

丹酚酸B对大鼠离体心脏缺血再灌注损伤的保护作用[△]

高元峰*, 陈 虎, 王银辉, 张 浩, 杨林军(长沙医学院, 长沙 410219)

中图分类号 R285;R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)43-4047-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.43.05

摘 要 目的:研究丹酚酸B对大鼠离体心脏缺血再灌注损伤的保护作用。方法:大鼠离体心脏采用Langendorff装置,灌注含氧K-H液30 min后,夹闭,停止灌注30 min,然后再灌注40 min。实验分为模型(空白K-H液)组、葛根素(0.24 mmol/l)组与丹酚酸B高、中、低浓度(60、30、15 μmol/l)组。灌注含氧K-H液20 min后加入相应药物灌注10 min。实时测定血流动力学指标、左室舒张末期压(LVEDP)、左室发展压(LVDP)、左室收缩压最大变化速率(+dP/dt_{max})、左室舒张压最大下降速率(-dP/dt_{max})。收集灌流液,并测定肌酸激酶(CK)的活力;取部分心肌组织测定丙二醛(MDA)含量与超氧化物歧化酶(SOD)活性。结果:与模型组比较,丹酚酸B高、中浓度组大鼠离体心脏在复灌10 min后LVEDP显著降低, LVDP显著升高, +dP/dt_{max}显著升高, -dP/dt_{max}显著降低($P<0.01$ 或 $P<0.05$);丹酚酸B高浓度组离体大鼠心脏组织CK活性显著减弱($P<0.01$),丹酚酸B高、中浓度组大鼠离体心脏MDA含量显著减少, SOD活性显著增强($P<0.01$);丹酚酸B高、中、低浓度组大鼠离体心脏复灌5 min后灌流液显著增加($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。结论:丹酚酸B对大鼠离体心脏有保护作用,其机制可能是通过清除氧自由基,抵抗氧化应激发挥治疗作用。

关键词 丹酚酸B;氧化应激;离体心脏;缺血再灌注

Protective Effects of Salvianolic Acid B on Isolated Heart in Rats

GAO Yuan-feng, CHEN Hu, WANG Yin-hui, ZHANG Hao, YANG Lin-jun(Changsha Medical College, Changsha 410219, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study protective effects of salvianolic acid B on myocardial ischemia-reperfusion injury in isolated heart of rats. METHODS: Isolated hearts were perfused with Oxygenated K-H solution in Langendorff mode for 30 min, and then they were subjected to 30 min of global ischemia, followed by a 40 min reperfusion period. Model rats were divided into model group (blank K-H solution), puerarin group (0.24 mmol/l) and salvianolic acid B high-dose, medium-dose and low-dose groups (60, 30, 15 μmol/l). They were subjected to 20 min of Oxygenated K-H solution, followed by 10 min perfusion. Hemodynamic parameters as LVEDP, LCDP, +dP/dt_{max} and -dP/dt_{max} were determined by determined; the perfusate was collected and the activity of CK was determined; the content of MDA and the activity of SOD in myocardial tissue were all determined. RESULTS: Compared with model group, the levels of LVEDP in isolated hearts were decreased significantly in salvianolic acid B high-dose and low-dose groups 10 min after reperfusion while the levels of LVDP and +dP/dt_{max} were increased significantly; -dP/dt_{max} were also decreased significantly ($P<0.01$ or $P<0.05$). The activity of CK in Salvianolic acid B high-dose group and the content of MDA were decreased significantly in salvianolic acid B high-dose and medium-dose group ($P<0.01$) while the activity of SOD was increased significantly ($P<0.01$). The reperfusion solution in isolated hearts were increased significantly in salvianolic acid B high-dose, medium-dose and low-dose groups 5 min after reperfusion. CONCLUSIONS: Salvianolic acid B has the function of protection on isolated heart, the mechanism of which is possibly associated with scavenging oxygen free radicals and defending against oxidative stress.

KEY WORDS Salvianolic acid B; Oxidative stress; Isolated heart; ischemia-reperfusion

有研究表明,氧化应激(OS)的增加会相应地增加缺血再灌注的损伤,它是再灌注损伤导致心肌顿抑的主要原因,也是心肌肥厚、扩张型心肌病、心律失常等疾病恶化的关键步骤^[1-2]。丹参为唇形科鼠尾草属植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根及根茎,具有活血凉血、祛瘀止痛、安神除烦的功效。丹参水溶性成分具有抗心肌缺血、改善微循环、抗炎等作用,其中丹酚酸B是丹酚酸诸多成分中含量较高、活性较强的水溶性成分^[3-7]。笔者利用Langendorff^[8-10]离体大鼠心脏模型研究丹酚酸B是否可通过抑制氧化应激来改善缺血再灌注损伤,以为丹参的临床应用与新药开发提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

