

性休克组大鼠, ig GSS 与 ig 蒸馏水相比, 血浆 ACTH 和 GC 的含量并没有明显变化, 但肝胞液 GR mRNA 表达水平则大幅度地提高, 这提示 GSS 对急性大失血大鼠 GR 结合活性的保护作用可能不是通过垂体-肾上腺皮质激素调节, 而可能是通过加强 GR 蛋白的合成速度。至于磷酸化脱磷酸化是否也发挥作用, 有待于进一步研究。GSS 的 3 个剂量组中以中剂量组对 GR 的调节作用最为明显, 据此推测, GSS 保护应激机体 GR 可能有一个最佳剂量, 值得进一步探讨。

本研究的结果为 GSS 的进一步开发利用提供了初步的实验依据, 尽管其确切的作用机制尚待进一步研究, 但随着研究的深入, 必将为研制及时抢救失血性休克患者, 提高部队作战能力的天然药物制剂提供科学的实验依据。

References:

- [1] Xu R B. The studies on glucocorticoid receptors in stress and shock [J]. *Physiol Sci* (生理科学), 1989, 9 (2): 1-4.
- [2] Ling C Q, Li M, Tan J X, *et al.* Experimental study on protective effect of Chinese herbal medicine on glucocorticoid receptor [J]. *CJIM*, 2000, 6 (1): 32-35.
- [3] Zhang S C. Pharmacological effect of ginsenoside from different parts of *Panax ginseng* [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药研究), 1980 (5): 45.
- [4] Lu J H, Ling C Q, Tan J X, *et al.* Effects of Gu Tuo Tang (GTT) on the glucocorticoid receptor in rats during hemorrhagic shock [J]. *Chin J Pathophysiol* (中国病理生理杂志), 1998, 14 (2): 136.
- [5] John W Funder. Mineralocorticoid receptors and glucocorticoid receptors [J]. *Clin Endocrinol*, 1996, 45: 651.
- [6] Fan J, Gong X Q, Wu J, *et al.* Effect of glucocorticoid receptor (GR) blockade on endotoxemia in rats [J]. *Circ Shock*, 1994, 42: 76.
- [7] Xu R B. Effects on decrease of glucocorticoid receptor during shock: a new hypothesis [J]. *Life Sci* (生命科学), 1997, 9 (2): 78-80.
- [8] Ling C Q, Li M, Lu J H, *et al.* Effects of Shen Fu decoction on the glucocorticoid and its receptor on hemorrhagic shock in rats [J]. *Acad J Second Mil Med Univ* (第二军医大学学报), 1996, 17 (3): 284.
- [9] Li M, Zhao F J, Guo J S, *et al.* Effects of Jiawei Shenmai San on the glucocorticoid and its receptor in heat-stressed rats [J]. *Acad J Second Mil Med Univ* (第二军医大学学报), 1996, 17 (6): 542-543.
- [10] Xu R B, Lu J, Jiang Z S. *The Basis and Clinic of Receptors* (受体的基础与临床) [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Publishing House, 1992.

红花黄色素改善大鼠缺氧心肌能量代谢的研究

朴永哲, 金 鸣, 臧宝霞, 陈文梅, 吴 伟, 李金荣*

(北京市心肺血管疾病研究所—首都医科大学附属北京安贞医院, 北京 100029)

摘要:目的 探讨红花黄色素 (SY) 缓解大鼠心肌缺氧性损伤作用及其对能量代谢的影响。方法 建立大鼠离体心脏的冠状动脉灌注流模型, 以 2, 4-二硝基苯肼比色法测心室肌组织乳酸脱氢酶 (LDH) 漏出量, 以荧光素酶法测心室肌组织 ATP 含量, 透射电镜观察心尖部组织超微结构; 制备大鼠心室肌组织线粒体混悬液, 分别以比浊法与荧光偏振法观察线粒体肿胀与膜流动性的变化。结果 SY 可减少大鼠低灌注离体心脏 LDH 漏出, 缓解心室肌组织 ATP 含量下降及其超微结构的损伤; SY 可缓解大鼠心肌线粒体混悬液中线粒体的肿胀及其膜流动性下降。结论 SY 可改善大鼠心肌能量代谢, 进而缓解心肌缺氧性损伤。

