

丹参酮 II_A 磺酸钠注射液对大鼠急性心肌缺血预处理 VEGF 的影响

李小燕¹ 杜成芬¹ 肖敏¹ 夏俊琳¹ 赵娟¹ 何华琼²

(1 湖北省十堰市太和医院急诊科, 十堰, 442000; 2 湖北医药学院机能实验室, 十堰, 442000)

摘要 目的: 观察丹参酮 II_A 磺酸钠注射液对大鼠急性心肌缺血/再灌注损伤缺血预处理后血管内皮生长因子(Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF)表达的影响。方法: 16 只健康大鼠随机分为缺血/再灌注组、丹参酮预处理组, 丹参酮预处理组经尾静脉注射 1% 丹参酮 II_A 磺酸钠注射液, 缺血/再灌注组给予等体积生理盐水预处理。于预处理 14 d 后采用结扎左侧冠状动脉前降支 30 min 再复灌 30 min 的方法建立大鼠急性心肌缺血/再灌注损伤模型。检测缺血预处理前后静脉血超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD)、过氧化氢酶(Catalase, CAT)活性及缺血心肌组织丙二醛(Malondialdehyde, MDA)、心肌缺血区组织 VEGF 及 VEGF-mRNA、缺氧诱导因子-1 α (Hypoxia Inducible Factor-1 α , HIF-1 α)及 HIF-1 α mRNA、受体胎肝激酶-1(Fetal Liver Kinase 1, FLK-1)及 FLK-1mRNA 表达。结果: 与缺血/再灌注组比较, 丹参酮预处理组 VEGF 及 VEGF-mRNA、FLK-1、FLK-1mRNA、HIF-1 α 、HIF-1 α mRNA 的表达均明显增强, SOD 及 CAT 活性明显提高, MDA 降低($P < 0.05$)。结论: 丹参酮 II_A 磺酸钠预处理可提高 VEGF 表达及超氧化物歧化酶活性, 对急性心肌缺血/再灌注损伤大鼠心肌有一定的保护作用。

关键词 丹参酮 II_A 磺酸钠; 急性心肌缺血预处理; 血管内皮生长因子

Effect of Sodium Sulfonate II_A Sulfonate Injection on VEGF of Rats with Acute Myocardial Ischemia Preconditioning

Li Xiaoyan¹, Du Chengfen¹, Xiao Min¹, Xia Junlin¹, Zhao Juan¹, He Huaqiong²

(1 Department of emergency, Hubei Shiyuan Taihe Hospital Affiliated Hospital to Hubei Medical College, Shiyan 442000, China; 2 Hubei Medical College, Shiyan 442000, China)

Abstract Objective: To observe the effect of sodium sulfonate A sulfonate injection on the expression of vascular endothelial growth factor(VEGF) in rats with acute myocardial ischemia / reperfusion injury. **Methods:** Sixteen healthy rats were randomly divided into two groups, ischemia / reperfusion group and Salvia miltiorrhiza group. The two rats were treated with 1% sodium sulfonate II_A sulfonate injection and sodium chloride injection from caudal vein. After fourteen days, rats underwent a 30 min left anterior descending coronary artery occlusion and a 30 min reperfusion. This process was repeated 3 times. Myocardial tissue and serum were assessed by Western blot, quantitative RT-PCR and assay kit. **Results:** The expression of FLK-1, FLK-1mRNA, HIF-1 α , HIF-1 α mRNA, VEGF and VEGF-mRNA were increased. The activity of SOD and CAT were significantly enhanced, however the content of MDA was decreased compared with IR. The difference showed statistically significant($P < 0.05$). **Conclusion:** Sodium Sulfonate A Sulfonate may enhance the expression of VEGF and the activity of SOD. It has certain protective effects on rats with acute myocardial ischemia / reperfusion injury.

