

黄精多糖对急性心肌梗死模型大鼠 NF- κ B 介导的炎症反应及心肌组织形态的影响

李 丽¹, 龙子江^{1*}, 黄 静¹, 任振兴¹, 陆松侠¹, 王晓华²

1. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230038

2. 安徽省医学科学研究所, 安徽 合肥 230022

摘要: 目的 观察黄精多糖 (PSP) 对急性心肌梗死 (AMI) 模型大鼠核因子- κ B (NF- κ B) 介导的炎症反应及心肌组织形态的影响, 探讨其对梗死心肌的保护作用及可能机制。方法 采用结扎冠状动脉左前降支的方法制备 AMI 大鼠模型, 假手术组只穿线不结扎, 将造模成功的大鼠随机分为模型组, PSP 高、中、低剂量 (900、450、225 mg/kg) 组, 麝香保心丸组 (12.2 mg/kg), 每组 10 只, 每天 ig 给药 1 次, 连续 4 周。分别记录手术前、手术后即刻及给药 1、3、7、10、14、21、28 d 心电图 S-T 段变化, 采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 测定各组大鼠血清肌酸激酶同工酶 (CKMB)、乳酸脱氢酶 (LDH)、NF- κ B、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6 (IL-6) 的量, 并用 HE 染色观察心肌组织形态病理变化。结果 与模型组比较, PSP 能明显抑制 AMI 模型大鼠心电图 S-T 段的升高; PSP 高、中剂量组大鼠血清 CK-MB、LDH 及 NF- κ B、IL-6、TNF- α 水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 心肌损伤程度明显改善。结论 PSP 能够改善 AMI 模型大鼠的心肌损伤, 减轻炎症反应, 修复缺血心肌, 其机制可能与调节 NF- κ B 介导的炎症反应有关。

关键词: 黄精多糖; 急性心肌梗死; 核因子- κ B; 白细胞介素-6; 肿瘤坏死因子- α ; 炎症反应

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)18-2750-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.18.014

Effect of *Polygonatum sibiricum* polysaccharides on inflammatory reaction mediated by NF- κ B and myocardium tissue morphology in acute myocardial infarction rats

LI Li¹, LONG Zi-jiang¹, HUANG Jing¹, REN Zhen-xing¹, LU Song-xia¹, WANG Xiao-hua²

1. College of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, China

2. Anhui Academy of Medical Sciences, Hefei 230022, China

Abstract: Objective To observe the effect of *Polygonatum sibiricum* polysaccharides (PSP) on the inflammatory reaction mediated by NF- κ B and myocardium tissue morphology in acute myocardial infarction (AMI) rats, and to explore the myocardial protective effect and its mechanisms. **Methods** The AMI model was established by closing the left anterior descending coronary artery of SD rats, Sham group threading without ligation, then the model rats were randomly divided into model group, high-, mid-, low-dose PSP (900, 450, and 225 mg/kg) groups, and positive group (Shexiang protect myocardial pills, 12.2 mg/kg), with 10 rats in each group, ig administered once daily for 28 d. ECG S-T changes were measured before surgery, immediately after surgery, and 1, 3, 7, 10, 14, 21, 28 d after surgery in each group; The levels of inflammatory cytokines IL-6, TNF- α , NF- κ B, CKMB, and LDH in serum were measured by ELISA; The myocardial tissue morphology was measured by HE staining. **Results** Compared with the model group, PSP inhibited S-T segment elevation of ECG in AMI rats; The serum levels of TNF- α , IL-6, NF- κ B, CKMB, and LDH in high- and mid-PSP groups decreased significantly ($P < 0.05$, 0.01), and the degree of myocardial injury was significantly improved. **Conclusion** PSP could improve the myocardial injury, reduce the inflammation, and repair the ischemic myocardium in AMI rats. The mechanisms may be related to regulating the inflammatory reaction mediated by NF- κ B.

