· 论著·

维拉帕米和生脉注射液抗 大鼠肝脏缺血/再灌注损伤的作用研究

山 峰¹,李 堃¹,马承泰¹,韩小宁¹,孙运波¹,吴力群¹,王 静²,王秋波² (1.青岛大学医学院附属医院,山东 青岛 266003; 2.青岛大学医学院分子与细胞免疫学教研室,山东 青岛 266003)

【摘要】目的:观察维拉帕米和生脉注射液对大鼠肝脏缺血/再灌注(I/R)损伤的保护作用。方法:将 40 只大鼠随机分为假手术组、I/R 组、维拉帕米组和生脉注射液组,每组 10 只。采用夹闭左肝蒂 30 min 后开放再关腹制备大鼠肝 I/R 损伤模型。维拉帕米组开腹前 10 min 经尾静脉注射维拉帕米 1.25 mg/kg;生脉注射液组开腹前 3 d 每日向腹腔内注射生脉注射液 5 ml/kg。各组均在关腹 48 h 后再开腹,每只大鼠取缺血肝组织并由腹主动脉抽血,检测丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、丙二醛(MDA)、肿瘤坏死因子— α (TNF— α)、热休克蛋白 70(HSP70)的变化;并在光镜下观察肝组织的形态变化。结果;与假手术组比较,I/R 组 ALT、AST、TNF— α 和 MDA 水平均显著升高 (P 均<0.05);维拉帕米组和生脉注射液组 ALT、AST、TNF— α 和 MDA 均显著低于 I/R 组,但显著高于假手术组 (P 均<0.05);而维拉帕米组和生脉注射液两组之间除 ALT 有差异外,其余指标差异无显著性。维拉帕米组和生脉注射液组 HSP70 的表达略少于生脉注射液组。肝组织切片观察显示,维拉帕米组和生脉注射液组肝细胞肿胀、坏死程度均较 I/R 组轻。结论:维拉帕米和生脉注射液可明显改善大鼠肝脏 I/R 后肝组织的损伤程度。

【关键词】 维拉帕米;生脉注射液;缺血/再灌注损伤,肝

中图分类号:R285.5;R256.4 文献标识码:A 文章编号:1008-9691(2007)01-0035-05

Study of protective effect of verapamil and Shengmai injection (生脉注射液) on ischemia/reperfusion injury in rat liver SHAN Feng¹, LI Kun¹, MA Cheng-tai¹, HAN Xiao-ning¹, SUN Yun-bo¹, WU Li-qun¹, WANG Jing², WANG Qiu-bo². 1. The Affiliated Hospital of Medical College, Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong, China; 2. Department of Molecular and Cellular Immunology, Medical College of Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong, China

【Abstract】 Objective: To observe the protective effect of verapamil and Shengmai injection (生脉注射 液) on ischemia/reperfusion (I/R) injury in rat liver. Methods: A rat model of liver I/R injury was established. Ischemia of the left lobe was created by total inflow occlusion for 30 minutes followed by perfusion. Forty healthy Wistar rats were randomly divided into four groups as follows: sham operation group, I/R group, verapamil group pretreated with verapamil (1.25 mg/kg) by caudal vein injection 10 minutes before ischemia and Shengmai injection group pretreated with Shengmai injection (5 ml • kg⁻¹ • day⁻¹) by intraperitoneal injection for 3 days before ischemia. Forty-eight hours after I/R, the liver tissues were obtained for light microscopic study and blood was drawn for examinations. The heat shock protein 70 (HSP70) expression level was determined by Western blotting. Malondialdehyde (MDA) was measured by TBA colorimetric method. Serum levels of tumor necrosis factor - α (TNF - α) was determined using radioimmunoassay kit, and alanine aminotrasferase (ALT) and aspartate aminotrasferase (AST) were measured by full-automatic biochemical analyzer. Results: Compared with sham operation group, levels of ALT, AST, TNF - α and MDA were significantly increased in I/R group (all P<0.05). The levels of ALT, AST, TNF - a and MDA in verapamil group and in Shengmai injection group were significantly lower than those in I/R group and significantly higher than those in sham operation group (all P < 0.05), but no significant differences were found between verapamil group and Shengmai injection group except for ALT. HSP70 expression levels in verapamil group and Shengmai injection group were obviously lower than that in I/R group, and slightly lower in verapamil group than that in Shengmai injection group. The liver cellular edema, necrosis degree in verapamil group and Shengmai injection group were effectively alleviated compared with those in I/R group. Conclusion: Verapamil and Shengmai injection administered before ischemia could effectively protect the rat liver from I/R injury.

