

# 参附注射液预处理对心肌缺血再灌注损伤模型大鼠的保护作用研究

谭冰<sup>1\*</sup>,熊毅<sup>2#</sup>(1.重庆市中山医院药剂科,重庆 400010;2.重庆市沙坪坝区人民医院药剂科,重庆 400030)

中图分类号 R285;R514 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)27-2513-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.27.06

**摘要** 目的:研究参附注射液(SFI)对心肌缺血再灌注损伤模型大鼠的保护作用。方法:开胸结扎冠脉左前降支30 min后再灌注120 min以复制大鼠心肌缺血再灌注损伤模型。实验分为正常(等容生理盐水)、假手术(等容生理盐水)、模型(等容生理盐水)和SFI(10 mg/kg)组。测定大鼠心肌组织匀浆中超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX),血清中磷酸肌酸激酶(CK)、乳酸脱氢酶(LDH)的活性以及丙二醛(MDA)含量,流式细胞仪检测血浆中B细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)的表达。结果:与假手术组比较,模型组大鼠SOD、GSH-PX的活性显著减弱,CK、LDH活性显著增强,MDA含量显著增加,Bcl-2表达显著减弱,Bax表达显著增强( $P<0.01$ 或 $P<0.05$ );与模型组比较,SFI组大鼠SOD、GSH-PX的活性显著增强,CK、LDH活性显著减弱,MDA含量显著减少,Bcl-2表达显著增强,Bax表达显著减弱( $P<0.01$ 或 $P<0.05$ )。结论:SFI预处理对于心肌缺血再灌注损伤具有保护作用,其具体作用机制可能与抗氧自由基、保护心肌组织以及抑制心肌细胞凋亡有关。

**关键词** 参附注射液;心肌缺血再灌注损伤;氧自由基;凋亡

## Protective Effects of Shenfu Injection Pretreatment on Myocardial Ischemia-reperfusion Injury Model Rats

TAN Bing<sup>1</sup>, XIONG Yi<sup>2</sup> (1.Dept. of Pharmacy, Chongqing Zhongshan Hospital, Chongqing 400010, China; 2. Dept. of Pharmacy, Chongqing Shapingba District People's Hospital, Chongqing 400030, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To investigate the protective effects of Shenfu injection (SFI) on myocardial ischemia-reperfusion injury (MI/RI) model rats. METHODS: MI/RI model was established by opening the chest and ligating the anterior descending branches of the left coronary arteries (LAD) for 30 min, followed by 120 min reperfusion. Model rats were divided into normal control group (constant volume of normal saline), sham operation control group (constant volume of normal saline), model group (constant volume of normal saline) and SFI group(10 mg/kg). The activities of SOD and GSH-PX in the myocardial tissue and the activities of CK and LDH in the serum were all determined. Flow cytometry was employed to assay the expression of apoptosis related genes Bcl-2 and Bax in the blood plasma. RESULTS: Compared with sham operation group, the activities of SOD and GSH-PX were decreased significantly in model group, while the activities of CK and LDH were enhanced significantly; the content of MDA and the expression of Bax were increased significantly while the expression of Bcl-2 was decreased significantly ( $P<0.01$  or  $P<0.05$ ). Compared with model group, the activities of SOD and GSH-PX and the expression of Bcl-2 were increased significantly in SFI group while the activities of CK and LDH, the content of MDA and the expression of Bax were decreased significantly ( $P<0.01$  or  $P<0.05$ ). CONCLUSIONS: SFI pretreatment have a protective effect on MI/RI, which might be associated with anti-oxygen free radical, protecting muscular tissues and suppressing myocardial cells apoptosis.

