

参考文献:

- [1] Devi R, Sharma D K. Hypolipidemic effect of different extracts of *Clerodendron colebrookianum* Walp in normal and high fat diet fed rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2004, 90: 63-68
- [2] Menon V P, Sudheer A R. Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2007, 595: 105-125
- [3] 余美荣, 蒋福升, 丁志山. 姜黄素的研究进展 [J]. 中草药, 2009, 40(5): 828-831
- [4] Aggarwal B B, Sundaram C, Malani N, et al. Curcumin: the Indian solid gold [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2007, 595: 1-75
- [5] 谌 辉, 张景辉, 刘文琪. 姜黄素抗血吸虫病肝纤维化及其机制的实验研究 [J]. 中草药, 2009, 40(8): 1274-1277
- [6] Zhang Y, Xie M L, Zhu L J, et al. Therapeutic effect of osthole on hyperlipidemic fatty liver in rats [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2007, 28: 398-403
- [7] 倪鸿昌, 李 俊, 金 涌, 等. 大鼠实验性高脂血症和高脂血症性脂肪肝模型研究 [J]. 中国药理学通报, 2004, 20(6): 703-706
- [8] 任永丽, 徐宗佩, 梁汝圣, 等. 姜黄素防治脂肪肝病模型剂量关系及安全性的研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2008, 35(11): 1735-1755
- [9] Rector R S, Thyfault J P, Wei Y Z, et al. Nonalcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome: An update [J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14: 185-192

蒺藜皂苷后处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用

李 莹, 宋宏宇, 张羽冠, 于丽芳, 张 爽, 李 红*, 杨世杰
(吉林大学白求恩医学院 药理学系, 吉林 长春 130021)

摘要:目的 探讨蒺藜皂苷(GSTT)后处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用。方法 56只大鼠随机分为假手术组、缺血再灌注模型组、缺血后处理组、阳性药尼可地尔10 mg/kg组、GSTT(100、30、10 mg/kg)组。采用结扎大鼠心脏左冠状动脉前降支的方法,制备心肌缺血再灌注损伤模型,分离血清,采用分光光度法测定乳酸脱氢酶(LDH)、丙二醛(MDA)水平和超氧化物歧化酶(SOD)的活性,ELISA法测定血清中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和白细胞介素6(IL-6)的量。光学显微镜下观察受损心肌病理组织学改变,采用TUNEL法检测心肌细胞凋亡情况。结果 与模型组比较,GSTT 100、30 mg/kg组LDH、MDA、TNF- α 和IL-6的量明显降低,SOD的活性明显升高($P < 0.01$),凋亡细胞数量明显减少($P < 0.01$),心肌组织形态明显改善。结论 再灌注同时ip GSTT进行药物后处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤具有保护作用,能减少自由基生成,抑制心肌细胞凋亡。

关键词:蒺藜皂苷; 心肌缺血再灌注损伤; 缺血后处理; 药物后处理

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)08-1326-04

蒺藜皂苷(GSTT)是蒺藜的有效成分,主要包括螺甾醇和呔甾醇两类。研究发现,GSTT具有降血压,调血脂,降血糖,抗动脉粥样硬化,阻止动脉、心肌和肝脏的脂质沉着,改善血液流变学指标,抗缺氧,抗衰老和增强性功能,舒张血管,抗心肌缺血再灌注损伤及脑缺血再灌注损伤等作用^[1-4]。目前对其的研究多在预适应方面,其对缺血后处理的作用尚未见报道。本研究旨在观察在体情况下,再灌注同时ip GSTT进行药物后处理,探讨其对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用,为临床治疗心肌缺血再灌注损伤提供理论依据。

