

红花黄色素缓解大鼠心肌缺血的作用

吴伟,金鸣*,朴永哲,李金荣

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

摘要:目的 研究红花黄色素(SY)对异丙肾上腺素(ISO)诱发的大鼠心肌缺血的作用。方法 多次 ip ISO 造成大鼠心肌缺血模型;观察大鼠血压、I 导联心电图 J 点的改变和出现 T 波倒置的阳性率,以及光镜下心肌组织形态学的变化;荧光素酶生物发光法测定心肌组织 ATP 量;硫代巴比妥酸比色法测量心肌组织丙二醛(MDA)量;Falholt 法测定血浆脂肪酸(FFA)量。结果 SY 可明显抑制 ISO 诱发的大鼠心肌缺血所致最大收缩压、平均收缩压、平均动脉压降低;缓解心肌缺血导致的心肌 MDA、血浆 FFA 水平升高及心肌 ATP 量的降低,同时 SY 还可减少心肌缺血后心电图出现 T 波倒置的阳性率($P < 0.05$);但对大鼠心电图 J 点抬高和缺血心肌细胞组织形态学变化未见明显改善。结论 SY 具有缓解大鼠心肌缺血的作用。

关键词:红花黄色素;心肌缺血;异丙肾上腺素(ISO);血压

中图分类号:R286.2

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)09-1373-03

Inhibition of safflor yellow against myocardial ischemia injury of rats

WU Wei, JIN Ming, PIAO Yong-zhe, LI Jin-rong

(Beijing Anzhen Hospital Affiliated to Capital University of Medical Science-Beijing Institute of Heart Lung and Blood Vessel Diseases, Beijing 100029, China)

Key words: safflor yellow (SY); myocardial ischemia; isoprenaline (ISO); blood pressure

心肌缺血是心绞痛、心肌梗死等冠心病发生的重要原因。红花作为常用的活血化瘀药,在临床中主要用于治疗冠心病、脑血栓等疾病。文献报道 iv 红花黄色素Ⅰ可以明显减慢心率,且对结扎冠状动脉前降支所致急性心肌梗死大鼠心电图 ST 段的抬高具缓解作用^[1];红花注射液可使急性心肌缺血大鼠的血浆心肌酶与 MDA 水平明显降低,血清 SOD 活性升高,显著减小心肌梗死面积,并改善主要血液流变学指标^[2]。为了阐明红花活血化瘀的药理机制,本实验观察了红花水溶性有效部位红花黄色素(safflor yellow, SY)抗大鼠心肌缺血的作用。

1 材料

1.1 动物:Wistar 大鼠,雄性,体重 206~262 g,北京维通利华公司,清洁级,合格证号:SCXX(京 2002-0003)。

1.2 药品与试剂:SY 采用大孔树脂柱色谱法制备,HPLC 面积归一化法分析结果表明其羟基红花黄色素 A 质量分数为 83%^[3]。盐酸异丙肾上腺素(ISO),上海大众药业有限公司;盐酸普萘洛尔,天津力生制药股份有限公司;ATP 测定所用试剂盒购自中国科学院上海植物生理研究所;四己氧基丙烷

(TEP),FLUKA 公司;牛血清白蛋白,上海丽珠东风生物技术有限公司;硫代巴比妥酸(TBA)为国产生物试剂经活性炭脱色、重结晶处理;其余试剂均为国产分析纯。

1.3 仪器:MedLab 生物信号采集处理系统,南京美易科技有限公司;AT-6 型心电图机,瑞典 SCHILLER 公司;WDD-1 发光测试仪,北京第二光学仪器厂;UV755B 分光光度计,上海分析仪器总厂。

2 方法

2.1 给药方案及手术过程:取大鼠依体重均衡随机分为 6 组即正常组、模型组、SY 高、中、低剂量(180、270、360 mg/kg)组、盐酸普萘洛尔(4 mg/kg)组。各组 ip 给予相应药物,30 min 后另侧 ip ISO 5 mg/kg;正常组两侧 ip 均为 NS。术前给药 2 d,每天上、下午各 1 次;第 3 天以乌拉坦 1.2 g/kg 麻醉动物,将联有 MedLab 生物信号采集系统且充满 1% 肝素/NS 的聚四氟乙烯管插入右侧颈总动脉约 2 cm,此时屏幕显示血压变化波形,固定该管,并经导管注入 1% 肝素/NS 13 mg/kg,血压波形稳定 10 min 后,记录第 1 批血压数据,每次测量取 5