Key words: *Polygonatum sibiricum* polysaccharides; acute myocardial infarction; NF- κ B; IL-6; TNF- α ; inflammatory reaction

收稿日期: 2015-03-20

基金项目: 安徽省研究生“千人培养计划”资助项目

作者简介: 李 丽 (1990—), 女, 硕士在读, 研究方向为心脑血管药理学。Tel: 15256063206 E-mail: 451968165@qq.com

*通信作者 龙子江, 男, 教授, 硕士生导师, 研究方向为心脑血管药理学。Tel: (0551)65169216 E-mail: lzjyls@163.com

心肌缺血是指由于心脏血液灌注减少而致心脏供氧减少, 心肌能量代谢不正常, 不能支持心脏正常工作的一种病理状态, 它是多种心脏疾患的初始阶段, 而当心肌出现严重而持久地急性缺血, 冠状动脉发生病变, 最终会发展为急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) [1]。黄精为百合科植物滇黄精 *Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsl.、黄精 *P. sibiricum* Red. 或多花黄精 *P. cyrtomema* Hua 的干燥根茎, 其主要活性成分为黄精多糖 (*Polygonatum sibiricum* polysaccharides, PSP), 有抗肿瘤、抗氧化、抗炎、抗菌、调节血糖及血脂、抗病毒、增强免疫功能及改善记忆等作用 [2-3]。生物活性多糖可以改善模型动物的缺血性损伤程度 [4], 而关于 PSP 抗心肌缺血的报道较少, 因此, 本实验通过观察 AMI 模型大鼠心电图 S-T 值及血清核因子- κ B (NF- κ B)、白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和肌酸激酶同工酶 (CKMB)、乳酸脱氢酶 (LDH) 的变化, 探讨 PSP 对 AMI 大鼠心肌损伤的保护作用及可能机制, 为其临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 药物与主要试剂

黄精购于安徽中医药大学第一附属医院, 并经安徽中医药大学药学院周建理教授鉴定为黄精 *P. sibiricum* Red., PSP (棕黄色粉末) 由安徽省医学科学院提取并检测, 质量分数为 90%, 用蒸馏水配制; 麝香保心丸 (批号 140304, 上海和黄药业有限公司), 临用时用蒸馏水配制。LDH 试剂盒 (批号 E-15124)、CKMB 试剂盒 (批号 E-15022), 南京建成科技有限公司; IL-6 试剂盒 (批号 E-30644)、TNF- α 试剂盒 (批号 E-30633)、NF- κ B p65 试剂盒 (批号 E-30713), 上海源叶生物技术有限公司。

1.2 主要仪器

XD-7100 型心电图仪, 上海医用电子仪器厂; TDZ5-WS 多管架自动平衡离心机, 湖南湘仪离心机仪器有限公司; HX-300 型动物呼吸机, 成都泰盟科技有限公司; Olympus BX5 型光学显微镜, 日本 Olymous 公司; RT-6000 酶标仪, 雷社科学仪器有限公司。

1.3 实验动物

SD 大鼠, 雄性, 体质量 180~220 g, SPF 级, 由安徽省实验动物研究中心提供, 动物生产许可证编号 SCXK (皖) 2011-002。

2 方法

2.1 AMI 大鼠模型制备

大鼠适应性饲养 1 周, 根据参考文献方法 [5] 制备 AMI 模型。乙醚麻醉并固定于手术台上, 记录正常 II 导联心电图, 在胸骨左侧备皮、消毒, 并用手术刀切口, 10 号线荷包缝合以便手术后迅速合胸; 剥离肋间肌肉, 于第 3~4 肋间钝性开胸, 显露心脏; 在左心耳和肺动脉圆锥间找到与左冠状动脉伴行的冠状静脉, 于左心耳下 2~3 mm 处用 6~0 号无损伤缝合线结扎, 进针深度控制在 0.1 cm, 宽度为 0.2~0.3 cm; 将心脏沿肋间隙放回胸腔, 迅速挤出胸腔内气体拉紧荷包缝合线进行结扎, 并缝合切口; 假手术组只穿线不结扎。手术后测 II 导联心电图, 心电图 S-T 段明显抬高或 QRS 波群变宽为模型制备成功的标志, 术后 im 青霉素, 且连续给药 3 d 预防感染。

2.2 分组及给药

将模型制备成功的大鼠随机分为模型组, 麝香保心丸组 (12.2 mg/kg, 阳性药物), PSP 低、中、高剂量 (225、450、900 mg/kg, 其中 225 mg/kg 按黄精临床用量及 PSP 质量分数换算得到) 组, 同时设假手术组, 每组 10 只。各给药组均 ig 给予相应药物, 给药体积为 10 mL/kg, 每天 1 次, 连续 4 周。模型组和假手术组 ig 等体积生理盐水。

