

荭草苷对大鼠急性心肌梗死的保护作用及机制研究

黄秀兰*, 刘丹妮, 刘立亚, 马芹芹, 王慧晔, 李建平

中央民族大学 中国少数民族传统医学国家民委-教育部重点实验室, 北京 100081

摘要:目的 探讨荭草苷对急性心肌梗死模型大鼠的保护作用及机制。方法 建立异丙肾上腺素致大鼠急性心肌梗死模型, 将大鼠分为正常对照组、模型组、阳性药普萘洛尔组及低、高剂量荭草苷干预组(1.0、2.0 mg/kg); 采用多道生理记录仪采集心电图、血流动力学指标, 检测血清中心肌酶、抗氧化物酶的活性, HE染色观察心肌组织病理学改变, ELISA法检测心肌组织环鸟苷酸(cGMP)水平。结果 与模型组比较, 预防性ip 2.0 mg/kg 荭草苷连续7 d, 可降低大鼠心电图ST段高度变化, 明显改善大鼠血流动力学指标, 降低大鼠血清心肌酶LDH、ALT和AST的水平, 减轻心肌梗死大鼠心肌纤维变性坏死及水肿程度, 亦可升高大鼠血清中抗氧化酶SOD、GSH-Px活性及心肌组织中cGMP水平。结论 荭草苷对大鼠急性心肌梗死具有明显保护作用, 其保护机制可能与增强体内抗氧化酶活性, 提高心肌组织cGMP水平和调节NO/cGMP信号通路有关。

关键词: 荭草苷; 急性心肌梗死; 抗氧化; 环鸟苷酸

中图分类号: R542.22 R972 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2012)06-0412-05

Protection of orientin on acute myocardial infarction in rats and study on its mechanism

HUANG Xiu-lan, LIU Dan-ni, LIU Li-ya, MA Qin-qin, WANG Hui-ye, LI Jian-ping

State Nationalities Affairs Commission and Department of Educational Key Laboratory, of Minority Traditional Medicine, Ministry of Education, Minzu University of China, Beijing 100081, China

Abstract: Objective To investigate the protective effect of orientin (Ori) on acute myocardial infarction (AMI) in rats and study its mechanism. **Methods** The rat model with AMI was induced by sc injection of isoproterenol. The rats were randomly divided into five groups, such as control, model, Propranolol (positive control), low- and high-dose Ori (1.0 and 2.0 mg/kg) groups. The electrocardiogram (ECG) and hemodynamic parameters were recorded by PowerLab, the activities of cardiac enzymes and anti-oxidant enzymes were determined, histopathological changes of myocardial tissue were measured by HE staining, and the level of cyclic guanosine monophosphate (cGMP) was detected by ELISA. **Results** Ip injection of Ori (2.0 mg/kg) for 7 d could reduce the ST segment height of ECG, improve the hemodynamic parameters in rats obviously, decrease the serum myocardial enzyme levels, reduce the myocardial fiber degeneration, necrosis, and edema, and increase the superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities and the myocardial cGMP level. **Conclusion** Ori could protect rats against AMI induced by isoproterenol, which may contribute to enhancing the anti-oxidase activities, elevating the cGMP level of myocardial tissue, and regulating the NO/cGMP signal pathway.

Key words: orientin (Ori); acute myocardial infarction (AMI); anti-oxidation; cyclic guanosine monophosphate (cGMP)

急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)是临床常见急症之一, 严重危害人类健康。荭草苷(orientin, Ori)属黄酮类单体成分, 是苗药都木油的主要药效物质基础之一, 具有抗氧化、抗凋亡、抗缺血性再灌注损伤等作用^[1-2]。以往的研究结果表明荭草苷对缺血性心肌损伤有确切防治作用, 具备开发成治疗缺血性心脏病新药的潜能^[3]。本实验采用大剂量异丙肾上腺素(isoproterenol, Iso)诱导大鼠急性心肌梗死模型, 研究荭草苷在不同剂量下对心肌梗死的预防作用, 并初步探讨其

作用机制, 为将其开发成治疗急性心肌梗死的新药提供实验依据。

1 材料

1.1 实验动物

Wistar大鼠60只, 雄性, (320±20)g, SPF级, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

1.2 药品与试剂

荭草苷(质量分数>98%, 上海融禾医药科技发展有限公司), 异丙肾上腺素(山东科源制药有限公司, 批号0910002), 普萘洛尔(北京亚邦制药有

收稿日期: 2012-08-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81173656); 国家民族事务委员会资助项目(10ZY08)

作者简介: 黄秀兰(1964—), 女, 重庆人, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药/民族药心血管药理学。Tel: (010)68933254 E-mail: hxlcn@126.com

