

· 实验研究 ·

黄芪皂甙提高心脏保存效果的实验研究*

储利胜[△] 施雪筠 席时芳 孙承琳

内容提要 **目的:**在改良的 Euro-Collins 心脏保存液(mEC 液)中添加黄芪皂甙(AS),观察黄芪皂甙对心脏保存的作用。**方法:**将 Wistar 大鼠分成 mEC 组和 AS 组。分别用 mEC 液和含 AS 的 mEC 液简单冷保存离体大鼠心脏 6h 后,用 Langendorff 离体鼠心模型再灌注 30min,研究保存后的心功能及抗氧自由基损伤作用。**结果:**AS 组与 mEC 组比较,保存后心脏的心功能和冠脉流量明显好于 mEC 组($P < 0.05$),心肌含水量显著降低($P < 0.01$),心肌细胞乳酸脱氢酶和肌酸激酶的漏出量显著减少($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$),心肌细胞超氧化物歧化酶活性显著增高($P < 0.01$),而过氧化脂质含量明显降低($P < 0.05$)。**结论:**黄芪皂甙能提高 mEC 液的心脏保存效果,可能与负性肌力和抗氧自由基损伤作用有关。

关键词 黄芪皂甙 心脏保存 心脏保存液 改良的 Euro-Collins 液

Experimental Studies on Improving Heart Preservation Effect of Astragalus Saponins Chu Lisheng, Shi Xuejun, Xi Shifang, et al *Department of Physiology, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing (100029)*

Objective: To observe the effect of heart preservation of Astragalus saponins (AS) in modified Euro-Collins solution (mEC) containing AS. **Methods:** Wistar rats were randomly divided into mEC and AS group. After preserving isolated rat hearts 6 hours by simple cold storage with mEC and mEC containing AS respectively, Langendorff's isolated rat heart model was used to reperfuse for 30 minutes to study cardiac function after preservation and the effect of preventing oxygen free radical injury. **Results:** To compare AS group with mEC group, cardiac function and coronary flow of the hearts after preservation were better than mEC group ($P < 0.05$), in AS group the water content of myocardium was decreased very significantly ($P < 0.01$), myocardial lactate dehydrogenase and creatine phosphokinase release were reduced greatly ($P < 0.05$ and $P < 0.01$), myocardial superoxide dismutase activity was increased very significantly ($P < 0.01$) and the content of lipid peroxide was decreased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion:** AS could improve the effect of heart preservation of mEC solution, its mechanism might be associated with the effect of negative contractile strength and preventing oxygen free radical injury.

Key words Astragalus saponins, heart preservation, heart preservation solution, modified Euro-Collins solution

进入 80 年代,心脏移植在世界范围内得到广泛的开展。由于受心脏保存时间和人们传统观念的影响,供心相对缺乏的矛盾已日益突出。提高心脏保存效果,延长心脏保存时间是解决这一矛盾的有效措施之一。

黄芪,性微温,有补气固表、托毒生肌功效。黄芪皂甙(Astragalus saponins, AS)是黄芪的有效成分之一。文献报道:AS 有保护心肌,减轻心肌缺血再灌注

损伤作用^(1,2),并发现大剂量 AS(50~200 μ g/ml)对离体鼠心有正性肌力作用,小剂量 AS(30 μ g/ml)有负性肌力作用⁽³⁾。

本实验选用改良的 Euro-Collins 心脏保存液(mEC 液)作为母液,加入 AS,观察它在 mEC 液中的心脏保存作用。

材料与方法

1 材料

1.1 动物 Wistar 大鼠,雌雄兼用,体重 250~350g,中国医学科学院动物所提供。

1.2 药品与试剂 黄芪皂甙由本校植物化学教

* 国家中医药管理局和国家教委博士点资助项目(No. 922901)

北京中医药大学(北京 100029)

[△] 现工作单位为浙江中医学院生理教研室(杭州 310009)

