

# 黄蜀葵花总黄酮对心肌缺血再灌注损伤的保护作用研究

李庆林<sup>1\*</sup>, 王成永<sup>1</sup>, 彭代银<sup>1</sup>, 孟刚<sup>2</sup>, 陈志武<sup>2</sup>, 马传庚<sup>2</sup>

(1. 安徽省现代中药重点实验室, 安徽 合肥 230038; 2. 安徽医科大学, 安徽 合肥 230032)

**[摘要]** 目的: 探讨黄蜀葵花总黄酮对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用。方法: 采用大鼠心肌缺血 30min 后再灌注 3.5h 造成心肌缺血再灌注损伤模型, 观察了黄蜀葵花总黄酮对损伤大鼠血清中 CPK 及心肌组织中 MDA, SOD 生成的影响; 对培养的乳鼠心肌细胞采用缺氧和缺氧再给氧造成心肌细胞损伤观察黄蜀葵花总黄酮对 LDH 形成的影响; 并采用 TUNEL 法分析细胞凋亡和采用免疫组化的方法观察药物对与心肌凋亡相关的蛋白 Bcl-2 表达的影响并阐述药物可能的作用机制。结果: 黄蜀葵花总黄酮可以降低损伤心肌组织的 MDA 含量, 提高 SOD 的活力, 抑制血清中 CPK 的生成, 也可以剂量依赖性抑制 LDH 的释放; 减少心肌细胞凋亡的发生率, 增强 Bcl-2 蛋白的表达。结论: 黄蜀葵花总黄酮对心肌缺血再灌注损伤有保护作用, 其作用机制部分可能与抗氧自由基的形成从而抑制细胞凋亡有关。

**[关键词]** 黄蜀葵花总黄酮; 缺血再灌注; 心肌细胞凋亡; Bcl-2

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2006)02-0039-04

## Protective Effects of Total Flavone from the Flowers of *Ablemoschl manihot* L. Medic on the Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury

LI Qing-lin<sup>1</sup>, WANG Cheng-yong<sup>1</sup>, PENG Dai-yin<sup>1</sup>, MENG Gang<sup>2</sup>, CHEN Zhi-wu<sup>2</sup>, MA Chuan-geng<sup>2</sup>

(1. Anhui key laboratory of modernized Chinese material medical, Hefei 230038, China;

2. Anhui Medical University, Hefei 230032, China)

**[Abstract]** **Object:** To study the effects and mechanism of total flavone from the flowers of *Ablemoschl Manihot* L. Medic(Tfa) against myocardium injury induced by ischemia and reperfusion. **Methods:** The ischemia-reperfusion model was induced by after 30 min of coronary occlusion followed by 3.5 h of reperfusion in rats. The creatine phosphokinase(CPK) of serum, the malondialdehyde(MDA) and the superoxide dismutase(SOD) of myocardium were measured. The cell injure model in the cultured neonatal rat cardiomyocytes was induced by anoxia-reoxygenation and remove oxygen and glucose from medium, and the lactate dehydrogenase(LDH) was detected. Apoptosis was determined by terminal deoxy-nucleotidyl transferase-mediated dUTP-digoxigenin nick end-labeling (TUNEL) method and Bcl-2 expression determined by immunohistochemistry method. **Results:** The results showed that Tfa can decreased the MDA contents in myocardium and the production of CPK in serum, improved the SOD activitie; also decreased the number of apoptotic cells and enhanced the Bcl-2 expression in injured rat myocardium by ischemia/reperfusion. Tfa showed it can reduced the release of LDH from injured cardiomyocytes. **Conclusion:** Tfa showed the protective effect against myocardial ischemia and reperfusion injured which might be resist the damaging of oxygen free radical(OFR) and inhibited cardiomyocyte apoptosis.

