

龙血竭总黄酮对心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌细胞的保护作用研究

梁丽梅, 冯湘玲, 刘 燕, 程初勇, 黄照河

基金项目: 广西自然科学基金项目(编号:2010GXNSFA013269); 广西中医药管理局科研项目(编号:GZZC14-63)

作者单位: 410008 长沙, 中南大学湘雅公共卫生学院[梁丽梅(现工作于右江民族医学院检验学院), 冯湘玲]; 533000 广西, 右江民族医学院附属医院心血管内科(刘 燕, 程初勇, 黄照河)

作者简介: 梁丽梅(1975-), 女, 在读硕士研究生, 副主任技师, 研究方向: 肿瘤发病和化学预防。E-mail: 372549367@163.com

通讯作者: 冯湘玲(1975-), 女, 医学博士, 副研究员, 研究方向: 鼻咽癌的遗传分子生物学机制。E-mail: fengxl2011@csu.edu.cn

[摘要] **目的** 探讨龙血竭总黄酮对心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌细胞的保护作用。**方法** 将 40 只 SD 大鼠随机分为 5 组, 空白对照组(Control 组)、假手术组(Sham 组)、心肌缺血再灌注损伤组(MIRI 组)、假手术 + SDF 组(SDF 组)、MIRI + SDF 组(MIRI&SDF 组), 每组 8 只。采用结扎左冠状动脉前降支 30 min 再灌注 2 h 的方法建立大鼠 MIRI 模型, 于术前 1 周开始灌药。采用比色法测定血清肌酸激酶(CK)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)和乳酸脱氢酶(LDH)水平, 采用 TTC 染色评估心肌坏死面积, 用 TUNEL 法检测心肌细胞凋亡率。**结果** 与 Control、Sham 和 SDF 组比较, MIRI 组、MIRI&SDF 组的 CK、LDH、CK-MB 的水平均明显升高($P < 0.05$)。与 MIRI 组比较, MIRI&SDF 组的 CK、LDH、CK-MB 的水平明显下降($P < 0.05$)。MIRI&SDF 组心肌梗死面积和心肌细胞的凋亡率明显小于 MIRI 组($P < 0.05$)。**结论** 龙血竭总黄酮对 MIRI 大鼠心肌细胞具有较好的保护作用。

[关键词] 龙血竭总黄酮; 心肌缺血再灌注损伤; 细胞凋亡

[中图分类号] R 542.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2017)09-0857-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2017.09.08

Study on protective effect of Sanguis Draconis flavones on myocardial cells in rats with myocardial ischemia-reperfusion injury LIANG Li-mei, FENG Xiang-ling, LIU Yan, et al. Xiangya School of Public Health, Central South University, Changsha 410008, China

[Abstract] **Objective** To investigate the protective effect of Sanguis Draconis flavones(SDF) on myocardial cells in rats with myocardial ischemia-reperfusion injury(MIRI). **Methods** 40 SD rats were randomly divided into five groups: control group, sham group, MIRI group, sham + SDF group and MIRI + SDF group, with 8 cases in each group. The MIRI model was established by ligating left anterior descending coronary artery for 30 minutes and reper-fusing for 2 hours. The drugs were administered one week before operation. The levels of serum creatine kinase(CK), creatine kinase isoenzyme MB(CK-MB) and lactic dehydrogenase(LDH) were measured by colorimetric assay. The area of myocardial necrosis was assessed by triphenyltetrazolium chloride(TTC) staining, and the apoptosis rate of cardiomyocytes was detected by terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling(TUNEL). **Results** Compared with those in the control group, sham group and the sham + SDF group, the levels of CK, LDH and CK-MB in the MIRI group and the MIRI + SDF group were significantly higher($P < 0.05$), while compared with those in the MIRI group, the levels of CK, LDH and CK-MB in the MIRI + SDF group were significantly lower($P < 0.05$). The area of myocardial infarction in the MIRI + SDF group was significantly smaller than that in the MIRI group($P < 0.05$), and the apoptotic rate of myocardial cells in the MIRI + SDF group was significantly smaller than that in the MIRI group($P < 0.05$). **Conclusion** Sanguis Draconis flavones can effectively protect the myocardial cells of rats with myocardial ischemia-reperfusion injury.

