

芳香新塔花总黄酮对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及机制

申静¹, 刘冲^{1,2}, 陈文^{1*}

(1. 石河子大学药学院 新疆植物药资源利用教育部重点实验室, 石河子 832000;
2. 新疆维吾尔自治区药物研究所, 乌鲁木齐 830000)

[摘要] **目的:**探讨芳香新塔花总黄酮(*Ziziphora clinopodioides* flavonoids, ZCF)对大鼠心肌缺血再灌注损伤中氧自由基、一氧化氮(NO)和细胞凋亡的影响及其机制。**方法:**60只大鼠随机分为假手术组,缺血再灌注模型组,复方丹参滴丸组(130 mg·kg⁻¹),ZCF低、中、高剂量组(75,150,300 mg·kg⁻¹)。通过结扎大鼠心脏冠状动脉左前降支30 min,再灌注3 h建立缺血再灌注损伤模型,测定大鼠血清中肌酸激酶同工酶(CK-MB),乳酸脱氢酶(LDH),超氧化物歧化酶(SOD),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px),丙二醛(MDA),NO和一氧化氮合酶(NOS)等相关指标的变化。2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色法评价心肌梗死程度,苏木素-伊红(HE)染色法观察大鼠心肌组织病理学改变,原位末端转移酶标记法(TUNEL)检测细胞凋亡。实时荧光定量聚合酶链式反应法(Real-time PCR)检测B细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)和Bcl-2相关X蛋白(Bax)mRNA的表达。**结果:**与假手术组比较,模型组大鼠血清中CK-MB,LDH,MDA的含量显著升高,SOD,GSH-Px,NO和NOS的活性显著降低,心肌梗死程度严重,出现明显的细胞凋亡,显著下调Bcl-2 mRNA表达,上调Bax mRNA表达($P < 0.01$)。与模型组比较,ZCF给药组能明显降低大鼠血清中CK-MB,LDH,MDA的含量,提高SOD,GSH-Px,NO和NOS的活性,同时可降低心肌梗死面积,改善缺血心肌的病理变化,抑制细胞凋亡,显著上调Bcl-2 mRNA表达,下调Bax mRNA表达,提高Bcl-2/Bax水平($P < 0.05, P < 0.01$)。**结论:**ZCF可减轻大鼠缺血心肌的损伤作用,其机制可能与减少氧自由基的产生,促进NO合成,上调Bcl-2 mRNA的表达,下调Bax mRNA的表达,抑制细胞凋亡有关。

[关键词] 芳香新塔花总黄酮; 心肌缺血再灌注; 氧自由基; 一氧化氮; 细胞凋亡

[中图分类号] R22;R24;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)14-0115-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181424

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180427.1815.004.html>

[网络出版时间] 2018-04-28 14:24

Protective Effect and Mechanism of *Ziziphora clinopodioides* Flavonoids Against Myocardial Ischemia-reperfusion Injury in Rats

SHEN Jing¹, LIU Chong^{1,2}, CHEN Wen^{1*}

(1. College of Pharmacy, Shihezi University, Key Laboratory of Xinjiang Phytomedicine Resources and Utilization, Ministry of Education, Shihezi 832000, China;
2. Xinjiang Institute of Materia Medica, Urumqi 830000, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect and mechanism of *Ziziphora clinopodioides* flavonoids (ZCF) on oxygen free radicals, nitric oxide (NO) and cell apoptosis of myocardial ischemia-reperfusion injury (MIRI) in rats. **Method:** Totally 60 rats were randomly divided into sham group, MIRI model group, compound Danshen dripping pills group (130 mg·kg⁻¹), low, medium and high-dose ZCF groups (75, 150, 300 mg·kg⁻¹). The

[收稿日期] 20180124(010)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81560714);自治区研究生科研创新项目(XJGR12017040)

