

# 肌生注射液心脏保护及抗氧化作用的实验研究

张素清 施雪筠

**摘要** 目的:观察肌生(GL)注射液的心脏保护效果。方法:在改良的 Euro-Collins 心脏保存液(mEC 液)中添加肌生注射液,以单纯 mEC 液为对照组,保存大鼠离体心脏 20h,采用 Langendorff 离体鼠心灌注法,于再灌注 40min,测定心功能、冠脉流量及心肌含水量。检测冠脉流液中乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)活性,心肌组织中超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)含量及心肌组织的病理学改变。结果:保存后 GL 组心脏心功能和冠脉流量明显优于 mEC 组( $P < 0.01$ );心肌含水量低于 mEC 组,但无统计学意义;LDH、CK 活性明显低于 mEC 组( $P < 0.01$ );SOD 活性显著高于 mEC 组( $P < 0.05$ ),MDA 含量显著低于 mEC 组( $P < 0.05$ )。病理损伤较 mEC 组轻。结论:肌生注射液具有很好的心脏保护及抗氧化作用。

**关键词** 肌生注射液 心脏保存 Langendorff 离体鼠心灌注模型 Euro-Collins 心脏保存

**Experimental Study on Cardiac Protection and Anti-oxidation Effects of Jisheng Injection** ZHANG Su-qing, SHI Xue-jun *Department of Physiology; Beijing University of TCM, Beijing (100029)*

**Objective:** To observe the effect of Jisheng injection (JSI) in protecting heart. **Methods:** Isolated heart of rat was preserved in modified Euro-Collins solution (mEC) containing JSI for 20 hrs, and that preserved in simple mEC was taken as control. Then Langendorff isolated rat heart perfusion was conducted. Forty minutes after perfusion, the cardiac function, coronary flow, myocardial water content were determined, and lactate dehydrogenase (LDH), creatine kinase (CK) activity in perfusate, superoxide dismutase (SOD) activity, malondialdehyde (MDA) content in myocardial tissue and pathologic change in myocardium were also observed. **Results:** The cardiac function and coronary flow of isolated heart preserved in JSI containing mEC was significantly better than those in the control ( $P < 0.01$ ), with the LDH, CK activity and MDA content significantly lower ( $P < 0.01$  and  $P < 0.05$ ), SOD activity significantly higher ( $P < 0.05$ ) and pathologic injury milder than those in control, but comparison of cardiac water content between the two groups showed insignificant difference. **Conclusion:** JSI has good cardiac protective and anti-oxidizing effects.

**Key words** Jisheng injection, heart preservation, Langendorff isolated rat heart perfusion model, Euro-Collins heart preserving solution

目前,心脏移植术已从一个激进而有争议的外科手段变成一种治疗终末期心脏病的重要方法。而且阻碍其发展的首要问题也由移植技术和术后治疗转为供心的相对缺乏。成千上万的患者因得不到供心而死亡。心脏冷缺血的有效保存在很大程度上要依赖于保存液和保存温度<sup>[1]</sup>。因此,心脏保存液的研究被认为是器官保存领域最具挑战性的课题之一。肌生注射液由赤芝(*Ganoderma lucidum*, GL)孢子粉加工制成的无菌注射液。近年来灵芝的研究已从整体器官水平深入到细胞、分子水平,但用于心脏保存的研究报道少见。本实验将肌生(GL)注射液添加到改良的 Euro-Collins 液(mEC 液)中,以研究 GL 的心脏保护作用。

## 材料与方法

### 1 材料

1.1 动物:Wistar 大鼠,2.5 月龄,雄性,体重 250~300g,中国医学科学院动物所提供。

1.2 药物及试剂 KH 液:NaCl,118.0mmol/L;KCl,4.7mmol/L;KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,0.93mmol/L;MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O,1.2mmol/L;CaCl<sub>2</sub>,1.5mmol/L;NaHCO<sub>3</sub>,25mmol/L;C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>,11.0mmol/L,pH:7.40±0.1。mEC 液:K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,42.5mmol/L;KCl,14mmol/L;KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,15mmol/L;MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O,5mmol/L;CaCl<sub>2</sub>,0.025mmol/L;NaHCO<sub>3</sub>,10mmol/L;C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>,139mmol/L,pH:7.6~7.8。肌生注射液:北京协和药厂提供,由赤芝孢子粉加工制成的无菌注射液,200mg/ml,生产批号 20000414。

北京中医药大学生理教研室(北京 100029)

通讯作者:张素清,Tel:010-64286952,E-mail:zhangsqing@sina.com.cn

万方数据

1.3 主要仪器 四导生理记录仪(RM-6000,日本光电产品);超级恒温水浴泵(501型上海市上海县第二五金厂产品);压力换能器(TP-200T,日本光电产品);数字酸度计(PHS-3C型梵隆仪器有限公司产品)。

