

• 药理与临床 •

氧化苦参碱心肌保护作用及其作用靶点的研究

孙宏丽, 商 蕾, 初文峰, 霍 蓉, 刘 艳, 杨宝峰*

(哈尔滨医科大学 药理教研室 黑龙江省生物医药重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:目的 研究氧化苦参碱对心肌缺血的保护作用,并进一步探讨其可能的作用靶点。方法 采用结扎大鼠左冠状动脉前降支制备急性心肌梗死模型,观察氧化苦参碱对心肌梗死的保护作用;应用 TUNEL 法检测氧化苦参碱对心肌梗死大鼠心肌细胞凋亡指数的影响;应用半定量逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 研究氧化苦参碱对急性心肌梗死大鼠心肌 L 型 Ca^{2+} 通道蛋白 mRNA 表达的作用。结果 氧化苦参碱大、中、小剂量 (20、10、5 mg/kg) 组均可缩小心肌梗死面积;氧化苦参碱大、中剂量能明显提高血清 SOD 活力、降低 MDA 水平;TUNEL 法证实氧化苦参碱可降低心肌细胞凋亡指数;RT-PCR 检测结果表明,急性心肌梗死大鼠心肌 L 型 Ca^{2+} 通道蛋白 α_{1C} mRNA 表达水平明显高于假手术组 ($P < 0.01$),经氧化苦参碱治疗后,心肌 L 型 Ca^{2+} 通道蛋白 α_{1C} mRNA 表达降低 ($P < 0.05$)。结论 氧化苦参碱对大鼠急性心肌梗死具有保护作用,其机制可能与抑制脂质过氧化,降低大鼠心肌 L 型 Ca^{2+} 通道蛋白 α_{1C} mRNA 表达,从而抑制心肌细胞凋亡有关。

关键词:氧化苦参碱;心肌梗死;L 型 Ca^{2+} 通道蛋白 α_{1C}

中图分类号:R286.2

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)01-0069-04

Cardioprotective effects and their action targets of oxymatrine

SUN Hong-li, SHANG Lei, CHU Wen-feng, HUO Rong, LIU Yan, YANG Bao-feng

(Department of Pharmacology, Bio-pharmaceutical Key Laboratory of Heilongjiang Province—Cultivation Base, State Key Laboratory Co-established by Province and Ministry, Harbin Medical University, Harbin 150086, China)

Abstract: Objective To investigate the protective effects of oxymatrine on myocardial ischemia and further explore their underlying targets. **Methods** The effects of oxymatrine on myocardial ischemia were observed by a model of acute myocardial infarction due to permanent ligation of left anterior descending coronary artery in rats. The apoptotic index of cardiomyocyte was detected by terminal deoxynucleotid transferase directed d-UTP nick and end labeling (TUNEL) assay. RT-PCR technique was utilized to study the action of oxymatrine on expression of L-type calcium channel protein α_{1C} mRNA in the cardiomyocytes of rats. **Results** Oxymatrine could decrease infarct area of myocardium at the dose of 5, 10, and 20 mg/kg. Oxymatrine could also increase SOD activity, reduce MDA content in serum, and attenuate myocyte apoptosis. The results of RT-PCR showed the expression of L-type calcium channel protein α_{1C} mRNA in model rats was markedly increased (compared with that in Sham-operation rats) ($P < 0.01$), and after treatment with oxymatrine, the expression of L-type calcium channel protein α_{1C} mRNA was lower than that in model rats ($P < 0.05$). **Conclusion** Oxymatrine possesses protective action on myocardial infarction of rats. The possible mechanisms of anti-ischemia are attributed to decreasing the expression of L-type calcium channel protein α_{1C} mRNA in ventricular myocytes of rats and further inhibiting cardiomyocyte apoptosis.