2.3 指标检测

2.3.1 心电图监测 分别于手术前、手术后即刻及给药 1、3、7、10、14、21、28 d 测定大鼠 II 导联心电图, 并记录 S-T 段值。

2.3.2 大鼠血清 LDH、CKMB 活性的测定 末次给药 1 h 后, 3.5% 水合氯醛 ip (10 mL/kg) 麻醉大鼠, 腹主动脉取血, 3 000 r/min 离心 15 min, 分离血清, 采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 测定各组大鼠血清 LDH、CKMB 活性。检测步骤严格按照各试剂盒说明书操作。

2.3.3 大鼠血清 NF- κ B、IL-6、TNF- α 水平测定 同“2.3.2”项方法取血、制备血清, 采用 ELISA 法检测, 检测步骤严格按照各试剂盒说明书操作。

2.3.4 HE 染色观察心肌组织形态学 末次给药 1 h 后, 3.5% 水合氯醛麻醉大鼠, 取心脏左心室组织置于 10% 中性甲醛溶液中固定 1 周, 常规梯度脱水、石蜡包埋, 切片, 厚度 5 μ m, 染色。于显微镜下观察各组大鼠心肌组织形态, 并摄片。

2.4 数据分析

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 17.0 软件进行统

计学分析, 定量资料多组间两两比较采用单因素方差分析 (方差齐采用 LSD 检验, 方差不齐者采用 Dunnett *t* 检验)。

3 结果

3.1 对 AMI 模型大鼠心电图 S-T 段值的影响

与假手术组比较, 造模后大鼠 S-T 段明显抬高, 说明模型制备成功; 与模型组比较, 各给药组的 S-T 段均有下降的趋势, 尤其是给药 7 d 后下降趋势更显著, 说明 PSP 对 AMI 模型大鼠心肌损伤有明显改善作用。结果见图 1。

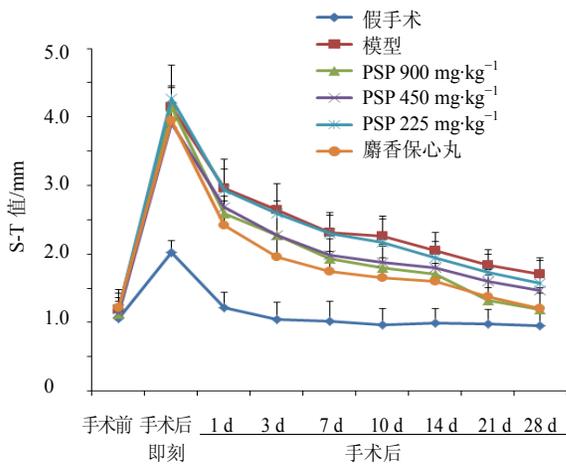


图 1 PSP 对 AMI 模型大鼠心电图 S-T 段值的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

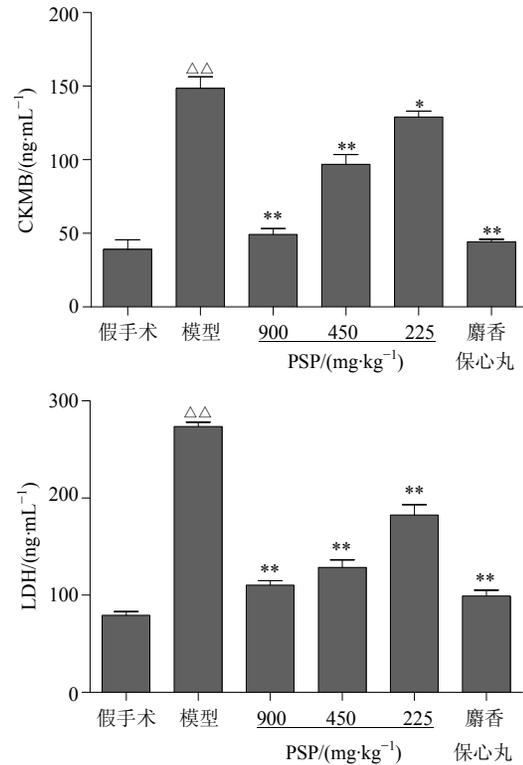
Fig. 1 Effect of PSP on ECG-ST segment in AMI model rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

