

聚乙二醇化葛根素对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用

刘新义¹, 李健和¹, 向大雄^{1*}, 易利丹¹, 胡雄彬¹, 叶祖光^{2*}

1. 中南大学湘雅二医院 临床药学研究所, 湖南 长沙 410013

2. 中国中医科学院, 北京 100700

摘要: **目的** 探讨聚乙二醇(PEG)化葛根素对大鼠心肌缺血再灌注损伤(MIRI)的保护作用。**方法** 将SD大鼠随机分为6组(每组10只): 假手术组, MIRI模型组, 葛根素注射剂(20 mg/kg)对照组, PEG化葛根素低、中、高剂量(244、488、976 mg/kg)组。阻断大鼠升主动脉造成心肌缺血30 min, 再灌注120 min, 造成大鼠MIRI模型, 在结扎后5 min各给药组尾iv给药。心电图监测心律失常情况, 再灌注结束后腹主动脉采血, 测定血清肌酸激酶(CK)、乳酸脱氢酶(LDH)、天冬氨酸转氨酶(AST)和丙二醛(MDA)水平, 并测量心肌梗死面积。**结果** 葛根素注射剂和PEG化葛根素均具有抗心律失常, 降低血清中CK、LDH、AST和MDA水平的作用, 减少心肌梗死面积; 其中PEG化葛根素中、高剂量组的药效明显强于葛根素注射剂组。**结论** PEG化葛根素对大鼠MIRI引起的损伤具有保护作用。

关键词: PEG化葛根素; 心肌缺血再灌注损伤; 心肌梗死; 心肌酶; 丙二醛

中图分类号: R282.710.5; R972.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)03-0327-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.03.018

Protection of PEGylated puerarin on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats

LIU Xin-yi¹, LI Jian-he¹, XIANG Da-xiong¹, YI Li-dan¹, HU Xiong-bin¹, YE Zu-guang²

1. Institute of Clinical Pharmacy, The Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410013, China

2. China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

Abstract: **Objective** To investigate the protective effect of PEGylated puerarin on the myocardial ischemia-reperfusion injury (MIRI) in rats. **Methods** Sixty healthy SD rats were randomly divided into six groups: Sham, MIRI model, puerarin injection (20 mg/kg, positive control), low-, mid-, and high-dose PEGylated puerarin (244, 488, and 976 mg/kg) groups. MIRI rat model was carried out by ligation of left anterior descending coronary artery for 30 min followed by reperfusion for 120 min. Different doses of PEGylated puerarin and puerarin injection were given 5 min after the ligation. Concomitant arrhythmias was surveyed by electrocardiogram, and the blood was collected at the end of reperfusion for detecting the changes of creatine kinase (CK), lactic dehydrogenase (LDH), aspartate aminotransferase (AST), and malondialdehyde (MDA). The myocardial infarct size was also estimated. **Results** Both puerarin injection and PEGylated puerarin exhibited the antiarrhythmic activity, decreased the contents of CK, LDH, AST, and MDA, and reduced the myocardial infarct size. The efficacy of mid- and high-dose PEGylated puerarin groups was better than that of puerarin injection group. **Conclusion** PEGylated puerarin exerts the protective effects on MIRI in rats.

Key words: PEGylated puerarin; myocardial ischemia-reperfusion injury; myocardial infarction; myocardial enzyme; malondialdehyde

葛根为豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 的干燥根。葛根素(puerarin)是葛根中的主要活性成分, 具有抗心律失常、抗心肌缺血、抗缺血再灌注损伤等作用, 临床上常用葛根素注射剂治疗和预防冠心病、心绞痛、心肌梗死等多种心脑血管

疾病^[1-5]。虽然葛根素在临床上应用十分广泛, 但其存在水溶性差、半衰期短、急性血管内容血等多种问题。聚乙二醇(PEG)修饰葛根素可使上述问题得到较大改善^[6-7]。但对PEG化葛根素药效的研究还不多见。本实验采用心肌缺血再灌注损伤(MIRI)

