

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

巩红岩^{1*}, 秦元旭¹, 王更富¹, 王庆志²

(1. 新乡医学院第一附属医院麻醉科, 河南 新乡 453100; 2. 新乡医学院解剖教研室, 河南 新乡 453100)

[摘要] 目的:探讨葛根素对大鼠体外循环后心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia-reperfusion injury, MIRI)的保护作用及抗氧化应激机制。方法:取健康雄性SD大鼠75只,随机分为5组:即假手术组(给予等体积的生理盐水)、MIRI模型组(给予等体积的生理盐水)、葛根素低、中、高剂量组(2,5,10 mg·kg⁻¹ 3个剂量)。于再灌注开始时在储血槽内加入稀释葛根素10mL。在全麻手术下制造大鼠体外循环模型后,随即阻断大鼠升主动脉造成心肌缺血30 min然后开放升主动脉后再灌注180 min造成大鼠心肌缺血再灌注损伤模型(灌注24 h,用于测定心肌梗死面积)。实验组和对照组分别给予葛根素和生理盐水。实验完成后留取大鼠心脏标本,观察大鼠心肌缺血区的心肌细胞凋亡情况;收集血清测定其抗氧化应激的指标:超氧化物歧化酶(SOD),丙二醛(MDA),谷胱甘肽(GSH),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)。结果:与模型组相比,葛根素的应用减少了MIRI大鼠的心肌细胞凋亡、心梗面积和血清中丙二醛的含量,增加了血清中超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶的活性和谷胱甘肽的含量,并且随着剂量的增加保护效果尤为明显。结论:葛根素对MIRI大鼠具有抗氧化应激的作用,它能够剂量依赖性的减少心肌细胞凋亡,最终减少心肌梗死面积。

[关键词] 葛根素; 心肌缺血再灌注损伤; 抗氧化应激; 心肌细胞凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)01-0165-04

Protection of Puerarin on Oxidative Stress Induced by Acute Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury in Rats in Cardiopulmonary Bypass

GONG Hong-yan^{1*}, QIN Yuan-xu¹, WANG Geng-fu¹, WANG Qing-zhi²

(1. Department of Anesthesia The First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453100, China; 2. Department of Anatomy of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453100, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the protective mechanism of puerarin on acute myocardial ischemia-reperfusion injury (MIRI) in rats, and to explain the antioxidative mechanism involved. **Method:** Rat MIRI model was induced by ischemia for 30 min and reperfusion for 180 min. At the end of the 3 h reperfusion period (or 24 h for infarct size), myocardial infarct size, myocardial apoptosis and the activity of antioxidative enzymes were measured. **Result:** Puerarin reduced infarct size, myocardial apoptosis and the serum level of malondialdehyde, increased the activity of superoxide dismutase and glutathione-peroxidase activities and serum level of glutathione. **Conclusion:** Puerarin exerts significant cardioprotective effects against MIRI in rats, likely through its antioxidation and antilipid peroxidative properties.

[Key words] puerarin; myocardial ischemia-reperfusion injury; oxidative stress; myocardial apoptosis

葛根 *Puerariae Radix* 为豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 的干燥根。葛根素

(puerarin)是葛根的主要活性成分^[1],它是具有抗心律失常、抗心肌缺血、抗缺血再灌注损伤等作用^[2-3]。在临床上葛根素注射液被广泛用于治疗心血管疾病,且具有较好的疗效^[4-5]。虽然很多学者对其治疗心血管疾病的机制进行了探讨^[2-3],但是葛根素对心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia-

[收稿日期] 20110514(006)

[通讯作者] * 巩红岩, Tel: 13462371221, E-mail: ghyzf@sohu.com

reperfusion injury, MIRI) 是否具有抗心肌细胞凋亡的作用? 其作用是否具有剂量依赖性? 尤其是在体外循环当中其保护作用如何? 本文通过研究葛根素对 MIRI 大鼠抗心肌细胞凋亡和抗氧化应激的相关机制, 进一步探讨围体外循环期葛根素的应用对心脏的保护作用机制。

1 材料

1.1 动物 健康雄性 SD 大鼠, 体重 220 ~ 250 g, 由新乡医学院实验动物中心统一采购提供, 动物饲养自然明暗周期, 自由食水。合格证号 SCXK-(军) 2002-001。

1.2 药物与试剂 葛根素注射液由扬子江药业有限公司提供(批号 YH20100906Y03); 戊巴比妥钠由中国医药(集团)上海化学试剂公司生产(HJ-1005335); TUNEL 试剂盒由美国罗氏公司生产(批号 091212); 超氧化物歧化酶(SOD)、脂质过氧化代谢产物丙二醛(MDA), 谷胱甘肽(GSH)试剂盒, 谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所(批号 100225)。其他试剂均为国产分析纯。