3.2 对 AMI 模型大鼠血清 CKMB、LDH 活性的影响

与假手术组比较, 模型组大鼠血清 CKMB、LDH 活性均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组大鼠血清 CKMB、LDH 活性均有所降低, 其中, PSP 高、中、低剂量组的降低显著 ($P < 0.01$ 、 0.05)。结果见图 2。

3.3 对 AMI 模型大鼠血清 NF- κ B、IL-6、TNF- α 水平的影响

与假手术组比较, 模型组大鼠血清 NF- κ B、IL-6、TNF- α 水平均明显升高, 差异显著 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组大鼠血清 NF- κ B、IL-6、TNF- α 水平均有所降低, 其中, PSP 高剂量组、麝香保心丸组 NF- κ B、IL-6、TNF- α 水平降低最明显, 差异显著 ($P < 0.01$), PSP 中剂量组差异有统计学意义 ($P < 0.05$); PSP 低剂量组大鼠血清 TNF- α 水平明显降低, 且差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结果见图 3。



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 2 PSP 对 AMI 模型大鼠血清 CKMB、LDH 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig. 2 Effects of PSP on CKMB and LDH activities in serum of AMI model rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

3.4 心肌组织形态学观察结果

HE 染色结果显示, 假手术组心肌组织未见明显的病理形态改变, 横纹较清晰; 模型组大鼠心肌组织病理学改变较明显, 心肌间质有大量炎性细胞浸润, 细胞明显肿胀, 部分心肌细胞变性、坏死, 肌束排列不整齐; PSP 低剂量组细胞肿胀及肌束紊乱程度较模型组减轻; PSP 中剂量组有炎性细胞浸润, 细胞肿胀轻度, 肌束紊乱程度有所改善; PSP 高剂量组及麝香保心丸组肌束排列较整齐, 炎性细胞浸润中度, 细胞溶解情况减少。结果见图 4。

4 讨论

AMI 是心力衰竭的早期重要病理过程, 也是引起心血管疾病发生率和死亡率升高的独立危险因素, 可引起心肌代谢功能障碍和结构损伤。心脏急性缺血时, 不同的心肌酶发生异常改变, 其中特异性最强的为 LDH 和 CKMB, 并伴随心电图的异常改变, 如 S-T 段升高、QRS 波变宽^[6]等, 因此两者均可作为 AMI 的特异性指标。实验中 AMI 模型大鼠心肌

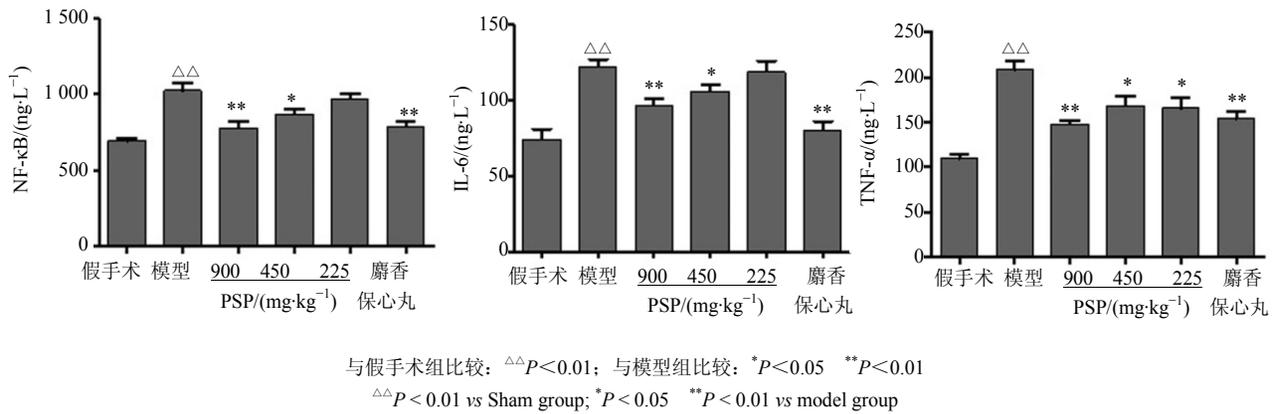


图 3 PSP 对 AMI 模型大鼠血清 NF-κB、IL-6、TNF-α 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 3 Effects of PSP on NF-κB, IL-6, and TNF-α levels in serum of AMI model rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