[Key words] Sanguis Draconis flavones(SDF); Myocardial ischemia-reperfusion injury(MIRI); Cell apoptosis

心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia-reperfusion injury, MIRI)是指急性心肌梗死患者在开通梗死相关血管恢复心肌血流再灌注后梗死区域的心肌组织结构反而受到严重破坏,导致大量心肌细胞梗死,严重影响心功能及预后。MIRI 的概念首先由 Jennings^[1]于 1960 年提出,但目前其发病机制仍未完全阐明。MIRI 是急性心肌梗死治疗过程中不可忽视的重要问题,是急性心肌梗死再灌注治疗时代不能实现心肌“有效再灌注”的主要原因和障碍,是当今国内外学者防治急性心肌梗死研究的热点问题。本研究主要探讨龙血竭总黄酮(Sanguis Draconis flavones, SDF)对 MIRI 大鼠心肌细胞的保护作用。

1 材料与方法

1.1 动物 从广西医科大学实验动物中心购买清洁级 SD 大鼠 40 只,6 周龄,雌雄各一半,体重为 180 ~ 220 g。将纳入研究的 SD 大鼠随机分为 5 组:空白对照组(Control 组)、假手术组(Sham 组)、MIRI 组、假手术 + SDF 组(SDF 组)、MIRI + SDF 组(MIRI&SDF 组),并分别放入 5 个笼子进行饲养,动物可自由饮水摄食。实验室饲养温度为(22 ± 2)℃,湿度为 55% ~ 70%。实验前动物禁食 12 h,不禁水。于术前 1 周开始按 180 mg/(kg · d)给 SDF 组和 MIRI&SDF 组大鼠灌喂 SDF。其他三组大鼠正常饲养,不喂任何药物。

1.2 试剂和设备 SDF 由广西中医药科学研究所采购,用正常的生理盐水对 SDF 悬浮液进行处理,其浓度为 3.5 mg/ml,供实验使用。原位细胞凋亡(TUNEL)成套设备是从罗氏公司购买。肌酸激酶同工酶(CK-MB)等心肌酶试剂盒由德赛诊断系统上海有限公司提供。ECG-6511 心电图机(上海光电医用电子仪器有限公司)。V-100 小型动物呼吸机(上海玉研科学仪器有限公司)。Xiang Yi L-530 离心机由湖南湘仪离心机仪器有限公司提供。

1.3 大鼠 MIRI 模型建立 参考文献^[2]采用冠状动脉结扎手术造模,手术前 12 h 禁食不禁水,麻醉后仰位固定,四肢连接 ECG-6511 心电图机。颈部做气管插管,连接 V-100 小型动物呼吸机(潮气量 20 ml/kg,呼吸频率 60 次/min)。于胸骨左旁第 3、4 肋间开胸,细心撑开肋骨,使心脏暴露出来,用带线缝合针沿左心耳下缘冠状动脉前降支起始部约 4 mm 处穿过,进针深度控制在约 1 mm,置一段直径 1.5 mm 的乳胶管于缝合线下,结扎缝合线以造成心肌缺血。缺血 30 min 后观察到心电图 T 波高耸或 ST 段明显抬高后,松开缝合线再灌注 2 h(观察到高耸的 T 波下降或已抬高的 ST 段下降 1/2 以上即标志 MIRI 造

模成功)。Sham 组和 SDF 组只穿线但不结扎前降支动脉,而 Control 组只开胸不穿线。

1.4 心肌酶检测 再灌注结束后,各组大鼠经腹主动脉采血 0.5 ml,并以 2 500 r/min 速度离心 10 min,离心后提取血清,用 7600 全自动生化分析仪分别测定血清肌酸激酶(CK)、CK-MB、乳酸脱氢酶(LDH)含量。

1.5 梗死面积评价 所有研究大鼠均处死后取左心室相同区域心肌保存备检测用。取出储存在 4℃冰箱里的心肌组织样品,用切片机将其中一份取出并切成 1.5 mm 的切片。根据试剂供应商提供的操作说明,在暗室里使用 1% 的 TTC 溶液进行染色,血液供应良好的心肌组织被 TTC 溶液染成红色,而梗死区心肌组织的染色相对较浅。20 min 后,将切片表面的液体吸干,用图像处理软件拍摄照片后分析梗死面积的大小。

1.6 心肌细胞凋亡 TUNEL 法检测 将大鼠心肌组织进行冷冻切片。根据 TUNEL KIT 的操作说明,TUNEL 的反应溶液在暗室中混合产生了 1 h 的反应。经过 3 min 的染色后,用苏木精进行组织学切片的反染色。在 400 倍放大率的高功率场下,从每片区域选取 10 个不同的区域进行分析,并测量每单位面积上的 TUNEL 阳性单元数(567 像素 × 567 像素,72 dpi 为单位面积),然后计算平均值。细胞凋亡率以凋亡心肌细胞的数量与该场中心肌细胞总数的比值来表示。

