

玉郎伞皂苷对大鼠离体心脏缺血再灌注损伤的保护作用

李健玲¹, 陈兆霓², 吕纪华², 黄仁彬², 覃斐章², 张士军^{2*}

(1. 广西医科大学第一附属医院心血管病研究所, 南宁 530021;

2. 广西医科大学药理学教研室, 南宁 530021)

[摘要] **目的:**研究玉郎伞(YLS)皂苷对大鼠离体心脏缺血再灌注损伤(MI/RI)的保护作用及其作用机制。**方法:**40只Wistar大鼠随机分为5组(每组8只):正常对照组,缺血-再灌注组,YLS皂苷低剂量组($2 \times 10^{-2} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$),YLS皂苷高剂量组($4 \times 10^{-2} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$),阳性对照维拉帕米组($5 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。离体大鼠心脏采用Langendorff法灌流,停灌30 min再灌30 min造成心肌缺血-再灌注损伤模型。左心室插入水囊导管,记录YLS皂苷对血流动力学指标的影响,测定冠脉流量(CF)和冠脉流出液中肌酸激酶(CK)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)、乳酸脱氢酶(LDH)、乳酸脱氢酶同工酶-1(LDH-1)活性以及心肌组织超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)含量。**结果:**YLS皂苷高剂量可显著改善缺血-再灌注所致的心功能损伤,减少CK,CK-MB,LDH,LDH-1的释放和心肌组织MDA的产生,增加SOD的活性(与模型组相比, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论:**YLS皂苷对心肌缺血-再灌注损伤具有保护作用,其机制可能与清除氧自由基、减少脂质过氧化反应有关。

[关键词] 玉郎伞皂苷;心肌缺血再灌注;心脏血流动力学;心肌酶

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)09-0250-04

Effect of Saponin of Yulangsan on Myocardial Ischemia Reperfusion Injury in Isolated Rat Hearts

LI Jian-ling¹, CHEN Zhao-ni², LV Ji-hua², HUANG Ren-bin², QIN Fei-zhang², ZHANG Shi-jun^{2*}

(1. Institute of Cardiovascular Disease, First Affiliated Hospital, Guangxi Medical

University, Nanning 530021, China; 2. Department of Pharmacology, Guangxi

Medical University, Nanning 530021, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect and mechanism of saponin of Yulangsan (SYLS) on myocardial ischemia reperfusion injury in isolated rat hearts. **Method:** Fourteen Wistar rats were randomly divided into five

[收稿日期] 20111221 (003)

[基金项目] 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科攻0630002-2A)

[第一作者] 李健玲, 硕士, 主治医师, 从事心血管疾病及药物研究工作, Tel:0771-5359553, E-mail: at5056@163.com

[通讯作者] *张士军, 博士, 副教授, 从事心血管药理工作, Tel:0771-5359553, E-mail: gxykdxzsj@163.com

[3] 张业, 谢鸣, 刘玥. 不同治法方药对2型糖尿病胰岛素抵抗大鼠细胞因子的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5): 210.

[4] Reed M J, Meszaros K, Entes L J, et al. A new rat model of Type 2 diabetes: the fat-fed, streptozotocin-treated rat[J]. Metabolism, 2000, 49(11): 1390.

[5] 朱禧星. 现代糖尿病学[M]. 上海: 复旦大学出版社, 2000: 249.

[6] 陈利国, 马民, 屈媛, 等. 糖尿病血瘀证研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2005, 20(2): 114.

[7] 张永杰. 糖尿病血瘀证机理及活血化瘀法应用之探

讨[J]. 中国热带医学, 2004, 4(6): 1022.

[8] 李植延, 张荔群. 2型糖尿病中医辨证分型与血浆内皮素及降钙素基因相关肽研究[J]. 福建中医学院学报, 2001, 11(3): 1.

[9] 刘红. 糖尿病血管病变和内皮素[J]. 广西医学, 1999, 21(3): 456.

[10] 唐迎雪. 祛痰活血解毒方对实验性2型糖尿病胰岛素抵抗大鼠血液流变学的影响[J]. 中药药理与临床, 2005, 21(1): 35.