**[Key words]** Total flavone from the flowers of *Ablemoschl manihut* L. Medic; ischemia/reperfusion; cardiomyocyte apoptosis; Bcl-2

**[收稿日期]** 2005-03-28

**[通讯作者]** 李庆林, Tel: (0551) 5169236; E-mail: qinglin\_lee@hotmail.com

黄蜀葵(*Abelmoschl manihot* L. Medic)为锦葵科秋葵属植物,其花具有清热解毒的功效。黄蜀葵花总黄酮是从黄蜀葵花中提取的活性部位群,其中的主要活性成分为金丝桃苷、槲皮素和槲皮素苷;文献报道已经表明槲皮素、金丝桃苷对心肌缺血损伤有一定保护作用<sup>[1~4]</sup>;我们的研究也表明黄蜀葵花总黄酮可以对抗多种诱因导致的心肌缺血损伤<sup>[5]</sup>。本文对黄蜀葵花总黄酮对心肌损伤的保护作用进行了进一步的研究,并探讨其抗再灌注损伤的可能机制。

## 1 材料

**1.1 药品和试剂** 黄蜀葵花总黄酮(Tfa)为锦葵科秋葵属植物黄蜀葵花的提取物;黄蜀葵花来自安徽皖南地区产植物黄蜀葵春节采摘的花蕾。干燥的黄蜀葵花采用乙醇提取三次,经大孔树脂层析柱分离,洗脱,收集洗脱液,干燥,鉴定,计算得率为 4.9%。以芦丁为定量成分,参照中华人民共和国药典项下的定量方法,总黄酮含量为含量的 60.1%;硝苯地平(Nifedipime, Nif):安徽省药品检验所提供,纯度为 99.4%;DMEM 培养基,胰蛋白酶, Gibco 公司产品;葡萄糖氧化酶,武汉中键科技发展有限公司;连二亚硫酸钠( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ),宜兴市化学制剂三厂;小牛血清,杭州四季青生物工程公司产品;TUNEL 法细胞凋亡检测试剂盒,进口分装,购自南京建成生物工程研究所;Bcl-2 鼠抗人单克隆抗体,购自福州迈新生物技术公司;生物素化山羊二抗,辣根酶标记链霉素购自华美生物工程公司;MDA、CPK、SOD、LDH 试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

**1.2 实验动物** Sprague-Dawley (SD) 大鼠, ♂, 体重  $270 \pm 30\text{g}$ ; SD 大鼠乳鼠, 出生 2~3d; 由安徽医科大学实验动物中心提供。

## 2 实验方法

**2.1 大鼠心肌缺血再灌注损伤模型的建立** SD 大鼠, 随机分为以下各组: 假手术组, 阳性对照组(Nif,  $2\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ); Tfa( $100\text{--}200\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 组, 各组均 ip 给药, 给药前心电图 ECG (LII) 监测心脏活动, 连续给药 3d, 于第 3d 给药后 30 min, 乌拉坦( $1\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 麻醉, 冠状动脉左前降支行可逆性结扎, 先缺血 30 min, 再恢复灌注 3.5 h, 实验结束后动物取血, 摘取心脏分为数份: 其中一份去除心房组织, 称重、剪碎, 以 20 倍量的缓冲液[含  $0.25\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  蔗糖,  $0.5\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  EDTA,  $10\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸缓冲液(pH = 7.4, 由  $1.36\text{g}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$  +  $0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaOH 79mL 加水至 200mL 配制

而成)]为介质,用组织匀浆器制备心肌匀浆,采用 Lowry 法行蛋白质定量后作 SOD、MDA 指标的检测;另一部分经 4% 甲醛固定后作 Bcl-2 免疫组织化学染色和 TUNEL 法染色检测。

**2.2 TUNEL 法检测凋亡的心肌细胞<sup>[6]</sup>** 将大鼠心脏用 4% 甲醛固定 24 h 后,脱水包埋,制成石蜡切片,然后脱蜡再水合。将脱蜡再水合的切片进行微波增透,蛋白酶 K( $20\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 中进行消化;然后切片进行内源性过氧化物酶阻断,再用 TUNEL 反应混合液进行标记,加以 TBS 1:100 稀释的链酶亲合素-生物素-过氧化物酶复合物(SABC),  $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、60 min, 取出,磷酸盐缓冲液(PBS)洗  $3\text{min} \times 2$  次,加入 3,3'-二氨基联苯胺盐酸盐(DAB)进行显色,最后用甲基绿复染,中性树脂封片,倒置显微镜下镜检。凋亡的心肌细胞在镜下显示为细胞核呈棕褐色,在高倍镜下选取 10 个视野进行计数,计算呈阳性反应的细胞数占细胞总数的平均百分比,进行组间比较。

