

# 葛花总黄酮对大鼠心肌缺血再灌注动物损伤模型的保护作用

范鹤馨<sup>1</sup>, 张志强<sup>2\*</sup>

(1. 湘雅博爱康复医院, 长沙 410000, 2. 河南中医药大学, 郑州 450046)

**[摘要]** **目的:**探讨葛花总黄酮对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及其作用机制研究。**方法:**取 Wistar 大鼠 72 只, 随机分为假手术组, 模型组, 阳性药组(复方丹参片, 240 mg·kg<sup>-1</sup>), 葛花总黄酮高、中、低剂量组(20, 40, 60 mg·kg<sup>-1</sup>), 预防给药 28 d, 通过夹闭冠状动脉 30 min 后恢复供血再灌注的方法复制大鼠心肌缺血再灌注损伤动物模型。造模完成后, 通过 2, 3, 5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色测定各组大鼠心肌梗死面积, 通过苏木素-伊红(HE)染色观察心肌组织病理性形态学改变, 检测血清中总抗氧化能力(T-AOC), 水平腺嘌呤核苷三磷酸(ATP), 二磷酸腺苷(ADP), 天门冬氨酸氨基转移酶(AST), 乳酸脱氢酶(LDH), 磷酸肌酸激酶(CPK)水平; 酶联免疫吸附测定(ELISA)检测心肌细胞组织匀浆液细胞肿瘤因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ), 白细胞介素-6(IL-6), 白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )含量水平; ELISA 检测心肌细胞组织细胞凋亡基因 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2), Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax), 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)含量表达。**结果:**与模型组比较, 葛花总黄酮高、中剂量组治疗组大鼠心肌梗死面积显著降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 葛花总黄酮高、中剂量治疗组大鼠心肌组织病变和心肌细胞凋亡状况均好转, 其中葛花总黄酮高剂量组治疗组效果最为显著; 葛花总黄酮高、中剂量治疗组大鼠血清中 AST, CPK, ATP, ADP, LDH 水平明显降低, 心肌组织中 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  含量明显降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 葛花总黄酮高、中剂量组上调大鼠心肌组织中 Bcl-2 含量, 降低 Bax, Caspase-3 含量。**结论:**葛花总黄酮能够降低心肌梗死面积, 改善组织病理学改变, 提示葛花总黄酮对心肌缺血再灌注大鼠具有保护作用, 其作用机制可能与葛花总黄酮能降低炎症细胞因子浸润, 降低心肌组织细胞凋亡有关。

**[关键词]** 葛花总黄酮; 心肌缺血再灌注损伤; 心肌梗死; 组织细胞; 炎症细胞浸润

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)12-0119-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017120119

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170324.1426.040.html>

**[网络出版时间]** 2017-03-24 14:26

## Protection of Total Flavonoids of Puerariae Lobatae Flos on Myocardial Ischemia-reperfusion Injury in Rats

FAN He-xin<sup>1</sup>, ZHANG Zhi-qiang<sup>2\*</sup>

(1. Xiangya Fraternity Rehabilitation Hospital, Changsha 410000, China;

2. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the protection effect of total flavonoids of Puerariae Lobatae Flos on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats and explore its possible mechanism. **Method:** The 72 Wistar rats were randomly divided into sham operation group, myocardial ischemia-reperfusion model group, positive drug control group (Danshen tablets, 240 mg·kg<sup>-1</sup>), total flavonoids of Puerariae Lobatae Flos low, medium and high dose groups (20, 40, 60 mg·kg<sup>-1</sup>). The drugs were given for 28 days as preventive administration. The rat models were established by clamping the artery for 30 min. After successful modeling, the areas of myocardial infarction were determined by triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining; the morphological changes of myocardial tissues were observed by htoxylin eosin (HE) staining; the levels of total antioxidant capacity (T-AOC), adenosine

