

芒果苷对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及其机制研究

徐 丽¹, 张元媛¹, 曹军平^{2*}

1. 武警总医院 药剂科, 北京 100039

2. 武警总医院 消毒供应科, 北京 100039

摘要: **目的** 探讨芒果苷(MGF)预处理对大鼠心肌缺血再灌注(MI/R)损伤的保护作用及机制。**方法** SD大鼠随机分为5组,即假手术组、模型组和MGF高、中、低剂量(40、20、10 mg/kg)组,采用结扎左冠脉前降支30 min再灌注2 h的方法制备大鼠MI/R损伤模型,于术前7 d开始ig给药。采用比色法测定血清肌酸激酶(CK)和乳酸脱氢酶(LDH)活性,ELISA法测定血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-1 β (IL-1 β)水平;染色法测定心肌梗死面积(MIS);取心肌匀浆,比色法测定髓过氧化物酶(MPO)活性。**结果** 与模型组比较,MGF高、中剂量组MIS、血清LDH活性显著降低($P < 0.05$);MGF各剂量组血清CK活性、血清TNF- α 和IL-1 β 水平、心肌MPO活性明显降低($P < 0.05, 0.01$)。**结论** MGF预处理通过抑制中性粒细胞浸润,下调TNF- α 和IL-1 β 表达,抑制炎症反应,发挥对MI/R所致心肌损伤的保护作用。

关键词: 芒果苷; 心肌缺血再灌注损伤; 肿瘤坏死因子- α ; 白介素-1 β ; 髓过氧化物酶

中图分类号: R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2016)02-0198-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2016.02.008

Cardioprotective effects of mangiferin against myocardial ischemia/reperfusion injury in rats

XU Li¹, ZHANG Yuan-yuan¹, CAO Jun-ping²

1. Department of Pharmacy, General Hospital of Armed Police Forces, Beijing 100039, China

2. Department of Sterilization and Supply, General Hospital of Armed Police Forces, Beijing 100039, China

Abstract: Objective To investigate the protective effects of mangiferin (MGF) against myocardial ischemia/reperfusion (MI/R) injury in rats. **Methods** Rat model of MI/R injury was established by coronary artery ligation for 30 min followed by 2 h reperfusion. Rats were divided randomly into five groups: Sham group, model group, MGF 10, 20, and 40 mg/kg group. MGF was ig administered once daily for 7 d pre-operation. The CK and LDH activities in sera were detected by chromatometry and the levels of TNF- α and IL-1 β in sera were examined by ELISA after reperfusion. The myocardial infarction size (MIS) was measured by NBT staining. The MPO activity, an index of neutrophil infiltration in heart homogenate, was determined by chromatometry. **Results** MGF (40 and 20 mg/kg) significantly reduced MIS and LDH activities comparing to that of model group ($P < 0.05$). The activity of CK in sera and MPO in heart homogenate, the levels of IL-1 β and TNF- α in sera, in all MGF groups were significantly lower than those of model group ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** The myocardial protection of MGF pretreatment in MI/R injury appears to be associated with the inhibition of neutrophil infiltration, expression of TNF- α and IL-1 β and inflammatory response.

Key words: mangiferin; myocardial ischemia/reperfusion injury; TNF- α ; IL-1 β ; MPO

芒果苷(mangiferin, MGF)属双苯吡酮类化合物,存在于多种植物中,具有广泛的生物学活性和药用价值,如平喘祛痰、抗病毒、抗炎、抗氧化、抗肿瘤、免疫调节等^[1-3],在医药、保健领域的应用前景广阔。近年来研究证实,MGF对心肌缺血再灌注(myocardial ischemia/reperfusion, MI/R)损伤具

有保护效应^[4-5],但是机制未明。本研究应用MI/R损伤大鼠模型,以炎症细胞因子为切入点,探讨MGF心肌保护作用机制。

1 材料

1.1 动物

清洁级SD大鼠,雌雄各半,体质量(200±20)