收稿日期: 2012-05-17

基金项目: 科技部重大新药创制专项(2009ZX09502-007)

作者简介: 刘新义(1979—), 男, 湖南人, 博士研究生, 主要研究方向为中药新制剂与新技术。

Tel: (0731)85292093 13677306549 E-mail: liuxinyi128@126.com

*通信作者 向大雄 Tel: (0731)85292129 E-mail: xiangdaxiong@163.com

叶祖光 Tel: (010)64014411 E-mail: yezuguang@sina.com

大鼠模型,对PEG化葛根素与葛根素注射剂进行对比研究,探索PEG修饰技术对葛根素药效的影响。

1 材料

1.1 药品与试剂

PEG化葛根素由本实验室合成^[8],HPLC检测其质量分数为97%,临用时用生理盐水配成所需浓度;葛根素注射剂,批号091208,含葛根素50 mg/mL,山东方明药业股份有限公司;生理盐水注射液,四川科伦药业股份有限公司;戊巴比妥钠,武汉大华伟业医药化工集团有限公司。肌酸激酶(CK)、乳酸脱氢酶(LDH)、天冬氨酸转氨酶(AST)、丙二醛(MDA)试剂盒,中生北控生物科技股份有限公司。氯化硝基四氮唑蓝(NBT)染液,上海工硕生物技术有限公司。

1.2 仪器

AMS—300全自动生化分析仪,奥普森科技发展有限公司;UV—1700紫外可见分光光度计,日本岛津公司;2—16PK高速冷冻离心机,德国Sigma公司;Cardiofax ECG—9130P十二导联自动分析心电图机,上海麦森医疗科技有限公司;TKR—200C小型动物呼吸机,江西特力麻醉呼吸设备公司。

1.3 动物

SD大鼠,雄性,体质量250~300 g,由中南大学湘雅二医院实验动物中心提供,许可证号:SCXK(湘)2010-0002。

2 方法

2.1 模型制备

MIRI模型制备参照文献方法^[9-10]并进行改良。SD大鼠以戊巴比妥钠(45 mg/kg)ip麻醉,仰位固定,气管插管,连接小型动物呼吸机,调节呼吸频率为80~90次/min,沿胸骨左缘第2~4肋间隙开胸,自制拉钩拉开肋骨,在距冠状动脉左前降支(LAD)起始部3~4 mm处带线缝合针穿过,将一小段聚乙烯管(直径1.5 mm)置于结扎线下,收紧结扎线阻断LAD血流,造成心肌缺血30 min后(心电图ST段明显抬高或T波高耸),松线再灌注120 min(抬高的ST段下降50%以上或高耸的T波下降^[11])。

2.2 分组与给药

60只大鼠按体质量随机分为6组(每组10只):假手术组大鼠在LAD下穿线但不结扎,尾iv等量生理盐水;模型组大鼠造模后尾iv等量生理盐水;葛根素注射剂对照组大鼠在LAD结扎后5 min尾静脉缓慢注射葛根素20 mg/kg(按临床人常用剂量换

算);PEG化葛根素各给药组大鼠在LAD结扎后5 min,尾静脉缓慢注射PEG化葛根素244、488、976 mg/kg(PEG化葛根素中葛根素的量为4.1%,中剂量折算后与葛根素注射剂等剂量)。

2.3 检测指标

2.3.1 心律失常发生率及ST段变化

以心电图机监测各组大鼠心电的变化,记录再灌注30 min内心律失常出现的时间、持续时间以及室性心动过速(VT)和心室颤动(VF)的发生率^[12],并记录再灌注后30、60、90、120 min ST段变化。

2.3.2 血清CK、LDH、AST和MDA水平

再灌注结束后,打开大鼠腹腔,腹主动脉取血,静置30 min后^[13],离心分离血清,按照试剂盒说明书测定血清中CK、LDH、AST、MDA水平。

2.3.3 心肌梗死面积

实验结束后迅速取出大鼠心脏,磷酸盐缓冲生理盐水冲洗干净后沿冠状沟切除右心室。取左心室称质量,沿心尖到心基部方向平行在结扎线以下将心室切成5片,放入0.1% NBT染液中,37℃孵育10 min。非梗死心肌为蓝色,梗死心肌呈白色,通过Image ProPlus 6.0图像分析软件计算梗死区面积和左心室面积^[14]。

