

# 基于炎症反应的香椿子总多酚抗大鼠 心肌缺血再灌注损伤的机制研究

李红月<sup>1</sup>, 陈超<sup>2\*</sup>

(1. 湖北医药学院, 湖北 十堰 442000; 2. 三峡大学医学院, 湖北 宜昌 443002)

**[摘要]** 目的: 观察香椿子总多酚对大鼠心肌缺血再灌注急性炎症的影响。方法: 50 只 SD 大鼠随机分成假手术组(冠脉下穿线不结扎 + 0.5% 羧甲基纤维素钠)、模型组(冠脉结扎 + 0.5% 羧甲基纤维素钠)、香椿子总多酚低剂量(XD, 50 mg·kg<sup>-1</sup> + 冠脉结扎)、中剂量(XZ, 100 mg·kg<sup>-1</sup> + 冠脉结扎)、高剂量(XG, 200 mg·kg<sup>-1</sup> + 冠脉结扎)组, 各组均 ig 给药。采用左冠状动脉前降支结扎 30 min 再灌 120 min 的方法复制大鼠心肌缺血再灌注损伤模型。以 ST 抬高作为结扎成功的标志, 以 ST 段逐渐回落、梗死性 Q 波出现作为再灌注成功的标志。再灌结束后行腹主动脉取血, 分离血清, 测定血清中白介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )含量。取左心室缺血区组织 10 mg 用 RT-PCR 测定核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)p65 mRNA 的表达水平, 其余心肌组织做病理切片, 并在光镜下观察左心室心肌组织的形态学变化。结果: 模型组大鼠血清 IL-6 含量为 (638.88  $\pm$  188.94) ng·L<sup>-1</sup>, XD, XZ, XG 组与模型组相比, 血清 IL-6 含量显著下降, 分别为 (491.58  $\pm$  142.59), (306.85  $\pm$  80.60), (246.11  $\pm$  71.64) ng·L<sup>-1</sup>。模型组大鼠血清 TNF- $\alpha$  含量为 (216.23  $\pm$  58.67) ng·L<sup>-1</sup>, XD, XZ, XG 组大鼠血清 TNF- $\alpha$  水平与之相比显著降低, 分别为 (148.24  $\pm$  36.30), (157.62  $\pm$  52.06), (144.10  $\pm$  36.64) ng·L<sup>-1</sup>。模型组大鼠心肌组织中 NF- $\kappa$ Bp65/ $\beta$ -actin 为 0.61  $\pm$  0.05, 香椿子总多酚给药组大鼠 NF- $\kappa$ B p65/ $\beta$ -actin 与之相比显著降低, 分别为 0.53  $\pm$  0.08, 0.45  $\pm$  0.13, 0.38  $\pm$  0.11。香椿子总多酚组与模型组相比, 大鼠心肌细胞的形态学损伤较轻。结论: 香椿子总多酚能够减轻大鼠心肌缺血再灌注急性炎症, 对其产生一定的保护作用。

**[关键词]** 香椿子总多酚; 心肌缺血再灌注; 急性炎症

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)02-0187-04

## Mechanism of Total Polyphenols Extracted from *Toona sinensis* Roem on Acute Inflammation during Myocardial Ischemia-reperfusion in Rats

LI Hong-yue<sup>1</sup>, CHEN Chao<sup>2\*</sup>

(1. Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China;

2. Medical College of Three Gorges University, Yichang 443002, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate effects of total polyphenols extracted from *Toona sinensis* Roem on acute inflammation in injury induced by myocardial ischemia-reperfusion in rats. **Method:** Fifty SD rats were randomly divided into 5 groups: sham operation group, model group and total polyphenols extracted from *T. sinensis* groups in 3 doses. Myocardial ischemia/reperfusion injury in rats was induced by ligating the left coronary artery (LAD) 30 min followed by a 120 min reperfusion, while rats in sham group were sutured only. Ligature success was indicated by elevation of segment, yet reperfusion success was indicated through gradual resolution of T wave with ST segment, and appearance of infarct Q wave. After reperfusion, blood from abdominal aorta was collected, and serum were prepared. Then content of IL-6 and TNF- $\alpha$  in serum were detected. Finally, 10 mg myocardium tissue was cut from left ventricle ischemic area, and expression level of NF- $\kappa$ B p65 mRNA was tested. The rest myocardium tissues were prepared for pathological sections. Then the morphological changes in left ventricle