Key Words Sodium Sulfonate A Sulfonate; Acute myocardial ischemia preconditioning; Vascular endothelial growth factor

中图分类号: R285.5 文献标识码: A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.10.046

VEGF 具有增加微、小静脉血管的通透性、促使血管内皮细胞分裂增殖及诱导血管生成再生等作用^[1]。在心肌缺血\再灌注中, VEGF 作为一种高度特异性的促血管生长因子也因缺血刺激而出现增高以弥补心肌缺血缺氧。由于 VEGF 具有促进血管内皮细胞增殖迁移再生、诱导多种血管活性物质合成并参与缺血心脏冠状动脉侧支循环形成的作用, 故 VEGF 在临床上常作为血管内皮功能的重要指标之

一^[2]。而急性心肌梗死(Cute Myocrdil Infrction, MI)是在冠状动脉病变如粥样硬化、梗阻的病理基础上导致冠状动脉血供急剧减少或中断, 使缺血区心肌严重而持久地急性缺血^[3]。近年来的流行病学统计数据表明我国 MI 发病率呈升高趋势^[4]。急性心肌梗死、冠脉溶栓术、冠脉搭桥术、心肌梗死再通术等疾病和手术常引起急性心肌缺血\再灌注损伤再灌注损伤^[5]。在发生心肌缺血\再灌注损伤再灌注损

伤前及时的进行干预(即缺血预处理)以减轻心肌缺血\再灌注损伤再灌注损伤显得尤其重要。近年来心肌缺血\再灌注损伤再灌注损伤的防治已取得了明确的成果,丹参酮Ⅱ_A磺酸钠注射液可提高心肌细胞耐缺氧能力,增强心肌收缩力,扩张冠状动脉进而改善心脏功能,预防和治疗血管再狭窄及缺血心肌保护等作用^[6]。为探讨丹参酮Ⅱ_A磺酸钠注射液对急性心肌缺血\再灌注损伤预处理后 VEGF 表达及心肌酶谱等的影响,我们建立大鼠心肌缺血\再灌注损伤模型,采用丹参酮Ⅱ_A磺酸钠对大鼠进行缺血预处理来研究其作用机制。

1 资料与方法

1.1 实验动物 SPF 级健康 Wistar 大鼠 16 只,鼠龄(50±5)d,体质量(180±50)g,采用随机数字表编号随机分随机分为缺血/再灌注组、丹参酮预处理组,每组 8 只($n=8$)。实验动物由湖北医药学院实验动物中心提供,实验动物设施使用许可证 SYXK(鄂)2011-0031,实验动物生产许可证 SCXK(鄂)2011-0008。动物房温度 18~25℃,湿度 50%~75%,12 h 交替光照,分笼饲养,自由饮水,普通饲料喂养,每日观察动物进食情况,称体重,及时清理粪便,本研究中动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.2 仪器及试剂 MDA、CAT、SOD 试剂盒(厂家:上海江莱生物科技有限公司,批号:KB13297),大鼠 VEGF 共调节趋化因子 1(VCC1)ELISA 试剂盒(厂家:上海酶联生物科技有限公司,产品货号:028457)。提取 mRNA 试剂及反转录试剂(美国 Invitrogen 公司)。丹参酮Ⅱ_A磺酸钠注射液粉(杭州正大青春宝药业有限公司,10 mg/瓶,国药准字 GR0532),使用前用蒸馏水配制成 1% 溶液并保存于 4℃ 冰箱备用。

1.3 缺血预处理方法 丹参酮预处理组大鼠在制备急性心肌缺血动物模型前 14 d 经尾静脉注射丹参酮Ⅱ_A磺酸钠注射液 2 mL/100 g/d,按此剂量连续预处理 14 d,缺血/再灌注组注射等量生理盐水。