关键词: 红花黄色素; 乳酸脱氢酶; 三磷酸腺苷; 超微结构; 线粒体

中图分类号: R286.2 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)05-0436-04

Study of safflower yellow on improving energetic metabolism in hypoxic myocardium of rats

PIAO Yong-zhe, JIN Ming, ZANG Bao-xia, CHEN Wen-mei, WU Wei, LI Jin-rong

(Beijing Institute of Cardiopulmonary Blood Vessel Diseases—Beijing Anzhen Hospital,

Capital University of Medical Science, Beijing 100029, China)

Abstract: **Object** To investigate the action of safflower yellow (SY) against rat cardiac hypoxic damage and the effect on energy metabolism. **Methods** The level of lactic dehydrogenase (LDH) leaked in the coronary effluence was measured with 2, 4-dinitrophenylhydrazine colorimetry. After insufficient perfusion, ATP level in ventricular myocardium was determined with luciferin-luciferase bioluminescence technique and ventricular transmission eletromicroscopy was performed. Swelling and membrane fluidity changes were observed in rat myocardial mitochondrion prepared by homogenization and repeated centrifugations, by means of turbidimetry and fluo-

* 收稿日期: 2002-08-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30171746); 北京市中医药科技发展基金资助项目; 北京市医学科学重点学科资助项目

rescence polarimetry respectively. **Results** LDH leakage, myocardial ATP content decrease and cardiac ultrastructure injury were reduced in all groups treated with SY. The decreases in both mitochondrial swelling and membrane fluidity were ameliorated by SY. **Conclusion** Cardiac ischemic injury was reduced by SY. The cardiac energetic metabolism improvement may be one of its important mechanism.

Key words safflower yellow (SY); lactic dehydrogenase (LDH); ATP; ultramicrostructure; mitochondrion

红花为菊科植物 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花,具活血通经、化瘀止痛之功效,临床上以水煎液入药。研究报道注射红花制剂可缓解冠心病患者心绞痛发作等临床症状、改善缺血性心电图^[1,2],还可抑制 ADP 诱发的大鼠血小板聚集,但在改善缺血心肌能量代谢方面的研究未见报道。本实验所用红花黄色素 (SY) 经本实验室专利技术^[3]硅胶吸附法制备,主要为黄酮类成分,其中以查尔酮为主, HPLC 法分析其中羟基红花黄色素 A 含量较高。本研究以离体大鼠心脏冠状动脉灌流模型与离体心肌线粒体实验,探讨 SY 缓解心肌缺血的药理作用及其机制。

1 材料与仪器

Wistar 雄性大鼠由北京大学医学部动物房提供。复方丹参注射液 (Composite Saliva Miltiorrhiza Injection, CSMI) 雅安三九药业有限公司产品; ATP 含量测定用试剂盒,中国科学院上海植物生理研究所产品; 1, 6-二苯基-1, 3, 5-己三烯 (1, 6-diphenyl-1, 3, 5-hexatriene, DPH), 瑞士 FLUKA 公司产品; 尼克酰胺腺苷二核苷酸 (β -nicotinamide adenine dinucleotide), Sigma 产品; Krebs-Henseleit 液^[4] (简称 K-H 液); 红花购自北京市海淀药材公司,经北京中医药大学药学院鉴定教研室李家实教授鉴定为菊科植物红花 *C. tinctorius* L. 的干燥花。红花水提液经硅胶吸附,以水提取、乙醇沉淀后上清液减压浓缩即为 SY 水溶液^[3],重量法定量;其余试剂均为国产分析纯。上海雷磁仪器厂新泾分厂产 5110 型测氧仪;瑞典 LKB-1250 型化学发光仪;日立 F-2000 型荧光分光光度计;上海分析仪器厂产 7551-b 型分光光度计;JEM-100CX2 型透射电镜。

