

· 论 著 ·

益生注射液抗大鼠移植心缺血再灌注损伤的实验研究

李 明¹, 严律南^{2△}

(1. 重庆医科大学附属第一医院普外科 400016; 2. 四川大学华西医院普外科, 成都 710032)

摘 要:目的 探讨中药益生注射液对大鼠移植心缺血再灌注损伤的保护作用。方法 采用封闭群 SD 大鼠 20 只, 随机分为两组, 对照组的离体心脏用 4℃ 生理盐水保存 3 h 后, 行心脏移植, 术后不给任何药物处理; 实验组的离体心脏则用含益生注射液的 4℃ 生理盐水保存 3 h 后, 行心脏移植, 术后每天腹腔注射益生注射液, 剂量为 8 mg/kg, 连续 9 d。分别采集受术术前和术后 1、3、5、7、9 d 血液, 检测丙二醛(MDA)含量和超氧化物歧化酶(SOD)活性。结果 对照组与实验组相比, 术前两组血浆的 MDA 含量和 SOD 活性相似; 术后第 1 天, 对照组血浆 MDA 含量升高, 并明显高于实验组($P < 0.05$), 而 SOD 活性下降, 并明显低于实验组($P < 0.05$); 此后, 两组的血浆 MDA 含量和 SOD 活性逐渐恢复到正常, 但实验组恢复较快。结论 益生注射液对大鼠移植心缺血再灌注损伤有保护作用。

关键词: 益生注射液; 缺血再灌注损伤; 大鼠; 心脏移植

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2010.23.019

中图分类号: R654.2; R282.71

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)23-3197-03

Experimental study on inhibitory effect of Yisheng injection on ischemia/reperfusion injury of cardiac allograft in rat

LI Ming¹, YAN Lu-nan^{2△}

(1. Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University,

Chongqing 400016, China; 2. Department of General Surgery, West China Hospital,

Sichuan University, Chengdu, 710032, China)

Abstract: **Objective** To investigate whether the traditional chinese medicine Yisheng injection can reduce ischemia/reperfusion injury in rat heart transplant model. **Methods** 20 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 chloride solution at 4℃ for 3 hours before transplantation, while in the experimental group, the hearts were preserved in 0.9% sodium chloride solution containing Yisheng injection at 4℃ for 3 hours before transplantation. After transplantation, the experimental group recipients were treated with Yisheng injection 8 mg/(kg · d) for 9 days. The specimens of blood were harvested from recipients before transplantation and on 1, 3, 5, 7, 9 day after transplantation. The changes of MDA and SOD were observed in two groups. **Results** The MDA and SOD of two groups were similar before transplantation. However, the MDA of the two groups increased and the SOD of two groups decreased, it was more significant in the control group. Then, The MDA and SOD of the two groups recovered to normal gradually, but the experimental group recovered to normal faster than the control group. **Conclusion** It demonstrated that Yisheng injection can reduce ischemia/reperfusion injury in rat heart transplant model.

Key words: yisheng injection; ischemia/reperfusion injury; closed colony SD rat; cardiac allograft

本实验采用大鼠心脏移植模型, 并用益生注射液进行供体心脏的冷藏保存和心脏移植后受体的早期治疗, 了解该药对移植心脏的缺血再灌注损伤(ischemia/reperfusion injury, I/R)是否具有保护作用。旨在验证以前的研究结果, 并为临床器官保存和器官移植后应用该药提供部分实验依据。

1 材料与方

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

1.2 药品与试剂 益生注射液(规格 20 mg/mL, 批号 990705, 成都市药物制剂研究所提供); 丙二醛测定试剂盒、超氧化物歧化酶测定试剂盒: 各 100 人份(购自南京建成公司)。

