

益母草碱对大鼠急性心肌缺血损伤血管舒缩功能及抗氧化作用的影响

熊 莺, 杨解人*

(皖南医学院药理教研室, 安徽 芜湖 241001)

[摘要] 目的: 观察益母草碱对大鼠急性心肌缺血损伤血管舒缩功能及抗氧化作用的影响。方法: 垂体后叶素腹腔注射诱导大鼠急性心肌缺血, 放射免疫法测定血浆及心肌内皮素(ET)含量, 硝酸还原酶法测定血清和心肌一氧化氮(NO)含量, 黄嘌呤氧化酶法测定血清和心肌超氧化物歧化酶(SOD)活力, 硫代巴比妥酸法测定血清和心肌丙二醛(MDA)含量。结果: 益母草碱在一定剂量范围内能升高血中和心肌 NO 水平($P < 0.01$), 降低 ET 含量($P < 0.01$), 增加 SOD 活力和降低 MDA 含量($P < 0.01$), 且存在量效关系。结论: 益母草碱具有对抗垂体后叶素急性心肌缺血损伤的作用, 其机制可能与平衡血管舒缩功能、抗脂质过氧化等有关。

[关键词] 益母草碱; 垂体后叶素; 心肌缺血; 一氧化氮; 内皮素

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)07-0034-04

The Equilibrium of Vasomotor Function and the Prevention of Lipid Peroxidation of Leonurine on Acute Myocardial Ischemia Injury in Rats

XIONG Ying, YANG Jie-ren*

(Department of Pharmacology, Wannan Medical College, Wuhu 241001, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the equilibrium of vasomotor function and the prevention of lipid peroxidation of leonurine (Leo) on pituitary (Pit)-induced acute myocardial ischemia injury in rats. **Methods:** Pit was administrated intraperitoneally to induce acute myocardial ischemia injury in rats. The concentration of endothelin (ET) in plasma and myocardium were measured by radio immunoassay. The level of nitric oxide (NO), the activity of superoxide dismutase (SOD) and the content of malondialdehyde (MDA) in serum and myocardium was determined by nitrate reductase assay, xanthine oxidase assay and thibabitoric acid assay, respectively. **Results:** Within certain dose range of Leo, the contents of ET and MDA were obviously decreased and the level of NO and the activity of SOD were increased. Linear regression analysis (scatterplot) indicated that there was dose-effect relationship of Leo against myocardial ischemia injury within certain dose range. **Conclusions:** Leo inhibits Pit-induced myocardial ischemia injury. The mechanism may be related to the equilibrium of vasomotor function and the prevention of lipid peroxidation.

[Key words] leonurine; pituitrin; myocardial ischemia; nitric oxide; endothelin

益母草碱(leonurine, Leo)是中药益母草所含的

主要生物碱。前期研究发现, Leo 对垂体后叶素(pituitrin, Pit)所致缺血心电图具有改善作用, 可减少急性心肌缺血大鼠心电图 J 点及 T 波的抬高幅度, 降低血清及心肌的肌钙蛋白(cTnT)含量, 提示其机制可能与扩张冠状动脉, 提高冠脉血流量, 增加氧供, 稳定缺血心肌细胞膜, 减少 cTnT 的释放与漏出

[收稿日期] 2007-10-18

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学基金项目(2003kj322)

[通讯作者] * 杨解人, Tel: (0553) 3932464; E-mail: wnmcyali@sina.com

有关^[1]。本文在 Pit 诱发大鼠急性心肌缺血损伤的基础上,观察 Leo 对血管舒缩功能及抗氧化等作用的影响,探讨其可能机制。

1 材料和方法

1.1 动物 SD 大鼠,16 周龄,雌雄各半,体重(180±20)g,购自南京青龙山动物中心,许可证号:SCXK(苏)2002-0018。大鼠分笼饲养,每笼 8 只,保持室温(23±2)℃,相对湿度 60%~65%,自由进食饮水。

1.2 药品 Leo 粉剂(安徽省恢宏药业有限公司惠赠),系化学合成品, C₁₄H₂₁N₃O₅, 纯度:99%,批号:040202;用前将 Leo 溶于 0.9% 生理盐水,配制成相应浓度备用。