**KEY WORDS** Shenfu injection; Myocardial ischemia-reperfusion injury; Oxygen free radical; Apoptosis

心肌持续缺血可导致细胞死亡和组织损伤,早期再灌注可以缓解心肌缺血损伤。但通过大量的动物实验和临床观察发现,长时间再灌注改善心肌供血的同时却又加重了单纯心肌缺血所造成的损伤,如心律失常、梗死面积扩大、持久性心室收缩功能低下等,在病理上可出现如心肌细胞肿胀、破坏性心肌纤维断裂、细胞器膜完整性破坏、微血管损伤等改变。

参附注射液(SFI)是红参、黑附片提取物的复方制剂,能增强心肌收缩力、增加心输出量(CO)、舒张冠状动脉及增加脑血流量。因此,临床上将SFI作为治疗心衰、休克、心肌梗死及肿瘤放疗、化疗的辅助用药,均取得了良好的疗效。系列研究

发现,SFI对于缺血再灌注损伤时出现的心律失常、心源性休克、心肌梗死等具有一定的保护作用<sup>[1-3]</sup>。同时,Wang YL等<sup>[4]</sup>研究发现,在缺氧和再氧合的情况下,SFI可通过阻止B细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)的下调和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(Caspase)-3的活化而抑制心肌细胞的凋亡。细胞凋亡受多种基因调控,包括P53、Fas、Bcl-2、Bcl-2相关X蛋白(Bax)等。在这些调控基因中,Bcl-2研究得较深入。Bcl-2是一种抑制凋亡基因,主要位于线粒体膜上,其主要生物学效应是抑制线粒体凋亡诱导因子(Apoptosis inducing factor, AIF)和细胞色素C的释放。而Bax是一种凋亡促进基因,定位于染色体19q13.3~19q13.4。Bax基因是Bcl-2癌基因家族中一类本身并不直接诱导细胞死亡,但能明显加速死亡信号、引起细胞凋亡的基因;它的高表达也拮抗Bcl-2的凋亡抑制活性,二者通过形成同源或异源二聚体的比例来调节细胞凋亡<sup>[5-10]</sup>。

\* 主管药师。研究方向:药事管理。电话:023-63532046。E-mail:645429902@qq.com

# 通信作者:主管药师。研究方向:药事管理。电话:023-65365161。E-mail:810176014@qq.com

本研究在整体动物水平上采用SFI作用于心肌缺血大鼠,观察其对相关氧自由基、心肌酶及凋亡相关因子Bcl-2和Bax表达水平的影响,从而阐明其对再灌注损伤的相关作用机制,为SFI临床应用提供一定的实验依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

UV754N型紫外-可见分光光度计(上海精科实业有限公司);FC 500 MCL/MPL型流式细胞仪(美国Beckman公司)。

### 1.2 药品与试剂

SFI(雅安三九药业有限公司,批号:20110827);超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)、丙二醛(MDA)、磷酸肌酸激酶(CK)、乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;Bcl-2、Bax流式检测试剂盒,兔抗大鼠Bcl-2、Bax单克隆抗体(一抗)和FITC标记的山羊抗兔IgG(二抗)均购自杭州联科生物科技有限公司。

### 1.3 动物

SD大鼠24只,♂,体质量280~350g,由第三军医大学实验动物中心提供[动物使用许可证号:SCXK(渝)2009-09053]。

## 2 方法

### 2.1 复制模型与分组、给药

ip 200 g/L乌拉坦溶液(5 ml/kg)麻醉大鼠后从其颈部正中切开皮肤,钝性分离肌肉;气管插管接人工呼吸机(呼吸频率:50次/min;潮气量:20 ml/kg;呼吸比1:1)。开胸结扎冠脉左前降支,剪断第3、4肋骨,用拉钩拉开胸壁。小心剪开心包膜,在左心耳下缘3~4 mm进针。稳定10 min后再收紧结扎线,连同小段聚乙烯管结扎。观察心电图,以出现QRS高大增宽为结扎成功标志,记录缺血时间。30 min后拉松结线,打开血管行再灌注,观察心电图,数分钟后出现QRS回落变窄,持续120 min。假手术组仅气管插管接人工呼吸机,钝性分离肌肉并剪断第3、4肋骨。实验分为4组,即正常(等容生理盐水)、假手术(等容生理盐水)、模型(等容生理盐水)与SFI(10 mg/kg)组。术前ig给药,每天1次,连续7 d。

