

心达康片对心肌缺血再灌注损伤模型大鼠的保护作用研究

曾碧映^{1,2*}, 曾 嵘², 李新才¹, 邓凤君¹, 李学军¹, 梁 娟³, 孙淑纯¹, 周 利⁴, 廖端芳^{2#}(1.湖南益阳医学高等专科学校, 湖南 益阳 413000; 2.湖南中医药大学, 长沙 410208; 3.湖南省妇幼保健院, 长沙 410008; 4.湖南湘潭市中医院药剂科, 湖南湘潭 411100)

中图分类号 R285;R541 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)31-2902-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.31.08

摘要 目的:研究心达康片对心肌缺血再灌注损伤模型大鼠的保护作用。方法:采用结扎冠状动脉左前降支30 min后再灌注120 min的方法复制大鼠心肌缺血再灌注损伤模型。实验分为假手术(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组、盐酸地尔硫草(14 mg/kg)组与心达康高、中、低剂量(6、4、2 mg/kg)组,灌胃给药,给药7 d后复制模型。检测大鼠血清乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性与心肌细胞中三磷酸腺苷(ATP)酶活性;免疫组化法测定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,模型组大鼠血清中CK、LDH活性显著增强,SOD和GSH-Px活性显著减弱,心肌细胞ATP酶活性显著减弱,Bax表达显著增强,Bcl-2表达显著减弱($P<0.01$);与模型组比较,心达康高、中、低剂量组大鼠血清中CK、LDH活性显著减弱,SOD和GSH-Px活性显著增强,心肌细胞ATP酶活性显著增强,Bax表达显著减弱,Bcl-2表达显著增强($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。结论:心达康片对心肌缺血再灌注损伤模型大鼠具有明显的保护作用,其机制可能与其增强机体清除自由基能力,改善心肌细胞ATP酶的能量代谢,以及抑制心肌缺血后心肌细胞凋亡有关。
关键词 心达康片;心肌缺血再灌注损伤;细胞凋亡

Protective Effects of Xindakang Tablets on Myocardial Ischemia-reperfusion Injury Model Rats

ZENG Bi-ying^{1, 2}, ZENG Rong², LI Xin-cai¹, DENG Feng-jun¹, LI Xue-jun¹, LIANG Juan³, SUN Shu-chun¹, ZHOU Li⁴, LIAO Duan-fang² (1.Yiyang Medical College of Hunan Province, Hunan Yiyang 413000, China; 2. Hunan University of TCM, Changsha 410208, China; 3.Hunan Provincial Maternal and Child Health Hospital, Changsha 410008, China; 4.Dept. of Pharmacy, Xiangtan Municipal Hospital of TCM, Hunan Xiangtan 411100, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the protective effects of Xindakang tablets on myocardial ischemia-reperfusion injury (MIRI) model rats. METHODS: MIRI model was induced by 120 min reperfusion 30 min after ligating the left anterior descending coronary artery. Model rats were divided into sham operation group (constant volume of normal saline), model group (constant volume of normal saline), Hexinshuang group(14 mg/kg) and Xindakang high-dose, medium-dose and low-dose groups (6, 4, 2 mg/kg). They were given medicine intragastrically for 7 days. The activities of LDH, CK, SOD and GSH-Px in serum and the activity of ATP in myocardial cells were determined. The expressions of Bcl-2 and Bax in myocardial cells were determined by immunohistochemical staining. RESULTS: Compared with sham operation group, the activities of CK and LDH were increased while those of SOD and GSH-Px were decreased significantly in model group; while the activity of ATP and the expression of Bcl-2 in myocardial cells were decreased significantly and the protein expression of Bax was increased significantly ($P<0.01$). Compared with model group, the activities of CK and LDH in serum in Xindakang high-dose, medium-dose and low-dose groups were decreased significantly, while the activities of SOD and GSH-Px were increased significantly; the activity of ATP and the expression of Bcl-2 in myocardial cells were increased significantly, while the protein expression of Bax was decreased significantly ($P<0.01$ or $P<0.05$). CONCLUSIONS: Xindakang tablets could protect against MIRI in rats. The potential mechanism is related to enhance function of eliminating free radical, improving the metabolism of ATPase, and attenuating cardiomyocyte apoptosis.