**[收稿日期]** 20170109(007)

**[基金项目]** 国家临床重点专科建设项目经费项目(国卫办函[2013]544号)

**[第一作者]** 范鹤馨, 主治医师, 从事心血管病研究, Tel:0731-83055054, E-mail:58846070@qq.com

**[通讯作者]** \*张志强, 硕士, 助理研究员, 从事中药药理学研究, Tel:0371-65962546, E-mail:392073683@qq.com

triphosphate (ATP), adenosine diphosphate (ADP), aspartate aminotransferase (AST), lactate dehydrogenase (LDH), and creatine phosphokinase (CPK) were detected; the levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6) and IL-1 $\beta$  in myocardial tissues were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); the levels of Bax, Bcl-2 and Caspase-3 were detected by ELISA. **Result:** As compared with model group, myocardial infarct size in the total flavonoids of Puerariae Lobatae Flos high dose and middle dose groups was significantly decreased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); the histopathological changes and cardiomyocytes apoptosis were improved in total flavonoids of Puerariae Lobatae Flos high dose and middle dose groups, and the effect was most obvious in high dose group; the levels of AST, CPK LDH ADP and ATP in serum, as well as TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  levels in myocardial tissues were decreased significantly in total flavonoids of Puerariae Lobatae Flos high and middle dose groups ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); total flavonoids of Puerariae Lobatae Flos high and middle dose groups up-regulated the Bcl-2 content in myocardial tissues of rats, and reduced the Bax and Caspase-3 content. **Conclusion:** Total flavonoids of Puerariae Lobatae Flos could effectively lower the areas of myocardial infarction, and improve the histopathological changes and cardiomyocytes apoptosis, suggesting that total flavonoids of Puerariae Lobatae Flos had protective effects on rats with myocardial ischemia-reperfusion injury, which may be related to its effects on reducing the infiltration of inflammatory cytokines and decreasing the apoptosis of myocardial cells.

[**Key words**] total flavonoids of Puerariae Lobatae Flos; myocardial ischemia-reperfusion injury; myocardial infarction; tissue cell; inflammatory cell infiltration

心肌缺血(myocardial ischemia, MI)是指各种原因引起冠状动脉血流量降低,致使心肌氧等物质供应不足、代谢产物清除减少,不能正常支持心脏正常运转的临床病理状态。现有临床治疗多以心脏搭桥手术、心肺复苏、体外循环心脏外科手术等治疗方法来缓解临床危急症状,促使缺血心脏短时间内血液恢复流通及血氧供应。缺血后再灌注可促进临床指标缓解,心功能正常运行;但缺血后再灌注容易引发心功能障碍、心肌组织损伤等。临床称以心肌缺血临床基础恢复血液、血氧流通后组织损伤加重、甚至出现不可逆损伤的病理状态为心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia reperfusion injury, MIRI)<sup>[1-3]</sup>。MIRI 发病机制可能与钙超载、氧自由基增多、心肌纤维能量代谢障碍、炎症反应、酸中毒等机制有关<sup>[4]</sup>。

葛花是传统中药,又名葛条花,首载与《名医别录》,具有清热消渴之功效。葛花总黄酮是葛花的有效活性成分之一<sup>[5-6]</sup>,现代药理学研究表明,葛花总黄酮具有强烈的消除活性氧的能力,具有抗氧化自由基活性<sup>[7]</sup>。研究表明抗炎、抗氧化作用在保护心肌组织中起着非常重要的作用<sup>[8]</sup>。目前,葛花总黄酮对 MIRI 保护作用报道少见,本实验研究通过夹闭冠状动脉 30 min 后恢复血流再灌注的方法制备 MIRI 动物模型,研究葛花总黄酮对 MIRI 大鼠的保护作用。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF 级 Wistar 大鼠 72 只,雄性,体重 220 ~ 260 g,由北京维通利华动物实验中心提供,合格证号 SCXK(京)2012-0001,本研究获得河南中医药大学实验动物伦理委员会批准(编号 DWLL15020012),所有实验研究均符合中国伦理委员会有关动物研究指导原则。

**1.2 药物及试剂** 葛花总黄酮按照文献[9]提供的方法制备(经湖南省食品药品监督管理局鉴定纯度 >99.8%);复方丹参片(广州白云山制药股份有限公司,批号 20140823);腺嘌呤核苷三磷酸(ATP),二磷酸腺苷(ADP),天门冬氨酸氨基转移酶(AST),乳酸脱氢酶(LDH),细胞肿瘤因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ),白细胞介素-6(IL-6),白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ),B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2),Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax),半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3),磷酸肌酸激酶(CPK),总抗氧化能力(T-AOC)检测试剂盒(武汉博士德生物有限公司,批号分别为 20150306, 20150308, 20150306, 20150304, 20150305, 20150219, 20150213, 20150307, 20150304, 20150305, 20150223, 20150223);乌拉坦(国药集团化学试剂有限公司,批号 T20130412);四氮唑红(美国 Sigma 公司,货号 1308092014);伊红及苏木素(国药集团,批号分别为 20150107, 20150221),其余试剂均为分析纯。