Key words: oxymatrine; myocardial infarction; L-type calcium channel protein α_{1C}

氧化苦参碱 (oxymatrine) 是从豆科槐属植物苦豆子 *Sophora alopecuroides* L. 中提取的一种苦参型生物碱。基础及临床研究发现,氧化苦参碱具有抗炎、抗过敏、抗心律失常、保肝、抗病毒等多方面药

理作用。关于氧化苦参碱药理作用机制的研究,多集中在抗肝炎及抗肿瘤方面,已有许多实验证实,氧化苦参碱对多种原因诱导的肝细胞凋亡具有抑制作用^[1];另有研究表明^[2],氧化苦参碱有明显的清除羟

收稿日期:2006-05-12

基金项目:国家自然科学基金重点项目 (30430780); 哈尔滨医科大学研究生创新基金

作者简介:孙宏丽 (1974—), 女, 山东省昌乐县人, 博士研究生, 副教授, 主要从事心血管药理学研究。

* 通讯作者 杨宝峰 Tel: (0451) 86671354 E-mail: yangbf@ems.brbm.u.edu.cn

自由基的作用。但关于氧化苦参碱对心血管系统相关疾病的研究鲜有报道,虽然已有实验证实氧化苦参碱能对抗乌头碱、BaCl₂、冠脉结扎和 CaCl₂-Ach 混合液诱发的心律失常,认为其抗心律失常的机制是多方面的,但关于氧化苦参碱抗心律失常作用机制的研究也只局限在对 Na⁺通道的影响上;关于氧化苦参碱抗心肌缺血作用方面的研究,国内外罕见报道,经本室研究证实^[3],氧化苦参碱对豚鼠心室肌细胞膜电压依赖性钙通道有明显抑制作用,由此推测氧化苦参碱可能具有抗心肌缺血作用。因为在心肌缺血时,钙超载和细胞凋亡是造成心肌损伤的重要因素。因此本实验通过结扎大鼠左冠状动脉前降支造成急性心肌缺血模型,观察氧化苦参碱对急性心肌缺血的保护作用,并初步探讨其可能的作用靶点。

1 材料与方法

1.1 动物、药品、试剂和主要仪器:健康 Wistar 大鼠,体重 200~250 g,雌雄兼用,由哈尔滨医科大学实验动物中心提供。氧化苦参碱购自陕西慧科植物开发有限公司,质量分数 98.42%;超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所;TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒购自德国 Roche 公司;Trizol 为 Gibco 公司产品;RT 试剂盒为 Invitrogen 公司产品;Taq 酶为上海生工产品;引物由上海生工合成。PCR 扩增仪(BIO-RAD,美国),低温高速离心机(Jouan BR4i,德国),稳压稳流电泳仪(BIO-RAD,美国),凝胶成像系统(BIO-RAD,美国)。

1.2 心肌缺血模型的制备^[4]:雄性 Wistar 大鼠,戊巴比妥钠 40 mg/kg 麻醉后仰位固定,气管插管接呼吸机。将针形电极插入四肢皮下,连接心电图机,记录标准 II 导联心电图。沿胸骨左缘 3~4 肋间开胸,暴露心脏,在左冠状动脉前降支距左心耳下缘 1~2 mm 处穿线,15 min 后取心电图正常者随机分成 5 组:假手术组,冠状动脉下穿线不结扎;模型组,结扎左冠状动脉前降支,以心电图 ST 段明显上抬,结扎线以下心肌颜色变暗为心肌缺血标志;氧化苦参碱小、中、大剂量组,分别 iv 氧化苦参碱 5、10、20 mg/kg,10 min 后,结扎左冠状动脉前降支。

1.3 心肌梗死面积的测定:结扎左冠状动脉前降支 6 h 后立即取出心脏,剪下左室,每隔 2 mm 将心肌横切成片,放入 1% TTC 磷酸缓冲液(pH 7.4)中,37℃水浴避光染色 10 min 后,剪下梗死心肌称质量,以梗死心肌占左室质量比为梗死百分率。

1.4 血清 SOD 活力和 MDA 水平的测定:各组动物于冠脉结扎 6 h 后颈总动脉取血,离心制备血清,按试剂盒操作方法测定 SOD 活力和 MDA 水平。

1.5 凋亡指数的检测:采用原位末端脱氧核糖核酸转移酶介导的 d-UTP 缺口末端标记(TUNEL)法检测心肌细胞凋亡指数,根据凋亡阳性细胞分布情况,在 400×高倍视野下,每张切片于梗死区周围选择 6 个无重叠视野,计算细胞凋亡指数。

凋亡指数=凋亡阳性的细胞核数/总计数的细胞核数×100%

1.6 RT-PCR 检测

1.6.1 心肌组织总 RNA 的提取:采用 Trizol 法(每 50~100 mg 组织加入 Trizol 1 mL),提取右心室肌组织总 RNA,-80℃保存备用。各总 RNA 样本 A₂₆₀/A₂₈₀值均为 1.8~2.0。