1.7 统计学方法 应用 SPSS19.0 统计软件进行数据处理,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析,有总的差异后进行组间两两比较采用 *q* 检验,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

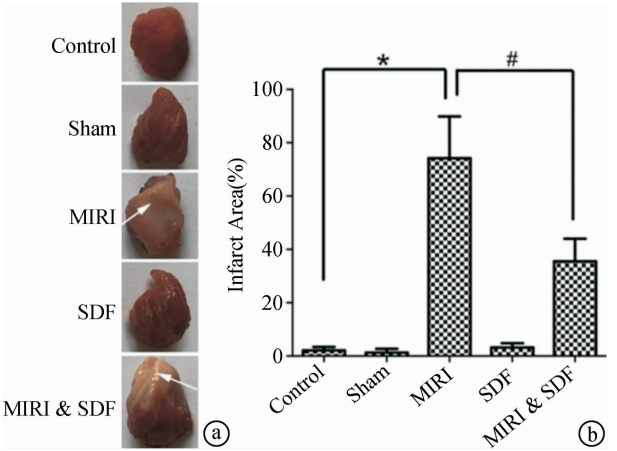
2.1 各组心肌酶变化情况比较 Control、Sham 和 SDF 三组的心肌酶各项指标比基本一样(*P* > 0.05),与 Control、Sham 和 SDF 组比,MIRI 组和 MIRI&SDF 组的 CK、CK-MB、LDH 水平明显升高(*P* < 0.05),而与 MIRI 组比较,MIRI&SDF 组的 CK、CK-MB、LDH 水平明显下降,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。说明 SDF 对未发生 MIRI 的心肌没有特殊影响,而对发生 MIRI 的心肌细胞具有一定的保护作用。见表 1。

表 1 五组 CK、CK-MB、LDH 水平变化情况[($\bar{x} \pm s$), U/L]

组 别	动物数	CK	CK-MB	LDH
Control 组	8	363.13 ± 67.25	213.42 ± 46.51	742.86 ± 96.51
Sham 组	8	382.52 ± 73.64	235.17 ± 48.86	765.13 ± 95.78
SDF 组	8	379.23 ± 71.73	224.69 ± 47.06	769.79 ± 97.48
MIRI 组	8	771.12 ± 98.15 [△]	465.45 ± 65.32 [△]	1648.26 ± 98.76 [△]
MIRI&SDF 组	8	680.15 ± 91.38 ^{△*}	415.32 ± 53.67 ^{△*}	917.66 ± 95.14 ^{△*}
<i>F</i>	—	2.840	5.940	2.920
<i>P</i>	—	0.039	0.010	0.035

注:与 Control、Sham、SDF 组比较, [△]*P* < 0.05;与 MIRI 组比较, **P* < 0.05

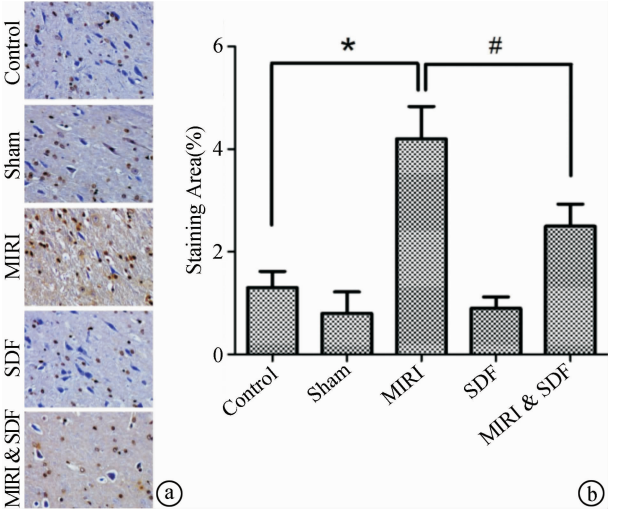
2.2 心肌坏死区域评价结果 Control、Sham 和 SDF 三组中未发现有心肌细胞缺血,三组心肌组织特点相似,而 MIRI 组心肌细胞坏死明显。然而,在 SDF 预处理后的大鼠接受 MIRI 手术后,其心肌梗死面积比接受简单 MIRI 手术的大鼠小。实验结果表明,SDF 可以降低 MIRI 大鼠的心肌梗死面积。见图 1。



①在 5 组大鼠梗死灶大小的图像中,箭头表示 TTC 染色阴性的梗死大小;②梗死面积的百分比。与 Control 组比较,* $P < 0.05$;与 MIRI 组相比,# $P < 0.05$