**1.3 仪器** Pico17 型高速冷冻离心机(美国 Thermo 公司),680 型酶标仪(美国 Bio-Rad 公司),CKX41 型倒置显微及 BX53 型显微镜(日本 Olympus 公司),RM6280C 型多道生理信号采集处理系统(成都仪器厂),RM2235 型石蜡切片机(德国 Leica 公司)。

## 2 方法

**2.1 分组及给药方法** 取大鼠 72 只,随机分为假手术组、模型组、阳性药组(复方丹参片,复方丹参片用量参考文献用量)、葛花总黄酮高、中、低剂量组(20,40,60 mg·kg<sup>-1</sup>,葛花总黄酮的剂量设置依据是按葛花临床常用量及中毒剂量和黄酮含量折算成大鼠和人的等效剂量,并以实验验证),正常饲养 3 d,各给药组灌胃给药 28 d,给药体积均为 10 mL·kg<sup>-1</sup>体重,每天 1 次,28 d 灌胃后 2 h 造模。假手术组和模型组同时灌胃相应溶剂 0.5% 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)。

**2.2 造模方法** 按照文献[10-11]所报道,大鼠腹腔注射乌拉坦腹腔注射乌拉坦(1 g·kg<sup>-1</sup>)实施麻醉,记录肢体二导联心电图监测心功能;气管正中切开插管、连接呼吸机(参数为频率 60 次/min,潮气量 20 mL·kg<sup>-1</sup>,呼吸比 1.5:1);稳定 10 min 后,打开胸腔、剪开心包、暴露心脏,于左心耳下缘约 2 mm 处夹闭冠状动脉,心电图示 ST 段抬高或 T 波高耸表示心肌缺血;30 min 后松开动脉夹恢复血流灌注,抬高的 ST 段降低或高耸的 T 波得以恢复表示心肌再灌注成功;假手术组行手术通路,除不夹闭冠状动脉外,其余操作与实验组完全一致。假手术组大鼠打开胸腔,穿线不结扎。实验结束后,腹主动脉取血,静置 30 min 离心(4 ℃,3 000 r·min<sup>-1</sup>,15 min),取上清放入 -80 ℃ 冰箱冻存,用于血清学指标的测定。取血后迅速取下心脏置于冰生理盐水中,冲净心腔内血液,剪取结扎线以下的左心室部分组织,用于制作组织病理切片,并且测其心肌组织梗死面积,其余部分按照 9 倍质量生理盐水稀释,匀浆,取上清液组织液冻存。

**2.3 心肌梗死面积的测定** 实验完成后,实施麻醉、开胸取心脏组织,-20 ℃ 冻存 30 min 后进行切片处理(厚度约 1 mm),置于 1% 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)溶液中,于 37 ℃ 环境中避光孵育 15 min;正常组织呈红色,梗死区呈灰白色,通过 BI-2000 医用图像分析系统计算心肌组织梗死面积。

### 2.4 指标观察

**2.4.1 血清中 T-AOC, ATP, ADP, AST, LDH, CPK**

水平测定 采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测血清中 T-AOC, ATP, ADP, AST, LDH, CPK 含量水平,检测方法按照试剂盒说明书检测。

**2.4.2 心肌组织中 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , Bax, Bcl-2, Caspase-3 含量测定** 采用 ELISA 检测心肌组织匀浆液中的 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  含量水平,ELISA 检测心肌细胞组织 Bax, Bcl-2, Caspase-3 含量,检测方法均按照试剂盒说明书检测。