1.6.2 扩增引物设计与合成:根据 Genebank 的序列,用 Primer 5.0 软件分别设计 β-actin 和 L 型 Ca²⁺通道 α_{1C}引物。β-actin 引物序列为上游引物:5'-AGGCCCTCTGAACCCTAAG-3';下游引物:5'-TGCCACAGGATTCCATACCC-3'。L 型 Ca²⁺通道 α_{1C}引物序列为上游引物:5'-TGACTACC-TGACTAGGGATTG-3';下游引物:5'-GCTT-CATGCTGGTCCTCT-3'。

1.6.3 逆转录和扩增反应:测定总 RNA 浓度,取 200 ng 参照 RT 试剂盒说明书进行逆转录反应合成 cDNA 第一链。双重 PCR 反应体系 50 μL:10×buffer 5.0 μL,MgCl₂ 3.0 μL,dNTP 0.4 μL,β-actin 上游引物及下游引物各 2.0 μL,L 型 Ca²⁺通道 α_{1C}上游引物及下游引物各 2.0 μL,cDNA 4.0 μL,Taq 酶 1.0 μL,去离子水 28.6 μL,混匀后离心数秒,置 PCR 仪上,反应条件为 94℃变性 30 s,51.5℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,进行 30 次 PCR 循环。

1.6.4 PCR 产物检测及结果分析:将 PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳,电泳结束后,置凝胶图像处理系统下拍照,α_{1C}产物为 362 bp,β-actin 产物为 500 bp。用凝胶图像处理系统记录 α_{1C}和 β-actin 产物为电泳带的密度,计算比值,进行半定量分析。

1.7 统计分析:数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 *t*-检验进行差异的显著性检验,双尾概率 *P*<0.05,认为具有显著性意义。

2 结果

2.1 氧化苦参碱对急性心肌缺血大鼠心肌梗死面积的影响:模型组梗死面积与假手术组相比具有显著差异(*P*<0.01),表明急性心肌梗死模型建立成

功。当预先给予氧化苦参碱后再结扎冠状动脉,结果显示氧化苦参碱各剂量(5、10、20 mg/kg)均可降低心肌梗死面积,结果见表 1,说明氧化苦参碱能缩小缺血心肌梗死范围,对大鼠急性心肌缺血具有保护作用。

表 1 氧化苦参碱对急性心肌梗死大鼠心肌梗死面积的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Effect of oxymatrine on infarct area of myocardium in acute myocardial ischemia rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	动物/ 只	梗死区质量/ g	左室质量/ g	梗死百分率/ %
假手术	—	12	0	0.39±0.07	0
模型	—	10	0.138±0.024 ^{##}	0.42±0.06	35±7 ^{##}
氧化苦参碱	5	10	0.108±0.020 ^{**}	0.38±0.05	29±5 [*]
	10	11	0.104±0.014 ^{**}	0.37±0.07	27±4 ^{**}
	20	11	0.102±0.017 ^{**}	0.38±0.04	27±4 ^{**}

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

2.2 氧化苦参碱对血清 SOD 活性和 MDA 水平的影响:结果显示模型组大鼠血清中 SOD 水平明显低于假手术组 ($P<0.01$),MDA 水平明显高于假手术组 ($P<0.01$),表明急性心肌缺血时可产生大量氧自由基导致心肌损伤。氧化苦参碱 10、20 mg/kg 剂量组血清中 SOD 水平明显高于模型组 ($P<0.05$),而 MDA 水平明显低于模型组 ($P<0.01$),说明氧化苦参碱能够提高血清 SOD 活力,降低 MDA 水平,从而保护氧自由基引起的心肌损伤,具有抗脂质过氧化作用,结果见表 2。

表 2 氧化苦参碱对急性心肌梗死大鼠血清 SOD 活力及 MDA 水平的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Effect of oxymatrine on SOD activity and MDA level in serum of acute myocardial ischemia rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	动物/ 只	SOD/ (U·μL ⁻¹)	MDA/ (nmol·mL ⁻¹)
假手术	—	12	0.21±0.04	2.5±0.8
模型	—	10	0.15±0.04 ^{##}	5.1±1.7 ^{##}
氧化苦参碱	5	10	0.17±0.04 [#]	3.5±0.9 ^{**}
	10	11	0.18±0.03 ^{**}	2.7±0.8 ^{**}
	20	11	0.19±0.03 [*]	2.7±0.8 ^{**}

