

DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2018.04.003

红花对兔心肌缺血-再灌注损伤的保护作用*

张磊¹ 刘志强^{2△} 徐祥文³(¹日照市人民医院,日照 276000; ²济宁医学院药学院; ³日照市 120 紧急救援指挥中心,日照 276826)

摘要 目的 探讨红花对兔心肌缺血-再灌注损伤的保护作用。方法 家兔随机分成 3 组:假手术组,缺血-再灌注损伤组,红花组,每组 10 只。ECG-1150 心电图机观察心电图,检测血清乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸肌酶(CK)变化,免疫组化检测 BCL-2 蛋白表达,HE 染色观察心肌细胞损伤情况并观察心肌梗死范围。结果 与假手术组相比,缺血-再灌注损伤组 CK 和 LDH 水平显著增加,差异有统计学意义($P < 0.05$);与假手术组相比,缺血-再灌注损伤组 BCL-2 蛋白阳性细胞数显著增多,差异有统计学意义($P < 0.05$),缺血-再灌注损伤组心肌梗死范围增大,心肌细胞损伤显著;与缺血-再灌注损伤组 CK 和 LDH 水平相比,红花组 CK 和 LDH 水平显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);与缺血-再灌注损伤组 BCL-2 蛋白阳性细胞数相比,红花组 BCL-2 蛋白阳性细胞数显著减少,差异有统计学意义($P < 0.05$),红花组心肌梗死范围减小,心肌细胞损伤减轻。结论 红花对兔心肌缺血-再灌注损伤有保护作用。

关键词 红花;缺血-再灌注损伤;兔

中图分类号:R322.11 文献标识码:A 文章编号:1000-9760(2018)08-238-04

Protective effects of *Carthamus tinctorius* on myocardial ischemia-reperfusion injury in rabbits

ZHANG Lei¹, LIU Zhiqiang^{2△}, XU Xiangwen³(¹Rizhao People's Hospital, Rizhao, 276000, China; ²College of Pharmacy, Jining Medical University;³120 Emergency Rescue Command Center of Rizhao City, Rizhao 276826, China)

Abstract: Objective To explore the protective effect of *Carthamus tinctorius* on myocardial ischemia-reperfusion injury in rabbits. **Methods** Rabbits were randomly divided into 3 groups ($n = 10$): Sham operation group, Ischemia-reperfusion injury group, *Carthamus tinctorius* group. Ecg-1150 electrocardiogram machine was used to observe the electrocardiogram and lactate dehydrogenase (LDH), Creatine Kinase (CK) changes, immunohistochemical expression of BCL-2 protein, pathological sections HE staining were used to observe myocardial cells injuries and myocardial infarct size measurements. **Results** Compared with in the sham operation group, the levels of CK and LDH in the ischemia-reperfusion injury group increased significantly ($P < 0.05$). Compared with the sham operation group, ischemia-reperfusion injury group the BCL-2 protein positive cells count significantly increased ($P < 0.05$). The myocardial infarction in ischemia-reperfusion injury group had increased scope, and myocardial cells were injured significantly. Compared with the ischemia-reperfusion injury group, the significant decreases occurred in CK and levels in the *Carthamus tinctorius* group were statistically significant ($P < 0.05$). In the ischemia-reperfusion injury group the BCL-2 protein positive cell number was reduced compared with *carthamus tinctorius* group. The difference was statistically significant ($P < 0.05$). *Carthamus tinctorius* group of myocardial infarction range decreased and the damage of myocardial cells were alleviated. **Conclusion** *Carthamus tinctorius* has protective effect on myocardial ischemia reperfusion injury in rabbits.

Keywords: *Carthamus tinctorius*; Ischemia-reperfusion injury; Rabbit

* [基金项目] 2012 年济宁市科技局项目

△ [通信作者] 刘志强, E-mail: liuzhiqiangy@yeah.net

近年,经皮冠状动脉腔内成形术、冠脉搭桥术等缺血-再灌注治疗手段增多,心肌缺血-再灌注(ischemia-reperfusion, IR)损伤备受关注^[1]。红花(*Carthamus tinctorius* L)可通过清除自由基、增强酶的活性、扩张血管等方面起到抗心肌缺血作用^[2]。本实验通过结扎右冠状动脉建立心肌缺血动物模型,并从心肌酶检测、BCL-2 蛋白表达、心肌梗死面积测量及病理切片镜像改变等方面研究红花对心肌缺血-再灌注损伤的保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 氯化三苯四唑啉(上海化学试剂厂);BCL-2 免疫试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司);红花注射液(亚宝药业集团股份有限公司)。

