

二氢槲皮素对异丙肾上腺素致大鼠心肌缺血的保护作用

王秋红, 匡海学*, 吴伦, 李阳, 王知斌

(黑龙江中医药大学北药基础与应用研究部省共建重点实验室, 黑龙江省中药及天然药物药效物质基础研究重点实验室, 哈尔滨 150040)

[摘要] **目的:**研究二氢槲皮素对异丙肾上腺素致大鼠心肌缺血的保护作用,探讨其对冠心病的防治作用及机制。**方法:**将 SD 大鼠随机分为空白组、模型对照组、阳性对照组(地奥心血康 $42 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、二氢槲皮素高、中、低剂量组($6.4, 3.2, 1.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。皮下注射 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 异丙肾上腺素(ISO)造成心肌缺血性损伤模型后观察心电图(ECG)的变化,检测血清和心肌组织中超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)和血清中肌酸激酶(CK)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)和乳酸脱氢酶(LDH)含量变化,并对大鼠心肌组织进行了病理切片检查。**结果:**二氢槲皮素能改善大鼠 ECG 的 J 点位移,显著降低心肌缺血大鼠血清中 CK, CK-MB, LDH 的含量,升高心肌组织匀浆中 SOD 活力,降低心肌组织匀浆中脂质过氧化终产物 MDA 的含量。**结论:**二氢槲皮素能有效抑制 ISO 所致心肌组织缺血,保护心肌细胞免受损伤,从而起到治疗冠心病的作用。

[关键词] 二氢槲皮素;心肌酶;心肌缺血;冠心病;异丙肾上腺素

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)17-0177-04

Protective Effect of Dihydroquercetin on Acute Myocardial Ischemia Induced by Isoproterenol in Rats

WANG Qiu-hong, KUANG Hai-xue*, WU Lun, LI Yang, WANG Zhi-bin

[Key Laboratory of Chinese Materia Medica (Heilongjiang University of Chinese Medicine), Ministry of Education, Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine and Natural Medicine Pharmacodynamic Material Base, Harbin 150040, China]

[Abstract] **Objective:** To study the effects and mechanisms of dihydroquercetin against myocardial ischemic model induced by isoproterenol in rat. **Method:** The health SD rats were randomly divided into blank group, model group, three dose groups of dihydroquercetin. Myocardial injury model was induced by subcutaneous injection of isoproterenol ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). The electrocardiogram ECG was recorded, superoxid dismutase (SOD), malondialdehyde(MDA), creatine kinase(CK), creatine kinase isoenzymes(CK-MB) and lactate dihydrogenase(LDH) in the blood were detected by ELISA, pathological changes of rat's myocardial tissue were determined by hematoxylin-eosin(HE) staining. **Result:** J point displacement in ECG was improved in dihydroquercetin group. Serum CK, CK-MB and lactate dihydrogenase(LDH) decreased significantly in dihydroquercetin group compared with those in the model group. SOD activity increased and MDA content lowered in myocardial tissue homogenate in dihydroquercetin group. **Conclusion:** Dihydroquercetin had an effective role to treat coronary heart disease by inhibiting myocardial tissue ischemia induced by ISO and protecting myocardial cells from injury.

[Key words] dihydroquercetin; myocardial ischemia; coronary heart disease; isoproterenol

[收稿日期] 20110405(002)

[基金项目] 中俄总理定期会晤政府间科技合作计划项目(CR11-69);哈尔滨市科技(对俄)攻关计划项目(2006AA3BE055)

[第一作者] 王秋红, 教授, 博士, 从事中药炮制、中药药效物质基础及活性研究、新药研发, Tel: 0451-82195994, E-mail: qhwang668@sina.com

[通讯作者] * 匡海学, 教授, 博士, 从事中药及天然药物药效物质基础研究, Tel: 0451-82193001, E-mail: hxkuang@163.com

冠心病是冠状动脉粥样硬化性心脏病 (coronary heart disease, CHD) 的简称, 又称缺血性心脏病。近年来, 随着人民生活水平的提高, 冠心病在我国的发病率及死亡率也呈逐年递增的趋势, 成为危及人类健康的主要疾病之一。天然药物具有疗效好、质量可控、毒副作用小等特点, 其在抗心肌缺血、防治冠心病领域的应用备受学者的重视。二氢槲皮素是由松科植物落叶松 *Larix gmelinii* Rupr. 中提取分离的高纯度天然化合物, 具有降血压、扩张冠状动脉、清除低密度脂蛋白和很强的抗氧化能力, 对于维持人的循环系统正常功能方面具有一定的作用^[1]。

