

玫瑰花挥发油对小鼠急性心肌缺血损伤的保护作用研究

宋旺弟, 袁长胜, 崔婷婷, 申 静, 陈 文*

石河子大学药学院, 新疆 石河子 832000

摘要: **目的** 探讨玫瑰花挥发油抗小鼠急性心肌缺血损伤的心肌保护作用及机制。**方法** 采用 ip 异丙肾上腺素的方法制备小鼠急性心肌缺血模型, 以玫瑰花挥发油 (160、80、40 mg/kg) 进行药物干预, 通过 HE 染色和 TTC 染色观察小鼠心肌组织病理变化和心肌损伤程度, 观察药物对小鼠心肌组织中超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 以及小鼠血清中肌酸激酶同工酶 (CK-MB) 和乳酸脱氢酶 (LDH) 活性的影响。**结果** HE 染色结果表明, 玫瑰花挥发油 160、80、40 mg/kg 均可以明显改善小鼠心肌组织的病理性损伤情况; TTC 染色结果发现, 玫瑰花挥发油 160、80、40 mg/kg 可以显著减小小鼠心肌缺血区的面积; 与模型组相比, 玫瑰花挥发油 160、80 mg/kg 组小鼠心肌组织中 SOD、GSH-Px 的酶活性显著增强 ($P < 0.05$ 、 0.01), 血清中 LDH 和 CK-MB 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。**结论** 玫瑰花挥发油对异丙肾上腺素所致的小鼠急性心肌缺血有一定的保护作用, 作用机制可能与玫瑰花挥发油抑制氧自由基的产生、增强抗氧化酶活性, 以及降低脂质过氧化损伤有关。

关键词: 玫瑰花; 挥发油; 急性心肌缺血; 超氧化物歧化酶; 谷胱甘肽过氧化物酶; 肌酸激酶同工酶; 乳酸脱氢酶

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)22-4701-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.22.017

Protective effects of essential oil of Uygur medicine rose on acute myocardial ischemia injury in mice

SONG Wang-di, YUAN Chang-sheng, CUI Ting-ting, SHEN Jing, CHEN Wen

College of Pharmacy, Shihezi University, Shihezi 832000, China

Abstract: Objective To study the protective effect of rose (*Rosae Rugosae Flos*) essential oil on acute myocardial infarction in mice, and explore its mechanism. **Methods** The model of acute myocardial ischemia in mice was established by intraperitoneal injection of isopropyl adrenaline. The myocardial tissue pathological changes and the degree of myocardial injury in mice were observed by HE staining and TTC staining. Activities of super oxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in myocardial tissue of mice were determined, and activities of creatine kinase isoenzyme (CK-MB) and lactate dehydrogenase (LDH) in serum of mice were determined as well. **Results** HE staining results showed that rose essential oil group (160, 80, and 40 mg/kg) can significantly improve myocardial tissue pathological injury in mice; TTC staining results showed rose essential oil (160, 80, and 40 mg/kg) can significantly reduce the myocardial ischemia areas in mice. Compared with model group, SOD and GSH-Px in the myocardial tissue of mice significantly increased ($P < 0.05$, 0.01), while enzyme activity of serum LDH and CK-MB significantly reduced in rose essential oil group ($P < 0.05$, 0.01). **Conclusion** Rose essential oil has certain protective effect on acute myocardial infarction injury and its mechanism may be associated with inhibiting oxidative damage, enhancing activities of anti-oxidant enzymes, and reducing the lipid peroxidation damage.

