

调脂通络胶囊对高脂模型心肌缺血再灌注大鼠氧自由基和抗氧化酶的影响

王永霞^{1*}, 王彩歌², 任琳琳³, 王幼平¹, 朱明军¹, 吴先杰⁴

(1. 河南中医学院第一附属医院, 郑州 450003; 2. 郑州市第九人民医院, 郑州 450003;
3. 驻马店市中医院, 河南 驻马店 463000; 4. 永城市人民医院, 河南 永城 476000)

[摘要] 目的: 测量心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemic reperfusion injury, MIRI)后大鼠血清中的血脂、心肌酶和心肌匀浆中的丙二醛(malondialdehyde, MDA)和相关抗氧化酶的含量。观察调脂通络胶囊可能的心肌保护作用和相关机制。**方法:** 本实验在高脂血症模型的基础上建立 MIRI 模型, 将 56 只大鼠分为调脂通络胶囊高、中、低剂量组(8.64, 4.32, 2.16 g·kg⁻¹·d⁻¹)、高脂模型组、非高脂模型组、阿托伐他汀阳性对照组和高脂假手术组, 每组 8 只大鼠。喂食 4 周高脂饲料(非高脂模型组正常饮食)后药物干预或生理盐水灌胃 4 周, 结扎左冠状动脉前降支 30 min(假手术组只穿线不结扎), 松线再灌注 24 h 后采血测定血清血脂(TC, TG, HDL, LDL)含量, 血清心肌酶(LDH, CK-MB)活性; 取缺血区心肌组织测定大鼠心肌匀浆中抗氧化酶[超氧化物歧化酶(SOD), 谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px), 过氧化氢酶(CAT)]活性, MDA 的含量。**结果:** 与正常饮食组相比, 高脂模型组的血脂、心肌酶、MDA 明显升高, 抗氧化酶含量明显降低; 各药物组均可以明显降低心肌酶和 MDA 含量、升高抗氧化酶 SOD, CAT, GSH-Px 的活性, 调脂通络胶囊各剂量组与他汀组无统计学差异。**结论:** 调脂通络胶囊和阿托伐他汀具有减少自由基聚集, 提高抗氧化酶活力的作用。

[关键词] 调脂通络胶囊; 心肌缺血再灌注损伤; 心肌保护; 氧自由基

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)04-0145-04

[doi] 10.11653/syfj2014040145

Effect of Tiaozhi Tongluo Capsule on Oxygen Free Radicals and Antioxidant Enzymes of Myocardial Ischemia Reperfusion Injury

WANG Yong-xia^{1*}, WANG Cai-ge², REN Lin-lin³, WANG You-ping¹, ZHU Ming-jun¹, WU Xian-jie⁴

(1. The First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine (TCM),

[收稿日期] 20130321(009)

[基金项目] 河南省教育厅青年骨干教师项目(教高[2012]862-132); 河南中医学院科技创新人才(2010XCXRC07); 河南省教育厅自然科学基金项目(2011B360010)

[通讯作者] *王永霞, 博士研究生, 副教授, 从事中西医结合防治心血管疾病, Tel: 0371-66262960, E-mail: wyxzhzq@yahoo.com.cn

长的作用, 且对 S180 荷瘤小鼠的免疫功能有明显改善, 但是肺瘤平是否可以改善肿瘤放疗荷瘤动物的免疫功能还有待于进一步研究。

[参考文献]

[1] 冯利, 花宝金, 朴炳奎. 肺瘤平 II 号改善肺癌患者生存质量临床研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2006, 13(12): 12.
[2] 郑红刚, 朴炳奎, 林洪生, 等. 肺瘤平膏对非小细胞肺癌患者树突状细胞亚型及免疫功能的影响[J]. 北京中医, 2007, 26(4): 214.
[3] 冯利, 花宝金, 朴炳奎. 肺瘤平 II 号对肺癌患者血浆 CD₄₄v6 及 CD₄₉ 表达的影响[J]. 中国新药杂志, 2007,

16(9): 716.
[4] 郑红刚, 朴炳奎, 林洪生. 肺瘤平膏及其拆方对树突状细胞抗原递呈功能影响的分子机制研究[J]. 中华中医药学刊, 2007, 25(6): 1133.
[5] 中华人民共和国卫生部. 保健食品检验与评价技术规范[S]. 2003: 22.
[6] 张微, 钱晓萍, 刘宝瑞. 中药与化疗药物的协同作用[J]. 中国中西医结合杂志, 2007, 27(10): 952.
[7] 何晓义, 葛卫红, 刘琼, 等. 木蹄复方提取物体内抗肿瘤作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(15): 170.
[8] 蒋树龙, 史冬梅, 徐霞, 等. 中医药抗肿瘤免疫机制研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2011, 13(10): 79.

