

· 民族药药理学研究专题 ·

# 瑶族药铜钻总黄酮对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用

路倩<sup>1</sup>, 朱开梅<sup>2</sup>, 齐俊斌<sup>2</sup>, 杨光<sup>2</sup>, 顾生玖<sup>2\*</sup>

(1. 桂林医学院附属医院, 广西 桂林 541001; 2. 桂林医学院, 广西 桂林 541004)

**[摘要]** 目的:探讨瑶族药铜钻(定心藤, *Mappianthus iodoies*)总黄酮对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用,为瑶族药铜钻在心血管领域的临床用药研究奠定基础。方法:将72只雄性SD大鼠随机分为6个组,分别为假手术组(假手术组)、模型组(模型组)、阳性药组(复方丹参滴丸)、定心藤总黄酮低、中、高剂量组(60, 120, 240 mg·kg<sup>-1</sup>)组。6组大鼠分别ig相应药物10 d, ig后对大鼠造模,即缺血30 min,再灌注24 h,然后对造模成功的大鼠取血和心脏,苏木素-伊红(HE)染色观察大鼠心肌组织病理形态改变;股动脉取血离心取上清,酶联免疫吸附测定(ELISA)检测血清心肌酶谱肌酸激酶(CK),乳酸脱氢酶(LDH)水平;蛋白质免疫印迹(Western blot)检测B细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)和Bcl-2相关X蛋白(Bax)蛋白表达。结果:与假手术组比较,模型组大鼠血清中CK, LDH水平明显增加,大鼠Bcl-2蛋白表达降低, Bax蛋白表达升高( $P < 0.05$ ),心肌组织病理形态学损伤交明显;与模型组比较,定心藤总黄酮低、中、高剂量组大鼠血清中CK, LDH水平明显降低,能明显降低Bax蛋白表达、升高Bcl-2蛋白表达( $P < 0.05$ )。定心藤总黄酮可显著改善大鼠心肌组织病理形态学损伤。结论:定心藤总黄酮对大鼠心肌缺血再灌注损伤具有一定的保护作用,其作用机制可能与它对细胞凋亡的抑制有关。

**[关键词]** 定心藤; 总黄酮; 心肌缺血再灌注; B细胞淋巴瘤/白血病-2; Bcl-2相关X蛋白

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)10-0128-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016100128

## Protective Effects of Total Flavones from *Mappianthus Iodoies* on Myocardial Ischemic-Reperfusion Injury in Rats

LU Qian<sup>1</sup>, ZHU Kai-mei<sup>2</sup>, QI Jun-bin<sup>2</sup>, YANG Guang<sup>2</sup>, GU Sheng-jiu<sup>2\*</sup>

(1. *Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541001, China;*

*2. Guilin Medical University, Guilin 541004, China*)

**[Abstract]** **Objective:** To discuss the effects of the total flavones from *Mappianthus iodoies* on myocardial ischemic-reperfusion injury in rats and lay the foundation for clinical medicinal research of *M. iodoies* in the cardiovascular field. **Method:** Seventy-two male SD rats were randomly divided into six groups; sham-operation group, model group, positive drug group (compound Danshen dripping pills), *M. iodoies* total flavones low dose group (60 mg·kg<sup>-1</sup>), middle dose group (120 mg·kg<sup>-1</sup>) and high dose group (240 mg·kg<sup>-1</sup>). Six groups of rats received corresponding drugs for 10 days by intragastric administration. The ischemia-reperfusion model was induced by 30 min of coronary occlusion followed by 24 h of reperfusion in rats. Blood and heart were taken from the successfully modeled rats. Pathological changes of the cardiac tissues of rats were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining; centrifugal treatment of the blood from femoral artery was done to obtain the

**[收稿日期]** 20150827(006)

**[基金项目]** 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科合14123001-22);桂林市科学研究与技术开发计划项目(201501102-8, 20150102-7, 20130103-8);广西教育科研立项课题(2013YB154);广西植物功能物质研究与利用重点实验室开放基金课题(FPRU2015-5)