异丙肾上腺素为 β 受体激动剂, 可通过促进氧自由基生成和细胞内 Ca^{2+} 浓度的升高而引起心肌损伤^[2]。连续给大鼠 *sc* 异丙肾上腺素 (ISO) 会导致大鼠急性心肌缺血损伤, 这种损伤与人的急性心肌缺血较为相似, 故可作为评价抗心肌缺血的动物模型^[3-4]。心肌缺血时, 由于代谢障碍所致 ATP 减少, 细胞内 K^+ 丢失, 导致心肌的兴奋-收缩偶联障碍, 心肌收缩力减弱, 所以心肌缺血往往伴随血流动力学及心脏功能的改变。大鼠心电图 (ECG) J 点位移值是评价心肌缺血的一个重要指标^[5], J 点上升或下降 0.1 mV 即可视为心肌缺血^[6-7]。同时大鼠血液和心肌组织中肌酸激酶 (CK)、肌酸激酶同工酶 (CK-MB)、乳酸脱氢酶 (LDH)、超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA) 等生化指标和心肌坏死面积对研究抗心肌缺血的机制具有一定的意义。本实验采用 ISO 致大鼠急性心肌缺血模型, 探究二氢槲皮素抗心肌缺血、治疗冠心病的作用。

1 材料

1.1 动物 健康 SD 大鼠 60 只, 雄性, 体重 220 ~ 250 g。由黑龙江中医药大学 GLP 中心提供, 许可证号 SCXK-(京)2009-0001。

1.2 仪器 KY2000 半自动生化分析仪 (日本岛津公司); 756PC Spectrum 紫外分光光度计 (上海光谱仪器有限公司); MP100-16 导联仪 (Linton instrumentation)。

1.3 试剂 CK 试剂盒 (批号 20090921), CK-MB 试剂盒 (批号 20090921), SOD 试剂盒 (批号 20091020), MDA 试剂盒 (批号 20091122), 考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒 (批号 20091120), LDH 试剂盒 (批号 20091120), 均购自南京建成生物工程研究所。

1.4 药物 盐酸异丙肾上腺素 (上海禾丰制药有限公司); 地奥心血康胶囊 (成都地奥制药集团有限公司); 二氢槲皮素 (俄罗斯阿梅季斯有限责任公司) 批号 140906102。

2 方法

2.1 异丙肾上腺素诱导的急性心肌缺血模型的建立 将大鼠随机分成空白组、模型组、高、中、低 3 个剂量组和阳性对照药 (地奥心血康) 组, 将二氢槲皮素的水溶液, 依照正常给药剂量按体表面积折算, 给药剂量分别为高、中、低剂量组: 4 mL (相当于二氢槲皮素 6.4, 3.2, 1.6 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。阳性对照组: 4 mL (相当于地奥心血康 42 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。空白组和模型组给予相应体积的蒸馏水, 所有大鼠连续 *ig* 15 d, 1 次/d。第 13 天开始, 分别将模型组、高、中、低剂量组、阳性对照组大鼠 *sc* ISO (按 5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量给药), 连续 3 d, 饮水不限^[8]。

2.2 检测指标及方法

2.2.1 心电图 (ECG) 检查 于末次给药后 20 min 左右, 将大鼠用 10% 乌拉坦溶液按 10 $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ *ip* 麻醉, 固定于操作台, 电极插于四肢皮下, 记录标准 II 导联心电图, 观察造模前后心电图变化, 测定 J 点位移值, 进行统计学分析。

2.2.2 血清中 CK, CK-MB, LDH 的测定 颈动脉取血, 分离血清, 按试剂盒说明书操作测定血清中 CK, CK-MB, LDH。

2.2.3 心脏组织匀浆 SOD, MDA 的测定 将心脏取出, 取心尖同一部位的心肌组织, 生理盐水冲洗, 冰水浴研磨, 制备 10% 心肌组织匀浆。按试剂盒说明书操作测定心肌组织匀浆中的 SOD, MDA。

2.2.4 心肌组织病理切片的制作 取出心尖组织放于 10% 甲醛中固定, HE 染色, 光镜下观察各组标本的病理形态学的变化情况。

2.3 统计学处理 用 SPSS 13.0 软件, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠 ECG 的影响 注射 ISO 后, 大鼠的 ECG 很快出现心肌缺血性改变, 表现为 J 点抬高, T 波高耸, 显示大鼠心肌有严重的心肌缺血损伤。各用药组 J 点位移幅度较小, 与模型组相比具有显著性差异; 且二氢槲皮素各组具量-效关系。见表 1。