1.1.2 仪器 心电图机(EGC-1150 日本);OLYMPUS 显微镜(TOKYO 日本);LX20 全自动生化分析仪(Beckman-Couher 美国);病理切片机(美国 AO 公司)。

1.1.3 实验动物及分组 健康兔 30 只,实验过程中死亡 7 只,补 7 只,共 37 只,体重 2.0~2.5kg,雌雄不拘,济宁医学院动物房提供,动物许可证号:SCXK(鲁)2014-0007,实验动物符合实验动物福利和动物伦理学的要求。

动物随机分为 3 组,每组 10 只,假手术组,在右冠状动脉下穿无创伤丝线,但不结扎;缺血-再灌注损伤组,缺血 30min,再灌注 120min;红花组为红花注射液在缺血前 30min,2ml/kg 耳缘静脉注射,缺血 30min,再灌注 120min。

1.2 方法

1.2.1 兔心肌缺血-再灌注模型建立 20%乌拉坦 5ml/kg 兔耳缘静脉缓慢注入,兔呼吸慢而平稳、肌张力下降且角膜反射消失即表示麻醉成功。随后将兔仰卧于手术台上将四肢和上颌固定,胸前剪毛。先沿胸骨中线右侧逐层剪开皮肤、皮下组织,可见肋骨,再沿肋骨右缘剪断 3~5 根肋骨,撑开胸腔,暴露心脏。观察到心脏跳动有力,右肺略有萎缩,用镊子轻夹起心包膜后剪开 2cm 左右的开口,牵拉右心耳,暴露右房室间沟。在距右房室间沟约 5mm 处右心室壁上可见右冠状动脉。将无创伤缝

合线环绕右冠状动脉,将该缝合线从自制皮管内穿出置于体外,迅速缝合关胸。用针管从自制皮管中抽气,使右肺膨胀,抽紧环绕线造成右冠状动脉缺血,用止血钳夹住皮管,防止空气进入胸腔,观察呼吸是否平稳、心率是否正常。逐层将胸腔和表皮缝合,缺血 30min,心电图机行心电监护,随后松开环绕线恢复心肌灌注 120min。在心肌再灌注 2h 后从心脏取血,测定 CK 和 LDH 含量。取出心脏,在右心室前壁取 1.2cm×1.5cm 心肌,备用做病理切片,每组 5 个心脏冷藏后取出做心脏切片观察心肌梗死面积。红花组红花注射液在缺血前 30min,2ml/kg 耳缘静脉注射,假手术组、缺血-再灌注损伤组在缺血前 30min 注射等量生理盐水。

1.2.2 心电图观测 采用 ECG-1150 心电图机对各组兔做心电图。以针刺电极插于兔四肢皮下,全程监测标准肢体 II 导联心电图。再灌注后 ST 值均有降低,降低的 ST 值称为 ST 回落值,即 ΔST 值($\Delta ST =$ 结扎后 30min ST 值 - 复灌后 ST 值)。

1.2.3 心肌酶检测 再灌注 2h 后从心脏取血,用 LX20 全自动生化分析仪(美国)检测心肌酶含量,包括 CK、LDH,速率法检测。

1.2.4 心肌梗死范围观测 1)取材 动物缺血-再灌注后取出心脏生理盐水冲洗后放置冰箱冷藏。2)心肌梗死范围观测 取冷冻心脏,每组各取 5 只,去除心房,沿水平方向将心室肌切成约 2~3mm 的圆薄片,用滤纸将心肌薄片吸干,置于 37℃ 的 1% 氯化三苯四唑啉磷酸缓冲液(pH=7.4)内,水浴 15~30 min,确定梗死组织面积,观察梗死区域(灰白色)和正常心肌区域(红色)面积。

心肌损伤观测:1)取材 动物缺血-再灌注后取心脏,在右心室前壁上取 1.2cm×1.5cm 的心肌。2)固定 把取出的标本放入 4% 多聚甲醛缓冲液中 6~8h。3)染色 石蜡包埋 HE 染色。4)拍照 用 OLYMPUS 光学显微镜观察,明美数码成像系统拍照。

1.2.5 检测 BCL-2 蛋白阳性细胞数 采用 HP IAS-1000 高清晰度彩色病理图文分析系统,于 200 倍光镜下选择血肿周围阳性细胞表达明显区域的 3 个相邻视野区,计数阳性细胞数,计算平均值。