**[第一作者]** 路倩,在读硕士,从事心血管疾病及药物治疗研究, Tel:15577367710, E-mail:86196813@qq.com

**[通讯作者]** \*顾生玖,博士,教授,从事心血管病理及药物防治研究, Tel:13607733816, E-mail:gushengjiu@163.com

supernatant. The levels of creatine kinase (CK) and lactic dehydrogenase (LDH) in serum were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The levels of B-cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2) and Bcl-2 associated X protein (Bax) protein expressions were detected by Western blot. **Result:** As compared with the sham-operation group, the levels of CK and LDH in serum of rats in model group were significantly increased; Bcl-2 protein expression was reduced while Bax protein expression was increased ( $P < 0.05$ ), with obvious pathological morphology damages in myocardial tissues. As compared with the model group, the levels of CK and LDH were significantly reduced in serum of rats in *M. iodoies* total flavones all dose groups; Bax protein expression was significantly reduced while Bcl-2 protein expression was increased ( $P < 0.05$ ), with significant improvement in pathological morphology damages in myocardial tissues. **Conclusion:** The total flavones of *M. iodoies* have certain protective effect in rats with myocardial ischemic reperfusion injury, and the mechanism may be related to the inhibition of cell apoptosis.

[**Key words**] *Mappianthus iodoies*; total flavones; myocardial ischemia reperfusion; B-cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2 associated X protein

瑶族药铜钻(定心藤, *Mappianthus iodoies*)系茶茱萸科定心藤属植物,为瑶族医常用药材“十八钻”之一。它的干燥藤茎是广西瑶医常用药材铜钻,功能主治祛风除湿,调经活血和止痛<sup>[1]</sup>,其各种提取物的提取方法以及化学成分已研究的较为透彻<sup>[2]</sup>。

心肌缺血/再灌注损伤(myocardial ischemia/reperfusion injury, MI/RI)是心肌缺血后,冠状动脉再通,恢复心肌灌注后引起的心肌一系列损伤性反应,是一个复杂的病理生理变化过程。总黄酮是许多中草药的有效成分,已有文献阐述了其他中草药提取出的总黄酮对心脑血管的保护作用<sup>[3-5]</sup>。众所周知,MI/RI的作用机制与心肌细胞凋亡有关,研究表明,细胞凋亡的调控与许多基因有关,其中B细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2), Bcl-2相关X蛋白(Bax)等基因家族参与细胞凋亡的“线粒体途径”,是心肌细胞凋亡发生的主要机制<sup>[6-7]</sup>。而定心藤的提取物总黄酮对心肌缺血再灌注损伤的作用却未曾报道,故本实验采用定心藤提取物总黄酮对大鼠进行预处理,分析其对MI/RI中Bcl-2和Bax蛋白表达的影响,从心肌细胞凋亡水平来对瑶药铜钻总黄酮对大鼠MI/RI的作用进行初步探讨。

## 1 材料

**1.1 动物** SD大鼠,雄性,240~260 g, SPF级,桂林医学院实验动物中心提供。动物合格证号SCXK(桂)2013-0001。动物自由饮水、进食。

**1.2 药物及试剂** 定心藤采集于中科院广西植物研究所药用植物园,经广西植物研究所曹明副研究员鉴定为茶茱萸科定心藤属植物定心藤的干燥藤茎。乳酸脱氢酶(lactic dehydrogenase, LDH),肌酸激酶(creatine kinase, CK)测定试剂盒(批号分别为

A020-2, A032),均购自南京建成生物工程研究所; Bcl-2抗体, Bax抗体(批号分别为BA0412, BA0315),均购自博士德生物公司;阳性药复方丹参滴丸(天士力制药集团股份有限公司,批号Z10950111)。其他试剂均为国产分析纯试剂。

**1.3 仪器** ALC-V8型动物呼吸机(上海奥尔科特生物科技有限公司), Spectra Max M5型酶标仪(美国Molecular Devices公司), Allegra X-22R型低温离心机(美国Beckman公司), BL-420S型生物机能试验系统(成都泰盟科技有限公司), TBA-420型全自动生化仪(日本Toshiba公司)。