限公司), 乌拉坦 (德国 Merck 公司)。乳酸脱氢酶 (LDH) 试剂盒、丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 试剂盒、门冬氨酸氨基转移酶 (AST) 试剂盒 (中生北控生物科技股份有限公司), 超氧化物歧化酶 (SOD) 试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所), cGMP ELISA 试剂盒 (武汉华美生物工程有限公司), 考马斯亮蓝 G-250、牛血清白蛋白 (美国 Amresco 公司)

1.3 仪器

多道生理记录仪 (ML880/P PowerLab16/30, 澳大利亚 AD Instruments 公司); 7020 全自动生化仪 (日本日立公司); 96 孔酶标仪 (美国 Bio-Rad); 超速低温冷冻离心机 (德国 Eppendorf)。

2 方法

2.1 动物分组及给药

Wistar 大鼠随机分为对照组、模型组、阳性药普萘洛尔组及低、高剂量荜苈子干预组 (1.0、2.0 mg/kg, 经预实验确定受试药剂量), 每组 12 只动物。

各干预组大鼠给予相应药物, 每天 ip 给药 1 次, 连续 7 d, 对照组及模型组给予等量生理盐水。末次给药 1 h 后 sc Iso 85 mg/kg 制备急性心肌梗死模型, 对照组给予生理盐水。

2.2 检测指标

大鼠 sc Iso 85 mg/kg 12 h 后, 分别 ip 1 g/kg 乌拉坦麻醉, 待大鼠的状态稳定后, 记录 II 导联 ECG 1 min。记录 ECG 后经颈静脉左心室插管, 测量血流动力学指标。记录血流动力学指标后经颈动脉插管处取血并分离血清, 分别检测大鼠血清中心肌酶 LDH、AST、ALT 及抗氧化酶 SOD、GSH-Px 活性, 具体实验步骤见试剂盒说明书。采血后每组迅速剪取大鼠心脏, 一半标本 (6 只大鼠) 采用 HE 染色法检测大鼠心肌组织病理学变化; 另一半标本 (6 只大鼠) ELISA 法检测大鼠心肌组织环鸟苷酸 (cGMP) 水平, 具体实验步骤见试剂盒说明书。

2.3 统计学处理

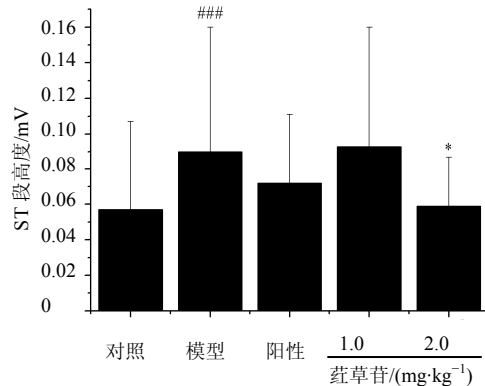
数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理, 组间比较用单因素方差分析 (One-Way ANOVA)。

3 结果

3.1 荜苈子对大剂量 Iso 致大鼠急性心肌梗死模型 ST 段高度的影响

如图 1 所示, sc 85 mg/kg Iso 12 h 可显著升高

大鼠 ST 段高度, 表明模型建立成功。预防性连续 ip 荜苈子 2.0 mg/kg 7 d, 对心肌梗死大鼠 ST 段抬高具有抑制作用, 使 ST 段高度由 (0.059 ± 0.028) mV 下降至 (0.090 ± 0.070) mV ($P < 0.05$)。



与对照组比较: ### $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$

$P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ vs model group

图 1 荜苈子对大鼠急性心肌梗死模型 ST 段高度的影响

Fig. 1 Effect of Ori on ST segment height of AMI in rats

3.2 荜苈子对大剂量 Iso 致大鼠急性心肌梗死模型血流动力学指标的影响

Sc 85 mg/kg Iso 12 h 后, 模型组大鼠左室内压最大上升速率 (+dp/dt Max) 及左室收缩指数 (CI) 降低, 左室舒张末期压 (LVEDP)、左室内压最大下降速率 (-dp/dt Max) 及左室心肌松弛时间常数 (τ) 升高 ($P < 0.01$ 或 0.001)。如图 2 所示, 荜苈子 (1.0、2.0 mg/kg) 均可改善心肌梗死大鼠血流动力学指标。