**2.4.3 苏木素-伊红(HE)染色观察大鼠心肌组织病理学状态** 各组大鼠取血后,去心脏组织,10% 甲醛溶液固定,石蜡包埋、切片,HE 染色,光学显微镜下观察大鼠心肌组织病理学变化。

**2.5 统计学分析** 采用 SPSS 21.0 软件处理数据,所有数据均采用  $\bar{x} \pm s$  的形式表示,组间比较运用单因素多水平设计资料的方差分析和 Dunnett-*t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 对 MIRI 大鼠心肌组织梗死面积的影响** 与假手术组比较,模型组大鼠心肌组织梗死面积显著升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,复方丹参片组、葛花总黄酮高剂量组心肌组织梗死面积显著降低( $P < 0.01$ ),葛花总黄酮中剂量组心肌组织梗死面积明显降低( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 葛花总黄酮对 MIRI 大鼠心肌组织梗死面积的影响( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Table 1 Effect of total flavonoids of Puerariae Lobatae Flos on myocardial infarct size in MIRI rats( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	心肌组织梗死面积/%
假手术	-	0 <sup>2)</sup>
模型	-	52.16 ± 7.34
复方丹参片	240	21.42 ± 3.62 <sup>2)</sup>
葛花总黄酮	60	34.76 ± 4.13 <sup>2)</sup>
	40	38.29 ± 4.36 <sup>1)</sup>
	20	48.18 ± 5.69

注:与模型组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ (表 2~6 同)。

**3.2 对 MIRI 大鼠血清中 T-AOC, LDH 水平的影响** 与假手术组比较,模型组大鼠血清 T-AOC 水平显著降低( $P < 0.01$ );与模型组比较,复方丹参片阳性药组、葛花总黄酮高剂量组 T-AOC 显著升高( $P < 0.01$ ),葛花总黄酮中剂量组 T-AOC 明显升高( $P < 0.05$ );与假手术组比较,模型组大鼠血清 LDH 水平显著升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,复方丹参片阳性药组、葛花总黄酮高、中剂量组 LDH 显著升高( $P < 0.01$ )。见表 2。

表 2 葛花总黄酮对 MIRI 大鼠血清 T-AOC 和 LDH 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Table 2 Effect of total flavonoids of Puerariae Lobatae Flos on serum T-AOC and LDH level in MIRI rats ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ ) U·L<sup>-1</sup>

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	T-AOC	LDH
假手术	-	19.86 ± 3.81 <sup>2)</sup>	648.3 ± 101.5 <sup>2)</sup>
模型	-	9.14 ± 1.68	1 253.8 ± 194.1
复方丹参片	240	13.96 ± 2.26 <sup>2)</sup>	765.1 ± 151.8 <sup>2)</sup>
葛花总黄酮	60	14.41 ± 2.36 <sup>2)</sup>	844.7 ± 176.2 <sup>2)</sup>
	40	12.35 ± 2.18 <sup>1)</sup>	881.6 ± 182.6 <sup>2)</sup>
	20	11.57 ± 2.03	1 084.3 ± 217.9

### 3.3 对 MIRI 大鼠血清中 AST, CPK 水平的影响

与假手术组比较,模型组大鼠血清 AST 水平显著升高 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,复方丹参片阳性药组、葛花总黄酮高剂量组 AST 显著降低 ( $P < 0.01$ ),葛花总黄酮中剂量组明显降低 ( $P < 0.05$ );与假手术组比较,模型组大鼠血清 CPK 水平显著升高 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,复方丹参片阳性药组、葛花总黄酮高、中剂量组 CPK 显著降低 ( $P < 0.01$ )。见表 3。

表 3 葛花总黄酮对 MIRI 大鼠血清 AST 和 CPK 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Table 3 Effect of total flavonoids of Puerariae Lobatae Flos on serum AST and CPK level in MIRI rats ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ ) U·L<sup>-1</sup>

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	AST	CPK
假手术	-	315.47 ± 58.21 <sup>2)</sup>	578.6 ± 88.5 <sup>2)</sup>
模型	-	694.64 ± 112.74	1 133.8 ± 204.6
复方丹参片	240	463.23 ± 78.43 <sup>2)</sup>	746.6 ± 121.4 <sup>2)</sup>
葛花总黄酮	60	486.51 ± 84.56 <sup>2)</sup>	786.1 ± 136.4 <sup>2)</sup>
	40	513.65 ± 88.36 <sup>1)</sup>	851.6 ± 162.5 <sup>2)</sup>
	20	611.57 ± 104.91	1 046.7 ± 216.9

表 5 葛花总黄酮对 MIRI 大鼠心肌组织 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Table 5 Effect of total flavonoids of Puerariae Lobatae Flos on myocardial tissues TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$  content in MIRI rats ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ ) ng·L<sup>-1</sup>

