] 覃 数,陈运珍,王志平. 大白鼠实验性心肌缺血再灌注模型制备与心电图改变的特点[J]. 重庆医科大学学报,1998;23(1):8－11.

[2] 戴晓明,武晓群,刘学风,等. 参附、柴胡注射液对肾缺血再灌注损伤的影响[J]. 江苏中医,1998;19(2):46－47.

[3] 徐德生,刘 力,吴志荣,等. 参附注射对休克犬血压、心脏血流动力学的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,1998;4(5):41－43.

[4] 朱正华,熊利泽,董海龙,等. 参附注射液对大鼠短暂性局灶性脑缺血损伤的保护作用[J]. 中国中西医结合急救杂志,2001;8(2):79－81.

[5] 罗 魏,万兰青,马超英,等. 参附注射液对兔内毒素休克肺损伤的保护作用[J]. 中国危重病急救医学,1995;7(2):68－70.

[6] Gray c c, Amrani M, Yacoub M H, et al. Heast stress proteins and myocardial pritection: experiental motel or potential clinical tool[J]. Int J Bioche Cell, 1999;31(5):559.

[7] Hall TJ. Role of $hsp_{70}$ in cytokine production[J]. Experien－tia, 1994;50(11－12):1048.

[8] 王悦喜,陈运珍,刘元生. 热休克、心肌缺血预处理时 I/R 心肌的第二窗保护作用[J]. 重庆医科大学学报,2001;26(1):32－33.

[9] Udelsman R, Blake M T, Stagg C A, et al. Vascular heat shock protein expression in respone to stress endocrine and autonomic regulation of this ade－dependent response[J]. J Clin Invest, 1993;91(2):465.

(上接第 238 页)

基础[J]. 中国实用外科杂志,2003;23(12):745－746.

[4] Negus DF, Letcher EWL, Cockett FB, et al. Compression and band formation at the mouth of the left common iliac vein [J]. Br J Surg, 1968, 55(5):369－374.

[5] 李德卫,赵 渝,时 德,等. 左髂总静脉受压处和静脉内粘连结构的组织学研究[J]. 中华实验外科杂志,2004,21(1):39－40.

[6] Ferrari E, Baudouy M, Cerboni P. Clinical epidemiology of venous thrombolitic disease. Result of a French multicentre registry[J]. Eur Heart J, 1997;18:685－691.

[7] Jaszczak P, Mathiesen FR. The iliac compression syndrome[J]. Acta Chir Scand, 1978;144:133－136.