**2.3 Bcl-2 表达的检测<sup>[7]</sup>** 按试剂盒说明书操作,对切片进行常规免疫组化检测。切片经高压煮沸法修复抗原,加入 Bcl-2 单抗  $37\text{ }^\circ\text{C}$  孵育 1h, PBS 洗涤,然后加入生物素化二抗-辣根酶标记链霉素;用过氧化氢/DAB 混合液染色,根据镜下胞浆或胞膜着黄色的为 Bcl-2 表达阳性,以观察 10 个视野阳性细胞着色强度作为指标,无显色的定为阴性(-),低于 20% 的为(+),高于 20% 为(++),然后比较。

**2.4 乳鼠心肌细胞的培养** 取出生 2~3d 的 SD 大鼠乳鼠数只,常规消毒胸腹部,解剖胸腔,在无菌条件下分离出心脏,取心室,用 pH 7.2~7.4 的 Hank's 液( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ : NaCl 130, KCl 4.0,  $\text{CaCl}_2$  1.8,  $\text{MgCl}_2$  0.5, Glucosell, HEPES 30)洗涤 3 次,剪碎成约  $1\text{mm}^3$  左右的小块,先用 0.125% 胰酶  $37\text{ }^\circ\text{C}$  消化 10min, 弃消化液,再用 0.25% 胰酶  $37\text{ }^\circ\text{C}$  消化 30min, Hank's 液洗涤 3 次,滴管吹打至细胞分散。用 DMEM 生长液(含 20% 小牛血清)调整细胞浓度为  $2 \times 10^6/\text{mL}$ , 加入细胞培养瓶中,  $37\text{ }^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  温箱中培养 4h 后,弃贴壁细胞,未贴壁细胞用台盼蓝染色观察细胞的成活率,达到 95% 以上后再将细胞悬液加至 96 孔细胞培养板,每孔 100 $\mu\text{L}$ ,置  $37\text{ }^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  温箱中培养,次日换液,以后每 2~3 天换液一次,继续培养至 7d。

**2.5 缺糖缺氧损伤和缺氧再给氧损伤模型的建立<sup>[8,9]</sup>** 取培养 7d 的心肌细胞,药物作用 24h 后,再将培养基换成连二亚硫酸钠配制成浓度为  $5\text{mmol} \cdot$

L<sup>-1</sup> 的无糖 Hank's 液, 对心肌细胞继续进行培养 6h 和 9h, 造成心肌细胞的缺糖缺氧损伤模型; 给药组用无糖 Hank's 液稀释药物, 终浓度分别为 Tfa (10、30、100mg·L<sup>-1</sup>, 药物用 DMSO 进行溶解, DMSO 的终浓度为 0.2%); Nif (5.0 μmol·L<sup>-1</sup>)。在换用培养液 37℃ 孵育 6h、9h 时, 分别取培养上清液 50 μL 进行 LDH 测定。

培养的心肌细胞在缺糖缺氧 6h、9h 后, 再换成 DMEM 培养基以 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 温箱中继续培养 24h, 造成心肌细胞的缺氧-再给氧损伤模型, 按上法同样进行药物处理, 再分别取培养上清液 50 μL 用酶联检测仪在 490nm 处测定吸收度 (A) 值, 然后计算 LDH 的含量。

**2.6 统计学处理** 实验数据均用均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 统计方法采用 F 测定法, 进行组间差异的显著性分析; 对质反应资料采用 X<sup>2</sup> 检验分析。

### 3 结果

**3.1 Tfa 对缺血再灌注损伤大鼠血清和心肌组织中 MDA、CPK、SOD 影响** 结果见表 1。模型组心肌组织中 MDA 含量明显高于假手术组, 而 SOD 的活力显著降低, 血清 CPK 含量明显升高, 与假手术组比较均有显著性差异。表明缺血再灌后, 一些与心肌损伤相关的指标发生了明显的改变。Tfa 能够减少心肌中 MDA 的生成, 提高缺血再灌组织中 SOD 活力, 抑制血清中 CPK 的生成。特别是 Tfa 200mg·kg<sup>-1</sup> 剂量组效果显著。结果提示 Tfa 对大鼠心肌缺血再灌注损伤有保护作用。