### 2.2 动物标本收集及处理

末次给药后直接抽取大鼠右心房血2~3 ml,4℃下以3 000 r/min离心10 min分离出血清或血浆,置于-80℃冰箱内贮藏,备用;同时,迅速切取病变心肌(包括边缘部分正常心肌),生理盐水洗净后放入液氮中贮藏,备用。

### 2.3 外周血标本处理

抽取EDTA抗凝静脉血2 ml,采用细胞分离柱方法进行实验:在无菌情况下采用淋巴细胞分离液方法分离淋巴细胞,分别取 $1 \times 10^6$  ml<sup>-1</sup>细胞标记的兔抗大鼠Bcl-2、Bax单克隆抗体(一抗)和FITC标记的山羊抗兔IgG(二抗)上流式细胞仪进行检测。

### 2.4 指标检测

2.4.1 血清氧自由基与心肌酶的测定 处死大鼠,迅速分离出病变心肌组织,使用玻璃匀浆器在冰浴中制成10%的组织匀浆,3 000 r/min离心10 min,取上清液按试剂盒说明处理,使用紫外-可见分光光度计测定SOD、GSH-PX、CK、LDH的活性与MDA的含量。

2.4.2 流式细胞仪检测大鼠血浆中Bcl-2、Bax的表达水平 荧光抗体标记的淋巴细胞悬液4℃下避光孵育30 min,PBS洗涤3次,每次5 min,然后上流式细胞仪进行检测。应

用间接荧光法检测,记录阳性细胞百分率。

## 2.5 统计学方法

采用SPSS 11.0统计软件进行数据分析,所有计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析(ANOVA)。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 SFI对模型大鼠心肌组织匀浆中氧自由基的影响

与假手术组比较,模型组大鼠心肌组织匀浆中SOD、GSH-PX活性显著降低,MDA含量显著增加( $P < 0.01$ );与模型组比较,SFI组大鼠心肌组织匀浆中SOD、GSH-PX活性显著升高,MDA含量显著减少( $P < 0.01$ )。SFI对模型大鼠心肌组织匀浆中氧自由基的影响见表1。

表1 SFI对模型大鼠心肌SOD、GSH-PX活性及MDA含量的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Tab 1 Effects of the activities of SOD and GSH-PX and the content of MDA in model rats treated with SFI( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	SOD, nU/mg	GSH-PX, nU/mg	MDA, nmol/mg
正常组	6	190.08 ± 32.74	53.85 ± 8.97	1.23 ± 0.21
假手术组	6	183.46 ± 30.61	51.55 ± 7.26	1.30 ± 0.22
模型组	6	85.33 ± 23.52*	30.22 ± 5.14*	5.06 ± 0.34*
SFI组	6	114.29 ± 25.80*	41.08 ± 6.11*	3.18 ± 0.29*

与假手术组比较: \* $P < 0.01$ ;与模型组比较: \* $P < 0.01$

vs.sham operation group: \* $P < 0.01$ ; vs.model group: \* $P < 0.01$

### 3.2 SFI对模型大鼠心肌组织匀浆中心肌酶活性的影响

与假手术组比较,模型组大鼠心肌组织匀浆中CK、LDH活性显著升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,SFI组大鼠心肌组织匀浆中CK、LDH活性显著降低( $P < 0.01$ )。SFI对模型大鼠心肌组织匀浆中心肌酶活性的影响见表2。

表2 SFI对模型大鼠心肌CK和LDH活性的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Tab 2 The activities of CK and LDH in model rats treated with SFI( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	CK, nU/mg	LDH, nU/mg
正常组	6	33.11 ± 5.28	1 733.20 ± 336.08
假手术组	6	35.52 ± 5.41	1 794.12 ± 318.43
模型组	6	158.76 ± 28.57*	3 862.47 ± 416.06*
SFI组	6	110.34 ± 21.09*	2 559.53 ± 367.91*

