

【基础研究】

心肌缺血再灌注损伤 (myocardial ischemia-reperfusion injury, MIRI) 是指心肌缺血后血管复通, 血流恢复, 原本缺血所致的心肌细胞可逆损伤转变为不可逆损伤, 心肌损伤加重, 心功能进一步降低的

病理过程^[1]。药物预处理是研究 MIRI 损伤保护机制的常用手段,黄芪中所含的黄芪多糖、黄芪皂苷和黄芪黄酮等有效成分具有强心、抗氧化和提高机体免疫功能的药理学作用^[2]。因此,本研究选择黄芪注射液作为预处理药物,探讨黄芪注射液对急性 MIRI 的保护作用。

1 材料与方法

1.1 动物及分组 30 只 3 个月龄雄性健康 Sprague Dawley 大鼠,体质量(220 ± 23) g,购自郑州大学实验动物中心(动物许可证号:SCXK 豫-2013-0002)。大鼠分笼饲养,普通饮食,自然光照,适应性饲养后随机分为缺血再灌注(ischemia-reperfusion, I/R)组、黄芪组和对照组,每组 10 只。

1.2 主要仪器及试剂 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱(日本 Sanyo 公司),聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)仪(美国 Pekin-Elmer 公司),低温高速离心机、H-7500 高性能日立电子透射电镜(日本 Hitachi 公司),BL-420 生物信号采集处理系统(成都泰盟软件有限公司),Alpha 凝胶成像系统(美国 ProteinSimple 公司)。黄芪注射液(每支 10 mg/10 mL,国药准字 Z13020999,石家庄神威药业有限公司), $100\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 水合氯醛(上海芸强化工有限公司),胰蛋白酶、Trizol 总 RNA 提取试剂(美国 Gibco 公司),氯仿、异丙醇、无水乙醇(天津市天大化学试剂厂),PCR 试剂盒、焦碳酸二乙酯(美国 Invitrogen 公司)。

1.3 方法

1.3.1 动物造模前处理 黄芪组大鼠于手术前 6 d 开始腹腔注射黄芪注射液 $40\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,每日 1 次,共 6 d;I/R 组和对照组大鼠手术前 6 d 开始腹腔注射等量生理盐水。

1.3.2 动物模型建立 黄芪组和 I/R 组大鼠在腹腔注射开始第 7 天进行急性 MIRI 模型制备,方法如下:大鼠禁食、水 16 h, $100\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 水合氯醛 $10\text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔注射麻醉,仰卧位固定于实验台上,连接小动物呼吸机,实验中注意观察大鼠一般情况和口唇颜色。使用 BL-420 生物信号采集处理系统记录大鼠 II 导联心电图。手术局部备皮消毒后纵向切开皮肤,分离肌层,在第 3、4 肋间打开胸腔,暴露心脏,寻找左冠状动脉前降支,在左心耳下缘 2 mm 处穿 1 根手术线。观察结扎处心肌的颜色和 II 导联心电图,结扎后局部心肌苍白或颜色变暗,提

示结扎血管的血流阻断,心肌缺血,II 导联心电图 ST 段高抬,进一步证实心肌缺血。血管结扎心肌缺血持续 45 min 后抽出结扎线,恢复心肌血液灌注,心肌颜色变红、心电图 ST 段下降超过 1/3,提示缺血心肌血流灌注恢复。轻柔压迫胸腔使气体排出,避免胸腔压力升高对心功能的影响,干扰实验结果。逐层缝合肋骨、肌肉和皮肤,关胸。再灌注 180 min,采用过量麻醉法处死动物^[3]。对照组大鼠在左冠状动脉前室间支穿线但不结扎,不造成心肌缺血,其余实验操作同黄芪组和 I/R 组大鼠。记录并保留各组大鼠的心电图。待处死动物后,迅速取出心脏,去除包膜,取 I/R 处心肌,均分 2 份,1 份用于透射电镜观察心肌细胞的超微结构,另 1 份用于检测心肌 $\text{Na}^{+}-\text{K}^{+}$ -三磷酸腺苷(adenosine triphosphatase, ATP)酶 $\alpha 1$ 亚基的 mRNA 水平。