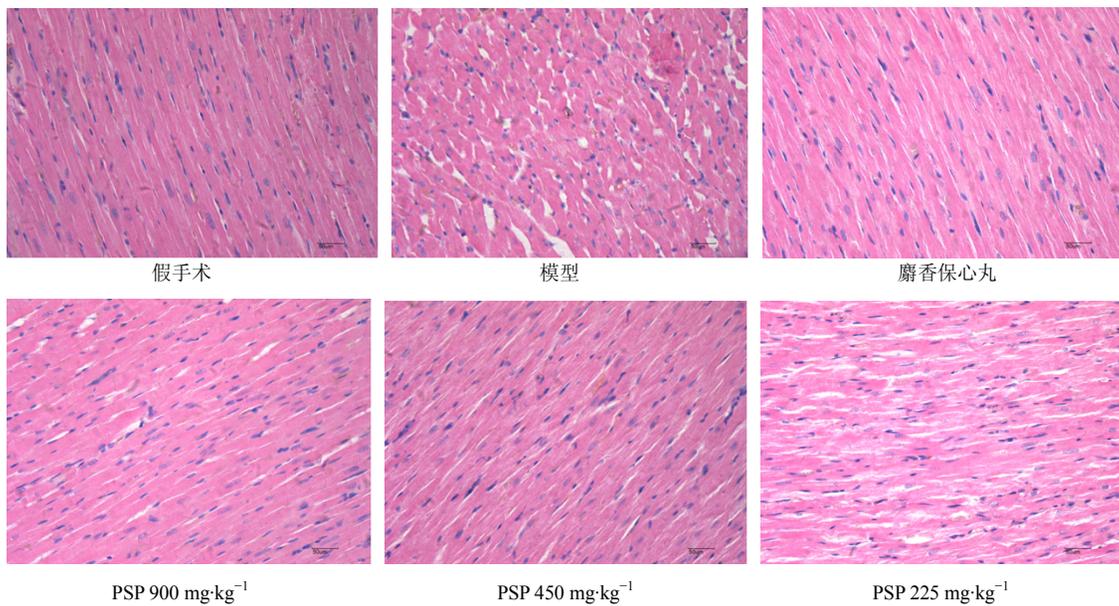


图 4 PSP 对心肌组织形态学的影响

Fig. 4 Effect of PSP on myocardial tissue morphology

CKMB、LDH 活性明显升高, PSP 给药组 2 种酶活性显著降低; 并能显著抑制造模后大鼠心肌 S-T 段的升高, 且从 HE 染色结果观察到, 给药组与模型组相比, 心肌组织炎症细胞浸润程度减轻, 细胞形态完整性得到改善, 肌束排列较整齐, 说明 PSP 能减少由于急性心肌缺血导致的 CKMB、LDH 外漏, 并在一定程度上减轻心肌细胞损伤。

心肌急性缺血后, 由于组织缺血缺氧等因素激活炎症调节系统, 诱导心肌细胞凋亡、心肌纤维化等梗死后效应, 机体为了清除坏死细胞, 进一步激活炎症反应, 从而导致心肌重塑等心功能代偿性恶化^[7]。NF-κB 是介导炎症因子释放的关键性转录因子, 其存在部位有血管内皮细胞、血管平滑肌细胞

及心肌细胞等, 并参与心血管的发生与发展^[8]。正常生理状况下, 其与抑制性蛋白 IκB 结合以同源二聚体形式存在, 处于无活性状态, 当多种病理因素刺激时, NF-κB 与 IκB 解体而被磷酸化激活, 并转移至细胞核内, 与特定靶基因结合并调控靶基因转录, 释放相关炎症因子, 如 IL-6、TNF-α 等^[9]。IL-6 是由多种淋巴细胞与非淋巴细胞产生的一种糖蛋白, 其可调节肝脏 C 反应蛋白 (C-reactive protein, CRP) 的合成, 进而增加心肌细胞间黏附分子 (ICAM-1) 的表达, 促进血小板的聚集, 同时促进平滑肌细胞的增殖和 TNF-α 等炎症因子的释放^[10], 而 TNF-α 可增强白细胞趋化作用, 直接损伤内皮细胞^[11], 它们共同参与梗死心肌炎症反应的全过程。