与假手术组比较: \* $P < 0.01$ ;与模型组比较: \* $P < 0.01$

vs.sham operation group: \* $P < 0.01$ ; vs.model group: \* $P < 0.01$

### 3.3 SFI对模型大鼠外周血Bcl-2、Bax表达的影响

与假手术组比较,模型组大鼠外周血中Bcl-2表达显著减弱,Bax表达显著增强( $P < 0.05$ );与模型组比较,SFI组大鼠外周血中Bcl-2表达显著增强,Bax表达显著减弱( $P < 0.05$ )。SFI对模型大鼠外周血Bcl-2、Bax表达的影响见表3。

表3 SFI对模型大鼠外周血Bcl-2、Bax表达的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Tab 3 Effects of SFI on the expression of peripheral blood Bcl-2 and Bax in model rats treated with SFI( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	Bcl-2	Bax
正常组	6	46.33 ± 8.26	43.68 ± 8.01
假手术组	6	48.05 ± 8.67	45.77 ± 7.93
模型组	6	43.30 ± 7.88*	52.12 ± 8.11*
SFI组	6	48.82 ± 7.36*	47.09 ± 7.41*

与假手术组比较: \* $P < 0.05$ ;与模型组比较: \* $P < 0.05$

vs.sham operation group: \* $P < 0.05$ ; vs.model group: \* $P < 0.05$

## 4 讨论

心肌缺血能够引起急性炎症反应,而再灌注可加剧炎症反应。越来越多的证据表明,包括肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )、白细胞介素(IL)-6等在内的致炎症细胞因子参与了缺血再灌注过程<sup>[7-9]</sup>。

SFI以人参皂苷、乌头碱为主要成分,可以直接清除自由基和过氧化物,提高组织细胞的耐低氧和抗应激能力,减轻脑缺血时的组织细胞损伤和再灌注损伤,并能降低血液黏度、减少血小板聚集,从而减轻脑缺血的发展。其强心、升压、稳压作用可保证脑部灌注,同时能改善脑细胞对葡萄糖和氧的摄取,促进三磷酸腺苷的合成,改善病变组织的细胞能量状态。在本研究中,笔者发现缺血30 min再灌注120 min后相关氧自由基的表达水平出现了改变,而SFI预处理则可有效地清除有害物质MDA在心肌组织中的蓄积,提高抗氧化酶SOD和GSH-PX的活性,从而对抗缺血再灌注所诱发的氧化应激损伤。同时笔者还注意到,SFI预处理可有效降低心肌损伤时释放到胞外的CK和LDH,这从一个侧面也说明了SFI对于缺血再灌注心肌的保护效应,这一结果与Zheng CD等<sup>[1]</sup>研究结果基本一致。

心脏缺血再灌注损伤是一个炎症反应过程,在这一过程中,诸多炎性细胞因子如TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、血管内皮生长因子(VEGF)等参与了炎症性损伤,并且可能引起心肌细胞的凋亡。大鼠心肌缺血再灌注过程中,心肌细胞的死亡形式不仅包括坏死,还存在着凋亡,而且凋亡占有相当大比例。Chakrabarti S等<sup>[9]</sup>在大鼠离体心脏灌注模型上发现心肌缺血10 min即出现心肌细胞凋亡,缺血30 min达高峰,证实了缺血可引起心肌细胞凋亡。Fliss H等<sup>[10]</sup>采用原位末端标记技术发现,缺血再灌注大鼠心肌细胞中有典型的凋亡形态改变及特征性DNA片段,而单纯持续心肌缺血未能引起细胞凋亡,明显的细胞凋亡形态改变出现在缺血再灌注后,表明再灌注加重细胞凋亡;同时还发现细胞凋亡与缺血及再灌注持续时间有关。事实上,本研究同样也发现,模型组中Bcl-2明显降低,而Bax的表达水平明显升高,即缺血再灌注促进了心肌细胞的凋亡。而SFI预处理后可明显升高Bcl-2的水平,显著降低Bax的表达,表现出凋亡抑制效应,从而保护心肌细胞免受损伤。

