

· 基础研究 ·

葡萄糖酸锌对心肌缺血/再灌注损伤保护作用的动物实验研究*

刘 丹, 孙品兰, 罗明军, 黄 春, 张乐星, 谭祥惠

(重庆三峡医药高等专科学校, 重庆万州 404120)

摘要:目的 探讨葡萄糖酸锌(ZG)对心肌缺血/再灌注损伤保护作用及其机制。方法 将 50 只雄性 SD 大鼠随机分为 5 组,即假手术组,模型组,ZG 低、中、高剂量组。采用结扎冠状动脉左前降支,引起心肌缺血,放松丝线给予再灌注的方法建立心肌缺血/再灌注损伤模型。ZG 低、中、高剂量组,于末次灌胃 1 h 后行缺血 30 min,再灌注 60 min。于再灌注结束后取心肌组织测定钠-钾-三磷酸腺苷酶($\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$)、超氧化物歧化酶(SOD)活性、IL-1 β 、 Ca^{2+} 和丙二醛(MDA)含量。结果 与模型组相比,ZG 3 个剂量组大鼠心肌组织中 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 和 SOD 活性升高,IL-1 β 、 Ca^{2+} 和 MDA 含量降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 ZG 对缺血/再灌注心肌具有保护作用。可能与减轻脂质过氧化反应、改善心肌能量代谢、减轻钙超载及抑制炎症反应有关。

关键词:再灌注损伤;葡萄糖酸锌;钠-钾-ATP 酶;白细胞介素 1 β

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.05.017

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)05-0461-02

Animal experiment on cardioprotective effects of zinc gluconate on myocardial ischemia/reperfusion injury*

Liu Dan, Sun Pinlan, Luo Mingjun, Huang Chun, Zhang Lexing, Tan Xianghui

(Department of Pharmacology, Chongqing Three Gorges Medical College, Wanzhou, Chongqing 404120, China)

Abstract: Objective To investigate the protective effect of zinc gluconate on myocardial ischemia/reperfusion injury in rats and its possible mechanism. Methods Fifty SD rats were randomly divided into five groups: sham, model, ZG of low, middle and high dose groups. Left coronary artery braid, silk suture tense and silk suture slacken were adopted to establish the model of myocardial ischemia/reperfusion injury in anesthetized rats. At 1 h after the last administration, the rats of ZG three groups were ligated for 30 min and reperfused for 60 min in the left anterior descending branch of coronary artery. Myocardial tissue was collected at the end of reperfusion for detecting the activitise of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ and SOD, the contents of IL-1 β , Ca^{2+} and MDA. Results Compared with the model group, the three different dose groups of ZG increased the activitise of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ and SOD, decreased the contents of IL-1 β , Ca^{2+} and MDA. Conclusion ZG has protective effects on myocardial ischemia/reperfusion injury. The mechanism is the inhibition of hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) generation, the reduction of lipid peroxidation, the improvement of cardiac energy metabolism, the reduction of calcium overload and the inhibition of inflammatory response.

Key words: reperfusion injury; zinc gluconate; $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$; interleukin-1 β

心肌缺血/再灌注损伤既是不可预知的(如心肌梗死),也是不可避免的(如冠状动脉搭桥术、冠状动脉溶栓术、冠状动脉再通术等),所以探索其发生机制及防治药物越来越重要。有研究表明,锌可抑制 $\cdot\text{OH}$ 生成,对心脏、肝脏和脑等多种器官的缺血/再灌注损伤(IR)有保护作用。但关于葡萄糖酸锌(zinc gluconate, ZG)是否可以通过抑制 $\cdot\text{OH}$ 生成,减轻脂质过氧化反应,改善心肌能量代谢,进而减轻钙超载;减少细胞因子 IL-1 β 的释放,抑制炎症反应,保护缺血/再灌注损伤心肌,报道较少。所以本实验拟研究 ZG 对心肌缺血/再灌注损伤的保护作用及其机制。

1 材料与方 法

1.1 材料 SD 大鼠(重庆市中药研究院实验动物中心提供)50 只,雄性,体质量 250~280 g。主要试剂:ZG(天津市光复精细化工研究所);超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondraldehyde, MDA)、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 酶($\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$)试剂盒(南京建成生物工程研究所);大鼠 IL-1 β ELISA 试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)