[Key words] verapamil; Shengmai injection; hepatic ischemia/reperfusion injury

肝脏缺血/再灌注(I/R)损伤在休克复苏、严重肝外伤、肝门阻断肝切除以及肝移植等过程中均不可避免地遭遇肝脏的 I/R 损伤,而它造成的组织损伤是影响上述疾病治疗效果的重要原因之一。因此,如何减轻肝脏 I/R 损伤是目前肝脏外科特别是移植外科的研究热点。导致肝脏 I/R 损伤的原因很多,确切的发病机制仍不十分清楚。本研究拟用维拉帕米和生脉注射液通过动物实验了解其对肝脏 I/R 损伤的保护作用。

1 材料与方法

- 1.1 动物分组: 雌性 Wistar 大鼠 40 只,体重 180~220 g,由河南医科大学实验动物中心提供。按随机数字表法分为假手术组、I/R 组、维拉帕米组和生脉注射液组 4 组,每组 10 只。
- 1.2 实验方法:假手术组大鼠行剖腹 30 min 后再 关腹; I/R 组大鼠行剖腹后,用无创血管夹夹闭大鼠 左肝蒂 30 min,然后关腹;维拉帕米组大鼠经尾静 脉缓慢注射维拉帕米(1.25 mg/kg),10 min 后开 腹,其余方法同 I/R 组;生脉注射液组大鼠于剖腹 前 3 d 每日向腹腔内注射生脉注射液(5 ml/kg),剖 腹前 30 min 再向腹腔内注射相同剂量的生脉注射 液,其余方法同 I/R 组。均用质量分数为 3%的戊巴 比妥钠 30 mg/kg 腹腔内注射麻醉。4 组大鼠在关腹 48 h 后再开腹,每只大鼠均取缺血肝组织两块, 分别放入无菌的小瓶中,一瓶送检热休克蛋白 70 (HSP70)、丙二醛(MDA),另一瓶用体积分数为 10%的甲醛溶液固定以备制作病理切片;由腹主动 脉抽血,分离血清,检测血中肿瘤坏死因子-α (TNF-α)、丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨 酶(AST)。
- 1.3 指标检测方法:①ALT、AST 用全自动生化分析仪测定。②采用顺序饱和液相竞争放射免疫分析法检测血清中 TNF α 含量,放射免疫分析试剂盒为北京中国原子能科学研究院产品。③用硫代巴比妥酸法检测缺血肝组织匀浆中 MDA 的含量,试剂 盒为南京建成生物工程研究所产品。④用蛋白质免

疫印迹法(Western blotting)检测缺血肝组织中HSP70的表达,抗HSP70单克隆抗体(一抗)和辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗小鼠IgG(二抗)购自美国SANA CRUZ公司中国代理-北京中山生物技术有限公司。⑤缺血肝组织用10%甲醛溶液固定,石蜡包埋、切片,苏木素-伊红(HE)染色,光学显微镜下观察肝组织形态学,并照相。

1.4 统计学方法:全部数据用 SPSS11.0 统计软件处理,计数资料以均数 \pm 标准差 $(\overline{x}\pm s)$ 表示,采用方差分析和 q 检验,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

- 2.1 制模情况:因手术操作不当造成血管损伤,导致 I/R 组大鼠死亡1只,维拉帕米组和生脉注射液组大鼠各死亡2只。
- 2.2 各组 ALT、AST、TNF α 、MDA 水平的比较 (表 1):与假手术组比较,I/R 组血中 ALT、AST、TNF α 和 MDA 水平均显著升高 (P 均<0.05)。与 I/R 组比较,维拉帕米组和生脉注射液组各指标水平均显著降低,但较假手术组较高 (P 均<0.05),且生脉注射液组 ALT 水平较维拉帕米组显著增高 (P<0.05)。
- 2.3 各组 HSP70 的表达(图 1):图中显示,各组 HSP70 的带宽和颜色深浅均不同,假手术组的色带 最窄、颜色最淡,提示有微量的 HSP70 表达;I/R 组 的色带最宽、颜色最浓,提示 HSP70 的表达量最多;而维拉帕米组和生脉注射液组的色带较窄、颜色较浓,介于两者之间,与 I/R 组比较有明显区别;维拉帕米组 HSP70 的表达又略弱于生脉注射液组。