心肌梗死面积比=梗死区面积/左心室面积

2.4 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以SPSS17.0软件进行统计分析,组间比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 对MIRI大鼠心律失常发生率的影响

在心肌缺血30 min再灌注30 min内,模型组大鼠在0.86 min出现心律失常,并持续7.72 min,VT和VF的发生率分别为90%、80%,表明造模成功。葛根素注射剂组和PEG化葛根素各剂量组大鼠心律失常的出现时间明显延迟,持续时间明显缩短,VT和VF的发生率明显减少,其中PEG化葛根素中、高剂量组与葛根素注射剂组相比差异显著($P < 0.05$ 、 0.01)。结果见表1。

3.2 对MIRI大鼠心电图ST段变化的影响

心肌缺血30 min再灌注30、60、90、120 min,模型组大鼠心电图ST段明显抬高;假手术组大鼠ST段几乎未改变;葛根素注射剂组和PEG化葛根素各剂量组大鼠ST段抬高程度明显降低,随时间推移,PEG化葛根素中、高剂量组大鼠ST段降低程度与葛根素注射剂组相比差异显著($P < 0.05$)。结果见表2。

表1 PEG化葛根素对MIRI大鼠心律失常的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 1 Effects of PEGylated puerarin on cardiac arrhythmia in MIRI rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	心律失常出现时间 / min	心律失常持续时间 / min	心律失常发生率 / %	
				VT	VF
假手术	—	—	—	—	—
模型	—	0.86±0.42	7.72±1.63	90	80
PEG化葛根素	244	3.08±1.73 ^{▲▲}	4.15±2.09 [▲]	60 [▲]	40 [▲]
	488	4.54±2.31 ^{▲▲}	2.19±1.27 ^{▲▲*}	30 ^{▲▲*}	10 ^{▲▲*}
	976	5.86±2.75 ^{▲▲**}	1.14±0.96 ^{▲▲**}	10 ^{▲▲**}	0 ^{▲▲**}
葛根素注射剂	20	3.75±1.94 ^{▲▲}	3.08±1.85 [▲]	50 ^{▲▲}	30 ^{▲▲}

与模型组比较: [▲] $P<0.05$ ^{▲▲} $P<0.01$; 与葛根素注射剂组比较: ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$, 下表同[▲] $P<0.05$ ^{▲▲} $P<0.01$ vs model group; ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ vs puerarin injection group, same as below表2 PEG化葛根素对MIRI大鼠心电图ST段变化的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 2 Effects of PEGylated puerarin on ST-elevation of electrocardiogram in MIRI rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	ST段抬高幅度 / mV			
		30 min	60 min	90 min	120 min
假手术	—	0	0	0	0
模型	—	0.32±0.11	0.31±0.09	0.27±0.10	0.26±0.08
PEG化葛根素	244	0.28±0.07 [▲]	0.24±0.09 [▲]	0.21±0.08 [▲]	0.19±0.09 [▲]
	488	0.24±0.08 [▲]	0.18±0.05 [▲]	0.15±0.05 ^{▲*}	0.13±0.03 ^{▲*}
	976	0.22±0.05 [▲]	0.15±0.03 ^{▲▲*}	0.11±0.04 ^{▲▲*}	0.09±0.02 ^{▲▲*}
葛根素注射剂	20	0.23±0.09 [▲]	0.19±0.06 [▲]	0.18±0.10 [▲]	0.16±0.05 [▲]

3.3 对MIRI大鼠血清CK、LDH、AST和MDA水平的影响

与模型组相比, 葛根素注射剂组和PEG化葛根素各剂量组均显著降低MIRI大鼠血清中CK、LDH、AST、MDA水平, 其中PEG化葛根素中、高剂量组与葛根素注射剂组相比差异显著 ($P<0.05$ 、 0.01)。结果见表3。