1.2 方 法

1.2.1 心肌缺血/再灌注损伤实验模型的建立及其分组

1.2.1.1 分组 按随机化原则分为 5 组(每组 10 只):(1)ZG 3 个剂量组,即 167[1/15 半数致死剂量(LD_{50})], 250(1/10 LD_{50})、357(1/7 LD_{50})mg/kg 剂量组,分别以相应剂量 ZG(溶于蒸馏水中,2 mL)灌胃,每次 2 mL,上、下午各 1 次,依据 ZG 的半衰期($t_{1/2}$): $t_{1/2}$ (h)=2.46 \pm 0.30^[1],两次灌胃给药间隔时间为 2.5 h。于末次灌胃 1 h 后行冠状动脉左前降支结扎 30 min,再灌注 60 min。(2)模型组,给予 ZG 各剂量组等容量的生理盐水 4 mL 灌胃,其他处理同上。(3)假手术组,只穿线不结扎,其他处理同上。

1.2.1.2 模型制作 大鼠心肌缺血/再灌注损伤实验模型^[2]:取雄性 SD 大鼠,以乌拉坦(1 g/kg)腹腔注射。描记肢体 II 导联心电图。气管插管,自左侧第 1~3 肋开胸,采用人工呼吸机正压呼吸。暴露大鼠心脏后,拉紧结扎线,使硅胶管压迫冠状动脉左前降支而致闭塞 30 min,而后切断结扎线再灌注 60 min。冠状动脉断流及再通成功与否以心电图肢体导联的 ST

* 基金项目:重庆市教委科学技术研究项目(KJ092101)。

段抬高及恢复作为标准。

1.2.2 检测指标

1.2.2.1 大鼠心肌组织中 IL-1 β 含量的测定 于实验结束后立即取左室游离心肌组织 0.1 g, 用 4 $^{\circ}$ C 冰生理盐水将血液洗净, 按组织与生理盐水 1 : 9 的比例制备组织匀浆。离心 (3 000 r/min, 15 min), 取上清液备用。用 ELISA 法测定心肌组织中 IL-1 β 的含量。用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度 (OD 值)。操作步骤按武汉博士德生物工程有限公司试剂盒说明书进行。

1.2.2.2 大鼠心肌组织中 Na $^{+}$ -K $^{+}$ -ATPase 和 SOD 活性、MDA 和 Ca $^{2+}$ 含量的测定 于实验结束后立即取左室游离心肌组织 0.4 g, 制备组织匀浆, 取上清液备用。Na $^{+}$ -K $^{+}$ -ATPase 用比色法测定, SOD 用羟胺法测定, MDA 用硫代巴比妥酸法测定, 蛋白含量用考马斯亮蓝法测定, 操作步骤按南京建成生物工程研究所试剂盒说明书进行。Ca $^{2+}$ 用离子电极直接测定法, 在自动生化分析仪上测定。

1.3 统计学处理 采用 SPSS12.0 软件进行统计学处理。所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 ZG 对心肌缺血/再灌注损伤大鼠心肌组织中 Na $^{+}$ -K $^{+}$ -ATPase 活性、IL-1 β 和 Ca $^{2+}$ 含量的影响 与假手术组相比, 模型组大鼠心肌组织中 Na $^{+}$ -K $^{+}$ -ATPase 活性降低, IL-1 β 和 Ca $^{2+}$ 含量升高 ($P < 0.01$), 与模型组相比, ZG 3 个不同剂量组大鼠心肌组织中 Na $^{+}$ -K $^{+}$ -ATPase 活性升高 ($P < 0.01$), IL-1 β 和 Ca $^{2+}$ 含量降低 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠心肌组织中 Na $^{+}$ -K $^{+}$ -ATPase 活性、IL-1 β 和 Ca $^{2+}$ 含量的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Na $^{+}$ -K $^{+}$ -ATPase (U/mgprot)	IL-1 β (pg/mL)	Ca $^{2+}$ (mg/L)
假手术组	1.93 \pm 0.32	2 345.25 \pm 55.77	5.89 \pm 0.85
模型组	1.08 \pm 0.22 ^a	3 522.96 \pm 145.63 ^a	9.63 \pm 1.43 ^a
ZG 组 (ng/kg)			
167	1.56 \pm 0.21 ^b	3 020.38 \pm 128.35 ^b	7.49 \pm 1.47 ^c
250	1.69 \pm 0.21 ^b	2 832.40 \pm 78.69 ^b	6.94 \pm 1.25 ^b
357	1.85 \pm 0.33 ^b	2 642.10 \pm 107.70 ^b	6.27 \pm 1.14 ^b