收稿日期: 2015-12-18

作者简介: 徐 丽(1985—),女,本科,主管药师,研究方向为天然药物与心脑血管病防治。

*通信作者: 曹军平,本科,主管药师,研究方向为天然药物与心脑血管病防治。E-mail: libin@cicete.org

g, 由河北医科大学实验动物中心提供, 许可证号 SCXK (冀) 2008-1-003。

1.2 药品和主要试剂

MGF, 质量分数 $\geq 98\%$, 购自 Sigma 公司, 批号 8420-201002, 以 2% 聚山梨酯 80 溶解, 用 0.5% 羧甲基纤维素钠配成所需浓度; 氯化硝基四氮唑蓝 (NBT)、髓过氧化物酶 (MPO)、肌酸激酶 (CK)、乳酸脱氢酶 (LDH) 试剂盒, 均购自南京建成生物工程研究所; 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β) ELISA 检测试剂盒, 均购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.3 主要仪器

DW-3000 型动物人工呼吸机, 安徽省淮北正华生物仪器设备有限公司; ECG-1350P 型十二导联心电图机, 日本光电工业株式会社; UV-1700 型紫外-可见分光光度计, 日本岛津公司; Multiskan MK3 型酶标仪, 美国 Thermo 公司。

2 方法

2.1 MI/R 损伤大鼠模型的制备

采用冠脉结扎手术造模, 参照文献^[6-7]方法并加以改进。大鼠术前 12 h 禁食不禁水, 麻醉后仰位固定, 四肢连接 ECG-1350P 型十二导联心电图机。颈部做气管插管, 连接 DW-3000 型动物人工呼吸机 (潮气量 20 mL/kg, 呼吸频率 60 次/min)。于胸骨左旁第 3、4 肋间开胸, 并撑开肋骨, 使心脏暴露出来, 用带线缝合针沿左心耳下缘冠脉前降支起始部约 4 mm 处穿过, 进针深度控制在约 1 mm, 置一段直径 1.5 mm 的乳胶管于缝合线下, 结扎缝合线以造成心肌缺血。缺血 30 min 左右观察到心电图 T 波高耸或 ST 段明显抬高后, 松开缝合线再灌注 2 h (观察到高耸的 T 波下降或抬高的 ST 段下降 1/2 以上即标志再灌注成功)。

2.2 分组及给药

将大鼠随机分为假手术组、模型组和 MGF 高、中、低剂量 (40、20、10 mg/kg) 组^[4], 于术前 7 d 开始 ig 给药, 每天 1 次, 假手术组和模型组给予等体积溶媒。除假手术组, 术后各组均抽取成模大鼠 10 只进行后续实验。假手术组只开胸不结扎冠脉。

2.3 血清 CK 和 LDH 活性、炎症细胞因子水平的测定

再灌注结束后, 各组大鼠经腹主动脉采血, 2 500 r/min 离心 10 min, 分离血清, 检测血清中 CK 和 LDH 活性, 具体步骤严格按照试剂盒说明书进行,

比色法测定分光光度计 660 和 440 nm 处吸光度 (A) 值, 计算 CK 和 LDH 活性; ELISA 法酶标仪下检测 TNF- α 和 IL-1 β 的表达水平, 具体步骤按试剂盒说明书进行。

2.4 心肌梗死面积 (myocardial infarction size, MIS) 的测定

采血后取心脏, 磷酸缓冲液 (PBS) 清洗后, 去除心房、血管及脂肪组织, 在冠脉结扎线下, 从心尖起将心室平行切成厚度相等的 5 片, 放入 0.1% NBT 溶液中, 37 °C 染色 15 min。梗死心肌呈灰白色, 正常心肌则呈蓝色, 用数码相机进行图像采集后, 通过软件 ImagePro Plus 7.0 测算梗死区面积和心室总面积, 计算 MIS^[8]。

$$\text{MIS} = \text{梗死区面积} / \text{心室总面积}$$

2.5 心肌 MPO 活性的测定

取部分心脏, 生理盐水清洗后, 应用自动匀浆机制成匀浆, 3 500 r/min 离心 10 min 取上清。检测 MPO 活性, 具体步骤按试剂盒说明书进行, 比色法测定分光光度计 460 nm 处 A 值, 计算 MPO 活性。