3.4 对MIRI大鼠梗死面积的影响

与模型组相比, 葛根素注射剂组和PEG化葛根素各剂量组可显著减少MIRI大鼠的心肌梗死面积,

PEG化葛根素中、高剂量组与葛根素注射剂组相比差异显著 ($P<0.05$ 、 0.01)。结果见表4。

4 讨论

心肌缺血是由于冠状动脉痉挛、心肌供血供氧不足导致心肌出现代谢异常的一种病理状态, 可引起心绞痛、心肌梗死等严重心脏疾病^[15]。心肌缺血过程中磷脂酶激活, 产生具有膜活性的游离脂肪酸, 破坏细胞膜; 并有大量儿茶酚胺释放、游离脂肪酸产生以及白细胞释放的自由基, 它们均能导致细胞质膜损伤和通透性增加, 使CK、LDH、AST释放

表3 PEG化葛根素对MIRI大鼠血清CK、LDH、AST和MDA水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 3 Effects of PEGylated puerarin on levels of CK, LDH, AST, and MDA in serum of MIRI rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	CK / (U·L ⁻¹)	LDH / (U·L ⁻¹)	AST / (U·L ⁻¹)	MDA / (mmol·L ⁻¹)
假手术	—	2 947.8±1 445.3	1 814.5± 318.3	476.8±109.6	6.8±2.4
模型	—	5 184.5±1 224.6 ^{△△}	4 624.3± 986.5 ^{△△}	1 187.3±243.7 ^{△△}	11.5±4.1 ^{△△}
PEG化葛根素	244	4 318.4±1 021.5 [▲]	3 312.3±1 015.8 [▲]	832.5±127.4 [▲]	9.2±3.1 [▲]
	488	3 724.8±1 152.5 ^{▲▲*}	2 613.5± 628.4 ^{▲*}	674.3±113.7 ^{▲▲}	7.6±1.8 ^{▲▲*}
	976	3 418.2±1 028.5 ^{▲▲**}	2 487.2± 727.5 ^{▲▲**}	557.2±132.1 ^{▲▲*}	7.3±1.2 ^{▲▲*}
葛根素注射剂	20	3 919.2± 986.4 [▲]	3 118.6± 518.3 [▲]	719.2±132.1 [▲]	8.4±2.9 [▲]

与假手术组比较: ^{△△} $P<0.01$ ^{△△} $P<0.01$ vs Sham group

表4 PEG化葛根素对MIRI大鼠心肌梗死面积的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 4 Effects of PEGylated puerarin on myocardial infarct area in MIRI rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	正常心肌面积 / cm ²	心肌梗死面积 / cm ²	心肌梗死面积比 / %
假手术	—	3.54±0.38	0	0
模型	—	2.62±0.43	1.16±0.31	30.87±7.16
PEG化葛根素	244	2.74±0.51	0.81±0.21 [▲]	23.34±3.21 [▲]
	488	2.85±0.42	0.67±0.18 ^{▲*}	19.11±2.18 ^{▲*}
	976	3.09±0.37	0.62±0.22 ^{▲▲**}	16.82±1.94 ^{**}
葛根素注射剂	20	2.81±0.47	0.76±0.19 [▲]	21.46±3.14 [▲]