KEY WORDS Xindakang tablets; Myocardial ischemia-reperfusion injury; Cell apoptosis

心达康片是从沙棘果中提取的总黄酮加工而成的一种纯天然中药制剂,其主要成分为异鼠李素和槲皮素等黄酮类化合物^[1],具有补气益心、化痰通脉、消痰运脾之功效,临床上常

用于治疗缺血性心脏病、心绞痛、心肌缺血、心肌梗死、脑血栓等疾病^[2-3]。本研究通过结扎大鼠冠脉复制心肌缺血模型,评价心达康片在大鼠心肌缺血再灌注损伤中的保护作用,并探讨其作用机制,为该药在临床上的合理应用提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器

BIOPAC型多导生理记录仪(北京普升科技有限公司);

* 副主任药师,副教授,硕士。研究方向:临床药理学和药理学。
E-mail: zengbiyingor@126.com
通信作者:教授,博士研究生导师,博士。研究方向:药理学。
E-mail: dfliao66@yahoo.com.cn

Inspira 型动物呼吸机(美国哈佛仪器公司); ECG-1350C 型十二道自动分析心电图机(上海舒康仪器技术有限公司)。

1.2 药品与试剂

心达康片(四川雅达药业股份有限公司, 批号: 20120922, 规格: 5 mg/片); 盐酸地尔硫草(合心爽片, 天津田边制药有限公司, 批号: 20120613, 规格: 30mg/片); 戊巴比妥钠、乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和三磷酸腺苷(ATP)酶测试盒均购自南京建成生物工程研究所。

1.3 动物

清洁级 SD 大鼠 60 只, ♂, 体质量 280~320 g, 由中南大学湘雅三医院动物实验中心提供[动物使用合格证号: SCXK(湘)2010-0184]。

2 方法

2.1 分组与给药

实验分为 6 组, 即假手术(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组、盐酸地尔硫草(14 mg/kg)组与心达康高、中、低剂量(6、4、2 mg/kg)组, ig 给药, 每天 1 次, 连续 7 d。

2.2 复制模型

末次给药结束后开始复制模型。采用 2% 的戊巴比妥钠(40 mg/kg) ip 麻醉大鼠, 仰位固定于手术台上, 气管插管, 连接动物呼吸机, 调节呼吸频率为 80~90 次/min, 剪去大鼠胸前手术区毛, 分层剪开皮肤、皮下组织、胸前肌肉及筋膜 3~4 cm, 于左侧第四肋间, 用血管钳钝性分离肋间肌 3 cm 长, 沿胸骨左缘 0.5 cm 剪断第 2~4 肋骨, 自制拉钩拉开肋骨, 打开胸腔, 暴露心脏剪开心包膜, 并将心脏挤出胸腔。在大鼠左冠状动脉前降支根部穿线结扎, 将一小段聚乙烯管(直径 1.5 mm)置于结扎线下, 收紧结扎线以阻断 LAD 血流, 观察心电图, 以 ST 段抬高 0.1 mV 为结扎成功标志, 记录缺血时间, 30 min 后, 松线再灌注 120 min^[4-6]。假手术组开胸后冠脉穿线, 但不结扎冠脉。采用十二道自动分析心电图机监测心电图, 观察到心肌缺血和再灌注期间大鼠 ST 段均明显抬高, 表明模型复制成功。

2.3 检测指标

2.3.1 血清 CK、LDH、SOD 和 GSH-Px 活性的测定 再灌注结束后, 迅速打开大鼠腹腔, 分离腹主动脉血, 采用洁净注射器抽取腹主动脉血约 6 ml, 静置 30 min 后^[7], 再离心分离血清, 按照试剂盒说明书操作步骤, 测定大鼠血清中 CK、LDH、SOD、GSH-Px 活性。