研室提供, 3mg/ml; 还原性辅酶 I (NADH) 由中国科学院上海生化所东风生化技术公司提供; 次黄嘌呤, FARCO CHEMICAL SUPPLIES, HONG KONG; 黄嘌呤氧化酶、超氧化物歧化酶 (SOD) 标准品为 Sigma 公司产品; 肌酸激酶 (CK) 试剂盒由北京中生生物工程高技术公司提供。

1.3 仪器 四导生理记录仪, RM-6000, 日本光电; 超级恒温水浴, 上海市上海县第二五金厂; 数字酸度计, PHS-3C 型 梵隆仪器有限公司; 恒温通风干燥箱, GD65-1 型, 北京来广营医疗器械厂; 分光光度计, UV-120-02 型, 日本岛津公司产品。

2 方法

2.1 实验分组 动物随机分成两组, 每组 10 只, 对照组使用 mEC 保存液 (KCl 14mmol/L, K_2HPO_4 42.5mmol/L, KH_2PO_4 15mmol/L, NaHCO_3 10mmol/L, MgSO_4 5mmol/L, CaCl_2 0.025mmol/L, Glucose 139mmol/L, pH 7.6~7.8), 简称 mEC 组; 实验组向 mEC 保存液中添加 AS, 配成终浓度含 37.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ AS 的 mEC 保存液, 简称 AS 组。

2.2 实验步骤 动物行戊巴比妥钠腹腔麻醉 (45mg/kg), 股静脉注射肝素 (每只 2mg), 3min 后迅速打开胸腔, 取出心脏, 放入 4 $^{\circ}\text{C}$ KH 液 (NaCl 118mmol/L, KCl 4.7mmol/L, KH_2PO_4 1.2mmol/L, MgSO_4 1.2mmol/L, NaHCO_3 25mmol/L, CaCl_2 2.5mmol/L, Glucose 11mmol/L, pH 7.35~7.45) 中, 在液面下修剪心脏, 主动脉插管后进行 Langendorff 灌注, 灌注压 8kPa, 灌注液为 37 $^{\circ}\text{C}$ KH 液, 并充以 95% O_2 和 5% CO_2 。稳定 15min 后, 分别用 4 $^{\circ}\text{C}$ 的冷保存液恒压灌注使心脏停搏, 灌注压为 8kPa, 3min 后取下, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存于 20ml 同种保存液中。简单冷保存 6h 后, 再次进行 Langendorff 灌注, 条件同前, 收集再灌注 10~15min 时的冠脉灌流液, 保存于液氮中。再灌注 30min 时测冠脉流量和心功能指标, 实验结束前测左室顺应性曲线。结束后取下心脏, 用滤纸拭干保存于液氮中。

3 检测指标

3.1 心功能 调整心室内球容量, 使左室舒张末期压 (LVEDP) 为 1.33kPa, 测左室最大收缩压

(LVPSP)、室内压最大变化率 ($\pm \text{dp}/\text{dt max}$)、心率 (HR)、冠脉流量 (CF)、心率与最大收缩压乘积 (RPP)。

3.2 左室顺应性曲线 调整心室内球容量, 从 0 开始, 每次增加 0.02ml, 记录 LVEDP, 但 LVEDP 不得超过 5.2kPa。对左室舒张末期容积 (LVEDV) 和 LVEDP 进行直线回归分析, 得到顺应性直线, 计算其斜率 (心肌弹性劲度常数) 和 X 轴截距。

3.3 心肌含水量 沿房室沟剪去心房, 用滤纸拭干, 称取湿重, 置烘箱中 80 $^{\circ}\text{C}$ 烘烤 48h, 称取干重。按下面公式计算心肌含水量: 心肌含水量 = $(1 - \text{心肌干重}/\text{心肌湿重}) \times 100\%$ 。

3.4 乳酸脱氢酶 (LDH)、CK 活性测定 收集再灌注 10~15min 的冠脉流液, 按文献方法^[4]测 LDH 活性; 用比色法测 CK 活性, 方法参照试剂盒说明书。

