

## 番茄红素对离体豚鼠心脏缺血/再灌注损伤的影响

张建武<sup>1</sup>, 朱姝<sup>2</sup>, 刘文虎<sup>1</sup>, 李生茂<sup>1</sup>, 余娟<sup>1</sup>, 闵冬雨<sup>3\*</sup>

(1. 川北医学院药理教研室, 四川南充 637100; 2. 中国医科大学口腔医院, 沈阳 110002;  
3. 辽宁中医药大学附属医院, 沈阳 110032)

**[摘要]** 目的:探讨番茄红素对豚鼠离体心脏缺血/再灌注损伤的影响。方法:将30只豚鼠离体心脏随机分为5组:正常组、缺血/再灌注组(Model)、番茄红素低剂量组(2.5 mg·L<sup>-1</sup>)、番茄红素中剂量组(5 mg·L<sup>-1</sup>)、番茄红素高剂量组(10 mg·L<sup>-1</sup>)。模型组全心缺血40 min之后,K-H液继续灌注60 min,治疗组的灌流液中加入不同质量浓度的番茄红素。观察的指标有:心率、冠脉流量、梗死面积、灌流液中乳酸脱氢酶(LDH)含量、心肌组织中丙二醛(MDA)含量和超氧化物歧化酶(SOD)的活性。结果:各组在再灌注后各项指标均发生变化,在再灌注60 min时,模型组与正常组比较心率下降(125±9), (169±16)次/min ( $P < 0.01$ );灌流量下降(3.48±0.43), (5.53±0.30) mL·min<sup>-1</sup> ( $P < 0.01$ );梗死面积显著增加(19.57±2.34), (1.57±0.29)% ( $P < 0.01$ );LDH漏出量增加(206.67±11.85), (120.96±13.56) U·L<sup>-1</sup> ( $P < 0.01$ );SOD活性下降(99.14±8.24), (153.22±8.93) U·mg<sup>-1</sup> ( $P < 0.01$ ),MDA含量增加(6.17±0.73), (3.80±0.41) μmol·g<sup>-1</sup> ( $P < 0.01$ )。与模型组比较,番茄红素各组心率和冠脉流量增加,梗死面积减少,LDH漏出量减少,心肌组织中MDA含量降低,SOD活性增加,各剂量组之间呈剂量依赖性。结论:番茄红素对豚鼠离体心脏缺血/再灌注损伤有保护作用,其作用机制可能与抗氧化应激相关。

**[关键词]** 番茄红素; 缺血再灌注损伤; 离体心脏; 脂质过氧化

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)10-0134-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014100134

## Effects of Lycopene on Ischemia/Reperfusion Injure in Isolated Heart of Guinea Pig

ZHANG Jian-wu<sup>1</sup>, ZHU Shu<sup>2</sup>, LIU Wen-hu<sup>1</sup>, LI Sheng-mao<sup>1</sup>, YU Xian<sup>1</sup>, MIN Dong-yu<sup>3\*</sup>

(1. Department of Pharmacology, North Sichuan Medical College, Nanchong 637100, China;

2. Stomatological Hospital, North Sichuan Medical College, Shenyang 110002, China;

3. Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the effects of lycopene on ischemia reperfusion injure in heart of isolated guinea pig. **Method:** Thirty isolated guinea pig hearts were divided into five groups: control group, model group, lycopene L group (2.5 mg·L<sup>-1</sup>), lycopene M group (5 mg·L<sup>-1</sup>), lycopene H group (10 mg·L<sup>-1</sup>). Heart rate (HR), coronary flow (CF), infarct size, lactate dehydrogenase (LDH) in effluent, malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) in heart tissues were measured in different groups. **Result:** The indexes of each group are changed after reperfusion, when reperfusion 60 min, compared with the control group, model group showed that HR was decreased (125±9), (169±16) stroke per·minute<sup>-1</sup>,  $P < 0.01$ , CF decreased (3.48±0.43), (5.53±0.30) mL·min<sup>-1</sup>,  $P < 0.01$ ; infarct size increased (19.57±2.34)%, (1.57±0.29)%,  $P < 0.01$ . the level of LDH increased (206.67±11.85), (120.96±13.56) U·L<sup>-1</sup>,  $P < 0.01$ , SOD activity decreased (99.14±8.24), (153.22±8.93) U·mg<sup>-1</sup>,  $P < 0.01$ ; the level of MDA increased (6.17±