[责任编辑 聂淑琴]

groups: normal group, ischemia reperfusion group, verapamil group ($5 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), and SYLS groups (2×10^{-2} , $4 \times 10^{-2} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$). Langendorff-perfusion isolated rat hearts were prepared. Myocardial ischemia reperfusion injury was induced by 30 minutes global ischemia followed by 30 minutes reperfusion. The effect of SYLS on cardiac hemodynamics was observed by MPA-CFS. The activities of creatine kinase (CK), creatine kinase isoenzyme MB (CK-MB), lactate dehydrogenase (LDH), lactate dehydrogenase isozyme-1 (LDH-1) in the effluent from coronary artery were measured to evaluate the injury of myocardial cells and the protective effect of SYLS. Meanwhile, the activity of superoxide dismutase (SOD) and the contents of malondialdehyde (MDA) in myocardial tissues were determined. **Result:** Compared with the I/R group, high dosages of SYLS could recover cardiac function, and reduce the releases of CK, CK-MB, LDH and LDH-1 from I/R rat hearts. It could increase the activity of SOD, and decrease the MDA product ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion:** SYLS may offer myocardial protective effects against ischemia reperfusion injury, which may be related to its effects of scavenging oxygen free radical, reducing lipid peroxidation.

[**Key words**] yulangsan saponin; myocardial ischemia-reperfusion; cardiac hemodynamics; cardiac enzyme

玉郎伞(YLS)为广西壮族的习用药材,用于治疗高血压、老年性痴呆,跌打损伤和风湿、消化不良及产后及病后虚弱等^[1]。玉郎伞皂苷为玉郎伞中的重要活性成分,具有清除氧自由基^[2],保护缺血心肌的作用^[3]。为进一步了解 YLS 皂苷的药理作用,本实验采用离体心脏灌流模型,观察 YLS 皂苷对离体心脏缺血再灌注的影响,并探讨可能的作用机制。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 Wistar 大鼠,雌雄各半,体重 ($250 \pm 10 \text{ g}$),由广西医科大学实验动物中心提供,动物许可证号 SCXKG(桂)2003-0003。

1.2 药品与试剂 YLS 其系豆科植物疏叶崖豆 *Millettia pulchra* (Dunn) Kurzvar. Laxior (Dunn) Z. Wei 的干燥根,皂苷由广西医科大学药理学教研室提取;盐酸维拉帕米注射液,上海禾丰制药有限公司,批号 5E12002。上述药品均在实验时用 K-H 液配成所需浓度。CK 试剂盒,批号 20110503;LDH 试剂盒,批号 20110402;MDA 试剂盒,批号 20110203;SOD 试剂盒,批号 20110203;考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒,批号 20110203,均购自南京建成生物工程研究所。CK-MB 试剂盒,批号 20110609;LDH-1 试剂盒,批号 20110502;上海复星长征医学科学公司。其余试剂均为分析纯。K-H 液配方 ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)^[4]: NaCl 6.92, KCl 0.35, CaCl₂ 0.28, MgSO₄ · 7H₂O 0.29, KH₂PO₄ 0.16, NaHCO₃ 2.1, Glu 2.0, pH 7.4。

1.3 仪器 MPA 离体心脏灌流实验系统(上海奥尔科特生物科技有限公司),ALC-B5-恒流泵(上海奥尔科特生物科技有限公司),MPA-心功能分析系统(上海奥尔科特生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 离体大鼠心肌缺血-再灌注损伤模型制备^[5]

将大鼠击枕致昏,打开胸腔,迅速取出心脏置于预冷的缓冲液中,轻轻挤压心脏,排空心脏内残留的血液,然后迅速将心脏固定于 MPA 离体心脏灌流实验系统中。心脏用饱含 95% O₂ 和 5% CO₂ 的 K-H 缓冲液 (37 ± 0.5) °C, pH 7.4 恒压逆行灌流(压力高度为 80 cm 水柱)。剪开左心耳,经二尖瓣口向左心室插入小乳胶水囊导管,经压力换能器连接至 MPA 心功能分析系统,调整水囊容积,使左室舒张末压维持于 10 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa) 左右。连续记录左室收缩压(LVSP)、左室内压最大变化速率 ($\pm dp/dt_{\max}$) 等血流动力学指标。定时收集冠脉流出液,记录冠肺流量(CF)。心脏均在平稳 30 min 后停灌 30 min,再灌注 30 min 造成缺血-再灌注损伤模型。40 只 Wistar 大鼠随机分为 5 组(每组 8 只):正常对照组(NC),缺血-再灌注(I/R)组,YLS 皂苷低剂量(SYLS_L)组 ($2 \times 10^{-2} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$),YLS 皂苷高剂量(SYLS_H)组 ($4 \times 10^{-2} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$),阳性对照维拉帕米(Ver)组(Ver $5 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。各给药组在停灌前 10 min 分别加入不同浓度的含药灌注液,并持续整个再灌注过程。NC 组持续灌流 90 min,其余各组离体心脏均停灌 30 min,再灌注 30 min。

