

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

的释放;也能显著降低血清和心脏匀浆中 MDA 水平,心脏重量参数显示对心肌水肿有明显的抑制作用;保护心肌 GSH-Px; Na^+ , K^+ -ATP 酶和 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶活性;心脏病理切片表明西红花酸对心肌坏死有显著的保护作用。结论 西红花酸对 ISO 所致急性心肌缺血有显著的保护作用。

关键词:西红花酸;异丙肾上腺素;心肌缺血坏死;丙二醛

中图分类号:R286.2

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2003)05-0439-04

Protective effect of crocetin on isoproterenol-induced myocardial injury in rats

LIU Tong-zheng, QIAN Zhi-yu

(Department of Pharmacology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract: **Object** To study the protective effect of crocetin on myocardial ischemia induced by isoproterenol (ISO). **Methods** Myocardial ischemia was induced by subcutaneous injection of ISO (30 mg/kg for two days, once a day). The experimental animals were randomly divided into the normal group, ISO group, positive control group and three crocetin groups (25, 50, 100 mg/kg). Cardiac indexes were examined. The level of LDH, CK, MDA in serum were measured. The content of MDA, GSH-Px and the ATPase activity heart and mitochondria were assayed by colorimetric analysis. The histopathological change of myocardia was investigated by HE staining. **Results** Compared with the model group, crocetin can significantly reduce the cardiac indexes, obviously decrease the level of MDA, LDH and CK in the serum. Crocetin can significantly increase the activities of Na^+ , K^+ -ATPase; Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase; GSH-Px. The histopathological changes confirmed the protective effects of crocetin on the myocardial injury. **Conclusion** Crocetin could alleviate the acute myocardial ischemia induced by ISO in rats.

Key words: crocetin; isoproterenol (ISO); myocardial ischemia necrosis; MDA

儿茶酚胺的大量产生与释放引起的心肌损伤是心肌缺血、心衰等病理过程的重要发病因素之一,异丙肾上腺素 (ISO) 为 β 受体激动剂,连续大剂量应用可诱发实验动物心肌梗死样损伤^[1]。sc 大剂量 ISO (> 10 mg/kg) 导致的清醒大鼠心肌损伤,能模拟人类心肌缺血性损伤^[2]。现代许多研究表明,大剂量 ISO 引起的心肌缺血样损伤与氧自由基的产生关系密切。一方面,心肌缺血时儿茶酚胺可在缺血区大量蓄积,其代谢过程中可以产生大量的氧自由基;另一方面 ISO 可自动氧化并在氧化过程中产生大量的超氧阴离子和过氧化氢;这些活性氧导致心肌细胞膜发生脂质过氧化而引起损伤^[3,4]。

从西红花中已经提取分离出一些有效成分,西红花苷及其苷元西红花酸是主要的有效成分^[5]。西红花酸属于类胡萝卜素类化合物,具有不饱和共轭多烯酸结构,与不同的糖结合形成其苷——西红花苷。实验证明西红花酸在体外具有很强的抗氧化作用,对 ISO 诱导的大鼠心肌缺血损伤是否具有保护作用,是否通过抗氧化作用而达到这一保护作用呢?为解答这个问题,本实验以大剂量 ISO 诱导的大鼠心肌缺血损伤为模型,以血清 LDH, CK, MDA 为指标检测心肌损害程度,以心脏系数、心脏病理和心脏匀浆 MDA 含量、GSH-Px 和 Na^+ , K^+ -ATPase; Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase 活性为指标观察心肌损伤时氧自由基的产生及体内抗氧化系统的变化与心

肌损伤之间的关系,并进行了病理考察。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂:西红花酸,本实验室精制,含量>50%。异丙肾上腺素 (isoproterenol, ISO) 为 Sigma 公司出品。考马斯亮蓝 G-250 为 Fluka 出品。Tris 为 B. M 进口分装。复方丹参片 (010504),广州粤华药业有限公司产品。其他试剂均为国产分析纯。ATPase 测定试剂盒、MDA 试剂盒由南京建成生物工程研究所提供。

1.2 仪器:分析天平,上海第二天平仪器厂生产;电热恒温水浴锅、752 分光光度计、XW80-A 旋涡混合器,上海医科大学仪器厂生产;Eppendorf 5417R 冷冻离心机。