Key words: flowers of *Rosa rugosa* Thunb.; volatile oil; acute myocardial; super oxide dismutase; glutathione peroxidase; creatine kinase isoenzyme; lactate dehydrogenase

玫瑰花为蔷薇科 (Rosaceae) 蔷薇属 *Rosa* L. 多年生灌木玫瑰 *Rosa rugosa* Thunb. 的干燥花蕾, 性温、味甘, 具有行气解郁、疏肝理气、和血散瘀等

多种功效^[1-2]。玫瑰花中富含挥发油类物质^[3], 而挥发油具有较强的自由基清除活性^[4]。为了探讨玫瑰花挥发油对小鼠急性心肌缺血的保护作用, 本实验

收稿日期: 2017-05-29

基金项目: 新疆兵团英才计划

作者简介: 宋旺弟 (1989—), 女, 硕士研究生, 研究方向为玫瑰花挥发油的药理作用。Tel: (0993)2055002 E-mail: 1378913346@qq.com

*通信作者 陈 文 (1967—), 男, 教授, 研究方向为新疆特种植物药新药研究与开发。Tel: (0993)2055002 E-mail: chen-wen2000@126.com

采用 ip 异丙肾上腺素的方法复制小鼠急性心肌缺血损伤模型^[5], 观察玫瑰花挥发油对急性心肌缺血小鼠心肌组织形态、抗氧化能力等相关指标的影响, 为玫瑰花挥发油药理作用及机制的探究和临床应用提供一定的理论依据。

1 材料

1.1 实验动物

清洁级昆明种雄性小鼠 90 只, 体质量 18~22 g, 购于新疆实验动物研究中心, 许可证号 SCXK(新)-2011-0001。

1.2 药品与试剂

玫瑰花挥发油(单方精油, 批号 20140122, 购于新疆和田阳光沙漠玫瑰有限公司); 盐酸普萘洛尔片(江苏亚邦爱普森药业有限公司, 规格 10 mg/片, 批号 1508161); 2,3,5-三苯基氯化四氮唑(北京索莱宝科技有限公司, 规格 1 g/5 g, 货号 T8170); 盐酸异丙肾上腺素注射液(上海禾丰制药有限公司, 规格 1 mg/2 mL, 批号 41150402); 聚山梨酯-80、甘油(北京索莱宝科技有限公司); 甲醛(成都市科龙化工试剂厂); 生理盐水(国药集团新疆制药有限公司); 乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

1.3 仪器与设备

Agilent 6890N 气相色谱 Agilent 5973N 质谱联用仪(美国安捷伦科技有限公司); BL-420F 生物机能实验系统(成都泰盟科技有限公司); UV-2401 紫外分光光度计(日本岛津公司); Thermo 3001 型多功能酶标仪(美国 Thermo 公司); TDL-50B 低速大容量离心机(上海安亭科学仪器厂); BCD-268DA 冰箱(青岛海尔股份有限公司); DHP-9162 电热恒温培养箱(上海齐欣科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 玫瑰花挥发油化学成分分析

2.1.1 色谱条件 HP-5 色谱柱(30.0 m×320 μm, 0.25 μm); 采用程序升温: 50 °C 维持 5 min, 以 2 °C/min, 上升至 250 °C (5 min); 进样口温度 250 °C, 检测器温度 280 °C, 载气为氮气, 体积流量为 1 mL/min, 进样量为 1 μL, 分流比为 10:1。

2.1.2 质谱条件 EI 离子源, 正离子模式, 电子能量 7 eV, 离子源温度 200 °C, 接口温度 250 °C, 扫描质量 m/z 20~500。

2.2 玫瑰花挥发油对急性心肌缺血小鼠的影响

2.2.1 实验分组及给药 心电图正常的健康昆明种小鼠 90 只, 随机分为 6 组: 对照组, 模型组, 玫瑰花挥发油高、中、低剂量(160、80、40 mg/kg)组, 盐酸普萘洛尔(48 mg/kg)组, 每组各 15 只。对照组和模型组 ig 给予等体积的生理盐水, 给药组 ig 相应剂量的药物, 体积为 10 mL/kg, 每天早晚各给药 1 次, 连续给药 15 d。