2.2 YLS 皂苷对缺血再灌注后生化指标的影响 收集再灌注后 30 min 时冠脉流出液,按试剂盒说明书测定冠脉流出液中 CK,LDH,CK-MB,LDH-1 的活性。灌流结束后,取各组大鼠心尖组织约 100 mg,冰浴下制备成 10% 的匀浆,离心后取上清液,按照试剂盒方法测定 MDA 含量、SOD 活性。

2.3 统计方法 采用 SPSS 13.0 软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组均数比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为有统计意义。

3 结果

3.1 YLS 皂苷对心肌缺血-再灌注损伤时心功能的影响 离体心脏停灌 30 min 后再灌注可致心功能, LVSP、+ dp/dt_{max}、CF 显著减退。SYLS_H 可明显促进心功能的恢复。SYLS_L 对 I/R 所致的心功能受损无明显恢复作用。结果见表 1。

3.2 YLS 皂苷对心肌缺血-再灌注损伤时心肌酶活性的影响 离体心脏再灌注可致冠脉流出液中 CK,

LDH, CK-MB, LDH-1 活性显著增加。SYLS_H 可显著降低冠脉流出液中 CK, LDH, CK-MB, LDH-1 活性(与 I/R 组比较 $P < 0.01$)。SYLS_L 无明显降低作用。结果见表 2。

3.3 对心肌组织中 MDA 含量及 SOD 活力的影响

I/R 组大鼠心肌组织中 MDA 含量显著增加,而 SOD 的活性显著降低。与 I/R 组比较,SYLS_H 组心肌中 MDA 含量显著降低($P < 0.05$), SOD 活性显著升高($P < 0.05$)。SYLS_L 对 I/R 所致 MDA 升高及 SOD 活性降低无明显作用。结果见表 3。