ZH-LF型离体心脏灌注设备(安徽淮北正华生物仪器设备公司);RM6240型生物信号采集系统(成都太盟科技有限公司);成人安全套(青岛伦敦杜蕾斯有限公司)。

1.2 药品与试剂

丹酚酸B(中国食品药品检定研究院,批号:111562-200807);葛根素注射液(湖南五洲通药业有限责任公司,批号:2007609);Krebs-Henseleit(K-H)缓冲液[成分(mmol/L):NaCl 118.5, NaHCO₃ 25.0, KCl 4.8, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1.2, 葡萄糖 11.0, CaCl₂ 2.5, 该溶液用95% O₂-5% CO₂的气体饱和(pH 7.4, 37℃)];肌酸激酶(CK)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

△基金项目:湖南省高等学校科学研究项目(No.11C0149)

*讲师。研究方向:心血管药理学。电话:0731-88498013。

E-mail: davin@126.com

1.3 动物

Wistar大鼠50只,♂,体质量(300±20)g,由长沙市开福区东创实验动物科技服务部提供[实验动物使用许可证号:SCXK(湘)2009-0012]。

2 方法

2.1 模型的复制^[11-14]

ip水合氯醛(350 mg/kg)麻醉大鼠,并ip肝素(1 000 u/kg),剪开胸部,迅速切除心脏,并转移到-4℃的K-H缓冲液中,洗净,将离体心脏的主动脉连接到的Langendorff灌流仪器,灌注压约为80 mmHg(1 mmHg=0.133 32 Pa)。将球囊通过左心耳插入左心室,将左心室舒张末压(LVEDP)通过三通阀调整为4~8 mmHg。灌注30 min心脏平衡稳定后,停止灌注K-H缓冲液,使心脏全心缺血30 min,之后再重新启动灌注40 min。

2.2 分组与给药

实验分为五组,即模型(空白K-H液)组、葛根素(0.24 mmol/L)组与丹酚酸B高、中、低浓度(60、30、15 μmol/L)组。灌注20 min后开始灌注含药K-H液10 min。

2.3 心功能指标的测定

将离体心脏挂在离体装置后,心脏正常搏动,连接生物信号采集系统,记录整个实验过程中LVEDP、左室发展压(LVDP)、左室收缩压最大变化速率(+dP/dt_{max})、左室舒张压最大下降速率(-dP/dt_{max})等心功能指标的变化。

2.4 生化指标的测定

收集再灌注后30 min的灌流液3次,每次1 min,将收集到的灌流液冷冻干燥至1 ml,测定CK的活性。再灌注结束后,从离体心脏仪器上取下心脏,迅速剪下左心室,于-80℃下贮藏,严格按照试剂盒说明进行MDA含量与SOD活性的测定。

2.5 统计学方法

采用SPSS13.0分析软件完成统计学处理,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间两两比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 丹酚酸B对模型离体心脏心功能指标的影响

与模型组比较,丹酚酸B高、中浓度组大鼠离体心脏再灌注10 min后LVEDP显著降低,LVDP显著升高,+dP/dt_{max}显著升高,-dP/dt_{max}显著降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。丹酚酸B对模型离体心脏LVEDP、LVDP、+dP/dt_{max}、-dP/dt_{max}的影响见表1、表2、表3、表4。

表1 丹酚酸B对模型离体心脏LVEDP(mmHg)的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	停灌前	再灌注后,min			
		10	20	30	40
模型组	8.67±1.34	81.55±10.33	68.97±7.09	56.28±9.32	53.18±8.95
丹酚酸B低浓度组	9.12±1.06	74.85±9.59	62.37±8.86	53.91±6.29	49.45±5.09
丹酚酸B中浓度组	8.97±0.98	62.96±9.92*	53.64±8.59*	45.72±8.32*	40.81±9.33*
丹酚酸B高浓度组	8.85±1.32	41.66±8.95*	35.38±8.87**	25.77±6.83**	22.66±4.82**
葛根素组	8.50±1.15	44.17±10.01**	35.25±8.99**	26.15±6.37**	23.04±4.80**

与模型组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

vs.model group: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表2 丹酚酸B对模型离体心脏LVDP(mmHg)的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	停灌前	再灌注后,min			
		10	20	30	40
模型组	148.43±10.56	27.38±8.36	65.41±10.24	82.68±9.52	93.18±9.71
丹酚酸B低浓度组	133.63±12.42	25.63±4.42	66.62±7.81	86.61±6.04	94.11±7.10
丹酚酸B中浓度组	147.46±12.53	50.83±9.57*	82.56±13.87*	106.09±14.43*	119.75±11.96*
丹酚酸B高浓度组	127.61±5.46	73.68±10.98*	101.32±12.77*	125.43±11.88*	122.64±13.76*
葛根素组	136.23±10.43	71.75±10.30*	103.45±10.99*	121.12±10.30*	123.51±13.71*