2.3.2 心肌组织中 ATP 酶活性测定 取血后迅速取出大鼠心脏, 剪取心尖部位心肌组织, 分取左心室心肌组织, 称定质量后匀浆, 置 -20 °C 待测心肌组织中 ATP 酶的活性^[8]。

2.3.3 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)表达的测定 取上述部分心肌组织, 采用 10% 的福尔马林溶液进行固定, 再以 80% 乙醇脱水处理, 然后再采用石蜡包埋, 切成大约 5 μm 厚的石蜡切片。按照试剂盒说明书要求进行操作, 借助光学显微镜, 以胞浆内棕黄色或褐色颗粒者为 Bcl-2、Bax 阳性表达细胞, 采用病理图像分析处理系统对所得

的切片图像进行分析, 计算各切片阳性点面积总和与光密度值, 以阳性点面积总和/阳性点光密度均值表示^[9-10]。

2.4 统计学方法

实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 SPSS 13.0 进行统计分析, 组间比较采用 *t* 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 心达康片对模型大鼠血清 CK、LDH、SOD、GSH-Px 活性的影响

与假手术组比较, 模型组大鼠血清 CK、LDH 活性显著增强, SOD、GSH-Px 活性显著减弱(P < 0.01); 与模型组比较, 心达康高、中、低剂量组大鼠血清 CK、LDH 活性显著减弱, SOD、GSH-Px 活性显著增强(P < 0.01 或 P < 0.05)。心达康片对模型大鼠血清 CK、LDH、SOD、GSH-Px 活性的影响见表 1。

表 1 心达康片对模型大鼠血清 CK、LDH、SOD、GSH-Px 活性的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 1 Effects of Xindakang tablets on the activities of serum CK, LDH, SOD and GSH-Px in model rats($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量, mg/kg	CK, U/ml	LDH, U/L	SOD, U/ml	GSH-Px, U/ml
假手术组		80.48 ± 15.77	567.45 ± 41.32	248.57 ± 11.94	397.29 ± 21.74
模型组		123.25 ± 25.41 [*]	749.38 ± 52.74 [*]	202.21 ± 13.85 [*]	319.95 ± 19.65 [*]
盐酸地尔硫草组	14	83.22 ± 17.85 [*]	592.47 ± 58.82 [*]	231.34 ± 10.15 [*]	388.52 ± 26.84 [*]
心达康低剂量组	2	98.15 ± 16.58 [*]	679.74 ± 1149.4 [*]	213.65 ± 11.92 [*]	376.12 ± 31.43 [*]
心达康中剂量组	4	87.08 ± 12.25 ^{##}	621.25 ± 28.46 [#]	229.37 ± 12.75 ^{##}	387.53 ± 41.65 ^{##}
心达康高剂量组	6	82.47 ± 18.58 ^{###}	601.34 ± 27.57 ^{###}	238.26 ± 13.48 ^{###}	407.15 ± 51.25 ^{###}

与假手术组比较: *P < 0.01; 与模型组比较: #P < 0.05, ##P < 0.01 vs. sham operation group: *P < 0.01; vs. model group: #P < 0.05, ##P < 0.01

3.2 心达康片对模型大鼠心肌细胞 ATP 酶活性的影响

与假手术组比较, 模型组大鼠心肌组织中 Na⁺-K⁺-ATP 酶、Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶和总 ATP 酶的活性显著减弱(P < 0.01), 表明当大鼠心脏出现严重缺血时, 心肌细胞能量代谢产生严重障碍。与模型组比较, 心达康高、中、低剂量组大鼠心肌组织中 Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶和总 ATP 酶的活性显著增强(P < 0.01 或 P < 0.05)。心达康片对模型大鼠心肌细胞 ATP 酶活性的影响见表 2。

