

文章编号:1001-6880(2016)10-1643-05

橄榄苦苷对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用

王昱*,秦序

陇南师范高等专科学校生化系,成县 742500

摘要:为了探讨橄榄苦苷联合合心爽对大鼠心肌缺血再灌注损伤的影响及其保护作用机制,将50只健康大鼠分成假手术组、模型组、橄榄苦苷组、合心爽组、橄榄苦苷+合心爽组。经结扎冠脉左前降支制备心肌缺血再灌注大鼠模型,造模后药物处理7d,用放射免疫法检测心肌肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α ,TNF- α)、白细胞介素1(interleukin-1 β ,IL-1 β)、白细胞介素10(interleukin-10,IL-10)含量,用比色法检测心肌超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)、过氧化氢酶(catalase,CAT)活性及丙二醛(malondialdehyde,MDA)含量,用Western blot法检测心肌内皮素-1(ednothelin-1,ET-1)的表达。结果显示与假手术组相比,模型组心肌TNF- α 、IL-1 β 、MDA的含量显著升高($P<0.01$),IL-10、SOD、CAT水平均显著降低($P<0.01$),心肌ET-1表达水平显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,经橄榄苦苷或合心爽治疗后,心肌TNF- α 、IL-1 β 、MDA的含量显著降低($P<0.05$, $P<0.01$),IL-10、SOD、CAT水平均显著升高($P<0.05$, $P<0.01$),心肌ET-1表达水平显著降低($P<0.05$, $P<0.01$)。橄榄苦苷和合心爽联合治疗后心肌缺血再灌注损伤的恢复更加显著。通过本研究可以看出橄榄苦苷和合心爽对小鼠心肌缺血再灌注损伤具有明显的保护作用,其机制可能与降低心肌内皮素-1表达、改善抗氧化酶活性和抑制炎症因子水平有关。

关键词:橄榄苦苷;心肌缺血再灌注损伤;合心爽;炎症因子;抗氧化能力;ET-1

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.10.027

Protective Effect of Oleuropein on Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury in Rats

WANG Yu*, QIN Xu

Department of Biology and Chemistry, Longnan Teachers College, Chengxian 742500, China

Abstract: The objective of this study was to explore the protective effect and the mechanism of oleuropein and diltiazem on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. Fifty health rats were divided into five groups, namely sham group, model group, oleuropein group, diltiazem group, oleuropein and diltiazem group. The model was established by the ligation of descending coronary artery in rats. After modeling, the rats were administrated with oleuropein, diltiazem, and oleuropein + diltiazem for 7 d. The contents of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) and interleukin-10 (IL-10) were detected by radioimmunoassay. The activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) as well as the content of malondialdehyde (MDA) were measured by spectrophotometry. The changes of myocardial ednothelin-1 (ET-1) expression in myocardium were analyzed by Western blot assay. The results showed that compared to sham group, the contents of TNF- α , IL-1 β and MDA were significantly increased, the levels of IL-10, SOD and CAT were significantly reduced, the myocardial ET-1 expression was significantly up-regulated in myocardium of model group mice ($P<0.01$). Compared to model group with the treatments of oleuropein, diltiazem, and oleuropein + diltiazem, the contents of TNF- α , IL-1 β and MDA were significantly decreased, the levels of IL-10, SOD and CAT were significantly increased, the myocardial ET-1 expression was significantly down-regulated in myocardium of treatment group ($P<0.05$, $P<0.01$). Furthermore, the oleuropein + diltiazem combined administration showed an even more significant positive effect. Based on these results, it was concluded that the treatments of oleuropein and diltiazem had a protective effect on myocardial ischemia-reperfusion injury, the mechanisms of which may depend on reducing myocardial ET-1 expression,

收稿日期:2016-06-02 接受日期:2016-08-31

基金项目:甘肃省自然科学基金(1107RJZK243);甘肃省高等学校科研资助项目(1128B-01)

* 通讯作者 E-mail:gswangyu@126.com

improving antioxidant enzyme activity and inhibiting inflammatory response.