表1 二氢槲皮素对急性心肌梗死大鼠心电图J点上移的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg · kg ⁻¹	J点上移/mV
空白对照	-	0.076 ± 0.015
模型对照	-	0.231 ± 0.026 ²⁾
二氢槲皮素	1.6	0.202 ± 0.038 ³⁾
	3.2	0.185 ± 0.009 ⁴⁾
	6.4	0.176 ± 0.011 ⁴⁾
地奥心血康	42.0	0.183 ± 0.024 ⁴⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表2~3同)。

表2 二氢槲皮素对急性心肌梗死大鼠血清CK,CK-MB,LDH活性的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

U · L⁻¹

组别	剂量/mg · kg ⁻¹	CK	CK-MB	LDH
空白对照	-	88.58 ± 37.22	86.38 ± 44.46	154.78 ± 47.52
模型对照	-	175.14 ± 47.63 ²⁾	187.25 ± 39.87 ²⁾	299.56 ± 37.93 ²⁾
二氢槲皮素	1.6	156.23 ± 39.86 ³⁾	163.16 ± 35.56 ³⁾	263.09 ± 23.27 ³⁾
	3.2	137.13 ± 24.63 ⁴⁾	129.15 ± 48.87 ⁴⁾	238.43 ± 45.05 ⁴⁾
	6.4	114.22 ± 25.46 ⁴⁾	119.18 ± 22.46 ⁴⁾	217.44 ± 37.88 ⁴⁾
地奥心血康	42.0	122.88 ± 34.77 ⁴⁾	128.14 ± 29.47 ⁴⁾	229.38 ± 28.74 ⁴⁾

个剂量组大鼠心肌组织匀浆中SOD活力显著升高,MDA含量显著降低。且具显著的量-效依赖关系。见表3。

3.4 心肌组织病理切片 与空白对照组比较,模型组心肌组织具有明显的缺血损伤,表明皮下注射异丙肾上腺素可引起心肌急性缺血损伤;与模型组相比,各给药组心肌坏死面积明显减小;随给药剂量的增加,心肌组织坏死面积明显减小,表明二氢槲皮素可减轻心肌细胞的变性坏死,结果见图1。

3.2 血清中CK,CK-MB,LDH含量 大鼠注射ISO后,血清中的CK,CK-MB,LDH明显上升,显示由于心肌组织的损伤而使心肌细胞中的CK,CK-MB,LDH漏出到血液中,血清中的脂质过氧化物(LPO)大量增加。与模型组相比,二氢槲皮素低、中、高治疗组血清中的CK,CK-MB,LDH明显下降,具显著的量-效依赖关系。见表2。

3.3 心肌组织匀浆中SOD活性及MDA含量 注射ISO后,大鼠心肌组织中SOD活性显著降低,MDA含量明显升高。与模型组相比,二氢槲皮素3

表3 二氢槲皮素对心肌梗死大鼠心肌组织中SOD,MDA水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg · kg ⁻¹	SOD /U · mg ⁻¹	MDA /nmol · mg ⁻¹
空白对照	-	250.68 ± 30.06	1.07 ± 0.09
模型对照	-	139.56 ± 24.33 ²⁾	2.98 ± 0.24 ²⁾
二氢槲皮素	1.6	185.55 ± 60.08 ³⁾	2.40 ± 0.43 ³⁾
	3.2	207.74 ± 32.62 ⁴⁾	1.94 ± 0.27 ⁴⁾
	6.4	218.21 ± 19.57 ⁴⁾	1.53 ± 0.16 ⁴⁾
地奥心血康	42.0	193.84 ± 43.64 ³⁾	2.09 ± 0.11 ⁴⁾

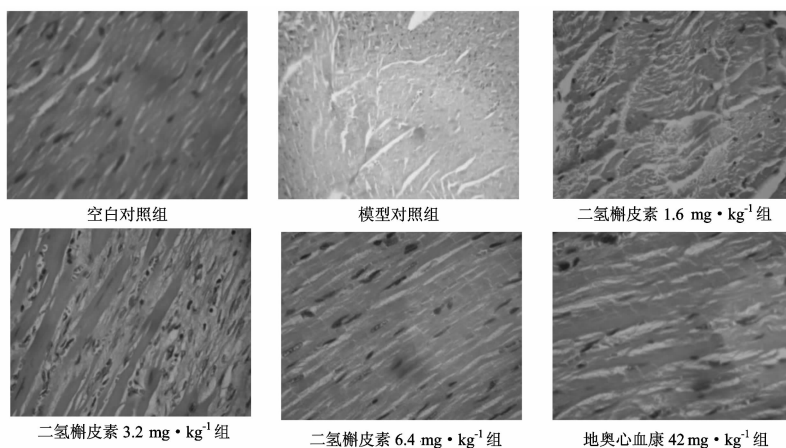


图1 二氢槲皮素治疗后心肌组织(HE, ×400)