1 材料与与方法

1.1 药品、试剂与仪器:蒺藜皂苷(GSTT)由吉林敖东洮南药业股份有限公司提供,质量分数>90%;乌拉坦,中国医药集团上海化学试剂公司;尼可地

尔,购自长春大政国际经贸集团制药有限公司;乳酸脱氢酶(LDH)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)检测试剂盒,均购自南京建成生物工程研究所;肿瘤坏死因子 α (TNF- α)及白细胞介素-6(IL-6)试剂盒(R&D,200908)。TECAN A-5082酶标仪,Austria;恒温水浴箱,北京医疗设备厂;6010-紫外分光光度计,安捷伦上海分析仪器厂;LDZ4-1.8型低速自动平衡离心机,北京雷勃尔离心机有限公司。

1.2 动物:清洁级Wistar大鼠,体质量200~220g,雌雄兼用,由吉林大学白求恩医学院实验动物中心提供,合格证号:SCXK(吉)2007-0003。

1.3 模型制备:Wistar大鼠,以20%乌拉坦(5 mL/kg)ip麻醉,仰卧位固定,切开气管,用动物呼吸机机械通气,参数为:呼吸频率75次/min,潮气

* 收稿日期:2010-03-10

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30472020,30672654);高校博士点基金资助项目(2005183129)

作者简介:李 莹(1988-),女,吉林长春人。Tel:13029117908 E-mail:jessica_li_ok@126.com

* 通讯作者 李 红 Tel:(0431)85619483 E-mail:lhong@jlu.edu.cn jcyali@sina.com.cn

量 9 mL/kg, 呼吸比 1: 2。四肢皮下接心电图机, 稳定 5 min 后, 记录一段正常心电图作为对照。于胸骨左侧 2 mm 切开皮肤, 在第四肋间隙用眼科剪向下分离肋间肌, 向上伸入血管钳夹闭两侧肋间肌以减少出血。剪断 3、4 肋骨, 用拉钩拉开胸壁, 在两侧胸壁肌肉分别穿一双线留小圈在内侧。小心剪开心包膜, 暴露心脏。以左冠状静脉主干为标志, 在左心耳下缘 3~4 mm 处以缝合针进针, 斜向右上方肺动脉圆锥方向出针。待呼吸平稳 10 min 后收紧结扎线, 压迫左冠状动脉前降支。冠状动脉结扎 30 min 后轻拉松结扎线, 恢复血液灌注。分别在正常状态下, 穿线及结扎后测量心电图, 以确定模型成立。

1.4 实验分组: 56 只大鼠随机分成 7 组, 每组 8 只, 分别为假手术组: 冠状动脉下穿线不结扎, 缺血再灌注模型组: 缺血 30 min, 再灌 120 min, 缺血后处理组: 缺血 30 min, 再灌 30 s, 缺血 30 s, 反复 3 次, 再灌 120 min, GSTT (100、30、10 mg/kg) 组: 缺血 30 min, 再灌 120 min, 再灌起始时分别 ip GSTT 100、30、10 mg/kg, 尼可地尔组: 缺血 30 min, 再灌 120 min, 再灌起始时 ip 尼可地尔 1 mg/kg。

1.5 血清生化指标测定: 于再灌注结束时经腹主动脉取血, 3 000 r/min 离心 10 min, 分离血清。按试剂盒说明书采用分光光度法检测血清 MDA、LDH 水平及 SOD 活性。

1.6 TNF- α 与 IL-6 的测定: 于再灌注结束时经腹主动脉取血, 3 000 r/min 离心 10 min, 分离血清, 按 ELISA 试剂盒说明书检测血清 TNF- α 与 IL-6 水平。

1.7 病理组织切片测定: 再灌注结束后迅速摘取心脏, 置于 4% 多聚甲醛中固定过夜。心尖上约 3 mm 处纵向切取左室心肌约 0.3 cm \times 0.5 cm。进行常规石蜡包埋, 切片, 染色, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封片, 光镜观察。