收稿日期:2006-12-03

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30171146)

作者简介:吴伟(1972-),男,助理研究员。Tel: (010) 64456481 E-mail: tailless@tom.com

*通讯作者 金鸣 Tel: (010) 64456308

个波形的平均值,3 次测量值的 $\bar{x} \pm s$ 为一个数据;同时以 100 mm/s 纸速记录第 1 次标准肢体 I 导联心电图。给药组 ip 给药 1 次,15 min 后记录第 2 批血压数据及第 2 次心电图;给药 25 min 后于另侧 ip ISO 50 mg/kg, 5 min 后记录第 3 批血压数据及第 3 次心电图。记录末次心电图后,颈总动脉取血离心后留取血浆冷冻备用;迅速开胸取心脏,以 4 ℃ NS 洗净揩干后剪取心尖组织,置 4% 中性福尔马林溶液固定,石蜡包埋切片后 HE 染色,光镜下观察心肌组织形态学变化;取剩余心室分成两份, -30 ℃ 冷冻备用。

2.2 心肌 ATP 的测定:取上述心室肌剪碎,氮冷却下研成粉末,称质量后立即加 1 mL 丙酮,室温放置 15 min,90 ℃ 水浴中约 4 min 挥干丙酮,加入 5 mL 2 mmol/L $MgSO_4$,沸水煮 15 min 后冷却,1 000×g 离心 10 min,取上清即得样品。参考试剂盒说明书所附生物发光法测定样品 ATP 的量。

2.3 心肌 MDA 测定:取上述心室肌,冰水中匀浆,100×g 离心 5 min,取上清即为样品,并以牛血清白蛋白为标准用双缩脲法测蛋白量。0.4 mL 样品加入双蒸水 0.25 mL,20% pH 3.5 醋酸缓冲液 0.75 mL,

加入 8.1% SDS 水溶液 0.1 mL 和 0.67% TBA 水溶液 0.5 mL,混匀,沸水煮 45 min 后冷却,1 000×g 离心 10 min,取上清于 535 nm 测吸光度(A)值,以 5×10^5 mol/L TEP 为标准计算 MDA 的量。

2.4 血浆脂肪酸(FFA)的测定:参照文献方法^[4]并加以适当改进,其中提取液的比例为氯仿-正庚烷-甲醇(49:49:2),以 5×10^{-4} mol/L 棕榈酸为标准计算 FFA 的量。

2.5 统计分析:数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料采用方差分析 Q 检验,计数资料进行 χ^2 检验,使用统计软件 SPSS 8.0 进行统计学处理。

3 结果

3.1 SY 缓解 ISO 诱导大鼠心肌缺血产生的血压下降:以下实验第 3 天 ip ISO 前后所测得血压数据的差值来表示各项指标的变化。表 1 可知,与正常组相比模型组 ip ISO 后最大收缩压、最小舒张压、平均收缩压、平均舒张压、平均动脉压均明显下降;盐酸普萘洛尔和高剂量 SY 可明显抑制 ISO 诱发的血压降低作用。此外,盐酸普萘洛尔还可使平均收缩间期和平均舒张间期延长。

3.2 SY 对 ISO 所致的大鼠心电图改变的作用:表 2

表 1 SY 缓解 ISO 诱导大鼠心肌缺血产生的血压下降作用 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Remitment of SY against blood pressure decrease after myocardial ischemia injury in rats induced by ISO ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	动物/ 只	最大收缩压/ mmHg	最小舒张压/ mmHg	平均收缩压/ mmHg	平均舒张压/ mmHg	平均动脉压/ mmHg	平均脉压差/ mmHg	平均收缩间 期/ms	平均舒张间 期/ms
正常	—	9	-1.64±9.34	-1.08±12.34	-1.17±9.74	-1.07±12.24	-1.91±7.83	-0.08±5.24	0.20±0.96	2.44±10.40
模型	—	10	34.62±11.79 $\Delta\Delta\Delta$	34.98±7.38 $\Delta\Delta\Delta$	34.43±11.10 $\Delta\Delta\Delta$	35.32±7.66 $\Delta\Delta\Delta$	16.84±10.69 $\Delta\Delta\Delta$	0.85±8.06	0.49±1.90	10.97±7.41
SY	180	11	29.46±11.14	33.98±10.90	30.25±10.38	35.08±11.63	19.18±18.74	-4.79±9.78	3.13±3.35	14.73±10.39
	270	10	28.27±6.52	33.30±9.06	29.00±5.90	33.55±8.79	12.37±7.51	-4.58±6.83	1.68±0.65	13.67±5.63
	360	10	24.18±7.71*	26.51±8.34	24.88±6.98*	27.11±8.32	5.04±9.52	-2.16±5.34	2.38±2.31	22.63±13.15
盐酸普萘洛尔	4	9	22.54±17.95*	27.14±19.52	24.08±18.26*	26.84±19.74	0.34±8.45**	-2.81±6.46	10.01±8.28***	75.85±28.09***

