

桑叶总黄酮对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用

王萍

(漯河医学高等专科学校, 河南 漯河 462002)

[摘要] 目的:研究桑叶总黄酮对大鼠心肌缺血再灌注损伤心肌细胞凋亡及半胱天冬酶-3(caspase-3)蛋白表达的影响。方法:90只SD大鼠随机分为假手术组、模型组、桑叶总黄酮(TFMF)高、中、低3个剂量组、通心络胶囊组。手术前1周,MSTF服用不同剂量的MSTF(35,70,140 mg·kg⁻¹·d⁻¹),通心络胶囊组按照100 mg·kg⁻¹·d⁻¹服用,其余2组给与等量的生理盐水。采用结扎左冠状动脉前降支30 min、再灌注2 h的方法建立大鼠心肌缺血再灌注损伤模型。观察心肌梗死面积,原位末端标记(TUNEL)染色检测心肌细胞的凋亡情况,免疫组织化学法检测caspase-3蛋白表达情况。结果:与假手术组比较,模型组IS/LV,IS/AR增加,细胞凋亡率显著增加($P < 0.01$),且caspase-3蛋白表达显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,不同剂量的TFMF能降低IS/LV,IS/AR,明显减少心肌细胞凋亡($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),明显降低caspase-3蛋白表达($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论:TFMF能下调caspase-3蛋白表达,减少细胞凋亡而发挥抗心肌缺血再灌注损伤作用。

[关键词] 桑叶总黄酮;心肌缺血再灌注;细胞凋亡;半胱天冬酶-3

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2011)19-0185-03

Protective Effects of Total Flavonoid from Mori Folium on Myocardial Ischemic-reperfusion Injury in Rats

WANG Ping

(Luohe Medical College, Luohe 462002, China)

[Abstract] **Objective:** To study effects of the total flavones from Mori Folium (TFMF) on myocardial cell apoptosis and caspase-3 expression in myocardial ischemic-reperfusion injury in rats. **Method:** Ninety SD rats were randomized into sham operation group, model group, three dose groups of TFMF (35, 70, 140 mg·kg⁻¹·d⁻¹), Tonxinluo capsule group (100 mg·kg⁻¹·d⁻¹). The left anterior descending coronary artery was ligated for 30 min, followed by 2 h of reperfusion to establish the rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury. Myocardial apoptosis were detected by the TUNEL staining and caspase-3 expression was detected by immunohistochemical technique method. **Result:** IS/LV and IS/AR increased obviously in model group compared with those in sham group, Myocardial apoptosis rate increased obviously ($P < 0.01$) and caspase-3 protein expression was significantly elevated ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) in the model group. Compared with model group, IS/LV, IS/AR and myocardial apoptosis rate in TFMF group decreased obviously ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and caspase-3 protein expression was down-regulated ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion:** TFMF possessed an obvious ameliorate effect on myocardial cell apoptosis in myocardial ischemic-reperfusion injury rats by decreasing the caspase-3 protein expression.

[Key words] total flavonoid of Mori Folium; myocardial ischemia-reperfusion injury; myocardial apoptosis; caspase-3

心肌缺血再灌注(ischemia reperfusion, IR)损伤广泛见于临床,是一个复杂的病理生理过程,是造成

临床溶栓治疗、心脏移植、冠状动脉搭桥术失败的重要原因。目前大量基础及临床实验研究证实,氧自

由基的过度产生是其主要机制之一^[1]。桑叶含有丰富的黄酮,动物试验表明,具有较强的抗肿瘤活性^[2],清除自由基、抗氧化,具有抑制血清脂质增加、抑制动脉粥样硬化形成及降血糖等多种药理作用^[3]。本研究采用心肌缺血再灌注模型模拟临床缺血再灌注损伤病理变化,旨在观察桑叶总黄酮(Mori Folium total flavonoid,TFMF)是否具有抗凋亡等保护心肌的作用及其可能的作用机制。

1 材料

1.1 药物 桑叶总黄酮(TFMF)由漯河医专天然产物教研室提供,高效液相色谱仪(安捷伦)检测纯度为 96.7%。使用时黄酮先溶于无水乙醇中,然后用 0.9% 氯化钠稀释成所需浓度,乙醇在溶液中的终浓度不超过 0.1%。