3.3 荜苈子对大剂量 Iso 致大鼠急性心肌梗死模型血清中心肌酶水平的影响

Iso 能够升高心肌梗死大鼠血清 LDH、AST、ALT 水平 ($P < 0.001$)。高剂量荜苈子组大鼠血清 LDH 活性由 (1297 ± 302) U/L 降至 (982 ± 27) U/L, ALT 活性由 (64 ± 11) U/L 降至 (859 ± 7) U/L, AST 活性由 (395 ± 122) U/L 降至 (331 ± 86) U/L ($P < 0.05$), 见表 1。

3.4 荜苈子对大剂量 Iso 致大鼠急性心肌梗死模型血清抗氧化酶活性的影响

如图 3 所示, 心肌梗死大鼠血清 SOD 及 GSH-Px 活性均明显降低 ($P < 0.01$)。连续 7 d 预防性注射 1.0 mg/kg 荜苈子能升高心肌梗死大鼠血清 SOD 活性, 连续 7 d 预防性注射 2.0 mg/kg 荜苈子可使血清 SOD 水平由 (164 ± 39) U/mL 升高至 (230 ± 45) U/mL ($P < 0.05$), GSH-Px 水平由 (593 ± 55) U/mL

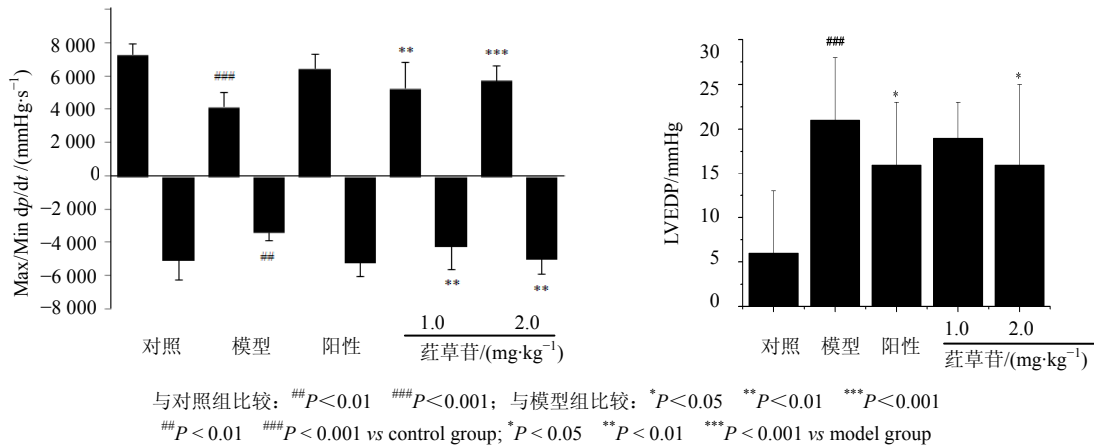


图2 荭草苷对急性心肌梗死大鼠血流动力学的影响

Fig. 2 Effect of Ori on hemodynamic parameters of AMI in rats

表1 荭草苷对急性心肌梗死大鼠血清心肌酶水平的影响

Table 2 Effects of Ori on activities of cardiac enzymes in serum of rats with AMI

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	LDH/(U·L ⁻¹)	ALT/(U·L ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)
对照	—	614±195	36±4	117±18
模型	—	1 297±302###	64±11###	395±122###
普萘洛尔	—	718±179**	42±14**	229±61**
荭草苷	1.0	1 073±248	80±11	409±143
	2.0	982±278*	59±7*	331±86*

与对照组比较: ###*P*<0.001; 与模型组比较: **P*<0.05 ***P*<0.01###*P*<0.001 vs control group; **P*<0.05 ***P*<0.01 vs model group升高至 (792±79) U/mL (*P*<0.001)。

3.5 荭草苷对大剂量 Iso 致大鼠急性心肌梗死模型病理学改变的影响

由图 4 可知, 对照组大鼠心肌组织结构清晰, 心肌纤维排列整齐, 未见心肌纤维变性、坏死等病

理改变 (图 4a)。模型组大鼠心肌出现广泛性心肌纤维变性、坏死, 毛细血管扩张, 心肌细胞间质水肿 (图 4b)。普萘洛尔组大鼠心肌组织出现心肌细胞间质轻微水肿, 毛细血管扩张, 未见其他异常 (图 4c)。1.0 mg/kg 荭草苷组出现心肌纤维弥漫性空泡变性, 毛细血管扩张, 以及心肌细胞间质中度水肿 (图 4d)。2.0 mg/kg 荭草苷组大鼠心肌组织出现心肌纤维轻度变性, 心肌纤维之间轻微水肿, 未见其他异常 (图 4e)。