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	TNF- $\alpha$	IL-6	IL-1 $\beta$
假手术	-	23.53 ± 5.59 <sup>2)</sup>	10.67 ± 2.37 <sup>2)</sup>	23.49 ± 4.46 <sup>2)</sup>
模型	-	45.47 ± 7.62	29.71 ± 5.63	51.34 ± 6.97
复方丹参片	240	31.34 ± 6.13 <sup>2)</sup>	18.54 ± 3.14 <sup>2)</sup>	34.17 ± 5.72 <sup>2)</sup>
葛花总黄酮	60	33.24 ± 6.27 <sup>2)</sup>	18.78 ± 3.27 <sup>2)</sup>	37.46 ± 5.98 <sup>2)</sup>
	40	36.38 ± 6.39	21.23 ± 3.64 <sup>2)</sup>	39.19 ± 6.14 <sup>2)</sup>
	20	38.67 ± 6.69	25.70 ± 5.33	45.17 ± 6.44

### 3.6 对 MIRI 大鼠心肌组织中 Bax, Bcl-2, Caspase-3 含量的影响

与假手术组比较,模型组大鼠心肌组

### 3.4 对 MIRI 大鼠血清中 ATP, ADP 水平的影响

与假手术比较,模型组大鼠血清 ATP 水平显著升高 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,复方丹参片阳性药组、葛花总黄酮高剂量组 ATP 显著降低 ( $P < 0.01$ ),葛花总黄酮中剂量组 ATP 明显降低 ( $P < 0.05$ );与假手术组比较,模型组大鼠血清 ADP 水平显著升高 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,复方丹参片阳性药组、葛花总黄酮高、中剂量组 ADP 显著降低 ( $P < 0.01$ )。见表 4。

表 4 葛花总黄酮对 MIRI 大鼠血清 ATP, ADP 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Table 4 Effect of total flavonoids of Puerariae Lobatae Flos on serum ATP and ADP content in MIRI rats ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ ) U·L<sup>-1</sup>

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	ATP	ADP
假手术	-	315.47 ± 58.21 <sup>2)</sup>	578.6 ± 88.5 <sup>2)</sup>
模型	-	703.64 ± 112.74	1 133.8 ± 204.6
复方丹参片	240	433.23 ± 68.43 <sup>2)</sup>	746.6 ± 121.4 <sup>2)</sup>
葛花总黄酮	60	466.51 ± 74.56 <sup>2)</sup>	786.1 ± 136.4 <sup>2)</sup>
	40	493.65 ± 78.36 <sup>1)</sup>	851.6 ± 162.5 <sup>2)</sup>
	20	651.57 ± 94.91	1 046.7 ± 216.9

### 3.5 对 MIRI 大鼠心肌组织中 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ 含量的影响

与假手术比较,模型组大鼠心肌组织 TNF- $\alpha$  水平显著升高 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,复方丹参片阳性药组、葛花总黄酮高剂量组 TNF- $\alpha$  显著降低 ( $P < 0.01$ );与假手术比较,模型组大鼠心肌组织 IL-6 水平显著升高 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,复方丹参片阳性药组、葛花总黄酮高、中剂量组 IL-6 显著降低 ( $P < 0.01$ );与假手术比较,模型组大鼠心肌组织 IL-1 $\beta$  水平显著升高 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,复方丹参片阳性药组、葛花总黄酮高、中剂量组 IL-1 $\beta$  显著降低 ( $P < 0.01$ )。见表 5。

织 Bcl-2 含量明显升高 ( $P < 0.01$ ),治疗周期结束后,复方丹参片组、葛花总黄酮高、中剂量组 Bcl-2

含量进一步上调 ( $P < 0.01, P < 0.05$ ); 与假手术组比, 模型组大鼠心肌组织 Bax 含量明显升高 ( $P < 0.01$ ), 与模型组比较, 复方丹参片组、葛花总黄酮高、中剂量组 Bax 含量显著降低 ( $P < 0.01$ ); 与假手

术组比较, 模型组大鼠心肌组织 Caspase-3 含量明显升高 ( $P < 0.01$ ), 与模型组比较, 复方丹参片组、葛花总黄酮高、中剂量组 Caspase-3 含量显著降 ( $P < 0.01$ )。见表 6。

