

木豆叶提取物对心肌缺血再灌注损伤大鼠的保护作用

孙琳¹, 张涛², 柴智^{1*}

1. 山西中医学院, 山西 晋中 030619

2. 山西省肿瘤医院, 山西 太原 030024

摘要: **目的** 研究木豆叶提取物对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用。**方法** 采用结扎冠状动脉前降支方法制备大鼠心肌缺血再灌注损伤模型, 缺血前 10 min 大鼠 ig 给予不同剂量木豆叶提取物 (125、200、500 mg/kg), 复方丹参滴丸为阳性对照, 再灌注 30 min 后以 II 导联心电图监测各组大鼠心律失常出现和持续时间, 进行心律失常评分; 再灌注 90 min 后测定心肌梗死范围, HE 染色观察心肌形态学变化。**结果** 模型组大鼠心律失常出现较早, 持续时间较长, 室性早搏、室速、室颤等发生率较高, 且心律失常在缺血再灌注损伤末期仍非常明显。与模型组相比, 木豆叶提取物能够降低大鼠缺血性心律失常的严重程度和发生率, 明显缩小心肌梗死范围, 减轻心肌细胞肿胀和炎性细胞浸润。**结论** 木豆叶提取物对心肌缺血再灌注损伤大鼠有一定的保护作用。

关键词: 木豆叶; 心肌缺血再灌注损伤; 心律失常; 梗死面积; 室颤

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2015)22-3382-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.22.016

Protection of extract from pigeonpea leaves on myocardial ischemia reperfusion injury in rats

SUN Lin¹, ZHANG Tao², CHAI Zhi¹

1. Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China

2. Shanxi Tumor Hospital, Taiyuan 030024, China

Abstract: **Objective** To investigate the protective effects of pigeonpea leaves on myocardial ischemia reperfusion injury in rats. **Methods** A model of myocardial ischemia reperfusion was established by ligating the anterior descending coronary arteries. Rats were administrated with extract from pigeonpea leaves (125, 200, and 500 mg/kg) before ischemia, and the size of myocardial infarction, arrhythmia score, and morphological changes of cardiomyocytes were determined. **Results** Compared with the model group, pigeonpea leaves could reduce arrhythmia severity and incidence ($P < 0.05$ or 0.01) and the size of myocardial infarction ($P < 0.05$). Pigeonpea leaves could ameliorate the pathological lesion. **Conclusion** Pigeonpea leaves have the protective effects on myocardial ischemia reperfusion injury in rats.

Key words: pigeonpea leaves; myocardial ischemia reperfusion injury; arrhythmia; infarct size; ventricular fibrillation

木豆 *Cajanus cajan* (Linn.) Millsp 系豆科木豆属植物, 在我国云南、四川、江苏、广东、广西和海南等地有广泛栽培, 具有清热解毒、消肿止痛的功效, 主要用于治疗外伤、烧伤感染和褥疮等^[1]。木豆叶中主要含有牡荆苷、异牡荆苷、木犀草素等多种黄酮类成分^[2], 关于木豆叶治疗缺血性疾病有一些相关报道, 木豆叶对小鼠脑缺血缺氧有一定的保护作用^[3], 木豆叶总黄酮对股骨头坏死有一定的

治疗作用, 其作用机制可能与促进血运生成相关^[4]; 此外, 木豆叶中含有的牡荆素对心肌缺血及再灌注损伤具有保护作用^[5]。本研究通过大鼠在体心肌缺血再灌注模型, 以心律失常发生率、心肌梗死面积以及心肌组织细胞形态学变化为指标, 观察木豆叶提取物对缺血再灌注大鼠心肌的影响, 为将木豆叶提取物发掘为防治心血管系统疾病的新药物提供参考。

收稿日期: 2015-07-12

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金资助项目 (81303262); 山西中医学院博士科研启动基金; 山西中医学院方药药效及其作用机制研究重点科技创新团队 (20150401)