**[收稿日期]** 20131221(001)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81102288)

**[第一作者]** 张建武, 硕士, 讲师, 从事心脑血管和肿瘤新药药理研究工作, Tel:13330770304, E-mail:546815404@qq.com

**[通讯作者]** \* 闵冬雨, 博士, 主管药师, 从事心脑血管疾病防治研究工作, Tel:18102459196, E-mail:mindongyu@163.com

0.73),  $(3.80 \pm 0.41) \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ ,  $P < 0.01$ 。Compared to model group, Lycopene group reduced infarct size and releases of LDH in effluent and MDA in heart tissues, increased HR, CF and the activity of SOD in heart tissues. **Conclusion:** The findings indicate that in the isolated guinea pig heart, lycopene can protect myocardium against ischemia/reperfusion injury and the mechanism could be related to lipid peroxidation in heart.

[**Key words**] lycopene; ischemia reperfusion; isolated heart; lipid peroxidation

心肌缺血/再灌注损伤(myocardial ischemia/reperfusion injury, MIRI)是指心肌缺血后得到血液再灌注而引起的心肌组织损伤加重,甚至转为不可逆性损伤。目前关于缺血/再灌注损伤的机制有很多,公认的有氧化应激学说、钙超载学说、炎症学说等,其中氧化应激学说占有重要地位。因此,寻找一种具有抗氧化应激作用的药物是降低心肌缺血/再灌注损伤的策略之一。

番茄红素是一种重要的类胡萝卜素,主要存在于番茄及其制品中,是一种重要的功能性色素,目前已证实其具有抗炎<sup>[1]</sup>、抗氧化<sup>[2-3]</sup>、抑制突变、减轻核酸损伤、预防衰老和预防癌症<sup>[4]</sup>等多种生物学效应,尤其是其强大的抗氧化作用正日益受到关注。目前对于番茄红素防治心血管病的机制研究很少,有研究表明,番茄红素对心血管具有保护作用<sup>[5]</sup>,能够增加心肌的抗氧化应激和抗炎的能力。近年来有研究表明番茄红素对急性心肌缺血有改善作用,减少心肌梗死面积<sup>[6]</sup>。

因此,为了更加深入研究番茄红素对心脏的保护作用,作者在前期已经建立的蟾蜍离体心脏实验的基础上进行改进,采用豚鼠离体心脏为研究对象,建立心肌缺血/再灌注损伤模型,来研究番茄红素对心肌缺血/再灌注损伤的保护作用及与抗脂质过氧化化的相关机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 豚鼠 30 只,雌雄不限,280 ~ 320 g,普通级,北京科宇实验动物养殖中心,许可证号 SCXK(京)2007-2003。

**1.2 试剂** 乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(批号 20131014),丙二醛(MDA)试剂盒(批号 20131016),超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(批号 20131009)均购自南京建成生物科技有限公司,2,3,5-三苯基氯化四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC,由 Amesco 提供),Krebs-Henseleit (KH)溶液( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ):NaCl 116, KCl 3.6, CaCl<sub>2</sub> 1.2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.16, MgSO<sub>4</sub> 0.58, NaHCO<sub>3</sub> 23.0, glucose 5.4, pyruvate 0.3, insulin 2.8 U · L<sup>-1</sup>, pH 7.38 ~ 7.42。