2.6 统计学分析

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 18.0 软件进行统计处理, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD- t 检验。

3 结果

3.1 对 MIS 的影响

假手术组 MIS 为 0, 未纳入统计学比较; 模型组大鼠 MIS 达 36.25%, MGF 高、中剂量组可分别使 MIS 缩小至 32.02%、32.44%, 与模型组比较, 差异显著 ($P < 0.05$)。结果见表 1。

3.2 对血清 CK 和 LDH 活性、炎症细胞因子水平的影响

冠脉结扎 30 min 再灌注 2 h 后, 模型组大鼠血

表 1 MGF 对 MI/R 损伤大鼠 MIS 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 1 Effects of MGF on myocardial infarction size in rats with MI/R injury ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	MIS/%
假手术	—	0.00 $\pm$ 0.00
模型	—	36.25 $\pm$ 3.06
MGF	10	33.17 $\pm$ 3.98
	20	32.44 $\pm$ 3.69 [#]
	40	32.02 $\pm$ 2.35 [#]

与模型组比较: [#] $P < 0.05$

[#] $P < 0.05$ vs model group

清 CK 和 LDH 活性、TNF- α 和 IL-1 β 水平明显升高,与假手术组比较,差异显著 ($P < 0.01$); MGF 各剂量组均显著降低 CK 活性、TNF- α 和 IL-1 β 水平,高、中剂量组显著降低 LDH 活性,与模型组比较,差异显著 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结果见表 2。

表 2 MGF 对血清 CK 和 LDH 活性、TNF- α 和 IL-1 β 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 2 Effects of MGF on serum CK and LDH activities and TNF- α and IL-1 β levels in rats with MI/R injury ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	CK/(U·L ⁻¹)	LDH/(U·L ⁻¹)	TNF- α /(ng·L ⁻¹)	IL-1 β /(ng·L ⁻¹)
假手术	—	380.02 $\pm$ 99.53	810.66 $\pm$ 102.17	34.59 $\pm$ 4.12	13.76 $\pm$ 2.55
模型	—	1137.26 $\pm$ 153.40**	2345.82 $\pm$ 750.34**	160.25 $\pm$ 29.70*	56.80 $\pm$ 10.03*
MGF	10	907.31 $\pm$ 214.58 [#]	1802.39 $\pm$ 890.21	128.01 $\pm$ 31.22 [#]	45.11 $\pm$ 7.24 ^{##}
	20	899.20 $\pm$ 190.34 [#]	1722.54 $\pm$ 530.70 [#]	119.36 $\pm$ 20.74 ^{##}	41.96 $\pm$ 8.98 ^{##}
	40	848.65 $\pm$ 140.22 ^{##}	1669.43 $\pm$ 602.25 [#]	116.87 $\pm$ 19.83 ^{##}	42.18 $\pm$ 5.37 ^{##}

与假手术组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs sham group; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs model group

表 3 MGF 对心肌 MPO 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 3 Effects of MGF on myocardial MPO activities in rats with MI/R injury ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	MPO/(U·g ⁻¹)
假手术	—	19.63 $\pm$ 3.75
模型	—	121.48 $\pm$ 16.20**
MGF	10	99.57 $\pm$ 20.03 [#]
	20	91.02 $\pm$ 28.14 [#]
	40	84.25 $\pm$ 10.96 ^{##}

与假手术组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs sham group; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs model group

4 讨论

以中性粒细胞浸润为主的炎症反应是造成 MI/R 损伤的重要因素之一^[9], MI/R 发生时, 激活的中性粒细胞聚集到心肌组织, 通过一系列病理机制造成心肌细胞损伤和功能丧失, 如: 释放炎症介质、细胞毒性产物, 直接损伤心肌; 黏附于微循环, 阻塞毛细血管, 造成“无复流现象”; 释放氧自由基, 增强脂质过氧化反应, 导致内皮细胞功能障碍等^[10]。对大鼠 MI/R 心肌组织的中性粒细胞进行定量分析, 发现其水平较正常心肌组织显著升高, 且在再灌注 2 h 时达到峰值^[11]。研究证实抑制中性粒细胞浸润能显著降低 MI/R 损伤程度, 抗中性粒细胞治疗有可能成为防治 MI/R 的有效措施^[12]。MPO 酶为中性粒细胞所特有, 通过分析该酶的活性, 可判断中性粒细胞浸润的程度。本研究结果表明缺血再灌注后 MPO 活性显著升高, 提示中性粒细胞浸润明显; MGF 可使心肌 MPO 活性明显下降, 结合 MGF 显