## 2 方法

**2.1 分组、给药及定心藤总黄酮提取** 将SD大鼠随机分为6组,分别为假手术组,模型组,复方丹参滴丸阳性药组( $600 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),定心藤总黄酮低、中、高剂量组( $60, 120, 240 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),每组12只动物。定心藤经中药粉碎机粉碎后,过10目筛,取粉碎的定心藤2 kg, 65%乙醇为溶剂,以1:40的料液比浸泡24 h, 700 W微波功率提取5 min,再超声提取3 h,用真空泵抽滤,然后旋转蒸发器减压回收乙醇,得到浓缩液;过滤之后再采用D101大孔树脂进行粗总黄酮的纯化,用不同浓度梯度的乙醇进行洗脱,收集乙醇洗脱液,减压除乙醇后,真空干燥至恒重。利用紫外分光光度法,以芦丁为对照品,在波长510 nm处测定吸收度计算总黄酮含量(约为61.2%)。临用前再以生理盐水溶解,配制成60, 120, 240  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 不同剂量稀释液ig大鼠。

**2.2 大鼠MI/RI模型的制备**<sup>[3,6]</sup> 10 d内每天将不同剂量的定心藤总黄酮ig给药于3个药物剂量组的大鼠,模型组和假手术组ig等体积蒸馏水,复

方丹参滴丸组大鼠 *ig* 等体积复方丹参。第 11 天停止 *ig* 给药,按照  $3 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  *ip* 10% 水合氯醛,对大鼠进行麻醉,进而固定于手术台上。将针状心电电极插入大鼠四肢皮下,记录 II 导联心电图。小心分离颈部气管,连接呼吸机辅助通气。胸部去毛后,常规消毒铺巾,剪开胸部皮肤,逐层钝性分离至肋骨清晰显露,逐个结扎第 2~4 肋骨的肋间动脉,小心剪断肋骨打开胸腔,用眼科剪轻轻剪开心包膜,暴露心脏,用带线缝合针在距离左冠状动脉根部 2 mm 左右处结扎左冠状动脉左前降支引起心肌缺血,将一根消毒后的细小塑料棒放置于结扎线环内,结扎打结要紧,假手术组只穿线不结扎,其他操作均给予相同处理。结扎后以心电图 II 导联 ST 段立即抬高为结扎成功标志,对心电图无改变者淘汰,然后快速将心脏送回胸腔,轻挤胸腔空气,关胸。待缺血 30 min 后,取出结扎线环内的塑料棒,再通冠脉,形成再灌注,然后迅速将皮肤缝合。再灌注 24 h 后,对造模成功的大鼠取血及心脏。

### 2.3 观察指标及检测方法

**2.3.1 大鼠心肌组织病理形态学观察** 将完整心脏于福尔马林液体中保存,取心脏偏下 1/3 组织,甲醛固定,石蜡包埋,切片,二甲苯脱蜡,常规苏木素-伊红(HE)染色常规,脱水,封片,于光学显微镜下观察大鼠心肌组织病理形态改变。

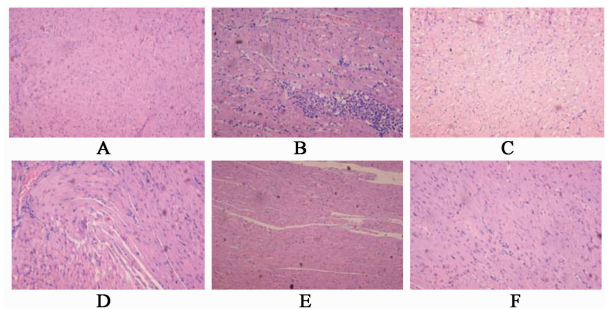
**2.3.2 血清心肌酶谱测定** 再灌注 24 h 后,对大鼠再次进行麻醉、固定,股动脉取血 2 mL,室温凝聚 30 min 后,  $5\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  离心 15 min,取上清液,  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  储存。酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒检测 CK, LDH 水平,严格按照试剂盒说明书所示操作步骤进行。

**2.3.3 蛋白质免疫印迹(Western blot)检测** 将  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  储存的心脏组织总蛋白提取出来,测定蛋白浓度,加入 5 倍上样缓冲液,沸水煮浴 10 min。配制 12% 凝胶,每孔上样  $10 \text{ } \mu\text{L}$ ,电泳过后,将蛋白条带用湿转法转移至被甲醛浸润好的 PVDF 膜上,根据目的蛋白分子量的大小裁剪 PVDF 膜。之后再使用含 5% 脱脂奶粉的 TBS-T 溶液室温封闭 1.5 h,用 TBS-T 洗膜,之后加入 Bcl-2 抗体和 Bax 抗体,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  过夜,再用 TBS-T 洗膜,辣根过氧化物酶标记的二抗室温作用 1 h,再次 TBS-T 洗膜,采用增强型化学发光试剂(ECL)法检测蛋白条带。