2.2.2 小鼠急性心肌缺血模型的制备 各组给药第 13 天, 早上给药 30 min 后, 除对照组外, 其余各组小鼠均 ip 盐酸异丙肾上腺素(10 mg/kg), 每天 1 次, 连续 3 d。第 15 天 ip 盐酸异丙肾上腺素 30 min 后, ip 3.5%水合氯醛麻醉, 对小鼠进行心电图监测。造模成功标志为与对照组比较, II 导联心电图 T 波倒置或异常增大、ST 段异常升高或降低。

2.2.3 心肌组织病理形态学观察 小鼠眼球取血后, 处死, 取出心脏, 冰的生理盐水清洗污血, 4% 甲醛溶液固定。用 HE 染色法观察心肌组织病理学变化, 根据水样变性、脂肪变性、血管瘀血以及心肌纤维断裂程度等指标来评价心肌组织的病理形态学变化。

2.2.4 心肌缺血面积测定 小鼠眼球取血后, 处死, 取出心脏, 用磷酸缓冲液 PBS 冲洗并冻存于-20 °C 的冰箱中, 30 min 后取出心脏, 快速以垂直心脏长轴的角度, 均匀切成 5 片, 切片置于 TTC 溶液中, 37 °C 水浴孵育 20 min 后, 用 4% 甲醛溶液固定 12 h, 拍照。切片中被染成红色的区域为正常组织, 白色区域为缺血组织, 使用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析, 计算心肌缺血面积(心肌缺血区面积占整个心脏面积的比例)。

2.2.5 心肌组织中 SOD 和 GSH-Px 活性的测定 小鼠眼球取血后, 处死, 取出心脏, 切取心室部位, 匀浆, 3 500 r/min 离心 10 min, 取上层澄清液于 EP 管内, 保存于-80 °C 的冰箱中, 融化后, 严格按照试剂盒说明书测定心肌组织中 SOD 和 GSH-Px 的活性。

2.2.6 血清中 CK-MB 和 LDH 水平的测定 小鼠眼球取血后, 室温放置 1~2 h, 2 000 r/min 离心 10 min, 取上层血清于 EP 管内, 保存于-80 °C 的冰箱中, 融化后, 严格按照试剂盒说明书测定血清中 CK-MB 和 LDH 的水平。

2.3 统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件对相关实验数据进行统计学分析, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析比较组间均值差异。

3 结果与分析

3.1 玫瑰花挥发油的化学成分分析

对玫瑰花挥发油的化学成分进行了 GC-MS 分析, 共鉴定出 50 多种组分, 总离子流图见图 1, 其中主要的化学成分为 β -香茅醇 (40.61%)、9-十九烯 (7.26%)、香叶醇 (5.45%)、乙酸香叶酯 (1.61%) 等。

3.2 对急性心肌缺血小鼠各项指标的影响

3.2.1 各组小鼠心肌组织病理变化 各组小鼠心肌组织病理变化结果见图 2 及表 1。可以看出, 对照组小鼠心肌组织结构完整, 心肌细胞排列整齐、

致密, 胞浆染色均匀; 模型组小鼠心肌纤维排列紊乱, 出现广泛性水肿、淤血以及炎症细胞浸润, 散在脂肪变性; 玫瑰花挥发油 160 mg/kg 组小鼠心肌组织有轻微的水样变性、淤血, 以及心肌组织点状坏死; 玫瑰花挥发油 80 mg/kg 组小鼠的心肌排列整齐, 出现少量的水样变性及脂肪变性; 玫瑰花挥发油 40 mg/kg 组小鼠出现心肌组织轻度炎性细胞浸润、水样变性、脂肪变性、肌纤维断裂; 盐酸普萘洛尔 (48 mg/kg) 组小鼠心肌纤维排列整齐, 出现少量的炎性细胞浸润。