1.3 动物:SD 大鼠,雌雄各半,体重 170~230 g,由中国药科大学实验动物中心提供。

1.4 ISO 诱导心肌缺血模型制备及给药方法:按照 Rona 等的方法略做改良,复制 ISO 急性心肌缺血模型。大鼠按体重随机分为 6 组:正常组,模型组,西红花酸高、中、低剂量组及复方丹参组。西红花酸组分别提前 ig 给药 5 d,每天 2 次,每次给药剂量分别为 100, 50, 25 mg/kg。丹参组提前 ig 给药 7 d,每天 2 次,每次给药剂量为 5 g/kg (生药量),除正常组以等量生理盐水 sc 外,其余各组均 sc ISO (每次 30 mg/kg,每日 1 次,连续注射 2 d)。全部动物在末次 sc ISO 后 24 h,摘眼球取血,分离血清, - 20

℃ 保存待测。脱颈椎处死动物, 迅速取出心脏, 以冰生理盐水洗去残留血液, 除去大血管、结缔组织, 滤纸吸干, 称全 心重。取心尖部位至 10% 福尔马林溶液中固定, 用于病理学检查, 其余心脏减碎后, 以 10 倍量 Tris-HCl (pH 7. 4) 缓冲液在冰浴下制成 10% 的心脏匀浆, 于 4 ℃, 1 000 g 离心 10 min, 弃沉淀, 取上清进行各项酶学指标的检测。考马斯亮蓝法测定蛋白含量以牛血清白蛋白为标准。

1. 5 统计方法: 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据间显著性差异用 *t* 检验。

2 结果

2. 1 西红花酸对心脏系数的影响: 与正常组比较, 模型组心脏系数 (心脏重/ 体重) 升高了 39. 72% (*P* < 0. 01); 复方丹参组心脏系数比模型组下降 7. 66% (*P* < 0. 05); 西红花酸高、中剂量组心脏系数分别比模型组下降了 8. 47%, 7. 86% (*P* < 0. 05)。

2. 2 西红花酸对血清中 MDA, LDH, CK 的影响: 心肌细胞中富含 LDH, CK, 当心肌细胞受损后, 心肌细胞膜完整性被破坏, 细胞内 LDH, CK 外漏, 释放入血, 因此血清 LDH, CK 的含量可以反应心肌细胞的损伤程度。同时心肌细胞膜脂质过氧化使得产生的脂质过氧化产物 MDA 进入血液, 可以检测心肌细胞膜过氧化的情况。与正常组比较, 模型组血

清 MDA, LDH, CK 分别升高了 52. 93%, 33. 46%, 69. 87%; 复方丹参组与模型组比较分别降低了 19. 51%, 12. 85%, 29. 37%。西红花酸高、中、低剂量组与模型组比较分别降低了 20. 91%, 14. 53%, 37. 63%; 20. 56%, 13. 28%, 35. 51%; 17. 54%, 11. 38%, 29. 13%。其中高、中剂量各项指标与模型组比较有非常显著性差异 (*P* < 0. 01), 两者的保护作用好于低剂量组。结果见表 1。

2. 3 西红花酸对心肌匀浆 MDA; GSH-Px; Na⁺, K⁺-ATPase; Ca²⁺, Mg²⁺-ATPase 的影响: 大剂量 sc ISO 后, 心脏组织 MDA 含量显著上升, 相对于正常组升高了 40% (*P* < 0. 01), 而 GSH-Px 与 Na⁺, K⁺-ATPase; Ca²⁺, Mg²⁺-ATPase 的活性下降, 相对于正常组分别下降了 46%, 57%, 60%, 而西红花酸各组对 ISO 引起的心肌组织 MDA 含量升高以及 GSH-Px; Na⁺, K⁺-ATPase; Ca²⁺, Mg²⁺-ATPase 酶活性降低都有一定的逆转作用, 其中西红花酸高、中剂量组的效果要好于低剂量组。结果见表 2。

2. 4 病理改变: 心肌组织经 10% 甲醛溶液固定, 常规取材, 脱水, 石蜡包埋, 制片 (4 μm 厚), HE 染色, 在光学显微镜下观察。正常组心内膜内皮完整, 间质结缔组织内未见炎细胞浸润, 无水肿及纤维结

表 1 西红花酸对 ISO 引起的心肌缺血大鼠血浆中 MDA, LDH, CK 水平及对大鼠心脏指数的影响 ($\bar{x} \pm s$, *n* = 8)