作者简介: 孙琳 (1984—), 女, 博士, 讲师。Tel: (0351)3179903 E-mail: sunlin115@aliyun.com

***通信作者** 柴智 (1979—), 男, 博士, 副教授。E-mail: chaizhi008@126.com

1 材料

1.1 实验动物

健康雄性 SD 大鼠, 体质量 250~300 g, 由广东省实验动物中心提供, 动物许可证号 SCXK(粤)2008-0002。

1.2 药品与试剂

木豆叶提取物(木豆叶药材经蒸馏水回流提取 1 h 得浸膏, 主要含牡荆苷、异牡荆苷、木犀草素等黄酮类成分, 制成片剂, 每片质量 0.25 g, 含牡荆苷 0.08 mg), 批号 091103, 购于广州中医药大学第一附属医院; 复方丹参滴丸, 批号 100604, 天津天士力制药股份有限公司; 戊巴比妥钠, 批号 F20060905, 中国医药(集团)上海化学试剂公司; 氯化硝基四氮唑(TTC), 美国 Sigma 公司, 磷酸盐缓冲液(PBS)配成 2% 溶液备用; 多聚甲醛, 天津市化学试剂研究所。

1.3 主要仪器

HX-200 动物呼吸机、BL-420E 生物机能实验系统、BI-2000 医学图像分析系统, 成都泰盟科技有限公司; IX70 型 Olympus 倒置显微镜, 日本 Olympus 公司。

2 方法

2.1 大鼠心肌缺血再灌注模型制备

雄性 SD 大鼠, 禁食 24 h, 3% 戊巴比妥钠(1.5 mL/kg) ip 麻醉, 仰卧位固定于手术操作台上, 气管插管; 小动物呼吸机维持人工呼吸, 频率 70 次/min, 潮气量 7 mL/min; II 导联心电图监测心电图(ECG)及心率。分离右侧颈总动脉, 血管插管, 连接压力传感器。剪去胸前手术区毛, 剪开皮肤、皮下组织及肌肉, 于左胸部第 3、4 肋骨间开胸, 撕开心包膜, 充分暴露心脏, 除假手术组只开胸不结扎外, 其余各组在位于左心耳根部下 2 mm、肺动脉圆锥之间用 6~0 聚丙烯缝线穿线结扎冠状动脉前降支, 阻断冠脉血流。结扎冠状动脉后迅速将心脏放回胸腔, 轻挤胸腔排除胸腔内气体及血液, 缝合肌肉及皮肤。结扎 30 min 后, 去掉引线再灌注 90 min, 即为缺血再灌注损伤模型。

2.2 分组及给药

将大鼠随机分为 6 组: 假手术组, 模型组, 木豆叶提取物低、中、高剂量(125、250、500 mg/kg)组, 复方丹参滴丸(72.9 mg/kg)组, 每组 10 只。木豆叶提取物及复方丹参滴丸组于结扎前 10 min ig

给药, 体积为 1 mL, 假手术组不结扎和模型组 ig 相同体积的生理盐水。

2.3 指标测定

2.3.1 心律失常的测定 用生物机能系统持续监测标准 II 导联 ECG。心律失常评分则参考 Wang 等^[6]的评分规则。记录再灌注后 30 min 的心律失常发生情况, 评分分值越高, 表明发生室性心律失常的几率越大。

2.3.2 心肌梗死面积的测定 再灌注 90 min 后迅速剪下大鼠心脏, PBS 冲洗心脏内积血, 去除血管、脂肪, 用滤纸吸干。从心尖到心基部平行将心脏切成约 2 mm 厚的切片, 置于 2% TTC 中 37 °C 水浴 20 min。采用 BI2000 图像分析系统计算心肌横断面面积及梗死区面积, 梗死范围以梗死区心肌面积占心肌横断面面积的百分比表示。

2.3.3 HE 染色观察心肌组织形态学变化 取结扎部位以下 0.5 mm 处心肌组织, 中性甲醛固定, 石蜡包埋, 切片, 从各组取 5 张石蜡切片, 二甲苯脱蜡, HE 染色, 梯度乙醇脱水, 封片, 于光学显微镜下观察心肌组织形态改变。

2.4 统计学分析

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 软件进行统计分析。两组间比较用非配对 *t* 检验, 多组间均值比较用随机设计的方差分析 *q* 检验。