1.3.3 透射电镜观察心肌细胞的超微结构 心肌组织使用体积分数 25% 戊二醛固定后, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下用同系列缓冲液漂洗,再用 $10\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 四氧化锇在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下固定 3 h,随后在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下依次浸入体积分数 50%、70%、90% 乙醇各 10 min,再依次浸入体积分数 90% 乙醇 + 体积分数 90% 丙酮混合液 10 min,体积分数 90% 丙酮 10 min,体积分数 100% 丙酮 15 min 脱水。脱水完成后用玻璃刀切成超薄片,再用柠檬酸铅和醋酸铀进行双重染色后,即可进行透射电子显微镜观察、拍摄照片和图像分析。

1.3.4 心肌 $\text{Na}^{+}-\text{K}^{+}$ -ATP 酶 $\alpha 1$ 亚基的 mRNA 表达检测 取 0.1 g 心肌组织提取总 RNA,提取的 RNA 经核酸蛋白分析仪测 A_{260}/A_{280} 比值在 1.83 ~ 1.95,符合 RNA 样本纯度要求,进行进一步实验。总 RNA 反转录合成 cDNA 后进行 PCR,反应产物经凝胶电泳后使用图像处理分析系统对产物条带行灰度扫描,内参照为磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)。反应条件如下:(1)引物序列和目的片段长度:内参引物 GAPDH 长度 487 bp,正向引物为 5'-ACCCCAAC-CCTTGGCATGAC-3',反向引物为 5'-TCCAACGTC-CAGTTGCTTCA-3'; $\text{Na}^{+}-\text{K}^{+}$ -ATP 酶 $\alpha 1$,长度 297 bp,正向引物为 5'-AGGGACGCCTTTCAGAATGCCT-3',反向引物为 5'-TAACGATGATGACCTTAATGGA-3'。(2)反应体系: $10 \times$ 磷酸盐缓冲液 $5\text{ }\mu\text{L}$, MgCl_2 ($25\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) $3\text{ }\mu\text{L}$,脱氧核苷酸($10\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) $1\text{ }\mu\text{L}$,上游引物(50 pmol) $1\text{ }\mu\text{L}$,下游引物(50 pmol)

1 μL , cDNA 模板 2 μL , TaqDNA 聚合酶 ($5 \times 10^6 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.5 μL , 灭菌去离子水加至 50 μL 。(3)反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 、50 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min,共 30 个循环。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 17.0 软件进行统计学处理,计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用独立样本 t 检验,计数资料比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠心电图变化 结果见表 1。结扎前各组大鼠心电图均呈窦性心律、ST 段正常。结扎 30 min 时,I/R 组和黄芪组大鼠心电图 ST 段上抬,T 波高尖,提示急性心肌缺血,但 2 组大鼠 ST 值差异无统计学意义($t = 3.054, P > 0.05$);再灌注 120 min 时,2 组大鼠心电图上抬的 ST 段均回落,但黄芪组大鼠 ST 值小于 I/R 组($t = 14.162, P < 0.01$);再灌注 180 min 时,2 组大鼠上抬的 ST 段均再次上抬,且

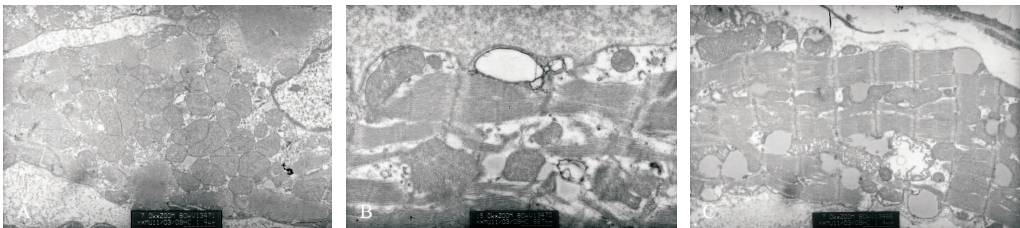
ST 值高于结扎 30 min 时,黄芪组大鼠 ST 值小于 I/R 组($t = 10.265, P < 0.01$);对照组大鼠心电图在 4 个时间点均正常。

