

• 药理 •

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

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(Leo)对大鼠急性心肌缺血损伤心肌肌钙蛋白T(cTnT)水平的保护作用。方法: 采用垂体后叶素(Pit)腹腔注射法诱导大鼠急性心肌缺血, 以J点(Δmv)和T波(Δmv)上移幅度评价急性心肌缺血程度; 采用放免法检测血清及心肌cTnT的含量。结果: 益母草碱(3, 5, 7, 9 mg/kg)可防止Pit诱导急性心肌缺血J点及T波的抬高, 并能降低血清和心肌cTnT含量($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 在一定剂量范围内存在量效关系。结论: Leo具有对抗垂体后叶素性急性心肌缺血损伤的作用。

[关键词] 益母草碱; 垂体后叶素; 心肌缺血; 心肌肌钙蛋白T

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2007)02-0021-04

Protective Effect of Leonurine on Acute Myocardial Ischemia Injury in Rats

XIONG Ying, YANG Jie-ren

(Wannan Medical College, Wuhu 241001, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the protective effect of leonurine(Leo) on pituitrin(Pit)-induced acute myocardial ischemia injury in rats. **Methods:** Pit was administrated intraperitoneally to induce acute myocardial ischemia injury in rats. The locomotion of J point(mv) and T wave (mv) in ECG was allowed to evaluate the degree of myocardial ischemia. The content of cardiac troponin T (cTnT) in serum and myocardium was measured by radio immunoassay. **Results:** In Leo(3, 5, 7, 9 mg/kg) groups, the elevation of J point and T wave was lowered. The contents of cTnT in serum and myocardium were obviously decreased. Linear regression analysis(scatterplot) indicated that there is dose-effect relationship within certain dose range. **Conclusions:** Leo can inhibit Pit-induced myocardial ischemia injury, with dose-dependent effect.

[Key words] Leonurine; Pituitrin; Myocardial ischemia; Cardiac troponin T

益母草作为活血化瘀的传统中药, 药理作用主要与其所含的生物碱如益母草碱(Leonurine, Leo)、水苏碱等有关, 其中Leo是重要有效成分。文献报导, Leo 2 mg/kg 静脉给药, 使麻醉猫血压短暂下降^[1];

Leo对苯肾上腺素、KCl及前列腺素F_{2α}(PGF_{2α})预处理的大鼠主动脉环具有舒张作用, 且存在浓度依赖性^[2]; Leo能抑制由二磷酸腺苷诱导的大鼠和兔血小板的聚集, 完整的Leo分子是维持这种活性的基本结构^[3]; 体外降血黏作用显示, Leo可显著降低高血黏患者的全血比黏度^[4]。本课题选用化学合成单体Leo, 观察其对垂体后叶素(pituitrin, Pit)诱发大鼠急性心肌缺血损伤心肌肌钙蛋白T(cTnT)水平的保护作用。

[收稿日期] 2006-02-07

[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

1 材料和方法

1.1 动物 SD大鼠75只,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) °C,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, $C_{14}H_{21}N_3O_5$,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),每支6 u/mL,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;cTnT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 ECG-6511心电图机(上海光电医用电子仪器有限公司);TGL-16G-A低温高速离心机(上海安亭科学仪器厂);GC-911Y放射免疫计数器(科大创新股份有限公司中佳分公司KDC-2042);低温冷冻离心机(科大创新股份有限公司中佳分公司);HY-5回旋振荡器(常州国华电器有限公司);微量加样仪(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,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+ NS 2.5 mL/kg)、缺血模型组(0.9% NS 10 mL/kg+ Pit 15 u/kg)、Leo(1, 3, 5, 7, 9 mg/kg+ Pit 15 u/kg)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及安定5 mg/kg^[5]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, 50 mm/s)。分别按上述设置剂量给药(容量10 mL/kg, 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),复制急性心肌缺血模型,记录Pit注射后1, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 min的心电图。

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 4 °C离心10 min,分离血清,置于-20 °C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