本研究初步揭示了SFI对缺血再灌注后心肌的保护效应及相关作用机制。缺血再灌注的机制较复杂,至今仍未完全明确。SFI可能还作用于心脏其他的环节和信号通路,这有待

在后续实验中进一步阐明。

## 参考文献

- [1] Zheng CD, Min S. Cardioprotection of Shenfu injection against myocardial ischemia/reperfusion injury in open heart surgery[J]. *Chin J Integr Med*, 2008, 14(1): 10.
- [2] Ke DZ, Chen QW, Li CL, et al. Cytokines mechanism of shenfu injection in treatment of cardiogenic shock in canine[J]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 2007, 32(21): 2 273.
- [3] Wang SD, Yuan L, Jiang Y, et al. Myocardial protective effect of Shenfu injection in patients undergoing valve replacement[J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2007, 87(33): 2 316.
- [4] Wang YL, Wang CY, Zhang BJ, et al. Shenfu injection suppresses apoptosis by regulation of Bcl-2 and caspase-3 during hypoxia/reoxygenation in neonatal rat cardiomyocytes in vitro[J]. *Mol Biol Rep*, 2009, 36(2): 365.
- [5] Honda HM, Korge P, Weiss JN. Mitochondria and ischemia/reperfusion injury[J]. *Ann NY Acad Sci*, 2005(1 047): 248.
- [6] Zhao ZQ, Vinten-Johansen J. Myocardial apoptosis and ischemic preconditioning[J]. *Cardiovas Res*, 2002, 55(3): 438.
- [7] Gu Q, Yang XP, Bonde P, et al. Inhibition of TNF-alpha reduces myocardial injury and proinflammatory pathways following ischemia-reperfusion in the dog[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2006, 48(6): 320.
- [8] Bhattacharya K, Farwell K, Huang M, et al. Mast cell deficient W/Wv mice have lower serum IL-6 and less cardiac tissue necrosis than their normal littermates following myocardial ischemia-reperfusion[J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2007, 20(1): 69.
- [9] Chakrabarti S, Hoque AN, Karmazyn M. A rapid ischemia induced apoptosis in isolated rat hearts and its attenuation by the sodium hydrogen exchange inhibitor HoE 642 (cariporide)[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1997, 29(11): 3 169.
- [10] Fliss H, Gattinger D. Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium[J]. *Circ Res*, 1996, 79(5): 949.

(收稿日期:2013-03-21 修回日期:2013-05-21)

## 国家卫生和计划生育委员会副主任陈啸宏会见墨西哥农业、畜牧业、乡村发展、渔业及食品部副部长一行

本刊讯 2013年6月13日,国家卫生和计划生育委员会副主任陈啸宏会见了来访的墨西哥农业、畜牧业、乡村发展、渔业及食品部副部长卡斯蒂约一行,双方就食品安全标准等问题进行了交流。

陈啸宏表示,最近中墨两国政府宣布将两国关系提升为全面战略合作伙伴关系,这将推动两国包括在食品安全风险评估和食品安全标准制定方面的交流与合作。目前,卫

生计生委正会同相关部门依法、依程序对部分墨西哥产龙舌兰酒的进口准入进行食品安全风险评估,并将依据评估结果,积极协调并配合相关部门,按照中墨两国联合声明的原则妥善处理龙舌兰酒输华事宜。卡斯蒂约表示墨西哥政府希望推进与中国在贸易、科技、食品安全等领域的合作,并感谢中国政府对龙舌兰酒相关事宜的重视及积极协作。