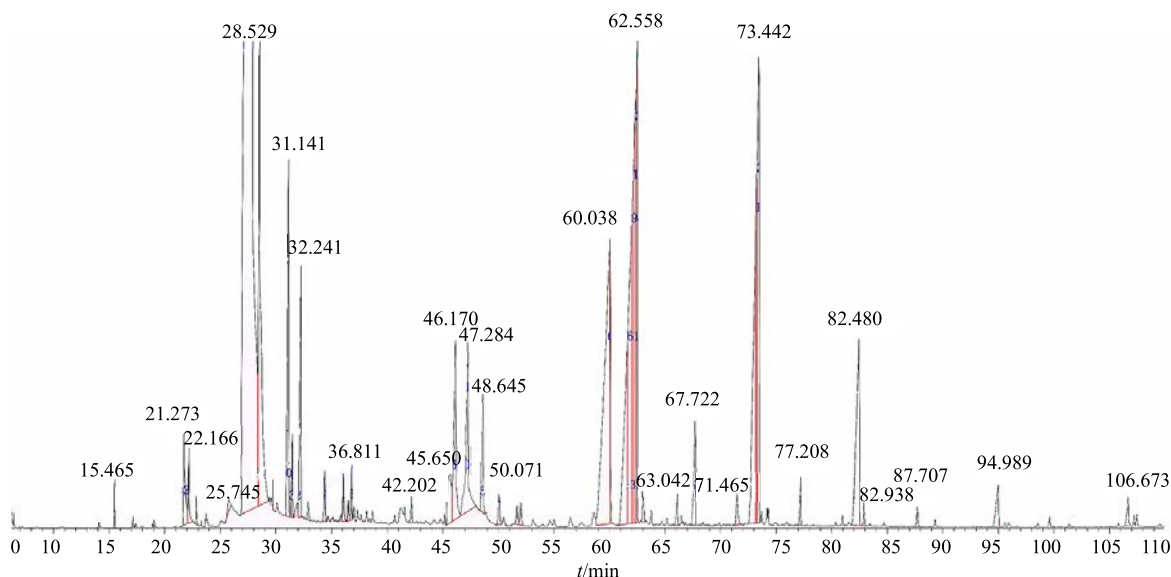


图 1 玫瑰花挥发油总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatogram of rose essential oil

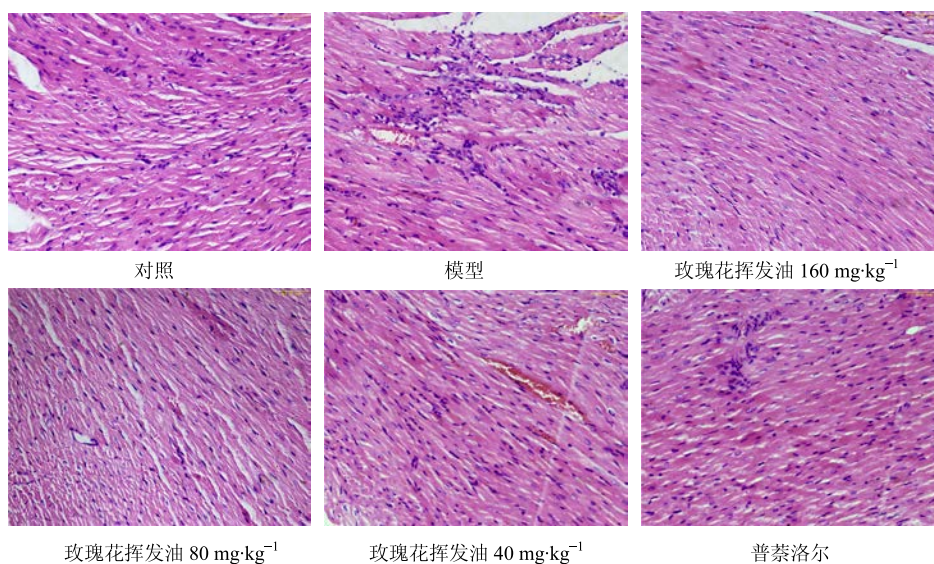


图 2 各组小鼠心肌组织 HE 染色结果 (×200)

