

文章编号:1001-6880(2014)3-0423-05

藏药莪达夏醇提物对大鼠心肌缺血-再灌注损伤的保护作用

李振¹, 刘明成², 李福安¹, 任世存¹, 马建滨³, 张得钧^{1,2*}¹青海大学医学院, 西宁 810001; ²青海大学生态环境工程学院, 西宁 810016; ³青海师范大学生命与地理学院, 西宁 810008

摘要:本实验探讨藏药莪达夏对大鼠急性心肌缺血再灌注损伤的抗氧化保护作用。采用结扎大鼠冠脉左前降支方法造成心肌缺血再灌注模型, 测定再灌注 40 min 后血清中乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性以及 MDA 含量。实验结果显示莪达夏可以显著降低心肌缺血再灌注后血清 CK、LDH 和 MDA 含量, 升高血清 SOD 和 GSH-Px 活力($P < 0.01, P < 0.05$)。表明藏药莪达夏对缺血-再灌注心肌损伤有抗氧化保护作用。

关键词:莪达夏醇提物; 心肌缺血-再灌注损伤; 抗氧化

中图分类号:R285. 5

文献标识码:A

The Antioxidative Effect of *Oxytropis falcata* Bunge Ethanol Extract on Rats' Hearts Against Myocardial Ischemia and Reperfusion Injury

LI Zhen¹, LIU Ming-cheng², LI Fu-an¹, REN Shi-cun¹, MA Jian-bin³, ZHANG De-jun^{1,2*}¹Medical College of Qinghai University, Xining 810001, China; ²College of Eco-Environmental Engineering of Qinghai University, Xining 810016, China; ³Qinghai Normal University of Biology and Geopraphy Science, Xining 810008, China

Abstract: The article studied the Antioxidant protection of *Oxytropis falcata* Bunge Ethanol extract, during acute myocardial ischemia-reperfusion in rats. The model of myocardial ischemia/reperfusion injury in rats was employed by ligating the artery of left anterior descending (LAD). After the following reperfusion for 40 minutes, the enzyme activity of CK, LDH, SOD, GSH-Px and the concentration of MDA in rats' serum were tested. The results showed that the ethanol of *O. falcata* Bunge can decrease the enzymatic activity of CK, LDH and the concentration of MDA, and can heighten the enzymatic activity of SOD and GSH-Px ($P < 0.01, P < 0.05$) as propranolol can. *O. falcata* Bunge, has the antioxidant protection effects during acute myocardial ischemia/reperfusion in rats in vivo.

Key words: *Oxytropis falcata* Bunge Ethanol extract; myocardial ischemia-reperfusion injury; antioxidation

藏药莪达夏为豆科棘豆属镰形棘豆(*Oxytropis falcata* Bunge)植物, 有关莪达夏的研究被许多学者所关注^[1-4], 药理学研究发现, 莪达夏对心血管系统具有一定的保护作用。莪达夏所含的喹喏里西定类生物碱, 具有抗心律失调生理活性^[5]。扎西东主等通过小鼠密闭缺氧实验和小鼠完全脑缺氧实验进行研究, 表明藏药莪达夏具有明显的抗缺氧缺血作用, 对急性脑缺血性缺氧所导致的心脑组织有一定的保护作用^[6], 其机理可能与降低耗氧量、清除氧自由基、降低脂质过氧化反应、抑制缺氧造成的血流变学改变、改善机体的能量代谢、增强耐受力等因素有关。本实验进一步通过复制大鼠心肌缺血-再灌注

损伤模型, 观察大鼠心肌组织中乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)以及丙二醛(MDA)的变化, 探讨藏药莪达夏抗氧化的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药物及试剂

莪达夏原药材采自青海省青海湖畔沙丘地带, 经青海大学医学院魏全嘉教授鉴定为藏药莪达夏。莪达夏全草乙醇提取部分制备: 莪达夏粗粉 4.4 kg 用 75% 乙醇 11 L 浸泡 7 d, 用旋转蒸发仪提取 3 次后, 浸泡液合并, 减压回收溶剂, 得粗提物 1.5 L。将粗提物混悬于水中, 用石油醚、氯仿、正丁醇、乙酸乙酯依次萃取, 合并萃取液, 用旋转蒸发仪得到莪达夏浸膏, 经低温冷冻干燥获得了给大鼠灌胃所需的