2 方法

2.1 SY 缓解大鼠冠状动脉灌流离体心脏缺氧性损伤实验: (202 ± 26) g 体重的大鼠随机分为单纯 K-H 液组、K-H 液+ CSMI 组与 K-H 液+ SY 低、中及高剂量组,依 Langendorff 法建立大鼠离体心脏灌流模型^[4] (简称 Langendorff 模型)。各组心脏灌流 20 min 后立即改为含不同浓度 SY 或 CSMI 的

K-H 液灌流,而单纯 K-H 液组仍以 K-H 液灌流,所有心脏灌流至 20, 30, 40, 50 及 60 min 时均各留一份冠状动脉流出液于 -20℃ 保存,6 周内室温解冻冠状动脉流出液以 2, 4-二硝基苯肼比色法^[5]测定其 LDH 活性 [10^{-9} mol/(L·s)],并计算其各时间点数据相对于 20 min 值的变化率。各组心脏灌流至 60 min 时,冰浴中取心尖部组织以 3% 戊二醛固定后由北京医科大学电镜室常规方法制作透射电镜切片,观察心尖部组织超微结构改变,其余心脏组织于冰浴中切取心室组织于液氮中保存,1 个月内参照试剂盒方法以丙酮提取心肌 ATP,并于 -20℃ 保存 ATP 提取液,1 周内室温解冻 ATP 提取液按试剂盒操作说明以荧光素-荧光素酶法测定 ATP 含量。

2.2 大鼠心肌线粒体混悬液制备方法:依文献方法^[6],将 1 只大鼠心室肌组织 0℃~4℃ 下匀浆后离心制备大鼠心肌线粒体混悬液,以牛血清白蛋白为标准,双缩脲比色法测定线粒体蛋白浓度。

2.3 SY 缓解离体心肌线粒体肿胀实验:缪明永等报道线粒体混悬液 37℃ 保温 30 min 后线粒体肿胀加剧,同时有 A_{520} 下降^[7]。本实验设损伤对照管、损伤+ SY 低、中、次高、高剂量管。各损伤+ SY 管依次加入 2.2 法制备的蛋白浓度为 3.0 g/L 线粒体悬液 0.2 mL、线粒体制备缓冲溶液^[6] 1.8 mL 及 SY 1.0 mL,损伤对照管加入同上心肌线粒体悬液 0.2 mL 及线粒体制备缓冲溶液 2.8 mL。以线粒体制备缓冲溶液为损伤对照管的比色调零管,以 2.0 mL 线粒体制备缓冲溶液与 1.0 mL 相应 SY 的混合液为各损伤+ SY 管比色调零管。各管分别于 37℃ 保温前及保温中每 15 min 测一次 A_{520} ^[8]。计算保温后各时间点 A_{520} 相对于保温前 A_{520} 的变化率以反映线粒体肿胀程度的变化。

$$A_{520}\text{变化率} = (A_{15\text{min}} - A_0) / A_0 \times 100\%$$

2.4 SY 缓解离体心肌线粒体膜流动性下降实验:实验设损伤对照管,损伤+ SY 低、中及高剂量管。参照王继峰等方法^[7],损伤+ SY 不同剂量管中含 2.2 法制备的心肌线粒体蛋白 0.2 g/L、荧光探针

DPH 2×10^{-6} mol/L 及 SY, 总反应体积为 1.5 mL。损伤对照管以同体积蒸馏水代替 SY, 其余成分均同损伤+ SY 不同剂量管。37 ℃ 保温 30 min 后, 以 λ_{ex} 360 nm, λ_{em} 430 nm 测各管荧光偏振值 $G(0,0)$, $G(0,90)$, $G(90,0)$ 及 $G(90,90)$ 。据 Perrin 公式计算线粒体膜荧光偏振度 P 、微粘度 η ^[9]。