3.5 SOD 活性和过氧化脂质 (LPO) 含量测定 按文献方法^[5]测定心肌组织中 SOD 活性, 用硫代巴比妥酸显色方法^[6], 计算每克组织 LPO 含量。

4 统计学处理 变量以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 结果采用 t 检验。

结 果

1 大鼠心脏保存后心功能及 CF 比较 心脏保存 6h, 再灌注 30min 后, AS 组心功能和冠脉流量与 mEC 组比较, LVPSP、 $-\text{dp}/\text{dt max}$ 、 $+\text{dp}/\text{dt max}$ 、CF 有显著性差异 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 两组 HR、RPP 虽然没有显著性差异 ($P > 0.05$), 但 AS 组恢复也好于 mEC 组, 结果见表 1。

2 两组大鼠左室顺应性曲线直线化后斜率与截距比较 顺应性曲线直线化后, 计算斜率和截距, 结果如表 2, 保存后 AS 组斜率明显小于 mEC 组 ($P < 0.05$); 两组截距没有显著性差异 ($P > 0.05$), 但 AS 组大于 mEC 组。说明 AS 组心脏的顺应性好于 mEC 组。

3 心肌含水量 保存后 AS 组心肌含水量为 $(79.19 \pm 1.28)\%$, mEC 组心肌含水量为 $(80.56 \pm 1.14)\%$, 两组有显著性差异 ($P < 0.01$)。

表 1 两组大鼠心脏保存后心功能及冠脉流量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	LVPSP (kPa)	$+\text{dp}/\text{dt max}$ (kPa/s)	$-\text{dp}/\text{dt max}$ (kPa/s)	HR (beat/min)	RPP (kPa/min)	CF (ml)
mEC	10	9.52 ± 1.06	171.5 ± 19.7	141.3 ± 16.8	185 ± 24	1771 ± 297	4.64 ± 0.49
AS	10	$10.77 \pm 1.36^*$	$199.7 \pm 16.9^{**}$	$160.7 \pm 19.6^*$	193 ± 29	2079 ± 411	$5.12 \pm 0.48^*$

注: 与 mEC 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表 2 两组大鼠左室顺应性曲线直线化后斜率与截距比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	斜率(kPa/ml)	截距(ml)
mEC	10	81.03 ± 5.38	0.124 ± 0.030
AS	10	75.45 ± 5.46*	0.153 ± 0.042

注:与 mEC 组比较, * $P < 0.05$

表 3 两组大鼠心肌保存后 LDH、CK、SOD、LPO 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	LDH(u/L)	CK(u/L)	SOD(NU/g)	LPO(μ mol/g)
mEC	10	13.26 ± 1.59	36.74 ± 9.42	3836.8 ± 346.4	2.14 ± 0.98
AS	10	11.39 ± 1.50*	19.32 ± 9.14**	4707.2 ± 129.7**	1.35 ± 0.54*

注:与 mEC 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

讨 论

心脏保存的关键就是降低能量消耗,而电机械活动是心肌消耗能量的主要决定因素。有报道 AS 对心肌肌力作用有剂量相关性,小剂量 AS(30 μ g/ml)能兴奋 Na^+ - K^+ -ATPase,使细胞内 Ca^{2+} 降低,呈负性肌力作用,洗脱后恢复;大剂量 AS(50 ~ 200 μ g/ml)抑制 Na^+ - K^+ -ATPase,对离体工作鼠心呈正性肌力作用^[3]。通过剂量筛选,我们认为 AS 浓度在 37.5 μ g/ml 时,对心脏的保存效果最好。这可能是因为采用的是简单冷保存方法,药物靠渗透作用进入血管,速度较慢,而文献都采用的是离体鼠心灌注模型,药物作用迅速。心肌顺应性曲线直线化所得到的斜率越大,意味心肌的顺应性越差。表 1、表 2 结果显示,AS 能促进保存后心脏的收缩和舒张功能及冠脉流量的恢复。心脏低温保存时, Na^+ - K^+ 泵被抑制,导致细胞水肿。AS 能兴奋 Na^+ - K^+ -ATPase,减轻细胞水肿,心肌含水量明显低于 mEC 组($P < 0.01$)。