1.8 心肌组织凋亡检测 (TUNEL 法): 心肌组织切片常规脱蜡水化, 按试剂盒操作说明进行 TUNEL 染色, 成色反应后, 常规脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封片。光镜下观察细胞核中有棕黄色颗粒者为 TUNEL 阳性细胞, 在 400 \times 显微镜下, 于缺血处心肌组织随机采集 5 个非重叠视野, 检测 100 个心肌细胞中 TUNEL 阳性细胞数, 取其平均值。

1.9 统计分析: 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 10.0 统计软件对实验数据进行方差分析。

2 结果

2.1 对血清生化指标的影响: 与假手术组比较, 模型组血清 MDA、LDH 水平明显升高, SOD 活性明

显降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, GSTT 100、30 mg/kg 和缺血后处理组血清 MDA、LDH 水平降低, SOD 活性明显升高 ($P < 0.05, 0.01$)。结果见表 1。

2.2 对 TNF- α 与 IL-6 水平的影响: 与假手术组比较, 缺血再灌注大鼠血清中 TNF- α 与 IL-6 水平明显升高。与模型组比较, GSTT 100、30、10 mg/kg 对 TNF- α 及 IL-6 分泌均有明显抑制作用 ($P < 0.01$), 结果见图 1。

表 1 GSTT 对心肌缺血再灌注损伤大鼠血清 LDH、MDA、SOD 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effect of GSTT on LDH, MDA, and SOD levels in serum of myocardial ischemia reperfusion injured rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

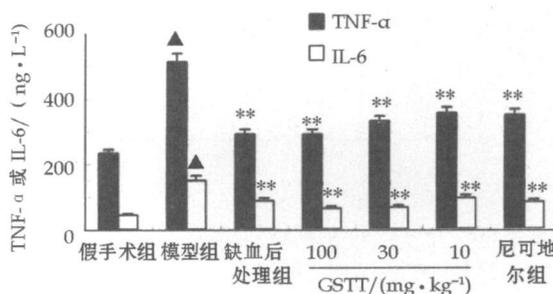
| 组别 | 剂量/(mg \cdot kg ⁻¹) | LDH/(U \cdot mL ⁻¹) | SOD/(U \cdot mL ⁻¹) | MDA/(nmol \cdot L ⁻¹) |
|-------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| 假手术 | - | 3.48 \pm 0.48 | 171.03 \pm 21.99 | 0.89 \pm 0.25 |
| 模型 | - | 4.62 \pm 0.21 [▲] | 101.85 \pm 25.85 [▲] | 10.53 \pm 2.15 [▲] |
| 缺血后处理 | - | 4.02 \pm 0.20 [*] | 139.66 \pm 20.81 ^{**} | 3.31 \pm 1.02 ^{**} |
| GSTT | 100 | 3.44 \pm 0.49 ^{**} | 151.40 \pm 5.17 ^{**} | 2.15 \pm 0.56 ^{**} |
| | 30 | 3.96 \pm 0.31 [*] | 135.38 \pm 10.88 ^{**} | 6.37 \pm 0.98 ^{**} |
| | 10 | 4.13 \pm 0.16 | 125.37 \pm 17.26 | 8.48 \pm 1.11 |
| 尼可地尔 | 1 | 3.83 \pm 0.29 ^{**} | 149.19 \pm 7.16 ^{**} | 5.55 \pm 1.77 ^{**} |

与假手术组比较: [▲] $P < 0.05$

与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$

[▲] $P < 0.05$ vs Sham group

^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group



与假手术组比较: [▲] $P < 0.05$; 与模型组比较: ^{**} $P < 0.01$

[▲] $P < 0.05$ vs Sham group; ^{**} $P < 0.01$ vs model group

图 1 GSTT 对心肌缺血再灌注损伤大鼠血清 TNF- α 和 IL-6 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

