

冠心舒通胶囊对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用

姚天明^{1,2}, 梁卓², 霍煜², 韩雅玲²

(1. 辽宁中医药大学, 辽宁省沈阳市 110016; 2. 沈阳军区总医院心血管内科, 辽宁省沈阳市 110016)

[关键词] 冠心舒通胶囊; 缺血再灌注损伤; 氧化应激; 一氧化氮

[摘要] **目的** 探讨冠心舒通胶囊对大鼠心肌缺血再灌注(I/R)后氧化应激损伤的保护作用。**方法** 30只雄性SD大鼠随机分为模型组(10只)、药物组(10只)和假手术组(10只),模型组和药物组大鼠通过心脏前降支结扎与松开的方法制备缺血再灌注损伤模型(心肌缺血30min,再灌注3h)。药物组大鼠在模型建立前5天开始每天给予冠心舒通胶囊,假手术组和模型组只给予同等剂量的生理盐水,各组大鼠在心肌缺血30min再灌注3h后,采血离心取上清检测血清中肌酸激酶同工酶(CK-MB)、乳酸脱氢酶(LDH)、肌钙蛋白(Tn-T)以及丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、总一氧化氮合酶(TNOS)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)和一氧化氮(NO)等氧化应激分子的水平。**结果** 与模型组相比,药物组大鼠的CK-MB、LDH、Tn-T、MDA及iNOS水平明显降低,SOD、TNOS和NO水平明显上升($P < 0.05$)。**结论** 冠心舒通胶囊可以保护心肌缺血再灌注损伤,可能与其对抗氧化应激损伤的作用有关。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Cardioprotective Effects of Guanxinshutong (GXST) Against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury in Rats

YAO Tian-Ming^{1,2}, LIANG Zhuo², HUO Yu², and HAN Ya-Ling²

(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine; 2. Department of Cardiology, Shenyang Military General Hospital, Shenyang, Liaoning 110016, China)

[KEY WORDS] Guanxinshutong Capsule; Ischemia/Reperfusion Injury; Oxidative Stress; Nitric Oxide

[ABSTRACT] **Aim** Exploration of the protective effects of Guanxinshutong (GXST) against Oxidative Stress (OS) injury following ischemia/reperfusion. **Methods** Thirty male Sprague Dawley rats were randomized into three groups: non-MI/R group (Sham, $n = 10$), MI/R group treated with vehicle (Model, $n = 10$) and MI/R group treated with GXST (Drug, $n = 10$). MI/R was induced by ligation of the left anterior descending coronary artery (LAD) for 30 min, followed by 3 h reperfusion in the model and Drug groups. In the Sham group, the LAD was exposed without occlusion. GXST powder (in the Drug group) or saline (in the Model and Sham groups) were administered via direct gastric gavage from 5 days prior to surgery. Blood samples were collected from the carotid artery after 3 h of reperfusion, to determine the levels of CK-MB, LDH, Tn-T, MDA, SOD, TNOS, iNOS and NO. **Results** GXST significantly decreased levels of CK-MB, LDH, Tn-T, MDA and iNOS; increased levels of SOD, TNOS and NO compared with the model group (all $P < 0.05$). **Conclusions** GXST is effective in protecting the myocardium against MI/R injury in rats. Its possible cardioprotective mechanism involves inhibition of the OS injury following MI/R.

冠心舒通胶囊由广枣、丹参、丁香、冰片、天竺黄等药材按一定比例组成,是在中医药及蒙医药理论相结合基础上研究开发而成,具有活血化瘀、通经活络、行气止痛的作用。其主要成分广枣、丹参等都具有多种药理作用,如改善实验动物外周微循

环、抑制炎症反应及抗氧化等作用。本实验通过建立大鼠的心肌缺血再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)损伤模型,检测实验动物血清中反应心肌损伤程度及氧化应激损伤等方面的分子水平,研究冠心舒通胶囊对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用,探