3.6 荭草苷对 Iso 致急性心肌梗死大鼠心肌组织匀浆上清液中 cGMP 水平的影响

与正常对照组相比, Iso 所致心肌梗死大鼠心肌组织 cGMP 水平显著降低 (*P*<0.001)。实验结果表明, 预防性 ip 荭草苷, 可剂量相关性升高心肌梗死大鼠心肌组织 cGMP 水平, 1.0 mg/kg 荭草苷可使 cGMP 水平由 (0.123±0.025) pmol/mg 升高至 (0.433±0.183) pmol/mg (*P*<0.05), 2.0 mg/kg 荭

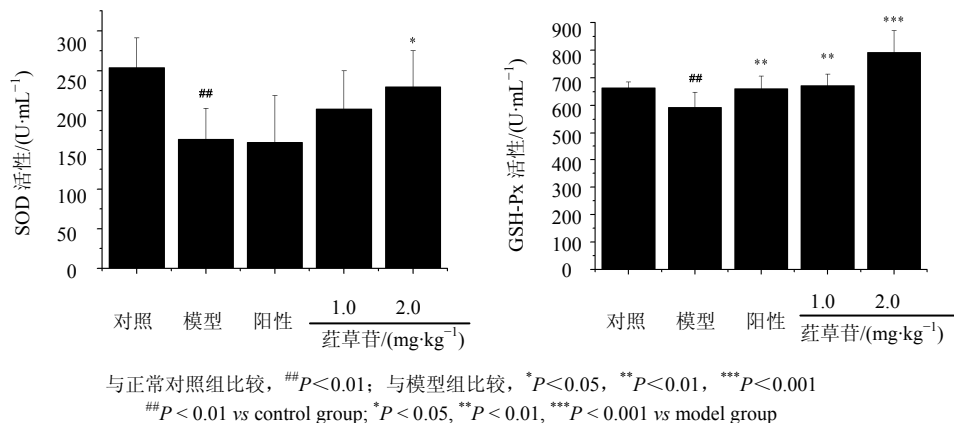


图3 荭草苷对急性心肌梗死大鼠血清 SOD 及 GSH-Px 活性的影响

Fig. 3 Effects of Ori on SOD and GSH-Px activities in serum of AMI in rats

苈草苷可使 cGMP 水平升至 (0.784 ± 0.256) pmol/mg ($P < 0.001$) (图 5)。

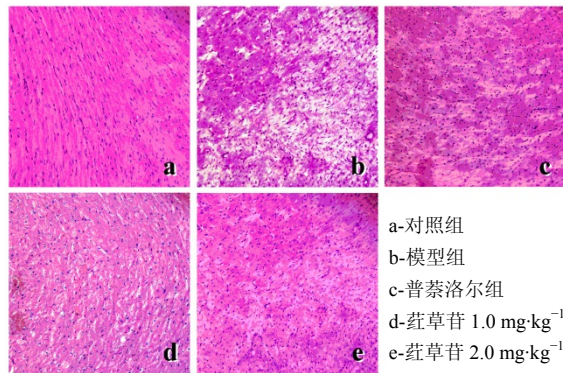
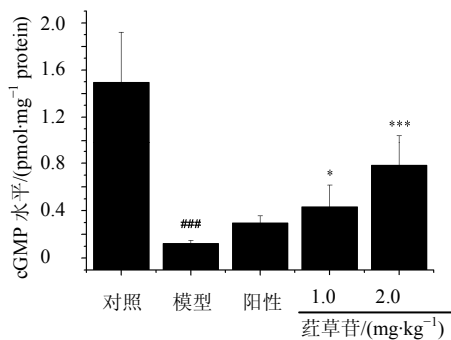


图 4 苈草苷对急性心肌梗死大鼠心肌组织病理学的影响
Fig. 4 Effect of Ori on myocardial histopathological changes of AMI in rats



与对照组比较: ### $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$
$P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ vs model group

图 5 苈草苷对急性心肌梗死大鼠心肌组织 cGMP 水平的影响
Fig. 5 Effect of Ori on cGMP level heart tissues of AMI in rats

4 讨论

一次性大剂量注射 Iso, 可通过收缩冠脉流量, 增加心肌收缩力和增加心肌耗氧量等, 诱发心肌梗死。心肌缺血后 ST 段的变化幅度可基本反映心肌缺血的严重程度^[4]。本研究结果表明, 一次性大剂量注射 Iso 可明显造成大鼠 ST 段抬高。与心肌梗死模型组相比, 连续 7 d 预防性注射苈草苷可缓解 Iso 引起的 ST 段抬高, 表明对缺血性心肌有保护作用。心肌缺血时, 心肌细胞代谢紊乱, 心肌收缩、舒张功能障碍, 血流动力学显著异常。在血流动力学各项指标中, $+dp/dt$ Max 反映左室收缩功能, LVEDP、 $-dp/dt$ Max 反映左心室舒张功能^[5]。本研究发现, 通过预防性给予苈草苷可以增强心肌梗死大鼠心肌收缩功能, 并改善心肌舒张功能, 使心内膜下血流供应得到改善, 减轻心肌缺血程度, 有利于保护缺