1.3 统计学方法

采用统计软件 SPSS 13.5 分析实验数据。

2 结果

2.1 各组兔心电图变化

与假手术组相比,缺血-再灌注损伤组心电图 ST 段抬高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);与缺血-再灌注损伤组相比,红花组心电图 ST 段抬高降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 3 组心电图 ST 段高度值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ST 段高度值
假手术组	10	0.17 ± 0.02
缺血-再灌注损伤组	10	0.41 ± 0.06*
红花组	10	0.23 ± 0.03 [△]
F 值		84.578
P		0.000

注:与假手术组相比, * $P < 0.05$;与缺血-再灌注损伤组相比, $\Delta P < 0.05$

2.2 各组兔心肌酶变化

与假手术组相比,缺血-再灌注损伤组 CK 和 LDH 水平增加,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);与缺血-再灌注损伤组相比,红花组 CK 和 LDH 水平显低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 3 组心肌酶检测数值比较 ($\bar{x} \pm s, U/L$)

组别	n	LDH	CK
假手术组	10	234 ± 39	1516 ± 206
缺血-再灌注损伤组	10	723 ± 43*	6823 ± 318*
红花组	10	464 ± 37 [△]	3194 ± 320 [△]
F 值		379.137	397.279
P		0.000	0.000

注:与假手术组相比, * $P < 0.05$;与缺血-再灌注损伤组相比, $\Delta P < 0.05$

2.3 各组兔心肌梗死范围检测结果

假手术组右心室无梗死发白,缺血-再灌注损伤组右心室梗死发白较明显,红花组与缺血-再灌注损伤组比较右心室梗死发白减轻。见图 1。

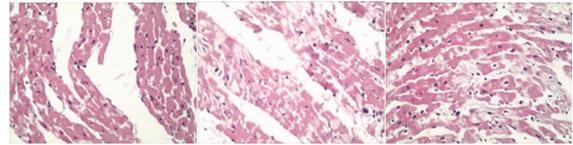


假手术组 缺血-再灌注损伤组 红花组

图 1 3 组兔心肌梗死检测结果

2.4 各组兔病理切片检测结果

缺血-再灌注损伤组梗死区部分毛细血管扩张,细胞出现空泡,模糊不清晰,细胞核颜色变浅,细胞质出现肿胀,纤维排列不规则,红花组出现轻微的血管充血,较少出现细胞固缩、形态结构改变。见图 2。

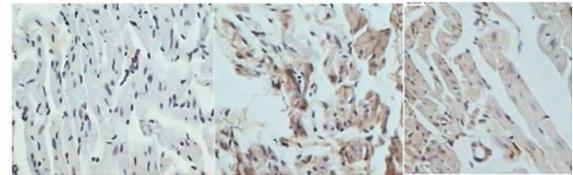


假手术组 缺血-再灌注损伤组 红花组

图 2 3 组兔心肌细胞形态

2.5 各组兔 BCL-2 蛋白表达情况

与假手术组相比,缺血-再灌注损伤组 BCL-2 蛋白阳性细胞数增多,与缺血-再灌注损伤组相比,红花组 BCL-2 蛋白阳性细胞数显著减少。见表 3、图 3。



假手术组 缺血-再灌注损伤组 红花组

图 3 各组兔 BCL-2 蛋白表达情况 (×200)

表 3 3 组心肌组织 BCL-2 蛋白阳性细胞数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	BCL-2 蛋白阳性细胞数
假手术组	10	0.00 ± 0.00
缺血-再灌注损伤组	10	28.32 ± 1.03*
红花组	10	10.18 ± 0.96 [△]
F 值		236.477
P		0.000

注:与假手术组相比, * $P < 0.05$;与缺血-再灌注损伤组相比, $\Delta P < 0.05$

3 讨论

缺血-再灌注损伤可发生于溶栓、经皮穿刺冠状动脉腔内成形术、冠状动脉旁路移置术、各种冠状动脉再通术和心脏移植术后,严重威胁人类健康。国内外同行^[3-5]对左冠状动脉缺血-再灌注损伤做了较多研究,而人及哺乳类动物 90% 以上的房室结动脉及 2/3 的窦房结动脉均起源于右冠状动脉,右冠状动脉位置深,变异较大,从而对右冠状

动脉的研究增加了难度。本文观察了红花注射液^[6-7]对在体兔右心缺血-再灌注损伤的影响,通过红花预处理后结扎右冠状动脉缺血 30min,再灌注 120min 后心肌损伤减轻,其对右心缺血-再灌注损伤的保护,在国内外未见报道。