表 2 心达康片对模型大鼠心肌细胞 ATP 酶活性的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 2 Effects of Xindakang tablets on the activities of ATPase in myocardial cells of model rats($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量, mg/kg	ATP 酶活性, μmol/(mg·h)		
		Na ⁺ -K ⁺ -ATP 酶	Ca ²⁺ -Mg ²⁺ -ATP 酶	总 ATP 酶
假手术组		3.07 ± 0.68	2.79 ± 0.56	5.74 ± 1.27
模型组		1.89 ± 0.41 [*]	1.84 ± 0.35 [*]	3.53 ± 0.87 [*]
盐酸地尔硫草组	14	2.87 ± 0.37 ^{##}	2.83 ± 0.44 ^{###}	5.65 ± 0.95 [*]
心达康低剂量组	2	2.62 ± 0.29 [#]	2.58 ± 0.31 [#]	4.79 ± 1.03 [*]
心达康中剂量组	4	2.76 ± 0.32 [#]	2.71 ± 0.37 [#]	5.27 ± 1.07 [#]
心达康高剂量组	6	2.85 ± 0.46 ^{##}	2.87 ± 0.48 ^{##}	5.44 ± 1.21 ^{##}

与假手术组比较: *P < 0.01; 与模型组比较: #P < 0.05, ##P < 0.01 vs. sham operation group: *P < 0.01; vs. model group: #P < 0.05, ##P < 0.01

3.3 心达康片对模型大鼠心肌细胞 Bcl-2、Bax 表达的影响

与假手术组比较,模型组大鼠心肌细胞 Bcl-2 表达显著减弱, Bax 表达显著增强 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 心达康高、中、低剂量组 Bcl-2 表达显著增强, Bax 蛋白表达显著减弱 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。心达康片对模型大鼠心肌细胞 Bcl-2、Bax 表达的影响见表 3。

表 3 心达康片对模型大鼠心肌细胞 Bcl-2、Bax 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 3 Effects of Xindakang tablets on the expressions of Bcl-2 and Bax in myocardial cells of model rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量, mg/kg	Bcl-2, %	Bax, %
假手术组		14.8 ± 1.9	3.8 ± 0.7
模型组		3.5 ± 2.2 [*]	29.6 ± 5.8 [*]
盐酸地尔硫草组	14	11.3 ± 3.1 ^{##}	21.4 ± 3.9 ^{##}
心达康低剂量组	2	5.8 ± 3.5 [*]	24.3 ± 4.1 [*]
心达康中剂量组	4	9.7 ± 4.1 [*]	22.7 ± 3.6 [*]
心达康高剂量组	6	12.7 ± 3.8 ^{##}	20.5 ± 2.7 ^{##}

与假手术组比较: * $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$
vs. sham operation group: * $P < 0.01$; vs. model group: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

4 讨论

心肌缺血可出现心脏的供氧减少, 导致心肌能量代谢不正常, 不能支持心脏正常工作, 最终可诱发心绞痛、心肌梗死等系列严重的心脏疾病。当心脏处于缺血状态下, 心肌组织出现严重缺氧和代谢障碍, 心肌细胞膜的液态性、流动性和通透性均将发生异常改变, 当心脏缺血损伤达到一定程度时, 磷酸酶被激活, 产生大量具有膜活性的游离脂肪酸, 破坏细胞膜, 同时释放大量的自由基, 导致细胞质膜损伤和通透性增加, 促使心肌细胞各种酶外漏, 如常见的 CK、LDH 等释放入血, 导致血液中内 CK、LDH 含量迅速升高。此外, 心肌缺血时儿茶酚胺在缺血区域大量积蓄, 产生大量氧自由基^[8]。而 SOD 和 GSH-Px 均能清除体内大量蓄积的氧自由基, 在机体的氧化与抗氧化平衡中起着至关重要的作用, 当心肌缺血发生时, 这些酶的活性降低, 导致机体清除氧自由基的能力下降, 引发氧自由基蓄积, 最终加剧心肌缺血组织的大量损伤^[9]。本研究发现, 心达康片可以显著抑制血清 CK、LDH 指标的升高, 升高血清 SOD 和 GSH-Px 活性, 表明心达康片对心肌缺血性损伤的保护作用可能与降低自由基水平、抑制脂质过氧化反应有关。