**[收稿日期]** 20110607(008)

**[第一作者]** 李红月, 硕士研究生, 助教, 从事心血管药理学研究, Tel: 15872687412

**[通讯作者]** \* 陈超, 教授, 硕士生导师, Tel: 13986828578, E-mail: chaochen1954@163.com

ischemic area was observed through optical Microscope. **Result:** Content of IL-6 and TNF- $\alpha$  in model group serum were (638.88  $\pm$  188.94), (216.23  $\pm$  58.67) ng  $\cdot$  L<sup>-1</sup> respectively. Compared with rats in model group, after administrated with polyphenols extracted from *T. sinensis* Roem, the content of IL-6 and TNF- $\alpha$  in serum was declined. NF- $\kappa$ B p65/ $\beta$ -actin in left ventricle ischemic area myocardium tissue of model group was 0.61  $\pm$  0.05, while myocardium tissue NF- $\kappa$ B p65/ $\beta$ -actin in total polyphenols extracted from *T. sinensis* groups were decreased significantly. Compared with model group, the morphological injury of cardiomyocytes in total polyphenols extracted from *T. sinensis* groups were alleviated significantly. **Conclusion:** Total polyphenols extracted from *T. sinensis* can play an intervention role on acute inflammation during myocardial ischemia-reperfusion in rats.

[**Key words**] total polyphenols extracted from *Toona sinensis* Roem; myocardial ischemia-reperfusion; acute inflammation

香椿是我国常见的药食两用植物,在我国分布较广,尤以山东、河南、河北栽植最多。香椿的营养价值丰富,还有很多药用价值。李时珍在《本草纲目》中记载,香椿叶、芽、根、皮和果实(香椿子)均可入药,有收敛止血、祛风除湿、抑菌止痛之功效。近年来有人对香椿各个器官的化学成分进行了初步的定性检验,发现香椿中含有丰富的黄酮类化合物、多酚、皂苷、挥发油等成分<sup>[1]</sup>,其有效成分有抗炎、增强免疫、抗氧化、降血糖等作用,其中多酚类物质的共有特性是良好的抗氧化活性。我们课题组提取了香椿子总多酚,并初步证明其具有改善大鼠心肌缺血再灌注损伤的作用<sup>[2]</sup>。为了进一步观察香椿子总多酚是否能影响大鼠心肌缺血再灌注急性炎症,我们进行了下列实验研究。

## 1 材料

**1.1 药物** 香椿子 *Toona sinensis* Roem 购于亳州市中药材批发中心。称重后先以 75% 乙醇浸泡过夜,再分别以料液比 1:12, 1:12, 1:10 用 70% 乙醇提取 3 次,时间均为 1.5 h。抽滤,合并滤液,然后回收乙醇至无醇味,用 AB-8 大孔树脂分离纯化,收集 70% 乙醇洗脱液,真空干燥后得香椿子总多酚(total polyphenols extracted from *T. sinensis*) 粉末。用时以 0.5% 羧甲基纤维素钠溶解配成所需浓度。

**1.2 仪器** TYPE1500-458 型全波长酶标仪,武汉新生福地贸易公司;Gene Genius 型凝胶图像分析系统,美国 Syngene 公司;RTC-220 型 PCR 仪,美国 UVP 公司;ULTRACUTR 型超薄切片机,奥地利莱卡公司;-80  $^{\circ}$ C 超低温保存冰箱,海尔公司。

**1.3 试剂** IL-6 ELISA 试剂盒、TNF- $\alpha$  ELISA 试剂盒均购自美国 R&D 公司,批号均为 20100531;RNAiso Plus (Total RNA 提取试剂,批号 BK2803)、PrimeScript RT Master Mix Perfect Real Time (反转录试剂盒)、Premix Taq Version 2.0, DL 1 000 DNA

Marker,均购自大连宝生物公司。

**1.4 动物** 健康成年 SD 大鼠 50 只,清洁级,雌雄各半,体重 200 ~ 220 g,购于华中科技大学同济医学院,许可证号 SCXK(鄂)2004-0007。

## 2 方法

**2.1 分组** 50 只大鼠随机分为 5 组:①假手术组、②模型组、③香椿子总多酚低剂量组(XD)、④香椿子总多酚中剂量组(XZ)、⑤香椿子总多酚高剂量组(XG)。③~⑤组分别以 50, 100, 200 mg  $\cdot$  kg<sup>-1</sup> 香椿子总多酚 ig,假手术组和模型组以等体积 0.5% 羧甲基纤维素钠 ig 给药,每天 1 次,连续 7 d。