1.4 急性心肌缺血动物模型制备 在经缺血预处理 14 d 后,参照文献^[7],所有动物在造模前夜停止喂食,不禁水,手套法抓取大鼠,碘伏消毒局部皮肤腹腔注射 2% 戊巴比妥钠(120 mg/kg)麻醉、腹部向上固定,接Ⅱ导联以记录Ⅱ导联心电图(EEG),接小动物呼吸机并调整潮气量使麻醉大鼠呼吸与之同步,于(5-6)肋间用手术刀开胸,剪开心包暴露心脏,用玻璃分针向右轻轻按压心脏,充分暴露冠状动脉前降支,用微创园缝合针自肺动脉圆锥进针、从左心

房边缘后外测出针,于缝合线与心脏前降支表面置一软管,然后拉紧缝合线结扎左侧冠状动脉前降支 30 min 再复灌 30 min,并反复 3 次阻断与再灌注的方法建立大鼠急性心肌梗死动物模型。此时心电图会立刻出现新的 Q 波并有 ST 段抬高、T 波高耸或倒置等 EEG 改变,大鼠术后存活 1 d 以上就可判断为造模型成功。

1.5 检测指标 参照文献^[8],分别于缺血预处理前后经大鼠眼眶静脉采血,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定 SOD、CAT 活性。参照文献^[9],在缺血预处理前及缺血预处理 14 d 后,3 组动物取血完毕后用手术剪断头处死动物,剪下心脏,取左心室部位心肌缺血区组织,暂存至 -30℃ 低温冰箱保存待测,以备 VEGF 蛋白分析。检测时取心肌缺血区组织标本研磨,以 3 000 r/min 高速离心(离心半径 70 mm)取上清液,严格按 SP 试剂盒说明操作,采用双抗体夹心 EUSA 法测定心肌缺血区组织 FLK-1 及 FLK-1mRNA、HIF-1 α 及 HIF-1 α mRNA、VEGF 蛋白质及 mRNA 的表达;采用酶联免疫吸附试验(ELISA)严格按试剂盒说明检测心肌缺血区 MDA 含量。

1.6 统计学方法 统计分析软件使用 SPSS 19.0,实验数据均以($\bar{x} \pm s$)表示,对于 2 组间的均数检验采用多因素方差分析,组间构成比差异检验采用 χ^2 检验,相应的多因素分析分别采用双向方差 Cmh χ^2 检验,两两比较采用 LSD- t 检验,以 $P < 0.05$,为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠 SOD、MDA、CAT 水平比较 缺血/再灌注组心肌缺血区 MDA 增高,血清 SOD、CAT 水平明显降低,与本组预处理前比较($P < 0.05$),差异有统计学意义。在缺血预处理 14 d 后丹参酮预处理组 MDA 降低、SOD、CAT 含量明显增高,与缺血/再灌注组及本组预处理前比较($P < 0.05$),差异有统计学意义,提示丹参酮Ⅱ_A磺酸钠注射液具有促进 SOD、CAT 的释放,增强组织对自由基清除活性酶,抑制脂质过氧化反应的作用。见表 1。

2.2 大鼠缺血区 VEGF、VEGFmRNA 表达比较 缺血/再灌注组在造模后 VEGF、VEGFmRNA 表达均有增强趋势,与本组预处理前比较($P < 0.05$),差异有统计学意义,提示缺血、缺氧可促进 VEGF 分泌。丹参酮预处理组在缺血预处理 14 d 后 VEGF、VEGFmRNA 表达明显增强,且明显高于缺血/再灌注组,与本组预处理前及缺血/再灌注组比较($P < 0.05$),差异有统计学意义。见表 2。

2.3 大鼠 HIF-1、HIF-1αmRNA 表达比较 在缺血预处理 14 d 后,缺血/再灌注组 HIF-1、HIF-1αmRNA 表达呈升高趋势,与本组预处理前比较 ($P > 0.05$)。丹参酮预处理组 HIF-1α、HIF-1αmRNA 比缺血/再灌注组增加更为明显,与本组预处理前及缺血/再灌注组比较 ($P < 0.05$),差异有统计学意义。见表 3。