Fig. 2 Result of HE staining of myocardial tissue of mice in each group (×200)

表 1 HE 染色结果分析
Table 1 Result of HE results

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	水样 变性%	脂肪 变性	心肌纤维 断裂	血管 瘀血
对照	—	7	—	—	—
模型	—	78	++	++	++
玫瑰花挥发油	160	30	—	—	+
	80	25	+	+	+
	40	40	+	+	++
普萘洛尔	48	20	+	—	—

“—”表示未见变化;“+”表示病变程度轻;“++”表示病变程度重
“—”indicates no change; “+” said lesion degree of light; “++” said lesion severity

3.2.2 对急性心肌缺血小鼠心肌缺血区域面积的影响

玫瑰花挥发油对心肌组织局部心肌缺血区域面积的影响,见图 3 和表 2。由图 3 可见,与对照组比较,模型组小鼠的心肌缺血区面积明显较多;与模型组比较,玫瑰花挥发油 160 mg/kg 组和玫瑰花挥发油组 80 mg/kg 组小鼠心肌的缺血区面积有一定程度的减少。由表 2 看出,模型组小鼠缺血区面积显著高于对照组 ($P<0.001$);玫瑰花挥发油 160 mg/kg 组和 40 mg/kg 组小鼠缺血区面积显著低于模型组 ($P<0.05$);玫瑰花挥发油 80 mg/kg 组小鼠缺血区面积显著低于模型组 ($P<0.01$),盐酸普

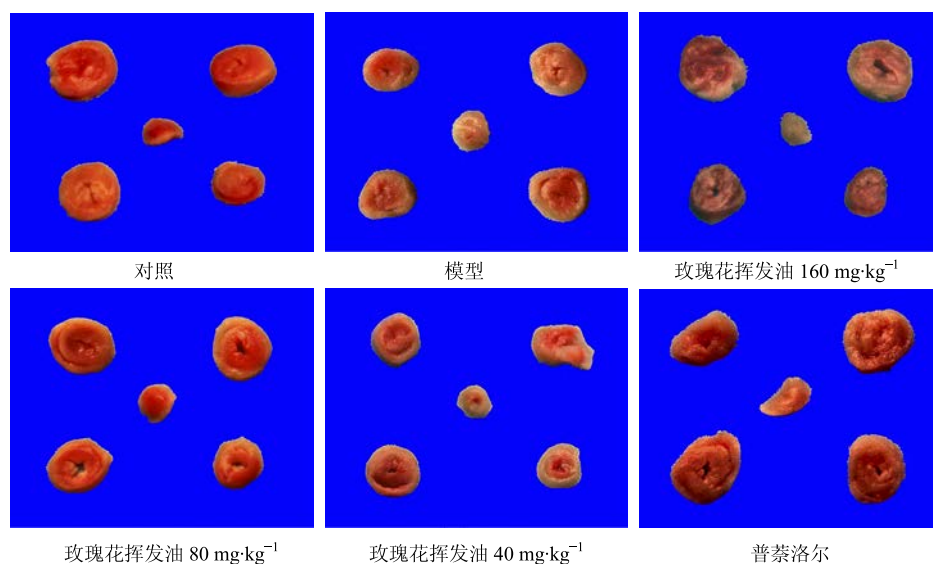


图 3 各组小鼠心尖组织 TTC 染色结果 (×200)

Fig. 3 Result of TTC staining of myocardial tissue of mice in each group (×200)