1.3 器械与仪器 显微外科手术器械(上海手术器械厂

SSW-3 手术显微外科器械); UV-1601PC 紫外分光光度计(日本岛津)。

1.4 实验方法

1.4.1 实验分组 采用大鼠心脏移植模型^[1], 将封闭群 SD 大鼠 20 只随机分为两组, 供心切取时, 对照组供心用 4℃ 肝素生理盐水(肝素浓度为 50 u/mL)进行灌注降温, 而实验组供心用 4℃ 含益生注射液的肝素生理盐水进行灌注降温(益生注射液浓度为 0.5 mg/mL, 肝素浓度同对照组); 供心取下后, 对照组置于 4℃ 生理盐水中保存, 3 h 后行心脏移植, 术后不给任何药物处理; 而实验组供心置于 4℃ 含益生注射液的生理盐水(益生注射液浓度为 0.5 mg/mL)中保存, 3 h 后行心脏移植; 术后每天腹腔注射益生注射液, 剂量为 8 mg/kg, 连续 9 d; 两

△ 通讯作者, E-mail: YanLunan@hotmail.com。

表 1 两组大鼠心脏移植后血浆 MDA 和 SOD 测定结果(±s)

组别	检测指标	术前	术后 1 d	术后 3 d	术后 5 d	术后 7 d	术后 9 d
对照组(n=5)	MDA(nmol/ml)	18.17±0.91	45.27±6.48 [#]	40.85±4.40	36.20±4.57	25.89±4.82	17.75±1.31
	SOD(Nu/mL)	734.61±43.37	529.77±46.31 [#]	588.79±73.48	621.67±68.99	675.37±71.73	715.22±72.24
实验组(n=5)	MDA(nmol/mL)	17.53±0.90	32.78±6.61* [#]	27.40±6.06*	23.28±5.84*	17.80±1.52*	17.45±1.10
	SOD(Nu/mL)	731.00±43.19	663.33±45.92* [#]	704.52±38.48*	735.00±40.26*	783.60±37.10*	729.46±47.24

[#]: P<0.05,与术前比较。*: P<0.05,与对照组同一时间点比较。

组均在冷藏保存 3 h 后,进行心脏移植。分别采集受术术前和术后 1、3、5、7、9 d 血液,检测丙二醛(MDA)含量和超氧化物歧化酶(SOD)活性。

1.4.2 观察指标及方法

1.4.2.1 丙二醛测定 丙二醛(MDA)测定采用 TBA(硫代巴比妥酸)法,利用过氧化脂质降解产物中的 MDA 可与 TBA 缩合,形成红色产物,在 532 nm 处有最大吸收峰,用 UV-1601PC(日本津岛)紫外分光光度仪在 532 nm 处检测其吸光度,利用公式可计算出实验组和对照组血浆样品中 MDA 含量。

1.4.2.2 SOD 测定 采用黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 活性。即通过黄嘌呤及黄嘌呤氧化酶反应系统产生超氧阴离子自由基,后者氧化羟胺形成亚硝酸盐,在显色剂的作用下呈现紫红色,用可见光分光光度计在 550 nm 处测其吸光度。当被测样品中含 SOD 时,则对超氧阴离子自由基有专一性的抑制作用,使形成的亚硝酸盐减少,比色时测定管的吸光度值低于对照管的吸光度值,利用以下公式可计算出实验组和对照组血浆样品中的 SOD 活性。

1.5 统计学处理 应用 SPSS10.0 软件进行统计学分析,所得计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用配对 t 检验,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

血浆 MDA 和 SOD 的测定结果见表 1。对照组和实验组心脏移植术后血浆 MDA 含量显著升高,而 SOD 活性却显著降低,术后第 1 天下降最明显。对照组与实验组相比,术前两组血浆的 MDA 含量和 SOD 活性相似;术后第 1 天,对照组血浆 MDA 含量升高,并明显高于实验组(P<0.05),而 SOD 活性下降,并明显低于实验组(P<0.05);此后,两组血浆 MDA 含量和 SOD 活性逐渐恢复到正常,但对照组恢复较慢,术后第 9 天才接近正常,实验组恢复较快,术后第 5 天已恢复正常。可见益生注射液对移植心脏的 I/R 损伤确实有保护作用,这与益生注射液的离体心冷藏保存实验结果一致。