表 1 3 组大鼠心电图 ST 值比较
Tab.1 Comparison of ST value of electrocardiogram of rats among the three groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ST 值/mV			
		结扎前	结扎 30 min	再灌注 120 min	再灌注 180 min
对照组	10	0.51 \pm 0.17	0.53 \pm 0.16	0.53 \pm 0.17	0.52 \pm 0.18
I/R 组	10	0.50 \pm 0.21	3.47 \pm 0.51 ^a	3.27 \pm 0.49 ^a	4.26 \pm 0.48 ^a
黄芪组	10	0.51 \pm 0.25	3.56 \pm 0.33 ^a	2.18 \pm 0.42 ^{ab}	3.62 \pm 0.55 ^{ab}

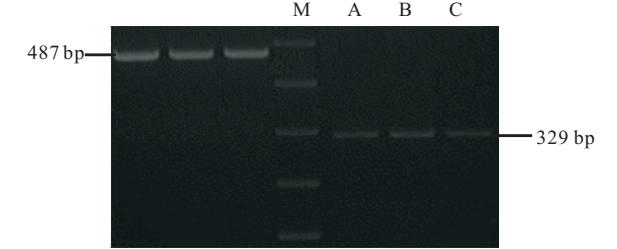
注:与对照组比较^a $P < 0.01$;与 I/R 组比较^b $P < 0.05$ 。

2.2 各组大鼠心肌细胞超微结构 结果见图 1。对照组大鼠心肌超微结构完好,心肌细胞及线粒体结构正常,线粒体丰富,糖原颗粒丰富;I/R 组大鼠心肌细胞肿胀,线粒体膜破裂,嵴断裂或消失,空泡变,糖原颗粒明显减少;黄芪组大鼠心肌细胞肿胀,线粒体膜尚完整,嵴肿胀部分不完整,糖原颗粒较多。



A: 黄芪组;B: I/R 组;C: 对照组。
图 1 3 组大鼠心肌细胞超微结构(透射电子显微镜, $\times 8\,000$)
Fig.1 Ultrastructure of cardiac muscle cells of rats in the three groups(transmission electron microscope, $\times 8\,000$)

2.3 各组大鼠心肌组织 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶 $\alpha 1$ 亚基 mRNA 表达比较 结果见图 2。黄芪组大鼠心肌 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶 $\alpha 1$ 亚基 mRNA 表达水平(0.092 ± 0.017)显著高于 I/R 组(0.056 ± 0.004)($t = 8.182, P < 0.05$),黄芪组和 I/R 组大鼠心肌 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶 $\alpha 1$ 亚基 mRNA 表达水平均显著低于对照组(0.204 ± 0.011)($t = 14.524, 19.219, P < 0.01$)。



M: 100 bp DNA ladders;A: 对照组;B: 黄芪组;C: I/R 组。
图 2 大鼠心肌组织 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶 $\alpha 1$ 亚基 mRNA 表达
Fig.2 Expression of mRNA of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ ase gene- $\alpha 1$ subunit in muscular tissues of rats

3 讨论

MIRI 是指心肌缺血后血管复通、心肌血流灌注恢复后心肌功能下降加剧的病理过程。MIRI 是临床救治急性心肌梗死患者时经常遇到的危重病理过程,这一危象与心肌 I/R 直接相关^[4]。研究 I/R 的发生机制和预防治疗措施对相关疾病的治疗有重要意义。

心电图是判断心脏功能的早期指标,心电图改变往往早于心功能和心肌酶变化^[5-6]。本研究结果显示,结扎 30 min 时,I/R 组和黄芪组大鼠心电图 ST 段上抬,T 波高尖,提示 I/R 模型复制成功,但 2 组大鼠 ST 值差异无统计学意义。再灌注 120 min 和 180 min 时,黄芪组大鼠 ST 值均显著小于 I/R 组;提示心肌缺血前短期使用黄芪注射液不能减轻缺血对心肌的损伤,但能够减轻缺血后再灌注对心

