

# 染料木素对 Iso 致心肌肥厚大鼠的抗氧化及抑制炎症反应作用研究

眭荣燕<sup>1</sup>, 王万辉<sup>2</sup>, 连磊凡<sup>1</sup>, 李红燕<sup>1</sup>, 黎晓<sup>1</sup>, 黄志华<sup>1</sup>, 曾靖<sup>3\*</sup>

(1. 赣南医学院基础医学院, 江西 赣州 341000;

2. 赣南医学院第一附属医院, 江西 赣州 341000;

3. 赣南医学院药学院, 江西 赣州 341000)

**[摘要]** 目的: 观察染料木素(Gen)对异丙肾上腺素(Iso)所致心肌肥厚大鼠的抗氧化及抑制炎症反应作用。方法: 采用背部 sc 给予 Iso  $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , 连续 10 d, 建立大鼠心肌肥厚模型。造模第 2 天, 正常对照组及模型组于背部 sc 给予 NS  $2 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , 溶剂对照组给予等体积 7% DMSO, Gen 组给予等体积的 Gen 0.03, 0.1, 0.3  $\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 连续 14 d。末次给药后禁食 12 h, 称体重, 麻醉, 取静脉血, 分离血清, 取心脏, 称左心室质量, 计算左心室质量参数; 检测血清超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)活性及丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量; 放射免疫学方法检测心肌组织白细胞介素 2(interleukin-2, IL-2)含量。结果: 与正常对照组相比, 模型组大鼠左心室质量参数明显升高( $2.48 \pm 0.11 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,  $P < 0.001$ ), 血清 SOD 活性明显降低( $128.19 \pm 11.20 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $P < 0.05$ ), 血清 MDA 含量增高( $15.81 \pm 1.96 \text{ mmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $P < 0.05$ ), 血清 MPO 活性提高( $12.22 \pm 2.34 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $P < 0.05$ ), 心肌组织 IL-2 含量增高( $11.41 \pm 1.08 \text{ pg} \cdot \text{mgprot}^{-1}$ ,  $P < 0.05$ )。染料木素低、中、高剂量明显提高血清 SOD 活性( $160.47 \pm 16.01$ ,  $164.36 \pm 9.39$ ,  $172.03 \pm 8.42 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $P < 0.01$ ), 降低血清 MDA 含量( $11.96 \pm 2.17$ ,  $11.72 \pm 0.73$ ,  $10.93 \pm 0.52 \text{ mmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $P < 0.05$ ), 降低血清 MPO 活性( $9.84 \pm 2.03$ ,  $8.91 \pm 2.03$ ,  $7.51 \pm 1.97 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $P < 0.01$ ), 降低心肌组织 IL-2 含量( $9.70 \pm 1.81$ ,  $5.95 \pm 3.39$ ,  $6.33 \pm 1.19 \text{ pg} \cdot \text{mg prot}^{-1}$ ,  $P < 0.05$ )。结论: 染料木素可通过提高抗氧化能力及抗炎症反应抑制 Iso 诱导的大鼠心肌肥厚。