[第一作者] 申静,在读硕士,从事新疆特种植物药新药研究与开发,E-mail: 18703082115@163.com

[通信作者] *陈文,博士,教授,从事新疆特种植物药新药研究与开发,Tel: 0993-2057612,E-mail: chen-wen2000@126.com

model of MIRI was established by ligating the left anterior descending coronary artery (LAD) for 30 min, which was followed by a 3 h reperfusion. The levels of creatine kinase isozyme (CK-MB), lactate dehydrogenase (LDH), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), malondialdehyde (MDA), nitric oxide (NO) and nitric oxide synthase (NOS) in serum were measured. The degree of myocardial infarction was evaluated by triphenyltetrazolium chlorid (TTC) staining, the pathological changes of myocardium in rats were observed by hematoxylin and eosin (HE) staining, and the cell apoptosis was detected by terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling (TUNEL). Quantitative Real-time PCR was utilized to measure Bcl-2 and Bax mRNA expressions. **Result:** Compared with the shame group, the content of CK-MB, LDH, MDA showed significant increases, while the activities of SOD, GSH-Px, NO and NOS showed significant decreases in the model group. It also showed severe myocardial infarction and obvious cell apoptosis. The expression of Bcl-2 mRNA was significantly down-regulated, and the expression of Bax mRNA was significantly up-regulated ($P < 0.01$). Compared with the model group, ZCF significantly decreased the content of CK-MB, LDH, MDA, and increased the activities of SOD, GSH-Px, NO and NOS. At the same time, the area of myocardial infarction was reduced, the pathological changes of ischemic myocardium were alleviated, and the cell apoptosis of myocardium was inhibited. The expression of Bcl-2 was significantly up-regulated, whereas the Bax mRNA expression was significantly down-regulated. The ratio of Bcl-2/Bax was significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** ZCF can reduce the damage of ischemic myocardium in rats and play a role in protecting the myocardium. This may be related to the reduction of oxygen free radicals, the promotion of NO synthesis, the up-regulation of Bcl-2 and the down-regulation of Bax mRNA expression and the inhibition of the occurrence of myocardial cell apoptosis.

[**Key words**] *Ziziphora clinopodioides* flavonids; myocardial ischemia-reperfusion injury (MIRI); oxygen free radicals; nitric oxide (NO); cell apoptosis

近年来,缺血性心脏病对人类健康产生了严重影响,临床上多采用溶栓、冠脉介入等方式恢复冠脉血流,然而缺血心肌组织恢复血流灌注后会进一步加重心肌结构和功能的损伤,称为心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia reperfusion injury, MIRI)^[1]。MIRI产生的机制可能与钙离子超载、能量代谢紊乱、氧自由基增加、炎症反应以及细胞凋亡等有关^[2]。目前MIRI尚未有较好的治疗方法,仍是缺血性心脏病治疗过程中的一个难题。

芳香新塔花又名唇香草,为唇形科新塔花属植物,在我国仅生长于新疆,系维吾尔族和哈萨克族常用药材,具有疏风散热、清利头目、壮骨强身、健胃消食等功效,多用于心脏病、高血压等心血管疾病的治疗^[3]。芳香新塔花总黄酮(*Ziziphora clinopodioides* flavonids, ZCF)是芳香新塔花中主要的有效成分之一^[4]。前期研究表明,芳香新塔花总黄酮对大鼠乳鼠心肌细胞缺氧复氧损伤和离体缺血心脏有明显的保护作用,其机制可能与清除氧自由基,提高心肌抗氧化功能有关^[5-6]。但ZCF对心肌缺血保护作用的机制是否与一氧化氮(NO)和细胞凋亡有关尚不明确。本研究通过建立大鼠在体心肌缺血再灌注损伤

模型,从氧化应激,NO和细胞凋亡等角度探讨ZCF对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及其机制,旨在为芳香新塔花的开发和利用提供药理学依据。

1 材料

1.1 动物 成年雄性SD大鼠,体质量260~300g,购自新疆实验动物研究中心,合格证号SCXK(新)2011-0003。本实验取得了石河子大学医学院第一附属医院实验动物伦理委员会的批准。

1.2 药物及试剂 ZCF(新疆维吾尔自治区药物研究所提供,纯度>60%,HPLC法测定蒙花苷含量约为64.2%);复方丹参滴丸(天津天士力制药集团股份有限公司,批号131110);乳酸脱氢酶(LDH),超氧化物歧化酶(SOD),丙二醛(MDA),肌酸激酶同工酶(CK-MB),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px),一氧化氮合酶(NOS),NO试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为20170916,20170917,20170824,20170923,20170925,20171123,20171125);细胞凋亡原位末端转移酶标记法(TUNEL)检测试剂盒(瑞士Roche公司,批号11684817910);2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC),水合氯醛(北京索莱宝生物科技有限公司,批号分别为20180202,811B024);B细胞淋

巴瘤/白血病-2 (Bcl-2), Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) mRNA 检测试剂盒(上海浩然生物技术有限公司, 批号均为 204054)。

1.3 仪器 ALC-V8S 型小动物呼吸机(上海奥尔特科特生物科技有限公司);BL-420F 型生物机能实验系统(成都泰盟科技有限公司);Eppendorf centrifuge 5430R 型高速离心机(上海心亮实业有限公司);UV-2600 紫外分光光度计(日本岛津公司);3001 型多功能酶标仪(美国 Thermo 公司);DB9 型石蜡包埋机(湖北德立森科技有限公司);LC480 II 型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(瑞士 Roche 公司)。