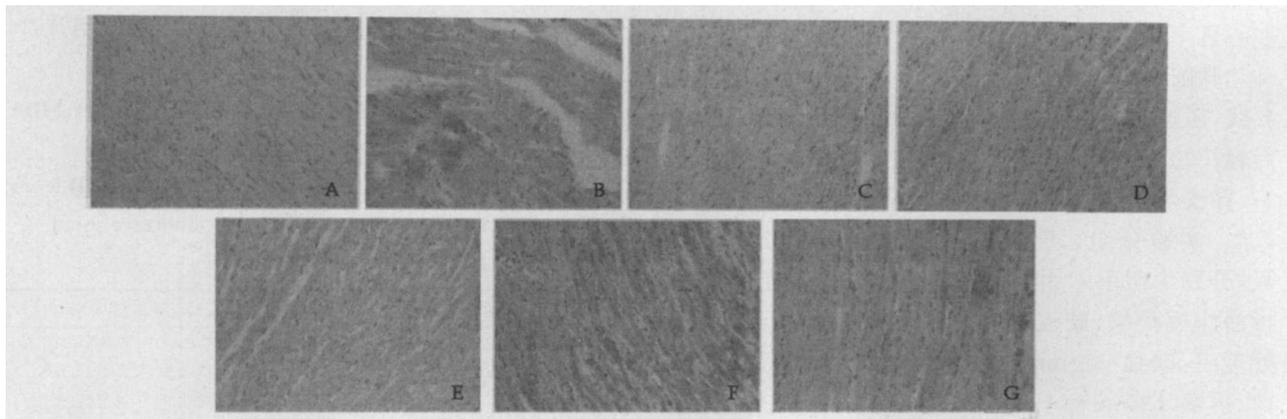
Fig. 1 Effect of GSTT on TNF- α and IL-6 levels in serum of myocardial ischemia reperfusion injured rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

2.3 对心肌组织病理形态学的影响: 光镜下观察, 假手术组心肌纤维排列整齐, 结构清楚, 横纹清晰可见, 细胞核呈长椭圆形, 分布均匀, 心肌细胞无肥大、萎缩或水肿; 模型组心肌细胞间隙增宽, 心肌纤维明显肿胀, 排列紊乱, 可见部分肌纤维断裂, 心肌细胞间可见大量散在的红细胞和部分成片红细胞渗出,

心肌间质出现大量炎细胞浸润,可见肌浆凝聚;缺血后处理组及 GSTT 100、30 mg/kg 组心肌细胞排列相对规则,界限清楚,心肌纤维轻度肿胀,红细胞明显少于模型组,偶见成纤维细胞及炎细胞浸润;阳性对照药尼可地尔组偶见肌浆凝聚,炎细胞浸润不明显。

2.4 对心肌细胞凋亡的影响:光镜下观察细胞核中

有棕黄色颗粒者为阳性细胞,假手术组可见少量凋亡细胞,说明正常细胞存在凋亡,但凋亡率小于 10%。与假手术组比较,模型组 TUNEL 染色阳性细胞数明显增多 ($P < 0.01$);与模型组比较,GSTT 100、30 mg/kg 组、后处理组和阳性药组 TUNEL 染色阳性细胞数明显减少 ($P < 0.05, 0.01$)。结果见图 2 和 3。



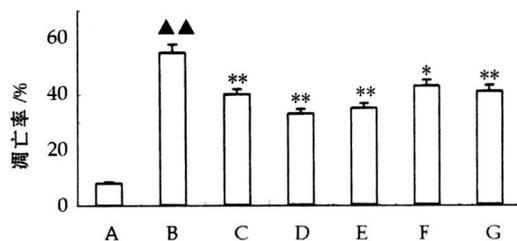
A 假手术组 B 模型组 C 缺血后处理组 D~ F GSTT 100、30、10 mg · kg⁻¹组 G 尼可地尔组

A Sham group B model group C ischemia post-conditioning group

D~F GSTT 100, 30, and 10 mg · kg⁻¹ group G Nicorandil group

图 2 GSTT 对心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌组织形态学的影响

Fig. 2 Effect of GSTT on histomorphology change of cardiac muscle of myocardial ischemia reperfusion injured rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)



