

[文章编号] 1007-3949(2002)10-02-0125-04

• 实验研究 •

云芝多糖防止缺血再灌注心肌早期损伤

罗义, 刘伊丽¹, 陈瑗², 查道刚¹, 黄晓波¹, 刘俭¹

(广州市第一人民医院心内科, 广东省广州市 510180;

第一军医大学 1. 南方医院心内科, 2. 自由基医学研究所, 广东省广州市 510515)

[关键词] 心肌缺血; 再灌注损伤; 抗氧化剂; 云芝多糖

[摘要] 为了探讨云芝多糖对心肌缺血再灌注损伤的预防作用, 制备犬心肌缺血再灌注损伤模型, 缺血再灌注组不用药物干预, 云芝多糖组手术前 2 天每天口服云芝多糖 150 mg/kg。在缺血再灌注过程不同时间点测定左心室舒张压、超声心功能和冠状静脉窦血浆丙二醛浓度, 心肌标本行透射电镜检查。结果发现, 缺血再灌注组再灌注前和再灌注早期左心室舒张压显著升高, 云芝多糖组仅再灌注前左心室舒张压升高。再灌注前两组缺血心肌节段收缩期增厚百分率显著下降, 并表现为矛盾运动; 再灌注期两组缺血心肌节段收缩期增厚百分率呈进行性改善, 至再灌注 120 min 两组均未恢复至结扎前水平, 且云芝多糖组显著高于相应时间点缺血再灌注组; 左心室射血分数的变化趋势与缺血心肌节段收缩期增厚百分率相似, 但恢复较快, 云芝多糖组于再灌注 90 min 即恢复至结扎前水平。缺血再灌注组再灌注期丙二醛浓度明显升高, 至再灌注 120 min 尚未恢复至结扎前水平, 而云芝多糖组再灌注早期丙二醛浓度升高, 但回降较快, 于再灌注 30 min 即恢复至结扎前水平。缺血再灌注组心肌组织水肿, 心肌细胞少部分肌丝断裂, 收缩带模糊, 线粒体轻度肿胀、脱颗粒, 胞质水肿; 云芝多糖组心肌组织除轻微水肿外, 未见其它明显结构改变。结果提示, 云芝多糖对缺血再灌注早期心肌有显著保护作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Prevention of Experimental Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury by Polysaccharide Krestin

LUO Yi, LIU Yi-Li, CHEN Yuan, CHA Dao-Gang, HUANG Xiao-Bo, and LIU Jian

(Department of Cardiology, Guangzhou First People's Hospital, Guangzhou 510180, China)

[MeSH] Myocardial Ischemia; Reperfusion Injury; Antioxidants; Proteoglycans

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the preventive effects of polysaccharide krestin (PSK) on myocardial ischemia-reperfusion (I/R) injury. **Methods** Eight mongrel dogs of male, anesthetized with sodium pentobarbital, underwent 60 min of left anterior descending coronary artery occlusion, followed by 120 min reperfusion (I/R group). Another six dogs (PSK group) were subjected to the same ischemia-reperfusion as I/R group, received PSK, which was administered orally, at a dose of 150 mg/kg once daily for two days before thoracotomy. Left ventricular function was evaluated by echocardiography using an echocardiogram and with measurement of left ventricular diastolic pressure (LVDP) by catheterization, and blood samples were taken from coronary venous sinus for the examination of malondialdehyde (MDA), at different time points. The ischemia-reperfusion myocardium was examined pathologically. **Results** LVDP markedly rose before and in early reperfusion in I/R group, but only prior to reperfusion in PSK group. The systolic thickening of ischemia-reperfusion myocardium region and left ventricular ejection fraction markedly declined during ischemia in both groups, but progressively improved with the time of reperfusion. In PSK group, the recovery of wall thickening was greater than in I/R group during reperfusion. Plasma MDA concentration during reperfusion in I/R group was higher than its baseline. In PSK group, MDA concentration rose only in early reperfusion, but recovered rapidly. In I/R group, myocardial cellular edema were present and, the fractures of a few myofilaments, the granule loss and swelling of mitochondrias were also seen. The ultrastructural abnormalities were much slighter in PSK group. **Conclusion** PSK could greatly alleviate the functional impairment and structural abnormalities of ischemia-reperfusion myocardium.