A: 假手术组;B:I/R组;C:维拉帕米组;D:生脉注射液组 图 1 各组 HSP70 的表达变化

Figure 1 Change of HSP70 expression in each group

表 1 各组 ALT、AST、TNF - α 和 MDA 水平的比较($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of levels of ALT, AST, TNF - α and MDA in each group $(\bar{x} \pm s)$

组别	动物数(只)	ALT(U/L)	AST(U/L)	TNF-a(ng/L)	MDA(μmol/L)
假手术组	10	60.60± 9.95	151. 30±33. 99	131. 44±38. 63	0.87±0.16
I/R 组	9	$183.89 \pm 27.90 \times$	331.11±49.51*	$177.56 \pm 24.50 \times$	1.31±0.22*
维拉帕米组	8	109.13±18.91*△	269. 50 \pm 51. 95* \triangle	143.69 \pm 16.94 $\times \triangle$	1.11±0.10*△
生脉注射液组	8	131.75±26.23*△#	281. 63 \pm 52. 54 $\times \triangle$	146.14±14.39*△	1.15±0.08*△

注:与假手术组比较:*P<0.05;与 I/R 组比较: $^{\triangle}P$ <0.05;与维拉帕米组比较: $^{\#}P$ <0.05

2.4 各组大鼠肝组织病理学改变(彩色插页图 2): 假手术组肝组织形态正常; I/R 组大量肝细胞明显肿胀,中央静脉周围肝细胞大量坏死;维拉帕米组和生脉注射液组病理改变较 I/R 组明显减轻,肝细胞轻度肿胀,中央静脉周围肝细胞呈小灶状或小片状坏死,两组之间无明显区别。

3 讨论

目前,有关肝脏 I/R 损伤发病机制的研究主要 集中在细胞内钙超载和氧自由基生成增多方面[1-3], 认为肝脏 I/R 时肝细胞 Na+-K+-ATP 酶活性降 低,膜通透性增加,ATP产生减少,致大量 Ca2+进 入细胞内、且排出减少,Ca2+激活细胞膜上的蛋白酶 和磷脂酶,破坏细胞膜的完整性,并且干扰线粒体的 氧化磷酸化,引起严重的能量代谢障碍,导致肝细胞 不可逆性损害。肝脏 I/R 过程中 ATP 分解代谢增 加,分解产物次黄嘌呤大量堆积,产生大量氧自由 基;缺氧也使内源性超氧化物歧化酶(SOD)失活或 耗尽。SOD 是体内作用强大的抗氧化剂,缺血性刺 激能激活 Ca2+依赖蛋白酶,促进细胞内产生有害的 黄嘌呤氧化酶,后者利用胞内分子氧产生大量的氧 自由基;细胞缺血、缺氧也可促进线粒体产生大量氧 自由基冠。大量的氧自由基能损伤肝细胞膜的完整 性,直接损伤肝细胞,还引起血小板、粒细胞在微血 管中的黏附和聚集,造成微循环障碍⁽⁵⁾;氧自由基可 直接氧化肝实质细胞核内 DNA 双链结构,引起 DNA 突变而造成肝脏结构和功能的损伤^[6]。

HSP 是细胞受应激原刺激后诱导产生的一组应激蛋白,一般认为 HSP70 可以提高细胞的应激能力,抵御各种损害因素的影响,起到保护细胞的作用。罗东林等^(?)研究表明,HSP70 在创伤后即开始在肝组织中表达,创伤后 8 h 仍维持较高水平,提示HSP70 可能是创伤后早期参与肝组织细胞抗损伤机制的一个重要因素,并可能参与了肝组织细胞损伤机制的启动。