表 6 葛花总黄酮对 MIRI 大鼠心肌组织 Bax, Bcl-2, Caspase-3 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Table 6 Effect of total flavonoids of Puerariae Lobatae Flos on myocardial tissues Bax, Bcl-2 and Caspase-3 content in MIRI rats ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	Bcl-2	Bax	Caspase-3
假手术	-	$0.17 \pm 0.02^2$	$0.12 \pm 0.01^2$	$0.07 \pm 0.01^2$
模型	-	$0.34 \pm 0.04$	$0.91 \pm 0.14$	$0.21 \pm 0.03$
复方丹参片	240	$0.45 \pm 0.07^2$	$0.35 \pm 0.07^2$	$0.12 \pm 0.05^2$
葛花总黄酮	60	$0.43 \pm 0.07^2$	$0.57 \pm 0.09^2$	$0.14 \pm 0.05^2$
	40	$0.39 \pm 0.06^1$	$0.63 \pm 0.11^2$	$0.16 \pm 0.05^2$
	20	$0.33 \pm 0.04$	$0.86 \pm 0.13$	$0.18 \pm 0.05$

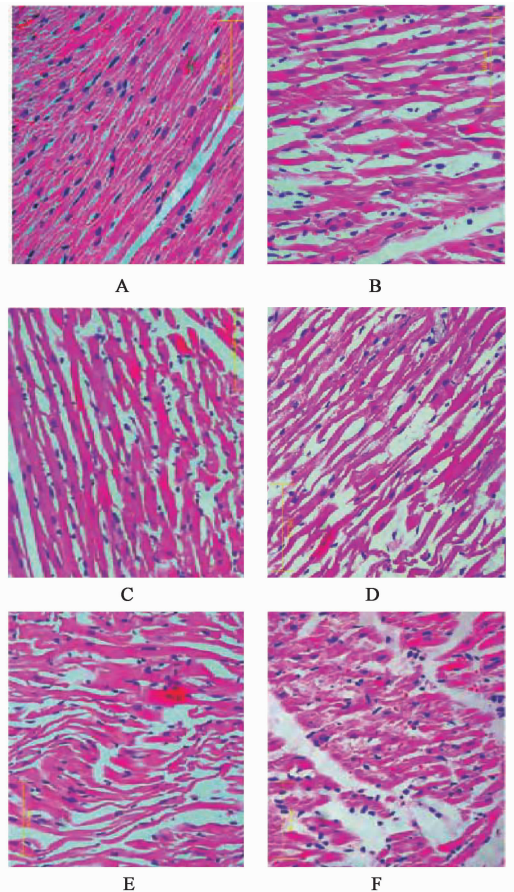
3.7 对 MIRI 大鼠心肌组织病理性形态学改变的影响 观察病理切片, 假手术组大鼠心肌组织结构心肌细胞核质均匀、形态正常, 肌原纤维平行排列; 模型组大鼠心肌组织细胞间质水肿变性、心肌纤维紊乱, 心肌细胞呈胞质着色不均、空泡变性; 葛花总黄酮干预治疗后, MIRI 大鼠心肌组织病变明显改善。见图 1。

#### 4 讨论

心肌缺血再灌注是心肌组织缺血后在灌注引发心脏组织结构损伤及部分功能障碍的病理现象<sup>[12]</sup>。MIRI 发病机制复杂, 具有多途径、多信号的发病机制, 目前其发病机制尚未进行最后阐述。现有研究表明其发病多与心肌组织缺血后再灌注时自由基爆发、线粒体损伤、钙超载、细胞自噬及 ATP 能量代谢障碍、炎症、细胞坏死、凋亡等是 MIRI 病理病变过程发生和发展的主要因素, 各损伤机制之间相互交错, 发病机制复杂<sup>[13-15]</sup>。

现代药理学研究表明, 黄酮类化合物是植物次生代谢产物, 结构类型复杂、具有抗炎、抗氧化、增强免疫能力、清除自由基、保护心血管、抗肿瘤多种药理作用<sup>[16]</sup>。葛花总黄酮是传统中药葛花中有效活性物质, 对 A/R 损伤心肌细胞具有明显的保护作用, 增加 SOD 活性、增强心肌抗氧化能力、清除自由基的产生<sup>[17]</sup>。