与模型组比较: * $P < 0.01$

vs.model group: * $P < 0.01$

表3 丹酚酸B对模型离体心脏+dP/dt_{max}(mmHg/s)的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 3 Effects of salvianolic acid B on +dP/dt_{max}(mmHg/s) in isolated rat hearts ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	停灌前	再灌注后,min			
		10	20	30	40
模型组	4 056.65±313.30	518.93±130.96	1 257.73±174.47	2 096.66±200.75	2 440.68±223.36
丹酚酸B低浓度组	3 868.76±348.61	570.30±112.08	1 393.62±196.98	2 320.16±217.41	2 610.70±205.74
丹酚酸B中浓度组	4 350.53±255.87	907.70±135.62*	1 810.40±267.37*	2 520.10±153.81*	2 785.91±204.93*
丹酚酸B高浓度组	3 779.80±250.75	1 286.26±218.44*	1 960.51±291.59*	3 305.09±391.92*	3 332.67±377.52*
葛根素组	3 934.60±250.60	1 161.26±194.05*	1 935.51±299.91*	3 229.46±487.63*	3 395.17±392.24*

与模型组比较: * $P < 0.01$

vs.model group: * $P < 0.01$

表4 丹酚酸B对模型离体心脏-dP/dt_{max}(mmHg/s)的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 4 Effect of salvianolic acid B on -dP/dt_{max}(mmHg/s) in isolated rat hearts ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	停灌前	再灌注后,min			
		10	20	30	40
模型组	-2 694.50±142.73	-349.10±43.58	-1 130.55±222.53	-1 484.54±183.79	-1 770.86±204.51
丹酚酸B低浓度组	-2 575.53±156.78	-364.02±42.81	-1 182.83±150.98	-1 582.79±182.01	-1 899.72±172.57
丹酚酸B中浓度组	-2 594.72±184.45	-736.57±121.58*	-1 408.38±151.55*	-1 732.62±181.81*	-2 136.57±213.11*
丹酚酸B高浓度组	-2 380.62±132.75	-989.13±211.50*	-1 936.19±249.53*	-2 133.29±173.71*	-2 301.29±207.82*
葛根素组	-2 794.80±212.70	-976.63±208.63*	-2 161.56±468.08*	-2 145.91±172.57*	-2 276.29±192.65*

与模型组比较: * $P < 0.01$

vs.model group: * $P < 0.01$

3.2 丹酚酸B对模型离体心脏复灌液的影响

与模型组比较,丹酚酸B高、中、低浓度组大鼠离体心脏再灌注5 min后复灌液显著增加($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。丹酚酸B对模型离体心脏复灌液的影响见表5。

表5 丹酚酸B对模型离体心脏复灌液的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 5 Effect of salvianolic acid B on perfusion fluid in reperfused rat hearts($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	再灌注后,min			
	5	10	20	40
模型组	6.78±0.39	6.75±0.41	6.73±0.31	6.72±0.42
丹酚酸B低浓度组	6.85±0.54*	8.33±0.51**	9.94±0.78**	11.43±0.81**
丹酚酸B中浓度组	7.52±0.24**	8.42±0.37**	10.01±0.39**	11.73±0.65**
丹酚酸B高浓度组	8.33±0.61**	9.02±0.34**	9.75±0.53**	9.75±0.99**
葛根素组	7.89±0.69**	8.78±0.57**	10.58±0.99**	10.75±0.94**

与模型组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

vs.model group: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3.3 丹酚酸B对模型离体心脏生化指标的影响

与模型组比较,丹酚酸B高浓度组大鼠离体心脏CK活性显著减弱,丹酚酸B高、中浓度组大鼠离体心脏MDA含量显著减少,SOD活性显著增强($P < 0.01$)。丹酚酸B对模型离体心脏生化指标的影响见表6。

表6 丹酚酸B对模型离体心脏生化指标的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 6 Effect of salvianolic acid B on biochemical markers ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	CK,U/ml	MDA,nmol/mg	SOD,U/mg
模型组	2.50±0.66	12.53±1.42	135.63±6.24
丹酚酸B低浓度组	2.03±0.23	11.15±1.63	139.18±11.58
丹酚酸B中浓度组	1.95±0.51	8.84±2.12*	167.62±21.29*
丹酚酸B高浓度组	1.61±0.42*	7.43±2.59*	179.02±26.19*
葛根素组	1.78±0.55*	8.53±2.93*	181.44±29.74*