本文缺血-再灌注损伤组与假手术组比较,心电图抬高显著,CK、LDH 明显升高,右心室心肌梗死明显,病理切片 HE 染色细胞损伤严重,BCL-2 蛋白表达升高,说明结扎右冠状动脉造成右心缺血-再灌注损伤明显;红花组与缺血-再灌注损伤组比较,红花组的各项指标均降低,说明红花减轻了缺血-再灌注的损伤。

当发生心肌梗死时心肌氧摄取率降低,对自由基清除能力下降,心肌细胞内氧自由基爆发式增长^[8],通过系列病理生理作用,引发心肌缺血-再灌注损伤。红花通过抑制氧自由基生成、增强心肌酶活性、改善微循环等作用减轻缺血-再灌注过程中心肌细胞的损伤^[9],对兔心肌缺血-再灌注损伤起到保护作用,临床上在应用红花预防心缺血-再灌注损伤具有广阔前景,对临床治疗具有指导意义。

参考文献:

[1] Jiang G, Liu X, Wang M, et al. Oxymatrine ameliorates renal ischemia-reperfusion injury from oxidative stress through Nrf2/HO-1 pathway [J]. Acta Cir Bras, 2015, 30 (6): 422-429. DOI: 10. 1590/S0102-865020150060000008.

[2] Hu T, Wei G, Xi M, et al. Synergistic cardioprotective effects of Danshensu and hydroxysafflor yellow A against myocardial ischemia-reperfusion injury are mediated through the Akt/Nrf2/HO-1 pathway [J]. Int J Mol Med, 2016, 38(1): 83-94. DOI: 10. 3892/ijmm. 2016. 2584.

[3] Aulakh AS, Randhawa PK, Singh N, et al. Neurogenic pathways in remote ischemic preconditioning induced cardioprotection: Evidences and possible mechanisms [J]. Korean J Physiol Pharmacol, 2017, 21 (2): 145. DOI: 10. 4196/kjpp. 2017. 21. 2. 145.

[4] Hu SY, Zhang Y, Zhu PJ, et al. Liraglutide directly protects cardiomyocytes against reperfusion injury possibly via modulation of intracellular calcium homeostasis [J]. J Geriatr Cardiol, 2017, 14 (1): 57-66. DOI: 10. 11909/j. issn. 1671-5411. 2017. 01. 008.

[5] Liu H, Wang C, Qiao Z, et al. Protective effect of curcumin against myocardium injury in ischemia reperfusion rats [J]. Pharm Biol, 2017, 55 (1): 1144-1148. DOI: 10. 1080/13880209. 2016. 1214741.

[6] Qazi N, Khan RA, Rizwani GH. Short communication-Evaluation of antianxiety and antidepressant properties of Carthamus tinctorius L. (Safflower) petal extract [J]. Pak J Pharm Sci, 2015, 28 (3): 991-995.

[7] Gao Y, Song J, Chen H, et al. TRPV1 activation is involved in the cardioprotection of remote limb ischemic postconditioning in ischemia-reperfusion injury rats [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 463 (4): 1034-1039. DOI: 10. 1016/j. bbrc. 2015. 06. 054.

[8] Jeremic N, Petkovic A, Srejsovic I, et al. Effects of ischemia and omeprazole preconditioning on functional recovery of isolated rat heart [J]. 2015, 30 (2): 266-275. DOI: 10. 5935/1678-9741. 20150020.

[9] Cao J, Chen Z, Zhu Y, et al. Huangqi-Honghua combination and its main components ameliorate cerebral infarction with Qi deficiency and blood stasis syndrome by antioxidant action in rats [J]. J Ethnopharmacol, 2014, 155 (2): 1053-1060. DOI: 10. 1016/j. jep. 2014. 05. 061.

(收稿日期 2018-01-19)

(本文编辑:石俊强)

· 简讯 ·

我校学报被评为山东省高校学报研究会优秀期刊

为探索高校综合性学术期刊特色化办刊模式,提高新数媒时代编辑人员职业素养,山东省高校学报研究会于 2017 年 11 月在福建省古田会议旧址举办了以“学术期刊的专业化与专题化转型”为主题的学术研讨会暨 2017 年优秀期刊、优秀主编、优秀编辑评选活动。经评审委员会最终评定,我校学报被评为优秀期刊。

本刊编辑部