1.6.1 心电图分析 分别测量给药前及给药后各时间段大鼠心电图上J点(QRS波群的终点与ST段交接处, mv)及T波(mv),以给药前后变化值(Δ mv),分析和比较各时间点各组间的心电图变化。

1.6.2 放射免疫法测定血清及心肌cTnT含量 根据双抗体夹心一步法反应原理,严格按照试剂盒说明书进行操作。用 γ 放免计数器测量,经IRMA程序处理后得出待测样品中cTnT含量(pg/mL)。

1.7 数据处理^[6] 采用DAS(ver1.0)软件进行统计学分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,J点及T波组间比较采用给药前后差值均数进行分析;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 实验结果

2.1 Leo对心电图J点的影响 结果见表1。与模型组相比,Leo 3 mg/kg剂量组在20 min,30 min J点上移幅度降低($P < 0.05$);7,9 mg/kg剂量组在20~60 min J点上移幅度明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。随着Leo剂量增加,J点上移幅度逐渐减小。结果表明Leo 3,7,9 mg/kg剂量组可防止缺血心电图J点上移,提示在该剂量范围内Leo可对抗Pit性心肌缺血。

2.2 Leo对T波的影响 结果见表2。与模型组相比,Leo 1 mg/kg(1 min)、Leo 3 mg/kg(1, 20 min)、Leo 5 mg/kg(1, 30 min)、Leo 7 mg/kg(1, 20, 30, 45, 60 min)、Leo 9 mg/kg(1, 5, 20, 30, 45, 60 min)剂量组T波抬高幅度显著下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。随着Leo剂量增加,T波抬高幅度有减小趋势。结果表明Leo各

表1 Leo对Pit急性心肌缺血大鼠心电图J点的影响($\bar{x} \pm s, n=7$)

组别 (mg/kg)	给药后(mv)								
	1min	3min	5min	10min	15min	20min	30min	45min	60min
正常组 (10 mL)	0.071 ± 0.057 (0.014 ± 0.024)	0.086 ± 0.063 (0.014 ± 0.024) ²⁾	0.079 ± 0.064 (0.007 ± 0.035) ²⁾	0.086 ± 0.063 (0.014 ± 0.024) ¹⁾	0.100 ± 0.071 (0.029 ± 0.027) ²⁾	0.079 ± 0.064 (0.007 ± 0.019) ²⁾	0.093 ± 0.073 (0.021 ± 0.027) ²⁾	0.086 ± 0.063 (0.014 ± 0.024) ²⁾	0.093 ± 0.073 (0.021 ± 0.039) ²⁾
模型组 (10 mL)	0.064 ± 0.080 (0.050 ± 0.050)	0.114 ± 0.063 (0.117 ± 0.062)	0.214 ± 0.048 (0.150 ± 0.100)	0.186 ± 0.118 (0.121 ± 0.091)	0.229 ± 0.076 (0.164 ± 0.075)	0.271 ± 0.039 (0.207 ± 0.053)	0.271 ± 0.057 (0.207 ± 0.061)	0.286 ± 0.075 (0.221 ± 0.086)	0.293 ± 0.102 (0.229 ± 0.095)
Leo组 (1)	0.114 ± 0.085 (0.021 ± 0.039)	0.214 ± 0.075 (0.100 ± 0.115)	0.250 ± 0.071 (0.136 ± 0.094)	0.246 ± 0.056 (0.131 ± 0.086)	0.264 ± 0.056 (0.150 ± 0.096)	0.293 ± 0.053 (0.179 ± 0.099)	0.279 ± 0.049 (0.164 ± 0.085)	0.293 ± 0.073 (0.179 ± 0.111)	0.293 ± 0.073 (0.179 ± 0.095)
Leo组 (3)	0.043 ± 0.067 (0.021 ± 0.064)	0.064 ± 0.099 (0.071 ± 0.064)	0.164 ± 0.085 (0.121 ± 0.057)	0.171 ± 0.091 (0.129 ± 0.076)	0.157 ± 0.045 (0.114 ± 0.048)	0.171 ± 0.081 (0.129 ± 0.076) ¹⁾	0.177 ± 0.062 (0.134 ± 0.063) ¹⁾	0.207 ± 0.061 (0.164 ± 0.056)	0.214 ± 0.063 (0.171 ± 0.027)
Leo组 (5)	0.071 ± 0.086 (0.033 ± 0.037)	0.104 ± 0.088 (0.129 ± 0.095)	0.164 ± 0.069 (0.093 ± 0.045)	0.200 ± 0.076 (0.129 ± 0.064)	0.221 ± 0.076 (0.150 ± 0.071)	0.207 ± 0.089 (0.136 ± 0.085)	0.200 ± 0.076 (0.129 ± 0.076)	0.229 ± 0.111 (0.157 ± 0.093)	0.221 ± 0.107 (0.150 ± 0.082)
Leo组 (7)	0.079 ± 0.086 (0.014 ± 0.038)	0.093 ± 0.079 (0.071 ± 0.049)	0.193 ± 0.073 (0.114 ± 0.069)	0.186 ± 0.038 (0.107 ± 0.067)	0.207 ± 0.067 (0.129 ± 0.039)	0.200 ± 0.087 (0.121 ± 0.057) ¹⁾	0.186 ± 0.090 (0.107 ± 0.061) ²⁾	0.193 ± 0.073 (0.114 ± 0.056) ¹⁾	0.186 ± 0.085 (0.107 ± 0.061) ¹⁾
Leo组 (9)	0.071 ± 0.057 (0.021 ± 0.070)	0.093 ± 0.053 (0.050 ± 0.076)	0.171 ± 0.070 (0.100 ± 0.091)	0.164 ± 0.075 (0.093 ± 0.045)	0.171 ± 0.049 (0.100 ± 0.058)	0.167 ± 0.052 (0.096 ± 0.067) ²⁾	0.179 ± 0.064 (0.107 ± 0.067) ¹⁾	0.164 ± 0.063 (0.093 ± 0.035) ²⁾	0.164 ± 0.063 (0.093 ± 0.035) ²⁾