[收稿日期] 2011-09-06

[作者简介] 姚天明,主治医师,博士,研究方向为中医药治疗心血管病的基础研究,E-mail为 yaotianming2003@sina.com。梁卓,主治医师,硕士,研究方向为中医药治疗心血管病的基础研究,E-mail为 fmmulz@163.com。通讯作者韩雅玲,主任医师,教授,博士研究生导师,研究方向为心血管病介入治疗方面的研究,E-mail为 hanyaling@medmail.com。

讨其可能机制。

1 材料与方法

1.1 动物

健康 SD 雄性大鼠, 体重 220 ~ 240 g, 由沈阳军区总医院动物实验中心提供。

1.2 实验药物与试剂

冠心舒通胶囊, 由广枣、丹参、丁香、冰片、天竺黄等五味药组成, 陕西步长制药有限公司研制提供, 批号为 100519。肌酸激酶同工酶(CK-MB)、乳酸脱氢酶(LDH)、肌钙蛋白(Tn-T)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、总一氧化氮合酶(TNOS)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)和一氧化氮(NO)试剂盒由南京生物建成提供。

1.3 实验仪器

ALC-V8 动物呼吸机和 ALCB10 MPA 心功能监测系统(上海奥尔科特生物科技有限公司)。

1.4 动物分组及用药

取健康 SD 雄性大鼠 30 只, 随机分为 3 组, 分为: ①假手术组 10 只, 给予生理盐水灌胃, 每天两次, 灌服 5 天; ②模型组 10 只, 建立心肌 I/R 模型前, 给予生理盐水灌胃, 每天两次, 灌服 5 天; ③冠心舒通胶囊组 10 只(药物组), 建立心肌 I/R 模型前, 给予冠心舒通胶囊灌胃, 每次按 1.5 g/kg 取药, 溶于生理盐水, 每次 6 mL/kg 灌胃, 每天两次, 灌服 5 天。

1.5 大鼠心肌 I/R 模型制备

大鼠禁食 12 h, 自由饮水。术前记录大鼠 II 导联心电图, 剔除心电图异常者。30 g/L 戊巴比妥腹腔注射(1.5 mL/kg), 麻醉后固定。气管插管, 接小动物呼吸机, 呼吸频率为 50 ~ 60 次/分, 持续记录心电图。沿左锁骨中线纵行剪开胸部皮肤约 2 cm, 用止血钳纵行钳夹胸骨旁肌肉数次后剪开, 在大鼠胸骨左侧 2 ~ 3 肋间隙靠胸骨处(约平腋下)钝性分离一小口, 打开胸腔, 剪开心包, 完全暴露心脏, 见左心耳和肺动脉圆锥后, 用 5 号针线在左心耳下缘垂直入针, 于左心耳和肺动脉圆锥交界右侧出针后结扎左冠状动脉前降支, 心肌梗死模型制备成功的判断标准为心电图出现心肌梗死表现。每组大鼠在梗死 30 min 后, 松开结扎线, 再灌注 3h。假手术组大鼠手术全过程与其它组相同, 只穿线不结扎左前降支。

1.6 指标的检测

每组大鼠在缺血 30 min 再灌注 3 h 后, 心脏采血, 离心取上清(3 kr/min, 20 min), 分装后 -80℃ 冷藏待测。CK-MB、LDH、Tn-T 采用 ELASA 的方法

检测, MDA 采用硫代巴比妥酸盐法检测, SOD 采用黄嘌呤氧化酶法检测, TNOS、iNOS 采用化学比色法检测, NO 采用硝酸还原酶法检测。各种检测都严格按照试剂盒说明书进行。

1.7 统计学方法

各组数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较用 *t* 检验。应用 SPSS 软件进行统计分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