**[关键词]** 染料木素; 异丙肾上腺素; 心肌肥厚; 抗氧化作用; 抗炎症反应

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)19-0175-04

**[收稿日期]** 20120227(010)

**[基金项目]** 江西省科技厅科技项目(20093191)

**[第一作者]** 眭荣燕, 大学本科, 讲师, 从事中药药理研究, Tel: 13879768599, E-mail: 13807078399@163.com

**[通讯作者]** \* 曾靖, 硕士, 教授, 硕士研究生导师, 从事心血管药理、中药药理的研究, Tel: 13879769873, E-mail: zengjing61@hotmail.com

- [8] Chen G, Shi J, Hu Z, et al. Inhibitory effect on cerebral inflammatory response following traumatic brain injury in rats: a potential neuroprotective mechanism of *N*-acetylcysteine [J]. *Mediators Inflamm*, 2008, 716: 458.
- [9] 宋健文, 刘增甲, 谭晓辉, 等. *N*-乙酰半胱氨酸减轻大鼠纹状体甲基苯丙胺神经毒性[J]. *中国药理学通报*, 2009, 25(6): 765.
- [10] 杨文华, 张健, 高立文, 等. 蓝萼甲素诱导 K562 细胞毒作用机制的初步研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(19): 181.
- [11] Singh D, Kaur R, Chander V, et al. Antioxidants in the prevention of renal disease [J]. *J Med Food*, 2006, 9:443.
- [12] Liu Y, Zhang H, Zhang L, et al. Antioxidant *N*-acetylcysteine attenuates the acute liver injury caused by X-ray in mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2007, 575 (1/3): 142.
- [13] Mishima K, Baba A, Matsuo M, et al. Protective effect of cyclic AMP against cisplatin-induced nephrotoxicity [J]. *Free Radic Biol Med*, 2006, 40(9):1564.
- [14] Dickey D T, Wu Y J, Muldoon L L, et al. Protection against cisplatin-induced toxicities by *N*-acetylcysteine and sodium thiosulfate as assessed at the molecular, cellular, and *in vivo* levels [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005, 314(3): 1052.
- [15] Morgan P G, Georghiou M, Flynn F, et al. Lack of renoprotective effect of i. v. *N*-acetylcysteine in patients with chronic renal failure [J]. *Br J Anaesth*, 2007, 99: 143.

[责任编辑 聂淑琴]

## Anti-oxidation and Anti-inflammation Effect of Genistein on Myocardial Hypertrophy in Rats Induced by Isopropylarterenol

SUI Rong-yan<sup>1</sup>, WANG Wan-hui<sup>2</sup>, LIAN Lei-fan<sup>1</sup>, LI Hong-yan<sup>1</sup>, LI Xiao<sup>1</sup>, HUANG Zhi-hua<sup>1</sup>, ZENG Jing<sup>3\*</sup>

(1. Basic Medical College of Gannan Medical University, Ganzhou 341000, China;

2. First Affiliated Hospital of Gannan Medical University, Ganzhou 341000, China;

3. Pharmaceutical College of Gannan Medical University, Ganzhou 341000, China)

**[ Abstract ] Objective:** To observe the antioxidation and anti-inflammation effect of genistein (Gen) on rat myocardial hypertrophy caused by isopropylarterenol (Iso). **Method:** The rat myocardial hypertrophy model was reproduced through hypodermic injection which lasted 10 days at back skin with Iso,  $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ . Once the model was successfully made, rats were administrated with corresponding doses of Gen, DMSO or normal saline through hypodermic injection from the second day, and the process lasted 14 days. After the last administration, the rats were lasted overnight and samples of blood and heart were collected under anesthesia status. The indexes of left ventricle were calculated, the activity of superoxide dismutase (SOD), myeloperoxidase (MPO) and the concentration of malondialdehyde (MDA) in serum were detected, and interleukin-2 (IL-2) in myocardial tissue was investigated with radioimmunity kits. **Result:** In model group, there was a marked increase in the left ventricle index, the activity of SOD in the serum was markedly decreased, the content of MDA and the activity of MPO in the serum were increased, the level of IL-2 in myocardial tissue of rats was increased. Treatment with Gen significantly increased the activity of SOD in the serum, decreased the content of MDA and the activity of MPO in the serum, reduced the level of IL-2 in myocardial tissue. **Conclusion:** Gen has antioxidation and anti-inflammation effect on the myocardial hypertrophy caused by Iso.

**[ Key words ]** genistein; isopropylarterenol; myocardial hypertrophy; antioxidation, anti-inflammation effect

心肌肥厚是以心肌细胞体积增大和蛋白质含量增多为主要特征的生长异常,是对各种心血管刺激因子如血流动力学负荷、生长因子以及激素等的适应性反应,但持续的心肌肥厚会导致失代偿而发生扩张型心肌病、心衰和猝死。研究证实,儿茶酚胺长期刺激可引起心肌细胞肥大、凋亡和坏死等心肌构型重建活动,连续用 $\beta$ 受体激动剂异丙肾上腺素刺激大鼠可诱导大鼠心肌肥厚<sup>[1]</sup>。染料木素(又名金雀异黄素,染料木黄酮, genistein, Gen)为植物雌激素的一种,在豆科植物(大豆、葛根及槐)中含量较高<sup>[2]</sup>,其化学结构与内源性雌激素相似,能与雌激素 $\alpha, \beta$ 两种受体结合,发挥雌激素样作用<sup>[3]</sup>。研究表明,Gen具有抗肿瘤<sup>[4]</sup>、抗氧化<sup>[5]</sup>、抑制更年期骨质疏松<sup>[6]</sup>、治疗动脉粥样硬化<sup>[7]</sup>、降低心肌兴奋性和自律性、增强心肌收缩力等作用<sup>[8]</sup>。课题组的前期研究表明,Gen对异丙肾上腺素(isoproterenol, Iso)诱导的大鼠心肌肥厚具有治疗作用,其机制可