3 讨 论

器官移植后不可避免地存在 I/R,I/R 损伤不仅可造成移植植物原发性无功能(primary graft failure,PGF)或移植植物延迟复功(delayed graft function,DGF),而且还将导致移植植物慢性失功(chronic graft failure,CGF)。随着 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注目的研究课题^[2]。

MDA 是氧自由基攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸,引发脂质过氧化作用,并形成脂质过氧化物中的一种。脂质过氧化作用及其产物可对细胞造成损伤,因此测定 MDA 的量常常可

反映机体内脂质过氧化的程度,间接地反映出细胞损伤的程度。SOD 对机体的氧化与抗氧化平衡起着至关重要的作用,此酶能清除超氧阴离子自由基而保护细胞免受损伤。因此,测定 SOD 活力的高低可间接反映机体清除氧自由基的能力。

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,它们都与供体器官离体后的能量代谢障碍密切相关^[3-4]。虽然低温保存供体器官可明显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到受体是公认的原则,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:SOD、别嘌呤醇、触酶、谷胱甘肽、辅酶 Q10、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^[5]。

此外,传统的祖国医学在抗 I/R 损伤中也得到了发掘。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。复方丹参为这类药的典型代表,张昱等^[6]研究了在体和离体大鼠心脏 I/R 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 I/R 均有明显的保护作用。李幼生等^[7]证实丹参对低温保存的小肠具有保护作用。有研究认为大鼠胰组织热缺血 45 min、再灌注 60 min 时,其脂质过氧化物发生变化,同时发现丹参、SOD 和辅酶 Q10 可减轻缺血再灌注损伤^[5]。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,本研究结果显示,在体外实验中,其对静态缺氧/再给氧损伤下培养的人胎儿肾毛细血管内皮细胞具有保护作用^[8];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^[9]。在血淤型大鼠模型中,其可降低全血黏度,减少血小板聚集,抑制血小板血栓素 A2(TXA2)释放^[10]。在大鼠离体心脏冷缺血损伤的实验研究中,其对离体心肌的冷缺血损伤有保护作用,特别是对其中的血管内皮细胞^[11]。为进一步研究益生注射液的抗 CGF 作用,本研究结果显示,与移植前相比,对照组移植后血浆 MDA 含量显著升高,SOD 活性显著降低,移植后第 1 天最明显,第 9 天恢复正常,说明大鼠心脏移植后发生了 I/R 损伤,这与氧自由基含量升高而清除它的酶类下降有关。实验组心脏移植后 MDA 含量也升高,SOD 活性也下降,但其变化幅度较低,而且恢复快,移植后第 5 天恢复正常。说明益生注射液有抗脂质过氧化和保护 SOD 活性的作用。

引起 I/R 损伤的介质除氧自由基外,有研究表明,补体也

介导 I/R 损伤, 尽管机体存在正常的限制补体攻击的内源性途径^[12]。同样在 I/R 损伤中发生的血栓形成也加重了移植物的损害, 特别是血管结构: 内皮细胞活化可导致促凝因子增加(组织因子), 加上抗凝、抗血栓和抗补体调节机制的丧失^[13]。以往研究证实, 益生注射液中的 B 成分可保护体外培养的人胎儿肾毛细血管内皮细胞免受缺氧再给氧损伤, 并能抑制缺氧时内皮素-1 的分泌, 促进 PGI₂ 的分泌^[14]。在大鼠血淤模型中, 益生注射液中的 B 成分可改善微循环, 降低全血黏度, 抑制血小板聚集^[12]。此外, 保护血管内皮细胞, 以避免补体的激活, 改善微循环, 以抑制血栓形成, 可能是益生注射液抗 I/R 损伤的另一个作用机制。

由此可见, 大鼠心脏移植后, 会造成移植心的缺血再灌注损伤, 而益生注射液对大鼠移植心缺血再灌注损伤有保护作用。

参考文献:

[1] Ono K, Lindesey ES. Improved technique of heart transplantation in rats[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 1969, 57: 225.