模型组大鼠 8 只建模成功; 药物组大鼠 7 只建模成功; 假手术组大鼠没有死亡发生。心电图 ST 段抬高作为结扎前降支成功判定标准(图 1)。

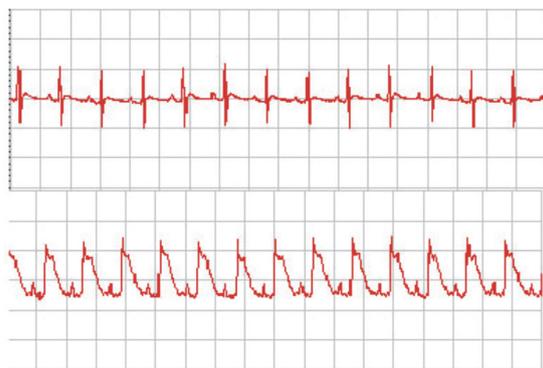


图 1. 前降支结扎前后心电图表现 上图为假手术组, 下同为模型组, 前降支结扎后 ST 段明显抬高证明结扎成功。

Figure 1. ECG before and after ligation of left anterior descending artery

2.2 冠心舒通胶囊对 I/R 大鼠血清心肌酶谱的影响

缺血 30 min 再灌注 3 h 后, 比较各组大鼠血清中 CK-MB、LDH、Tn-T 的活性和浓度, 发现模型组的心肌酶活性和浓度水平明显高于假手术组 ($P < 0.05$), 药物组心肌酶活性和浓度水平明显低于模型组 ($P < 0.05$; 表 1)。

表 1. 各组大鼠缺血 30 min 再灌注 3 h 后血清心肌酶谱活性和浓度的比较

Table 1. Comparison of serum myocardial enzyme activity and concentration (ischemia 30 min and reperfusion 180 min)

分组	CK-MB(U/L)	LDH(U/L)	Tn-T(ng/L)
假手术组(n=10)	5.52 ± 3.89	18.96 ± 3.96	135.72 ± 12.09
模型组(n=8)	42.55 ± 2.69 ^a	47.04 ± 3.18 ^a	333.24 ± 17.75 ^a
药物组(n=7)	33.20 ± 2.87 ^{ab}	39.59 ± 2.10 ^{ab}	230.52 ± 27.60 ^{ab}

a 为 $P < 0.05$, 与假手术组相比; b 为 $P < 0.05$, 与模型组相比。

2.3 冠心舒通胶囊对 I/R 大鼠血清 MDA 和 SOD 的影响

缺血 30min 再灌注 3h 后,比较各组大鼠血清 MDA 浓度和 SOD 活性,发现模型组的 MDA 水平明显高于假手术组,SOD 活性明显低于假手术组(P 均 < 0.05),药物组 MDA 水平明显低于模型组,SOD 活性明显高于模型组($P < 0.05$;表 2)。

表 2. 各组大鼠缺血 30 min 再灌注 3h 后血清 MDA 浓度和 SOD 活性的比较

Table 2. Comparison of serum SOD activity and MDA concentration (ischemia 30 min and reperfusion 180 min)

分 组	MDA($\mu\text{mol/L}$)	SOD(U/L)
假手术组($n=10$)	2.24 ± 0.56	249 ± 24
模型组($n=8$)	7.57 ± 2.85^a	183 ± 15^a
药物组($n=7$)	3.51 ± 0.58^{ab}	209 ± 15^{ab}

a 为 $P < 0.05$,与假手术组相比; b 为 $P < 0.05$,与模型组相比。

2.4 冠心舒通胶囊对 I/R 大鼠血清 TNOS、iNOS 活性和 NO 浓度的影响

缺血 30min 再灌注 3h 后,各组大鼠心脏采血离心取上清后,比较各组大鼠血清 TNOS、iNOS 活性和 NO 浓度,发现模型组的 iNOS 活性明显高于假手术组,TNOS 活性和 NO 浓度明显低于假手术组(P 均 < 0.05),药物组 iNOS 活性明显低于模型组,TNOS 活性和 NO 浓度明显高于模型组($P < 0.05$;表 3)。

表 3. 各组大鼠缺血 30 min 再灌注 3 h 后血清 TNOS、iNOS 活性和 NO 浓度的比较

Table 3. Comparison of serum TNOS、iNOS activity and NO concentration (ischemia 30 min and reperfusion 180 min)