1.3 试剂 Pit 注射液(上海第一生化药业有限公司),批号:030303;盐酸氯胺酮注射液(上海第一生化药业有限公司),批号:021101;地西洋注射液(上海旭东海普药业有限公司),批号:961106;超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(批号:20040510)、丙二醛(MDA)试剂盒(批号:20040426)、一氧化氮(NO)试剂盒(批号:20040421)和蛋白定量检测试剂盒(批号:20040426),购于南京建成生物工程研究所;内皮素(ET)试剂盒(批号:0404)购于北京北方生物技术研究所。其他试剂均为分析纯。

1.4 仪器 XD-811 型自动生化分析仪(上海迅达医疗器械厂);电热恒温水浴箱(温州永强医疗器械厂);HH·S 型电热恒温水浴锅(江苏省医疗器械厂);TGL-16G-A 低温高速离心机(上海安亭科学仪器厂);低温冷冻离心机(科大创新股份有限公司中佳分公司);GC-911V 放射免疫计数器(科大创新股份有限公司中佳分公司 KDC-2042);HY-5 回旋振荡器(常州国华电器有限公司);TCS-2000 型电子秤(武汉市电子称重仪器公司);JA5003N 电子天平(上海精密科学仪器有限公司);玻璃匀浆器(南京建成生物工程研究所);微量加样器(瑞士)。

1.5 实验方法

1.5.1 动物筛选及分组 于实验前 2 周分别给大鼠腹腔注射 Pit 15 u·kg⁻¹,20 min 时 T 波抬高或 J 点上移 0.1 mv 以上者入选,有下列情形之一者淘汰不用:大鼠未注射 Pit 前就出现异常心电图者;20 min 内 T 波抬高或 J 点上移低于 0.1 mv 者;注射 Pit 24 h 后大鼠心电图未恢复正常者。根据上述标准筛选获得 Pit 敏感大鼠 49 只。随机分为正常对照组(0.9% 生理盐水(NS) 10 mL·kg⁻¹+ NS2.5 mL·kg⁻¹)、缺血

模型组(0.9% NS10 mL·kg⁻¹+ Pit15 u·kg⁻¹) Leo(1, 3, 5, 7, 9 mg·kg⁻¹+ Pit15 u·kg⁻¹) 5 个剂量组,共 7 组,每组 7 只。

1.5.2 心肌缺血模型制备及给药 大鼠分别腹腔注射氯胺酮(50 mg·kg⁻¹)及地西洋(5 mg·kg⁻¹)进行麻醉,仰面固定于手术台上,稳定后记录给药前肢体 II 导联心电图(10 mm·mv⁻¹,50 mm·s⁻¹)。分别按上述设置剂量给药(容量 10 mL·kg⁻¹,ip)。20 min 后,除正常组给予等量 NS 外,其余各组均单次腹腔注射 Pit(15 u·kg⁻¹),复制急性心肌缺血模型。

1.5.3 血样采集 于记录末次心电图后打开腹腔,分离腹主动脉并取动脉血 2 mL,静置 30 min 后,按 3 000 r·min⁻¹ 4℃离心 10 min,分离血清,置于-20℃冰箱保存待测。

1.5.4 心肌匀浆制备 大鼠取血后立即开胸摘取心脏,取左心室游离壁心肌组织,准确称取心肌组织 200 mg,在冰冷的生理盐水中漂洗数次,滤纸吸干,用眼科剪迅速剪碎组织块,按重量体积比 1:9 加入 0.86% 冷生理盐水 1.8 mL 充分研磨,制备成 10% 心肌组织匀浆,按 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液迅速冷冻保存待测。制备心肌组织匀浆全过程在冰水中进行,并在 15 min 内完成。

1.6 指标检测 严格按照试剂盒说明书进行操作,分别用硝酸还原酶法、黄嘌呤氧化酶法及硫代巴比妥酸法测定血清和心肌 NO SOD 活力及 MDA 含量,放射免疫法测定血浆及心肌 ET 含量。

1.7 统计学处理 采用 DAS 2.0 软件,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较,方差齐时用 *t* 检验,方差不齐则用 *t'* 检验;量效关系采用成组直线回归(散点图)分析;显著性水平 *P* = 0.05。