[责任编辑 聂淑琴]

Zhengzhou 450003, China; 2. The Ninth People's Hospital of Zhengzhou, Zhengzhou 450003, China;
3. The Hospital of Zhumadian of TCM, Zhumadian 463000, China;
4. The People's Hospital of Yongcheng, Yongcheng 476000, China)

[Abstract] Objective: To observe the myocardial protective effect and related mechanism of the Tiaozhi Tongluo capsule (TZTL). **Method:** MIRI model combined with hyperlipemia was established, 56 male Wistar rats were divided into following seven group: hyperlipemia group, normal group, sham group without hyperlipemia, Atorva statin group, TZTL 8.64, 4.32, 2.16 g·kg⁻¹·d⁻¹ group. After feeding of high fat diet for 4 weeks, the drug intervention was carried out, then the left arteria coronaria was legated for 30 min, following reperfusion for 24 hours. At the end of the experiment, the blood and myocardial homogenate samples were collected for measurement of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px) for blood lipids, cardiac enzymes [lactic clehydrogense (LDH), creatine kinase isoenzyme (CK-MB)]. **Result:** The blood lipids, cardiac enzymes and MDA levels were significantly increased and antioxidant enzyme content decreased obviously in model group. All treatment groups could decrease the cardiac enzymes and MDA levels, and increase the SOD, CAT and GSH-Px levels. **Conclusion:** The TZTL can reduce the free radicals aggregation and improve the effect of antioxidantase.

[Key words] Tiaozhi Tongluo capsule; myocardial ischemic reperfusion injury; myocardial protection; oxygen free radicals

调脂通络胶囊为院内制剂调脂胶囊和冠心舒乐胶囊在前期研究基础上经过优化筛选后合拟而成,前期的临床和实验研究发现两药具有确切的降脂、抗动脉硬化和防治冠心病心绞痛的作用^[1-2],因此本实验在动物模型制作方面,模拟临床上冠心病的发病特点,把心肌缺血再灌损伤(myocardial ischemic reperfusion injury, MIRI)模型建立在高脂血症的基础上,检测心肌丙二醛(MDA)含量和抗氧化酶的活性,观察其可能的心肌保护作用。

1 材料

1.1 动物 Wistar种雄性大鼠56只,SPF级,体重(190±20)g,由河南省动物实验中心提供(动物许可证号SCKK(豫)2010-0002)。

1.2 药物和试剂 调脂通络胶囊由红参、皂角刺、红曲、三七、血竭(10:9:15:2:1)组成,药材购自河南中医学院第一附属医院药房并由药剂科将红参、三七、皂角刺醇提制成浸膏,1 mL的浸膏相当于2 g原生药材。三七、血竭打粉,过100目筛备用。阿托伐他汀片(辉瑞公司054610K)。超氧化物歧化酶(SOD, 20120205)、过氧化氢酶(CAT, 20120102)、谷胱甘肽过氧化酶(GSH-Px, 20120202)、丙二醛(MDA, 20120205)、乳酸脱氢酶(LDH, 20120204)和肌酸激酶同工酶(CK-MB, 20120208)试剂盒均由南京建成生物工程研究所提供。总胆固醇(TC, 20120105)、甘油三酯(TG, 20120104)、高密度脂蛋白

(HDL, 20120105),低密度脂蛋白(LDL, 20111207)试剂盒均由北京北化康泰临床试剂有限公司提供。伊文思蓝(MKBH2094V)等。

1.3 仪器 小动物呼吸机(Harvard 683 美国),低速自动平衡离心机(LDE-2 北京),BS110S型电子天平(Sartorius 德国),低温冰箱(Haier 青岛),TU-1901型紫外-可见分光光度计(北京普析),SC-15型数控超级恒温槽(宁波新芝生物科技股份有限公司),DNP-9082型电热恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司)等。