Key words: oleuropein; myocardial ischemia-reperfusion injury; diltiazem; inflammatory factors; antioxidant capacity; ET-1

急性心肌梗死是导致人类死亡主要疾病之一,其发病凶险且病死率高,恢复冠状动脉血流为主要治疗措施,然而血流恢复后再灌注造成的心肌损伤却远大于单纯缺血时的损伤^[1],但目前心肌缺血再灌注损伤的确切发病机制尚未完全明确。因此,阐明心肌缺血再灌注损伤具体机制,探索新的治疗途径亟需解决。橄榄苦苷是油橄榄中最主要的含量最多的成分,本课题组已经研究了橄榄苦苷在海洛因脱毒、预防老年痴呆症和糖尿病肾病等方面的作用^[3-5]。为了进一步探讨橄榄苦苷的药理作用,本实验制备心肌缺血再灌注大鼠模型,观察橄榄苦苷、合心爽单独以及联合治疗后生化指标的变化,从炎性反应、抗氧化酶和血管内皮因子等方面探讨其保护机制,为油橄榄的基础研究和临床应用提供更多的实验依据。

1 材料与仪器

1.1 材料与动物

橄榄苦苷(陇南田园油橄榄科技开发有限公司,纯度>98%,批号:20130810,无色结晶,用双蒸水配制);50只清洁级SD大鼠,体重200~250 g,由兰州大学实验动物中心提供,实验动物许可证号:SCXK(甘)2005-0007。

1.2 仪器与试剂

U-1800型UV-VIS全自动分光光度计spectrophotometer(日本Tokyo),高速台式冷冻离心机(TGL-16M,Beckman美国)等;盐酸地尔硫卓片(商品名合心爽,天津田边制药有限公司生产,规格30 mg,批号1304032,用双蒸水配制);超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、丙二醛(MDA)试剂盒(南京建成生物工程研究所);白细胞介素1(IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素10(IL-10)放射免疫试剂盒(武汉博士德生物工程研究所);一抗内皮素-1(ET-1)(北京中杉金桥生物技术有限公司); β -actin抗体(上海碧云天生物技术研究所);0.45 μm硝酸纤维膜(Solarbio公司)。

2 实验方法

2.1 心肌缺血模型的建立与给药

健康SD大鼠50只,随机分假手术组、模型组、橄榄苦苷组、合心爽组、橄榄苦苷+合心爽组,每10只。手术前4周开始灌胃给药,假手术组和模型对照组分别给予等体积的生理盐水,每天一次。以

10%水合氯醛腹腔注射麻醉(3 mg/kg),仰位固定,持续记录肢体二导联心电图;气管插管并连接人工呼吸机,调节呼吸频率为60次/min,潮气量20 mL/kg,呼吸比1.5:1;于左侧第三、四肋间打开胸腔以暴露心脏,稳定5 min后,于左心耳下缘约2 mm处用无创动脉夹夹闭冠状动脉,心电图显示ST段抬高或T波高耸者表示心肌缺血;缺血30 min后,松开动脉夹,抬高的ST段降低或高耸的T波得以恢复表示心肌缺血再灌注模型造模成功;恢复血流灌注60 min后,腹主动脉取血和心脏组织标本,20 ℃保存待检。假手术组除不夹闭冠状动脉外,其余操作与试验组完全一致。大鼠造模成功后,以灌胃给药,合心爽以24.8 mg/kg给药,橄榄苦苷以500 mg/kg给药,假手术组、模型组给予0.5%羧甲基纤维素钠,心肌缺血再灌注成功后2 h开始灌胃给药,给药体积均为10 mL/kg,每天1次,连续7 d。

2.2 TNF- α 、IL-1 β 、IL-10含量检测

末次给药后,迅速取心脏,洗净、冰浴匀浆,离心15 min(3000 rpm),取上清液,采用放射免疫法中的液相竞争法和平衡法测定心脏组织TNF- α 、IL-1 β 、IL-10含量,具体方法按照检测试剂盒说明书操作。