心肌缺血再灌注 (ischemia/reperfusion, I/R) 损伤

的具体发生机制尚未完全阐明, 氧自由基生成可能是其重要发病机制^[1,2], 目前尚没有预防心肌 I/R 损伤的有效药物。本研究在犬心肌 I/R 损伤模型中应用抗氧化剂云芝多糖 (polysaccharide krestin, PSK), 观察其对 I/R 早期心肌结构和功能的影响。

[收稿日期] 2001-11-08 [修回日期] 2002-02-25

[作者简介] 罗义, 男, 1963 年出生, 湖南湘潭市人, 副主任医师, 副教授, 医学博士, 硕士研究生导师, 主要研究方向为冠心病的基础和临床。刘伊丽, 女, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 中华医学会广东省心血管学会副主任委员, 主要研究方向为冠心病的基础和临床。陈瑗, 男, 教授, 博士研究生导师, 中国自由基生物学与医学专业委员会委员、广东省生物物理学会副理事长、自由基生物学专业委员会主任, 主要研究方向为自由基医学和动脉粥样硬化。

1 材料和方法

1.1 心肌缺血再灌注损伤模型建立

雄性杂种犬 18 只, 体重 15.4 ± 4.3 kg, 随机分为 I/R 组、PSK 组和假手术组, 以各组成功完成犬 6 只为目标。动物用戊巴比妥钠 (35 mg/kg) 静脉全麻后, 气管插管连接呼吸机。经右股动脉插入猪尾导管并经压力换能器连接多道生理记录仪监测主动脉压和左心室压。右股静脉插入扩张管后留置套鞘管用于静脉输液。经右颈外静脉插入冠状静脉窦取血导管至冠状静脉窦并留置。左侧第五肋间开胸, 充分暴露心前区, 打开心包壁层, 用丝线将心包边缘缝吊于胸壁, 切口缘形成心包吊床, 使心脏悬卧于心包床上。分离左冠状动脉前降支近段(回旋支分出点至第一对角支分出点之间), 留置一结扎线。将一放置有超声探头的水囊置于心脏表面。I/R 组前降支结扎 60 min, 再灌注 120 min; PSK 组 I/R 方案同 I/R 组, 但手术前 2 天每天口服 PSK (第一军医大学自由基医学研究所提供) 150 mg/kg; 假手术组不行冠状动脉结扎。全过程监测血流动力学和心电图。

1.2 超声心功能测定

使用 Acuson SEQUOIA 512 超声诊断仪, 探头频率为 3.5 MHz。探头用夹子固定并置于水囊内, 显示左心室乳头肌水平短轴切面图。探头的位置和角度在整个实验中不变。在前降支结扎前、再灌注前及再灌注 5 min、30 min、60 min、90 min 和 120 min, 常规记录左心室乳头肌水平短轴切面图像, 用超声诊断仪自带软件测定左心室舒张末和收缩末容积及缺血心肌节段室壁厚度, 进一步计算左心室射血分数 (left ventricular ejection fraction, LVEF) 和室壁节段收缩期增厚百分率 (segmental systolic thickening percentage, SSTP)。

1.3 静脉心肌声学造影

观测时点为前降支结扎前、结扎后即刻、再灌注前及再灌注后 5 min、30 min、60 min、90 min 和 120 min。具体方法参照文献[3]。

1.4 血浆丙二醛浓度测定

在上述时点从冠状静脉窦取血 5 mL, 立即离心分离血浆, -70 °C 保存。采用硫代巴比妥酸法测定血浆丙二醛浓度(试剂盒购自南京聚力生物医学工程研究所)。

1.5 心肌标本病理检查

实验完毕后, 将心脏取下, 冰盐水浸洗, 然后将心脏按短轴切面切成 5 mm 厚的心肌片, 部分心肌片立刻置 1% 氯化三苯四唑 (triphenyltetrazolium chloride, TTC) 中, 37 °C 染色 20 min。取一块心肌片再用冰盐水浸洗, 切取缺血再灌注区中央部分心肌标本 2 块, 每块大小 1 cm \times 1 cm \times 0.2 cm, 置 10% 中性甲醛缓冲液中固定, 用于 HE 染色检查。取一块心肌片再用冰盐水浸洗, 切取缺血再灌注区中央部分心肌标本 3 块, 每块大小 1 mm \times 1 mm \times 1 mm, 置 2.5% 戊二醛中固定, 用于透射电镜检查。

1.6 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 同组自身前后比较使用配对 t 检验, 组间比较使用方差分析。

2 结果

I/R 组和 PSK 组犬分别为 8 只和 6 只, I/R 组 2 只犬于再灌注 30 min 内死于心室颤动。前降支结扎过程中除室性早搏外, 未发生其它并发症。前降支结扎期心肌声学造影显示局部心肌无造影剂充填, 二维超声显像显示局部室壁显著变薄并出现明显运动障碍。结扎解除后, 原无造影剂充填区获得良好的造影剂充填, 再灌注期室壁厚度和运动虽有所改善, 但至再灌注 120 min 缺血心肌节段收缩运动仍明显较弱。心肌 TTC 染色未发现梗死心肌。

2.1 左心室舒张压变化

再灌注前和再灌注早期 I/R 组左心室舒张压 (left ventricular diastolic pressure, LVDP) 显著升高, 于再灌注 60 min 恢复至结扎前水平, PSK 组 LVDP 仅在再灌注前升高(表 1, Table1)。

表 1. 左心室舒张压的改变.