^a, $P < 0.01$, 与假手术组相比; ^c, $P < 0.05$, ^b, $P < 0.01$, 与模型组比较。

表 2 各组大鼠心肌组织中 SOD 活性和 MDA 含量的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	SOD(U/mgprot)	MDA(nmol/mgprot)
假手术组	118.54 \pm 30.34	2.41 \pm 0.33
模型组	67.16 \pm 17.01 ^a	5.72 \pm 0.73 ^a
ZG 组 (mg/kg)		
167	80.86 \pm 16.01 ^c	3.34 \pm 0.41 ^b
250	90.95 \pm 24.95 ^b	2.89 \pm 0.29 ^b
357	101.11 \pm 13.56 ^b	2.58 \pm 0.37 ^b

^a, $P < 0.01$, 与假手术组比较; ^c, $P < 0.05$, ^b, $P < 0.01$, 与模型组比较。

2.2 ZG 对心肌缺血/再灌注损伤大鼠心肌组织中 SOD 活性

和 MDA 含量的影响 与假手术组相比, 模型组大鼠心肌组织中 SOD 活性降低和 MDA 含量升高 ($P < 0.01$), 与模型组相比 ZG 3 个不同剂量组大鼠心肌组织中 SOD 活性升高 ($P < 0.05$) 和 MDA 含量降低 ($P < 0.01$)。见表 2。

3 讨 论

心肌缺血/再灌注损伤是一个复杂的病理生理过程, 主要原因是在再灌注过程中产生了大量的氧自由基 (OFR)、Ca $^{2+}$ 超载、中性粒细胞浸润引起炎症反应, 能量代谢障碍、内皮细胞自稳态失衡^[3-5]。它们之间互为因果、互相影响。其中, OFR 和 Ca $^{2+}$ 超载成为细胞致死的主要原因^[6]。

心肌缺血/再灌注时, 因高能磷酸化合物减少而使 Na $^{+}$ -K $^{+}$ -ATPase 活性降低, 结果导致大量 Na $^{+}$ 经 L 型 Ca $^{2+}$ 通道进入细胞内, 细胞内 Na $^{+}$ 增高, 进而激活 Na $^{+}$ -Ca $^{2+}$ 交换机制, 使细胞内 Ca $^{2+}$ 增高。同时因能量不足, 使肌膜及肌浆网 (SR) 的 Ca $^{+}$ -ATPase 活性降低, 不能将肌浆中过多的 Ca $^{2+}$ 泵出或摄入肌浆网, 细胞外 Ca $^{2+}$ 内流, 最终导致 Ca $^{2+}$ 超载^[7-8]。Ca $^{2+}$ 与细胞质受体钙调蛋白结合后, 可激活蛋白酶, 使黄嘌呤脱氢酶转变成黄嘌呤氧化酶 (XO), 缺血时, 产生黄嘌呤。当再灌注后, 黄嘌呤在 XO 的作用下生成超氧阴离子自由基 (O $_2^{\cdot-}$) 及过氧化氢 (H $_2$ O $_2$), O $_2^{\cdot-}$ 除直接损伤细胞外, 还可通过 Haber-Weiss 反应转变成 \cdot OH, 然后经瀑布反应生成其他自由基^[9]。在 OFR 中主要是 \cdot OH 引起心肌损伤, 导致膜脂质过氧化, 再经过氧化物酶分解生成 MDA, 最终造成心肌纤维过度收缩, 三磷酸腺苷耗竭, 线粒体超微结构损害, 使依赖能量的离子泵活性降低, 进而促进钙超载。