**2.2 模型制备** 各组大鼠于末次给药后 1 h,用乌拉坦(1.2 g  $\cdot$  kg<sup>-1</sup> ip)麻醉,固定,四肢皮下插电极,监测 II 导联心电图。剪毛、常规消毒皮肤后,于胸骨左缘三、四肋间开胸,剪开心包膜,暴露心脏;在肺动脉圆锥与左心耳之间找到心大静脉,于左心耳根部下缘 2 ~ 3 mm 处,用 6/0 手术缝线连同心大静脉一起结扎冠状动脉左前降支,然后将心脏放回胸腔,挤出胸腔内气体,关闭胸腔。30 min 后解除结扎,再灌注 120 min<sup>[3]</sup>(假手术组只穿线不结扎,其余操作同手术组)。实验过程中,监测心电图,以 ST 抬高作为结扎成功的标志,以 ST 段逐渐回落、梗死性 Q 波出现作为再灌注成功的标志。再灌注结束后腹主动脉取血,并取出心脏,将左心室缺血区组织 10 mg 置于 -80  $^{\circ}$ C 冰箱中,其余组织浸泡于 10% 甲醛中制备成病理切片。

**2.3 血清 IL-6 和 TNF- $\alpha$  含量测定** 腹主动脉取血后,3 500 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 离心分离血清,用 ELISA 方法测定各组大鼠血清中白介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )含量。

**2.4 心肌组织 NF- $\kappa$ B p65 mRNA 表达的测定** 用 Trizol RNA 提取试剂盒对保存在 -80  $^{\circ}$ C 冰箱中的心肌组织总 RNA 进行抽提与纯化,然后按照试剂盒说

说明书逆转录为 cDNA,采用 50  $\mu\text{L}$  反应体系进行 PCR。反应条件:94  $^{\circ}\text{C}$  变性 5 min,94  $^{\circ}\text{C}$  30 s,60  $^{\circ}\text{C}$  30 s 和 72  $^{\circ}\text{C}$  15 s,顺序循环 30 次后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min。用 2% 琼脂糖凝胶电泳,用凝胶自动成像系统摄像并分析各条带吸光度值。本实验设定  $\beta$ -actin 为内参照,基因表达值 =  $\text{NF-}\kappa\text{B}/\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)。 $\text{NF-}\kappa\text{B}$  p65 引物,5'-ATCTGTTTCCCCT-CATCTTTCC, 3'-CGTCTTAGTGATCTGTGCT-TCTC,扩增片段长 164 bp, $\beta$ -actin 引物,5'-GCAC CACACTTTCTACAATGA, 3'-GAACCGCTCATTGC-CGATAGTAGTCC,扩增片段长 508 bp,均由生工生物工程(上海)有限公司合成。

**2.5 心肌组织形态学观察** 将其余心肌组织脱水、包埋后用超薄切片机切成厚度 4  $\mu\text{m}$  薄片,进行常规 HE 染色,并在 40 倍光镜下观察左心室缺血区心肌组织的形态学变化。

**2.6 统计分析** 应用 SPSS 13.0 统计软件,所有实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,用单因素方差分析统计实验结果, $P < 0.05$  有统计学意义。

### 3 结果

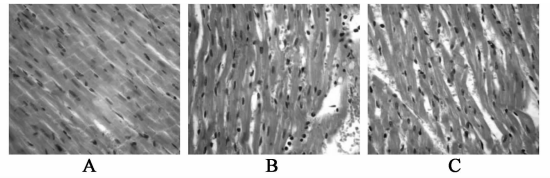
**3.1 香椿子总多酚对心肌缺血再灌注大鼠血清 IL-6 和 TNF- $\alpha$  含量的影响** 模型组与假手术组相比,血清 IL-6 和 TNF- $\alpha$  含量明显升高( $P < 0.05$ ),XD, XZ, XG 组与模型组相比,血清 IL-6 和 TNF- $\alpha$  含量明显降低,具有显著统计学差异( $P < 0.05$ )。结果如表 1 所示。

**表 1 香椿子总多酚对心肌缺血再灌注大鼠血清 TNF- $\alpha$ , IL-6 的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )  $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$**