目前预防肝脏 I/R 损伤的研究仍以药物为多。本实验中选用钙通道拮抗剂维拉帕米和中药制剂生脉注射液,观察这两种药物对肝脏 I/R 损伤大鼠的保护作用。维拉帕米为 Ca²+阻滞剂,Nauta 等^[8]最早将其应用于肝缺血/再灌注损伤大鼠的保护,发现维拉帕米在肝脏缺血前给药可明显减轻再灌注的损伤程度。本实验结果显示,维拉帕米组的 ALT、AST、TNF-α和 MDA 水平显著低于 I/R 组,HSP70 的表达少于 I/R 组,组织病理学检查亦显示肝细胞肿胀轻,呈小灶状坏死,而 I/R 组表现为大量肝细胞

坏死,提示维拉帕米组肝损伤的程度较 I/R 组明显减轻,与文献^⑤报道相符。

生脉注射液的有效成分为人参皂甙、麦冬皂甙、 麦冬黄酮和五味子素,中医认为上述有效成分有益 气生津,复脉固脱之效。国内应用生脉注射液对器官 和组织 I/R 损伤的保护研究多集中在心、肺、肠黏 膜以及休克状态下的器官保护方面,而对肝脏 I/R 损伤保护研究的报道则少见。近年来通过对生脉注 射液的现代药理研究发现,其有耐缺氧、改善微循 环、抗炎、减轻对免疫功能的影响、改善呼吸功能和 增强心肌收缩力的作用(10)。对动物肠黏膜 I/R 损伤 保护作用的研究发现,生脉注射液能通过"多靶作 用"发挥肠黏膜保护效应,如清除氧自由基,调节细 胞内钙稳态,抑制一氧化氮(NO)活性,增加肠黏膜 灌注及氧合[11]。本实验中应用生脉注射液在大鼠肝 缺血前给药,观察到 ALT、AST、TNF-α和 MDA 等指标均较 I/R 组显著好转, HSP70 的表达比 I/R 组少,组织病理学检查也显示肝细胞肿胀轻、坏死范 围小,提示生脉注射液对大鼠肝脏 I/R 损伤有明显 的保护作用。

综上所述:用维拉帕米和生脉注射液预处理的 大鼠其肝脏 I/R 损伤程度比未经药物处理的大鼠 明显减轻,其主要表现在抗炎症介质 TNF - α,减轻 肝脏组织氧化损伤程度,减少 HSP70 表达等方面, 为两种药物在临床上的应用提供了实验依据。

参考文献:

- [1]梁浩晖,王成友,倪勇. 肝脏缺血再灌注损伤发生机制的研究进展 [J]. 肝胆外科杂志,2002,10(6),478-479.
- [2]王万铁,林丽娜,王卫,等. 川芎嗪对肝缺血/再灌注损伤时黄嘌呤 氧化酶活性的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志,2003,10(6): 340-342.
- [3]王万铁,王卫,徐正 祄,等. 肝缺血/再灌注损伤中脂质过氧化反应及左旋精氨酸的干预作用[J]. 中国危重病急救医学,2003,15 (2):91-93.
- (4) Clavien P A, Harvey P R, Strasberg S M. Preservation and reperfusion injuries in liver allografts; an overview and synthesis of current studies (J). Transplantation, 1992, 53(5):957 978.
- (5) Vollmar B, Richter S, Menger M D. Leukocyte stasis in hepatic sinusoids. (J)Am J Physiol, 1996, 270(5 pt 1): G798 803.
- (6) Loft S, Larsen P N, Rusmussen A, et al. Oxidative DNA damage after transplantation of the liver and small intestine in pigs (J).

 Transplantation, 1995, 59(1):16-20.
- [7]罗东林,周继红,刘宝华,等.糖皮质激素受体和热休克蛋白 70 在 大鼠创伤失血性休克肝组织中的变化及其意义[J].中国危重病 急救医学,2005,17(11):651-653.
- [8] Nauta R J, Tsimoyiannis E, Uribe M, et al. The role of calciumions and calcium channel entry blockers in experimental ischemia-reperfusion-induced liver injury (J). Ann Surg, 1991, 213(2):137-142.
- (9) Ohira H, Ueno Y, Sakamoto M, et al. Expression of intercellular

adhesion molecule -1(ICAM -1) on cultured rat liver sinusoidal endothelial cells by tumor necrosis factor - α and interlrulin - 1 (M)//Knook D L, Wisse E. Cells of the hepatic sinusoid, The Netherlands : Leiden . 1993 . 79.