心肌缺血再灌注发病过程中, 心肌组织发生过氧化应激反应产物自由基, 自由基产物堆积, 细胞膜脂质化增加细胞膜流动性, 造成心肌组织进一步损伤<sup>[18]</sup>。临床指标研究表明, 总抗氧化能力 (T-AOC) 水平高低是机体抵抗氧自由基损伤能力大小



A. 假手术组; B. 模型组; C. 复方丹参片组; D. 葛花总黄酮高  $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组; E. 葛花总黄酮  $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组; F. 葛花总黄酮  $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组; 图 1 葛花总黄酮对心肌缺血再灌注大鼠心肌组织病理形态学变化的影响 (HE,  $\times 400$ )

Fig. 1 Effect of total flavonoids of Puerariae Lobatae Flos on histopathology changes in myocardial tissue of MIRI rats (HE,  $\times 400$ )

重要指标<sup>[19]</sup>; 血清中心肌酶 (AST, CPK, LDH) 水平

是心肌组织正常运行重要生化指标,间接反映心肌组织损伤程度;所以,T-AOC 水平以及 AST,CPK,LDH 活性能够直接反应机体抗氧化能力、心肌组织损伤程度。本研究发现葛花总黄酮能增强血清中 T-AOC 含量水平,降低 AST,CPK,LDH 水平,增强心肌组织抗氧化能力、降低氧化应激损害、改善心功能。

磷酸腺苷(ATP,ADP,AMP)是生物组织内生物能量转换的高能磷酸化合物,心脏运转动力的发动机,心肌组织缺血再灌注过程易产生能量代谢紊乱、脂肪酸代谢旺盛,体内代谢抑制,细胞内酸性物质堆积,能量方面功能改变促使心肌组织线粒体发生改变,导致心肌组织进一步损伤<sup>[20-21]</sup>。本研究发现,葛花总黄酮能促进体内能量代谢,缓解心肌组织动力不足,有效改善心肌组织损伤程度。

MIRI 的发病机制包括多种细胞因子、黏附分子过度表达、中性粒细胞活化、伴有多种炎性介质及信号传导分子参与,研究表明,中性粒细胞浸润为主的炎症是造成 MIRI 损伤的重要因素<sup>[22-23]</sup>。MIRI 过程中,NF- $\kappa$ B 得以活化,进入细胞核内调控 TNF- $\alpha$ ,IL-1 $\beta$ ,IL-6 等靶基因的表达,进而促使中性粒细胞在心肌缺血区血管中聚集、黏附,浸润心肌组织内,造成血管及心肌损伤<sup>[24]</sup>。葛花总黄酮能显著降低 TNF- $\alpha$ ,IL-6,IL-1 $\beta$  表达含量,有效改善心肌组织损伤过程造成炎症反应。

心肌细胞凋亡是 MIRI 最终过程,Bcl-2,Bax 存在于细胞内一对调节细胞凋亡的基因,Bcl-2 可抑制细胞凋亡,Bax 促进细胞凋亡而,二者含量水平直接表现细胞凋亡情况,并激活下一级 Caspases 酶系引起细胞的凋亡。其中 Caspase-3 是细胞凋亡的主要执行者,活化后可分解细胞内的重要蛋白及底物,进而导致细胞凋亡。本研究发现,葛花总黄酮上调 Bcl-2 含量,降低 Bax 含量,且降低 Caspase-3 含量,有效保护心肌组织细胞。

葛花总黄酮是葛花中有效活性成分之一,本研究发现葛花总黄酮增强心肌组织 T-AOC 能力、促进体代谢能力,降低心肌损伤引起的一系列炎症反应,上调 Bcl-2 含量,降低 Bax 含量,有效保护心肌组织,减少缺血再灌注损伤。心肌缺血再灌注发病过程复杂,心肌细胞凋亡及坏死是心肌组织学损害的最终环节,发病过程有信号通路、损害通路、救助通路多层复杂,交织成网状。本实验探索了葛花总黄酮治疗心肌缺血再灌注发病机制,至于其对信号通路及其相关调控蛋白基因的

影响有待于进一步研究,明确其作用机制,为葛花总黄酮防治 MIRI 提供基础数据和实验支撑。

[参考文献]