药物颗粒。心得安(规格:10 mg×100片)由山西晋太药业生产(批号:20110502)。乌拉坦(氨基甲酸乙酯),上海吉化有限公司。

1.1.2 仪器

DW.2000型小动物人工呼吸机;II导联大鼠心电图机;RM-6280型多道生理信号采集处理系统;750型全自动生化分析仪(El本东芝);JEOL-1230透射型电子显微镜;JY5002型电子天平;LKB-III型超薄切片机。

1.1.3 动物

2月龄SD大鼠120只,雌雄各半,体重(150±20)g,由甘肃中医学院实验动物中心提供,动物许可证编号:SCXK(甘)2012-0004。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与给药

将大鼠随机分为6组,每组20只,雌雄各半,分别为:(1)假手术组(取血清作正常对照);(2)缺血-再灌模型组;(3)莪达夏醇提物高剂量给药组;(4)莪达夏醇提物中剂量给药组;(5)莪达夏醇提物低剂量给药组;(6)心得安对照组。莪达夏醇提物给药剂量按照预实验中莪达夏急性毒理学最大致死量结果给定,给药高、中、低剂量分别为15、10、5 g/kg。假手术组和缺血再灌注组给等量纯净水,心得安组以0.6 g/kg给药,各组连续灌胃给药10 d。

1.2.2 动物模型建立

将大鼠末次灌胃禁食8 h后,25%乌拉坦腹腔注射麻醉(5 mL/kg),麻醉后固定,记录标准II导联心电图,气管切开,连接动物呼吸机,自左侧第3~4肋间逐层打开胸腔、剔除心包膜,暴露心脏,于左心耳下冠状动脉前降支上三分之一处进针,深度为1~1.4 mm,宽2~3 mm,穿线后稳定1 min,将塑料管套入结扎线环中(与血管并行),结扎(无ST段及T波改变者淘汰),心肌缺血30 min后,剪开塑料管,取掉结扎线,使冠状动脉前降支再灌注40 min后,于心脏取血。缺血的标志为ST段抬高和R波增高,左室发绀;复灌见ST段抬高和R波恢复,发绀区变红。假手术组只穿线不结扎^[7,9]。

表1 各组心电图ST段变化的比较($n=20, \bar{x} \pm s, ST/mv$)

Table 1 The comparison of the ST waves among groups ($n=20, \bar{x} \pm s, ST/mv$)

组别 Group	缺血 Ischemia		再灌注 Reperfusion	
	0 min	30 min	0 min	40 min
伪手术组 Sham Operation	0	0	0	0
模型组 IR model	0.42 ± 0.18	0.37 ± 0.04	0.42 ± 0.09	0.37 ± 0.01

高剂量组 High Dose	$0.36 \pm 0.06^*$	$0.27 \pm 0.03^*$	$0.34 \pm 0.04^*$	$0.25 \pm 0.03^*$
中剂量组 Middle Dose	$0.26 \pm 0.07^*$	$0.24 \pm 0.08^*$	$0.27 \pm 0.12^*$	$0.23 \pm 0.09^*$
低剂量组 Low Dose	$0.14 \pm 0.08^*$	$0.13 \pm 0.05^*$	$0.16 \pm 0.05^*$	$0.13 \pm 0.04^*$
对照组 Control Group	$0.15 \pm 0.07^{**}$	$0.13 \pm 0.13^{**}$	$0.15 \pm 0.02^*$	$0.11 \pm 0.05^*$

注:与模型组比较, ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$ 。

Note: Compare with IR model, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

2.1.2 血清酶含量

与模型组比较, 莪达夏高、中、低剂量均能显著

降低血清中 LDH 和 CK 的释放, 但作用疗效不如心得安。结果见表 2。

表 2 各组大鼠心肌缺血再灌注后血清酶 LDH、CK 的变化 ($n = 20, x \pm s$)

Table 2 The comparison of the LDH, CK among groups ($n = 20, x \pm s$)

组别 Group	乳酸脱氢酶活性 LDH (HIU/L)	肌酸激酶活性 CK (HIU/L)
假手术组 Sham Operation	$980.7 \pm 673.8^{**}$	$3678.5 \pm 3786.4^{**}$
模型组 IR model	2787.3 ± 1587.9	9654.4 ± 5839.5
高剂量组 High Dose	$1029.7 \pm 249.7^*$	$4436.4 \pm 1656.3^*$
中剂量组 Middle Dose	$1242.4 \pm 676.0^*$	$4731.8 \pm 3459.9^*$
低剂量组 Low Dose	$1317.2 \pm 683.2^*$	$5710.6 \pm 4916.5^*$
对照组 Control Group	$1025.5 \pm 914.2^*$	$3897.9 \pm 3667.7^*$