2 结果

2.1 Leo 对 NO 含量的影响 与模型组相比,Leo 能明显提高血清(9 mg·kg⁻¹)和心肌(3, 5, 7, 9 mg·kg⁻¹)NO 含量(*P* < 0.05 或 *P* < 0.01);随着 Leo 剂量增加,NO 含量逐渐提高,并呈剂量依赖性(*r* 分别为 0.386 和 0.738, *P* < 0.05 及 *P* < 0.01)。见表 1。

2.2 Leo 对 ET 含量的影响 与模型组相比,Leo 能明显降低血浆(3, 5, 7, 9 mg·kg⁻¹)及心肌(7, 9 mg·kg⁻¹)ET 含量(*P* < 0.05 或 *P* < 0.01)。随着 Leo 剂量增加,ET 含量逐渐降低,并呈剂量依赖性(*r* 分别为-0.598 和-0.510, *P* < 0.01)。见表 2。

2.3 Leo 对 SOD 活力的影响 与模型组相比,Leo

表 1 Leo 对 Pit 急性心肌缺血大鼠血清和心肌 NO 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量 ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	血清 NO ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	心肌 NO ($\mu\text{mol} \cdot \text{gprot}^{-1}$)
正常组	10 mL	105.36 ± 16.31 ²⁾	7.08 ± 1.64 ²⁾
模型组	10 mL	72.32 ± 21.30	1.79 ± 0.47
Leo 组	1	80.36 ± 13.71	2.68 ± 1.53
	3	78.57 ± 11.89	3.39 ± 1.27 ¹⁾
	5	86.61 ± 19.58	4.93 ± 0.88 ²⁾
	7	92.86 ± 21.48	6.62 ± 1.30 ²⁾
	9	97.32 ± 18.70 ¹⁾	6.43 ± 1.93 ²⁾

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

表 2 Leo 对 Pit 急性心肌缺血大鼠 ET 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量 ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	血浆 ET ($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	心肌 ET ($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)
正常组	10 mL	78.70 ± 12.28 ²⁾	22.69 ± 6.51 ²⁾
模型组	10 mL	139.11 ± 25.35	37.01 ± 7.99
Leo 组	1	120.03 ± 17.51	32.54 ± 3.89
	3	103.14 ± 13.42 ²⁾	29.89 ± 4.18
	5	96.63 ± 18.46 ²⁾	30.73 ± 6.11
	7	85.21 ± 14.15 ²⁾	24.77 ± 7.30 ¹⁾
	9	87.97 ± 16.18 ²⁾	23.07 ± 7.71 ²⁾

能明显提高血清(1, 3, 5, 7, 9 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)和心肌(5, 7, 9 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)SOD 活力($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。随着剂量增加, SOD 活力逐渐提高, 并呈剂量依赖性(r 分别为 0.397 和 0.502, $P < 0.05$ 及 $P < 0.01$)。见表 3。

表 3 Leo 对 Pit 急性心肌缺血大鼠 SOD 活力的影响($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量 ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	血清 SOD ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)	心肌 SOD ($\text{U} \cdot \text{mgprot}^{-1}$)
正常组	10 mL	115.03 ± 5.04 ²⁾	108.12 ± 20.13 ²⁾
模型组	10 mL	84.23 ± 6.56	76.24 ± 16.11
Leo 组	1	102.77 ± 9.22 ²⁾	85.54 ± 10.09
	3	105.91 ± 14.23 ²⁾	84.67 ± 15.32
	5	111.26 ± 6.94 ²⁾	99.20 ± 10.71 ²⁾
	7	109.06 ± 7.06 ²⁾	108.28 ± 26.27 ¹⁾
	9	115.66 ± 10.99 ²⁾	106.36 ± 15.55 ²⁾

2.4 Leo 对 MDA 含量的影响 与模型组相比, Leo 能明显降低血清(5, 7, 9 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)和心肌(5, 7, 9 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)MDA 含量($P < 0.05$ 及 $P < 0.01$)。随着剂量增加, MDA 含量逐渐降低, 并呈剂量依赖性(r 为 -0.409 和 -0.683, $P < 0.05$ 及 $P < 0.01$)。见表 4。