图 1 SDF 预处理后接受 MIRI 手术的大鼠心肌缺血耐受图

2.3 MIRI 大鼠心肌细胞凋亡情况 我们用 TUNEL 方法检测到 MIRI 大鼠的心肌细胞凋亡情况。Control、Sham 和 SDF 组三组中未见有明显的细胞凋亡,而 MIRI 组其心肌组织和细胞凋亡率明显高于 Control、Sham 和 SDF 组。然而,在 SDF 预处理后,接受 MIRI 手术的大鼠心肌组织和细胞的凋亡率明显低于 MIRI 组。结果表明,SDF 可降低 MIRI 大鼠心肌细胞凋亡率。见图 2。



①在 5 组大鼠心肌组织的 TUNEL 染色图像中,蓝色颗粒为 karyons,褐黑区为凋亡细胞;②细胞凋亡率的百分比。与 Control 组比较,* $P < 0.05$;与 MIRI 组相比,# $P < 0.05$

图 2 SDF 预处理后接受 MIRI 手术的大鼠心肌组织和细胞凋亡图

3 讨论

3.1 MIRI 是临床实践中经常出现的一个严重问题。早期的临床观察发现,在急性心肌梗死发生后 1.5~2 h 内,如果心脏恢复心肌血液供应,就不会发生再灌注损伤^[3,4]。然而,在急性心肌梗死发生 2~4 h 后血液供应的恢复会导致相对明显的再灌注损伤,急性心肌梗死 6 h 后恢复对缺血心肌血液供应的重要意义明显减少,但也可能导致梗死加重、心肌出血和心肌破裂等并发症^[5~7]。但目前 MIRI 的发生机制仍不明确,有学者研究认为氧化应激是导致 MIRI 的主要病理机制之一^[8]。在组织和细胞缺血和缺氧的情况下,氧自由基(OFR)清除系统的功能减退或功能丧失。由于系统活动的增强,在组织血液供应和氧气供应的恢复情况下,OFR 将大量产生,导致急性累积,并随后对心肌造成损害^[9]。MIRI 的预防和治疗的基本原则是,在有效的缺血时间内为缺血心肌组织提供血液再灌注,以降低心肌组织对氧和营养物质的消耗,细胞保护剂或其他保护措施应在长期缺血的心肌组织的再灌注前或之后采用,以缓解或防止再灌注损伤的发生^[10,11]。然而,目前还没有有效预防和治疗 MIRI 的特效药,中药可能是防治 MIRI 的措施之一。

3.2 我们的早期研究发现^[12],龙血竭(Sanguis Draxonis,SD)对急性心肌梗死家兔的心功能起到很好的保护作用,其可能机制是通过保护 MIRI 发挥保护作用。SD 是广西传统名贵中药,从百合科植物剑叶龙血树分泌树脂中提取得到,SD 的确认成分主要有黄酮类、有机酸、皂素、酚类、酯类、挥发油等^[13]。它具有活血化瘀、增加冠状动脉血流、抑制血小板聚集、止血、抗氧化、抗硬化、促进组织创面愈合再生等作用^[14],而 SDF 是它的主要成分之一。本研究发现,当发生 MIRI 时心肌酶谱中 CK、CK-MB、LDH 水平明显升高,予 SDF 预处理后,MIRI 大鼠的 CK、CK-MB、LDH 水平明显下降(P 均 < 0.05),而 SDF 对未发生 MIRI 大鼠的 CK、CK-MB、LDH 水平没有任何影响。众所周知,CK、CK-MB 和 LDH 是心肌细胞坏死的标记物,当发生 MIRI 时其释放入血的多少被认为与心肌坏死程度呈正相关,是反映 MIRI 损伤程度的重要诊断标准之一。本研究结果表明,SDF 能降低 MIRI 大鼠的 CK、CK-MB、LDH 水平,对 MIRI 大鼠心肌细胞起明显的保护作用。本研究还发现,SDF 预处理后能明显减少 MIRI 大鼠心肌坏死面积,明显降低 MIRI 大鼠心肌细胞凋亡率(P 均 < 0.05),充分说明 SDF 对 MIRI 大鼠心肌细胞具有很好的保护

作用,但具体机制尚未清楚,可能与清除 OFR、抗氧化或激活某一信号通路发挥其作用有关。

综上所述,我们认为 SDF 对 MIRI 大鼠心肌细胞具有很好的保护作用,对未发生 MIRI 的心肌细胞没有任何影响,但其机制尚未明确,有待进一步深入研究。本研究结果对中药防治 MIRI 提供新的理论依据和新的思路。

参考文献

1 Jennings RB,Sommers HM,Smyth GA,et al. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog[J]. Arch Pathol,1960,70:68-78.