注:与模型组比较, ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$ 。

Note: Compare with IR model, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

2.1.3 心肌组织酶活性

与模型组比较, 莩达夏高、中、低剂量均能显著

增强心肌组织中 SOD 和 GSH-Px 活性, 降低 MDA 含量 ($P < 0.05$)。结果见表 3。

表 3 各组大鼠心肌缺血再灌注后心肌组织 GSH-Px、SOD、MDA 的变化

Table 3 The comparison of the GSH-Px, SOD, MDA among groups ($n = 20, x \pm s$)

组别 Group	谷胱甘肽过氧化物酶活性 GSH-Px (U mg ⁻¹ pro)	超氧化物歧化酶活性 SOD (n U mg ⁻¹ pro)	丙二醛含量 MDA (n mol mg ⁻¹ pro)
假手术组 Sham Operation	$67.82 \pm 3.56^{**}$	$187.65 \pm 43.21^{**}$	$7.54 \pm 0.61^{**}$
模型组 IR model	39.29 ± 3.77	128.22 ± 26.13	14.59 ± 2.31
高剂量组 High Dose	50.67 ± 6.85	$142.54 \pm 12.64^*$	$8.98 \pm 1.90^{**}$
中剂量组 Middle Dose	45.05 ± 5.86	$140.25 \pm 18.15^{**}$	$9.03 \pm 0.81^{**}$
低剂量组 Low Dose	$43.66 \pm 5.5^{**}$	$131.49 \pm 21.07^*$	$9.23 \pm 1.73^{**}$
对照组 Control Group	$54.30 \pm 4.20^*$	$165.83 \pm 16.28^*$	$7.95 \pm 0.96^{**}$

注:与模型组比较, ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$ 。

Note: Compare with IR model, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

2.1.4 心肌超微结构

如图 1 所示:缺血-再灌注模型组 ($\times 10000$): 肌原纤维内大量收缩带, 肌质网扩张, 肌纤维内脂滴增多, 心肌细胞连接处电子密度降低, 肌丝排列稀疏, 润盘解离, 局部肌纤维内线粒体肿胀疏松, 部分嵴消失; 假手术组 ($\times 20000$): 肌原纤维完整有序, 线粒体膜完整, 峴致密; 低剂量组 ($\times 10000$): 肌膜下轻度肿胀, 局部肌原纤维内肌丝缺失, 肌节内粗细肌丝解离, 肌丝排列疏松, 局部线粒体轻度肿胀; 中剂量组 ($\times 10000$): 心肌纤维轻微收缩, 线粒体无明显

损伤; 高剂量组 ($\times 10000$): 肌纤维排列整齐, 肌丝排列轻度疏松, 线粒体无明显损伤, 峴致密; 心得安对照组 ($\times 20000$): 心肌纤维有收缩带结构, 心肌连接基本正常, 肌节与正常相比略有缩短, 肌节内肌丝略有疏松。

2.2 讨论

心肌组织遭受一定时间缺血后, 恢复血流其损伤程度反而会加剧。心肌缺血-再灌注损伤的主要原因是组织内抗氧化能力下降, 氧自由基的大量生成。氧自由基与细胞膜上的多聚不饱和脂肪酸反

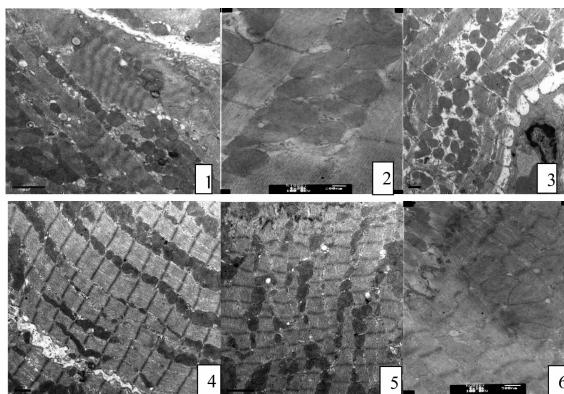


图 1 各组大鼠心肌缺血-再灌注后超显微结构变化

Fig. 1 The comparison of the ultrastructure among groups
图注:1. 缺血-再灌注模型组($\times 10000$) ;2. 假手术组($\times 20000$) ;
3. 低剂量组($\times 10000$) ;4. 中剂量组($\times 10000$) ;5. 高剂量组($\times 10000$) ;6. 心得安对照组($\times 20000$)。