Table 1. Changes in left ventricular diastolic pressure ($n = 6$, mm Hg).

Groups	Before ligation	Before reperfusion	Reperfusion				
			5 min	30 min	60 min	90 min	120 min
I/R	14.7 ± 8.9	8.3 ± 6.9^b	10.0 ± 7.6^a	11.8 ± 7.2^a	12.8 ± 7.8	13.7 ± 7.9	13.7 ± 7.7
PSK	14.7 ± 7.6	13.2 ± 7.2^{bc}	14.2 ± 7.8^c	14.2 ± 7.5^c	14.3 ± 7.8^c	14.5 ± 8.1	14.5 ± 7.2
Sham	13.0 ± 6.8	12.8 ± 6.7	13.3 ± 7.1	13.3 ± 5.9	13.0 ± 6.8	12.3 ± 6.7	13.5 ± 6.9

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, compared with before ligation; c: $P < 0.05$, compared with I/R group.

2.2 超声心功能改变

表 2(Table 2) 显示, 再灌注前 I/R 组和 PSK 组 SSTP 显著下降, 并出现缺血区矛盾运动; 再灌注后心肌节段收缩功能呈进行性改善, 至再灌注 120 min 尚未恢复至结扎前水平。再灌注期 PSK 组 SSTP 显

著高于 I/R 组。

表 3(Table 3) 显示, LVEF 的变化趋势与 SSTP 相似, I/R 组 LVEF 再灌注 120 min 尚未恢复至结扎前水平, 而 PSK 组 LVEF 于再灌注 90 min 已恢复至结扎前水平。

表 2. 缺血再灌注心肌节段收缩期增厚百分率.

Table 2. Segmental systolic thickening percentage of ischemia reperfusion myocardium ($n = 6$, %).

I/R	Before ligation	Before reperfusion	Reperfusion				
			5 min	30 min	60 min	90 min	120 min
Control	37 ± 15	-16 ± 7 ^b	-6 ± 5 ^b	2 ± 5 ^a	9 ± 6 ^a	15 ± 7 ^a	17 ± 6 ^a
PSK	41 ± 14	-10 ± 7 ^b	10 ± 6 ^{bc}	21 ± 10 ^{ad}	29 ± 9 ^{ad}	33 ± 10 ^{ad}	38 ± 12 ^{ad}
Sham	42 ± 15	43 ± 17	42 ± 16	43 ± 15	41 ± 16	42 ± 16	41 ± 16

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, compared with before ligation; c: $P < 0.05$, d: $P < 0.01$, compared with I/R group.

表 3. 左心室射血分数改变.

Table 3. Changes in left ventricular ejection fraction ($n = 6$, %).

Groups	Before ligation	Before reperfusion	Reperfusion				
			5 min	30 min	60 min	90 min	120 min
I/R	62 ± 5	43 ± 4 ^b	51 ± 4 ^b	54 ± 4 ^b	55 ± 4 ^b	56 ± 6 ^b	57 ± 6 ^a
PSK	64 ± 7	44 ± 9 ^a	52 ± 8 ^a	56 ± 4 ^a	57 ± 4 ^a	59 ± 5	61 ± 5
Sham	60 ± 8	59 ± 8	61 ± 8	60 ± 8	61 ± 8	59 ± 9	59 ± 8

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, compared with before ligation.

2.3 冠状静脉窦血浆丙二醛浓度变化

表 4 (Table 4) 显示, I/R 组再灌注期冠状静脉窦血浆丙二醛浓度明显升高, 至再灌注 120 min 尚未恢复至结扎前水平。PSK 组再灌注早期血浆丙二醛

浓度升高, 但回降较快, 于再灌注 30 min 即恢复至与结扎前水平。再灌注期 PSK 组血浆丙二醛浓度低于 I/R 组。

表 4. 冠状静脉窦血浆丙二醛浓度.

