

# 阿魏酸钠在肢体缺血 - 再灌注损伤中的作用

李彬<sup>1</sup>, 温昱<sup>2</sup>, 李靖年<sup>3</sup>

(1. 温州医学院附属二院骨科, 浙江 温州 325000; 2. 温州医学院解剖教研室; 3. 大连医科大学附属二院骨科)

**摘要** 目的:探讨阿魏酸钠对缺血 - 再灌注损伤肢体的保护作用。方法:SD 大鼠 63 只,随机分为 3 组,采用大鼠股动脉夹闭模型,设立缺血组(夹闭股动脉 5 h)、对照组(再灌注前予生理盐水保护)和试验组(再灌注前予阿魏酸钠保护),分别测定不同再灌注时相肌组织中超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)及血清中肌酸磷酸激酶(creatine phosphokinase, CK)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、谷丙转氨酶(glutamic-pyruvic transaminase, GPT)浓度的变化,并观察了肌组织形态学变化(光镜、电镜技术)。结果:实验组 MDA、CK、GPT、LDH 水平显著低于对照组, SOD 显著高于对照组,形态学变化实验组明显轻于对照组。结论:阿魏酸钠可以降低肢体再灌注后肌肉组织中的氧自由基水平,保护肢体减轻再灌注损伤。

**关键词** 阿魏酸钠; 再灌注损伤; 自由基

**Influence of sodium ferulate on the damage of ischemia-reperfusion in rat's limb** LI Bin, WEN Yu, Li Jing-nian. The Department of Orthopedics, The Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College (Zhejiang Wenzhou, 325000, China)

**Abstract** **Objective**: To study the protection of sodium ferulate (SF) on rat's limb ischemia-reperfusion injury. **Methods**: Using femoral artery clamped model, sixty-three rats were divided randomly into three groups: Ischemia group occluded the blood stream of femur for five hours, control group reperfused after the blood stream occluded for five hours and were given saline before reperfusion, experimental group experienced the same procedure as the control group but were given SF. The superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) in muscular tissue and creatine phosphokinase (CK), lactate dehydrogenase (LDH), glutamic-pyruvic transaminase (GPT) in serum were measured at reperfusion and examined under light and electronic microscope. **Results**: Increasing of MDA, LDH, CK, GPT and decreasing of SOD were more obvious in the control group as compared with the experimental group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion**: SF can reduce the oxygen free radicals level, relieve the limb ischemia-reperfusion injury.

**Key words** Sodium ferulate; Reperfusion injury; Free radicals

肢体再灌注损伤在骨科临床中较为常见,损伤轻者可发生晚期纤维化、挛缩影响功能,重者可致肢体坏死、截肢甚至危及生命。对于再灌注损伤,目前临床上尚缺乏有效的防治方法。阿魏酸钠是中药当归、川芎提纯制剂之一,被广泛用于心脑血管疾病的治疗。通过本项研究,探讨阿魏酸钠对肢体缺血 - 再灌注损伤的影响,为临床治疗寻求有效药物。

## 1 材料与方法

**1.1 实验与分组** SD 大鼠 63 只,体重 250 ~ 300 g,

性别不限。采用股动脉夹闭模型<sup>[1]</sup>: 25% 乌拉坦 (1 g/kg) 大鼠腹腔麻醉,于右腹股沟处解剖出股动脉,无创动脉夹夹闭保持下肢缺血 5 h 后去除动脉夹,开始再灌注。根据再灌注前所给药物的不同,将大鼠随机分为对照组(再灌注前尾静脉注射生理盐水 20 ml/kg)和实验组(再灌注前尾静脉注射阿魏酸钠 25mg/kg),再按不同再灌注时间(1 h、6 h、12 h、24 h),将两组各分为实验组 1 h、6 h、12 h、24 h 及对照组 1 h、6 h、12 h、24 h 4 个亚组,每亚组 7 只大鼠。另设 7 只大鼠作为缺血组,夹闭股动脉 5 h 后,立即做各项检查。

**1.2 SOD 和 MDA 测定** 取肌组织 0.1 g,以 1:9(w

基金项目:温州市科技发展计划项目(No. S2002A157)

通讯作者:李彬 Tel:13064563085 E-mail:liwy 956@hotmail.com

v) 加入冷生理盐水,玻璃匀浆管制成组织匀浆,3 000 转/min,离心 15 min,取 0.2 ml 上清用于 MDA,40 μl 用于 SOD,依据购自南京建成生物制药有限公司的试剂盒说明操作测定。

1.3 血清酶测定 采用日本产 7170A 全自动生化分析仪测定血清中 CK、LDH、GPT 含量变化。

1.4 光镜切片制备 取对照组、实验组再灌注 6 h 及缺血组腓肠肌组织,锐刀修剪成 1.5 cm × 1 cm × 0.5 cm 大小后放入 10% 中性福尔马林溶液中固定,12 h 后取定型肌肉组织 0.5 cm × 0.5 cm × 0.3 cm,常规脱水、石蜡包埋,制成 4 μm 厚切片,HE 染色,镜检。