1.2 动物 健康 SD 大鼠 90 只,体重(220 ± 20)g,雌雄各半,购于河南省动物实验中心,动物许可证号(豫)动字 P0010003。

1.3 试剂与仪器 原位末端标记(Tunel)检测试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,批号 20090112);半胱天冬酶-3(caspase-3),兔抗鼠多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司,批号 20090203);通心络胶囊(石家庄以岭药业股份有限公司,批号 20090312);氯化三苯基四氮哇(TTC;中国医药集团上海化学试剂公司,批号 100611)。奥林巴斯荧光显微镜(奥林巴斯公司);FACSCalibur 流式细胞仪(美国 B&D 公司);6511 型心电图机(上海 KOHDEN 电子有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组 108 只 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、TFMF 高、中、低剂量、通心络胶囊组。每组 18 只。除假手术组,其余各组大鼠均制备心肌缺血再灌注模型,其中 TFMF 3 个剂量(35, 70, 140 mg·kg⁻¹·d⁻¹)组和通心络胶囊(100 mg·kg⁻¹·d⁻¹)组,大鼠于手术前 1 周分别 ig 给药,连续 10 d;假手术组和模型组术前分别 ig 给予相应容积的生理盐水。

2.2 心肌缺血再灌注模型的制备 10% 乌拉坦 ip 麻醉(10 mL·kg⁻¹)大鼠,仰卧位固定,开胸后连接小动物人工呼吸机(潮气量 8 ~ 12 mL,呼吸比 1:2,呼吸频率 70 ~ 80 次/min),用针型电极记录标准肢体 II 导联心电图。于胸骨左缘 3 ~ 4 肋间切开胸壁,暴露心脏,在左心耳与肺动脉干之间结扎左冠状动脉

前降支,将结扎线从 PE 管(直径约 2 mm)中间穿出,用 PE 管一端阻断冠状动脉血流,另一端用动脉夹固定^[4]。结扎 30 min;然后剪断缝合线,取出 PE 管,再灌注 2 h。以心电图 ST 段抬高、T 波高耸标志心肌缺血的存在;以抬高的 ST 段下降 50% 以上,动脉血压升高以确定再灌注的成功。假手术组仅分离前室间支,但不结扎。

2.3 大鼠心肌梗死面积测定 除假手术组外,其余各组随机取出 5 只大鼠,将 1% 伊文思蓝液 3 mL 经右颈总动脉注入进行左室心肌染色,处死动物,迅速取出心脏,以磷酸缓冲液(PBS, pH 7.4)冲洗,滤纸吸干表面水分,置 -20℃ 冰箱中冷却 30 min 后,取心脏剪去心耳和右心室后切成 1 mm 厚的薄片,于 1% TTC 溶液中 37℃ 温孵 15 min,非缺血区染成蓝色,缺血未梗死区染成砖红色,梗死区呈灰白色^[5],用数码相机进行图像采集,再用电脑图像分析软件(Photoshop7.0 和 OPTIMAS5.0)求出梗死区(infarct size, IS)占缺血区面积(area of risk, AR)、梗死区占左室面积(area of leftventricular, LV)及缺血区占左室面积的比例。

2.4 原位末端标记(TUNEL)染色 用 TUNEL 方法检测再灌注后梗死区边缘心肌组织凋亡细胞的 DNA 片段,在荧光显微镜下计数心肌细胞及凋亡细胞,每张切片随机选取 5 个视野(×400 倍),计数心肌细胞及凋亡阳性细胞,棕黄色颗粒者为阳性细胞,即凋亡的细胞,以凋亡指数(apoptosis index, AI)反映各组心肌凋亡情况。

$$AI = \text{凋亡细胞数} / \text{总心肌细胞数} \times 100\%$$

2.5 caspase-3 蛋白的检测 采用免疫组化法检测再灌注后取梗死区边缘心肌组织切片。心肌细胞质黄色或棕黄色为阳性细胞,在高倍镜下(400×),取每张切片中梗死灶区域相互不重叠 5 个视野,采用 Meta Morph 图像分析系统,记录 caspase-3 蛋白积分吸光度(IA)。

2.6 统计学方法 应用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学处理,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,组间比较用 *t* 检验, *P* < 0.05 为有统计学差异。

3 结果

3.1 桑叶总黄酮对心肌梗死面积的影响 与模型组比较,桑叶黄酮低、中、高剂量均可明显减少 IS/AR, IS/LV (*P* < 0.05 或 *P* < 0.01)。各药物治疗组

AR/LV 值与模型组比较, 各组之间无显著差异。(表 1)。

表 1 桑叶总黄酮对缺血再灌注大鼠心肌梗死面积的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$) %

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	IS/LV	IS/AR	AR/LV
模型	-	49.31 ± 3.78	31.27 ± 4.87	57.38 ± 4.98
假手术	-	0 ²⁾	0 ²⁾	0 ²⁾
TFMF	35	46.27 ± 4.17 ¹⁾	28.11 ± 3.31 ¹⁾	43.21 ± 3.27
	70	43.19 ± 3.21 ¹⁾	18.17 ± 3.29 ¹⁾	35.21 ± 3.51
	140	39.31 ± 3.98 ²⁾	10.21 ± 4.12 ²⁾	27.38 ± 3.29
通心络胶囊	100	36.24 ± 4.11 ²⁾	8.29 ± 4.59 ¹⁾	21.12 ± 3.47