[10]梁爱武,黄国东.生脉注射液的临床应用与药理研究近况[J].

现代中西医结合杂志,2002,11(10):987-988.

〔11〕夏中元,罗涛,夏芳,等. 生脉注射液对肠粘膜再灌注损伤保护作用 机制的实验研究(I). 中华麻醉学杂志,2001,21(5):299-301.

(收稿日期:2006-10-20 修回日期:2006-12-01)

(本文编辑:李银平)

・基层园地・

联用葛根素和参麦注射液治疗急性心肌梗死的临床观察

江伟芬,丁律中 (浙江省缙云县第二人民医院,浙江 缙云 321404)

【关键词】 葛根素注射液;参麦注射液;心肌梗死,急性

中图分类号:R285.6;R256.22 文献标识码:B 文章编号:1008-9691(2007)01-0038-01

我院 2002-2005 年采用葛根紊和 参麦注射液联合静脉滴注(静滴)治疗 38 例急性心肌梗死(AMI)患者,疗效较 好,现报告如下。

1 临床资料

- 病例:38 例患者中男 30 例,女 8例;年龄46~72岁,平均59岁。临床 诊断均符合 WHO 制定的标准:有典型 的临床表现、特征和心电图变化;肯定的 血清心肌酶学异常;3项中具备2项即 可诊断。
- 1.2 治疗方法及结果:患者均在心电监 护下卧床休息,吸氧,葛根素和参麦注射 液联合并配合硝酸甘油、极化液等静滴, 口服复方丹参滴丸、速效救心丸、通心络 胶囊、阿司匹林等心血管病常用药物。 38 例患者中除 2 例猝死外(院内、外各 1例),余均存活,救治成功率为94.7%。
- 1.3 典型病例
- 1.3.1 例 1. 患者男性,61 岁,因心前区 疼痛、憋闷、气短3d,加重1h入院。查 体:体温 35 °C,脉搏 45 次/min,血压 65/40 mm Hg(1 mm Hg=0.133 kPa);心电图示前间壁、下壁 AMI。实验室检 查:天冬氨酸转氨酶(AST)230 U/L,肌 酸激酶(CK)876 U/L,肌酸激酶同工酶 (CK-MB)317 U/L。给予心电监护、吸 氧,联用葛根素注射液 0.4g、参麦注射 液 30 ml 及硝酸甘油 8 mg 静滴,多巴胺 20 mg 微泵输注维持 8 h,同时辅以丹参 注射液、极化液、能量合剂、抗生素静滴,

作者简介: 江伟芬(1973-), 女(汉族), 浙江省人,主治医师(Email: jydwp@163. com).

口服速效救心丸、通心络胶囊,葛根素注 射液、参麦注射液用 15 d,硝酸甘油间断 维持 6 d。3 h 后症状有所减轻,但胸闷持 续7d才缓解,症状完全消失后下床活 动,住院15d出院,随访至今无异常。

1.3.2 例 2. 患者女性,52 岁,因心前区 憋闷、疼痛,伴气短、大汗1h而急诊入 院,入院前曾口服速效救心丸20粒。入 院后查体:患者意识清楚,痛苦面容,面 色苍白,四肢湿冷,体温低于 35 ℃,脉搏 48次/min,血压 70/50 mm Hg,心率 48次/min,律齐,心音低钝;心电图示下 壁 AMI。实验室检查: AST 159 U/L, CK 623 U/L, CK - MB 180 U/L。予吸 氧,心电监护,联合静滴葛根素和参麦注 射液,辅以能量合剂、极化液静滴,硝酸 甘油、多巴胺微泵输注,口服通心络、阿 司匹林等,住院月余,症状消失出院,随 访至今无不适。

2 讨论

AMI 的治疗以积极抢救"边缘带" 频死心肌,缩小梗死面积,增加心肌氧 供,减少氧耗,保护心肌细胞,减少其凋 亡、坏死为目的[1]。葛根素注射液主要为 异黄酮化合物单体,它可使正常或痉挛 的冠状动脉扩张,降低血液黏度,改善微 循环障碍,提高心肌氧摄取能力,改善正 常及缺血心肌的代谢,保护内皮细胞,减 慢心率,增加心肌收缩力(2-4)。说明再灌 注前给予葛根素注射液可明显减少细胞 凋亡(5)。