**1.3 药品** 番茄红素(南京泽朗生物科技有限公司,来源于西红柿的果实,纯度 96%,批号 ZL201304812a)。

**1.4 仪器** Langendorff 装置(中国,成都泰盟公司),DH-140B 型动物人工呼吸机(中国,浙江医科大学仪器厂),HH.S21 型恒温水浴锅(中国,上海凯乐电子设备厂),5804R 型低温高速离心机(德国,Eppendorf 公司),CX41 型显微镜(日本,Olympus 公司),752 型紫外分光光度计(中国,上海光学仪器厂)。

## 2 方法

**2.1 动物模型的制备** 参考以往方法<sup>[7]</sup>,在本实验室的条件下加以改进,豚鼠适应性饲养 5 d,腹腔注射  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  水合氯醛麻醉,仰卧位固定,行气管插管,剪开胸腔,暴露主动脉,心脏在体插管并用动脉夹固定,将心脏分离并置于 37 °C 的保温玻璃槽中进行主动脉灌注,灌注过程中持续通入含 95% O<sub>2</sub> 和 5% CO<sub>2</sub> 混合气体。

**2.2 分组** 于 Langendorff 灌流装置中用 K-H 液灌注心脏,先平衡 10 min,稳定 15 min。正常组( $n = 6$ )继续用 K-H 液灌流 100 min;各个缺血再灌注组均采用止血钳夹闭灌流管,模型组是全心缺血 40 min 之后松开止血钳,K-H 液继续灌注 60 min(I 40/R 60,  $n = 6$ )。番茄红素组各药物(终质量浓度分别为 2.5, 5, 10  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )溶于 K-H 液中,其他操作与模型组相同,共 5 组。

### 2.3 观察指标

**2.3.1 心率(heart rate, HR)** 稳定第 15 min 的心率作为基础心率。正常组分别于稳定 15 min 后第 45, 55, 65, 80, 100 min 记录心率;模型组和给药组于再灌注第 5, 15, 25, 40, 60 min 记录心率。

**2.3.2 冠脉流量(coronary flow, CF)** 利用蠕动泵将 37 °C 保温的灌流液输送至距离体灌流心脏 75 cm 高的贮液罐中,并维持该高度。收集稳定第 15 min 的灌流液做为基础冠脉流量。正常组分别于稳定 15 min 后第 45, 55, 65, 80, 100 min 记录冠脉流量;模型组和给药组于再灌注第 5, 15, 25, 40, 60 min 记录冠脉流量。

**2.3.3 灌流液中 LDH 活力的测定** 正常组收集稳定 15 min 的最后 1 min, 稳定 15 min 后第 45, 55, 65, 80, 100 min 的灌流液, 模型组和给药组收集再灌注第 5, 15, 25, 40, 60 min 的灌流液。

**2.3.4 心肌组织 MDA 和 SOD 测定** 取心尖 100 mg 左右, 于生理盐水中清洗, 加入 9 倍生理盐水制备 10% 心肌匀浆液, 用于测定 MDA; 将 10% 心肌匀浆液稀释后测定 SOD。操作过程按试剂盒说明书进行。

**2.3.5 心肌梗死面积测定** 剩余心肌组织, 于 -20 °C 冰箱中冻存 15 min, 取出, 横切为 4 片, 于 0.1 mol·L<sup>-1</sup> PBS 配制的 1% TTC 溶液中 37 °C 恒温水浴染色 10 min, 然后显微镜下拍照, 计算梗死面积, 并根据心肌梗死面积比 = 未染色面积/心肌片总面积 × 100%, 计算心脏横切片的梗死面积比。

**2.4 统计分析** 实验数据用 SPSS 11 统计软件

进行处理, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。各组数据间采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对离体心脏心率的影响** 再灌注 5, 15, 25, 40, 60 min 时模型组与正常组比较心率降低 ( $P < 0.01$ )。再灌注 15 min 时, 番茄红素低剂量组与模型组比较心率升高 ( $P < 0.05$ )。在再灌注 5, 15, 25, 40, 60 min 时, 番茄红素中、高剂量组与模型组比较心率升高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。见表 1。