入血。再灌注时剧增的氧自由基加重细胞膜的损伤,导致细胞内CK、LDH、AST释放量进一步增加^[16],引起血液中相应酶水平升高,这些酶释放入血的多少与心肌坏死程度呈正相关。此外,心肌缺血时脂质过氧化物MDA量显著增加,体内清除氧自由基的主要酶类SOD活力明显降低^[16]。本研究结果显示,PEG化葛根素与葛根素注射剂均能显著抑制MIRI模型小鼠血清中CK、LDH、AST水平的升高,降低升高的MDA,表明有明显的心肌保护作用。PEG化葛根素对大鼠MIRI的保护作用具有剂量相关性,其中、高剂量的作用明显强于葛根素注射剂,分析原因可能为①PEG化葛根素凭借其“大分子屏障体系”,在很大程度上减少葛根素在体内酶解,从而在体内保留大量葛根素^[17],PEG化葛根素在体内作用时间延长,能较久维持葛根素的血药浓度^[6];②PEG化葛根素在体内可较缓慢地释放葛根素。本实验心电图检测发现,在最初的几分钟内,PEG化葛根素组降低ST段升高的作用明显弱于葛根素注射剂,有些时间点甚至无明显变化,这可能与PEG化葛根素释放的葛根素量少、低于起效浓度有关。但随着体内释放的葛根素的量增多,其药效逐渐增强,以致PEG化葛根素在较高剂量的药效强于葛根素注射剂。本研究结果表明,PEG修饰小分子化合物,可延长药物的体内作用时间,从而提高药效。PEG作为一种新型的高分子载药体系值得在药剂学上大力推广。

参考文献

- [1] 于继强,高尔.葛根素对心脑血管系统药理作用研究进展[J].现代中西医结合杂志,2008,17(24):3880-3882.
- [2] 张环宇,李大伟,史彩虹.葛根素的临床应用研究进展[J].现代药物与临床,2012,27(1):75-78.
- [3] 黄萍,龚永生,范小芳,等.葛根素对低氧高二氧化碳性肺动脉高压大鼠右心室Apelin/APJ系统的影响[J].中草药,2008,39(4):565-569.
- [4] 李娟,胡永华.葛根素对人小细胞肺癌H446细胞周期和相关周期蛋白表达的影响[J].中草药,2008,39(10):1535-1537.
- [5] 王超权.葛根素注射液对急性冠脉综合症非再灌注治疗患者血液流变学的影响[J].中草药,2011,42(3):563-565.
- [6] Liu X Y, Zhi H Y, Du F, et al. A HPLC-UV method for the determination of puerarin in rat plasma after intravenous administration of PEGylated puerarin conjugate [J]. *J Chromatogr B*, 2010, 878(31): 3297-3302.
- [7] Liu X Y, Yu B Y, Wang N J, et al. A validated stability-indicating HPLC method for the determination of PEGylated puerarin in aqueous solutions [J]. *J Chromatogr B*, 2010, 878(23): 2061-2066.
- [8] 高翔,高全,李涛,等.葛根素预处理保护心肌缺血再灌注损伤的机制[J].贵阳医学院学报,2007,32(1):37-41.
- [9] 张玮玮,郭永清.大鼠急性心肌缺血再灌注模型的改进[J].山西医药杂志,2009,38(10):902-903.
- [10] 李晓民,汪克明,刘婧,等.大鼠心肌缺血再灌注模型的有效复制方法[J].中国心血管病研究杂志,2007,5(6):463-464.
- [11] 王黎,于小风,曲绍春,等.复方刺五加注射液对大鼠心肌缺血再灌注心律失常的影响[J].中国中药杂志,2007,32(20):2174-2177.
- [12] 陈冰心,任澎,段明军,等.大鼠心肌缺血再灌注模型构建的改良[J].中国比较医学杂志,2010,20(5):24-28.
- [13] Wu L M, Qiao H X, Li Y K, et al. Protective roles of puerarin and Danshensu on acute ischemic myocardial injury in rats [J]. *Phytomedicine*, 2007, 14(10): 652-658.
- [14] 王艳,周添浓,侯少贞,等.葛根素对大鼠急性心肌缺血的保护作用[J].广东中医药大学学报,2008,25(2):138-141.
- [15] Lum H, Barr D A, Shafer J R. Reoxygenation of endothelial cells increases permeability by oxidant mechanisms [J]. *Circ Res*, 1992, 70(5): 991-993.
- [16] 杨宇杰,程晓亮,吕英超,等.双氢丹酚酸B对大鼠急性心肌缺血的治疗作用[J].中草药,2010,41(3):447-449.
- [17] Khandare J, Minko T. Polymer-drug conjugates: Progress in polymeric prodrugs [J]. *Prog Polym Sci*, 2006, 31(4): 359-397.