3 结果

3.1 心律失常发生情况比较

模型组大鼠心律失常出现较早, 持续时间较长, 室性早搏、室速、室颤等发生率较高, 且心律失常在缺血再灌注损伤末期仍非常明显。木豆叶提取物 250、500 mg/kg 剂量组及复方丹参滴丸组能明显降低室性早搏、室速、室颤发生率及缩短持续时间($P < 0.05, 0.01$)。木豆叶提取物 250、500 mg/kg 剂量组心律失常评分与模型组比较差异显著($P < 0.05$)。见表 1。结果表明木豆叶提取物对缺血再灌注损伤引起的心律失常有明显改善作用。

3.2 心肌梗死范围比较

模型组大鼠的心肌梗死范围显著高于假手术组($P < 0.01$)。木豆叶提取物 250、500 mg/kg 剂量组与复方丹参滴丸组大鼠心肌梗死范围显著低于模型组($P < 0.05$), 结果见表 2。

3.3 心肌组织形态学变化

光镜下假手术组心肌纤维结构完整、排列整齐、无变性、核内物质分布均匀, 肌原纤维规则,

表1 各组大鼠心律失常发生情况比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 1 Comparison on arrhythmia incidence of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	室性早搏/次	室速发生率/%	室颤发生率/%	每分钟持续时间/s	评分
假手术	—	0	0	0	0	0
模型	—	66.8±11.7	100	50	58.5±5.5	6.21±2.19
木豆叶提取物	125	64.8±12.6	90	40	49.3±6.7	5.86±1.66
	250	39.5±7.9*	40*	20*	37.5±2.9*	4.90±2.02*
	500	37.5±6.4*	40*	20*	34.4±1.3*	4.75±1.24*
复方丹参滴丸	72.9	26.1±7.4**	30*	10**	25.6±3.2**	3.19±1.64**

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group表2 各组大鼠心肌梗死范围的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 2 Comparison on Myocardial infarct size of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	心肌梗死范围/%
假手术	—	0
模型	—	36.57±11.71 ^{△△}
木豆叶提取物	125	33.70±10.23
	250	19.35±8.48*
	500	18.31±2.12*
复方丹参滴丸	72.9	18.10±2.04*

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

肌小节清晰, 间质无水肿、出血; 模型组心肌细胞分布紊乱、局部变性、细胞结构模糊, 边界不清, 间质水肿、出血明显可见, 心肌肌浆呈嗜伊红染色, 间质有炎性细胞浸润。木豆叶提取物各剂量组心肌细胞水肿、变性较模型组减轻, 小部分细胞结构模糊, 边界不清, 心肌纤维相对紊乱, 部分肌纤维溶解液化, 心肌间质可出现少量红细胞; 复方丹参滴丸组心肌细胞水肿、变性较模型组明显减轻, 可见轮廓完整的心肌细胞, 部分肌纤维溶解液化, 心肌间质可出现少量红细胞, 胞质轻度水肿, 结果见图1。