A 假手术组 B 模型组 C 缺血后处理组

D~ F GSTT 100、30、10 mg · kg⁻¹组 G 尼可地尔组

A Sham group B model group C ischemia post-conditioning group

D~F GSTT 100, 30, and 10 mg · kg⁻¹ group

G Nicorandil group

与假手术组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

$\Delta\Delta P < 0.01$ vs Sham group

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

图 3 GSTT 对心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌细胞凋亡的影响

Fig. 3 Effect of GSTT on myocardium apoptosis of myocardial ischemia reperfusion injured rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

3 讨论

心肌缺血性疾病是目前临床上发生率最高的急症之一,进行血运重建可显著降低其死亡率,但潜在

的再灌注损伤可能会引起心肌细胞坏死、凋亡、心肌顿抑及无复流现象,成为影响预后的一个重要因素。研究显示^[5-6],在闭塞的冠脉血管完全开放、心肌组织实现完全再灌注之前,间断少许开放冠脉血流,直至最后完全的开放血流,对于再灌注损伤具有干预作用,心肌组织可以得到一定的保护,即缺血后处理具有保护作用。与缺血预适应相比,缺血后处理在实施上有更好的可预测性及可控性,因此具有较好的临床应用前景^[7]。尽管这种机械后处理是一种新的治疗理念和手段,但具有潜在的危险,临床应用有限。经过探索发现^[8-9],在完全恢复血流前,不采用机械后处理办法,而使用模拟内源性保护机制的药物——即药物后处理 (pharmacological post-conditioning),对心肌缺血再灌注损伤具有类似缺血后处理的保护作用,可避免反复机械刺激导致的严重问题。

GSTT 为临床上常用的抗心脑血管疾病药物,本实验室的前期研究发现,GSTT 预适应对心肌缺血再灌注损伤具有保护作用^[10],故本实验进一步探讨 GSTT 后处理对缺血再灌注损伤是否具有保护作用。本实验结果显示心肌缺血再灌注损伤大鼠给予 GSTT 药物后处理能明显降低血清 MDA、LDH 的水平,并提高 SOD 的活力,病理形态学及

TUNEL 检测均显示,应用 GSTT 后,心肌组织损伤减轻,心肌细胞凋亡率下降。揭示在再灌注的同时外源性给予 GSTT 可增强机体清除氧自由基的能力,减轻细胞膜脂质过氧化损伤,提高机体的抗氧化能力,从而发挥药物后处理的保护作用。

研究发现,细胞因子参与了缺血再灌注损伤的发生与发展。受损的心肌细胞会分泌 T 炎症性因子,诱导心肌细胞凋亡,进一步加重细胞损伤。本实验结果显示,缺血再灌后血清中 TNF- α 、IL-6 升高,与文献报道一致^[11]。而 GSTT 可显著抑制损伤心肌细胞分泌 TNF- α 、IL-6,减轻再灌注对细胞膜损伤程度,进一步揭示了 GSTT 后处理可抑制缺血再灌注导致的心肌细胞凋亡。

综上所述,GSTT 后处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤具有保护作用,能减少自由基生成,减少炎症因子分泌,抑制心肌细胞凋亡,其具体的作用机制有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 李红,冯彩霞,关凤英,等. 蒺藜皂苷对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 吉林大学学报:医学版,2009,35(5):794-797.
- [2] 孙巍,李晶莹,李红,等. 蒺藜皂苷对缺血心肌细胞内核转录因子 κ B的作用[J]. 中草药,2008,39(6):889-892.
- [3] Wang S S, Ji Y S, Li H, et al. Mechanisms of gross saponins of *Tribulus terrestris* via activating PKC ϵ against myo-

cardial apoptosis induced by oxidative stress[J]. *Acta Pharm Sin*, 2009, 44(2): 134-139.