分 组	TNOS(U/L)	iNOS(U/L)	NO($\mu\text{mol/L}$)
假手术组($n=10$)	15.92 ± 1.90	5.04 ± 0.72	54.37 ± 11.58
模型组($n=8$)	5.48 ± 1.04^a	11.20 ± 1.93^a	16.92 ± 3.96^a
药物组($n=7$)	8.04 ± 2.22^{ab}	7.07 ± 1.65^{ab}	31.26 ± 6.53^{ab}

a 为 $P < 0.05$,与假手术组相比; b 为 $P < 0.05$,与模型组相比。

3 讨 论

本实验首次探讨了冠心舒通胶囊对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用,其降低心肌损伤标志物即心肌酶谱的作用,可能与其抗氧化应激的作用有关。实验证实其可以有效降低缺血再灌注损伤后大鼠血清中 MDA 浓度和 iNOS 活性,提高 SOD、TNOS 活性和 NO 浓度。

冠心舒通胶囊的活血化瘀、通经活络、行气止痛作用,符合冠心病的病因病机,临床上用于冠心病心绞痛引起的胸痛、胸闷、心慌、气短等症,往往取得明显疗效。部分动物实验已经证实,预防性应用冠心舒通胶囊 7 天可以降低大鼠急性心肌梗死后 90 分钟观察期内的心电图 J 点抬高值,减小大鼠急性心肌梗死 6 h 后的梗死面积,降低其血清中乳酸脱氢酶、肌酸激酶、天门冬氨酸氨基转移酶的活性^[1]。部分临床试验也验证了冠心舒通胶囊预防和治疗冠心病心绞痛的显著疗效^[2]。冠心舒通胶囊是否对心肌缺血再灌注损伤具有保护作用及可能作用机理还没有进行相关动物实验研究。

缺血再灌注的过程中,由于氧化应激诱发的氧自由基可以引起包括蛋白质、DNA、脂质等多方面的损伤,从而引起细胞膜通透性的改变,导致细胞结构功能紊乱甚至凋亡^[3,4]。SOD 属于内源性抗氧化酶系统的之一,能够清除超氧阴离子自由基,保护细胞免受损伤,在机体氧化与抗氧化平衡中起着非常重要的作用,其活性反映机体对抗氧化应激损伤的能力,MDA 则是生物体内氧自由基作用于脂质发生过氧化反应的终产物,会引起蛋白质、核酸等生命大分子的交联聚合,且具有细胞毒性,其浓度则反映了机体受到氧化应激损伤的程度^[5,6]。本试验中发现冠心舒通胶囊可以提高模型大鼠血清中 SOD 活性,减少 MDA 的血清浓度,可能是因为它增强了实验动物抗氧化应激的能力,从而减轻了氧化应激导致的损伤程度。

NO 是在 NOS 作用下合成的内源性物质,在心肌缺血再灌注过程中具有双重作用。NO 既被公认为是内源性的心脏保护物质,又能通过脂质过氧化等途径引起细胞毒性反应和损伤^[7,8]。iNOS 是 NOS 中的一种,为诱生型 NOS,缺血再灌注损伤时,能在氧化应激、炎症等刺激下表达增多,其产生的 NO 能直接导致细胞损伤^[9,10]。本实验发现,心肌缺血再灌注损伤后,血清 TNOS 活性下降、NO 浓度下降,而 iNOS 活性上升。灌服冠心舒通胶囊后,可以降低 iNOS 活性,增强 TNOS 活性、提高 NO 浓度。其可能通过提高其他类型的 NOS 活性而发挥其产生的 NO 的保护作用,降低 iNOS 的活性而抑制其产生的 NO 的损伤作用。

综上所述,冠心舒通胶囊对心肌缺血再灌注损伤有一定的保护作用,可能与其抗氧化应激,抑制 iNOS 活性、促进保护性 NO 生成有关。

(下转第 260 页)