注:括号内数据为给药前后变化值(Δ mv);与模型组相比,¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。(下同)

表2 Leo对Pit急性心肌缺血大鼠心电图T波的影响($\bar{x} \pm s, n=7$)

组别 (mg/kg)	给药后(mv)								
	1min	3min	5min	10min	15min	20min	30min	45min	60min
正常组 (10 mL)	0.164 ± 0.099 (0.021 ± 0.027) ¹⁾	0.186 ± 0.103 (0.021 ± 0.027) ¹⁾	0.186 ± 0.099 (0.021 ± 0.027) ²⁾	0.179 ± 0.076 (0.014 ± 0.024)	0.179 ± 0.107 (0.014 ± 0.024) ²⁾	0.179 ± 0.091 (0.014 ± 0.024) ²⁾	0.193 ± 0.084 (0.029 ± 0.027) ²⁾	0.193 ± 0.067 (0.029 ± 0.039) ²⁾	0.179 ± 0.095 (0.014 ± 0.024) ²⁾
模型组 (10 mL)	0.181 ± 0.051 (0.054 ± 0.036)	0.236 ± 0.048 (0.066 ± 0.036)	0.300 ± 0.041 (0.119 ± 0.056)	0.271 ± 0.141 (0.090 ± 0.125)	0.321 ± 0.086 (0.140 ± 0.087)	0.357 ± 0.073 (0.176 ± 0.066)	0.361 ± 0.085 (0.180 ± 0.069)	0.393 ± 0.084 (0.211 ± 0.084)	0.396 ± 0.106 (0.214 ± 0.108)
Leo组 (1)	0.243 ± 0.084 (-0.007 ± 0.035) ²⁾	0.310 ± 0.077 (0.067 ± 0.090)	0.350 ± 0.100 (0.107 ± 0.084)	0.346 ± 0.085 (0.103 ± 0.037)	0.360 ± 0.074 (0.117 ± 0.066)	0.370 ± 0.073 (0.127 ± 0.065)	0.374 ± 0.053 (0.131 ± 0.061)	0.399 ± 0.065 (0.156 ± 0.083)	0.407 ± 0.053 (0.164 ± 0.069)
Leo组 (3)	0.193 ± 0.067 (0.003 ± 0.051) ¹⁾	0.243 ± 0.093 (0.050 ± 0.050)	0.264 ± 0.090 (0.071 ± 0.057)	0.289 ± 0.080 (0.096 ± 0.062)	0.283 ± 0.069 (0.090 ± 0.029)	0.293 ± 0.061 (0.100 ± 0.058) ¹⁾	0.304 ± 0.072 (0.111 ± 0.053)	0.340 ± 0.067 (0.147 ± 0.037)	0.331 ± 0.063 (0.139 ± 0.035)