能与提高 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 及 $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$ 的活性,降低羟脯氨酸含量,从而抑制心脏纤维化有关<sup>[9]</sup>,本实验在此基础上进一步探讨Gen的抗心肌肥厚作用及其是否与抗氧化作用和抗炎症反应有关。

### 1 材料

**1.1 动物** 清洁级SD大鼠,48只,雄性,体重200~250g,购自江西中医学院,动物许可证号SCXK(赣)2005-0001。

**1.2 药品和试剂** Gen,由沈阳药科大学中医药学院植化教研室提供,纯度为99%,用DMSO溶解后,再用NS稀释成0.03,0.1,0.3 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;Iso注射剂,上海禾丰制药有限公司,批号H31021344,用NS稀释成0.2 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ;7%的DMSO,用NS配成,浓度与Gen中相同;超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性及丙二醛(malondialdehyde, MDA)、髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)试剂

盒购自南京建成生物工程研究所,白细胞介素-2 (interleukin-2, IL-2) 试剂盒购自北京福瑞生物工程有限公司。

**1.3 仪器** SN-695 型智能放免  $\gamma$  测量仪(上海核福光电仪器有限公司), ZS83-1 型内切式组织匀浆器(浙西机械厂), 赛多利斯 BS224S 型电子天平(北京赛多利斯仪器有限公司), MK3 型酶标仪(美国 Thermo 公司)。

## 2 方法

**2.1 造模与给药方法** 按文献[1]制备心肌肥厚模型。雄性 SD 大鼠 48 只, 200 ~ 250 g, 随机分成 6 组, 每组 8 只, 分别为: 正常对照组、心肌肥厚模型组、溶剂(DMSO)组、0.03, 0.1, 0.3  $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$  Gen 组。除正常对照组外, 其余各组大鼠背部按 5 mL  $\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  sc 给予 Iso 1 mg  $\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ , 连续 10 d, 制备心肌肥厚模型; 正常对照组给予等体积 NS。造模后第 2 天, 给予 Iso 后 30 min, 按照分组正常对照组及模型组, 于背部 sc 给予 NS 2 mL  $\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ , 溶剂对照组给予等体积 7% DMSO。考虑到 Gen 溶剂 DMSO 可能对消化道及腹腔造成伤害性刺激, 而 Gen 具有脂溶性高、通过皮肤及皮下吸收好的特点, 因此采用 sc 给药方法。从造模后第 2 天开始, 给予 Iso 后 30 min, 按照分组, 正常对照组及模型组, 于背部 sc 给予 NS 2 mL  $\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ , 溶剂对照组给予等体积 7% DMSO, Gen 组给予等体积的 Gen, 终剂量为 0.03, 0.1, 0.3  $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 连续 14 d。

**2.2 左心室质量参数测定** 末次给药后禁食 12 h, 称体重, 水合氯醛 0.35 g  $\cdot\text{kg}^{-1}$  ip 麻醉, 取心脏, 去除结缔组织、心房和右心室, 用生理盐水洗净, 滤纸吸干后称左心室质量, 计算左心质量参数 = 左心室重(mg)/体重(g)。

**2.3 血清 MDA 含量、SOD 及 MPO 活性的检测** 大鼠麻醉后, 腹腔静脉取血 2 mL, 迅速注入放在冰水浴的酶抑制剂抗凝管中, 混匀, 4  $^{\circ}\text{C}$ , 800  $\times$  g, 离心

10 min, 分离血清, 于 -80  $^{\circ}\text{C}$  保存。严格按试剂盒说明书操作, 酶活性分析法检测血清 SOD 及 MPO 活性, TBA 法检测血清 MDA 含量。

**2.4 放免法检测心肌组织 IL-2 含量** 末次给药后禁食 12 h, 水合氯醛(0.35 g  $\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 麻醉, 取出心脏, 称取 500 mg 左心室心肌组织冰浴下制成 10% 匀浆, 4  $^{\circ}\text{C}$ , 1 200  $\times$  g, 离心 10 min, 取上清于 -80  $^{\circ}\text{C}$  保存。严格按试剂盒说明, 放射免疫学方法检测心肌组织 IL-2 含量。