Table 1 Effect of crocetin on level of MDA, LDH, CK in serum and cardiac index of myocardial ischemia rats induced by ISO ($\bar{x} \pm s$, *n* = 8)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	MDA/(nmol·mL ⁻¹)	LDH/(U·L ⁻¹)	CK/(U·L ⁻¹)	心脏指数
正常	-	5. 63±0. 55	3 114±585	82. 80±19. 44	3. 55±1. 04
模型	-	8. 61±1. 35 ^{△△}	4 156±281 ^{△△}	141. 38±40. 88 ^{△△}	4. 96±0. 29 ^{△△}
西红花酸	100	6. 81±0. 51 [*] *	3 553±499 [*] *	88. 18±22. 13 [*] *	4. 54±0. 34 [*] *
	50	6. 84±0. 91 [*] *	3 605±512 [*] *	91. 17±12. 86 [*] *	4. 57±0. 34 [*] *
	25	7. 10±0. 69 [*] *	3 683±553 [*] *	100. 20±24. 08 [*] *	4. 99±0. 59
丹参	5 000	6. 93±0. 69 [*] *	3 622±461 [*] *	99. 86±12. 55 [*] *	4. 58±0. 33 [*] *

与正常组比较: ^{△△}*P* < 0. 01; 与模型组比较: ^{*}*P* < 0. 05 ^{**}*P* < 0. 01

^{△△}*P* < 0. 01 *vs* normal group; ^{*}*P* < 0. 05 ^{**}*P* < 0. 01 *vs* model group

表 2 西红花酸对 ISO 所致心肌缺血大鼠心肌匀浆中 MDA 含量及 GSH-Px; Na⁺, K⁺-ATPase; Ca²⁺, Mg²⁺-ATPase 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, *n* = 8)

Table 2 Effect of crocetin on level of MDA and activities of GSH-Px; Na⁺, K⁺-ATPase; Ca²⁺, Mg²⁺-ATPase in myocardial homogenate of myocardial ischemia rats induced by ISO ($\bar{x} \pm s$, *n* = 8)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	MDA/(nmol·mg ⁻¹)	Na ⁺ , K ⁺ -ATPase/(U·mg ⁻¹)	Ca ²⁺ , Mg ²⁺ -ATPase/(U·mg ⁻¹)	GSH-Px/(U·mg ⁻¹)
正常	-	3. 04±0. 56	1. 45±0. 29	1. 45±0. 32	25. 00±5. 78
模型	-	4. 25±0. 49 ^{△△}	0. 63±0. 21 ^{△△}	0. 58±0. 18 ^{△△}	13. 44±2. 64 ^{△△}
西红花酸	100	3. 37±0. 37 [*] *	0. 98±0. 21 [*] *	0. 91±0. 22 [*] *	18. 90±5. 37 [*] *
	50	2. 91±0. 51 [*] *	0. 92±0. 19 [*] *	0. 87±0. 20 [*] *	18. 70±6. 58 [*] *
	25	3. 60±0. 41 [*] *	0. 92±0. 27 [*] *	0. 82±0. 22 [*] *	15. 75±6. 44
丹参	5 000	3. 65±0. 52 [*] *	0. 92±0. 13 [*] *	0. 86±0. 11 [*] *	17. 99±5. 59 [*] *

与正常组比较: ^{△△}*P* < 0. 01; 与模型组比较: ^{*}*P* < 0. 05 ^{**}*P* < 0. 01

^{△△}*P* < 0. 01 *vs* normal group; ^{*}*P* < 0. 05 ^{**}*P* < 0. 01 *vs* model group

缔组织增生; 心肌细胞横纹清晰, 核居中, 间质未见血管扩张及炎细胞浸润; 心外膜内皮完整, 无渗出物被覆及炎细胞浸润。而模型组心内膜内皮不完整, 可见大片心肌细胞变性坏死, 间质内大量淋巴细胞、巨噬细胞弥漫性浸润。西红花酸的高、中、低剂量组心内膜内皮不完整, 可见散在心肌细胞变性坏死, 间质内多少不等的淋巴细胞、巨噬细胞浸润, 间质未见血管扩张。丹参组情况与此类似。

3 讨论

ISO 可产生类应激反应, 过量可导致心肌坏死^[6]。在临床心绞痛发作及心肌梗死时常有明显的应激反应。研究已经证实 sc 大剂量 ISO 所造成的大鼠心肌梗死样损害的模型, 其心电图演变、心肌代谢改变及组织病理学 (包括超微结构) 变化均与动脉粥样硬化大鼠和人类自然发生的急性心肌梗死非常接近, 并对 ISO 引起的损伤机制提出相对缺血缺氧学说, 膜通透性改变、自由基损伤等观点, 因此该模型在一定程度上比冠脉结扎模型更具有优越性, 更具有实际意义^[7]。

在实验中观察到, 模型组的血清 LDH, CK 活性, 心肌 MDA 含量和心脏系数 (心脏水肿程度) 等明显升高, 与正常组比较均有显著差异, 提示 ISO 导致心肌损伤时出现心肌细胞损伤, 产生大量的自由基诱发心肌细胞膜脂质过氧化增加, 同时观察到心肌中 GSH-Px; Na^+ , K^+ -ATPase; Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase 活性降低, 这表明 ISO 引起心肌损伤后, 心肌抗氧化系统清除自由基的能力降低, 心肌能量代谢障碍等。