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

[3] 孙海涛, 郭涛, 喻卓, 等. 缺血后处理对减小猪急性心肌梗死面积的作用[J]. 重庆医学, 2010, 39(5): 522.

[4] 陈诗奉, 江跃全, 朱冰. 氧化苦参碱减轻肺缺血再灌注损伤的实验研究[J]. 重庆医学, 2010, 39(4): 411.

[5] 夏穗生. 临床移植医学[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1999: 95.

[6] 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.

[7] 李幼生, 黎介寿, 李宁, 等. 丹参对低温保存小肠的保护作用[J]. 中华实验外科杂志, 1997, 14(3): 178.

[8] 杨华蓉. 中药注射液 A、B 抗移植慢性失功机制研究[D]. 成都: 华西医科大学研究生学位论文, 2000.

[9] 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]. 华西药杂志, 2000, 15(3): 185.

[10] 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.

[11] 李明, 严律南. 益生注射液抗大鼠离体心脏冷缺血损伤的实验研究[J]. 重庆医科大学学报, 2005, 30(6): 831.

[12] Dong J, Pratt JR, Smith RAG, et al. Strategies for targeting complement inhibitors in ischemia/reperfusion injury[J]. Mol Immu, 1999, 36: 957.

[13] Sriramarao P, Languino LR, Altieri DC. Fibrinogen mediates leukocyte-endothelium bridging in vivo at shear forces[J]. Blood, 1996, 97: 493.

[14] 李胜富, 蒋红梅, 李幼平, 等. 益生注射液对人内皮细胞缺氧再给氧损伤的拮抗机制研究[J]. 华西医科大学学报, 2002, 33(2): 215.

(收稿日期: 2010-05-28 修回日期: 2010-07-14)

(上接第 3196 页)

2006, 18(5): 941.

[6] 刘莉. 7 569 例妇女乳腺病普查结果分析[J]. 安徽医药, 2008, 12(8): 727.

[7] Jin Q, Esteva FJ. Cross-talk between the ErbB/HER family and the type I insulin-like growth factor receptor signaling pathway in breast cancer[J]. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2008, 13(4): 485.

[8] Fagan DH, Yee D. Crosstalk between IGF1R and estrogen receptor signaling in breast cancer[J]. JMammary Gland BiolNeoplasia, 2008, 13 (4): 423.

[9] 姜伟, 朱波, 崔亚洲. 乳腺间质成纤维细胞的生物学特征及其在乳腺癌诊断及鉴别诊断中的作用[J]. 山东医药, 2006, 46(2): 52.

[10] 崔亚洲, 孙靖中, 马榕, 等. 乳腺浸润性导管癌间质肌成纤维细胞的临床意义[J]. 中国现代普外科进展, 2003, 6(3): 153.

[11] Singer CF, Kubista E, Garmroudi F, et al. Local feedback mechanisms in human breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 2000, 63(2): 95.

[12] Sieuwerts AM, Klijn JG, Henzen-Logmand SC, et al. Aurokinase-type-plasminogen-activator (uPA) production by human breast (myo)fibroblast in vitro: influence of transforming growth factor-beta(1) [TGF beta(1)] compared with factors released by human epithelial-carcinoma cells[J]. Int Cancer, 1998, 76(6): 829.

[13] Valenti MT, Sartore SA, Zzarello G, et al. Human fibroblasts from normal and malignant breast tissue grown in vitro show a distinct senescence profile and telomerase activity[J]. Histochem J, 2002, 34(829): 403.

[14] Giani C, Campani D, Rasmussen A, et al. Insulin like growth factor II (IGF-II) immunohistochemistry in breast cancer: relationship with the most important morphological and biochemical prognostic parameters[J]. Int J Bio Immunol, 2002, 17(2): 90.

[15] 张涛, 陈晓晶. 138 例乳腺癌临床预后因素分析[J]. 重庆医学, 2007, 36(19): 1955.

(收稿日期: 2010-06-04 修回日期: 2010-07-08)