1.3 仪器 兰格蠕动泵(吉林宏威制药设备有限公司)可提供流量范围 0.001 ~ 36 000 mL·min⁻¹。YD-335 型电脑切片仪(上海之信仪器有限公司生产), 切片厚度 0 ~ 100 μm, 修片厚度范围 0 ~ 500 μm。

2 方法

2.1 动物模型及分组 所有大鼠均采用全身麻醉, 以 3% 戊巴比妥钠(1.5 mL·kg⁻¹) ip 麻醉, 并行气管切开插管, 连接于小型动物呼吸机, 调节呼吸频率为 80 ~ 90 次/min, 开胸暴露心脏, 行心房插管, 并引流至储血槽, 并向储血槽内吹入 100% 纯氧, 同时暴露股动脉, 行股动脉插管, 通过蠕动泵引流储血槽内氧和血通过股动脉泵入体循环。体外循环建立后, 即用动脉夹行升主动脉阻断。然后观察心电图 S-T 段变化, 阻断 30 min 后, 开放升主动脉。再灌注 3 h 后, 断头取血并采集心脏。用于心肌梗死面积测定的大鼠心肌样本在再灌注 24 h 后取下心脏。假手术组的所有大鼠不阻断升主动脉。

取健康雄性 SD 大鼠 75 只, 随机分为 5 组: 即假手术组(给予等体积的生理盐水)、MIRI 模型组(给予等体积的生理盐水)、葛根素低、中、高剂量组(2, 5, 10 mg·kg⁻¹) 3 个剂量。于再灌注开始时在储血槽内加入稀释葛根素 10 mL。

2.2 心肌梗死面积测定 大鼠心肌缺血再灌注 24

h 后, 于左心室注入 3% 伊文思蓝 1 mL 后取下心脏。确定未缺血与缺血心肌(未缺血心肌呈蓝色, 缺血心肌呈白色)。生理盐水冲洗后, 置于 -20 °C 冰箱。自冠状动脉开口起始, 从心尖起平行切成等厚 5 片, 厚度均为 5 μm。置入 1% 氯化三苯基四氮唑磷酸缓冲液(pH 7.4)中 37 °C 水浴 15 min。出现 3 个分区: 未梗死区(红染)、梗死区(未红染, 为白色)、危险区(蓝染), 缺血区为非危险区(红染 + 白色)。用 Image ProPlus 6.0 软件测量。

$$\text{心肌梗死面积} = (\text{梗死区} / \text{缺血区}) \times 100\%$$

2.3 细胞凋亡检测 开放再灌注 3 h 后, 从主动脉根部沿冠状动脉向左室心肌组织放入 4% 多聚甲醛固定, 常规石蜡包埋、切片, 用脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记法(TUNEL)检测凋亡细胞(测法遵照罗氏凋亡检测试剂盒说明书)。每个石蜡包埋的组织块被切成 4 ~ 5 μm 厚度的切片, 蛋白酶 K 孵育, 修复后加上 TUNEL 反应液, 切片加盖含 DAPI 的封片剂来计数全部细胞。每个石蜡块取 6 个切片, 每张切片随机选取 10 个视野, 计数凋亡细胞数和细胞总数, 图像用 Dp Controller 软件与 Image ProPlus 6.0 软件采集与测量。

$$\text{凋亡指数} = (\text{凋亡细胞数} / \text{细胞总数}) \times 100\%$$

2.4 抗氧化指标的测定 大鼠缺血再灌注 3 h 后, 断头取血, 分离血清。按照南京建成生物工程研究所的试剂盒说明书的要求进行 SOD, MDA, GSH, GSH-Px 测定。

2.5 统计学处理 采用 SPSS 13.5 统计学软件进行统计学分析, 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 比较不同组间差异用单因素方差分析。P < 0.05 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对 MIRI 大鼠的心肌梗死面积的影响 与假手术组比较, 心肌缺血再灌注大鼠的心梗面积明显增大。与模型组比较, 给药 2 mg·kg⁻¹ 葛根素后心梗面积有所减少, 但无统计学意义。给药 5 mg·kg⁻¹ 葛根素后, 心梗面积明显减小, 差异有统计学意义(P < 0.05); 给药 10 mg·kg⁻¹ 葛根素后, 差异更显著(P < 0.01)。

3.2 葛根素对 MIRI 大鼠的心肌细胞凋亡的影响 在荧光倒置显微镜下观察, 并统计各组的凋亡指数。与模型对照组比较, 给药 2 mg·kg⁻¹ 葛根素后, 凋亡指数无明显差异; 给药 5 mg·kg⁻¹ 后凋亡指数明显降低, 差异有统计学意义(P < 0.05), 给药 10 mg·kg⁻¹ 葛根素后, 差异有显著统计学意义(P < 0.01)。