与模型组比较: * $P < 0.01$

vs.model group: * $P < 0.01$

4 讨论

缺血再灌注是个复杂而又多层面的过程,这一过程产生氧化应激反应,导致严重的组织损伤^[2]。在早期阶段的预灌注中,组织活性氧浓度增加。原因可能是由于需增加产生的各级抗氧化系统严重不足。在停灌以及再灌注后,在心肌组织中,产生越来越多的活性氧,并最终导致心肌损伤。

本研究采用大鼠离体心脏,结果表明,丹酚酸B可使LVDP、 $\pm dP/dt_{max}$ 绝对值升高,表明在用药后心脏收缩和舒张功能增强,室壁肌张力随之上升,心肌从减弱趋势转向正常。此外,丹酚酸B可扩张冠状动脉,增加侧枝循环、降低冠脉阻力,使其在心排出量不增加的前提下增加冠脉流量、提高心肌血流量,改善缺血区的供血供氧,维持心脏做功。

再灌注可引起大量自由基的产生而导致细胞损伤,这一事实已为许多研究结果所肯定。在细胞内线粒体、内质网、细胞核、质膜和细胞液中都可产生氧自由基。本研究通过测定缺血再灌注心肌组织中MDA含量、SOD活性的变化,来观察缺血再灌注对离体大鼠心脏氧自由基含量的影响^[15]。研究结果表明,丹酚酸B能提高缺血再灌注心肌氧自由基清除系统SOD的活性,降低MDA的含量,从而减轻缺血再灌注心肌的

损伤。丹酚酸B的这种抗氧化作用可能是其对缺血再灌注心肌的保护机制之一。

参考文献

- [1] Bolli R, Jeroudi M, Patel B, *et al.* Marked reduction of free radical generation and contractile dysfunction by antioxidant therapy begun at the time of reperfusion. Evidence that myocardial "stunning" is a manifestation of reperfusion injury [J]. *Circ Res*, 1989, 65(3): 607.
- [2] Charniot JC, Bonnefont-Rousselot D, Marchand C, *et al.* Oxidative stress implication in a new phenotype of amyotrophic quadriplegic syndrome with cardiac involvement due to lamin A/C mutation [J]. *Free Radic Res*, 2007, 41(4): 424.
- [3] 李克明,付桂香.丹参中丹酚酸B的药理研究进展[J]. 中日友好医学院学报, 2008, 22(6): 366.
- [4] 张平,李桂三.丹参化学成分与药理作用研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2006, 13(6): 34.
- [5] 高元峰,陈虎,王银辉,等.丹酚酸B对大鼠心缺血保护作用及其机制研究[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(11): 2771.
- [6] 黎创幸.丹酚酸B与三七总皂苷配伍对缺氧复氧内皮细胞粘附分子-1表达及对中性粒细胞与内皮细胞黏附率的影响研究[J]. 中国药房, 2006, 17(14): 1061.
- [7] Wang Y, Xu F, Chen J, *et al.* Matrix metalloproteinase-9 induces cardiac fibroblast migration collagen and cytokine secretion: inhibition by salvianolic acid B from *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Phytomedicine*, 2011, 19(1): 13.
- [8] Monika SS, Bartosz G, Adam S, *et al.* Isolated heart perfusion according to Langendorff-still viable in the new millennium[J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2007, 55(2): 113.
- [9] Gao Q, Pan HY, Qiu S, *et al.* Atractyloside and 5-hydroxydecanoate block the protective effect of puerarin in isolated rat heart[J]. *Life Sci*, 2006, (79): 217.
- [10] Jin SE, Son YK, Min BS, *et al.* Anti-inflammatory and antioxidant activities of constituents isolated from *Pueraria lobata* roots[J]. *Arch Pharm Res*, 2012, 35(5): 823.
- [11] 李寒,徐序洁,张载高,等.离体心脏灌注模型的制备[J]. 海军总医院学报, 2006, 19(3): 133.
- [12] 梁伟涛.离体心脏 Langendorff灌注模型稳定性的探讨[J]. 国际心血管病杂志, 2011, 38(1): 44.
- [13] 黄健,周云,杨绍军,等.成功制作离体心脏灌注模型要点和经验[J]. 实验动物科学, 2011, 28(4): 60.
- [14] 刘镭,徐军美,杨昭云,等.一种新的Langendorff球囊制备方法[J]. 实验动物与比较医学, 2008, 28(3): 186.
- [15] Zhang JP, Zhang YY, Zhang Y, *et al.* *Salvia miltiorrhiza* (Danshen) injection ameliorates iron overload-induced cardiac damage in mice[J]. *Planta Med*, 2013, 79(9): 744.

(收稿日期:2013-06-10 修回日期:2013-07-27)