表 1 Tfa ip 给药 3d 对缺血再灌注大鼠心肌中 SOD 和 MDA 含量以及血清中 CPK 生成的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	给药剂量/ mg·kg <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>	n	MDA 含量/ (μmol/g pro)	SOD 活性/ (10 <sup>3</sup> μg/g pro)	CPK (IU/mL 血清)
假手术组	—	6	0.79 ± 0.19 <sup>2)</sup>	74.4 ± 13.3 <sup>2)</sup>	74.6 ± 8.6 <sup>2)</sup>
模型组	—	7	2.33 ± 1.01	52.3 ± 9.2	115.2 ± 20.3
Nif	2	5	0.86 ± 0.13 <sup>2)</sup>	69.8 ± 8.8 <sup>2)</sup>	83.2 ± 11.5 <sup>2)</sup>
Tfa	100	5	1.34 ± 0.32	64.6 ± 17.3	90.1 ± 14.8 <sup>1)</sup>
	200	5	1.21 ± 0.28 <sup>1)</sup>	70.8 ± 10.2 <sup>2)</sup>	80.5 ± 16.0 <sup>2)</sup>

注: 与模型组比较: <sup>1)</sup> P < 0.05, <sup>2)</sup> P < 0.01。下同

**3.2 Tfa 对缺血再灌注损伤大鼠心肌细胞凋亡的影响** 结果见表 2。假手术组仅见少量的心肌细胞发生凋亡, 而模型组在所有的视野中均有大量的凋亡细胞存在; Tfa 有效的抑制心肌细胞凋亡的发生, 100、200mg/kg 剂量组的抑制率分别为 48.3%,

78.0% (P < 0.05, P < 0.01)。表明 Tfa 可抑制心肌组织中凋亡的发生。

**3.3 Tfa 对凋亡基因 Bcl-2 表达的影响** 结果见表 3。假手术组心肌组织中未见有明显的 Bcl-2 的表达, 而模型组中 Bcl-2 蛋白有一定的表达, Tfa 干预可以上调 Bcl-2 的表达, 提示 Tfa 可能对心肌细胞凋亡的抑凋亡基因表达有一定的影响。

表 2 Tfa ip 给药 3d 对缺血再灌注大鼠心肌中凋亡细胞生成的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	给药剂量/ mg·kg <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>	n	凋亡细胞数 (%)	抑制率 (%)
假手术组	—	6	0.2 ± 0.2 <sup>2)</sup>	—
模型组	—	7	22.7 ± 7.4	—
Nif	2	5	10.3 ± 1.9 <sup>1)</sup>	54.5
Tfa	100	5	11.7 ± 4.2 <sup>1)</sup>	48.3
	200	5	5.0 ± 1.5 <sup>2)</sup>	78.0

表 3 Tfa ip 给药 3d 对心肌细胞凋亡相关基因 Bcl-2 表达的影响

组别	n	给药剂量 (mg·kg <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> )	Bcl-2			总表达率 (%)
			-	+	++	
假手术组	6	—	5	1	0	0
模型组	7	—	4	2	1	42.8
Nif	5	2	1	1	3	80
Tfa	5	100	1	2	2	80
	5	200	1	0	4	80

**3.4 Tfa 对损伤心肌细胞的保护作用** 结果见表 4。心肌细胞缺糖缺氧和缺氧再给氧均能造成心肌细胞损伤, 培养液中 LDH 的生成增加, 而 Tfa 给药可以减少 LDH 的形成, 保护心肌细胞。

表 4 Tfa 对培养的乳鼠心肌细胞 LDH 形成的影响 ( $\bar{x} \pm s$ , n = 8)

组别	剂量	LDH (U/L)		LDH (U/L)	
		缺糖缺氧损伤组		缺氧再给氧损伤组	
		6h	9h	6h	9h
模型组	—	112.5 ± 17.3	137.6 ± 28.4	100.0 ± 16.3	126.7 ± 24.2
空白组	—	37.2 ± 10.4 <sup>2)</sup>	43.8 ± 8.0 <sup>2)</sup>	37.5 ± 6.1 <sup>2)</sup>	42.8 ± 7.2 <sup>2)</sup>
Tfa	10mg·L <sup>-1</sup>	76.6 ± 11.8 <sup>2)</sup>	109.8 ± 20.4 <sup>1)</sup>	84.5 ± 16.0	113.4 ± 22.1
	30mg·L <sup>-1</sup>	65.8 ± 9.1 <sup>2)</sup>	85.5 ± 11.3 <sup>2)</sup>	67.8 ± 10.1 <sup>2)</sup>	98.5 ± 15.8 <sup>1)</sup>
	100mg·L <sup>-1</sup>	52.1 ± 7.7 <sup>2)</sup>	64.7 ± 9.0 <sup>2)</sup>	51.9 ± 9.4 <sup>2)</sup>	65.3 ± 13.2 <sup>2)</sup>
Nif	5.0 μmol·L <sup>-1</sup>	60.8 ± 10.5 <sup>2)</sup>	85.7 ± 8.9 <sup>2)</sup>	68.7 ± 14.2 <sup>2)</sup>	63.2 ± 16.1 <sup>2)</sup>