另有研究显示, TNF- α 、IL-6 等物质的释放反馈性作用于 NF- κ B, 维持 NF- κ B 的活性, 从而给心肌损伤造成恶性循环^[7]。范桃溥^[12]采用 I κ B α 及 NF- κ B 激活被抑制的心肌梗死模型小鼠, 使 IL-6、TNF- α 的生成减少, 结果显示梗死后炎症反应及心肌细胞损伤均减轻, 由此可见 NF- κ B 与 IL-6、TNF- α 等炎症因子息息相关且都参与心肌梗死过程。因此, 调节炎症因子的释放对减轻心肌缺血性损伤至关重要。本课题组前期大量研究表明通过结扎冠状动脉左前降支的方法制备 AMI 动物模型, 方法可行性高、动物死亡率低。造模后, 模型组大鼠血清 NF- κ B、IL-6、TNF- α 水平均明显升高, 给予 PSP 干预后, 3 个炎症相关因子水平均显著降低, 提示 PSP 对急性心肌缺血产生的炎症反应有一定抑制作用, 并可能通过调节 NF- κ B 介导的炎症反应实现的。

目前, 临床上治疗心肌梗死常用药物作用机制主要包括扩张血管、溶栓等, 严重者采用冠状动脉搭桥术、心脏血管支架手术等, 以使阻塞后的冠状动脉血管尽可能恢复血流, 但临床上常用的化学药副作用较大, 且手术后需药物长期维持, 并存在心肌缺血再灌注性损伤, 因此开发利用中药来防治多发严重疾病至关重要。本实验研究表明, PSP 干预可改善 AMI 模型大鼠心肌 S-T 段的升高, 抑制炎症因子的释放, 减轻心肌损伤程度, 为今后的研究提供实验基础, 而关于 PSP 对 AMI 模型大鼠心肌损伤保护的分子机制将进一步深入研究。

参考文献

[1] 邵莹, 吴启南, 乐巍. 等. 碳苷黄酮保护心肌缺血损伤作用的研究进展 [J]. 中草药, 2015, 46(1): 128-135.

- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [3] 陆建平, 张静, 张艳贞. 黄精多糖的功能活性及应用前景 [J]. 食品安全质量检测学报, 2013, 4(1): 273-278.
- [4] 朱慧民, 李辉, 朱天民. 等. 红豆杉多糖对 Beagle 犬心肌缺血再灌注损伤模型心肌 NADPH 氧化酶 mRNA 及 SOD、MDA 的影响 [J]. 中草药, 2011, 42(5): 935-939.
- [5] Sun Q, Kang Z M, Cai J M, *et al.* Hydrogen-rich saline protects myocardium against ischemia/reperfusion injury in rats [J]. *Exp Biol Med*, 2009, 234(10): 1212-1219.
- [6] 成细华, 喻嵘, 吴勇军, 等. 左归降糖舒心方对转基因 2 型糖尿病 MKR 鼠心肌损伤的保护 [J]. 中草药, 2011, 42(2): 343-345.
- [7] Frangogiannis, N G Regulation of the inflammatory response in cardiac repair [J]. *Circ Res*, 2012, 110(1): 159-173.
- [8] Lu J X, Ji J Z, Meng H. *et al.* The protective effect and underlying mechanism of metformin on neointima formation in fructose-induced insulin resistant rats [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2013, 12(1): 2-11.
- [9] Bujak, M, Frangogiannis N G. The role of IL-1 in the pathogenesis of heart disease [J]. *Arch Immunol Ther Exp*, 2009, 57(3): 165-176.
- [10] Brasier A R. The nuclear factor-kappaB-interleukin-6 signalling pathway mediating vascular inflammation [J]. *Cardiovasc Res*, 2010, 86(2): 211-218.
- [11] Khanna A K, Xu J, Mehra M R. Antioxidant N-acetyl cysteine reverses cigarette smoke-induced myocardial infarction by inhibiting inflammation and oxidative stress in a rat model [J]. *Lab Invest*, 2012, 92(2): 224-235.
- [12] 范桃溥. Tisp40 在心肌梗死炎症反应中的作用与机制研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2012.