2 方法

2.1 动物分组和高脂血症模型的制作 将56只Wistar大鼠适应性喂养1周后,按数字表法随机分为7组,调脂通络高、中、低剂量组、高脂模型组、非高脂模型组、阿托伐他汀阳性对照组、高脂假手术组各8只。除非高脂模型组外余组均给予4周高脂饲料^[3](3.5%胆固醇、10%猪油、0.2%甲基硫氧嘧啶、0.5%胆酸钠、5%白糖加基础饲料)喂养。之后再给予药物干预或生理盐水4周,其中调脂通络高、中、低剂量组(8.64, 4.32, 2.16 g·kg⁻¹·d⁻¹,阿托伐他汀组2 mg·kg⁻¹·d⁻¹,高脂模型组、非高脂模型组和高脂假手术组给予10 mL·kg⁻¹·d⁻¹生理盐水灌胃。

2.2 MIRI模型的制作^[4] 末次给药或生理盐水后,空腹12 h的大鼠用10%的水合氯醛3 mL·kg⁻¹

ip 麻醉后固定于鼠板上,备皮、消毒,于 3,4 肋间开口,钝性分离皮下、胸大肌与前锯肌;于第 4,5 肋间钝性分离肋间肌,显露胸膜。弯止血钳于呼气时刺破胸膜,进入胸腔。撑开肋骨,挤出心脏。确定缝扎位置(肺动脉圆锥与左心耳交界处下方 2 mm)。6-0 线缝扎左冠前降支,进针深度约 1.5 mm 左右,宽度约 3 mm 左右。于结扎处垫一塑料管后打结。经口气管插管,连接小动物呼吸机,呼吸频率 90 次/min,潮气量 2.5 mL,30 min 后剪开结扎线。探查无出血后关胸,缝合肌肉层后按压胸腔,挤出空气,防止气胸。大鼠苏醒后,放回鼠笼。在 MIRI 模型制作过程中,每组均有 25% 的死亡率。

2.3 标本的留取和检测 再灌注 24 h 后,除高脂假手术组外各组取一半动物,首先行颈动脉置管,抽取 5 mL 血液 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 后制成血清 -20 ℃ 冷冻保存。再经颈动脉导管推注 5 mL 肝素钠注射液和约 20 mL 生理盐水冲洗心脏(需将左心耳剪一小口,便于冲洗),待心脏颜色苍白,推注 1% 的伊文思蓝约 2 mL,以区分缺血区和非缺血区,之

后剪下心脏,用冰生理盐水冲洗,剪下左室未蓝染部分(缺血部分),滤纸吸干水分,用组织研磨器将缺血区心肌组织制成 10% 的心肌匀浆,匀浆介质为磷酸盐缓冲生理盐水溶液,EP 管分装后 -20 ℃ 冷冻保存。其中 CK-MB 用酶联免疫分析法测定,SOD 用 WST-1 法测定,余指标皆用比色法测定。

2.4 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件,数据资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有统计意义。

3 结果

3.1 各组大鼠血清中血脂含量的变化 与非高脂模型组比较,高脂模型组 TC, TG, LDL 均显著升高($P < 0.01$)。与高脂模型组比较,各药物治疗组均可显著降低 TC, TG, LDL ($P < 0.05, P < 0.01$);各药物组间的 TC, LDL 差异无统计学意义,调脂通络中剂量组 TG 与高、低剂量组相比差异有统计学意义($P < 0.05$),调脂通络中剂量组的 HDL 与高脂模型组相比明显升高($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 调脂通络胶囊对高脂模型大鼠血清 TC, TG, HDL, LDL 含量比较($\bar{x} \pm s, n = 6$)