2.4 大鼠 FLK-1、FLK-1mRNA 表达比较 缺血/再灌注组在缺血预处理 14 d 后,FLK-1、FLK-1mRNA 表达无明显变化,与本组预处理前比较 ($P > 0.05$),丹参酮预处理组 FLK-1、FLK-1mRNA 阳性表达均明显增强,与本组预处理前及缺血/再灌注组比较 ($P < 0.05$),差异有统计学意义。见表 4。

表 1 大鼠 SOD、MDA、CAT 水平比较 ($n = 8, \bar{x} \pm s$)

组别	时间	SOD (U/mL)	MDA (nmol/mL)	CAT (U/mL)
缺血\再灌注组	预处理前	227.34 ± 15.75	2.52 ± 0.24	14.51 ± 1.14
	预处理 14 d	120.29 ± 13.56 ^a	39.15 ± 3.49 ^a	6.96 ± 0.17 ^a
丹参酮预处理组	预处理前	222.97 ± 16.40	2.59 ± 0.19	14.53 ± 1.18
	预处理 14 d	170.29 ± 10.12 ^{ab}	6.47 ± 0.28 ^{ab}	19.47 ± 0.28 ^{ab}

注:与本组预处理前比较,^a $P < 0.05$;与缺血/再灌注组比较,^b $P < 0.05$ 。

表 2 大鼠预处理 VEGF、VEGFmRNA 表达比较 ($n = 8, \bar{x} \pm s$)

组别	时间	VEGF (Pg/mL)	VEGFmRNA
缺血\再灌注组	预处理前	55.47 ± 4.22	0.52 ± 0.07
	预处理 14 d	88.90 ± 7.39 ^a	0.86 ± 0.17 ^a
丹参酮预处理组	预处理前	56.50 ± 5.87	0.54 ± 0.08
	预处理 14 d	110.37 ± 9.12 ^{ab}	1.84 ± 0.24 ^{ab}

注:与本组预处理前比较,^a $P < 0.05$;与缺血/再灌注组比较,^b $P < 0.05$ 。

表 3 大鼠缺血预处理 HIF-1、HIF-1αmRNA 阳性表达比较 ($n = 8, \bar{x} \pm s$)

组别	时间	HIF-1α (PU)	HIF-1αmRNA
缺血\再灌注组	预处理前	5.78 ± 0.17	0.56 ± 0.08
	预处理 14 d	7.79 ± 0.22	0.45 ± 0.08
丹参酮预处理组	预处理前	5.82 ± 0.24	0.55 ± 0.08
	预处理 14 d	10.71 ± 0.29 ^{ab}	1.03 ± 0.15 ^{ab}

注:与本组预处理前比较,^a $P < 0.05$;与缺血/再灌注组比较,^b $P < 0.05$ 。

表 4 大鼠缺血预处理 FLK-1、FLK-1mRNA 表达比较 ($n = 8, \bar{x} \pm s$)

组别	时间	FLK-1 (PU)	FLK-1mRNA
缺血\再灌注组	预处理前	4.57 ± 0.19	6.97 ± 0.34
	预处理 14 d	4.69 ± 0.25	7.09 ± 0.32
丹参酮预处理组	预处理前	4.72 ± 0.21	7.05 ± 0.40
	预处理 14 d	8.76 ± 0.35 ^{ab}	10.58 ± 0.43 ^{ab}

注:与本组预处理前比较,^a $P < 0.05$;与缺血/再灌注组比较,^b $P < 0.05$ 。

3 讨论

丹参酮Ⅱ_A 磺酸钠注射液是从中草药丹参块茎

中纯化分离出的二萜醌类化合物经磺化反应而制成的灭菌注射液,主要药理成份有丹参酮甲酯、丹参酚酸及丹参酮Ⅱ_A 等^[10-11]。中医典籍《吴普本草》中记载其味辛性凉、具凉血消痈、活血通经之功效^[12],主治心肌腹痛^[13]。现代医学亦证实其中的丹参素及丹参酮Ⅱ_A 具有扩张心肌血管、增加缺血心肌组织血液流量,抑制缺血区组织细胞内钙超载而发挥心肌保护作用^[14]。