**3.2 对豚鼠离体心脏冠脉流量的影响** 再灌注 5, 15, 25, 40, 60 min 时, 模型组与正常组比较冠脉流量降低 ( $P < 0.01$ )。除番茄红素中剂量组在再灌注 60 min 外, 番茄红素各剂量组与模型组比较再灌注 5, 15, 25, 40, 60 min 时冠脉流量升高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。见表 2。

表 1 番茄红素对豚鼠离体心脏心率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

次/min

组别	剂量 /mg·L <sup>-1</sup>	各再灌注时间的心率					
		0 min	5 min	15 min	25 min	40 min	60 min
正常	-	171 ± 9	179 ± 15	186 ± 21	188 ± 8	186 ± 9	169 ± 16
模型	-	175 ± 10	125 ± 8 <sup>1)</sup>	131 ± 9 <sup>1)</sup>	129 ± 6 <sup>1)</sup>	124 ± 12 <sup>1)</sup>	125 ± 9 <sup>1)</sup>
番茄红素	2.5	173 ± 9	137 ± 13	145 ± 8 <sup>2)</sup>	136 ± 5	128 ± 14	130 ± 9
	5.0	170 ± 9	147 ± 6 <sup>3)</sup>	155 ± 12 <sup>3)</sup>	154 ± 11 <sup>3)</sup>	161 ± 10 <sup>3)</sup>	147 ± 16 <sup>2)</sup>
	10.0	168 ± 12	152 ± 11 <sup>3)</sup>	162 ± 12 <sup>3)</sup>	177 ± 4 <sup>3)</sup>	163 ± 14 <sup>3)</sup>	158 ± 9 <sup>3)</sup>

注: 与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; 与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>3)</sup>  $P < 0.01$  (表 2~4 同)。

表 2 番茄红素对豚鼠离体心脏冠脉流量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

mL·min<sup>-1</sup>

组别	剂量 /mg·L <sup>-1</sup>	各再灌注时间的冠脉流量					
		0 min	5 min	15 min	25 min	40 min	60 min
正常	-	7.20 ± 0.29	6.94 ± 0.32	6.53 ± 0.28	6.52 ± 0.29	6.18 ± 0.50	5.53 ± 0.30
模型	-	7.50 ± 0.21	5.11 ± 0.43 <sup>1)</sup>	4.73 ± 0.59 <sup>1)</sup>	4.33 ± 0.40 <sup>1)</sup>	3.58 ± 0.43 <sup>1)</sup>	3.48 ± 0.43 <sup>1)</sup>
番茄红素	2.5	7.80 ± 0.42	5.86 ± 0.39 <sup>2)</sup>	5.43 ± 0.43 <sup>2)</sup>	4.94 ± 0.25 <sup>3)</sup>	4.46 ± 0.44 <sup>3)</sup>	4.10 ± 0.29 <sup>2)</sup>
	5.0	7.16 ± 0.36	6.07 ± 0.36 <sup>3)</sup>	5.36 ± 0.35 <sup>3)</sup>	5.16 ± 0.24 <sup>3)</sup>	4.85 ± 0.28 <sup>3)</sup>	3.85 ± 0.28
	10.0	7.60 ± 0.35	6.89 ± 0.40 <sup>3)</sup>	6.40 ± 0.28 <sup>3)</sup>	6.12 ± 0.29 <sup>3)</sup>	5.60 ± 0.23 <sup>3)</sup>	5.04 ± 0.3 <sup>3)</sup>

**3.3 对豚鼠离体心脏 LDH 的影响** 在再灌注 5, 15, 25, 40, 60 min 时, 模型组与正常组比较 LDH 漏出量升高 ( $P < 0.01$ )。番茄红素低剂量组与模型组比较在再灌注 5, 25, 40 min 时 LDH 漏出量降低 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。在 5, 15, 25, 40, 60 min 时, 番茄红素中、高剂量组 LDH 漏出量与模型组比较 LDH 漏出量降低 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。见表 3。