mmol·L⁻¹

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TC	TG	HDL	LDL
非高脂模型	-	1.14 ± 0.22 ²⁾	0.71 ± 0.30 ²⁾	0.46 ± 0.13	0.39 ± 0.13 ²⁾
高脂模型	-	1.91 ± 0.29	1.65 ± 0.93	0.37 ± 0.20	0.69 ± 0.67
阿托伐他汀	0.002	1.10 ± 0.38 ²⁾	0.86 ± 0.26 ²⁾	0.47 ± 0.14	0.41 ± 0.20 ²⁾
调脂通络	8.64	1.10 ± 0.58 ²⁾	1.10 ± 0.34 ^{1,3)}	0.40 ± 0.10	0.47 ± 0.44 ¹⁾
	4.32	1.33 ± 0.57 ¹⁾	0.35 ± 0.57 ²⁾	0.57 ± 0.18 ¹⁾	0.48 ± 0.10 ¹⁾
	2.16	1.35 ± 0.30 ¹⁾	0.97 ± 0.39 ^{1,3)}	0.40 ± 0.13	0.53 ± 0.16 ¹⁾

注:与高脂模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与调脂通络中剂量组比较³⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 大鼠血清 LDH 和 CK-MB 的变化 与非高脂模型组比较,高脂模型组的 LDH 和 CK-MB 含量显著升高($P < 0.01$)。与高脂模型组比较,高脂假手术组、各药物组 LDH, CK-MB 均有显著降低($P < 0.05$)。见表 2。

3.3 大鼠心肌匀浆中抗氧化酶的变化 与非高脂模型组比较,高脂模型组的 SOD, GSH-Px, CAT 显著降低,MDA 显著升高($P < 0.05, P < 0.01$);与高脂模型组比较,高脂假手术组、各药物组 SOD, GSH-Px, CAT 显著升高,MDA 显著降低($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 3。

4 讨论

MIRI 是心肌组织在较长时间缺血后恢复血液灌注,反而出现比再灌注前更明显、更严重的损伤和功能障碍,包括收缩功能降低,冠脉流量下降及血管

表 2 调脂通络胶囊对高脂模型大鼠血清 LDH, CK-MB 活性比较($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	CK-MB /μg·L ⁻¹	LDH /U·L ⁻¹
假手术	-	2.17 ± 0.60 ^{1,2)}	1 079.7 ± 42.7 ^{1,2)}
非高脂模型	-	2.49 ± 0.17 ¹⁾	1 276.6 ± 21.8 ¹⁾
高脂模型	-	2.70 ± 0.39	1 524.7 ± 84.7
阿托伐他汀	0.002	2.32 ± 0.15 ^{1,2)}	1 124.1 ± 131.7 ^{1,2)}
调脂通络	8.64	2.36 ± 0.10 ¹⁾	1 256.1 ± 104.0 ¹⁾
	4.32	2.24 ± 0.35 ^{1,2)}	1 122.6 ± 83.6 ^{1,2)}
	2.16	2.38 ± 0.18 ¹⁾	1 255.4 ± 84.7 ¹⁾

注:与高脂模型组比较¹⁾ $P < 0.01$;与非高脂模型组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

反应性改变^[5]。正常情况下,心肌细胞代谢产生少量的氧自由基和活性氧,并由内源性的氧自由基清除酶灭活,二者处于动态平衡中^[6]。当发生 MIRI 时由于心肌细胞代谢异常,氧自由基大量生成,并消

表 3 调脂通络胶囊对高脂模型大鼠心肌匀浆中 SOD, GSH-Px, CAT 活性, MDA 的含量比较($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	SOD/U·mL ⁻¹	GSH-Px/U·mg ⁻¹	CAT/U·mg ⁻¹	MDA/nmol·mg ⁻¹
假手术	-	637.4 ± 92.4 ^{2,4)}	117.5 ± 11.0 ^{2,3)}	59.1 ± 15.6 ^{2,3)}	12.1 ± 1.1 ^{2,3)}
非高脂模型	-	563.1 ± 53.9 ²⁾	97.2 ± 22.2 ²⁾	41.3 ± 11.7 ¹⁾	15.0 ± 1.8 ¹⁾
高脂模型	-	394.1 ± 38.1	77.3 ± 21.8	23.8 ± 10.0	17.7 ± 2.5
阿托伐他汀	0.002	773.4 ± 111.7 ^{2,4)}	145.4 ± 12.4 ^{2,4)}	76.5 ± 10.9 ^{2,3)}	8.7 ± 3.6 ^{2,3)}
调脂通络	8.64	701.1 ± 72.8 ^{2,4)}	137.3 ± 12.4 ^{2,4)}	73.0 ± 15.6 ^{2,3)}	9.6 ± 2.1 ^{2,3)}
	4.32	693.8 ± 92.7 ^{2,4)}	132.7 ± 7.1 ^{2,4)}	76.5 ± 21.5 ^{2,3)}	9.5 ± 2.5 ^{2,3)}
	2.16	683.2 ± 62.9 ^{2,4)}	129.6 ± 8.8 ¹⁾⁴⁾	70.9 ± 5.5 ^{2,3)}	9.6 ± 1.9 ^{2,3)}