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

2.3 氧化苦参碱对急性心肌梗死大鼠心肌细胞凋亡指数的影响:假手术组未发现心肌细胞凋亡,心肌

细胞核呈蓝色,模型组可见大量心肌细胞凋亡,凋亡的心肌细胞核在 TUNEL 染色 DAB 显色时呈深浅不一的棕褐色,氧化苦参碱治疗组心肌细胞凋亡指数明显减少 ($P<0.05$),说明氧化苦参碱可以降低心肌细胞凋亡指数,从而保护心肌。结果见表 3。

表 3 氧化苦参碱对急性心肌梗死大鼠心肌细胞凋亡指数的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Table 3 Effect of oxymatrine on apoptotic index of cardio-myocytes of acute myocardial ischemia rats ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	凋亡指数/%
假手术	—	2.5±0.8
模型	—	26.0±7.0 ^{##}
氧化苦参碱	10	18.0±6.0 ^{##*}

与假手术组比较: ^{##} $P<0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P<0.05$
^{##} $P<0.01$ vs Sham group; ^{*} $P<0.05$ vs model group

2.4 氧化苦参碱对急性心肌梗死大鼠心肌 L 型 Ca²⁺通道蛋白 α_{1C} mRNA 表达的影响:以大鼠心肌总 RNA 为模板,在同一反应体系中以特异性引物同时扩增 L 型 Ca²⁺通道 α_{1C}和 β-actin 的特异片段,在 2% 琼脂糖凝胶电泳后可见在 362 bp 处及 500 bp 处各出现 1 条带,与预期的目的条带位置相符,PCR 产物电泳后置凝胶图像处理系统下进行泳道分析,结果显示模型组大鼠心肌 L 型 Ca²⁺通道蛋白 α_{1C} mRNA 表达量显著高于假手术组 ($P<0.01$);氧化苦参碱大、中剂量组同模型组比较表达量有所降低 ($P<0.05$)。结果见表 4 及图 1。

表 4 氧化苦参碱对急性心肌梗死大鼠心肌 L 型 Ca²⁺通道蛋白 α_{1C} mRNA 表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

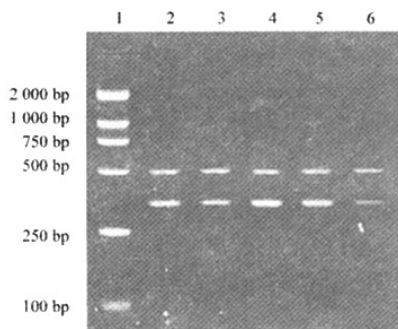
Table 4 Effect of oxymatrine on expression of L-type calcium channel protein α_{1C} mRNA in myocardium of acute myocardial ischemia rats ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	α _{1C} /β-actin
假手术	—	0.77±0.06
模型	—	1.18±0.05 ^{##}
氧化苦参碱	5	1.12±0.09
	10	0.87±0.11 ^{**}
	20	1.01±0.11 [*]

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

3 讨论

心肌缺血、缺氧时不仅可产生大量的氧自由基,同时由于 SOD 活性的降低,无法清除过多的氧自由基,结果使自由基上的活跃电子与多种生物大分子发生脂质过氧化反应,导致大分子变性失活,造成



1-Marker DL2000 2~4-氧化苦参碱 (20,10,5 mg/kg) 组
5-模型组 6-假手术组
1-Marker DL2000 2—4-oxymatrine (20, 10, and 5 mg/kg)
groups 5-model group 6-Sham group

图 1 PCR 产物电泳图

Fig. 1 Electrophoretogram of PCR product

生物膜损伤,同时使过氧化物 MDA 增高。因此,氧化应激对心肌损伤的程度可通过内源性抗氧化酶 SOD 活性及 MDA 水平的变化间接评定^[6]。本实验结果表明,氧化苦参碱能缩小左冠状动脉前降支结扎大鼠心肌梗死范围,提高血清 SOD 活力,降低其 MDA 水平,提示氧化苦参碱可能通过抑制脂质过氧化过程,并提高内源性抗氧化酶 SOD 活性而减轻氧自由基对心肌的损伤。