IL-1 β 在心肌缺血/再灌注时表达水平增高。已有研究证实, 细胞因子 IL-1 β 和黏附分子 (ICAM-1) 在心脏移植后缺血/再灌注损伤的病理过程中起着重要作用^[10]。其引起心肌损伤的机制可能有: IL-1 可直接上调 ICAM-1 和内皮细胞黏附分子-1 (ELAM-1) 表达, 而 ICAM-1、ELAM-1 诱导中性粒细胞 (PMN) 黏附在内皮细胞和内皮下基质并穿过内皮迁移流入缺血区, 通过阻塞微血管、释放 OFR 等机制导致心肌细胞损伤, 使梗死过程加剧^[11]。同时 Ca $^{2+}$ 也能激活 PMN 引起呼吸爆发, 可产生大量的 OFR, 损伤细胞。

心肌缺血/再灌注时, 锌对黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶体系所引发的 OFR 有抑制作用, 它能减少铁离子进入细胞并抵制其在羟自由基引发的链式反应中的催化作用^[12], 有实验证实, 外源给锌可以明显减轻肝脏缺血/再灌注损伤, 抗脂质过氧化和抑制 ICAM-1/VCAM-1 表达是其作用的重要机制^[13]。心肌缺血/再灌注损伤时, 补锌组血清和心肌组织中 MDA 含量降低、SOD 活性升高^[14]。

本实验结果显示, 与模型组相比, ZG 3 个不同剂量组大鼠心肌组织中 SOD 活性升高和 MDA 含量降低。有研究表明, 在缺血/再灌注时, 及时补充能量, 可减少 OFR 的生成及减轻 Ca $^{2+}$ 超载, 促进心肌功能恢复。与模型组相比, Na $^{+}$ -K $^{+}$ -ATPase 活性升高, Ca $^{2+}$ 和 IL-1 β 含量降低。提示 ZG 对心肌缺血/再灌注损伤有保护作用, 其作用与抑制 \cdot OH 生成, 减轻脂质过氧化反应, 同时葡萄糖增加血液循环中糖酵解底物浓度, 促进心肌功能恢复, 升高 Na $^{+}$ -K $^{+}$ -ATPase 活性, 进而减轻 Ca $^{2+}$ 超载; 减少 IL-1 β 释放, 抑制炎症反应。本实验结果可为临床应用锌剂治疗心肌缺血/再灌注损伤提供一定的理论基础。

(下转第 465 页)

强于对照侧。术后 12 周,对照侧有 1 例自肌腱部分断裂,5 例从胫骨髓道拔出;实验侧有 3 例自肌腱部分断裂,3 例从胫骨髓道拔出。说明在干预措施影响下,术后腱-骨界面的愈合强度得到了增加,提示自体骨髓移植的有效性。实验中未见有从股骨侧拔出者,说明了骨块镶嵌式固定技术具有较高的固定强度,可以进一步在临床中应用^[13]。

参考文献:

- [1] 刘宁,刘建民,梁振雷,等.前入路关节镜下可吸收空心界面螺钉固定四股腓绳肌腱重建后交叉韧带[J].中国矫形外科杂志,2005,13(12):887-889.
- [2] Leung KS, Qin L, Fu LK, et al. A prospective study of bone to bone repair and bone to tendon healing in patella-patella tendon complex in rabbits[J]. Clin Biomech, 2002, 17(8):594-602.
- [3] Eriksson E. Vascular ingrowth into ACL-grafts[J]. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2008, 16(4):341-341.
- [4] Nebelung W, Becker R, Urbach D, et al. Histological findings of tendon-bone healing following anterior cruciate ligament reconstruction with hamstring grafts[J]. Arch Orthop Trauma Surg, 2003, 123(4):158-163.
- [5] Hays PL, Kawamura S, Deng XH, et al. The role of macrophages in early healing of a tendon graft in a bone tunnel[J]. J Bone Joint Surg Am, 2008, 90(3):565-579.
- [6] 曾春,蔡道章,王昆,等.关节镜下前交叉韧带重建术后的康复干预[J].中国临床康复,2005,9(14):1-3.
- [7] Lim JK, Hui J, Li L, et al. Enhancement of tendon graft

osteointegration using mesenchymal stem cells in a rabbit-model of anterior cruciate ligament reconstruction[J]. Arthroscopy, 2004, 20(9):899-910.