器官在保存过程中,器官缺血本身对组织结构改变影响并不严重,而是恢复血供后加重了保存器官的损害,即缺血再灌注损伤。氧自由基是造成心肌再灌注损伤的主要因素之一。1988 年 Belzer 提出理想的低温保存液应具备预防再灌注后氧自由基损伤作用^[7]。近年来研究证实黄芪可使抗氧化酶 SOD 活性提高,LPO 含量减少,从而减轻自由基造成的损伤。雷春利等利用犬急性心肌梗塞模型研究 AS 对心肌的保护作用,给药后 6h 采血,结果 AS 组 CK 浓度基本不变、SOD 含量有增高趋势,而 LPO 含量略有增加趋势,并能缩小心肌梗塞面积,增加冠脉流量,因此认为,AS 是通过抑制氧自由基产生起到心肌保护作用^[1,2]。卢成志等利用体外培养大鼠乳鼠心脏细胞缺氧缺糖/复氧复糖损伤模型,结果发现黄芪注射液能改善心肌能量代谢,保护细胞超微结构特别是线粒体结构,提高细胞内 SOD 活性,减轻氧自由基对心肌细胞膜的损

4 乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)、SOD 活性和 LPO 含量 保存后 AS 组 LDH、CK、SOD、LPO 与 mEC 组比较有显著性差异($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结果见表 3。

伤,减少 LDH 漏出^[8]。张光平等研究黄芪对人红细胞膜脂流动性及膜蛋白构象的影响时发现,黄芪能增加人红细胞膜脂流动性,并认为黄芪与人红细胞膜作用可能与红细胞膜免受自由基的攻击有关,估计黄芪一方面能清除自由基,同时还能提高膜脂和膜蛋白抗御自由基攻击的能力^[9]。从表 3 可见保存后 AS 组再灌注时冠脉流出液的 LDH、CK 的活性明显低于 mEC 组($P < 0.05$, $P < 0.01$),心肌细胞的 SOD 活性明显高于 mEC 组($P < 0.01$),而 LPO 含量低于 mEC($P < 0.05$)。这也说明 AS 有明显的抗氧自由基损伤作用,保护心肌细胞膜,减少心肌酶的漏出。

参 考 文 献

1. 雷春利,陈 羽,吕文伟,等. 黄芪总皂甙对犬急性心肌梗塞缺血面积、心外膜电图、心肌酶的影响. 白求恩医科大学学报 1995;21(2):111—113.
2. 雷春利,陈 羽,吕文伟,等. 黄芪总皂甙对在体犬心功能的影响. 白求恩医科大学学报 1994;20(4):326—327.
3. 王奇玲,李云义,齐 辉,等. 黄芪皂甙对离体工作心脏的肌力作用及可能机制. 中国中药杂志 1992;17(9):557—559.
4. 蒋传葵. 工具酶的活力测定. 上海:上海科学技术出版社, 1982:11.
5. Yoshihiko, Oyanagui. Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. Analytical Biochemistry 1984;142:290—292.
6. 陈文为,路雪雅,刘春梅,等. 清宫寿桃粉剂对大鼠肝匀浆生成过氧化脂质产物的影响. 中西医结合杂志 1984;4(11):686—688.
7. Belzer FO, Southard JH. Principles of solid-organ preservation by cold storage. Transplantation 1988;45:673—676.
8. 卢成志,李玉光. 黄芪注射液对心肌细胞缺氧缺糖/复氧复糖损伤作用的实验研究. 实用中西医结合杂志 1988;11(1):10—11.
9. 张光平,张学贤,沈子威,等. 黄芪对人红细胞膜脂流动性及膜蛋白构象的影响. 中国药科大学学报 1994;25(4):238—241.

(收稿:1998-11-30 修回:1999-03-17)