- [1] 吴焯,何玲.心肌缺血再灌注损伤的机制研究进展及相关药物的研发[J].药学进展,2010,34(7):305-312.
- [2] 徐盟.心肌缺血再灌注损伤的主要机制与相关药物治疗的研究进展[J].实用药物与临床,2014,17(8):1052-1056.
- [3] 邓海英,赖为国.心肌缺血再灌注损伤的机制研究进展[J].中国医药指南,2013,11(1):63-64.
- [4] Turer A T, Hill J A. Pathogenesis of myocardial ischemia-reper-fusion injury and rationale for therapy [J]. Am J Cardiol,2010,106(3):360-368.
- [5] XIONG Y, YANG Y, YANG J, et al. Tectoridin, an isoflavone glycoside from the flower of *Pueraria lobata*, prevents acute ethanol induced liversteatosis in mice [J]. Toxicology,2010,276(1):64-72.
- [6] ZHANG H J, YANG X P, WANG K W. Isolation of two new C-glucofuranosyl isoflavones from *Pueraria lobata* (Wild.) Ohwi with HPLC-MS guiding analysis [J]. J Asian Nat Prod Res,2010,12(4):293-299.
- [7] 张志强,孟欣桐,苗明三.葛花的现代研究与思考[J].中医学报,2016,12(31):1957-1960.
- [8] 尹霞,李柏成,赵宇光,等.抗氧化剂对慢性间歇性乏氧所致小鼠心肌重构的保护作用[J].中华心血管病杂志,2014,42(11):944-950.
- [9] 朱中贵,张卓勇,蔡光明.葛花总黄酮提取工艺及抗氧化活性的研究[J].中南药学,2009,7(3):203-205.
- [10] SONG M, LAN H. GW27-e1017 Beneficial effects of a polysaccharide from *Salvia miltiorrhiza* on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats [J]. J Am Coll Cardiol,2016,68(16):C65-C65.
- [11] QU D, HAN J, REN H, et al. Cardioprotective effects of astragaloside against myocardial ischemia/reperfusion injury in isolated rat heart[J]. Oxid Med Cell Longev, 2016, 2016(2):210-211,216.
- [12] Kurian G A, Rajagopal R, Vedantham S, et al. The role of oxidative stress in myocardial ischemia and reperfusion injury and remodeling: revisited. [J]. Oxid Med Cell Longev, 2016, 2016(12):1-14.
- [13] 吴晓燕,苗琳,郑蕊,等.心肌缺血再灌注损伤的研究进展[J].中国临床药理学杂志,2016,32(11):1043-1045.
- [14] 谢紫凌,葛卫林,王俭,等.心肌缺血再灌注损伤中医研究进展[J].实用中医药杂志,2016,32(3):290-292.
- [15] 王宁,严冬.中医药抗心肌缺血再灌注损伤的研究进

- 展[J]. 山东中医药大学学报, 2016, 40(2):188-191.
- [16] 羊波, 应茵, 陈苓丽, 等. 黄酮类化合物抗炎作用机制研究进展[J]. 中国药师, 2016, 19(7):1369-1373.
- [17] 余薇, 查文良, 吴基良, 等. 葛花总黄酮对缺氧/复氧心肌细胞的抗氧化作用研究[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(3):587-588.
- [18] 荀平, 孙莉. 人参皂苷 CK 对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及机制探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(16):155-158.
- [19] 彭辉. 地黄多糖对心肌缺血再灌注损伤大鼠保护作用研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2016, 18(6):39-42.
- [20] MENG L M, MA H J, GUO H, et al. The cardioprotective effect of naringenin against ischemia-reperfusion injury through activation of ATP-sensitive potassium channel in rat [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2016, 94(9):973-978.
- [21] 丁士鹭, 梅举. 线粒体与心肌缺血/再灌注损伤的研究进展[J]. 医学综述, 2016, 22(1):37-41.
- [22] 殷惠军, 王显刚, 史大卓, 等. 蒺藜总皂苷对心肌缺血再灌注损伤炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  释放的影响[J]. 解放军医学杂志, 2006, 31(10):986-987.
- [23] 李冬梅, 张元媛, 徐丽, 等. 槲皮素对心肌缺血再灌注损伤的保护作用及机制研究[J]. 实用药物与临床, 2016, 19(4):410-413.
- [24] Abe J I. Role of PKCs and NF- $\kappa$ B activation in myocardial inflammation: Enemy or ally[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2007, 43(4):404-408.

[责任编辑 周冰冰]