3.3 对心肌 MPO 活性的影响

模型组大鼠心肌 MPO 活性显著升高, 与假手术组比较, 差异显著 ($P < 0.01$); MGF 各剂量组心肌 MPO 活性明显降低, 与模型组比较, 差异显著 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结果见表 3。

著缩小 MIS 的实验结果, 提示 MGF 可能通过抑制心肌内中性粒细胞浸润、减轻炎症反应来保护受损的心肌组织。

CK 和 LDH 是存在于心肌细胞中的蛋白酶, 当 MI/R 导致心肌细胞受损或坏死时, 释放量增加, 其释放入血的多少被认为与心肌坏死程度呈正相关^[13], 因此, 血清中 CK 和 LDH 水平可以作为反映 MI/R 损伤程度的诊断标准之一^[14]。本研究结果表明 MGF (10、20、40 mg/kg) 预处理可显著降低血清 CK 活性, MGF 高、中剂量组可明显降低 LDH 活性, 提示 MGF 可通过提高细胞膜的稳定性而发挥心肌保护作用。

TNF- α 是 MI/R 炎症连锁反应中的一个关键性介质, 心肌细胞在缺血再灌注的刺激下可合成和分泌大量的 TNF- α ^[15]。TNF- α 本身具有细胞毒作用, 可通过不同途径导致心肌细胞受损, 甚至溶解、死亡; TNF- α 能刺激血管内皮细胞和中性粒细胞表达黏附分子, 反过来黏附分子又促进中性粒细胞聚集并释放活性氧和蛋白水解酶等物质, 导致心肌微血管阻塞, 加重 MI/R 心肌损伤的程度^[16]。研究发现大鼠 MI/R 损伤早期心肌组织及血清中 TNF- α 明显表达, 峰值出现在再灌注 2~4 h^[17]。IL-1 β 作为一种急性炎症因子, 广泛参与感染、应激及缺血再灌注等过程。IL-1 β 处于炎症级联反应上游, MI/R 损伤早期即有 IL-1 β 产生^[18]; IL-1 β 同样能刺激血管内皮细胞表达黏附分子, 加重缺血组织的炎症反应; 抑制 IL-1 β 的产生和释放, 则可减轻 MI/R 损伤程度^[19]。朱俊超等^[20]研究发现, MI/R 损伤大鼠海马内 IL-1 β

蛋白表达增多,可在再灌注后持续数天。在大鼠MI/R模型中应用脂质体转染过表达IL-1 β 受体拮抗剂,可减轻心肌组织的炎症浸润和细胞凋亡^[21],从另一个角度证明了IL-1 β 参与MI/R过程中的炎症反应和心肌细胞凋亡。本研究结果表明,冠脉结扎30 min再灌注2 h后,血清TNF- α 和IL-1 β 水平明显升高,提示这些炎性细胞因子参与了MI/R损伤过程,加重了心肌组织的灌注障碍;经MGF预处理,各剂量组均能降低血清TNF- α 和IL-1 β 水平,提示MGF预处理可减少炎性细胞因子的生成,抑制炎症反应。