3.3 生化指标的变化 与模型对照组比较,葛根素组(10 mg·kg⁻¹)能够显著减少 MIRI 大鼠血清中 MDA 的含量,增加血清中 SOD, GSH-Px 的活性和

GSH 的含量差异均有显著意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。葛根素抗氧化应激能力存在剂量依赖性。见表 1。

表 1 葛根素对 MIRI 大鼠血清 SOD, MDA, GSH, GSH-Px 活性的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	SOD/U·mL ⁻¹	MDA/nmol·mL ⁻¹	GSH/mg·L ⁻¹	GSH-Px/U·mL ⁻¹
假手术	-	275.90 ± 29.93 ²⁾	3.67 ± 0.21 ²⁾	239.92 ± 25.24 ¹⁾	430.48 ± 13.57 ²⁾
模型	-	192.74 ± 20.23	6.34 ± 2.17	203.20 ± 32.95	387.45 ± 28.87
葛根素	2	222.56 ± 30.59	4.97 ± 0.83 ¹⁾	214.78 ± 31.42	405.67 ± 16.34
	5	231.24 ± 25.93 ¹⁾	4.68 ± 1.02 ¹⁾	227.14 ± 21.77	420.45 ± 31.05 ¹⁾
	10	234.42 ± 21.48 ²⁾	4.54 ± 1.65 ²⁾	234.17 ± 16.71 ¹⁾	425.58 ± 25.19 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

随着现今心脏手术日益增多,体外循环的参与以及围体外循环期的心脏保护显得尤为重要,本文采用单纯行体外循环,阻断升主动脉,不结扎冠状动脉的方法制造心肌缺血再灌注损伤动物模型。以期最大程度上接近人体手术时的真实情况,为观察葛根素的应用对心肌损伤的影响提供有效的模型。

当前的研究表明葛根素能够剂量依赖性的减少 MIRI 大鼠的心肌细胞凋亡,从而减少心梗面积。进一步研究发现,其机理与其具有抗氧化应激的作用有关。葛根素能够减少 MIRI 大鼠血清中 MDA 的含量,增加血清中 SOD, GSH-Px 的活性和 GSH 的含量。当前大量研究表明, MIRI 会进一步加大心肌缺血,心功能障碍程度比急性心肌梗死严重,病死率更高^[6-8]。大鼠经历缺血再灌注损伤后,会导致大量心肌细胞的凋亡^[9]。心肌细胞凋亡参与心肌梗死的病理过程,在 MIRI 中发挥重要作用。细胞凋亡始发于细胞内外的死亡信号,经过一系列传递,触发某些基因的转录和翻译,这些基因的表达产物引起细胞内一系列生化及结构改变,使与细胞生存密切相关的成分受到不可逆的损害,导致细胞死亡。如实验结果所示:葛根素能够剂量依赖性的减少了心肌细胞凋亡,减少了心梗面积。表明葛根素对大鼠 MIRI 具有较好的保护作用。尤其在心脏手术期间,体外循环的使用,心肌损伤较大,缺血再灌注损伤严重,且是心肌损伤的主要原因,心肌的有效保护不仅依赖于心肌保护液的灌注保护,还应寻找更多保护途径进行心肌保护。葛根素具有抗心律失常、抗心肌缺血、抗缺血再灌注损伤等作用,在心血管手术中应用尚不多见,对其效果正有待于进一步研究。

心肌细胞凋亡^[10-11]。MIRI 过程中产生大量氧自由基,引发链式脂质过氧化反应,损伤膜系统,促使细胞发生氧化损伤。膜通透性及流动性改变;并攻击蛋白质,使具有酶活性的蛋白质活性丧失或减弱^[12-13]。人体自身具有一个防御系统来清除这些氧自由基,机体能够自身产生 SOD, GSH-Px 等活性酶^[14]。本研究发现,葛根素能够剂量依赖性的增加血清中 SOD, GSH-Px 的活性和 GSH 的含量,增加机体的防御作用。表明葛根素能够有效降低缺血再灌注损伤,对 MIRI 有明显的防治作用。

[参考文献]

[1] Qin F, Huang X, Zhang H M, et al. Pharmacokinetic comparison of puerarin after oral administration of Jiawei-Xiaoyao-San in healthy volunteers and functional dyspepsia patients: influence of disease state [J]. J Pharm Pharmacol, 2009, 61 (1): 125.

[2] 沈炳权,蔡兆斌,徐群红,等. 葛根素对家兔心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2004, 11 (6): 361.