在本实验中,丹参酮预处理组 HIF-1α 及 HIF-1αmRNA、VEGF 蛋白及 mRNA、FLK-1 及 FLK-1mRNA 的阳性表达明显增强,这可能与丹参酮Ⅱ_A 磺酸钠注射液诱导缺血急性心肌的血管再生、扩张冠状动脉而改善微循环、增加冠脉灌注血流量,保证急性缺血心肌血液供应、活血化瘀的药性特征有关,另一方面也可能与其促进 Ca^{2+} -ATP 酶活性恢复,增强钠钾 ATP 酶活力,减少细胞内钙超载,并通过钠钾 ATP 酶调节钠氢交换来抑制钠钙交换,阻止 Ca^{2+} 内流,改善急性心肌组织能量代谢,进而改善急性心肌缺血而起到保护作用有关。由于机体代谢过程中产生有害过氧化氢等代谢产物,在发生脂质过氧化反应时对机体组织器官造成严重损害,而 CAT 是细胞催化过氧化氢分解成氧和水的酶,清除体内的过氧化氢,从而使细胞免于遭受过氧化氢的毒害,是生物防御体系的关键酶之一^[15]。实验观察到,丹参酮预处理组 MAD 明显降低,SOD、CAT 酶活性增强,说明丹参酮Ⅱ_A 磺酸钠注射液可增强 SOD 及 CAT 等自由基清除活性酶的活性^[16-17],抑制有害代谢产物过氧化氢造成的脂质过氧化反应,改善急性心肌组织的能量代谢,改善病灶缺血、水肿,促进细胞功能恢复,减轻缺血再灌注后组织损伤而起到急性心肌缺血/再灌注损伤保护作用。

参考文献

[1] 陈红英,李贤玉,王文杰,等. 参麦对大鼠急性心肌梗死血管内皮生长因子表达的影响[J]. 世界中医药,2015,10(9):1387-1390.

[2] 王勤,于俊民,张小波,等. 中药对缺血心肌血管内皮细胞生长因子、碱性成纤维细胞生长因子水平的影响[J]. 中国医药导报,2013,10(7):30-32.

[3] 陈灏珠,钟南山,陆再英,等. 内科学[M]. 8 版. 北京:人民卫生出版社,2013:237-255.

[4] 刘永国. 心肌梗死/再灌注损伤的机制研究进展[J]. 医学综述,2010,16(21):3267-3269.

[5] 邹海东,何英,李勇,等. 丹参酮Ⅱ_A 磺酸钠注射液辅助治疗老年舒张性心力衰竭的临床观察[J]. 中国实用医药,2007,9(10):131-132.

[6] 刘家军,李小燕,杜成芬,等. 丹参酮Ⅱ_A 磺酸钠对急性心肌梗死大鼠心肌组织间液钙离子与心功能的影响[J]. 安徽医药,2016,

- 20(4):643-646.
- [7]潘赞,钱进先,崔妍,等. 丹参酮Ⅱ_A 磺酸钠对大鼠心肌缺血-再灌注损伤的影响[J]. 中华急诊医学杂志,2016,25(7):864-870.
- [8]戴宁凰,陈伟,郑中锋,等. 丹参酮Ⅱ_A 后处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用研究[J]. 中国心血管病研究,2013,11(7):549-551,后插5.
- [9]吴冬鸣,唐燕,韩艺,等. 大鼠心肌缺血再灌注后不同时间点心脏及肝脏中 HIF-1、vegf 的表达[J]. 南京医科大学学报:自然科学版,2012,8(9):1047-1051.
- [10]岑坚,杨平地,沈建良,等. 参麦注射液对腹部开放伤合并海水浸泡犬血气和凝血的影响[J]. 中国医药导报,2012,9(32):84-86,90.
- [11]焦阳,李思铭,高铸烽,等. 丹参酮Ⅱ_A 磺酸钠注射液与冠心病炎症因子的研究进展[J]. 世界中医药,2013,8(12):1404-1406.
- [12]周松,陈腾,王青丽. 丹红注射液的药理作用与临床应用概述[J]. 中国药师,2008,11(8):987-989.
- [13]潘菊华,王彦云,张永超,等. 丹参抗抑郁作用新探[J]. 环球中医药,2014,7(7):489-490.
- [14]徐涛,张哲,王锦鹏,等. 丹参酮Ⅱ_A 磺酸钠联合阿托伐他汀对冠心病患者心功能、氧化应激及血管内皮功能的影响[J]. 河北医药,2015,37(24):3695-3698.
- [15]杨萍,李杰,周风华,等. 丹参酮Ⅱ_A 对过氧化氢损伤心肌细胞的保护作用及机制研究[J]. 时珍国医国药,2010,2(1):3-5.
- [16]刘大朋,毛静. 丹参酮Ⅱ_A 磺酸钠对心肌梗死患者溶栓治疗后心肌氧化应激损伤的保护作用研究[J]. 中国现代医学杂志,2014,24(19):96-99.
- [17]王策. 丹参酮Ⅱ_A 磺酸钠对大鼠心肌缺血再灌注脂质氧化的影响[J]. 中医临床研究,2015,7(31):4-6.

(2015-11-09 收稿 责任编辑:张文婷)

(上接第 2104 页)

- [4]郑庆山,马乐,易锦,等. 推拿治疗女性压力性尿失禁临床疗效观察[J]. 北京中医药,2012,31(12):889-891.
- [5]雷磊,玄英华,李萍. 压力性尿失禁动物模型两种建立方法比较[J]. 南京医科大学学报:自然科学版,2010,30(1):59-63.
- [6]廖国龙,傅强. 压力性尿失禁大鼠模型检测的研究现状[J]. 现代泌尿外科杂志,2010,15(1):76-78.
- [7]Reddy J, Paraiso MF. Primary stress urinary incontinence; what to do and why[J]. Rev Obstet Gynecol, 2010, 3(4):150-155.
- [8]郝明,善辉. 压力尿失禁解剖学发生机制的研究进展[J]. 临床误诊误治,2012,25(1):97-99.
- [9]那彦群,叶章群,孙光. 中国泌尿外科疾病诊断治疗指南[M]. 北京:人民卫生出版社,2011:156.
- [10]黄莉莉. 压力性尿失禁患者阴道组织神经肽表达的研究[D]. 福州:福建医科大学,2007.
- [11]王一兵,何剪太,冯永强,等. 蛋白基因产物 9.5 与神经丝蛋白标记瘢痕神经效果的比较[J]. 中国临床解剖学杂志,2010,28(3):327-329.
- [12]凌丽,薛金伟. 神经纤维标记物-蛋白基因产物 9.5 (PGP9.5) 的研究概况[J]. 中国老年学杂志,2010,30(21):3226-3228.
- [13]李柏文,李铁,胡秀武,等. 八髎穴的临床应用概况[J]. 针灸临床杂志,2012,28(12):61-65.
- [14]王玲玲,金洵. 重新认识八髎穴[J]. 南京中医药大学学报,2014,30(1):4-7.
- [15]梁远兰,卢丽琼,梁健桃,等. 温针灸治疗压力性尿失禁效果观察[J]. 护理学杂志,2009,24(13):49-50.
- [16]廖利民. 神经源性膀胱的治疗现状和进展[J]. 中国康复医学杂志,2011,26(3):201-205.
- [17]罗庆禄,王诗忠,陈岚榕. 针刺八髎穴对脊髓损伤神经源性膀胱患者残余尿量和排尿功能的影响[J]. 福建中医药大学学报,2012,22(1):12-14.

(2015-12-02 收稿 责任编辑:张文婷)