**2.5 统计学分析** 应用 Prism 4.0 统计学软件进行统计学分析。各测量指标的数据资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间各测定指标的总体比较采用单因素方差分析, 组内各指标的多重比较采用 SNK 检验,  $P < 0.05$  认为有统计学差异。

## 3 结果

**3.1 染料木素对心肌肥厚大鼠左心质量参数的影响** 与正常对照组相比, 模型组及溶剂对照组大鼠左心质量参数增大( $P < 0.001$ )。与模型组相比, Gen 处理后左心室质量指数降低, 其中 0.1, 0.3  $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$  组的差异有统计学意义( $P < 0.05$ )(表 1)。

**3.2 染料木素对心肌肥厚大鼠血清 SOD 活性及 MDA 含量的影响** 与正常对照组相比, 模型组及溶剂对照组大鼠血清 SOD 活性明显降低( $P < 0.001$ ), 而血清 MDA 含量升高。Gen 治疗组与模型组相比, 血清 SOD 活性明显升高, 3 个剂量组均有统计学差异; 血清 MDA 含量降低, 3 个剂量组均有统计学差异(表 1)。

**3.3 染料木素对心肌肥厚大鼠血清 MPO 活性及心肌组织 IL-2 含量的影响** 与正常对照组相比, 模型组及溶剂对照组大鼠血清 MPO 活性、心肌组织 IL-2 含量均升高。Gen 治疗组与模型组相比, 血清 MPO 含量降低, 3 个剂量组均有统计学差异; 心肌组织 IL-2 含量活性降低, 3 个剂量组均有统计学差异(表 1)。

表 1 染料木素(Gen)对异丙肾上腺素(Iso)诱导的心肌肥厚大鼠左心室质量参数、血清 SOD 和 MPO 活性及 MDA 含量、心肌组织 IL-2 水平的影响( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量 / $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$	左心质量参数 / $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	SOD / $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$	MDA / $\text{mmol}\cdot\text{mL}^{-1}$	MPO / $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$	IL-2 / $\text{pg}\cdot\text{mg}^{-1}$
对照	-	1.87 $\pm$ 0.09 <sup>2)</sup>	159.72 $\pm$ 11.96 <sup>1)</sup>	8.92 $\pm$ 1.15 <sup>1)</sup>	8.42 $\pm$ 1.19 <sup>1)</sup>	7.52 $\pm$ 1.91 <sup>2)</sup>
模型	-	2.48 $\pm$ 0.11	128.19 $\pm$ 11.20	15.81 $\pm$ 1.96	12.22 $\pm$ 2.34	11.41 $\pm$ 1.08
溶剂	-	2.50 $\pm$ 0.05 <sup>2)</sup>	126.52 $\pm$ 10.08 <sup>1)</sup>	16.42 $\pm$ 1.62 <sup>1)</sup>	12.63 $\pm$ 1.58 <sup>1)</sup>	11.26 $\pm$ 1.30 <sup>1)</sup>
Gen	0.03	2.32 $\pm$ 0.15	160.47 $\pm$ 16.01 <sup>1)</sup>	11.96 $\pm$ 2.17 <sup>1)</sup>	9.84 $\pm$ 2.03 <sup>1)</sup>	9.70 $\pm$ 1.81 <sup>1)</sup>
	0.1	2.28 $\pm$ 0.10 <sup>1)</sup>	164.36 $\pm$ 9.39 <sup>2)</sup>	11.72 $\pm$ 0.73 <sup>1)</sup>	8.91 $\pm$ 2.03 <sup>2)</sup>	5.95 $\pm$ 3.39 <sup>1)</sup>
	0.3	2.25 $\pm$ 0.13 <sup>1)</sup>	172.03 $\pm$ 8.42 <sup>1)</sup>	10.93 $\pm$ 0.52	7.51 $\pm$ 1.97 <sup>1)</sup>	6.33 $\pm$ 1.19

注:与模型组相比<sup>1)</sup> $P < 0.05$ , <sup>2)</sup> $P < 0.01$ 。

#### 4 讨论

$\beta$  受体激动剂异丙肾上腺素对心脏表现为兴奋作用,使心肌耗氧量及心排出量增加,同时使骨骼肌血管及冠状血管舒张,导致收缩压升高舒张压下降。由于心脏的代偿作用,长期使用 Iso 可导致心肌肥厚。心室质量参数是衡量心肌肥厚模型的客观指标,实验中观察到,模型组大鼠左心室质量参数明显增大说明心肌肥厚动物模型复制成功。给予染料木素治疗后,左心室质量参数降低,提示染料木素具有抗心肌肥厚作用。