- [8] Muschler GF, Nitto H, Boehm CA, et al. Age and gender related changes in the cellularity of human bone marrow and the prevalence of osteoblastic progenitors[J]. J Orthop Res, 2001, 19(1):117-125.
- [9] Karaoglu S, Celik C, Korkusuz P. The effects of bone marrow or periosteum on tendon-to-bone tunnel healing in a rabbit model[J]. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2009, 17(2):170-178.
- [10] Berg EE, Pollard ME, Kang Q. Interarticular bone tunnel healing[J]. Arthroscopy, 2001, 17(2):189-195.
- [11] Demirag B, Sarisozen B, Ozer O, et al. Enhancement of tendon-bone healing of anterior cruciate ligament grafts by blockage of matrix metalloproteinases[J]. Bone Joint Surg Am, 2005, 87(11):2401-2410.
- [12] Tomita F, Yasuda K, Mikami S, et al. Comparisons of intraosseous graft healing between the doubled flexor tendon graft and the bone-patellar tendon-bone graft in anterior cruciate ligament reconstruction [J]. Arthroscopy, 2001, 17(5):461-476.
- [13] 张义龙,李 宁,李志怀.一端带骨块同种异体深冻下肢肌腱重建前交叉韧带的应用[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,15(7):1295-1299.

(收稿日期:2011-08-09 修回日期:2011-09-22)

(上接第 462 页)

参考文献:

- [1] 林秀云,郭琦.兔体内甘草酸锌和葡萄糖酸锌药动学比较[J].微量元素与健康研究,1994,11(1):4-5.
- [2] 齐志敏,王倩,张莹.大鼠心肌缺血/再灌注损伤实验模型开胸方法的研究[J].中国临床康复,2004,8(30):6620-6621.
- [3] Nagel E, Meyer Z, Vilsendorf A, et al. Antioxidative vitamins in revention of ischemia/reperfusion injury[J]. Int J Vit Nutr Rev, 1997, 67(5):298-306.
- [4] 王鹏,张燕,田玉科,等.等容血液稀释和川芎嗪在兔心肌缺血/再灌注损伤中的抗氧化作用[J].临床麻醉学杂志,2003,19(1):27-29.
- [5] 李峥,董志.金属硫蛋白及其对脑缺血/再灌注损伤的保护作用[J].重庆医学,2009,38(8):989-991.
- [6] 刘胜中.心肌缺血/再灌注损伤机制研究进展[J].实用医院临床杂志,2007,4(1):88-90.
- [7] Talukder MA, Kalyanasundaram A, Zhao X, et al. Expression of SERCA isoform with faster Ca²⁺ transport properties improves postischemic cardiac function and Ca²⁺ handling and decreases myocardial infarction[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007, 293(4):H2418-2428.
- [8] Gao H, Chen L, Yang HT. Activation of alpha1B-adrenoceptors alleviates ischemia/reperfusion injury by limita-

tion of mitochondrial Ca²⁺ overload in cardiomyocytes [J]. Cardiovasc Res, 2007, 75(3):584-595.

- [9] 司良毅,张远慧.钙超载、氧自由基和中性粒细胞与心肌缺血/再灌注损伤[J].重庆医学,1995,24(3):177-178.
- [10] Chandrasekar B, Smith JB, Freeman GL, et al. Ischemia-reperfusion of rat myocardium activates nuclear factor-kB and induces neutrophil infiltration via lipopolysaccharide-induced CXC chemokine[J]. Circulation, 2001, 103(18):2296-2302.
- [11] Saitoh M, Osanai T, Kamada T, et al. High plasma level of asymmetric dimethylarginine in patients with acutely exacerbate congestive heart failure; role in induction of plasma nitric oxide level[J]. Heart Vessels, 2003, 18(4):177-182.
- [12] 李烽,郭振荣,赵霖.锌在机体代谢中的作用[J].国外医学医学地理分册,1999,20(3):103-106.
- [13] 蒋与刚,王先远,郭长江,等.锌对肝缺血/再灌注损伤的对抗作用及其机制研究[J].中国病理生理杂志,2002,18(2):192-195.
- [14] 沈炳玲,秦毅,颜利求.锌对家兔心肌缺血/再灌注损伤的保护作用[J].中国危重病急救医学,2004,16(9):560-561.

(收稿日期:2011-03-02 修回日期:2011-07-20)