心肌缺血期间产生的自由基引发生物膜脂质过氧化损伤, 是造成细胞膜上的 ATP 失活、离子转运障碍的主要原因之一。近年的研究表明, 心肌肌膜 Na^+ , K^+ -ATPase 酶活性和 Na^+ - Ca^{2+} 交换活性对维持细胞内钙浓度恒定也有重要的意义。 Na^+ , K^+ -ATPase 酶活性下降会引起胞内 Na^+ 超负荷, 进而使胞浆内 Ca^{2+} 超载。 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase 酶活性下降则主要导致细胞内外 Ca^{2+} , Mg^{2+} 分布失

衡, 细胞内 Ca^{2+} 聚集, 同时由于 Na^{2+} , K^+ -ATPase 酶受到抑制, Na^{2+} - Ca^{2+} 交换下降, 细胞内 Ca^{2+} 超载而导致心肌细胞受损, 甚至死亡。GSH-Px 是体内重要的抗氧化酶, 对细胞结构和功能的完整具有保护作用。冠心病患者随着病情的发展, MDA 升高而 GSH-Px 活性降低, 并有研究表明在应激状态下, GSH-Px 的消耗先于 MDA 的增加, 过氧化反应增强导致了 GSH-Px 活性的降低。

本实验研究发现西红花酸能够降低心肌缺血过程中 MDA 含量, 提高 Na^+ , K^+ -ATPase; Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase 的活性, 提示西红花酸可通过减少脂质过氧化, 维持细胞膜的完整性而发挥保护作用。此外西红花酸提高心肌组织中抗氧化酶 GSH-Px 的活性, 从而提高心肌细胞抗氧化损伤的能力。更为重要的是西红花酸还可以显著的增加冠脉流量以及加强氧从心肌非缺血区向缺血区域的扩散, 以此对抗 ISO 诱发的交感兴奋、代谢增强而导致的缺血性损伤, 改善心肌缺血状态^[7, 8]。由此可见西红花酸通过清除自由基、抗脂质过氧化、稳定细胞膜和抗心肌缺血多种途径对 ISO 诱导的大鼠心肌损伤起到良好的保护作用。西红花酸与其他单纯的抗氧化比较具有明显的优势, 是一个很有前途的抗心肌缺血药物。

References:

- [1] Rona G, Chappel C, Batatz T A. An infarction myocardial lesion and other toxic manifestations produced by isoproterenol in the rat [J]. *Arch Pathol*, 1959, 67: 443-468.
- [2] Nimmla C, Puvanakrishnan R. Protective role of curcumin against isoproterenol induced myocardial infarction in rats [J]. *Mol Cell Biochem*, 1996, 159 (2): 85-93.
- [3] Blasing L E, Zipper J, Muschick P, et al. Absolute and relative myocardial ischemia by isoproterenol overdosage [J]. *Biomed Biochim Acta*, 1985, 44: S1641-S1649.
- [4] Kondo T, Ogawa Y, Sugiyama S. Mechanism of isoproterenol induced myocardial damage [J]. *Cardiovasc Res*, 1987, 21: 248-254.
- [5] Gao W Y, Zhu D Y. Reviews of *Crocus sativus* L. ingredients and related pharmacology [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1999, 30 (5): 389-391.
- [6] Rona G, Boutet M, Huttenner I. Repersution injury, a possible link between catecholamine-induced and ischemia myocardial alteration [J]. *Adv Myocardiol*, 1983, 4: 427-439.
- [7] Wexler B C, Judd J T. Acute myocardial histopathology in normal and arteriosclerotic rats during isoproterenol infarction [J]. *Br J Exp Pathol*, 1970, 51: 646-652.

欢迎订阅《中草药》杂志 2002 年增刊

为了加快中药现代化的进程, 交流中药指纹图谱研究的经验, 讨论入世后我国中药产业面临的挑战和对策, 本刊在 2002 年 10 月底出版以“中药现代化”和“中药指纹图谱”为主要内容的增刊。欢迎广大读者直接向《中草药》杂志编辑部订阅。定价: 60.00 元, 另加 5.00 元邮费, 款到寄刊。

本刊另有 1996—2001 年增刊, 欢迎订阅。

编辑部地址: 天津市南开区鞍山西道 308 号

邮编: 300193 电话: (022) 27474913 23006821 传真: (022) 23006821 E-mail: zcyzzbjb@tjipr.com

References: