



用<sup>[4]</sup>。本实验通过结扎大鼠冠状动脉建立大鼠心肌缺血模型，研究芍药苷对大鼠心肌缺血模型及心肌细胞凋亡的保护作用。

## 1 材料与方 法

### 1.1 药物与试剂

芍药苷由青岛市药检所惠赠；TUNEL 法测定凋亡试剂盒购自 Promega 公司。磷酸肌酸激酶 (creatine phosphokinase, CPK) 试剂盒和乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

### 1.2 大鼠心肌缺血模型制备

制备大鼠心肌缺血模型：体重 200~250 g SD 大鼠用 3% 戊巴比妥钠 (1.5 mL/kg) 腹腔内注射麻醉，气管切开并插管，连接于小型动物呼吸机，调节呼吸频率为 80~90 次/min，开胸暴露心脏，用小圆针穿 0 号丝线，在冠状静脉走行处平左心耳间下缘 1~2 mm 浅层心肌处进行缝线结扎，建立心肌缺血模型，心电图 ST 段明显抬高或 T 波高耸作为冠状动脉结扎成功的标志，阻断血流 3 h 后取下心脏。用于心肌梗死面积测定的大鼠心肌样本在缺血 24 h 后取下心脏。

### 1.3 实验方案

将 24 只雄性 SD 大鼠随机分为 4 组，每组 6 只。对照组，造模前 30 min 给予生理盐水；高剂量组，造模前 30 min 腹腔注射芍药苷 20 mg/kg；低剂量组，造模前 30 min 腹腔注射 5 mg/kg；假手术组，手术前给予生理盐水，手术中心脏左前冠状动脉只穿线不结扎。

### 1.4 心肌缺血和梗死范围测定

结扎冠状动脉 24 h 后，于心脏左心室注入 3% Evans 蓝 2~3 mL，确定未缺血与缺血心肌 (未缺血心肌呈蓝色，缺血心肌呈白色)。将离体心脏置于 -20℃ 保存 1 h，分离缺血心肌与未缺血心肌。将缺血区心室肌以平行于房室沟的方向切成 4 片，每片厚 1~2 mm，置入 1% 氯化三苯基四氮唑 (TTC) 磷酸缓冲液 (pH 7.4) 中 37℃ 水浴 10~15 min。梗死区 (infarct size, IS) 不染色，未梗死区染为红色，红色区与未染色区之和为缺血区 (area at risk, AAR)，梗死范围以梗死心肌占缺血心肌面积的百分比表示。对每组 6 只大鼠进行心肌缺血范围和梗死范围的测定，比较各组心肌缺血和梗死范围是否有差别。

### 1.5 生化指标检测

以匀浆器将心脏制成 10% 心肌组织生理盐水匀浆，测定 CPK 和 LDH 生化指标。测定方法按试剂盒说明进行。

### 1.6 TUNEL 法测定心肌细胞凋亡指数

将心肌缺血区组织常规切片，放在二甲苯中脱腊，酒精中依次水化，蒸馏水放摇床上冲洗后放入 37℃ 烤箱中 15 min。将蛋白酶 K (20 mg/L) 覆盖在组织上，放入 37℃ 烤箱中 30 min。加入磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 放摇床上冲洗，在封闭液 (20% 小牛血清 + 5% 奶粉) 中封闭 2 h，加入 PBS 液放摇床上冲洗，将配好的凋亡试剂 (1 号液 : 2 号液 = 1 : 10) 覆盖在组织上 (每张片至少 15  $\mu$ L)，放入 37℃ 烤箱中 90 min，PBS 液放摇床上避光冲洗。用染色剂 DAPI 覆盖组织 (每张片 10  $\mu$ L 左右) 避光静置 2 min，用 PBS 液冲洗 2 min，加甘油后封片，在荧光显微镜下拍片观察。然后计算凋亡指数 (apoptosis index, AI)，AI = 凋亡细胞数 / 细胞总数  $\times$  100%。

### 1.7 统计学处理

所有计数资料均采用均数  $\pm$  标准差表示，使用统计软件 SPSS 11.0 进行统计分析，以 one-way ANOVA 方法进行总体比较，*q* 检验做组间比较，以  $P < 0.05$  为有统计学显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 危险指数及CPK, LDH值

结果说明：高剂量组较对照组能明显降低心肌缺血大鼠模型的危险指数（梗死区/危险区），降低心肌CPK, LDH活性，高剂量的芍药苷对心肌缺血大鼠模型心肌梗死有明显的保护作用（如表1所示）。

表1 危险指数及CPK, LDH值  
Tab.1 The values of risk index, CPK, LDH

组别	数量	剂量/(mg/kg)	危险指数/%	CPK	LDH
对照组	6	—	0.51±0.11	219.2±34.5	58.8±12.0
低剂量组	6	5	0.40±0.12	248.3±39.6	86.0±16.3
高剂量组	6	20	0.20±0.06**	523.5±136.8**	134.3±28.1**