Leo组 (5)	0.236 ± 0.080 (0.000 ± 0.000) ²⁾	0.271 ± 0.076 (0.036 ± 0.038)	0.321 ± 0.064 (0.086 ± 0.048)	0.321 ± 0.049 (0.086 ± 0.056)	0.343 ± 0.081 (0.107 ± 0.067)	0.354 ± 0.076 (0.119 ± 0.085)	0.343 ± 0.077 (0.107 ± 0.052) ¹⁾	0.360 ± 0.101 (0.124 ± 0.075)	0.367 ± 0.114 (0.131 ± 0.086)
Leo组 (7)	0.257 ± 0.098 (0.007 ± 0.019) ²⁾	0.264 ± 0.111 (0.043 ± 0.053)	0.329 ± 0.115 (0.071 ± 0.076)	0.321 ± 0.057 (0.064 ± 0.08)	0.350 ± 0.065 (0.093 ± 0.045)	0.336 ± 0.099 (0.079 ± 0.086) ¹⁾	0.349 ± 0.095 (0.091 ± 0.047) ¹⁾	0.357 ± 0.098 (0.100 ± 0.041) ²⁾	0.353 ± 0.089 (0.096 ± 0.031) ¹⁾
Leo组 (9)	0.207 ± 0.045 (-0.014 ± 0.056) ¹⁾	0.193 ± 0.084 (0.014 ± 0.056)	0.257 ± 0.061 (0.050 ± 0.050) ¹⁾	0.264 ± 0.085 (0.057 ± 0.067)	0.279 ± 0.039 (0.071 ± 0.039)	0.286 ± 0.085 (0.079 ± 0.081) ¹⁾	0.293 ± 0.073 (0.086 ± 0.069) ¹⁾	0.286 ± 0.085 (0.079 ± 0.064) ²⁾	0.293 ± 0.073 (0.086 ± 0.063) ¹⁾

剂量组可防止缺血心电图 T 波抬高, 尤以 7 mg/kg 与 9 mg/kg 剂量组较为明显, 提示在该剂量范围内 Leo 可对抗 Pit 性心肌缺血。

2.3 Leo 对 cTnT 含量的影响 结果见表 3。与模型组相比, Leo 组除血清(1, 3 mg/kg)和心肌(1 mg/kg) cTnT 含量无统计意义($P > 0.05$)外, 其余各剂量组血清和心肌升高的 cTnT 含量明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。随着 Leo 剂量增加, cTnT 含量逐渐下降, 并呈剂量依赖性(r 分别为 -0.634 和 -0.609, $P < 0.01$)。提示 Leo 可降低 cTnT 含量, 保护缺血性心肌损伤。

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

组别	剂量 (mg/kg)	血清 cTnT (pg/mL)	心肌 cTnT (pg/mL)
正常组	10 mL	5.08 ± 2.01 ²⁾	215.54 ± 41.01 ²⁾
模型组	10 mL	18.18 ± 4.43	459.31 ± 116.43
Leo 组	1	15.46 ± 4.26	375.92 ± 84.69
Leo 组	3	13.42 ± 4.97	313.45 ± 69.00 ¹⁾
Leo 组	5	11.37 ± 5.49 ¹⁾	251.88 ± 92.87 ²⁾
Leo 组	7	9.47 ± 3.59 ²⁾	236.23 ± 53.43 ²⁾
Leo 组	9	6.06 ± 1.74 ²⁾	212.14 ± 86.63 ²⁾