2.3 SOD、CAT活性及MDA含量测定

末次给药后,迅速取心脏,洗净、冰浴匀浆,离心10 min(3000 rpm),取上清液,按照试剂盒的操作要求分别测定SOD、CAT的活性及MDA的含量。

2.4 Western blot法检测

取各组大鼠结扎线下左心室游离壁和前下壁心肌组织,提取总蛋白。等量蛋白样品经10%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺电泳(SDS-PAGE)分离后,90V湿转至硝酸纤维膜,5%脱脂奶粉室温封闭,加一抗ET-1(1:1000),同时加入大鼠抗 β -actin单抗(1:2000),4℃孵育过夜,TBST洗膜后置于二抗(羊抗兔IgG/HRP,1:2000)中室温孵育,以增强型化学发光剂(ELC)显色,以 β -actin作为内参照,运用Image Lab软件进行曝光成像,采用Quantity one软件分析条带灰度值。

2.5 数据处理

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用SPSS13.0软件进行单因素方差分析,组间比较以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 大鼠心肌 TNF- α 、IL-1 β 、IL-10 含量的差异

与假手术组比较,模型组心肌 TNF- α 、IL-1 β 含量显著增加,IL-10 含量降低,均差异极显著($P < 0.01$)。各给药组与模型组比较,心肌 TNF- α 、IL-1 β 含量降低,IL-10 含量升高,差异显著或极显著($P < 0.05, P < 0.01$),橄榄苦苷 + 合心爽组与单独给药组相比,心肌 TNF- α 、IL-1 β 、IL-10 含量差异显著($P < 0.05, P < 0.01$,图 1)。

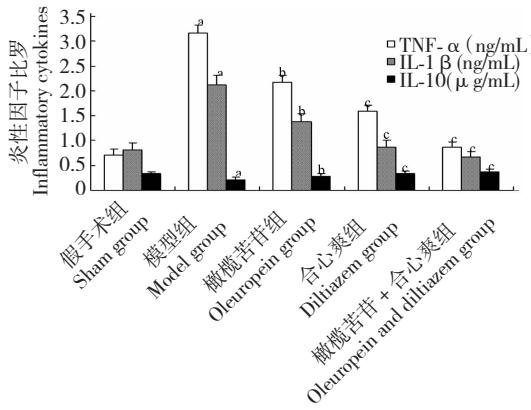


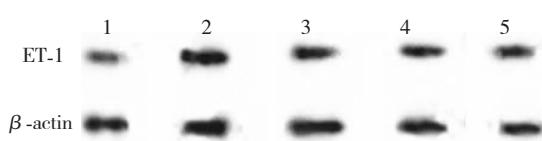
图 1 各组心肌 TNF- α 、IL-1 β 、IL-10 含量的比较

Fig. 1 Comparison of the contents of TNF- α , IL-1 β and IL-10 in myocardium among different groups

注:与假手术组比较,^a $P < 0.01$;与模型组比较,^b $P < 0.05$,^c $P < 0.01$;与橄榄苦苷 + 合心爽组比较,^d $P < 0.05$,^e $P < 0.01$,下同。

Note: Compared with sham group, ^a $P < 0.01$; Compared with model group, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$; Compared with oleuropein + diltiazem group, ^d $P < 0.05$, ^e $P < 0.01$. Same as below.

3.2 大鼠心肌 SOD、CAT 的活性及 MDA 含量的差异



与假手术组比较,模型组心肌 SOD、CAT 的活性显著降低,MDA 含量显著增高,差异极显著($P < 0.01$)。各给药组与模型组比较,心肌 SOD、CAT 的活性显著升高,MDA 含量显著降低,差异显著或极显著($P < 0.05, P < 0.01$),橄榄苦苷 + 合心爽组与单独给药组相比,心肌 SOD、CAT 的活性显著升高,MDA 含量显著降低,差异显著($P < 0.05$,图 2)。