肌的损伤作用,与文献[7-8]报道一致。有研究报道,I/R 破坏大鼠心肌亚细胞结构,尤其是对线粒体和细胞内膜结构的破坏更为严重^[9-10]。本研究结果显示,电子透射显微镜下黄芪组大鼠心肌细胞线粒体和膜结构损伤程度轻于 I/R 组大鼠心肌细胞,说明黄芪注射液预处理可以减轻心肌 I/R 对大鼠心肌的损伤。心肌细胞将化学能 ATP 转变为可供心肌细胞的机械能依赖 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP 酶}^{[11-12]}$, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP 酶} \alpha 1$ 亚基作用最强。因此,本研究检测了大鼠心肌组织 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP 酶} \alpha 1$ 亚基 mRNA 水平,结果发现,黄芪组大鼠心肌 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP 酶} \alpha 1$ 亚基 mRNA 水平显著高于 I/R 组;提示黄芪注射液改善 MIRI 大鼠心电图和心肌细胞超微结构可能与增加 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP 酶} \alpha 1$ 亚基 mRNA 表达有关。

本研究发现了黄芪注射液预处理对大鼠 MIRI 的改善作用,但对其机制研究还不够深入,在以后的工作中将深入研究黄芪注射液对 MIRI 的保护机制,为相关疾病的防治提供研究基础和思路。

参考文献:

[1] SANTOS-GALLEGO C G, VAHL T P, GOLIASCH G, *et al.* Sphingosine-1-phosphate receptor agonist fingolimod increases myocardial salvage and decreases adverse postinfarction left ventricular remodeling in a porcine model of ischemia/reperfusion[J]. *Circulation*, 2016, 133(10):954-966.

[2] HUANG X P, DING H, WANG B, *et al.* Effects of the main active components combinations of *Astragalus* and *Panax notoginseng* on energy metabolism in brain tissues after cerebral ischemia-reperfusion in mice[J]. *Pharmacogn Mag*, 2015, 11(44):732-739.

[3] LUO P, DONG G, LIU L, *et al.* The long-term consumption of ginseng extract reduces the susceptibility of intermediate-aged hearts to acute ischemia reperfusion injury [J]. *PLoS One*, 2015, 10(12):e0144733.

[4] 哈玲梅,董华江,单娜娜,等. 天麻素对心肌缺血再灌注损伤大鼠血清内皮素-1 水平的影响[J]. 新乡医学院学报, 2015, 32(5):395-397.

[5] CHEN W R, TIAN F, CHEN Y D, *et al.* Effects of liraglutide on no-reflow in patients with acute ST-segment elevation myocardial infarction[J]. *Int J Cardiol*, 2016, 208:109-114.

[6] ZHOU Z, HAN C, YANG T, *et al.* Noninvasive imaging of 3-dimensional myocardial infarction from the inverse solution of equivalent current density in pathological hearts [J]. *IEEE Trans Biomed Eng*, 2015, 62(2):468-476.

[7] TRESCHER K, DZILIC E, KREIBICH M, *et al.* The nitric oxide donor, S-nitroso human serum albumin, as an adjunct to HTK-N cardioplegia improves protection during cardioplegic arrest after myocardial infarction in rats[J]. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, 2015, 20(3):387-394.

[8] BÖNING A, HAGMÜLLER S, HEEP M, *et al.* Is warm or cold Calafiore blood cardioplegia better? Hemodynamic, metabolic, and electron microscopic differences [J]. *Thorac Cardiovasc Surg*, 2014, 62(8):683-689.

[9] HE H, LI N, ZHAO Z, *et al.* Ischemic postconditioning improves the expression of cellular membrane connexin 43 and attenuates the reperfusion injury in rat acute myocardial infarction [J]. *Biomed Rep*, 2015, 3(5):668-674.

[10] KUMPHUNE S, SURINKAEW S, CHATTIPAKORN S C, *et al.* Inhibition of p38 MAPK activation protects cardiac mitochondria from ischemia/reperfusion injury [J]. *Pharm Biol*, 2015, 53(12):1831-1841.

[11] MURAILLE E, LEO O, MOSER M. TH1/TH2 paradigm extended; macrophage polarization as an unappreciated pathogen-driven escape mechanism[J]. *Front Immunol*, 2014, 5:603.

[12] DAI H, JIA G, LIU X. Astragalus polysaccharide inhibits isoprenaline-induced cardiac hypertrophy via suppressing Ca^{2+} -mediated calcineurin/NFATc3 and CaMKII signaling cascades[J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2014, 38(1):263-271.

(本文编辑:王 燕 英文编辑:王 燕)