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	TNF- $\alpha$	IL-6
假手术	-	60.23 $\pm$ 17.69 <sup>2)</sup>	229.91 $\pm$ 77.24 <sup>2)</sup>
模型	-	216.23 $\pm$ 58.67	638.88 $\pm$ 188.94
香椿子总多酚	50	148.24 $\pm$ 36.30 <sup>2)</sup>	491.58 $\pm$ 142.59 <sup>1)</sup>
	100	157.62 $\pm$ 52.06 <sup>1)</sup>	306.85 $\pm$ 80.60 <sup>2)</sup>
	200	144.10 $\pm$ 36.64 <sup>2)</sup>	246.11 $\pm$ 71.64 <sup>2)</sup>

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

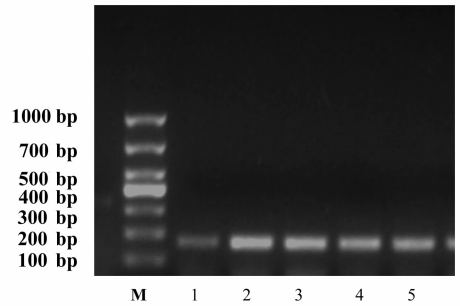
**3.2 香椿子总多酚对心肌缺血再灌注大鼠心肌组织形态学的影响** 光镜下观察,假手术组心肌细胞排列整齐,心肌纤维横纹清晰,无细胞肿胀,未见变性坏死和炎性细胞浸润。模型组心肌排列紊乱,细胞肿胀明显,肌纤维部分断裂,横纹模糊或消失,细胞间有炎性细胞浸润,红细胞漏出明显。XG 组心肌细胞排列基本规整,部分心肌细胞水肿变性,肌纤维间隙水肿,偶尔可见散在的红细胞,少见炎性细胞浸润。见图 1。



A. 假手术组; B. 模型组; C. 香椿子总多酚 200  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组;

图 1 香椿子总多酚对心肌缺血再灌注大鼠心肌组织形态学的影响(HE,  $\times 400$ )

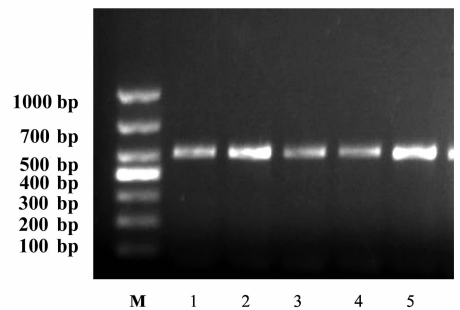
**3.3 香椿子总多酚对心肌缺血再灌注大鼠 NF- $\kappa\text{B}$  mRNA 的表达的影响** 各组大鼠心肌组织均有 NF- $\kappa\text{B}$ p65 mRNA 表达(图 2~3)。模型组 NF- $\kappa\text{B}$  mRNA 的表达显著高于假手术组,XD, XZ, XG 组与模型组相比,NF- $\kappa\text{B}$  mRNA 的表达明显降低,具有显著统计学差异( $P < 0.05$ )。见图 2~3,表 2。



M. DNA Marker; 1. 假手术组; 2. 模型组;

3. 香椿子总多酚 50  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组; 4. 香椿子总多酚 100  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组; 5. 香椿子总多酚 200  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组(图 3 同)。

图 2 大鼠心肌 NF- $\kappa\text{B}$ p65 RT-PCR 产物电泳



M 1 2 3 4 5

图 3 大鼠心肌  $\beta$ -actin RT-PCR 产物电泳

**表 2 香椿子总多酚对心肌缺血再灌注大鼠心肌组织 NF- $\kappa\text{B}$  p65 mRNA 的表达量的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )**

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	NF- $\kappa\text{B}$ p65/ $\beta$ -actin
假手术	-	0.35 $\pm$ 0.10 <sup>2)</sup>
模型	-	0.61 $\pm$ 0.05
香椿子总多酚	50	0.53 $\pm$ 0.08 <sup>1)</sup>
	100	0.45 $\pm$ 0.13 <sup>1)</sup>
	200	0.38 $\pm$ 0.11 <sup>1)</sup>