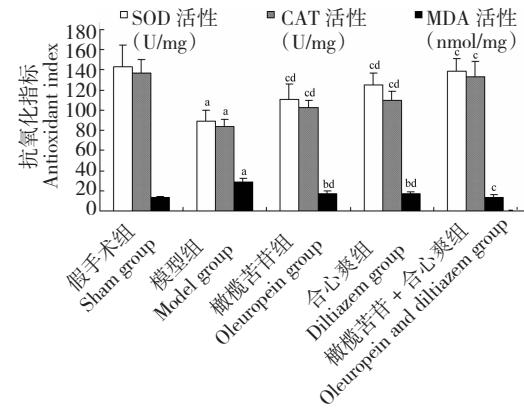


图 2 各组心肌抗氧化酶活性的比较

Fig. 2 Comparison of antioxidant enzyme activities in myocardium among different groups

3.3 大鼠心肌 ET-1 表达的差异

模型组大鼠心肌 ET-1 表达量较假手术组高,差异极显著($P < 0.01$)。经橄榄苦苷、合心爽单独和橄榄苦苷 + 合心爽给药后,心肌 ET-1 表达量低于模型组,差异极显著($P < 0.01$),橄榄苦苷 + 合心爽组心肌 ET-1 表达量显著低于单独给药组($P < 0.05$,图 3)。

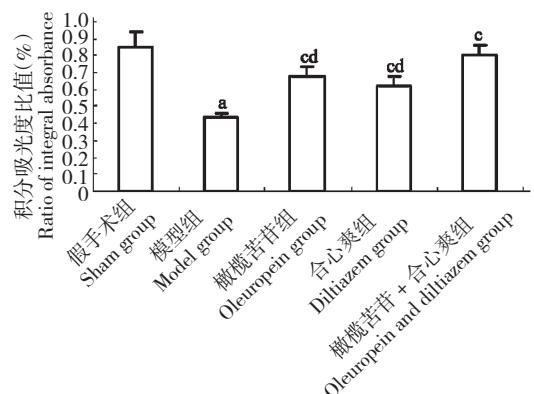


图 3 心肌 ET-1 蛋白质印迹分析及条形图(条形图代表 ET-1 积分吸光度值与 β -actin 积分吸光度值的比值)

Fig. 3 The western blot analysis result and bar chart of ET-1 in myocardium (Bar represent the ratio of integral absorbance of β -actin and integral absorbance of ET-1)

注:1. 假手术组;2. 模型组;3. 橄榄苦苷组;4. 合心爽组;5. 橄榄苦苷 + 合心爽组

Note: 1. sham group; 2. mode group; 3. oleuropein group; 4. diltiazem group; 5. oleuropein and diltiazem group

4 讨论与结论

心肌缺血再灌注损伤是通过溶栓、介入或者建立冠脉旁路等手段恢复血流再灌注后所引起心肌的损伤反应。在临幊上常表现为持久的胸骨后剧烈疼痛、心律失常、心力衰竭、急性循环功能障碍发热、白细胞计数和血清心肌损伤标志酶水平升高以及心肌急性损伤与坏死等特征性的心电图改变，病情危重，病死率高。心肌缺血再灌注损伤是由多种因素造成，是一个复杂的病理生理过程，其中心肌代谢障碍、氧自由基产生过多、钙超载、中性粒细胞聚积、内皮功能受损、细胞凋亡等在心肌缺血再灌注损伤中发挥重要作用^[6,7]。本研究在成功建立心肌缺血再灌注损伤大鼠模型基础上，从抗氧化、抗炎、调节血管内皮因子的表达等方面比较橄榄苦苷、合心爽单独以及联合用药对心肌缺血再灌注损伤大鼠的治疗情况。