与模型组相比, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$

3 讨论

垂体后叶素性心肌缺血模型被广泛用于筛选抗心肌缺血药物的研究。本研究证实大鼠腹腔注射垂体后叶素后 3 min, 心电图上即可出现心肌缺血的变化, 表现为 J 点上移, T 波抬高, 持续可达 60 min。这一变化与其所含加压素能强烈地收缩冠状动脉、外周毛细血管和小动脉, 使心肌血液灌注减少, 耗氧量增加, 心肌缺血缺氧急剧加剧有关。用益母草碱(7, 9 mg/kg)腹腔注射进行预处理后, 能明显拮抗垂体后叶素引起的 J 点上移和 T 波抬高, 表明益母草碱具有保护心肌缺血的作用, 其机制可能与其阻断电压依赖性和受体调控性 Ca^{2+} 通道, 抑制细胞外 Ca^{2+} 内流及细胞内 Ca^{2+} 释放, 松弛血管平滑肌^[2], 从而缓解冠脉痉挛, 增加冠脉流量, 改善心肌血氧供应有关。

cTnT 在血液中出现早, 持续时间长, 具有很宽的诊断窗口期, 比其他传统心肌损伤标志物具有更高的灵敏度和特异性, 因此近几年倍受重视, 被认为是一种接近理想的非酶性标记物, 正逐步取代 CK-MB 成为心肌损伤诊断的“金标准”^[7,8]。因此, 本

研究以 cTnT 水平的变化作为心肌损伤的非酶性指标, 反映垂体后叶素急性心肌缺血大鼠的心肌损伤状况。结果表明, 大鼠腹腔注射垂体后叶素后, 不仅在心电图上表现为缺血性改变, 同时血清与心肌 cTnT 含量亦显著增加。当心肌细胞受到可逆性损伤时, 细胞内钙超载及氧自由基大量产生, 钙依赖性蛋白酶破坏细胞骨架, 氧自由基攻击膜磷脂, 细胞膜的完整性遭到破坏, 胞浆中的游离型 cTnT 迅速逸出, 构成短暂而迅速的升高峰。随着缺血继续发展, 结合型 cTnT 可从细肌丝中降解下来, 导致血清 cTnT 持续性升高。而给予益母草碱干预后, 随着剂量增加, cTnT 含量逐渐降低, 并有明显剂量依赖性。提示益母草碱可能通过扩张血管, 对抗垂体后叶素引起的冠脉痉挛, 从而保护缺血心肌细胞, 减少 cTnT 的释放。

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, 并且随着剂量增加, 疗效增强。其机制有待进一步研究。

[参考文献]

[1] 高学敏. 益母草. 中药学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000. 1120.

[2] Chen CX, K wan CY. Endothelium independent vasorelaxation by leonurine, a plant alkaloid purified from Chinese motherwort [J]. Life Sci. 2001; 68(8): 953-960.

[3] 周远鹏, 刘文化, 邵国贤. 益母草碱、丁香酰胍醇及丁香酸氨基醇酯类化合物抗血小板聚集活性及其与结构的关系[J]. 中国药学杂志. 1996, 31(5): 271-274.

[4] 黎就明, 崔虹, 张泳娟. 益母草注射液、益母草碱、水苏碱等对影响离体血标本黏度的观察[J]. 实用中西医结合杂志. 1992, 5(7): 411-412.

[5] 苏定冯. 心血管药理学[M]. 北京: 科学出版社. 2001. 373.

[6] 孙瑞元. 定量药理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1987. 89-149.

[7] Goktekin O, Melek M, Gorenk B, et al. Cardiac troponin T and cardiac enzymes after external transthoracic cardioversion of ventricular arrhythmias in patients with coronary artery disease[J]. Chest. 2002; 122(6): 2050-2054.

[8] Zaricha S, Qamar A, Werdmann M, et al. Value of a single troponin T at the time of presentation as compared to serial CK-MB determinations in patients with suspected myocardial ischemia[J]. Clinica Chimica Acta. 2002; 326: 185-192.