参麦注射液主要由人参、麦冬组成, 其大补元气,使气足血运通畅,活血化瘀 而缓解症状;益气养阴,提高机体免疫 力,改善心脏功能。临床观察表明,参麦

注射液具有增强心肌收缩力、增加心排 血量、减慢心率、扩张外周血管的作用, 使心肌耗氧指数明显下降,同时还具有 正性肌力作用,改善心肌缺血、缺氧,从 而减少心肌细胞凋亡、坏死〔6〕。大剂量参 麦注射液(1 ml/kg)是治疗 AMI 合并泵 衰竭安全有效的辅助药物(7)。

综上所述,对 AMI 患者联合应用葛 根紊和参麦注射液静滴,可使患者病情 迅速缓解和稳定,并对增加冠状动脉血 流,改善心肌缺血、缺氧,降低心肌酶有 肯定的疗效。

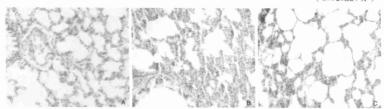
参考文献:

- [1]黄晓莉,王燕妮. 急性心肌梗死的治疗进 展 — 从再通到再灌注(J), 心血管病学 进展,2005,26(2):113-115.
- [2]赵虹,魏嘉平,李耘,等.普乐林注射液对 急性心肌梗死患者心肌梗死面积和缺血 总负荷的影响[J]. 中国中西医结合急救 杂志,2001,8(6),367-369.
- [3]石瑞丽,张建军. 葛根素对缺氧性血管内 皮细胞凋亡的保护作用(J). 药学学报, 2003,38(2):103-107.
- [4]高秀荣,王春梅,秦桂云,等. 葛根素注射 液改善冠心病微循环的临床观察〔J〕. 中 国微循环,2002,6(4),216-217.
- [5]刘琦,常志文,卢玲巧,等. 葛根蒙对心肌 缺血再灌注损伤的影响〔J〕. 中国药学杂 志,2000,35(9):642.
- 〔6〕李刚. 参麦注射液治疗冠状动脉粥样硬化 性心脏病伴左心衰竭 45 例(J), 中国中西 结合急救杂志,1999,6(3):116.
- [7]洪岩,白琴,肖绍新. 大剂量参麦注射液治 疗急性心肌梗死后泵衰竭(附 163 例报 告)[J]. 中国综合临床,2001,17(3):182-183.

(收稿日期:2006-09-05) (本文编辑:李银平)

丹参注射液对"二次打击"急性肺损伤大鼠的保护作用

(正文见29页)

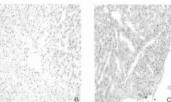


A:正常组;B:模型组;C:丹参干预组 图1 3組肺组织病理变化(HE,×400) Figure 1 Change of pathology of lung tissues in three groups (HE,×400)

维拉帕米和生脉注射液抗大鼠 肝脏缺血/再灌注损伤的作用研究

(正文见35页)





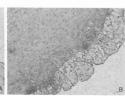


A:假手术组:B:1/R组:C:维拉帕米组:D:生脉往射液组 图2 各组大鼠肝组织病理学改变(HE,×100) Figure 2 Change of pathology of rats liver tissues in each group (HE,×100)

冠心康颗粒对高同型半胱氨酸血症致免动脉粥样硬化 作用的实验研究

(正文见51页)

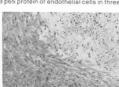


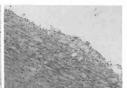




A L 定常对照组、B 模型组、C 设心 集俗介组 图2 3组主动脉内皮细胞NF - kB p65蛋白的表达(免疫组化、×100) Figure 2 Expression of NF - kB p65 protein of endothelial cells in three groups (immunochemistry, ×100)







A,正常对照组。B,模型组。C;短心集治疗组 图3 3组主动脉病理形态学观察(HE、×100) Figure 3 Observation of pathomorphology of aorta in three groups (HE、×100)