**2.4 统计学分析** 采用 SPSS 17.0 软件对实验数据来进行统计学分析,计量资料均以  $\bar{x} \pm s$  表示,单因素方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 对大鼠 MI/RI 心肌组织病理形态的影响** 假手术组心肌横纹结构清晰可见,心肌纤维排列整齐,心肌间质有轻微水肿但不十分明显,未见炎性细胞,几乎接近正常心肌组织的形态学。模型组心肌横纹断裂,心肌纤维结构紊乱,排列不规则,可见心肌细胞溶解坏死,心肌间质出现大量炎性细胞浸润。复方丹参滴丸组心肌间质少量充血、水肿、出血,少数炎性细胞浸润,心肌病变不甚明显。定心藤总黄酮低剂量组可见心肌横纹呈现波浪状弯曲断裂,心肌纤维不整,心肌细胞出血、坏死、水肿,炎性细胞浸润于心肌间质。定心藤总黄酮中剂量组可见心肌纤维不规则,仍有细胞坏死,少量炎性细胞浸润。定心藤总黄酮高剂量组可见心肌纤维较规整,几乎看不到细胞坏死现象,极少量炎性细胞仍有浸润。见图 1。



A. 假手术组; B. 模型组; C. 复方丹参滴丸组; D. 定心藤总黄酮  $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组; E. 定心藤总黄酮  $120 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组; F. 定心藤总黄酮  $240 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组(图 2,3 同)

图 1 铜钴总黄酮对大鼠 MI/RI 心肌组织病理形态学的影响(HE,  $\times 200$ )

Fig. 1 Effects of total flavones from *Mappianthus iodoies* on myocardial tissue pathologic morphology in MI/RI rats (HE,  $\times 200$ )

**3.2 对大鼠 MI/RI 血清中 LDH 和 CK 含量的影响** 与假手术组比较,模型组大鼠的血清中 CK, LDH 含量明显增加( $P < 0.05$ );与模型组比较,定心藤总黄酮各剂量组可使 CK, LDH 值含量随所给剂量增加而降低,差异具有显著性( $P < 0.05$ )。见表 1。

**3.3 对 MI/RI 大鼠心肌 Bcl-2, Bax 蛋白表达的影响** 与假手术组比较,模型组 Bcl-2 蛋白表达明显降低, Bax 蛋白表达明显升高( $P < 0.05$ );与模型组比较,定心藤总黄酮各剂量组和复方丹参滴丸组均明显升高 Bcl-2 蛋白表达,降低 Bax 蛋白表达( $P < 0.05$ )。与复方丹参滴丸组比较,定心藤总黄酮高剂量组效果更好( $P < 0.05$ )。见图 2,3。

## 4 讨论

本实验采取的是一种经典的利用大鼠来模拟人

表 1 铜钴总黄酮对大鼠 MI/RI 血清 CK, LDH 活性的影响  
( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Table 1 Effects of total flavones from *Mappianthus iodoies* on CK and LDH activities in serum of MI/RI rats ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	CK/U·mL <sup>-1</sup>	LDH/U·L <sup>-1</sup>
假手术	-	0.30 ± 0.06	3 396.57 ± 284.65
模型	-	3.15 ± 0.03 <sup>1)</sup>	5 840.62 ± 133.71 <sup>1)</sup>
复方丹参滴丸	600	1.86 ± 0.08 <sup>2)</sup>	4 478.06 ± 113.27 <sup>2)</sup>
定心藤总黄酮	60	1.09 ± 0.00 <sup>2)</sup>	4 943.74 ± 45.21 <sup>2)</sup>
	120	1.00 ± 0.07 <sup>2)</sup>	4 264.90 ± 62.89 <sup>2)</sup>
	240	0.65 ± 0.05 <sup>2)</sup>	3 660.30 ± 76.99 <sup>2)</sup>