3 讨论

一氧化氮(NO)和内皮素(ET)是一对由血管内皮细胞分泌的具有拮抗效应的生物活性递质, 两者

表 4 Leo 对 Pit 急性心肌缺血大鼠 MDA 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量 ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	血清 MDA ($\text{nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$)	心肌 MDA ($\text{nmol} \cdot \text{mgprot}^{-1}$)
正常组	10 mL	4.08 ± 0.79 ²⁾	1.62 ± 0.33 ²⁾
模型组	10 mL	7.02 ± 1.78	3.65 ± 0.42
Leo 组	1	6.07 ± 0.82	3.54 ± 0.41
	3	5.49 ± 1.39	2.98 ± 0.95
	5	5.09 ± 1.10 ¹⁾	2.66 ± 0.25 ²⁾
	7	5.16 ± 0.80 ¹⁾	2.30 ± 0.52 ²⁾
	9	4.76 ± 0.65 ¹⁾	2.02 ± 0.63 ²⁾

的动态平衡对维持心血管系统稳定的舒张状态及调节冠状动脉基础张力, 改善心肌血流灌注有着重要的作用^[2-4]。本研究发现, 大鼠腹腔注射 pit 后血清及心肌中 NO 含量明显降低, ET 含量明显增加, 与文献报道基本一致^[5-6]。给予益母草碱干预后, NO 水平明显升高, 而 ET 含量显著降低, NO/ET 比例发生逆转; 在一定范围内, 其剂量与 NO 水平呈显著正相关, 与 ET 含量呈显著负相关。提示益母草碱可能通过改善缺血心肌冠状动脉内皮细胞的合成与分泌功能, 促进 NO/ET 比例恢复, 使得内源性血管舒张因子与收缩因子达到新的平衡状态, 从而扩张冠状动脉, 缓解冠脉痉挛状态, 改善微循环, 提高心肌血氧和能量的供应。

本试验发现, 模型组血清和心肌 SOD 活力降低, MDA 含量增加。pit 通过其强烈的缩血管作用, 诱发冠状动脉痉挛性心肌缺血损伤, 从而使氧自由基大量产生, SOD 消耗增加, 活力降低; MDA 生成增加; 氧自由基还可使 NO 灭活^[7]。益母草碱对心肌缺血造成的 SOD 活性降低和 MDA 含量增加有一定的抑制作用; 在一定范围内, 其剂量与 SOD 活力呈显著正相关, 与 MDA 含量呈显著负相关。说明益母草碱可提高体内抗氧化酶活性, 对抗自由基引发的脂质过氧化反应, 改善细胞膜的通透性, 保护结构的完整性, 减少血管舒张因子 NO 的灭活, 避免心肌损伤进一步加重, 保护缺血心肌细胞。

综上所述, 本研究发​​现益母草碱对垂体后叶素引起的大鼠急性心肌缺血具有保护作用; 其作用有一定剂量依赖性。其机制可能与提高内源性保护因子 NO 与 SOD 而降低损伤因子 ET 及 MDA 的含量, 平衡血管舒缩功能, 增强机体抗氧化能力有关。

[参考文献]

- [1] 熊 莺, 杨解人. 益母草碱对大鼠急性心肌缺血损伤心肌肌钙蛋白 T 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(2): 21-24.
- [2] Pepine C. Endothelial dysfunction and its role in the cycle of cardiovascular disease[J]. Can J Cardiol, 1998, 14(Suppl D): 5D-7D.
- [3] Cicek D, Pekdemir H, Camsari A, *et al.* Effects of atrial pacing on coronary sinus endothelin-1 and nitric oxide levels in patients with myocardial bridging[J]. Acta Cardiol, 2004, 59(3): 297-303.
- [4] Stankevicius E, Kevelaitis E, Vainorius E, *et al.* Role of nitric oxide and other endothelium-derived factors [J]. Medicina (Kaunas), 2003, 39(4): 333-341.
- [5] 吴伟康, 周 琳, 孙慧兰. 实验性心肌缺血内皮素的动态变化[J]. 中国病理生理杂志, 2002, 18(5): 501-504.
- [6] 吴伟康, 杨仕云, 刘筱蔼. 心肌缺血时 NO 代谢的动态变化[J]. 中国病理生理杂志, 2002, 18(10): 1258-1261.
- [7] Szocs K. Endothelial dysfunction and reactive oxygen species production in ischemia/reperfusion and nitrate tolerance[J]. Gen Physiol Biophys, 2004, 23(3): 265-295.