表 1 YLS 皂苷对离体心脏缺血再灌注心功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

指标/单位	再灌注时间/min	NC	I/R	Ver	SYLS _L	SYLS _H
CF/mL·min ⁻¹	5	8.11 ± 1.00	3.60 ± 0.53 ¹⁾	4.58 ± 0.50 ^{1,3)}	3.59 ± 0.36 ¹⁾	4.23 ± 0.45 ¹⁾
	10	7.99 ± 0.98	3.76 ± 0.53 ¹⁾	4.85 ± 0.59 ^{1,3)}	3.85 ± 0.37 ¹⁾	4.60 ± 0.35 ^{1,2)}
	20	7.84 ± 0.90	3.98 ± 0.44 ¹⁾	4.98 ± 0.54 ^{1,3)}	3.78 ± 0.33 ¹⁾	4.81 ± 0.48 ^{1,2)}
	30	7.61 ± 0.91	4.13 ± 0.63 ¹⁾	5.06 ± 0.53 ^{1,3)}	3.75 ± 0.37 ¹⁾	4.91 ± 0.38 ^{1,2)}
Lvsp/kPa	5	9.31 ± 0.42	2.70 ± 0.30 ¹⁾	3.85 ± 0.30 ^{1,3)}	2.84 ± 0.44 ¹⁾	3.03 ± 0.36 ¹⁾
	10	9.21 ± 1.23	3.35 ± 0.64 ¹⁾	4.99 ± 0.78 ^{1,3)}	3.44 ± 0.78 ¹⁾	4.50 ± 0.51 ^{1,2)}
	20	9.08 ± 0.59	4.76 ± 0.35 ¹⁾	6.14 ± 0.51 ^{1,3)}	5.00 ± 0.43 ¹⁾	5.95 ± 0.21 ^{1,3)}
	30	8.87 ± 0.53	5.43 ± 0.23 ¹⁾	6.10 ± 0.66 ^{1,2)}	5.60 ± 0.54 ¹⁾	6.07 ± 0.39 ^{1,2)}
dp/dt _{max} /kPa·s ⁻¹	5	284.93 ± 26.87	66.13 ± 14.53 ¹⁾	108.05 ± 22.57 ^{1,3)}	70.07 ± 14.88 ¹⁾	96.03 ± 14.21 ^{1,3)}
	10	284.64 ± 19.51	84.29 ± 13.58 ¹⁾	131.20 ± 24.87 ^{1,3)}	85.89 ± 17.02 ¹⁾	125.02 ± 11.32 ^{1,3)}
	20	283.50 ± 18.16	112.60 ± 10.96 ¹⁾	165.60 ± 21.82 ^{1,3)}	115.63 ± 22.61 ¹⁾	156.74 ± 19.06 ^{1,3)}
	30	279.10 ± 27.23	123.53 ± 16.44 ¹⁾	160.44 ± 24.38 ^{1,3)}	127.51 ± 22.55 ¹⁾	154.52 ± 21.70 ^{1,2)}
-dp/dt _{max} /kPa·s ⁻¹	5	-209.49 ± 14.34	-57.36 ± 14.08 ¹⁾	-90.38 ± 11.32 ^{1,3)}	-60.59 ± 12.94 ¹⁾	-76.84 ± 21.78 ¹⁾
	10	-209.38 ± 21.38	-66.81 ± 14.29 ¹⁾	-103.07 ± 16.95 ^{1,3)}	-67.60 ± 16.00 ¹⁾	-89.27 ± 12.55 ^{1,2)}
	20	-209.27 ± 14.34	-80.08 ± 8.97 ¹⁾	-112.45 ± 19.21 ^{1,3)}	-85.42 ± 22.82 ¹⁾	-105.04 ± 13.19 ^{1,2)}
	30	-207.57 ± 19.90	-84.60 ± 10.22 ¹⁾	-122.57 ± 11.60 ^{1,3)}	-90.00 ± 25.42 ¹⁾	-110.67 ± 13.10 ^{1,3)}

注:与 NC 组相比¹⁾ $P < 0.01$;与 I/R 组相比²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表 2~3 同)。

表 2 YLS 皂苷对缺血再灌注大鼠冠脉流出液中心肌酶的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/g·L ⁻¹	CK	CK-MB	LDH	LDH-1
NC	-	536.9 ± 76.2	665.7 ± 76.3	627.4 ± 89.1	544.3 ± 114.1
I/R	-	1 590.4 ± 176.1 ¹⁾	1 987.1 ± 286.9 ¹⁾	1 869.8 ± 245.4 ¹⁾	1 328.0 ± 170.6 ¹⁾
SYLS _L	2 × 10 ⁻²	1 467.7 ± 165.5 ¹⁾	1 851.7 ± 208.7 ¹⁾	1 656.0 ± 188.3 ¹⁾	1 139.1 ± 228.3 ¹⁾
SYLS _H	4 × 10 ⁻²	973.3 ± 197.5 ^{1,2)}	1 162.5 ± 206.0 ^{1,2)}	941.2 ± 143.9 ^{1,2)}	824.8 ± 226.3 ^{1,2)}
Ver ⁴⁾	5 × 10 ⁻⁷	1 009.9 ± 204.7 ^{1,2)}	1 073.3 ± 198.7 ^{1,2)}	907.6 ± 180.8 ^{1,2)}	981.1 ± 190.4 ^{1,2)}

注:⁴⁾ Ver 的单位是 mol·L⁻¹。

4 讨论

心肌缺血再灌注损伤(MI/RI)是缺血性心脏病以及心脏体外循环术后重要的病理生理过程,是造成临床溶栓治疗、心脏移植、冠状动脉搭桥术处理失败的重要原因,MI/RI 可表现为心肌顿抑、细胞坏

死等。

心功能是反映 MI/RI 严重程度的指标。本研究发现 I/R 组心脏 LVSP, + dp/dt_{max} 在再灌注期心功能明显低于 NC 组,说明缺血再灌注能使心肌纤维的缩短速度减慢,收缩力减弱。同时能使 I/R

表3 YLS皂苷对心肌组织中MDA含量
及SOD活力的影响($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