在心肌肥厚形成的过程中,氧自由基生成过多造成的脂质过氧化反应是心肌损伤的重要因素。SOD 是体内清除氧自由基的重要的抗氧化酶类之一,而 MDA 为脂质过氧化的中间产物,是脂质过氧化损伤的标志。研究结果显示,大鼠心肌肥厚时血清 SOD 活性降低,MDA 含量升高;而 Gen 治疗后,血清 SOD 活性明显升高,MDA 含量降低。提示 Gen 可能通过提高 SOD 活性,增强机体的抗氧化能力,降低脂质过氧化损伤,减弱心肌细胞的损伤与重构的病理过程,从而起抗心肌肥厚作用。

MPO 是由中性粒细胞、单核细胞和某些组织的巨噬细胞分泌的含血红素辅基的血红素蛋白酶,是血红素过氧化物酶超家族成员之一,外界刺激可导致中性粒细胞聚集,释放 MPO,因此,检测血清 MPO 活性可作为中性粒细胞激活的标志。IL-2 是所有 T 细胞亚群的生长因子,并可促进活化 B 细胞增殖,故为调控免疫应答的重要因子,也参与抗体反应、造血和肿瘤监视。IL-2 在炎症反应中起重要作用,近年研究表明,免疫异常是高血压及其心脏损害发生、发展的机制之一,尤其是活化的免疫细胞分泌的多种细胞因子参与了上述过程<sup>[10]</sup>。实验中观察到,Iso 诱导的心肌肥厚模型组大鼠血清 MPO 活性升高,心肌组织中 IL-2 升高;经 Gen 处理后,MPO 活性及 IL-2 含量降低,提示 Gen 可通过减少中性粒细胞的激活及 IL-2 的分泌,抑制炎症反应而起抗心肌肥厚作用。

综上所述,染料木素具有抗 Iso 诱导的大鼠心

肌肥厚作用,其作用机制与提高大鼠的抗氧化能力及抑制炎症反应有关。

#### [参考文献]

- [1] Stanton H C, Brenner G, Mayfield E D Jr. Studies on iso-proterenol-induced cardiomegaly in rats [J]. Am Heart J, 1969, 77(1):72.
- [2] 刁义平,束晓云,唐于平. 槐叶化学成分研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(6): 89.
- [3] 朱瑞清,葛宝丰,杨斌,等. 金雀异黄酮与芹菜素的雌激素样作用体外研究[J]. 中国中药杂志,2012,27(15):2317.
- [4] Li Y S, Wu L P, Li K H, et al. Involvement of nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) in the downregulation of cyclooxygenase-2 (COX-2) by genistein in gastric cancer Cells[J]. J Int Med Res, 2011, 39(6): 2141.
- [5] Choi J S, Song J. Effect of genistein on insulin resistance, renal lipid metabolism, and antioxidative activities in ovariectomized rats [J]. Nutrition, 2009, 25(6): 676.
- [6] Miao Q, Li J G, Miao S, et al. The bone-protective effect of genistein in the animal model of bilateral ovariectomy: roles of phytoestrogens and PTH/PTHrP against post-menopausal osteoporosis[J]. Int J Mol Sci, 2012,13(1):56.
- [7] Schrader C, Ernst I M, Sinnecker H, et al. Genistein as a potential inducer of the anti-atherogenic enzyme paraoxonase-1: studies in cultured hepatocytes *in vitro* and in rat liver *in vivo* [J]. J Cell Mol Med, 2012,01542 x.
- [8] 顾静,李红芳,田治锋,等. 染料木素对离体豚鼠乳头肌生理特性的影响[J]. 中国药理学通报,2007,23(4): 501.
- [9] 胡志苹,黄志华,吴亮亮,等. 染料木素抗大鼠心肌肥厚作用及其与 ATPase 活性的关系[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(13): 163.
- [10] Vistnes M, Waehre A, Nygard S, et al. Circulating cytokine levels in mice with heart failure are etiology dependent[J]. J Appl Physiol,2010, 108(5): 1357.

[责任编辑 聂淑琴]