表 2 玫瑰花挥发油对急性心肌缺血小鼠心肌缺血面积的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 2 Effect of REO on ischemic myocardial tissue area in acute myocardial ischemic mice ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	心肌缺血区面积	心肌总面积	(心肌缺血区面积/心肌总面积)/%
对照	—	7 135 ± 548	407 169 ± 20 979	11.75 ± 1.12
模型	—	213 549 ± 12 961	286 555 ± 8 937	54.52 ± 1.87 ^{###}
玫瑰花挥发油	160	58 614 ± 4 187	199 635 ± 9 069	29.36 ± 0.23 [*]
	80	86 380 ± 3 901	360 866 ± 20 701	23.94 ± 0.25 ^{**}
	40	400 804 ± 37 211	1 413 288 ± 78 301	28.36 ± 0.19 [*]
普萘洛尔	48	37 090 ± 2 604	385 218 ± 25 047	16.63 ± 0.41 ^{**}

与对照组比较: ^{###} $P<0.001$ ^{###} $P<0.001$; 与模型组比较: ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$, 下同

^{###} $P<0.01$ ^{###} $P<0.001$ vs control group; ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ vs model group, same as below

萘洛尔 (48 mg/kg) 组小鼠缺血区面积与模型组比较,降低程度非常显著 ($P<0.01$)。表明玫瑰花挥发油可以减少急性心肌缺血小鼠心肌缺血区面积,对异丙肾上腺素所致的心肌缺血损伤有一定的保

护作用。

3.2.3 对急性心肌缺血小鼠心肌组织中 SOD 和 GSH-Px 活性的影响 玫瑰花挥发油对急性心肌缺血小鼠心肌组织中 SOD 和 GSH-Px 的影响结果见表 3。

表3 玫瑰花挥发油对急性心肌缺血小鼠心肌组织中 SOD 和 GSH-Px 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of REO on activities of SOD and GSH-Px in cardiac tissue of acute myocardial ischemia mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	GSH-Px/ (U·mg ⁻¹)	SOD/ (U·mg ⁻¹)
对照	—	121.81 ± 9.12	293.23 ± 22.61
模型	—	81.27 ± 4.31 ^{###}	166.89 ± 16.58 ^{###}
玫瑰花挥发油	160	91.59 ± 7.33 ^{**}	225.34 ± 14.78 ^{**}
	80	101.65 ± 8.25 [*]	218.85 ± 15.79 ^{**}
	40	89.37 ± 5.23	182.27 ± 14.52
普萘洛尔	48	113.69 ± 4.31 ^{**}	279.08 ± 15.67 ^{**}

ip 过量的异丙肾上腺素可以抑制机体 SOD 和 GSH-Px 的产生,进而导致机体内氧自由基和脂质自由基的增多,造成小鼠心肌缺血性损伤。与模型组比较,玫瑰花挥发油 160、80 mg/kg 组和盐酸普萘洛尔组小鼠心肌组织中 SOD 和 GSH-Px 活性明显升高 ($P < 0.05$ 、 0.01),实验结果表明玫瑰花挥发油可以增加 SOD 和 GSH-Px 的产生,从而增加清除氧自由基和脂质自由基的作用,起到保护心肌的作用。

3.2.4 对急性心肌缺血小鼠血清中 CK-MB 和 LDH 水平的影响 玫瑰花挥发油对急性心肌缺血小鼠血清中 CK-MB 和 LDH 水平的影响结果见表 4。通过测定小鼠血清中 LDH 和 CK-MB 的释放量,可检测各实验组小鼠的心肌损伤程度。从表 4 可以看出,模型组小鼠血清中 CK-MB 和 LDH 的水平均显著增加,与对照组比较差异显著 ($P < 0.01$)。与模型组比较,玫瑰花挥发油 160、80 mg/kg 组和盐酸普萘洛尔组小鼠血清中 CK-MB 和 LDH 的量均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结果表明玫瑰花挥发油可以显著降低异丙肾上腺素所致的急性心肌缺血小鼠血清中 CK-MB、LDH 的量。