分组	剂量 /g·L ⁻¹	SOD /U·mg ⁻¹	MDA /nmol·mg ⁻¹
NC	-	130.6 ± 15.7	3.75 ± 0.41
I/R	-	75.3 ± 8.8 ¹⁾	6.53 ± 0.58 ¹⁾
SYLS _L	2 × 10 ⁻²	80.0 ± 9.5 ¹⁾	6.24 ± 0.60 ¹⁾
SYLS _H	4 × 10 ⁻²	111.9 ± 17.5 ^{1,2)}	5.13 ± 0.55 ^{1,2)}
Ver ⁴⁾	5 × 10 ⁻⁷	120.4 ± 14.7 ^{1,3)}	4.86 ± 0.45 ^{1,3)}

组大鼠-dp/dt_{max}降低,说明心肌舒张功能损伤,心肌顺应性降低。YLS皂苷组可以对抗缺血再灌注所致的LVSP, ± dp/dt_{max}降低,说明YLS皂苷对心功能有明显的恢复作用,可以改善心脏的收缩和舒张功能。I/R组心脏冠脉流量明显下降,YLS皂苷可显著增加心脏缺血再灌注时的冠脉流量,改善心肌氧供。

心肌缺血缺氧使心肌细胞膜损伤,细胞膜完整性遭到破坏,导致膜流动性下降、通透性增加,心肌酶大量外漏。为观察YLS皂苷对心肌细胞膜稳定性的影响,我们测定了离体心脏灌流液中CK,LDH,CK-MB,LDH-1的活性,发现YLS皂苷可显著地抑制I/R所导致的CK,LDH,CK-MB,LDH-1活性的升高,说明YLS皂苷可以减少MI/RI时心肌细胞的破坏,保护心肌。

氧自由基的生成及由其他原因引起的细胞膜脂质过氧化是缺血再灌注损伤的重要机制之一。机体通过产生氧自由基引发脂质过氧化作用,并因此形成脂质过氧化产物MDA。MDA可破坏细胞膜,使细胞内Ca²⁺严重超负荷,线粒体合成ATP的量明显减少,进而抑制心功能,引起严重的心律失常,最终导致心肌细胞的死亡。测定MDA的含量可间接反映出细胞受自由基攻击的严重程度和细胞损伤的程度^[6]。SOD为超氧阴离子自由基(O₂⁻·)清除酶,通过与自由基反应生成稳定的基团而将其清除。测定MDA含量及SOD活性可间接反应机体抗氧化损伤

的能力^[7-8]。实验结果显示,SYLS_H可以显著提高抗氧化酶SOD的活力,阻止缺血再灌注所致的MDA含量增加,提示YLS皂苷有明显的抗自由基、减少脂质过氧化的作用。

YLS皂苷能增加缺血再灌离体心脏的冠脉流量,改善心肌的收缩和舒张功能,减少心肌酶的漏出。提高心肌组织中抗氧化酶的活性,可能为YLS皂苷发挥抗MI/RI作用,保护心肌组织的机制之一。

[参考文献]

- [1] 广西壮族自治区卫生厅. 广西中药材标准[S]. 南宁:广西科学技术出版社,1992:31.
- [2] 陈健,黄媛恒,王乃平,等. 玉郎伞多糖和皂苷对氧自由基清除作用研究[J]. 中药药理与临床,2007,23(5):100.
- [3] 焦杨,段小群,孔晓龙,等. 玉郎伞提取物对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国医院药学杂志,2004,24(12):726.
- [4] 陈雯,郭丽丽,周婷婷,等. 丹参总酚酸对离体心脏缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(9):173.
- [5] 匡荣,朱社敏,倪维芳,等. 离体心脏灌流技术在抗心绞痛中药生物活性检测中的应用初探[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(9):173.
- [6] Fitter W D. Free radicals and myocardial reperfusion injury[J]. Br Med Bull, 1993, 49(3): 545.
- [7] Paradies G, Petrosillo G, Pistolese M, et al. Lipid peroxidation and alterations to oxidative metabolism in mitochondria isolated from rat heart subjected to ischemia and reperfusion[J]. Free Radic Biol Med, 1999, 27(1/2): 42.
- [8] 常超,王裕勤,杨刚,等. 粉防己碱对缺血再灌注大鼠心肌损伤的保护作用及机制探讨[J]. 山东医药,2007,47(9):22.

[责任编辑 古云侠]