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

3.2 对心肌缺血再灌注心肌细胞凋亡和心肌细胞 caspase-3 的影响 模型组细胞凋亡率和 caspase-3 蛋白表达显著增加, 与假手术组相比均有显著性差异 ($P < 0.01$); 桑叶黄酮各剂量组能显著降低心肌细胞凋亡率和 caspase-3 蛋白表达, 与模型组相比有显著性差异 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 提示桑叶黄酮可抑制缺血再灌注诱导的大鼠心肌细胞 caspase-3 蛋白表达, 减少心肌细胞凋亡。

表 2 桑叶总黄酮对缺血再灌注大鼠细胞凋亡及心肌细胞 caspase-3 的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	细胞凋亡率 /%	caspase-3 阳性 细胞/%
模型	-	25.6 ± 2.4	2.12 ± 0.14
假手术	-	6.1 ± 1.7 ²⁾	0.3 ± 0.02 ²⁾
TFMF	35	18.3 ± 2.4	2.01 ± 0.15 ¹⁾
	70	12.2 ± 2.9 ¹⁾	1.42 ± 0.07 ¹⁾
	140	9.7 ± 2.5 ²⁾	1.01 ± 0.01 ²⁾
通心络胶囊	100	8.1 ± 2.7 ²⁾	0.7 ± 0.11 ²⁾

4 讨论

心肌缺血性疾病的发生率和死亡率呈逐年上升趋势。目前对心肌缺血再灌注治疗的药物研究多集中在试图减少梗死面积的药物探索上^[4]。通过试验表明, 桑叶总黄酮可明显减少心肌缺血再灌注损伤后心肌梗死面积, 说明桑叶总黄酮能够增强缺血区心肌的抗损伤能力, 有效地减轻心肌缺血再灌注损伤。

细胞凋亡与心肌缺血再灌注损伤密切相关, 细胞凋亡的多少决定了心功能损害的程度^[6]。本实验用 TUNEL 方法对大鼠心肌细胞凋亡进行研究, 结果发现模型组中均有明显的凋亡细胞, 而假手术组的心肌组织中无明显的凋亡现象, 经不同剂量 TFMF

预保护, 给药组心肌凋亡细胞较模型组明显减少。因此, 心肌缺血再灌注损伤时可发生细胞凋亡, 而 TFMF 预保护可减少凋亡的发生。

实验研究表明, 心肌短时缺血后即可出现凋亡, 再灌后加剧, 而细胞凋亡的触发是一个级联式基因表达的结果, 有许多基因参与此过程, 主动合成新的大分子蛋白质, 对凋亡的发生、发展起到促进或抑制作用^[7]。其中 caspase 家族是细胞凋亡发挥关键作用的一组半胱氨酸蛋白酶, caspase-3 在凋亡级联反应中处于核心地位^[8], 在死亡受体介导的细胞凋亡过程中扮演着重要角色。与假手术组大鼠相比, 模型组大鼠 caspase-3 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组大鼠相比, TFMF 组大鼠 caspase-3 蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 差异具有显著性, 提示 SSTF 能抑制缺血再灌注中心肌细胞 caspase-3 蛋白表达。

总之, 本实验结果提示, TFMF 能下调 caspase-3 蛋白表达, 减少细胞凋亡, 减少心肌梗死面积, 能够改善心功能, 缩小心肌梗死面积, 对心肌缺血性疾病的防治可能具有潜在的开发价值。

[参考文献]

- [1] Shiomi T, Tsutsui H, Matsusaka H, et al. Overexpression of glutathione peroxidase prevents left ventricular remodeling and failure after myocardial infarction in mice[J]. Circulation, 2004, 109(4):544.
- [2] 杨燕, 王洪庆, 陈若芸. 桑叶中的黄酮类化合物[J]. 药学报, 2010, 45(1):77.
- [3] 刘成梅, 游海. 天然产物有效成分的分离与应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003:58.
- [4] 蒯艳芳. 盐酸小檗碱对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[D]. 长春: 吉林大学, 2010.
- [5] 程虹, 刘惟莞. 姜黄素对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2005, 21(10):1238.
- [6] 刘永平, 龚明玉, 周晓慧. 黄芩茎叶总黄酮抑制大鼠心肌缺血再灌注时细胞凋亡的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(12):146.
- [7] 吕纪华, 贺敏, 黄建春, 等. 玉郎伞黄酮对心肌缺血再灌注损伤心肌组织 ATP 酶和凋亡蛋白的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(13):162.
- [8] Kim K S, Yoon S T, Li J, et al. Disc degeneration in the rabbit: a biochemical and radiological comparison between four disc injury models[J]. Spine, 2005, 30(1):30.

[责任编辑 聂淑琴]