2 方法

2.1 分组与给药 60 只大鼠随机分为假手术组, 缺血再灌注模型组, 复方丹参滴丸组 ($130 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), ZCF 低、中、高剂量组 (75, 150, $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 每组 10 只。假手术组和模型组分别给予等体积的生理盐水。术前连续灌胃给药 7 d, 每天 1 次。

2.2 大鼠心肌缺血再灌注损伤模型的建立 术前大鼠禁食 12 h, 不禁水, 第 7 天给药 30 min 后进行手术实验。大鼠术前称体质量, 用 10% 水合氯醛 ($3.5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$) 腹腔注射麻醉, 仰卧位固定。将电极插入大鼠四肢皮下, 连接 BL-420F 生物机能实验系统, 观察正常状态下心电图情况。将 18 号静脉留置针经口插入气管, 连接小动物呼吸机, 设置呼吸频率为 80 次/min, 潮气量为 $80 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 呼吸比为 1.5:1。胸骨左侧心脏处切开皮肤, 钝性分离肌肉至见肋骨, 通过第 3 到 4 肋间打开胸腔, 小心撕破心包膜, 以伴行的左冠状静脉为标志, 于左心耳下缘 1~2 mm 处用 6-0 号手术线穿过心肌表层结扎冠状动脉左前降支, 打一活结以阻断血流的供应, 30 min 后松开结扎线, 再灌注 3 h 造成心肌缺血再灌注损伤模型。以心电图 ST 抬高, 缺血区心肌呈紫绀为结扎成功的标志^[7]。假手术组仅穿线不结扎冠状动脉左前降支。

2.3 大鼠心肌梗死面积测定 再灌注结束后取出心脏, 用 4 ℃ 生理盐水清洗干净, 并置于 -20 ℃ 冷冻 20 min 后取出, 切成 2~3 mm 的薄片。将薄片置于 TTC 染液中, 37 ℃ 水浴孵育 20~30 min, 每隔 5 min 将薄片翻面。染完后, 用 10% 甲醛溶液固定 24 h, 拍照。切片中白色区域为缺血组织, 红色区域为正常组织。采用 Image Pro Plus 6.0 软件分析, 计算心肌梗死面积率。

心肌梗死面积率 = (梗死面积/心肌总面积) × 100%

2.4 心肌组织病理学和心肌细胞凋亡观察 手术结束后将心脏置于 10% 的甲醛中固定 24 h, 常规脱水, 石蜡包埋、切片, 苏木素-伊红 (HE) 染色, 200 倍光镜下观察心肌组织病理学变化。TUNEL 染色, 严格按照原位细胞凋亡试剂盒说明书操作。400 倍光镜下, 每张切片随机选取 6 个不同的视野, 计算各组心肌细胞凋亡率。

心肌细胞凋亡率 = 凋亡心肌细胞数/心肌细胞总数 × 100%

2.5 血清心肌损伤标志酶 CK-MB 和 LDH 活性的测定 再灌注结束时, 麻醉大鼠, 快速打开腹腔, 腹主动脉取血, $4\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 分装血清, 放于 -80 ℃ 条件下, 备用。严格按照说明书测定 CK-MB, LDH 活性。

2.6 血清氧化应激指标 SOD, GSH-Px 活性和 MDA 含量的测定 再灌注结束时, 麻醉大鼠, 快速打开腹腔, 腹主动脉取血, $4\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 分装血清, 放于 -80 ℃ 条件下, 备用。黄嘌呤氧化酶法测定 SOD, 比色法测定 GSH-Px, 硫代巴比妥酸法测定 MDA。严格按照说明书测定 SOD, GSH-Px, MDA 水平。

2.7 血清中 NO 含量和 NOS 活性测定 NO 含量和 NOS 活性按照说明书的操作进行。用酶联免疫吸附法检测血清中 NO 含量, 用紫外分光光度法测定 NOS 活性。

2.8 Real-time PCR 检测 Bcl-2 和 Bax mRNA 表达 取心尖部心肌组织, 切碎研磨后, 用提取试剂盒对组织中总 RNA 进行提取, 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 纯度、完整性, 取吸光度 $A_{260}/A_{280} \geq 1.80$ 样品作为合格样品。将经过稀释后的 RNA 样本进行反转录合成 cDNA, 然后进行 PCR 反应。引物序列为 β -肌动蛋白 (β -actin, 189 bp) 上游引物 5'-CCACCATGTACCCAGGCATT-3', 下游引物 5'-CGGACTCATCGTACTCCTGC-3'; Bcl-2 (90 bp) 上游引物 5'-GATTGTGGCCTTCTTTGAGT-3', 下游引物 5'-CACAGAGCGATGTTGTCC-3'; Bax (85 bp), 上游引物 5'-TGAGCTGACCTTGAGCA-3', 下游引物 5'-GTCCAGTTCATCGCCAAT-3'。PCR 程序: 95 ℃ 5 min; 95 ℃ 10 s, 60 ℃ 30 s, 40 个循环, 设 β -actin 为内参, 根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 mRNA 的相对表达量。

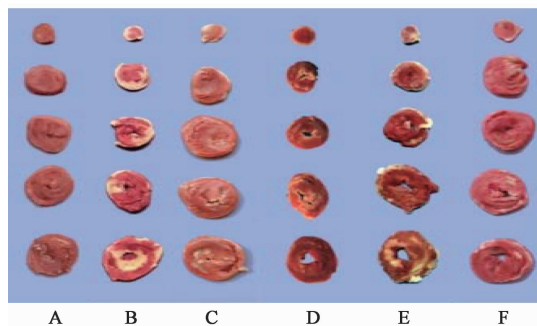
2.9 统计学分析 统计学处理采用 SPSS 20.0 统计软件进行分析, 不同组间差异用单因素方差分析。

所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 模型建立结果监测 心电图是缺血心肌变化的敏感指标。通过监测大鼠心电图可知,结扎冠状动脉左前降支后,心电图出现明显的波形改变,ST 段抬高幅度明显,心率加快,表明大鼠在体心肌缺血再灌注损伤模型建立成功。

3.2 对 MIRI 大鼠心肌梗死面积的影响 假手术组心肌染色正常,几乎无梗死;与假手术组比较,模型组梗死面积显著增多,表明心肌梗死程度严重 ($P < 0.01$);与模型组比较,丹参滴丸组,ZCF 各剂量组均能减少心肌梗死面积,减轻心肌梗死程度 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 1 和表 1。



A. 假手术组; B. 模型组; C. 丹参滴丸组; D. ZCF 75 mg·kg⁻¹ 组; E. ZCF 150 mg·kg⁻¹ 组; F. ZCF 300 mg·kg⁻¹ 组 (图 2, 3 同)

图 1 ZCF 对 MIRI 大鼠心肌梗死面积的影响

Fig. 1 Effect of ZCF on infarct size in MIRI rats

表 1 ZCF 对 MIRI 大鼠心肌梗死面积的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 Effect of ZCF on infarct size in MIRI rats ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

| 组别 | 剂量/mg·kg ⁻¹ | 心肌梗死面积/% |
|------|------------------------|----------------------------|
| 假手术 | - | 0.95 ± 0.09 |
| 模型 | - | 42.90 ± 1.91 ¹⁾ |
| 丹参滴丸 | 130 | 14.77 ± 1.90 ³⁾ |
| ZCF | 75 | 39.79 ± 1.28 ²⁾ |
| | 150 | 24.04 ± 0.79 ³⁾ |
| | 300 | 13.97 ± 1.62 ³⁾ |

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表 2~6 同)。

3.3 对 MIRI 大鼠心肌组织病理形态学的影响 光学显微镜下观察大鼠心肌结构,假手术组心肌纤维排列整齐,细胞核着色均匀、清晰,间质无水肿、炎症浸润,无坏死现象;模型组心肌损伤严重,细胞核着色不均匀,间质炎性细胞浸润,水肿明显,血管瘀血严重;与模型组比较,丹参滴丸组心肌纤维排列整

齐,水肿减轻,间质偶见炎性细胞浸润,只有轻微的血管瘀血;ZCF 高、中剂量组能明显降低缺血再灌注引起的心肌损伤,细胞核着色相对均匀,间质炎性细胞浸润明显减少,水肿减轻,血管瘀血明显减少,而低剂量组间质仍有大量的炎性细胞浸润,心肌纤维排列出现轻微紊乱。见图 2。

经 TUNEL 染色和苏木素复染后,凋亡心肌细胞核被染成棕黄色或棕褐色,正常心肌细胞核被染成蓝色。模型组细胞凋亡指数与假手术组比较,具有显著性差异 ($P < 0.01$);给予丹参滴丸和 ZCF 后,凋亡细胞数明显减少 ($P < 0.05, P < 0.01$),结果提示 ZCF 可以抑制心肌细胞的凋亡,见图 3 和表 2。

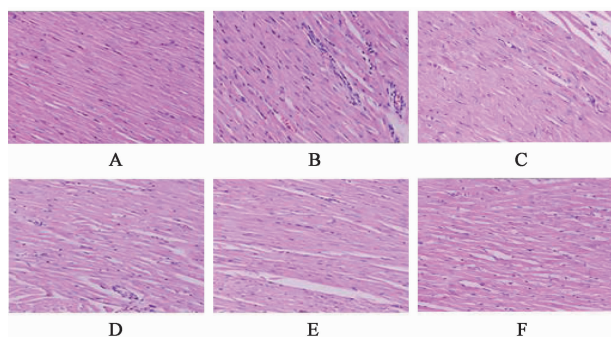


图 2 ZCF 对 MIRI 大鼠心肌结构病理学变化的影响 (HE, × 200)

Fig. 2 Effect of ZCF on pathological changes of myocardial structure in MIRI rats (HE, × 200)

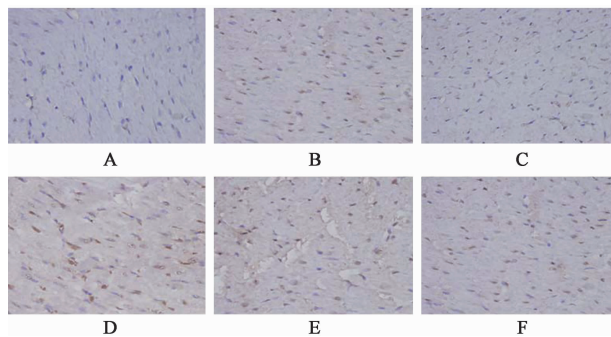


图 3 ZCF 对 MIRI 大鼠心肌细胞凋亡的影响 (TUNEL, × 400)

Fig. 3 Effect of ZCF on cardiomyocytes apoptosis in MIRI rats (TUNEL, × 400)

3.4 对 MIRI 血清心肌损伤标志酶 CK-MB 和 LDH 的影响 与假手术组比较,模型组血清中 CK-MB, LDH 活性显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较,丹参滴丸组,ZCF 高、中剂量组 CK-MB 和 LDH 的活性明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$),ZCF 低剂量组对 CK-MB 活性的影响与模型组比较也有显著性差异 ($P < 0.01$),但对 LDH 活性的影响无显著性差异。见表 3。

3.5 对 MIRI 大鼠血清中氧化应激指标 SOD,

表 2 ZCF 对 MIRI 大鼠心肌细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 2 Effect of ZCF on cardiomyocytes apoptosis rate in MIRI rats ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

| 组别 | 剂量/mg·kg ⁻¹ | 心肌细胞凋亡率/% |
|------|------------------------|----------------------------|
| 假手术 | - | 7.36 ± 0.58 |
| 模型 | - | 56.02 ± 2.91 ¹⁾ |
| 丹参滴丸 | 130 | 22.37 ± 2.20 ³⁾ |
| ZCF | 75 | 47.19 ± 1.88 ²⁾ |
| | 150 | 38.99 ± 1.83 ³⁾ |
| | 300 | 28.14 ± 1.39 ³⁾ |

表 3 ZCF 对 MIRI 大鼠血清 CK-MB 和 LDH 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of ZCF on serum CK-MB and LDH activities in MIRI rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 剂量/mg·kg ⁻¹ | CK-MB | LDH |
|------|------------------------|---------------------------|----------------------------|
| 假手术 | - | 0.20 ± 0.04 | 9.57 ± 1.49 |
| 模型 | - | 0.84 ± 0.30 ¹⁾ | 13.09 ± 0.75 ¹⁾ |
| 丹参滴丸 | 130 | 0.44 ± 0.02 ³⁾ | 10.91 ± 2.45 ³⁾ |
| ZCF | 75 | 0.52 ± 0.04 ³⁾ | 12.78 ± 0.22 |
| | 150 | 0.37 ± 0.03 ³⁾ | 11.45 ± 0.98 ²⁾ |
| | 300 | 0.34 ± 0.05 ³⁾ | 10.24 ± 0.9 ³⁾ |

GSH-Px 及 MDA 水平的影响 与假手术组比较,模型组能够显著增加 MDA 的含量,降低 SOD, GSH-Px 的活性 ($P < 0.01$)。与模型组比较,除 ZCF 低剂量组外,丹参滴丸组和 ZCF 高、中剂量组均能明显升高 GSH-Px 活性,降低 MDA 含量,而 ZCF 各剂量组均能升高 SOD 活性 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 4。

表 4 ZCF 对 MIRI 大鼠血清中 SOD, GSH-Px 及 MDA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effect of ZCF on serum SOD, GSH-Px and MDA in MIRI rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 剂量/mg·kg ⁻¹ | SOD /U·mL ⁻¹ | GSH-Px /mol·L ⁻¹ | MDA /μmol·L ⁻¹ |
|------|------------------------|------------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| 假手术 | - | 192.61 ± 46.36 | 1.53 ± 0.07 | 3.26 ± 0.77 |
| 模型 | - | 130.29 ± 20.05 ¹⁾ | 1.31 ± 0.04 ¹⁾ | 6.48 ± 3.02 ¹⁾ |
| 丹参滴丸 | 130 | 180.29 ± 39.95 ³⁾ | 1.45 ± 0.05 ³⁾ | 3.87 ± 1.04 ³⁾ |
| ZCF | 75 | 166.82 ± 18.67 ²⁾ | 1.37 ± 0.06 | 5.08 ± 0.81 |
| | 150 | 173.74 ± 10.74 ³⁾ | 1.42 ± 0.03 ³⁾ | 4.29 ± 0.09 ²⁾ |
| | 300 | 184.05 ± 20.85 ³⁾ | 1.48 ± 0.06 ³⁾ | 3.89 ± 0.45 ³⁾ |

3.6 对 MIRI 大鼠血清中 NO 和 NOS 水平的影响 模型组血清 NO 和 NOS 水平与假手术组比较显

著降低 ($P < 0.01$); 给药后,丹参滴丸组和 ZCF 高、中剂量组 NO 和 NOS 水平较模型组明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$), 而 ZCF 低剂量组无统计学意义。见表 5。

表 5 ZCF 对 MIRI 大鼠血清中 NO 和 NOS 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 5 Effect of ZCF on serum NO and NOS levels in MIRI rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 剂量/mg·kg ⁻¹ | NO/μmol·L ⁻¹ | NOS/U·mL ⁻¹ |
|------|------------------------|---------------------------|----------------------------|
| 假手术 | - | 10.13 ± 2.50 | 41.12 ± 5.97 |
| 模型 | - | 3.62 ± 1.42 ¹⁾ | 16.13 ± 1.93 ¹⁾ |
| 丹参滴丸 | 130 | 6.86 ± 0.64 ²⁾ | 23.10 ± 3.54 ³⁾ |
| ZCF | 75 | 3.64 ± 2.14 | 18.27 ± 2.67 |
| | 150 | 6.46 ± 2.38 ²⁾ | 21.54 ± 0.91 ²⁾ |
| | 300 | 7.67 ± 1.36 ³⁾ | 30.02 ± 1.80 ³⁾ |

3.7 对 MIRI 大鼠心肌 Bcl-2 和 Bax mRNA 的表达 与假手术组比较,模型组 Bcl-2 mRNA 的表达显著降低 ($P < 0.01$), Bax mRNA 的表达显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较,ZCF 各剂量组 Bcl-2 mRNA 的表达及 Bcl-2 /Bax 显著提高,丹参滴丸组也存在显著性差异 ($P < 0.05, P < 0.01$), 而 Bax mRNA 的表达下降 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 6。

表 6 ZCF 对 MIRI 大鼠心肌 Bax 和 Bcl-2 mRNA 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 6 Effect of ZCF on expression of Bax and Bcl-2 mRNA in myocardium of MIRI rats ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

| 组别 | 剂量 /mg·kg ⁻¹ | Bcl-2 | Bax | Bcl-2/Bax |
|------|-------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 假手术 | - | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 |
| 模型 | - | 0.34 ± 0.02 ¹⁾ | 1.99 ± 0.55 ¹⁾ | 0.17 ± 0.01 ¹⁾ |
| 丹参滴丸 | 130 | 0.84 ± 0.03 ³⁾ | 1.56 ± 0.06 ³⁾ | 0.54 ± 0.03 ³⁾ |
| ZCF | 75 | 0.44 ± 0.04 ²⁾ | 1.92 ± 0.03 ²⁾ | 0.23 ± 0.02 ²⁾ |
| | 150 | 0.58 ± 0.06 ³⁾ | 1.87 ± 0.02 ³⁾ | 0.31 ± 0.03 ³⁾ |
| | 300 | 0.74 ± 0.08 ³⁾ | 1.72 ± 0.02 ³⁾ | 0.43 ± 0.05 ³⁾ |

4 讨论

随着人们生活水平的提高,缺血性心脏病的发病率和死亡率逐年升高,成为危害人类健康的重要杀手,而临床上对 MIRI 损伤仍未获得满意的治疗效果,因此寻找和开发新的药物成为有效防治 MIRI 的热点。MIRI 损伤的发生过程是一个复杂的病理生理过程,发生机制因其复杂性尚未明确。

复方丹参滴丸是由丹参、三七、冰片组成的复

方,主要成分为水溶性丹参素和三七皂苷,作为一种传统的中药复方制剂已被广泛用于心血管疾病的治疗,防治冠心病疗效确切,临床上得到广泛应用^[8],因此将其作为本研究的阳性药物。黄酮类化合物具有抗肿瘤、抑菌、抗氧化等药理活性^[9],对 MIRI 有一定的保护作用。芳香新塔花富含黄酮类化合物,其总黄酮具有清除自由基的能力,保护心肌损伤的作用。

大量研究表明,氧自由基的大量产生和抗氧化能力减弱介导的氧化应激是心肌损伤产生的重要机制之一^[9-10]。MIRI 后会产生大量的氧自由基,从而引起生物膜的多不饱和脂肪酸发生脂质过氧化,并且产生脂质过氧化的代谢产物 MDA^[11-12]。MDA 作为脂质过氧化的代谢产物,其含量可反映细胞受自由基损伤的程度。SOD, GSH-Px 是机体内清除自由基重要的抗氧化酶类,可以抑制活性氧(ROS)和氧化应激的产生^[13],有效保护心肌免受 MIRI 损伤。本研究中,ZCF 和丹参滴丸给药组均可显著减少 MDA 的含量,增加 SOD 和 GSH-Px 活性,起到保护心肌的作用。由此可知,ZCF 可增强心肌抗氧化能力,抑制脂质过氧化物的产生,推测 ZCF 对 MIRI 损伤的保护作用可能是通过抗氧化作用起效的。

MIRI 后心肌细胞膜会受到损伤,使细胞内大量的心肌酶外漏。心肌酶 CK-MB, LDH 被认为是能反映心肌细胞受损水平的重要标志酶,对诊断心肌梗死有重要意义^[14],因此通过检测 CK-MB, LDH 的活性可判断心肌坏死量,评价心肌损伤的程度。本研究表明,ZCF 和丹参滴丸给药组均可抑制 CK-MB, LDH 活性的升高,说明给予 ZCF 后可以防止心肌酶的外漏。此外,心电图 ST 段抬高与心肌梗死面积是反映心肌损伤程度的直观指标。本研究中,结扎冠状动脉左前降支后,ST 段明显抬高,表明 MIRI 损伤模型复制成功。ZCF 和丹参滴丸可降低心肌梗死程度,改善缺血心肌的病理变化,缩小病变范围以及细胞凋亡程度,提示 ZCF 保护 MIRI 损伤可能是通过降低心肌耗氧来发挥作用的。

NO 为血管内皮舒张因子,在生物体内作为一种反应性极强的自由基,是生物体内重要的信使分子和效应分子,在体内具有广泛的生理作用,在 MIRI 损伤中发挥着双重作用,是保护作用还是细胞毒性作用目前仍有争议^[15]。NO 的合成需 NOS 的催化才能完成,NOS 是合成 NO 关键的酶,二者共同参与调控冠脉血管的收缩与舒张,对缺血后心功能的恢复及预后具有重要作用。本研究中 ZCF 和丹

参滴丸可通过提高 NOS 的活性,进而增加 NO 的含量,同时病理切片可见 ZCF 和丹参滴丸可减少炎症细胞浸润,这可能与 NO 有效抑制炎症反应从而起到保护心肌的作用。

细胞凋亡的过程与许多基因相关,其中是 Bcl-2 是主要的抑制凋亡基因,而其同源体诱导凋亡基因 Bax 则抑制 Bcl-2 的表达及活性。Bcl-2 与 Bax 是一个平衡体系,Bax 表达过度,则细胞凋亡增加。目前研究证明,心肌缺血再灌注状态下,心肌组织氧化应激加剧,并通过调控炎症、细胞增生和分化等相关基因表达,促进细胞凋亡的生成^[16]。通常 Bcl-2/Bax 可反映 Bcl-2 和 Bax 在细胞凋亡中的作用,比值升高,则抑制细胞凋亡,反之促进细胞凋亡^[17]。本研究发现,ZCF 和丹参滴丸可有效抑制 MIRI 过程中细胞的凋亡,上调 Bcl-2 mRNA 的表达量,下调 Bax mRNA 的表达量,提高 Bcl-2/Bax。关于凋亡及抗凋亡因子的研究,在心肌缺血中研究较多,但有关 ZCF 是否可以抑制该病中凋亡相关基因的表达尚未见报道。

本实验表明,ZCF 可以明显提高心肌组织的抗氧化能力,促进 NO 合成,上调 Bcl-2 表达,降低 Bax 表达,抑制心肌细胞的凋亡,有效保护 MIRI 损伤。