在出现缺血再灌注损伤时，炎症因子的升高水平与心肌的损伤显著相关。IL-1 为免疫反应的启动因子，在心肌缺血阶段介导中性粒细胞与血管内皮细胞的黏附及向心肌浸润^[8]。IL-1 β 是 IL-1 的主要活性形式，可通过直接激活中性粒细胞或先激活组织的黏附分子表达分泌而间接作用于中性粒细胞介导炎性过程，最终加重心肌损伤。细胞因子 IL-10 是一种多功能、多细胞源性的炎症抑制因子，在下调炎症反应中起关键作用^[9]。TNF- α 为促炎反应的关键细胞因子，通过多种途径促进炎性心肌的损伤，诱导心肌细胞凋亡，使心功能恶化，加重心肌缺血再灌注损伤^[10]。本实验观察到，模型组大鼠心肌 TNF- α 、IL-1 β 含量显著增加，IL-10 含量降低，经橄榄苦苷、合心爽以及橄榄苦苷 + 合心爽联合治疗后，心肌 TNF- α 、IL-1 β 含量显著降低，IL-10 含量显著升高，这提示橄榄苦苷和合心爽一方面可通过抑制心肌中的炎症介质 TNF- α 、IL-1 β 的合成和释放，另一方面可通过升高抗炎因子 IL-10 的含量减轻缺血再灌注损伤引发的炎症反应及局部中性粒细胞的浸润，从而起到保护心脏的作用。

SOD 是一种以自由基为底物的抗氧化酶，能够提供氢原子使氧自由基还原成过氧化氢，而 CAT 催化过氧化氢转化为对机体无害的水和氧，从而降低过氧化损伤。MDA 是超氧化物阴离子自由基作用于生物膜磷脂结构不饱和脂肪酸所形成的终产物之一，脂质过氧化终产物 MDA 含量反映机体生物膜受损伤程度，也能间接反映机体氧自由基水平^[11]。

本实验观察显示，研究结果表明，模型组大鼠心肌 SOD、CAT 的活性显著降低，MDA 含量显著升高，提示促炎症细胞因子的高表达使得心肌抗氧化能力失衡，将造成心脏的严重损害。经橄榄苦苷、合心爽以及橄榄苦苷 + 合心爽联合治疗后，心肌 SOD、CAT 的活性显著升高，MDA 含量显著降低，说明橄榄苦苷可提高心肌的抗氧化能力，对心脏有一定的保护作用。虽然橄榄苦苷、合心爽能促进心肌抗氧化能力的恢复，但橄榄苦苷联合合心爽治疗效果明显优于单独治疗组。

内皮素-1(ET-1) 为血管内皮细胞所释放，为目前所知的最为强劲的缩血管物质，具有强烈的收缩血管及促血管重塑作用，其在调节血管开放、关闭及控制血流分布等方面起重要作用，在急性心肌缺血再灌注损伤的病理生理的整个过程中扮演着重要角色，因此对 ET-1 的干预已经成为防治心肌缺血、改善预后的重要途径^[1,12,13]。本研究结果表明，模型组与假手术组相比，大鼠心肌 ET-1 表达水平显著升高。经橄榄苦苷、合心爽以及橄榄苦苷 + 合心爽联合治疗后，大鼠心肌 ET-1 的表达水平显著降低，其中橄榄苦苷 + 合心爽组大鼠心肌 ET-1 的表达水平降低更为明显，这表明治疗药物是通过降低心肌 ET-1 的水平对缺血再灌注心肌损伤起保护作用，从而发挥其对心肌缺血的治疗作用，这也可能是橄榄苦苷对心肌缺血保护作用的机制之一。

综上所述，橄榄苦苷对心肌缺血再灌注损伤有明显的保护作用，其机制可能为橄榄苦苷进行干预后可有效降低心肌缺血再灌注损伤后内皮素-1 表达，降低炎性因子水平，改善抗氧化酶活性、减轻自由基损伤，从而起到保护心脏的作用。橄榄苦苷和合心爽联合治疗时有一定的增效作用，这为临幊上预防和治疗心肌缺血再灌注损伤提供了参考，同时为进一步开发橄榄苦苷之前所不为人知的利用价值积累了理论依据。

参考文献

- Ha LM (哈玲梅), Dong HJ (董化江), Shan NN (单娜娜), et al. Effect of gastoordin on the level of endothelin-1 in rats with myocardial ischemia-reperfusion injury. *J Xinxiang Med Univ* (新乡医学院学报), 2015, 32:395-397.
- Wang Y (王昱), Wang SQ (王胜青), Ye WB (叶文斌), et al. Renal protection of oleuropein on diabetic rats and relevant mechanism. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技), 2015, 21:26-37.

(下转第 1519 页)