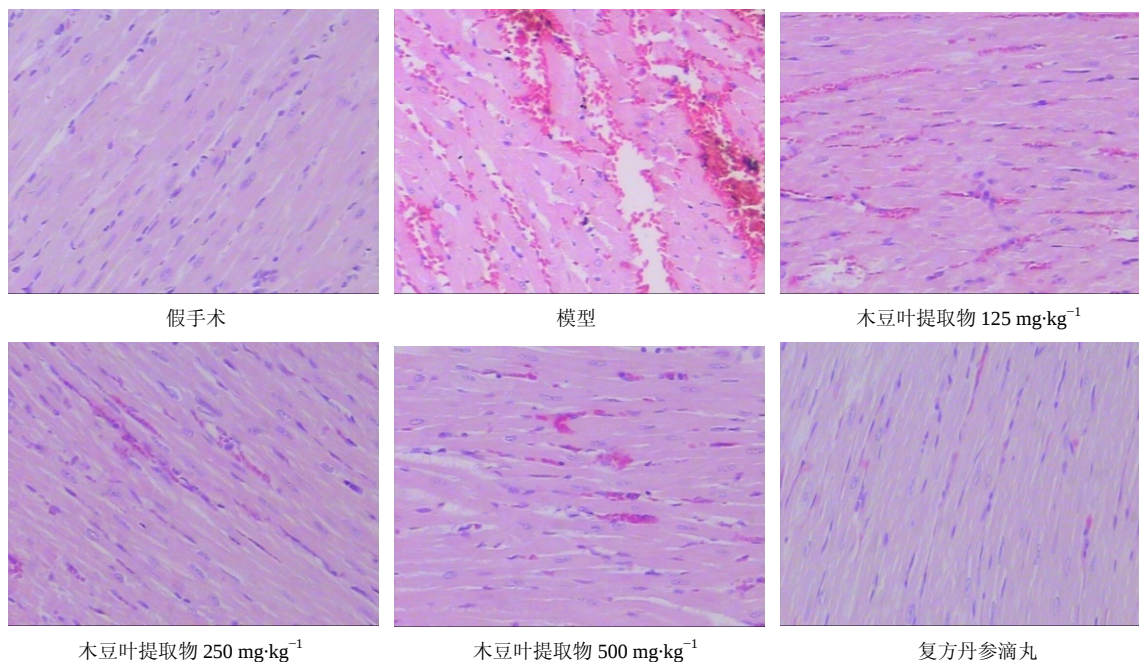


图1 各组大鼠心肌组织病理改变

Fig. 1 Pathologic changes of myocardium tissues of rats in each group

4 讨论

心脏缺血后再灌注可能导致致死性的心律失常^[7]。再灌注心律失常是指急性缺血心肌的血流得

以再次恢复数秒所出现的心律失常。本研究观察结果显示, 缺血再灌注后心律失常主要发生在再灌注1 h内。木豆叶提取物中、高剂量组可以明显减少室

性早搏、室速和室颤的发生,说明木豆叶提取物可以降低缺血性心律失常的严重程度和发生率。

此外,本研究观察了再灌注大鼠心肌梗死范围的变化。相关研究表明,评价药物是否具有保护心肌作用的金指标是心肌梗死范围的降低^[8-9]。本实验结果表明木豆叶提取物中、高剂量组可以有效缩小心肌梗死范围,表现出一定程度的保护心肌的作用。

心肌缺血后的再灌注会引发心肌超微结构发生不可逆改变。对心肌超微结构的观测有助于较为客观地判断实验过程中心肌早期损伤程度。本研究中模型组大鼠出现明显的心肌梗死现象,光镜下心肌细胞的超微结构损伤较严重,可以见到心肌组织呈区域性变性坏死,肌丝断裂溶解等。当给予木豆叶提取物后可明显改善心肌超微结构的改变,光镜下的心肌组织损伤均较轻。综合结果表明木豆叶提取物对大鼠心肌缺血再灌注损伤具有一定的保护作用。

参考文献

- [1] 林 励, 谢 宁, 程紫骅, 等. 木豆黄酮类成分的研究 [J]. 中国药科大学学报, 1999, 30(1): 21-23
- [2] 刘亚旻, 姜保平, 沈胜楠, 等. 木豆叶的化学成分研究 [J]. 中草药, 2014, 45(4): 466-470.
- [3] 黄桂英, 廖雪珍, 廖惠芳, 等. 木豆叶水提物抗脑缺血缺氧损伤的作用研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2006, 17(3): 172-174.
- [4] 罗文正, 刘 红, 郑 稼, 等. 木豆叶总黄酮对股骨头坏死大鼠的作用及机制研究 [J]. 中国药师, 2009, 12(7): 857-859.
- [5] 董六一. 牡荆素对心肌缺血/再灌注损伤的保护作用及其作用机制 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2007.
- [6] Wang G Y, Wit S, Pei J M, *et al.* Kappa-but not delta-opioid receptors mediate effects if ischemic preconditioning on both infarct and arrhythmia in rats [J]. *Am J Physiol Heart Cir Physiol*, 2001, 280(1): 384-391.
- [7] Manning A S, Hearse D J. Reperfusion-induced arrhythmias: mechanisms and prevention [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1984, 16(6): 497-518.
- [8] O'Rourke B. Myocardial K (ATP) channels in preconditioning [J]. *Circ Res*, 2007, 87(10): 845-855.
- [9] Thibault H, Gomez L, Donal E, *et al.* Acute myocardial infarction in mice: assessment if transmuralit by strain rate imaging [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 293(1): H496-H502.