2.5 数据处理: 以统计学软件 SPSS 8.0 进行方差分析及 Q 检验。

3 结果

表 1 SY 缓解大鼠 Langendorff 模型 LDH 漏出的作用 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Table 1 Effect of SY in reducing LDH level in coronary effluence in Langendorff model rats <i>in vitro</i> ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)										
组别	剂量 $/(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	LDH 活性/ $(\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{s}^{-1})$					LDH 变化率/%			
		20 min	30 min	40 min	50 min	60 min	30 min	40 min	50 min	60 min
单纯 K-H 液	-	54.2±16.5	128.2±98.0	246.2±113.7	239.4±95.1	265.9±115.6	123.2±127.2	405.7±283.4	426.9±349.1	440.4±305.1
K-H 液+ SY	0.025	42.6±11.6	44.1±23.7	30.4±26.5	18.3±18.7	13.8±11.6	18.2±94.5	-14.3±96.9 [*]	-50.5±52.1 ^{***}	-61.6±42.7 ^{***}
	0.1	47.8±20.4	81.0±76.3	83.1±119.5	61.1±88.4	69.9±81.1	76.6±114.5	29.4±205.6 [*]	-20.3±180.6 [*]	6.1±152.0 ^{***}
	0.4	57.7±29.7	112.1±121.2	74.7±78.3	90.3±90.4	147.3±186.7	92.1±140.2	23.7±107.5 [*]	60.6±126.8 [*]	149.4±261.2 [*]
K-H 液+ CSM I	2.0	60.1±22.4	40.6±37.7	46.3±45.0	108.5±102.2	101.5±72.8	-32.9±59.4 [*]	-22.3±69.6 [*]	96.1±179.8 [*]	88.8±147.9 [*]

与单纯 K-H 液组比较: ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ ^{***} $P<0.001$
^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ ^{***} $P<0.001$ vs K-H solution-perfused group

3.2 SY 对大鼠 Langendorff 模型心肌组织 ATP 含量的影响: 如表 2 结果所示, 各给药组的心室肌组织 ATP 含量呈随 SY 剂量增加而升高的趋势, 但其显著性差异无统计学意义。

表 2 SY 缓解大鼠 Langendorff 模型心室肌组织 ATP 含量下降作用

Table 2 Effect of SY in ameliorating decrease of ATP in rat ventricular muscle <i>in vitro</i>			
组别	剂量/ $(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	n	ATP/ $(\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1})$
单纯 K-H 液	-	8	95±41
K-H 液+ SY	0.025	7	129±81
	0.1	6	136±105
	0.4	6	167±107
K-H 液+ CSM I	2.0	8	116±36

3.3 SY 缓解大鼠 Langendorff 模型超微结构损伤的作用: 大鼠离体心脏灌流 65 min 时, 单纯 K-H 液组心尖部组织透射电镜下可见部分线粒体肥大等形态学改变, 与正常心肌差异较大, 而 K-H 液+ SY 各剂量组及 K-H 液+ CSM I_{2.0} g/L 组的线粒体结构基本正常。除线粒体变化外, 各给药组透射电镜下均未见其他显著改变。

3.4 SY 缓解大鼠心肌线粒体混悬液中线粒体肿胀的作用: 37 ℃ 保温时, 损伤对照管的 A_{520} 逐渐降低, 线粒体悬液中的线粒体肿胀逐渐加重; 损伤+ SY 不同剂量管不同时间点的 A_{520} 变化率较相应时间点的损伤对照管低 ($P<0.05$), 提示 SY 具有缓解此种线粒体损伤的作用。