与正常组比较, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$; 与模型组比较, * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

$\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ vs normal group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group

结果表明,模型组比正常组 J 点有明显升高,同时出现 T 波倒置的例数明显增多;盐酸普萘洛尔组对上述两种心电图改变均未见缓解,SY 组随剂量增加缓解作用有增强的趋势,但仅高剂量组降低 T 波倒置阳性率的作用具有统计学意义。

3.3 SY 对 ISO 所致的心肌缺血大鼠组织形态学改变的影响:与正常组相比,其他各组心肌组织中心肌细胞排列紊乱,间质肿胀并有淋巴细胞浸润,发生了细胞变性。SY 与盐酸普萘洛尔对 ISO 诱发的缺血心肌细胞组织形态学变化未见明显改善。

3.4 SY 缓解 ISO 诱导大鼠心肌缺血产生的 MDA、FFA 升高、ATP 降低的影响:表 3 结果显示,与正常组相比模型组心肌组织 MDA 水平明显

表 2 SY 对 ISO 所致的大鼠心电图改变的作用 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of SY against changes of electrocardiogram after myocardial ischemia injury in rats induced by ISO ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	动物/只	J 点抬高/mV	T 波倒置率/%
正常	—	9	0.022±0.026	—
模型	—	11	0.216±0.103 $\Delta\Delta\Delta$	81.8 $\Delta\Delta\Delta$
SY	180	12	0.192±0.126	66.7
	270	14	0.164±0.143	50
	360	13	0.162±0.126	38.5*
盐酸普萘洛尔	4	10	0.208±0.101	60

与正常组比较, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$; 与模型组比较, * $P < 0.05$

$\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ vs normal group; * $P < 0.05$ vs model group

升高、ATP 水平降低、血浆 FFA 水平升高;给药组可明显缓解 ISO 诱发的这种作用。

表 3 SY 对 ISO 诱导的大鼠心肌缺血大鼠 MDA、FFA、ATP 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)Table 3 Effect of SY on levels of MDA, FFA, and ATP after myocardial ischemia injury in rats induced by ISO ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	动物/ 只	MDA/ (μmol · g ⁻¹)	FFA/ (mmol · L ⁻¹)	ATP/ (μmol · g ⁻¹)
正常	—	9	4.53 ± 0.70	0.707 ± 0.180	0.740 ± 0.260
模型	—	10	8.22 ± 1.34 ^{△△△}	1.061 ± 0.169 ^{△△△}	0.428 ± 0.205 ^{△△}
SY	180	11	6.75 ± 0.45 ^{***}	0.844 ± 0.201 ^{**}	0.521 ± 0.200
	270	10	6.51 ± 0.89 ^{***}	0.858 ± 0.194 [*]	0.430 ± 0.133
	360	10	5.62 ± 0.54 ^{***}	0.757 ± 0.173 ^{***}	0.649 ± 0.225 [*]
盐酸普萘洛尔	4	9	5.23 ± 0.51 ^{***}	0.806 ± 0.152 ^{**}	0.649 ± 0.231 [*]

与正常组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$ $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ 与模型组比较: $*P < 0.05$ $**P < 0.01$ $***P < 0.001$ $\Delta\Delta P < 0.01$ $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ vs normal group $*P < 0.05$ $**P < 0.01$ $***P < 0.001$ vs model group