Kajstura 等^[6]研究认溪细胞凋亡是心肌缺血时心肌损伤的主要形式,心肌缺血导致机体抗氧化能力下降,使氧自由基在体内积聚,一方面损伤细胞膜结构,使细胞膜通透性增加;另一方面可能损伤线粒体等膜结构和功能,引起细胞内钙稳态的失衡,从而激活了细胞凋亡机制,导致细胞凋亡的发生。心肌细胞凋亡决定了心肌梗死面积的大小。本实验结果发现,缺血 6 h 后,在模型组梗死心肌周围出现了凋亡的心肌细胞,心肌细胞凋亡指数较假手术组明显增加,而氧化苦参碱对心肌缺血所诱发的心肌细胞凋亡具有明显的抑制作用,能明显降低心肌细胞凋亡指数,这提示氧化苦参碱对缺血心肌的保护作用可能部分是通过减少心肌细胞凋亡来实现的。

为进一步探讨氧化苦参碱抑制心肌细胞凋亡的机制,研究其潜在的作用靶点,应用 RT-PCR 方法观察了氧化苦参碱对大鼠心肌细胞膜上 L 型 Ca^{2+} 通道蛋白 α_{1C} mRNA 表达的影响。心肌缺血时,由于

能量代谢障碍,钙通道的特性发生了改变,细胞外 Ca^{2+} 通过细胞膜上的 L-型钙通道大量内流,同时通过钙介导的钙释放 (CICR)^[7] 机制使肌浆网 (SR) 内的 Ca^{2+} 也大量释放,致使细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 明显升高。 Ca^{2+} 的增加将会激活细胞凋亡的信号转导途径,促进细胞凋亡启动基因的表达,使凋亡抑制因子的功能受到影响,最终产生细胞不可逆性损伤,由此可见在心肌缺血过程中,细胞内 Ca^{2+} 超载是引起心肌细胞损伤的重要机制之一。本研究结果显示氧化苦参碱对急性心肌缺血大鼠心肌细胞膜上 L 型 Ca^{2+} 通道蛋白 α_{1C} mRNA 表达的增高具有抑制作用,以往的研究结果^[3] 表明氧化苦参碱对高 K^+ 去极化引起的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高具有明显的降低作用,这就提示氧化苦参碱可能通过抑制大鼠心肌细胞膜上 L 型 Ca^{2+} 通道蛋白 mRNA 的表达,影响 L-型钙通道的功能,抑制外 Ca^{2+} 内流,进而降低 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 而发挥抗凋亡作用的。

本实验表明氧化苦参碱对缺血心肌具有保护作用,其作用机制可能与抗脂质过氧化,抑制大鼠心肌细胞膜上 L 型 Ca^{2+} 通道蛋白 mRNA 表达,使外钙内流减少,进而使 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 降低,从而抑制心肌细胞的凋亡有关。本研究阐明了氧化苦参碱新的药理作用,这将为氧化苦参碱的临床应用提供可靠的实验依据。

References:

- [1] Xiang X X, Wang G J, Cai X, *et al.* Effect of oxymatrine on murine fulminant hepatitis and hepatocyte apoptosis [J]. *Chin Med J*, 2002, 115(4): 593-596.
- [2] Tian X H, Cong J B, Sun C P, *et al.* ESR Study on the effects of oxymatrine on scavenging hydroxyl radical and protecting 5'-TMP against irradiation [J]. *J Prev Med Chin PLA* (解放军预防医学杂志), 1996, 14(6): 412-415.
- [3] Sun H L, Xu C Q, Li Z, *et al.* Effect of oxymatrine on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in single ventricular myocyte of guinea pig [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2004, 39(4): 264-266.
- [4] Liu Y, Xu C Q, Jiao J D, *et al.* $\text{M}_3\text{-R}/\text{IKM}_3$ a new target of antiarrhythmic agents [J]. *Acta Pharm Sin* (药理学学报), 2005, 40(1): 8-12.
- [5] Hammond B, Hess M L. The oxygen free radical system: potential mediator of myocardial injury [J]. *J Am Coll Cardiol*, 1985, 6(1): 215-220.
- [6] Kajstura J, Cheng W, Reiss K, *et al.* Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats [J]. *Lab Invest*, 1996, 74(1): 86-107.
- [7] Berridge M J. Elementary and global aspects of calcium signaling [J]. *J Physiol*, 1997, 499(2): 291-306.