**3.4 对豚鼠离体心脏梗死面积, MDA 和 SOD 的影响** 模型组与正常组比较梗死面积和 MDA 含量显著增加, SOD 活性显著降低 ( $P < 0.01$ )。番茄红素

中、高组与模型组比较, 均降低了梗死面积和 MDA 含量, 增加了 SOD 活性 ( $P < 0.01$ )。见表 4。

### 4 讨论

Langendorff 灌流法是经典的离体心脏研究方法, 本实验采用豚鼠离体心脏, 参照 Liao 等<sup>[8]</sup> 文献, 在本课题组原有条件<sup>[9]</sup> 的基础上, 优化实验条件, 豚鼠离体心脏在缺血 40 min 后进行再灌注的 60 min 内表现为心率降低, 冠脉流量减少, 梗死面积增大, 提示随着缺血再灌注时间的延长, 心脏的损伤程度呈现逐渐加重趋势。

表3 番茄红素对豚鼠离体心脏 LDH 的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )U·L<sup>-1</sup>

组别	剂量 /mg·L <sup>-1</sup>	各再灌注时间的 LDH 漏出量					
		0 min	5 min	15 min	25 min	40 min	60 min
正常	-	50.47 ± 7.60	127.83 ± 14.56	117.46 ± 12.16	129.17 ± 11.69	127.63 ± 5.66	120.96 ± 13.56
模型	-	43.48 ± 4.60	178.22 ± 12.33 <sup>1)</sup>	208.22 ± 9.99 <sup>1)</sup>	228.09 ± 15.99 <sup>1)</sup>	213.57 ± 10.86 <sup>1)</sup>	206.67 ± 11.85 <sup>1)</sup>
番茄红素	2.5	42.48 ± 5.40	154.13 ± 6.85 <sup>3)</sup>	211.38 ± 11.63	194.15 ± 9.84 <sup>3)</sup>	195.15 ± 14.42 <sup>2)</sup>	199.16 ± 11.86
	5.0	44.54 ± 6.51	159.4 ± 11.95 <sup>2)</sup>	178.08 ± 13.80 <sup>3)</sup>	181.27 ± 9.74 <sup>3)</sup>	151.15 ± 12.22 <sup>3)</sup>	152.31 ± 7.63 <sup>3)</sup>
	10.0	43.39 ± 6.14	150.22 ± 19.22 <sup>2)</sup>	173.24 ± 15.74 <sup>3)</sup>	168.22 ± 10.47 <sup>3)</sup>	137.7 ± 15.74 <sup>3)</sup>	136.03 ± 7.41 <sup>3)</sup>

表4 番茄红素对豚鼠离体心脏梗死面积、MDA 和 SOD 的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	剂量 /mg·L <sup>-1</sup>	梗死面积 /%	MDA /μmol·g <sup>-1</sup>	SOD /U·mg <sup>-1</sup>
正常	-	1.57 ± 0.29	3.80 ± 0.41	153.22 ± 8.93
模型	-	19.57 ± 2.34 <sup>1)</sup>	6.17 ± 0.73 <sup>1)</sup>	99.14 ± 8.24 <sup>1)</sup>
番茄红素	2.5	17.63 ± 1.77	5.53 ± 0.38	102.20 ± 7.05
	5.0	13.32 ± 1.17 <sup>3)</sup>	4.79 ± 0.69 <sup>3)</sup>	122.55 ± 9.11 <sup>3)</sup>
	10.0	11.57 ± 1.84 <sup>3)</sup>	4.45 ± 0.33 <sup>3)</sup>	139.40 ± 10.47 <sup>3)</sup>

有研究表明番茄红素对大鼠在体心肌缺血所致的心肌损伤具有保护作用<sup>[6]</sup>,对正常大鼠具有抗氧化作用,能够降低 MDA 含量,增加 SOD 和 GSH-Px 活性<sup>[3]</sup>。本实验首次采用了心脏体外灌流方法,对番茄红素进行了客观的评价,结果表明番茄红素对豚鼠离体心脏的缺血再灌注有保护作用,有抗离体心脏的缺血再灌注后氧化应激的作用。