注:与高脂模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与非高脂模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。

耗大量的抗氧化酶,导致抗氧化酶的活力和数量降低。MDA 含量变化可反映自由基对心肌细胞膜和线粒体膜的脂质过氧化程度,间接反映心肌细胞受损程度^[6-7]。而当心肌细胞坏死时,LDH 作为胞浆中的酶大量溢出,故 LDH 的增加可反映心肌细胞细胞膜的损伤;CK-MB 主要存在于心肌细胞的外浆层,其组织特异性和敏感性较好^[8];二者均可客观的评价心肌细胞受损的程度。他汀类药物是目前公认的在动物实验中可以预防和减少 MIRI 的药物,其主要机制可能是上调内皮型一氧化氮合酶的表达,提高一氧化氮的生成,增加 NO 的生物利用度^[5],安全性相对较好,因此本实验中选择阿托伐他汀作为阳性对照药物。

临床观察发现痰瘀互阻型高脂血症和冠心病的比例呈逐渐上升的趋势,同时高血脂作为冠心病的重要危险因素推动和加剧了动脉粥样硬化的发生发展。调脂通络胶囊由三七、红参、红曲、血竭、皂角刺组成。三七具化瘀止血,活血定痛之功;红参为人参蒸熟后晒干而成,具大补元气,复脉固脱,益气摄血之功;血竭活血定痛,化瘀止血;红曲健脾消食;皂角刺活血祛风。五药相合具有补益心气,活血化瘀,利湿化痰的功效。现代药理发现这五味药的有效成分可以产生强心、增加冠脉流量、降血脂、防治动脉粥样硬化、减慢心率等对心脏和血管有益的作用^[9-10]。在本实验中高脂模型组比非高脂模型组心肌损伤更明显,说明高血脂可以加重缺血再灌注对心肌的损伤,可能与高脂血症损伤血管内皮功能有关。调脂通络胶囊和阿托伐他汀对再灌注损伤大鼠的心肌有延迟保护作用,在升高抗氧化酶活力,减少氧自由基方面效果相似,具有等效性。

[参考文献]

[1] 朱明军,牛琳琳,王永霞.调脂胶囊对血脂及 M-CSF 表达的影响[J].陕西中医,2006(7):884.
 [2] 朱明军,罗琰.调脂胶囊对动脉粥样硬化大鼠血小板聚集率及凝血功能的影响[J].中国中医急症,2006,(7):759,812.
 [3] 赵娟,李相军,孙波,等.维生素 D3 联合高脂饲料建立大鼠动脉粥样硬化模型[J].实用医学杂志,2009,25(21):3569.
 [4] 陈业农,周逸平,汪克明,等.急性心肌缺血再灌注损伤大鼠模型制备方法的改进与评价[J].中国中医急症,2008,17(3):359.
 [5] Sebastian Wolfrum, Michael Grimm, Marc Heidbreder, et al. Acute reduction of myocardial infarct size by a hydroxymethyl glutaryl coenzyme A reductase inhibitor is mediated by endothelial nitric oxide synthase [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2003, 41 (3):474.
 [6] Zweier Jay L, Talukder M A Hassan. The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury [J]. Cardiovasc Res, 2006, 70 (2):181.
 [7] 巩红岩,秦元旭,王更富,等.葛根素对大鼠体外循环后心肌缺血再灌注损伤的保护作用及抗氧化应激机制的探讨[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(1):165.
 [8] 陈在嘉,高润霖.急性心肌梗死[M].北京:人民卫生出版社,2002:47.
 [9] 高学敏.中药学[M].北京:中国中医药出版社,2006:336,296.
 [10] 韵海霞,芦殿香.中药抗心肌缺血再灌注损伤与基因表达的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(10):360.

[责任编辑 聂淑琴]