3.1 SY 缓解大鼠 Langendorff 模型 LDH 漏出的作用: 结果见表 1。单纯 K-H 液组的 LDH_{30 min} (灌流至 30 min 时冠状动脉流出液中 LDH 活性, 下同), LDH_{40 min}, LDH_{50 min} 及 LDH_{60 min} 均高于本组的 LDH_{20 min}, SY 不同剂量组 LDH_{30 min} 亦高于本组的 LDH_{20 min}, 但 K-H 液+ SY 不同剂量组的 LDH_{40 min} 变化率, LDH_{50 min} 变化率及 LDH_{60 min} 变化率均低于单纯 K-H 液组相应时间点的数值 ($P<0.05$)。

3.5 SY 缓解大鼠心肌线粒体混悬液中线粒体膜流动性下降的作用: 如表 3 结果所示, SY 不同剂量管的荧光偏振度 P 较损伤对照管低, 其中中剂量管与高剂量管的显著性具统计学意义, 提示 SY 1.0~2.0 mg/L 缓解了线粒体膜流动性的下降; 线粒体膜微粘度 η 的变化趋势与 P 相同, 但其显著性无统计学意义。

表 3 SY 缓解大鼠心肌线粒体膜流动性下降的作用

Table 3 Effect of SY in ameliorating decrease of rat mitochondrial membrane fluidity				
组别	剂量/ $(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	n	P	η
损伤对照	-	15	0.147±0.0212	0.955±0.215
损伤+ SY	0.5	15	0.138±0.0109	0.859±0.0992
	1.0	15	0.136±0.0078 [*]	0.837±0.0701
	2.0	14	0.135±0.0054 [*]	0.831±0.0467

与损伤对照管比较: ^{*} $P<0.05$
^{*} $P<0.05$ vs damage tube in control group

4 讨论

大鼠离体心脏灌流实验中, 测氧仪监测表明虽然所用 K-H 液灌流液始终氧饱和, 但单纯 K-H 液组灌流至 30 min 时的冠状动脉流量较 20 min 时显著下降(另文总结), 心肌仍可能发生缺氧。比较单纯 K-H 液组心肌与正常对照心肌的透射电镜观察结果, 提示单纯 K-H 液组离体心脏发生了缺氧性损伤。结果与本实验中离体心脏 LDH 漏出量及心肌组织 ATP 含量等实验结果相一致。实验结果表明 SY 可剂量依赖性地减少心肌 LDH 漏出, 表明 SY

缓解了心肌组织急性缺氧性损伤,该结果与SY缓解超微结构缺氧性损伤的结果相吻合。文献报道SY可使微循环流速加快、毛细血管网开放数目增加、心肌内毛细血管血流量增加,因而SY可能使毛细血管扩张而致冠状动脉流量增加;文献报道SY还可降低血浆中血管紧张素II(angiotensin II, AGT II)活性,因而推测SY亦可降低离体心脏局部AGT II活性,从而不同程度扩张冠状动脉、冠状静脉,改善微循环。因而SY可能通过扩张冠状动脉改善微循环而改善心肌供血、缓解心肌缺氧性损伤。

SY使离体灌流心脏的心室肌组织ATP含量呈升高趋势,缓解离体心肌线粒体肿胀,线粒体膜流动性下降,缓解Langendorff模型超微结构的损伤,因而改善心肌能量代谢也可能为其缓解心肌缺氧性损伤的重要机制之一。心肌缺血时组织发生能量代谢障碍,使钠泵、钾泵及其他酶系统功能下降,生物膜通透性增加,进而出现组织细胞的一系列病变。SY缓解细胞内ATP含量下降,可能是由SY增加氧、葡萄糖等物质供给(如通过缓解冠状动脉流量下降)与SY直接缓解缺氧时线粒体磷脂双分子层结构和功能的损伤共同作用结果。荧光探针直接标记于线粒体内膜脂质区,反映了内膜脂质区磷脂分子各种运动状态的变化,线粒体保温后^[7,8]发生肿胀、膜流动性下降等变化,这与心肌缺氧时线粒体改变相似。这时磷脂分子活动度降低、有序性增高,膜蛋白(如酶复合体)侧向运动的微环境改变,可能会影响呼吸链电子传递和磷酸化过程。SY缓解心肌线粒体混悬液中线粒体损伤的作用与大鼠离体心脏灌流实验观察到的SY缓解心肌线粒体肿胀等作用一致。