Note: 1. Ischemia and Reperfusion Model Group ($\times 10000$) ;2. Sham Operation ($\times 10000$) ;3. Low Dose ($\times 10000$) ;4. Middle Dose ($\times 10000$) ;5. High Dose ($\times 10000$) ;6. Control Group ($\times 20000$)。

应,发生脂质过氧化,其过氧化产物 MDA 能够破坏心肌细胞膜的完整性,使其流动性和通透性发生变化,甚至丧失^[10],也会改变心肌超微结构,导致心肌细胞损伤,从而产生很强的破坏作用^[11],因此 MDA 含量能够反映机体内脂质过氧化程度,也可间接反映细胞损伤的程度。心肌受损后大量乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)从心肌细胞中漏出,因而 LDH 和 CK 的变化也可间接作为判断心肌受损和受损程度的指标。SOD 对机体的氧化和抗氧化平衡起着重要的作用,并具有清除超氧阴离子自由基(O_2^-)保护细胞免受损伤的功能^[12]。GSH-Px 是生物体内广泛存在的一种重要的催化过氧化物分解的酶,它在细胞内能消除有害的过氧化代谢产物,阻断脂质过氧化链锁反应,对保护细胞膜和细胞功能的完整性具有重要作用^[13]。SOD 与 GSH-Px 酶活力的高低能间接反映机体清除氧自由基的能力,反映药物的作用特点。另外,心肌组织病理学改变是评价药物是否具有抗心肌缺血-再灌注损伤作用最有力、最直接的证据,线粒体在心肌细胞能量生成和细胞生命中占重要地位,而且缺血再灌注引起的组织损伤与线粒体具有更密切的关系^[14],因此电镜对心肌组织和线粒体进行详细的微观观察对评价药物作用评价具有重要意义。本实验采用了在体内复制心肌缺血-再灌注模型来观察莪达夏对大鼠心肌缺血-再灌注损伤的抗氧化保护作用。实验表明莪达夏醇

提物能够显著降低心肌缺血-再灌注引起的 CK 和 LDH 含量的升高,莪达夏醇提物高、中、低剂量组都能提高内源性抗氧化剂 SOD 和 GSH-Px 的活力,减少脂质过氧化产物 MDA 的生成,且随剂量增高作用显著。本实验超微结构显示,心肌缺血后发生明显的损伤,再灌注后损伤进一步加重,而与模型组比较,显微观察发现莪达夏醇提物低剂量组肌溶灶,变性肌纤维多见,心肌收缩带少见;高、中剂量组肌溶灶,变性坏死肌纤维少见,收缩带多见,但收缩带损伤程度均明显缓解。这表明莪达夏醇提物能够抑制再灌注过程中自由基的生成和提高机体内源性抗氧化系统的活性,发挥对心肌缺血再灌注损伤的保护作用。

参考文献

- Zhao Y(赵萤), Tong L(童丽), Chen SL(陈树林), et al. The Effects of *Oxytropis falcata* Bunge Ethanol Extract on the proliferation and apoptosis of the human hepatoma cell. *Progress in Veterinary Med*(动物医学进展), 2009, 30(10): 15-18.
- Wang D(王栋), Yang H(杨欢), Yang GM(杨光明), et al. Volatile compositions from A Tibetan medicine: *Oxytropis falcata* Bunge. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2010, 22: 614-619.
- Cheng HY(程会云), Tong L(童丽), Chen XH(陈湘宏), et al. Extraction and content determination of polysaccharide from Tibetan herbal medicine *Oxytropis falcata* Bunge. *J Anhui Agri Sci*(安徽农业科学), 2009, 37: 10989, 10992.
- Huo XH(霍星华), Zhao BY(赵宝玉), Wang JJ(王建军), et al. Preliminary chemical test of *Oxytropis falcata* Bunge and alkaloids analysis by TLC. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*(西北农业学报), 2008, 17(2): 24-28.
- Zha XDZ(扎西东主), Li XJ(李先加), Que S(确生). Experiment study of *Oxytropis falcata* Bunge on hypoxia. *J Qinghai Med Coll*(青海医学院学报), 2008, 29: 266-268.
- Fu CX(付晓春), Li SP(李少鹏), Wang MW(王敏伟), et al. Protective effects of bamboo leaves extract on ischemia and reperfusion of myocardium. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2006, 18: 214-218.
- Wang Y(王怡), Wang SX(王少峡), Jiang ZH(姜志浩), et al. Effects of formula narcose dogs on iNOS mRNA Expression of Rats during Myocardial Ischemia and Reperfusion. *Liaoning J Trad Chin*(辽宁中医药杂志), 2007, 34: 1811-1814.

(下转第 373 页)