注：与对照组比较，\*\*P<0.01

### 2.2 TUNEL 凋亡指数结果

进行方差分析及q检验后，高剂量组与假手术组无统计学差异，其他各组两两比较均有统计学差异。结果说明：高剂量组能明显降低心肌细胞的凋亡指数，对心肌细胞凋亡的保护作用明显高于对照组和低剂量组，与假手术组无统计学差异（如表2、图1所示）。

表2 TUNEL 凋亡指数结果

Tab.2 The apoptosis index of TUNEL

组别	数量	剂量/(mg/kg)	凋亡指数/%
对照组	6	—	0.53±0.14*
低剂量组	6	5	0.50±0.12*
高剂量组	6	20	0.41±0.10
假手术组	6	—	0.35±0.11

注：与假手术组比较，\*P<0.05

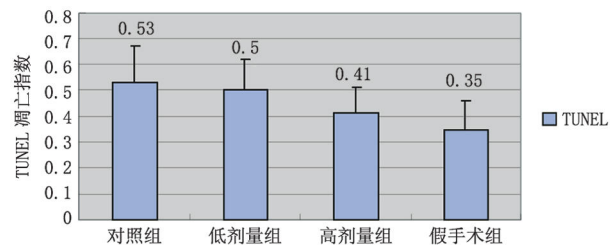


图1 TUNEL 凋亡指数

Fig.1 The apoptosis index of TUNEL

## 3 讨论

研究测定心肌缺血大鼠模型的危险指数（梗死区/危险区），结果说明：20 mg/kg 芍药苷可以明显降低心肌缺血大鼠模型的危险指数。急性心肌缺血后，CPK和LDH活性明显增高，代表细胞损伤的开始，并最终导致细胞死亡和组织坏死，所以酶的漏出被认为是细胞完全坏死前的改变之一[2]。研究中的20 mg/kg 芍药苷可以明显降低心肌缺血大鼠心肌CPK和LDH活性，对心肌缺血大鼠模型心肌梗死有明显的保护作用。

急性心肌缺血和心肌梗塞等心血管疾病存在心肌细胞凋亡[3~4]的现象，细胞凋亡是心肌缺血过程中心肌细胞死亡的形式之一，心肌缺血诱发心肌细胞凋亡已被多个实验所证实[5~6]，细胞凋亡与细胞死亡不同，是一种受基因调控的有序的细胞非炎症性死亡，又称程序性细胞死亡。对心肌细胞凋亡的研究近几年才成为研究热点，为探索各种心脏疾病病理机制及药物防治开拓了一条新途径。研究中TUNEL结果显示：20 mg/kg 芍药苷能明显降低心肌细胞的凋亡指数，对心肌细胞凋亡具有保护作用。

研究利用大鼠在体心脏缺血模型，发现芍药苷高剂量组能明显缩小心肌梗死范围，同时具有显著抗缺血损伤心肌细胞凋亡的作用，说明芍药苷对于心肌缺血损伤的保护作用与其抑制缺血损伤所致的心肌细胞凋亡有关，为芍药苷在临床上的进一步应用提供了理论依据，但其具体作用机制还不明确，值得进一步探讨。

**[参考文献] (References)**

- [1] NIZAMUTDINOVA I T, JIN Y C, KIM J S, et al. Paeonol and paeoniflorin, the main active principles of *Paeonia albi flora*, protect the heart from myocardial ischemia/reperfusion injury in rats[J]. *Planta Med.*, 2008, 74(1): 14~18.
- [2] 王秋静, 吕文伟, 路航, 等. 心痛贴对麻醉犬急性心肌梗死的保护作用[J]. *中国临床康复*, 2003, 7 (21): 2910~2911.  
WANG Q J, LV W W, LU H, et al. Protective effect of Xintongtie on acute myocardial infarction in dogs with anesthesia[J]. *Chinese Journal of Clinical Rehabilitation*, 2003, 7(21): 2910~2911. (in Chinese)
- [3] OLIVETTI G, QUAIRRI F, SALA R, et al. Acute myocardial infarction in human is associated with activation of programmed myocyte cell death in the surviving portion of the heart[J]. *J. Mol. of Cell Cardiol.*, 1996(28): 2005~2016.
- [4] NAKAMURA M, WANG N P, ZHAO Z Q, et al. Preconditioning decreases bax expression PMN accumulation and apoptosis in reperfused rat heart[J]. *Cardio. Vasc. Res.*, 2000, 45(3): 661~670.
- [5] MERCANOGLU G, SAFRAN N, GUNGOR M, et al. The effects of nebivolol on apoptosis in a rat infarct model [J]. *Circ. J.*, 2008, 72(4): 660~670.
- [6] BIAN G X, LI G G, YANG Y, et al. Madecassoside reduces ischemia-reperfusion injury on regional ischemia induced heart infarction in rat[J]. *Biol. Pharm. Bull.*, 2008, 31(3): 458~463.