[3] 刘启功,王琳,陆再英,等. 葛根素抗心肌缺血及其机理的实验研究[J]. 临床心血管病杂志, 1998, 14 (5): 292.

[4] 祝星,鱼运寿,李仁君,等. 葛根素对冠心病患者心肌缺血的疗效[J]. 第二军医大学学报, 2003, 24 (3): 343.

[5] 杨春茂,李德正,袁锐三. 葛根素治疗冠心病 100 例疗效观察[J]. 山东医药, 2008, 48 (15): 75.

[6] Qin F, Liu Y X, Zhao H W, et al. Chinese medicinal formula Guan-Xin-Er-Hao protects the heart against oxidative stress induced by acute ischemic myocardial injury in rats[J]. Phytomedicine, 2009, 16 (2/3): 215.

复方芳香植物提取物对营养型肥胖大鼠的减肥作用

王会宁, 李淑颖, 吴亚妮, 王贵荣, 姚雷*

(上海交通大学农业与生物学院芳香植物研发中心, 上海 200240)

[摘要] 目的:研究一种复方芳香植物提取物对营养型肥胖大鼠的减肥作用。方法:制备了复方芳香植物水提取物和营养型肥胖大鼠模型,用提取物连续 ig 给药 5 周,测量体重、体脂,计算肥胖指数和 Lee's 指数,ELISA 检测血清瘦素(LEP),制作石蜡切片观察脂肪组织形态变化,测定血清超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、总抗氧化能力(T-AOC),初步分析药物作用机制。结果:与营养型肥胖大鼠模型组比较,复方芳香植物提取物各剂量组(4 000, 2 000, 500 mg·kg⁻¹)大鼠体重和体脂均显著减轻($P < 0.05$),肥胖指数和 Lee's 指数也均有所降低,高剂量组肥胖指数显著降低($P < 0.05$);提取物各剂量组均显著降低大鼠血清 LEP 水平($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),呈现剂量依赖性;切片观察高剂量组脂肪细胞显著变小($P < 0.01$),单位视野细胞数目显著增加($P < 0.01$);各剂量组均显著增加大鼠血清 SOD 和 T-AOC 含量,降低 MDA 含量($P < 0.01$),呈现剂量依赖性。结论:本复方芳香植物提取物对营养型肥胖大鼠具有明显的减肥功效和良好的抗氧化作用。

[关键词] 芳香植物;提取物;肥胖模型;减肥;抗氧化

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)01-0168-05

Antiobesity Effects of Water Extract from Compound Aromatic Plants on Diet-induced Obese Rats

WANG Hui-ning, LI Shu-ying, WU Ya-ni, WANG Gui-rong, YAO Lei*

(R&D Center of Aromatic Plants, School of Agriculture & Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

[Abstract] **Objective:** To study the antiobesity function of water extract from compound aromatic plants on

[收稿日期] 20110608(007)

[基金项目] 农业部行业计划项目(200903056)

[第一作者] 王会宁,硕士研究生,从事芳香植物提取物功效研究

[通讯作者] * 姚雷, Tel:021-34206606, E-mail:yaolei@sjtu.edu.cn

- [7] 张良,袁冬平,徐立,等. 丹酚酸 B 对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用机制研究[J]. 中药新药与临床药理, 2008, 19 (6): 467.
- [8] Prasad A, Stone G W, Holmes D R, et al. Reperfusion injury, microvascular dysfunction, and cardioprotection: the 'dark side' of reperfusion [J]. Circulation, 2009, 120 (21): 2105.
- [9] Els-sser A, Suzuki K, Lorenz-Meyer S, et al. The role of apoptosis in myocardial ischemia: a critical appraisal [J]. Basic Res Cardiol, 2001, 96 (3): 219.
- [10] Kehrer J P. Cause-effect of oxidative stress and apoptosis [J]. Teratology, 2000, 62 (4): 235.
- [11] Zhao Z Q. Oxidative stress-elicited myocardial apoptosis during reperfusion [J]. Curr Opin Pharmacol, 2004, 4 (2): 159.
- [12] Wattanapitayakul S K, Bauer J A. Oxidative pathways in cardiovascular disease: roles, mechanisms, and therapeutic implications [J]. Pharmacol Ther, 2001, 89 (2): 187.
- [13] 郭小芙, 吴允孚, 曹一飞. 葛根素注射液治疗不稳定性心绞痛的疗效观察 [J]. 中国血液流变学杂志, 2007, 17(4): 574.
- [14] Gilberto L P A, Mariela F B, Carlos C, et al. Protective effects of *Mangifera indica* L extract (Vimang), and its major component mangiferin, on iron-induced oxidative damage to rat serum and liver [J]. Pharmacol Res, 2008, 57 (1): 79.

[责任编辑] 聂淑琴