Table 4. The coronary venous sinus plasma levels of malondialdehyde ($n = 6$, $\mu\text{mol/L}$).

Groups	Before ligation	Before reperfusion	Reperfusion				
			5 min	30 min	60 min	90 min	120 min
I/R	9.7 ± 3.1	10.6 ± 4.5	14.0 ± 3.3 ^b	15.3 ± 2.5 ^b	16.4 ± 3.8 ^b	15.4 ± 5.0 ^b	12.4 ± 2.9 ^b
PSK	9.1 ± 3.4	9.4 ± 3.0	9.8 ± 3.6 ^{ac}	9.4 ± 3.0 ^d	9.6 ± 3.2 ^d	9.6 ± 3.5 ^d	9.5 ± 3.3 ^c
Sham	9.9 ± 3.8	10.7 ± 4.5	10.6 ± 3.4	10.4 ± 4.2	9.7 ± 3.5	10.3 ± 3.9	10.0 ± 3.6

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, compared with before ligation; c: $P < 0.05$, d: $P < 0.01$, compared with I/R group.

2.4 缺血再灌注心肌结构改变

HE 染色显示, I/R 组心肌组织水肿, 微血管和心肌纤维结构未见明显异常; PSK 组心肌组织除轻微水肿外, 微血管和心肌纤维结构也未见明显异常。透射电镜观察发现, 假手术组心肌细胞结构完整, 超微结构保存良好(图 1A, Figure 1A); I/R 组心肌细胞部分肌丝断裂, 收缩带模糊, 线粒体肿胀、脱颗粒, 胞

质水肿(图 1B, Figure 1B); PSK 组心肌细胞结构完整, 超微结构保存良好, 肌丝及收缩带清晰, 线粒体结构无明显改变, 胞质轻微水肿(图 1C, Figure 1C)。

3 讨论

心肌机械功能障碍是心肌缺血再灌注损伤的具体表现形式之一^[2]。本组资料显示, 缺血再灌注组

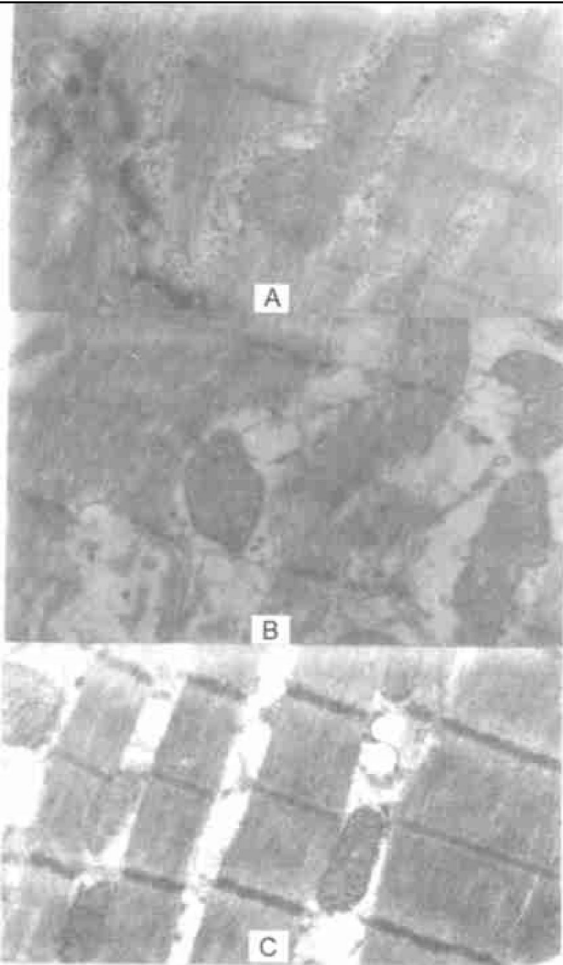


图 1. 缺血再灌注心肌细胞超微结构.

Figure 1. Ultrastructure of ischemia reperfusion myocardium ($\times 12K$). A: sham group; B: I/R group; C: PSK group.