4 讨论

大剂量 ISO 可诱导大鼠心肌缺血性损伤,其缺血性损伤的渐进性及心肌酶学变化均与人类急性心肌梗死的病变特征类似^[5,6]。ISO 通过兴奋 β 受体,激活血管内皮 cAMP 系统而开放钙通道,使细胞内游离 Ca^{2+} 浓度增加,并加强氧自由基的生成;而氧自由基引起的膜脂质过氧化损伤反应,产生 MDA,又促使细胞膜对 Ca^{2+} 的通透性增加,进一步加剧细胞内钙聚集,由此形成恶性循环,造成血管内皮损伤,而血管内皮的损害可以诱发血栓形成,从而引起急性心肌梗死。此外,ISO 使心收缩力增强,心率加快,心肌耗氧量增加并降低冠脉灌注压、影响心肌血液供应也是造成心肌缺血性损伤的原因之一。

ISO 可使收缩压升高,舒张压降低,但持续大剂量 ISO 会造成心肌组织不可逆损伤,使心肌收缩力降低导致收缩压,舒张压同时下降;心电图 J 点抬高并出现 T 波低平或倒置现象;在有氧条件下 FFA 是心肌主要能源,而在心肌缺血时有氧代谢受抑制,无氧酵解成为主要能量来源,因此血中 FFA 明显升高,此外,ISO 与 β 受体结合可促进脂肪动员也是 FFA 升高的原因之一;当缺血时间过长,ATP 消耗超过心肌能量储备时便出现 ATP 明显下降。

本实验结果中 SY 与 β 受体拮抗剂盐酸普萘洛尔同样具有缓解心肌缺血导致的收缩压降低、心肌组织中 ATP 降低、MDA 升高、血浆中 FFA 升高的作用,同时研究发现 SY 具有拮抗大鼠心肌细胞膜

中 β 受体的作用,这提示 SY 拮抗 β 受体作用可能是缓解心肌缺血的机制之一。

据文献报道,SY 具有抑制小鼠肝匀浆 MDA 升高,抗氧化作用^[7]。本实验结果中 SY 可缓解缺血心肌组织中 MDA 升高,提示抗氧自由基作用也可能是其缓解心肌缺血的机制之一。

此外,据文献报道,SY 具有改善大鼠离体心脏的心肌能量代谢^[8],缓解大鼠低灌注离体心脏的心率及冠状动脉流量的下降作用^[9]。本实验结果表明,SY 可缓解缺血心肌组织中 ATP 降低、血浆中 FFA 升高,并可缓解心肌缺血导致的收缩压降低,减少 T 波倒置发生率等缺血性心电图改变,提示改善心肌能量代谢和冠状动脉供血可能是 SY 缓解心肌缺血的机制之一。

综上所述,SY 缓解心肌缺血的作用机制可能为多种机制的综合效应。SY 缓解心肌缺血的其他作用机制及不同的作用机制在治疗过程中的相互作用,还有待于进一步研究。

References:

- [1] Cheng D B, Liu J G, Guan Y F. Effect of safflor yellow II on acute myocardial ischemia in dogs [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2000, 16(5): 590-591.
- [2] Liao H, Hao B. Study of the protective effect of *Flos Carthami* injection on acute myocardial ischemia and its mechanism in rats [J]. *China Pharm* (中国药房), 2003, 14(5): 269-271.
- [3] Jin M, Gao Z C, Li J R, et al. Preparation of safflor yellow and hydroxysafflor yellow A by macroporous resin column chromatography [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(1): 25-28.
- [4] Ye Y W, Li J Z, Wang Y C. *Clinical Laboratory Diagnosis* (临床实验诊断学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1991.
- [5] Yu Y, Tang J, Wang D Y, et al. Protective effect of taurine on rat's myocardial injury induced by isoproterenol [J]. *Chin J Pathophysiol* (中国病理生理杂志), 1991, 7(6): 566.
- [6] Lu X D, Dong C R. Dynamic heart function was detected on rat's myocardial infarction induced by isoproterenol [J]. *Chin J Pathophysiol* (中国病理生理杂志), 1992, 8(1): 58.
- [7] Jin M, Li J R, Wu W. Study on the antioxidative effect of safflor yellow [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2004, 29(5): 447-449.
- [8] Piao Y Z, Jin M, Zang B X, et al. Study of safflower yellow on improving energetic metabolism in hypoxic myocardium of rats [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(5): 436-439.
- [9] Piao Y Z, Jin M, Zang B X, et al. Study on the protective effect of safflower yellow against rat myocardial ischemia [J]. *J Cardiovasc Pulm Dis* (心肺血管病杂志), 2002, 21(4): 225-228.