SY可缓解大鼠心肌缺氧性损伤,改善心肌能量代谢可能为其重要机制之一。心肌缺血是中医血瘀证,心血瘀阻的重要病理改变,作为活血化瘀常用药物,红花可通过多种机制缓解心肌缺血。本研究对于进一步阐明红花活血化瘀的作用机制,指导红花及其制剂开发及临床应用,具有重要的理论及实际意义。

References:

- [1] Bai Y L, Ke M L, Liu J D. Effect of *Carthamus tinctorius* L. on blood rheology and clinical symptom in coronary heart disease patients [J]. *Res Tradit Chin Med* (中医药研究), 1991, (5): 33-34.
- [2] Wang D J, Zhang P Y, Zhang P Q. Clinical report on therapeutic effect of *Carthamus tinctorius* L. Injection on coronary heart disease and analysis of 100 cases [J]. *Shanxi Med J* (山西医药杂志), 1997 (1): 34-36.
- [3] Jin M, Li J S, Wang Y Q, et al. Gross safflower yellow and its preparation and application [P]. CN: 99123713. 7, 2002-05-29.
- [4] Shi X Y. *Methods of Medical Experimental Animals* (医学动物实验方法) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1986.
- [5] Ye Y W, Li J Z, Wang Y C. *Clinical Experimental Diagnostics* (临床实验诊断学) (Book 1) [M]. 1st ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 1989.
- [6] Wang Q. *Modern Medical Experimental Methods* (现代医学实验方法) [M]. 1st ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 1997.
- [7] Wang J F, Zhang R R, Lu X Y, et al. Protective effect of propyl gallic acid on swelling and lipid peroxidation of rat liver mitochondria [J]. *Acta Pharma Sin* (药学报), 1986, 21 (11): 857-869.
- [8] Miao M Y, Zhu S H, Shi H P, et al. Effects of injection saline mitochondria on the inner membrane damage of rat myocardial mitochondria following hemorrhagic shock [J]. *Basic Med Sci Clin* (基础医学与临床), 1994, 14 (5): 368-371.
- [9] Fang F D, Zhou L, Ding L, et al. *General Book of Techniques in Modern Medical Experiments* (Book 1) (现代医学实验技巧全书) [M]. Beijing: Beijing Medical University & Peking Union Medical University United Publishing House, 1995.

西红花酸对异丙肾上腺素致大鼠急性心肌缺血损伤的保护作用

刘同征, 钱之玉*

(中国药科大学 药理教研室, 江苏 南京 210009)

摘要:目的 研究西红花酸对异丙肾上腺素(ISO)致大鼠急性心肌缺血的保护作用及机制。方法 采用大剂量ISO_{sc}诱导产生大鼠急性心肌缺血模型(ISO 30 mg/kg, 每日一次, 连续2 d), 实验大鼠随机分为正常组、ISO模型组、阳性对照组和3个西红花酸给药组(25, 50, 100 mg/kg), 测定心脏系数和血清中乳酸脱氢酶(LDH)、磷酸肌酸激酶(CK)和丙二醛(MDA)含量, 观察心肌组织谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、Na⁺, K⁺-ATP酶和Ca²⁺, Mg²⁺-ATP酶活性及心脏病理改变, 观察西红花酸的保护作用。结果 西红花酸能显著降低血清中CK和LDH

* 收稿日期: 2002-08-12

作者简介: 刘同征(1978—), 男, 现于北京大学临床肿瘤学院临床药理室工作, 主要研究方向为抗肿瘤药物的开发研究。

* 通讯作者 Tel: (025) 3222717