乳酸脱氢酶(LDH)存在于心肌细胞胞质中,在正常的状态下,细胞外液中含量很低,当心肌受到损伤时,细胞膜的通透性增加,它们就会释放到细胞外液中,通过检测灌流液中 LDH 的含量就能够反映出心肌细胞的损伤程度。再灌注 15 min 时心肌细胞开始受到损伤,直至再灌注后的 60 min。番茄红素中、高剂量组 LDH 的含量显著减少,表明番茄红素具有减轻缺血再灌注心肌细胞损伤的作用。

现在关于缺血/再灌注损伤的学说有很多,其中氧化应激学说占有重要地位。心肌组织富含线粒体,以有氧氧化为主。线粒体利用氧合成能量,同时也可产生自由基。线粒体对氧自由基毒性作用十分敏感,心肌缺血或梗死时,氧自由基可作用于线粒体膜,引起膜磷脂降解,流动性降低,导致线粒体结构和功能损伤,心肌缺血时产生的氧自由基及其过氧化物,在再灌注过程中导致了心肌细胞的损伤和心律失常的发生<sup>[10]</sup>。本实验测定了心肌组织中 MDA 和 SOD 的变化,缺血再灌注组的 MDA 含量显著升高,SOD 活性下降,番茄红素各组降低了 MDA 含

量,升高了 SOD 活性,结果表明番茄红素可能通过调节心肌组织的氧化应激来减轻心肌细胞的损伤。所以通过本实验的结果,观察到了番茄红素对豚鼠离体心肌缺血/再灌注损伤有保护作用,保护作用可能与其抗氧化应激相关。

## [参考文献]

- [1] 冯丹,凌文华. 番茄红素对脂多糖诱导巨噬细胞炎症反应的作用及其分子机制[J]. 中山大学学报,2011, 32(4):421.
- [2] 丁怡,钱珂,支枫,等. 番茄红素对过氧化氢诱导的小鼠来源神经瘤母细胞损伤的保护作用及机制研究[J]. 中华老年心脑血管病杂志,2013,15(6):640.
- [3] 潘洪志,石刚,陈文华,等. 番茄红素对大鼠体内抗氧化系统功能的影响[J]. 卫生研究,2003,32(5):441.
- [4] Teodoro A J, Oliveira F L, Martins N B, et al. Effect of lycopene on cell viability and cell cycle progression in human cancer cell lines[J]. Cancer Cell Int, 2012, 12(1):36.
- [5] Böhm V. Lycopene and heart health[J]. Molecular Nutrition Food Res, 2012, 56(2):296.
- [6] 杨艳晖,王海霞,荣胜忠,等. 番茄红素对大鼠急性心肌缺血的保护作用[J]. 实用预防医学,2013, 20(4):476.
- [7] Su S W, Wang Y L, Li J X, et al. Relationship between cardiotoxic effects and inhibition on cardiac sarcolemmal Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase of strophanthidin at low concentrations[J]. Acta Pharmacol Sin, 2003, 24:1103.
- [8] Liao R, Podesser B K, Lim C C. The continuing evolution of the Langen-dorff and ejecting murine heart: new advances in cardiac phenotyping[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2012, 303(2):H156.
- [9] 王燕,赵美咪,闵冬雨,等. 不同缺血时间对豚鼠离体心脏缺血/再灌注损伤影响[J]. 中国药理学通报, 2013, 29(1):73.
- [10] Okazaki T, Otani H, Shimazu T, et al. Reversal of inducible nitric oxide synthase uncoupling unmasks tolerance to ischemia/reperfusion injury in the diabetic rat heart[J]. J Mol Cell Cardiol, 2011, 50(3):534.

[责任编辑 聂淑琴]