芳香新塔花是新疆维吾尔族民间传统中草药,资源丰富,分布广泛,临床上已用于高血压及心脑血管疾病的治疗。黄酮类化合物是芳香新塔花中重要的活性成分。文献报道^[18],从中得到的黄酮类化合物有槲皮素、木犀草素、芹菜素、金合欢素、蒙花苷等,研究表明这些化合物均具有保护 MIRI 损伤的作用。新疆是一个少数民族居多的地区,地域辽阔,传统中药如复方丹参滴丸虽起到不可忽视的作用,但民族药资源丰富,发展历史悠久,疗效显著,开发民族药势在必行。本文主要是对芳香新塔花总黄酮抗氧化及抑制细胞凋亡作用机制进行了初步研究,但 MIRI 过程涉及的发病机制很多,通常与多个信号通路相关,后期可对相应的信号通路蛋白进行研究,以期明确芳香新塔花总黄酮的作用机制,为后续芳香新塔花的开发利用提供理论基础。

[参考文献]

- [1] ZHANG X, LIANG X, LIN X, et al. Mechanism of the protective effect of Yulangsan flavonoid on myocardial ischemia/reperfusion injury in rats [J]. Cell Physiol Biochem, 2014, 34(4): 1050-1062.

- [2] ZHANG Y, YUAN C, HE F, et al. Total flavonoid extract from *Coreopsis tinctoria* Nutt. protects rats against myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. Iran J Basic Med Sci, 2016, 19(9):1016-1023.
- [3] 邹阳春, 洪秀芳. 新疆新塔花对高血压病人脂质过氧化反应及血压水平的干预研究[J]. 新疆医科大学学报, 1994, 17(2):97-100.
- [4] 杨伟俊, 顾政一, 满尔哈巴, 等. 芳香新塔花中黄酮类成分的研究[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(2):375-376.
- [5] 杨伟俊, 哈木拉提, 孙玉华, 等. 芳香新塔花对大鼠急性心肌缺血和乳鼠心肌细胞的保护作用[J]. 现代药物与临床, 2010, 25(3):194-198.
- [6] 陈秋红, 李钦, 杨伟俊, 等. 芳香新塔花总黄酮对大鼠离体心脏缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国现代应用药学, 2015, 32(3):264-268.
- [7] 刘祥, 景桂霞, 白娟, 等. 舒芬太尼预处理对大鼠心肌缺血再灌注时 PI3K/Akt 的影响[J]. 南方医科大学学报, 2014, 34(3):335-340.
- [8] 袁如玉, 李广平. 复方丹参滴丸在心血管疾病防治中的多靶点作用[J]. 中国新药杂志, 2009, 18(5):377-380.
- [9] 郭新红, 王新春. 黄酮类化合物抗心肌缺血再灌注损伤研究进展[J]. 中成药, 2014, 36(10):2168-2171.
- [10] Lorgis L, Zeller M, Dentan G, et al. The free oxygen radicals test (FORT) to assess circulating oxidative stress in patients with acute myocardial infarction[J]. Atherosclerosis, 2010, 213(2):616-621.
- [11] 周朝伟, 严冬. 心肌缺血再灌注损伤中医药研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2014, 16(3):217-220.
- [12] 卢宁, 韩吉春, 任博雪, 等. 二氢槲皮素预处理对心肌缺血/再灌注损伤抗氧化作用的影响[J]. 中国药理学通报, 2017, 33(4):487-492.
- [13] Niizuma K, Yoshioka H, CHEN H, et al. Mitochondrial and apoptotic neuronal death signaling pathways in cerebral ischemia[J]. Iran J Basic Med Sci, 2010, 1802(1):92-99.
- [14] Khalil M I, Tanvir E M, Afroz R, et al. Cardioprotective effects of tualang honey: amelioration of cholesterol and cardiac enzymes levels[J]. Biomed Res Int, 2015, doi: org/10.1155/2015/286051.
- [15] 宋瑾, 王超, 阳仁达, 等. 电针内关穴预处理对心肌缺血再灌注损伤大鼠 NO, NOS 及线粒体膜电位的影响[J]. 上海针灸杂志, 2017, 36(10):1247-1252.
- [16] 李军, 石博, 黄可欣, 等. 葛根素对心肌缺血再灌注大鼠心肌组织 Bcl-2, Bax 和 Caspase-3 表达水平的影响[J]. 中国实验诊断学, 2013, 17(4):631-633.
- [17] Renault T T, Dejean L M, Manon S. A brewing understanding of the regulation of Bax function by Bcl-xL and Bcl-2 [J]. Mech Ageing Dev, 2016, 161(Pt B):201.
- [18] 廖晶晶. 芳香新塔花总黄酮分离纯化及滴丸剂的制备工艺研究[D]. 乌鲁木齐:新疆医科大学, 2012.

[责任编辑 周冰冰]