1.5 电镜切片制备 取对照组、实验组再灌注 6 h 及缺血组 1 mm × 1 mm × 1 mm 腓肠肌组织 6~8 块,立即放入 3% 戊二醛中前固定,1% 锇酸后固定,酒精梯度脱水,环氧树脂定向包埋,制备半薄切片,甲苯

胺蓝染色,光镜下定位,超薄切片制备,透射电镜观察。

1.6 统计学方法 结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,对照组与缺血组比较用方差分析,实验组与对照组比较用 *t* 检验。

2 结果

2.1 肌组织中 SOD 与 MDA 含量变化(见表 1) 从表中可见,随着再灌注时间的延长,对照组与实验组肌组织中 SOD 值进行性降低,MDA 值进行性升高,相同再灌注时相,实验组肌组织中 SOD 含量高于对照组,MDA 含量低于对照组。

2.2 血清中 CK、LDH、GPT 含量变化(见表 2) 从表中可见,随着再灌注时间的延长,对照组与实验组血清中 CK、LDH、GPT 值进行性升高,相同再灌注时相,实验组血清中 CK、LDH、GPT 含量明显低于对照组。

表 1 各组肌组织中 SOD 与 MDA 含量

Tab 1 The content of superoxide dismutase and malondialdehyde in muscular tissue

项目	缺血组	对照组				实验组			
		1 h	6 h	12 h	24 h	1 h	6 h	12 h	24 h
SOD(Nu/ml)	249.04 ± 7.73	195.27 ± 1.49	150.43 ± 0.07	141.01 ± 2.73	111.73 ± 6.89	225.33 ± 1.52	207.78 ± 28.47	190.19 ± 6.47	175.49 ± 0.96
MDA(nmol/ml)	0.96 ± 0.08	1.53 ± 0.30	2.23 ± 0.31	2.37 ± 0.14	3.09 ± 0.31	1.12 ± 0.11	1.43 ± 0.13	1.62 ± 0.37	1.86 ± 0.11

注: 对照组与缺血组相比  $P < 0.01$ , 实验组与对照组相比  $P < 0.01$ , 实验组与对照组相比  $P < 0.05$

表 2 各组血清中 CK、LDH、GPT 含量

Tab 2 Content of creatine phosphokinase, lactate dehydrogenase and glutamic pyruvic transaminase of serum in each groups

项目	缺血组	对照组				实验组			
		1 h	6 h	12 h	24 h	1 h	6 h	12 h	24 h
CK(IU/L)	154.60 ± 6.56	366.62 ± 93.49	1394.24 ± 23.77	1970.86 ± 74.13	2094.26 ± 30.11	169.38 ± 1.44	686.90 ± 15.18	774.20 ± 24.19	1063.54 ± 1.31
LDH(IU/L)	408.94 ± 1.21	1037.21 ± 79.81	1646.77 ± 92.16	1775.98 ± 8.51	1909.66 ± 72.36	680.56 ± 4.01	764.90 ± 7.10	894.56 ± 66.07	2162.07 ± 45.87
GPT(IU/L)	95.68 ± 9.99	122.16 ± 0.37	166.28 ± 6.28	185.90 ± 6.04	212.75 ± 1.94	81.42 ± 6.76	107.62 ± 4.67	131.40 ± 5.24	143.46 ± 4.13

注: 对照组与缺血组相比  $P < 0.01$ , 实验组与对照组相比  $P < 0.01$ , 实验组与对照组相比  $P < 0.05$

2.3 光镜变化 缺血组肌纤维轻度水肿,不同程度横纹外观模糊、不清;对照组部分 HE 染色不易着色,肌纤维肿胀且有部分断裂,较多肌细胞内横纹明显溶解、模糊不清,肌细胞核内移,间质血管扩张充血、明显水肿,炎性细胞浸润;实验组 HE 染色均匀,肌纤维连续、完整,水肿不明显,横纹清晰,无肌浆凝固,血管周围偶见炎性细胞浸润。

2.4 电子显微镜观察 缺血组肌原纤维明暗带界限不清,Z 线变薄,线粒体轻度肿胀,或部分嵴融合,内外膜完整(见图 1);对照组肌原纤维 I 带、Z 线溶解,肌丝自 Z 线脱失,明暗带更加模糊不清,线粒体肿胀,髓鞘样变或靶心样,嵴部分消失,不连续(见

图 2);实验组明暗带界限清晰,粗细肌丝轻度溶解,肌丝无脱失,线粒体肿胀不明显,嵴连续完整,内外膜完整(见图 3)。

3 讨论

肢体缺血时可致肌肉组织损伤,但更严重的损伤是发生在再灌注时,其机制主要为氧自由基介导的脂质过氧化反应<sup>[2]</sup>。SOD 为内源性氧自由基清除剂,MDA 为脂质过氧化反应的主要代谢产物,测量二者的含量间接反映了肌肉组织内氧自由基的生成量。正常情况下,肌肉组织内(细胞内液、线粒体和溶酶体内)含有丰富的细胞内酶:CK、LDH、GPT 等,再灌注损伤后,生物膜的脂质过氧化反应使其通透