心肌缺血时可出现 Ca^{2+} 在细胞内超载, 引起膜受损和膜通透性增强, 损伤线粒体, 最终导致心肌细胞出现坏死, Na^+-K^+-ATP 酶和 $Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP$ 酶是细胞膜上的重要离子通道, 具有对抗钙超载的作用^[10]。本研究发现, 心达康片可以显著提高心肌缺血损伤大鼠心肌细胞中 Na^+-K^+-ATP 酶和 $Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP$ 酶的活性, 表明心达康片可通过改善缺血心肌

细胞 ATP 的能量代谢, 保护受损心肌。近年来研究表明, 心肌细胞死亡存在坏死和凋亡两种机制, 尤其在心肌梗死再灌注后, 在梗死区及其周围可见细胞凋亡的存在, 其中 Bcl-2 与 Bax 的表达比例是决定细胞是否凋亡的关键。由本研究结果可知, 心肌缺血再灌注损伤发生后, 心肌细胞 Bcl-2 与 Bax 蛋白表达呈增强趋势, 心达康片可以促使 Bax 蛋白表达较缺血模型组明显降低, Bcl-2 蛋白表达显著升高。免疫组化结果表明, 心达康片对抗心肌缺血再灌注损伤的机制可能与其减少细胞凋亡密切相关。

综上所述, 心达康片对大鼠心肌缺血再灌注损伤具有明显的保护作用, 其具体作用机制可能是: (1) 通过激活抗氧化酶, 提高 SOD 和 GSH-Px 的活性, 减少过多氧自由基对组织的损伤, 抑制脂质过氧化反应; (2) 通过改善缺血心肌细胞 ATP 的能量代谢, 保护受损心肌; (3) 调控心肌细胞 Bcl-2 与 Bax 蛋白表达, 减少心肌细胞凋亡, 最终实现对损伤心肌的保护。本研究可为心达康片在临床上的合理应用提供科学理论依据, 具体的有效成分有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 旷英华, 朱勇, 戴宏勋, 等. 心达康胶囊治疗冠状动脉粥样硬化性心脏病 120 例的临床疗效分析[J]. 实用医技杂志, 2008, 15(26): 3 513.
- [2] 刘伦翠. 心达康治疗冠心病心绞痛 51 例临床研究[J]. 中国现代药物应用, 2008, 2(7): 54.
- [3] 林月景, 罗静, 郭玲霞. 高效液相色谱法测定心达康片中 3 种黄酮的含量[J]. 中国医院药学杂志, 2007, 27(9): 1 320.
- [4] 张玮玮, 郭永清. 大鼠急性心肌缺血再灌注模型的改进[J]. 山西医药杂志, 2009, 38(10): 902.
- [5] 李晓民, 汪克明, 刘婧, 等. 大鼠心肌缺血再灌注模型的有效复制方法[J]. 中国心血管病研究杂志, 2007, 5(6): 463.
- [6] 张建军, 张振英, 王娜. 羟基红花黄色素 A 对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及机制[J]. 中国医院药学杂志, 2012, 32(19): 1 526.
- [7] 陈冰心, 任澎, 段明军, 等. 大鼠心肌缺血再灌注模型构建的改良[J]. 中国比较医学杂志, 2010, 20(5): 24.
- [8] 董六一, 邵旭, 江勤, 等. 牡荆素对大鼠实验性心肌缺血损伤的保护作用及其机制[J]. 中草药, 2011, 42(7): 1 378.
- [9] 刘锡强, 李丽, 田京伟. 迷迭香酸对大鼠心肌缺血损伤保护作用机制的探讨[J]. 中成药, 2011, 33(7): 1 232.
- [10] 何东伟, 刘新伟, 庞勇, 等. 白藜芦醇对大鼠缺血再灌注心肌细胞凋亡的抑制作用与 PI3K-Akt 信号通路的关系[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(15): 2 323.

(收稿日期: 2013-04-12 修回日期: 2013-06-04)

《中国药房》杂志——中国科技核心期刊, 欢迎投稿、订阅