## 4 讨论

到目前为止,临床和基础已经发现了多种药物如抗氧化剂、NO 供体、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^+$  或  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交换体抑制剂、腺苷受体激动剂等可以不同程度减轻缺血再灌注损伤<sup>[4]</sup>,但是多数研究在动物实验中取得了良好的结果,而在临床研究中效果欠佳。我们课题组前期研究发现香椿子总多酚可以改善大鼠心肌缺血再灌注损伤,本文在此研究基础上设计了几个相关实验探讨香椿子总多酚对大鼠心肌缺血再灌注急性炎症的作用。

近年研究发现在心肌缺血再灌注损伤过程中,炎症损伤贯穿于心肌细胞损伤的全过程。TNF- $\alpha$  是一种重要的炎症因子,心肌巨噬细胞和心肌细胞本身均可以产生该物质。Schulz 发现心肌缺血再灌注损伤 TNF- $\alpha$  在血清和组织中快速升高,与心肌损伤有关。TNF- $\alpha$  参与了心肌缺血再灌注的形成和发展,其表达水平的增高促进白细胞与内皮细胞的黏附和相互作用,使粒细胞向缺血再灌注区域的浸润大大增加,从而导致心肌功能障碍和心肌细胞死亡<sup>[5]</sup>。IL-6 主要来源于冠状动脉的血管细胞,一般认为对心肌有损伤作用。它可以诱导粒细胞进入缺血组织,促进心肌细胞间 ICAM-1mRNA 的表达,使 ICAM-1mRNA 急剧增加,进而与中性粒细胞表面的 LFA-1 相结合,促进内皮细胞与中性粒细胞的黏附。中性粒细胞活化后可以释放超氧阴离子、穿孔素等加重心肌细胞损伤。实验结果表明,香椿子总多酚可以降低心肌缺血再灌注大鼠血清 TNF- $\alpha$ , IL-6 含量,反映了其可以减轻缺血再灌注时的急性炎症损伤。

NF- $\kappa$ B 主要由一个相对分子质量 50 000 和一个相对分子质量 65 000 的蛋白组成二聚体。静息时, NF- $\kappa$ B 与 I $\kappa$ B $\alpha$  形成三聚体,以非活性的形式定位于胞质中。当各种刺激信号刺激胞质中的 I $\kappa$ B $\alpha$  激酶,使 I $\kappa$ B $\alpha$  磷酸化, NF- $\kappa$ B 激活并进入胞核中,

启动基因转录。心肌缺血再灌注时的急性炎症可以造成 NF- $\kappa$ B 活化,进而引起相关的信号转导通路活化,诱导多种黏附分子、趋化因子、炎症因子生成<sup>[6]</sup>。我们的研究显示,香椿子总多酚可以有效降低心肌缺血再灌注大鼠心肌中 NF- $\kappa$ Bp65mRNA 表达,从而抑制 ICAM-1, VCAM-1, E-选择素等细胞因子生成,减少内皮细胞与白细胞之间的黏附及炎症放大效应。

此外,从 HE 染色的结果可以直观地看出,香椿子总多酚可以减轻大鼠心肌缺血再灌注时的形态学损伤,减轻炎症细胞浸润。

综上所述,香椿子总多酚可以减轻大鼠心肌缺血再灌注炎症损伤,对心脏产生保护作用。但是由于其中的机制错综复杂,又涉及到信号转导通路,深入的机制探讨有待于设计一系列实验进一步研究。

## [参考文献]

- [1] 臻铁出,罗忠萍,崔裘安,等. 香椿化学成分初步研究[J]. 陕西林业科技,2000,20(2):1.
- [2] 李红月,陈超. 香椿子总多酚对心肌缺血再灌注大鼠的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(1):117.
- [3] 呼敏凤,尚立芝,韦大文. 川芎嗪预处理对心肌缺血再灌注损伤大鼠保护作用的实验研究[J]. 上海中医药杂志,2008,42(4):66.
- [4] Moens A L, Claey s M J, Timmermans J P, et al. Myocardial ischemia/reperfusion-injury, a clinical view on a complex pathophysiological process [J]. Int J Cardiol, 2005,100(2):179.
- [5] 张晓东,杨简,杨俊. 细胞因子在心肌缺血在损伤中的作用机制[J]. 现代生物医学进展,2008,8(11):2179.
- [6] Jong Woo Kim, Yong Chun Jin, Young Min Kim, et al. Daidzein administration *in vivo* reduces myocardial injury in a rat ischemia/reperfusion model by inhibiting NF- $\kappa$ B activation[J]. Life Sciences, 2009, 84 (7/8): 227.

[责任编辑 聂淑琴]