图 1 缺血组:肌原纤维明暗带界限不清,Z线变薄,线粒体轻度肿胀或部分嵴融合,内外膜完整(HE×20 000) 图 2 对照组:肌原纤维 I 带,Z线溶解,细肌丝自 Z 线脱失,明暗带更加模糊不清,线粒体肿胀,髓鞘样变或靶心样,嵴部分消失,不连续(HE×20 000) 图 3 实验组:肌原纤维明暗带界限清晰,粗细肌丝轻度溶解,肌丝无脱失,线粒体肿胀不明显,嵴连续完整,内外膜完整(HE×20 000)

Fig 1 Ischemia group: The edge of light and dark band of myofibril were unclear, Z-line become gracil, mitochondrion were slight swelling, part of cristae were fused, tunica intima and adventitia were integrity(HE×20 000) Fig 2 Control group: I band and Zline of myofibril lysis, thin myofilament shedding from Zline, light and dark band were more unclear, mitochondrion were swelling, showed myelin sheath or bull's-eye change, part of cristae disappeared and discontinuous(HE×20 000) Fig 3 Experimental group: The edge of light and dark band of myofibril were clear, thick and thin myofilament slight lysis, myofilament were not shedding, swelling of mitochondrion were distransparent, cristae were continuous and integrity, tunica intima and adventitia were integrity(HE×20 000)

性增高甚至损坏,细胞内酶释放入血。因此,对血清中 CK、LDH、GPT 含量的测量可作为肌细胞损伤程度的指征<sup>[3]</sup>。本实验中,与缺血组相比,对照组肌组织中 SOD 含量显著性降低,MDA 含量显著性升高,说明再灌注后,肌组织内氧自由基浓度升高;血清中 CK、LDH、GPT 浓度显著性升高,形态学观察肌纤维水肿加重,横纹部分溶解,线粒体髓鞘样变,嵴脱失,这些说明,与缺血 5 h 相比,再灌注后,肌组织的病变确实不是减轻,而是继续加重,与以前报道相符<sup>[1]</sup>。同时,我们连续监测了再灌注 24 h 生化指标的变化,发现 SOD 进行性降低,MDA、CK、LDH、GPT 进行性升高,这提示肢体再灌注后一定时间内,随着时间的延长,肌组织内氧自由基不断积聚,浓度升高,并进而导致肌组织损伤不断加重。

阿魏酸钠是中药川芎及当归的有效成分,研究证实其分子上的酚羟基结构具有抗氧自由基及脂质过氧化作用<sup>[4]</sup>。本实验中,应用阿魏酸钠的实验组与对照组相比,肌组织中 SOD 浓度显著性升高,MDA 浓度显著性降低,证实了阿魏酸钠有清除氧自由基的作用;血清中 CK、LDH、GPT 浓度显著性降

低,形态学观察可见实验组肌原纤维内线粒体水肿较轻,嵴完整连续,核基本正常,说明应用阿魏酸钠后,减轻了肌肉组织的再灌注损伤。但是,从我们的测量结果可以看出,无论是代表氧自由基水平的 SOD、MDA,还是标志着肌肉组织损伤程度的 CK、LDH、GPT,并没有恢复到缺血时的水平,说明阿魏酸钠的应用,并不能完全消除氧自由基的危害,保护肢体免受再灌注损伤,同时也提示我们,再灌注损伤的机制很复杂,可能是多种因素综合作用的结果,单用一种药物或单纯针对一种因素进行治疗,有可能达不到目的。

参考文献

- 1 李靖年,李合,赵文志,等.局部低温对肢体缺血-再灌注损伤保护作用的实验研究.中国矫形外科杂志,2000,7(1):53-55.
- 2 Soog CV, Yung IS, Blair PHB, et al. Lipid peroxidation as a cause of limb swelling following femoropopliteal bypass grafting. Eur J Vasc Surg, 1993, 7(4):540-549.
- 3 陈隆恩.缺血对骨骼肌代谢及生化影响的实验研究.中华骨科杂志,1987,7(2):56-58.
- 4 句海松,李小洁,赵保路,等.阿魏酸钠和 18-甘草次酸对氧自由基的清除作用.中国药理学报,1990,11(8):466-470.

(收稿日期:2003-03-22 本文编辑:李为农)

北京天东医疗设备有限公司供货信息

北京天东医疗设备有限公司生产部是多年生产口腔正畸材料、骨科器械及小针刀系列产品的专业厂家。审批文件:京药管械生产许 20000333 号,京药管械经营许 20000629 号,京医械广审(文)200303012 号。

现办理小针刀邮购业务,售价:型(20 支装)每套 120 元;~型(10 支装)每套 90 元。每套加收 10 元包装邮资,款到发货。地址:北京天东医疗设备有限公司,北京市丰台区三路居乙 12 号。邮编:100073 电话:010-63266458 63488112