2 实验方法 动物随机分成两组,每组10只。对照组使用mEC液;实验组使用添加肌生(GL)注射液的mEC液,浓度为每毫升保存液中含GL1.6mg(1.6mg/ml)。大鼠腹腔注射20%乌拉坦(5ml/kg),麻醉后,股静脉注射0.1%肝素(0.6ml/kg),2~3min后,迅速打开胸腔,剪取心脏,放入4℃KH液中停搏,修剪心脏并安装主动脉插管,进行Langendorff装置灌注。从打开胸腔到灌注时的时间在1.5min以内,灌注压为60mmHg,灌注液为37℃恒温KH液,充以95%O<sub>2</sub>和5%CO<sub>2</sub>。安装心室内球,调整充液量,使左心室舒张末压为10mmHg。稳定5min后开始计时,20min后测定冠脉流量(CF),记录心功能指标。测量结束后,以15ml4℃冷保存液(mEC液或添加肌生注射液的mEC液)恒压灌注停搏,灌注压为60mmHg,灌注5min后取下心脏,放入20ml同种保存液中,4℃保存20h,再次进行Langendorff装置灌注,条件同前。于再灌注40min记录心功能指标,并测冠脉流量(CF)。

3 检测指标 心功能:左室最大收缩压(LVP-SP)、室内压最大变化率(±dp/dtmax)、心率(HR)、CF。心肌含水量:再灌注结束后,剪取部分心脏,用滤纸拭干,称取湿重,置烘箱中80℃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-心肌干重/心肌湿重)×100%。乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)活性测定:收集再灌注40min的冠脉流液,留取5ml,化学比色法检测LDH、CK活性,方法参照试剂盒说明书。超氧化物歧化酶(SOD)活性及丙二醛(MDA)含量测定:取大于0.1g的左心室肌,制成1%、10%的组织匀浆,化学比色法测定心肌组织中SOD活性及MDA含量。方法参照试剂盒说明书。LDH、CK、SOD、MDA试剂盒由南京建成生物技术公司提供。

光镜标本制备:两组分别随机取3只鼠的左室心肌,20%甲醛固定,HE染色,光镜下观察病理学变化。

### 结 果

1 大鼠心脏保存后心功能、CF及心肌含水量的比较 见表1、2。心脏保存20h,再灌注40min后,GL组的心功能、CF明显高于mEC组( $P < 0.01$ );HR GL组高于mEC组,但差异无显著性( $P > 0.05$ );心肌含

水量GL组低于mEC组,亦无统计学意义。

2 LDH、CK、SOD活性和MDA含量的比较 见表3。保存后冠脉流液中的LDH、CK活性,GL组明显低于mEC组,差异有显著性( $P < 0.01$ );心肌组织SOD活性,GL组明显高于mEC组,差异有显著性( $P < 0.05$ );心肌组织MDA含量,GL组明显低于mEC组,差异有显著性( $P < 0.05$ )。

3 病理学改变 保存后mEC组大鼠心脏,心肌细胞间质疏松,细胞显著水肿,肌原纤维断裂,排列紊乱。GL组大鼠心脏,心肌细胞排列疏松,细胞轻度水肿,肌原纤维断裂程度较mEC组轻,有胞核边聚。

表1 保存后两组心脏心功能的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	LVPSP (mmHg)	+ dp/dtmax (mmHg/s)	- dp/dtmax (mmHg/s)	HR (次/min)
mEC	10	22.58 ± 11.26	418.97 ± 152.29	251.97 ± 114.71	120.99 ± 38.84
GL	10	41.58 ± 11.27*	890.34 ± 274.32*	553.08 ± 181.90*	148.01 ± 36.84

注:与mEC组比较,\* $P < 0.01$

表2 保存后两组心脏CF及心肌含水量的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	CF(ml/min)	心肌含水量(%)
mEC	10	2.09 ± 0.93	84.79 ± 1.20
GL	10	3.59 ± 1.23*	83.68 ± 1.37

注:与mEC组比较,\* $P < 0.01$

表3 保存后两组心脏LDH、CK、SOD活性和MDA含量的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	LDH (U/L)	CK (U/ml)	SOD (NU/mg prot)	MDA (μmol/L)
mEC	10	145.26 ± 35.67	36.68 ± 14.93	305.66 ± 28.10	8.60 ± 0.41
GL	10	43.77 ± 13.25**	10.89 ± 3.56**	344.71 ± 37.75*	6.51 ± 0.24*

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

### 讨 论

心脏保存是指在一定条件下保护性存放离体心脏,于一定时期内维持其存活状态,从而能够在血供恢复后恢复心脏功能。Belzer<sup>[2]</sup>于1988年提出,一种恰当而有效的保存液须具备以下条件:(1)使低温导致的细胞水肿减至最少;(2)能防止细胞内酸中毒;(3)能阻止细胞间隙在灌流期间的扩大;(4)防止氧自由基造成的损伤,尤其在再灌注期间;(5)提供在再灌注期间产生高能磷酸化合物的底物。本组实验结果显示,GL添加到mEC液中,可明显提高保存后心脏的心功能,增加CF。推测GL的有效保存作用可能与下述因素有关。