注:与假手术组比较<sup>1)</sup>P < 0.05;与模型组比较<sup>2)</sup>P < 0.05。

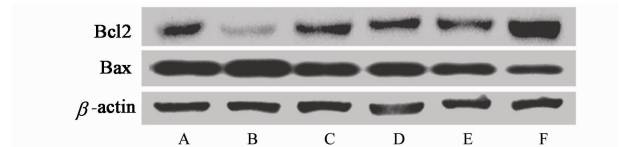
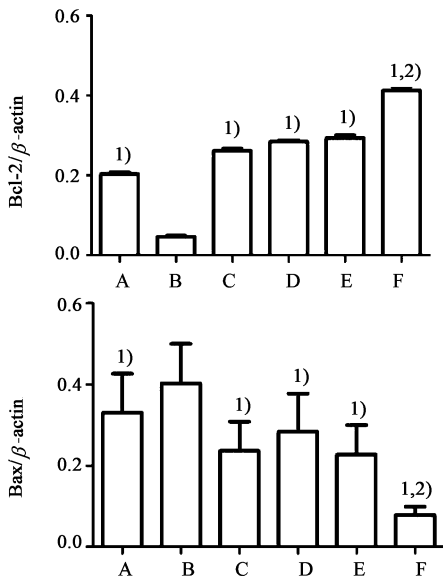


图 2 铜钴总黄酮对大鼠 MI/RI 的 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响  
Fig. 2 Effects of total flavones from *Mappianthus iodoies* on expression of Bcl-2 and Bax protein in MI/RI rats



与模型组比较<sup>1)</sup>P < 0.05;与复方丹参滴丸组比较<sup>2)</sup>P < 0.05。

图 3 铜钴总黄酮对大鼠 MI/RI 的 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响  
( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Fig. 3 Effects of total flavones from *Mappianthus iodoies* on expression of Bcl-2 and Bax protein in MI/RI rats ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

类 MI/RI 的实验研究方法<sup>[8]</sup>,即结扎 SD 大鼠心脏冠脉左前降支,造成心肌缺血梗死,待一段时间后恢复血流,进行再灌注。病理切片可以在显微镜下直观的看到各组大鼠模型的心肌大体情况<sup>[9]</sup>,从本实验的结果可知,定心藤总黄酮可以减轻大鼠心肌缺

血再灌注损伤后心肌炎性细胞浸润、细胞充血、心肌纤维断裂等损伤,在一定程度上对心肌组织产生保护作用。心肌酶谱指的是分布于心肌的多种酶的一种总称,大体包括 LDH,CK 等。当心肌受到损伤之后,心肌细胞膜的通透性就会产生变化,各种酶不同程度会穿过细胞膜而渗透到血液里<sup>[10]</sup>,从而使血液中的酶的含量出现变化,定心藤总黄酮可以降低心肌缺血再灌注大鼠血清中 CK 和 LDH 水平,进而对受损害的心肌起到保护作用。

MI/RI 整个过程均可以诱导细胞凋亡,是一种受基因调控的主动性、程序性细胞死亡形式,其中已被证实许多基因均有参与细胞凋亡的调控过程,比如 Bcl-2, Bax 等<sup>[11-12]</sup>。Bcl-2 是一个抑制细胞凋亡的基因蛋白,其在线粒体内高度表达,维持线粒体内钙离子的稳态,并阻止线粒体膜电位的下降,进而阻止开放线粒体膜的通透性转换孔,达到对促进凋亡蛋白质释放的抑制,结果使细胞发生凋亡结果<sup>[13]</sup>。而 Bax 是一个促进细胞凋亡的基因蛋白,其与 Bcl-2 的作用正好相反,Bax 的表达是通过和线粒体上 Bcl-2 结合成二聚体来发挥作用的。当 Bax 表达增多时,Bax, Bax 同源二聚体便可促进细胞凋亡,而当 Bax 表达减少时,Bcl-2, Bax 异源二聚体便可抑制细胞凋亡。因此,Bcl-2 和 Bax 的比值可反映细胞凋亡的程度<sup>[14-15]</sup>。本实验结果表明,与假手术组相比较,模型组大鼠 Bax 表达增强,Bcl-2 表达降低;与模型组相比较,定心藤总黄酮药物组 Bax 表达明显降低,Bcl-2 表达明显增强,且随着定心藤总黄酮剂量的增多,Bax 随之剂量依赖性降低,Bcl-2 剂量依赖性增强。说明大鼠出现 MI/RI 时,Bax 高表达,Bcl-2 低表达,最终导致心肌细胞凋亡。本实验研究结果显示定心藤总黄酮通过下调,上调 Bcl-2 来抑制 MI/RI 时心肌细胞的凋亡,以发挥对心肌的保护作用,对心肌缺血性疾病的防治可能具有潜在的开发价值。