血心肌。

缺血性心肌酶的释放量是心肌损害程度的主要标志, LDH、ALT 及 AST 水平的测定有助于急性心肌梗死病程的判定。实验结果表明注射 Iso 后, 模型组大鼠血清中 LDH、ALT、AST 活性显著升高, 说明心肌细胞处于变性坏死期, 细胞明显受损。苈草苷干预组急性心肌梗死大鼠血清中 LDH、ALT、AST 活性明显降低, 说明苈草苷能减轻心肌细胞变性反应, 保持细胞膜完整。光镜下对心肌组织病理形态学改变的观察, 也表明苈草苷对 Iso 诱导的大鼠心肌病理改变具有改善作用。由此可见, 苈草苷对心肌缺血损伤具有明显的保护作用。

缺血缺氧时, 心肌代谢产生自由基, 血清中 SOD 及 GSH-Px 活性减弱, 缺血心肌组织损伤加重。本研究发现, 急性心肌梗死大鼠血清 SOD 及 GSH-Px 活性明显下降, 表明自由基生成与清除之间严重失衡。与模型组比较, 苈草苷干预组能够提高急性心肌梗死大鼠血清中的抗氧化酶活性, 从而减轻毒性自由基对心肌细胞的损害, 降低心肌梗死程度。

研究发现, 心肌缺血性损伤常常伴有 NO/cGMP 信号通路异常^[6]。而许多抗氧化剂所发挥的心血管系统疾病保护作用与心肌细胞内 NO 及 cGMP 水平密切相关^[7-8]。Fu 等^[9]报道苈草苷可刺激血管细胞产生 NO, 并使 cGMP 水平升高。本研究也发现, 在心肌细胞内苈草苷使 cGMP 水平升高, 因此推测苈草苷可能通过 NO-cGMP 信号通路达到减轻心肌缺血损伤作用, 但其确切机制仍待进一步的研究证实。

本研究通过观察苈草苷对 Iso 诱发大鼠心肌梗死模型的抗心肌缺血作用, 并从抗氧化作用及 NO/cGMP 信号通路角度探讨其可能的作用机制, 为苈草苷的开发利用提供药理学依据。

参考文献

- [1] 苑红燕, 张琳, 童政, 等. 金莲花总黄酮及其单体成分的抗氧化活性研究 [J]. 苏州大学学报: 医学版, 2011, 31(3): 396-399.
- [2] Fu X C, Wang M W, Li S P, *et al.* Anti-apoptotic effect and the mechanism of orientin on ischaemic/reperfused myocardium [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2006, 8(3): 265-272.
- [3] 付晓春, 王希, 郑辉, 等. 苈草苷对缺血缺氧心肌的保护作用 [J]. 南方医科大学学报, 2007, 27(8): 1173-1175.
- [4] Kelback H, Terkelsen C J, Helquist S, *et al.* Randomized comparison of distal protection versus conventional

- treatment in primary percutaneous coronary intervention the drug elution and distal protection in ST-elevation myocardial infarction trial [J]. *J Am Coll Nutr*, 2008, 51(9): 899-905.
- [5] 侯春丽, 张冬梅, 侯学红, 等. 大鼠急性心肌梗死模型制备及对心功能影响的实验研究 [J]. 宁夏医科大学学报, 2010, 32(9): 967-970.
- [6] Korkmaz S, Radovits T, Barnucz E, *et al.* Pharmacological activation of soluble guanylate cyclase protects the heart against ischemic injury [J]. *Circulation*, 2009, 120(8): 677-686.
- [7] Okazaki T, Otani H, Shimazu T, *et al.* Reversal of inducible nitric oxide synthase uncoupling unmasks tolerance to ischemia/reperfusion injury in the diabetic rat heart [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2011, 50(3): 534-544.
- [8] Chen H P, Liao Z P, Huang Q R, *et al.* Sodium Ferulate attenuates anoxia/ reoxygenation-induced calcium overload in neonatal rat cardiomyocytes by NO/cGMP/ PKG pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2009, 603(1-3): 86-92.
- [9] Fu X C, Wang M W, Li S P, *et al.* Vasodilatation produced by orientin and its mechanism study [J]. *Biol Pharm Bull*, 2005, 28(1): 37-41.