总之,MGF预处理对MI/R损伤的心肌保护作用是通过减少中性粒细胞浸润,下调TNF- α 和IL-1 β 表达,缓解MI/R过程中的炎症反应等途径实现的。

参考文献

- [1] Vyas A, Syeda K, Ahmad A, *et al.* Perspectives on medicinal properties of mangiferin [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2012, 12(5): 412-425.
- [2] Telang M, Dhulap S, Mandhare A, *et al.* Therapeutic and cosmetic applications of mangiferin: a patent review [J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2013, 23(12): 1561-1580.
- [3] Wei Z Q, Deng J G, Yan, L. Pharmacological effects of Mangiferin [J]. *Chin Herb Med*, 2011, 3(4): 262-267.
- [4] 王超, 王国贤. 芒果苷对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008, 16(9): 697-700.
- [5] Zheng D, Hou J, Xiao Y, *et al.* Cardioprotective effect of mangiferin on left ventricular remodeling in rats [J]. *Pharmacology*, 2012, 90(1-2): 78-87.
- [6] 刘新义, 李健和, 向大雄, 等. 聚乙二醇化葛根素对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. *中草药*, 2013, 44(3): 327-330.
- [7] 春玉虎, 党宏伟, 闫业军. 番茄红素对大鼠心脏缺血再灌注的保护作用及其机制研究 [J]. *现代药物与临床*, 2014, 29(9): 974-979.
- [8] 杨建业, 张迎春, 唐俊明, 等. 大鼠心肌缺血再灌注后心功能变化与心肌梗死面积的相关性分析 [J]. *实验动物与比较医学*, 2008, 28(1): 4-9.
- [9] Goldmann B U, Rudolph V, Rudolph T K, *et al.* Neutrophil activation precedes myocardial injury in patients with acute myocardial infarction [J]. *Free Radic Biol Med*, 2009, 47(1): 79-83.
- [10] Saeed S A, Waqar M A, Zubairi A J, *et al.* Myocardial ischaemia and reperfusion injury: reactive oxygen species and the role of neutrophil [J]. *J Coll Physicians Surg Pak*, 2005, 15(8): 507-514.
- [11] 吴志峰, 余伯阳, 朱丹妮, 等. 大鼠心肌缺血再灌注模型中中性粒细胞与心肌损伤程度的相关性研究 [J]. *中国药科大学学报*, 2002, 33(3): 231-233.
- [12] Al-Amran F, Shahkolahi M. Oxytocin ameliorates the immediate myocardial injury in rat heart transplant through downregulation of neutrophil-dependent myocardial apoptosis [J]. *Transplant Proc*, 2013, 45(6): 2506-2512.
- [13] Quan W, Yin Y, Xi M, *et al.* Antioxidant properties of magnesium lithospermate B contribute to the cardioprotection against myocardial ischemia/reperfusion injury in vivo and in vitro [J]. *J Tradit Chin Med*, 2013, 33(1): 85-91.
- [14] Nakai K, Nakai K, Suwabe A. Biochemical marker for myocardial injury [J]. *Rinsho Byori*, 2002, 50(12): 1140-1145.
- [15] Jin J, Chen F, Wang Q, *et al.* Inhibition of TNF- α by cyclophosphamide reduces myocardial injury after ischemia-reperfusion [J]. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*, 2013, 19(1): 24-29.
- [16] Flaherty M P, Guo Y, Tiwari S, *et al.* The role of TNF- α receptors p55 and p75 in acute myocardial ischemia/reperfusion injury and late preconditioning [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2008, 45(6): 735-741.
- [17] 邹吉丽, 尹照萍, 张利群, 等. 大鼠心肌缺血再灌注早期心肌及血清中IL-6、TNF- α 的表达 [J]. *中国医科大学学报*, 2013, 42(9): 830-833.
- [18] Takahashi M. Role of the inflammasome in myocardial infarction [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2011, 21(2): 37-41.
- [19] Yu M, Wen N, Wenzhong Z, *et al.* Effect of repeated ischaemic preconditioning on TLR4 and proinflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β in myocardial ischaemia-reperfusion injury in a rat model [J]. *Arch Med Sci*, 2010, 6(6): 843-847.
- [20] 朱俊超, 马虹, 王俊科. 急性心肌缺血再灌注损伤大鼠海马长时程增强及TNF- α 、IL-1 β 表达的变化 [J]. *中国医科大学学报*, 2008, 37(1): 124-127.
- [21] Suzuki K, Murtuza B, Smolenski R T, *et al.* Overexpression of interleukin-1 receptor antagonist provides cardioprotection against ischemia-reperfusion injury associated with reduction in apoptosis [J]. *Circulation*, 2001, 104(12 Suppl 1): 1308-1313.