1 增强心脏的耐缺血缺氧能力 灵芝可降低机体的耗氧量,减轻心肌缺血造成的心肌损伤。有研究显示,灵芝水溶性提取物(EG)可增强小鼠对缺氧及极度疲劳的耐受能力<sup>[3]</sup>。灵芝液可对抗垂体后叶素导

致的急性心肌缺血<sup>[4]</sup>。

2 增强心肌的收缩力 林志彬等<sup>[4]</sup>报道灵芝酊对离体蟾蜍心脏具有明显的强心作用,使心脏的收缩力增强,心输出量增多,而心率则变化不大,对衰弱心脏的强心作用尤为显著。GL 显著增强衰弱心脏的心肌收缩力作用,从理论上讲,有利于心脏的保存,因为供心的采集、缺血保存及移植后再灌注都会造成心脏的损伤,降低心脏的心功能。本实验 GL 组心脏保存后的 LVPSP、+ dp/dtmax 明显高于 mEC 液组( $P < 0.01$ ),可能与 GL 的强心作用有关。

3 提高心脏的抗氧化作用 灵芝的水浸出液(0.5~4.0mg)对  $Fe^{2+}$ -维生素 C 系统诱导的脂质过氧化升高呈显著抑制,同时对于乙醇中毒诱发的心脏、肝脏脂质过氧化反应(灵芝 0.75~3.0g/kg)也表现出完全抑制<sup>[5]</sup>。云芝多糖可提高机体各组织的谷胱甘肽过氧化物酶(SeGSHPx)及 SOD 活性,降低脂质过氧化物含量,有效增强机体抗氧化能力<sup>[6,7]</sup>。本实验结果也显示 GL 可提高心肌组织中 SOD 活性,减少心肌组织中 MDA 含量。

4 补充心脏代谢所需物质,提高营养物质的利用率 灵芝富含多种成分包括氨基酸、生物碱、核苷、酶及微量元素等。所含谷氨酸是高能磷酸化合物的底物。另外,组氨酸为有效的非渗透性因子,可防止内皮细胞肿胀。组氨酸/组氨酸盐缓冲系统有较强的缓冲

能力,缓解酸中毒。菌丝体分泌的大量酶,广泛参与人体的物质代谢和能量代谢。对于离体心脏的保存,这些酶的作用,一方面,促进物质的充分吸收与转换,提高营养物质的利用率。另一方面,其加快物质和能量代谢的作用,不利于保存心脏的能量储备。这可能是本实验,灵芝的有效保存浓度较高的原因之一。

#### 参 考 文 献

- 1 Jjahlania MS, Sanchez JA, Narayan P, et al. Heart preservation for transplantation: principles and strategies. *Ann Thorac Surg*, 1999; 68(5): 1983—1987.
- 2 Belzer FO, Southard JH. Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation* 1988; 45: 673—676.
- 3 夏一鲁,胡学常,董为伟. 灵芝对大鼠缺血性脑损害的预防性保护作用研究. *临床神经病学杂志* 1999; 12(1): 12—14.
- 4 北京医学院药理教研组. 灵芝的药理研究 I. *北京医学院学报* 1974(4): 246—254.
- 5 郑惠华. 灵芝对小鼠脂质过氧化的影响. *中成药* 1999; 21(7): 367—369.
- 6 娄宁,周玫,陈瑗. 云芝多糖对小鼠心、肝、脾、肾和红细胞抗氧化能力的影响. *中国药理学通报* 1996; 12(5): 425—426.
- 7 庞战军,周玫,陈瑗. 云芝多糖对小鼠腹腔巨噬细胞 NO 释放及抗氧化酶活性的影响. *第一军医大学学报* 1997; 17(2): 115—117.

(收稿 2002-12-04 修回 2003-02-28)

#### 第二届中日韩血瘀证及活血化瘀学术大会征文通知

经中国科学技术协会批准,中国中西医结合学会拟与日本东洋医学会、韩国东医病理学会于 2003 年 11 月 22~24 日在北京共同主办“第二届中日韩血瘀证及活血化瘀学术大会”。征文内容(1)血管源性疾病(包括微循环、大中血管病变)的血瘀证及活血化瘀研究(2)心脑血管疾病及疑难病的活血化瘀临床研究(3)血瘀证及活血化瘀基础研究(4)血瘀证诊断辨证与现代分类。

征文要求全文及 1 000 字以内的中英文摘要各 1 份,最好打印或附软盘。截稿日期 2003 年 9 月 15 日。来稿请寄:北京中日友好医院中医心肾科(邮编 100029)杜金行、贾海忠。联系方式:电话 010-64221122 转 2421、2435;传真 010-64217749;E-mail: shixz@95777.com