2 春玉虎,党宏伟,闫业军. 番茄红素对大鼠心脏缺血再灌注的保护作用及其机制研究[J]. 现代药物与临床,2014,29(9):974-979.

3 Boag SE, Andreano E, Spyridopoulos I. Lymphocyte Communication in Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury[J]. Antioxid Redox Signal, 2017, 26(12):660-675.

4 Agrawal V, Gupta JK, Qureshi SS, et al. Role of cardiac renin angiotensin system in ischemia reperfusion injury and preconditioning of heart[J]. Indian Heart J, 2016, 68(6):856-861.

5 Lesnfsky EJ, Chen Q, Tandler B, et al. Mitochondrial Dysfunction and Myocardial Ischemia-Reperfusion: Implications for Novel Therapies[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2017, 57:535-565.

6 Wang BF, Yoshioka J. The Emerging Role of Thioredoxin-Interacting

Protein in Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury[J]. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2017,22(3):219-229.

7 Mailloux RJ. Application of Mitochondria-Targeted Pharmaceuticals for the Treatment of Heart Disease[J]. Curr Pharm Des, 2016,22(31):4763-4779.

8 Morano M, Angotti C, Tullio F, et al. Myocardial ischemia/reperfusion upregulates the transcription of the Neuregulin1 receptor ErbB3, but only postconditioning preserves protein translation: Role in oxidative stress[J]. Int J Cardiol, 2017,233:73-79.

9 Jin JK,Blackwood EA,Azizi K,et al. ATF6 Decreases Myocardial Ischemia/Reperfusion Damage and Links ER Stress and Oxidative Stress Signaling Pathways in the Heart[J]. Circ Res,2017,120(5):862-875.

10 McDougal AD,Dewey CF Jr. Modeling Oxygen Requirements in Ischemic Cardiomyocytes[J]. J Biol Chem,2017,292(28):11760-11776.

11 Wu SZ,Tao LY,Wang JN,et al. Amifostine Pretreatment Attenuates Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury by Inhibiting Apoptosis and Oxidative Stress[J]. Oxid Med Cell Longev, 2017,2017:4130824.

12 程初勇,梁丽梅,刘 燕,等. 龙血竭对急性心肌梗死家兔左心功能的保护研究[J]. 右江医学,2017,45(1):15-19.

13 Su XQ, Song YL, Zhang J, et al. Dihydrochalcones and homoisoflavones from the red resin of *Dracaena cochinchinensis* (Chinese dragon's blood) [J]. Fitoterapia, 2014,99:64-71.

14 Hao Q,Saito Y,Matsuo Y,et al. Three new flavans in dragon's blood from *Daemonorops draco*[J]. Nat Prod Res,2015,29(15):1419-1425.

[收稿日期 2017-08-24][本文编辑 杨光和]

博硕论坛·论著

腹腔镜下复发肝癌切除术的临床效果观察

谢 勇, 马晓飞, 刘晓平, 黄志峰, 欧 希, 刘吉奎

作者单位: 518032 广东,北京大学深圳医院肝胆胰外科

作者简介: 谢 勇(1973-),男,医学硕士,副主任医师,研究方向:肝脏肿瘤及肝内外胆管结石的诊治。E-mail:adzhoux@sina.com

〔摘要〕 目的 观察腹腔镜下复发肝癌切除术的临床疗效。方法 选取该院 2012-04~2015-10 收治的 34 例复发肝癌患者为研究对象,按手术方式不同分为腹腔镜组和开腹组,每组 17 例。腹腔镜组采用腹腔镜下肝切除术,开腹组采用开放式肝切除术,比较两组的术中、术后情况以及术后 1 年复发率。结果 腹腔镜组的手术时间、术中出血量、手术切口长度、术后下床时间、术后疼痛指数分别为(93.28±46.45)min、(122.68±52.74)ml、(6.34±1.82)cm、(3.44±1.26)d、(4.52±2.39)分低于或少于开腹组的(126.43±39.13)min、(237.81±76.39)ml、(21.43±2.25)cm、(8.25±2.37)d、(6.71±1.85)分($P<0.05$)。结论 腹腔镜下复发肝癌切除术具有创伤小、出血量少、术后恢复快等优点,可以作为复发肝癌的首选治疗方式。

〔关键词〕 肝细胞癌; 复发; 腹腔镜; 肝切除术

〔中图分类号〕 R735 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1674-3806(2017)09-0860-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2017.09.09