- [4] 姜惠平,苏学今,李红,等. 蒺藜皂苷对 H₂O₂ 诱导 PC12 细胞凋亡保护作用及其机制研究[J]. 中草药,2008,39(9):1368-1371.
- [5] Zhao Z Q, Corvera J S, Halkos M E, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic preconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, 285(2): 579-588.
- [6] Zhu M, Feng J, Lucchinetti E, et al. Ischemic preconditioning protects remodeled myocardium via the PI3K-PKB/Akt reperfusion injury salvage kinase pathway[J]. *Cardiovasc Res*, 2006, 72(1): 152-162.
- [7] Kloner R A, Rezkalla S H. Preconditioning, postconditioning and their application to clinical cardiology[J]. *Cardiovasc Res*, 2006, 70(2): 297-307.
- [8] Yao Y, Li L, Li L, et al. Sevoflurane postconditioning protects chronically infarcted rat hearts against ischemia reperfusion injury by activation of pro-survival kinases and inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening upon reperfusion[J]. *Biol Pharm Bull*, 2009, 32(11): 1854-1861.
- [9] Hönisch A, Theuring N, Ebner B, et al. Postconditioning with levosimendan reduces the infarct size involving the PI3K pathway and KATP-channel activation but is independent of PDE-III inhibition[J]. *Basic Res Cardiol*, 2010, 105(2): 155-167.
- [10] 张爽,李红,魏征人,等. 蒺藜皂苷预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤大鼠心功能的影响[J]. 中草药,2010,41(6):959-963.
- [11] 程江霞,彭晓红,秦汉,等. 缺血后处理对大鼠心肌缺血再灌注时血清 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 浓度的影响[J]. 武汉大学学报:医学版,2008,29(5):576-577.

龙须菜藻红蛋白对 H₂₂ 荷瘤小鼠免疫功能的影响

陈美珍,杜虹,徐本杰*

(汕头大学理学院 生物系,广东 汕头 515063)

摘要:目的 研究龙须菜藻红蛋白体内抑瘤效应与荷瘤小鼠机体免疫功能的关系,探讨其抑瘤作用的细胞免疫学机制。方法 建立小鼠 H₂₂ 肝癌实体瘤模型,分别 ig 给予藻红蛋白高、中、低剂量。连续给药 7 d 后,测定各组小鼠肿瘤生长抑制率和腹腔巨噬细胞的吞噬指数,采用 MTT 法检测各组小鼠脾淋巴细胞增殖指数、NK 细胞免疫活性和肿瘤坏死因子(TNF- α)的分泌。结果 高剂量藻红蛋白对小鼠 H₂₂ 肿瘤的生长抑制率明显高于模型组($P < 0.05$),抑瘤率为 30.23%;与模型组比较,藻红蛋白对荷瘤小鼠胸腺和脾脏有保护和修复作用,具有显著提高腹腔巨噬细胞的吞噬指数($P < 0.05$)、脾淋巴细胞增殖指数($P < 0.01$)、NK 细胞对靶细胞的杀伤活性($P < 0.01$)和增加脾淋巴细胞分泌 TNF- α 的作用($P < 0.05$)。结论 龙须菜藻红蛋白可明显提高 H₂₂ 荷瘤小鼠细胞免疫功能,这可能是其抗肿瘤效应机制之一。

关键词: 龙须菜藻红蛋白; 抗肿瘤; 细胞免疫

中图分类号: R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)08-1329-04

龙须菜 *Gracilaria lemaneiformis* Weber van Bosse 是江蓠属红藻。龙须菜在我国已经成为继海

带和紫菜之后的第三大重要养殖藻种,资源十分丰富。至今,龙须菜主要用于提取琼胶,民间多用于入

* 收稿日期: 2009-12-03

基金项目: 广东省科技计划项目(2007A032600003); 汕头市科技计划项目(2006-149)

作者简介: 陈美珍(1956-),女,副教授,硕士生导师,主要研究方向为天然活性物质研究与开发。

Tel: (0754) 82902540 E-mail: chenmz@stu.edu.cn