在缺血期和再灌注早期心肌收缩功能明显受损, PSK 组在缺血期心肌收缩功能明显受损,但在再灌注期心肌收缩功能恢复较快。这些结果表明 PSK 明显改善缺血再灌注心肌节段收缩功能,并促进左心室整体功能的恢复。透射电镜观察发现,缺血再灌注组心肌细胞少部分肌丝断裂,收缩带模糊,线粒体轻度肿胀、脱颗粒,胞质水肿;PSK 组心肌的超微结构改变很轻微,表明 PSK 可明显减轻缺血再灌注心肌细胞损害。文献[4~7]报道,PSK 可致小鼠腹腔巨噬细胞硒谷胱甘肽过氧化物酶活性及基因表达增加,还可在转录水平增加锰超氧化物歧化酶的表达,从而显著提高细胞抗过氧化损伤的能力。在家兔实验性动脉粥样硬化模型中,PSK 能有效降低心、肝、颈总动脉脂质过氧化物含量^[8]。研究表明,PSK 能保护巨噬细胞免受由叔丁基脂氢过氧化物(tert-

butylhydroperoxide, tBOOH) 和氧化型低密度脂蛋白引起的脂质过氧化损伤^[9,10]。Zhou 等^[9]报道,将 PSK 与巨噬细胞一起作体外培养,未显示 PSK 对 tBOOH 引起的巨噬细胞损害有保护作用,但是,小鼠口服 PSK 或腹腔内注入 PSK,然后收集腹腔巨噬细胞作实验,发现 tBOOH 引起的腹腔巨噬细胞损害明显减轻,一氧化氮释放量和低密度脂蛋白的氧化发生变化^[11],而且小鼠血清也有同样的保护作用,提示 PSK 是通过调控体内某种物质的生成或活性来发挥细胞保护作用。PSK 还可能通过抑制细胞毒性物质过氧亚硝酸阴离子的形成而发挥细胞保护作用(另文报道)。本资料显示,缺血再灌注组再灌注期冠状静脉窦血浆丙二醛浓度明显升高,至再灌注 120 min 尚未恢复至结扎前水平;PSK 组仅再灌注 5 min 血浆丙二醛浓度轻度升高,总体上看无明显变化,这提示 PSK 可明显减轻缺血再灌注心肌的脂质过氧化损害。

本研究表明,PSK 可显著减轻缺血再灌注心肌的功能障碍和结构损害,可能为临床上预防心肌缺血再灌注损伤提供一种新的药物选择。

[参考文献]

- [1] Park JL, Lucchesi BR. Mechanisms of myocardial reperfusion injury. *Ann Thorac Surg*, 1999, **68**: 1905-912
- [2] Dhalla NS, Elmoselhi AB, Hata T, et al. Status of myocardial antioxidants in ischemic reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, 2000, **47**: 446-456
- [3] 罗义, 刘伊丽, 黄晓波, 等. 心肌声学造影评价实验性顿抑心肌的微血管功能改变. *中华超声影像学杂志*, 2000, **9**: 247-251
- [4] Zhou M, Chen Y, Liu SX, et al. Elevation of macrophage SeGSHPx gene expression and prevention of foam cell formation. In: Lester Pacher. *Proceedings of the international Symposium on Natural antioxidants: Molecular Mechanisms and Health Effects*. Maret G Traber. AOCS Press, Champaign, Illinois, USA, 1996: 339-351
- [5] 庞战军, 陈瑗, 周玫. 云芝多糖对小鼠腹腔巨噬细胞锰超氧化物歧化酶基因表达的调控. *中国动脉硬化杂志*, 1999, **7**: 106-109
- [6] Lou N, Zhou M, Chen Y. Inhibitory effect of polysaccharide Krestin on foam cell formation and necrosis of murine peritoneal macrophage caused by oxidized low density lipoprotein. *Med Sci Res*, 1996, **24**: 49-51
- [7] Chen Y, Zhou M, Li J, et al. Injurious effect of reactive oxygen species on macrophage and its prevention by PSK. *J Clin Lab Immunol*, 1994, **43**: 99-115
- [8] 欧阳谦, 刘翠华, 陈瑗, 等. 云芝多糖提高实验性动脉粥样硬化家兔抗氧化能力和减轻主动脉粥样硬化斑块. *第一军医大学学报*, 1998, **18**: 8-11
- [9] Zhou M, Chen Y, Ouyang Q, et al. The effect of tert-butyl hydroperoxide on peritoneal macrophages and the protective effect of protein-bound polysaccharide administered intraperitoneally and orally. *Am J Chin Med*, 1998, **26**: 301-310
- [10] 刘尚喜, 周玫, 陈瑗. 云芝多糖对叔丁基脂氢过氧化物所致腹腔巨噬细胞损伤的保护作用的特点. *第一军医大学学报*, 1998, **18**: 15-17
- [11] 王瑾雯, 陈瑗, 周玫, 等. 一氧化氮在低密度脂蛋白氧化中的双向作用. *中国动脉硬化杂志*, 2000, **8** (4): 292-294

(此文编辑 文玉珊)