[参考文献]

[1] 周丽娜,戴斌. 瑶药铜钴(定心藤)的生药鉴定[J]. 广西中医药,2002,25(2):48-50.  
[2] 曾立. 高校定心藤化学成分研究[D]. 桂林:广西师范大学,2008.  
[3] 邵莹,吴启南,周婧,等. 淡竹叶黄酮对大鼠心肌缺血/再灌注损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报,2013,29(2):241-247.  
[4] 胡彦武,刘凯,闫梦彤,等. 淫羊藿总黄酮及淫羊藿苷的心血管保护作用及机制研究进展[J]. 中国实验方

- 剂学杂志,2015,21(13):227-230.
- [ 5 ] Ansó E, Zuazo A, Irigoyen M, et al. Flavonoids inhibit hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression by aHIF-1 independent mechanism [ J ]. Biochem Pharmacol,2010,79(11):1600-1609.
- [ 6 ] 杨明,隋殿军,朱妹,等. 蜂胶总黄酮对大鼠心肌缺血再灌注损伤 Fas、Bax 和 Bcl-2 基因蛋白表达的影响 [ J ]. 中国药理学通报,2005,21(7):799-803.
- [ 7 ] Chang T H, Liu X Y, Zhang X H, et al. Effects of dl-praeruptorin A on interleukin-6 level and Fas, Bax, Bcl-2 protein expression in ischemia-reperfusion myocardium [ J ]. Acta Pharmacol Sin,2002,23(9):769-774.
- [ 8 ] Xue L, Wu Z, Ji X P, et al. Effect and mechanism of salvianolic acid b on the myocardial ischemia-reperfusion injury in rats [ J ]. Asian Pac J Trop Med,2014,7(4):280-284.
- [ 9 ] Wang Z, Li H, Vuohelainen V, et, al. Confined ischemia may improve remote myocardial outcome after rat cardiac arrest [ J ]. Scand J Clin Lab Invest, 2014, 74 ( 1 ): 27-36.
- [ 10 ] Amani M, Jeddi S, Ahmadiasl N. Effect of HEMADO on level of CK-MB and LDH enzymes after ischemia/reperfusion injury in isolated rat heart [ J ]. Bioimpacts, 2013,3(2):101-104.
- [ 11 ] Chen K, Li G H, Geng F H, et al. Berberine reduces ischemia/reperfusion-induced myocardial apoptosis via activating AMPK and PI3K-Akt signaling in diabetic rats [ J ]. Apoptosis,2014,19(6):946-957.
- [ 12 ] Westphal D, Dewson G, Czabotar P E, et al. Molecular biology of Bax and Bak activation and action [ J ]. Biochim Biophys Acta,2011,1813(4):521-531.
- [ 13 ] Chen Q, Xu H, Xu A, et, al. Inhibition of Bcl-2 sensitizes mitochondrial permeability transition pore ( MPTP ) opening in ischemia-damaged mitochondria [ J ]. PLoS One,2015,10(3):e0118834.
- [ 14 ] Yang J, Chen L H, Yang J, et al. MicroRNA-22 targeting CBP protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through anti-apoptosis in rats [ J ]. Mol Biol Rep, 2014,41(1):555-561.
- [ 15 ] 朱开梅,陈丹,李美波,等. 构树叶总黄酮调控 Bcl-2 与 Bax 蛋白表达及 Caspase-3 活性诱导 HepG-2 细胞凋亡的研究 [ J ]. 中国实验方剂学杂志,2015,20(19):128-133.

[责任编辑 周冰冰]