4 讨论

冠心病(缺血性心脏病)的病因与氧自由基的

产生密切相关。心肌缺血后活化的中性粒细胞大量聚集在缺血区,加速了自由基的生成^[9],导致氧自由

基堆积,氧自由基可转变为羟基自由基,后者使膜脂质过氧化,引起细胞膜的结构和功能损害,从而加剧缺血组织损伤^[10]。二氢槲皮素有很强的抗氧化能力,能有效清除自由基,提高心肌组织中 SOD 的活性,并能够抑制脂质过氧化过程,降低脂质过氧化物 MDA 活性,减轻氧自由基对心肌的损伤,保护缺血性心肌,治疗冠心病。

大剂量 ISO 可引起大鼠心肌收缩增快,心肌能量供应发生障碍,产生心肌损伤及坏死,心电图 J 点发生变化,变化幅度可基本反映心肌缺血的严重程度,因此,J 点位移可作为缺血程度的定量指标。CK,CK-MB,LDH 的活力是评价心肌细胞损害程度的重要指标。CK,CK-MB,LDH 在心肌组织含量较高且分布均匀,心肌缺血或心肌受损时,CK,CK-MB,LDH 的释放量增加,导致血清中 CK,CK-MB,LDH 含量增加,测定心肌和血清中 CK,CK-MB,LDH 的活力,常用做心肌缺血指标,有助于评价保护心肌药物的疗效。MDA 为脂质过氧化反应的主要终产物,测定其含量可间接反应机体中自由基水平及脂质过氧化反应程度。

本实验观察到大鼠口服二氢槲皮素后能有效抑制 ISO 所致心肌组织缺血,明显降低 J 点的位移值,提高左心室收缩力,血清中 CK,CK-MB,LDH 的活性明显降低,心肌组织匀浆中 SOD 活力升高,MDA 含量显著降低,提示二氢槲皮素可以保护心肌细胞,提高细胞膜的稳定性。从病理切片上可以看出服用二氢槲皮素后大鼠心肌变性坏死区域的大量炎性细胞浸润、心肌纤维排列紊乱、断裂,肌丝融解得到明显改善,病变范围缩小。实验证明二氢槲皮素能有效抑制异丙肾上腺素(ISO)所致心肌组织缺血,保护心肌细胞免受损伤,从而起到治疗冠心病的作用。

[参考文献]

- [1] Haraguchi H, Mochida Y, Sakai S. Protection against oxidative damage by dihydroflavonoils in Engelhardtia chrysolepis [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1996, 60(6): 945.
- [2] Kondo T, Ogawa Y, Sugiyama S, et al. Mechanism of isoproterenol induced myocardial damage [J]. Cardiovasc Res, 1987, 21(4):248.
- [3] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学 [M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社,1991: 897.
- [4] 贾广乐,董培智. 对肾上腺素性心肌缺血模型大鼠相关指标的探讨 [J]. 中国实验动物学报, 2005, 17(2):106.
- [5] 陈奇. 中药药理研究方法 [M]. 北京:人民卫生出版社,1996:441.
- [6] 邵耕. 现代冠心病 [M]. 北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社,1998: 53.
- [7] 张齐好,陆大祥,王华东,等. 甘氨酸对心肌缺血-再灌注小鼠一氧化氮系统和 B-RNA 表达的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2004, 20(1): 42.
- [8] 叶耘,陈世宏,尚正录,等. 大鼠异丙肾上腺素性心肌缺血模型中医证型反证探讨 [J]. 实用中医药杂志, 2005, 21(5): 259.
- [9] Zweier J L. Measurement of superoxide derived free radical in the reperfused heart, Evidence for a free radical mechanism of reperfusion injury [J]. Biol Chem, 1988, 262(12): 1353.
- [10] Rao P S, Cohen M V, Mueller H S. Production of free radicals and lipid peroxides in early experimental myocardial ischemia [J]. J Mol Cell Cardiol, 1983, 15(10): 713.

[责任编辑 聂淑琴]