### 4 讨论

大量的研究表明, 缺血再灌注所致心肌细胞死亡是缺血性心脏病最严重的损伤类型; 在心肌缺血再灌注过程中, 由于心肌的局部缺血缺氧, 导致了超

氧阴离子自由基的生成;在再灌注过程中氧气供应充足,大量的自由基产生,如  $O_2^{\cdot-}$ ,  $OH^{\cdot-}$ , 这些自由基进攻细胞成分,造成心肌细胞的损伤和心肌细胞凋亡<sup>[10]</sup>。

本实验采用结扎大鼠的冠状动脉缺血 30min 再灌注 3.5h,结果显示模型组动物心肌组织中 MDA 大量形成,血清中 CPK 生成显著增加,心肌细胞的凋亡指数上升;而 SOD 的生成减少。连二亚硫酸钠是氧清除剂,它能清除培养基中的氧,在短时间内即可造成细胞缺氧损伤;我们选择以连二亚硫酸钠造成心肌细胞的缺氧及再给氧损伤模型,结果表明连二亚硫酸钠可以诱导细胞培养液中 LDH 的大量形成。Bcl-2 作为一种抗凋亡的基因,其过表达可以抑制自由基引起的细胞损伤和凋亡。本研究表明缺血再灌注后,心肌发生损伤,心肌细胞凋亡增加,而给药后心肌细胞 Bcl-2 的表达增加;而黄蜀葵花总黄酮是一类黄酮类活性部位群,其清除自由基的活性已初步证实。本研究在此心肌损伤模型中显示了黄蜀葵花总黄酮可以减少心肌组织中 MDA 生成,提高 SOD 的活力,抑制 LDH 的形成,减少血清中 CPK 的释放,有效抑制了心肌细胞凋亡的发生;从而表现了保护损伤心肌的作用。因此,我们认为黄蜀葵花总黄酮抗心肌损伤以及抑制心肌细胞凋亡的作用机制可能与其抗自由基的形成,同时通过诱导相关抗凋亡蛋白的过表达,发挥了保护心肌的功效。

#### [参考文献]

[1] Wang WQ, Ma CG, Xu SY, et al. Protective effect of hyperin

against myocardial ischemia and reperfusion injury[J]. *Acta Pharmacol Sin.*, 1996, 17(4): 341.

- [2] 李庆林,孟刚,陈志武,等.金丝桃苷对心肌缺血损伤的保护作用[J].安徽医科大学学报,2001,36(1):15.
- [3] 李庆林,CHOU 桂新,陈志武,等.金丝桃苷抑制大鼠心肌缺血再灌注损伤引起的细胞凋亡作用的机制[J].药学报,2002,37(11):849.
- [4] 李庆林,CHOU 桂新,陈志武,等.金丝桃苷对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J].中国药理学杂志,2002,37(11):829.
- [5] 李庆林,陈志武,马传庚.黄蜀葵花总黄酮对心肌损伤的保护作用和机制[J].中国药理学通报,2001,17(4):466.
- [6] Hollv TA, Drincic A, Bvun Y, et al. Caspase inhibition reduces myocyte cell death induced by myocardial ischemia and reperfusion in vivo[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1999, 31(9): 1709.
- [7] 彭黎明,王曾礼.细胞凋亡的基础和临床[M].北京:人民卫生出版社,2000.205.
- [8] Salvaterra CG, Goldman WF. Acute hypoxia increases cytosolic calcium in cultured pulmonary arterial myocytes [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 1993, 264: 323.
- [9] Pan Z, Perez polo R. Role of nerve growth factor in oxidant homeostasis: glutathione metabolism[J]. *J Neurochem*, 1993, 61: 1713.
- [10] Richter C. Pro-oxidants and mitochondrial  $Ca^{2+}$ : their relationship to apoptosis and oncogenesis[J]. *FEBS Lett.*, 1993, 325(1-2): 104.