表4 玫瑰花挥发油对急性心肌缺血小鼠血清中 LDH 和 CK-MB 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effect of REO on activities of LDH and CK-MB in serum of acute myocardial ischemia mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	LDH/(U·L ⁻¹)	CK-MB/(U·L ⁻¹)
对照	—	1 695.91 ± 305.37	2 219.52 ± 144.40
模型	—	6 765.91 ± 645.65 ^{###}	7 164.98 ± 822.58 ^{###}
玫瑰花挥发油	160	4 093.79 ± 390.20 [*]	4 367.87 ± 484.87 [*]
	80	3 678.12 ± 223.93 ^{**}	3 685.69 ± 685.50 ^{**}
	40	6 077.31 ± 868.52	5 211.96 ± 570.85
普萘洛尔	48	2 558.45 ± 406.69 ^{**}	3 620.08 ± 386.38 ^{**}

4 讨论

心肌急性缺血时,心肌对氧的供需失调,代谢出现紊乱,导致心肌细胞内多种酶如 CK 等释放入血,大量自由基聚集,引起脂质过氧化,进而加重缺血对心肌的损伤^[6]。而挥发油具有较强的清除自由基的能力,因此其对心血管等疾病的防治有重要意义^[4]。HE 染色是检查组织发生病理变化的常用方法之一^[7]。本实验用 HE 染色法检测玫瑰花挥发油对异丙肾上腺素所致的小鼠急性心肌缺血的保护作用,结果发现,玫瑰花挥发油组可明显减少心肌纤维断裂,减少组织的水样变性和炎症细胞的浸润。TTC 染色是检测心肌缺血程度最为直接的方法^[8],结果发现玫瑰花挥发油组不同程度的减小了小鼠心肌缺血区面积,与模型组比较差异显著。SOD 的主要功能是催化超氧阴离子的歧化反应, SOD 量和活力的减少和降低,将导致自由基的堆积^[9-10]。心肌缺血时,细胞内 Ca²⁺超载,自由基生成过多,清除能力下降,从而造成心肌的损伤。GSP-Px 也是一种主要的抗氧化剂和自由基清除剂^[11]。实验结果显示,模型组小鼠体内 SOD 和 GSP-Px 的量明显降低,而玫瑰花挥发油组小鼠体内 SOD 和 GSP-Px 的量均有一定程度的增加,说明玫瑰花挥发油可以促进 SOD 和 GSP-Px 的产生,加快自由基的清除,从而起到保护心肌的作用。CK-MB 存在于心肌细胞的胞浆或线粒体中,当心肌受损时,CK-MB 释放入血,因此血清酶的升高可作为心肌受损的酶学标志物^[12]。LDH 是体内能量代谢过程中的一个重要的酶,当心肌缺血时,LDH 会释放入血,通过检测血清中 LDH 的量,可反映心肌细胞的损伤程度^[13-14]。实验结果显示,模型组小鼠血清中 CK-MB 和 LDH 的量明显升高,心肌损伤严重,玫瑰花挥发油组不同程度地降低了 CK-MB 和 LDH 的水平,说明玫瑰花挥发油对缺血损伤心肌有一定的保护作用。清除自由基和抗氧化作用可能是玫瑰花挥发油发挥心肌缺血保护作用的主要机制之一。

综上所述,玫瑰花挥发油对异丙肾上腺素诱导的急性心肌缺血具有一定的保护作用,有可能成为一种良好的抗心肌缺血新药的主要来源。

参考文献

- [1] 李丽梅, 姜洁, 刘贵有, 等. 玫瑰花中的异黄酮类化合物及其活性研究 [J]. 中草药, 2015, 46(10): 1420-1422.

- [2] 马猛华, 崔波, 于海峰, 等. 玫瑰花的研究进展 [J]. 山东轻工业学院学报: 自然科学版, 2008, 22(4): 38-42.
- [3] 姚光明. 玫瑰精油的高效提取与抗氧化性及微胶囊化研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2016.
- [4] de Lima V T, Vieira M C, Kassuya C A. Chemical composition and free radical-scavenging, anticancer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Ocimum kilimandscharicum* [J]. *Phytomedicine*, 2014, 21(11): 1298-1302.
- [5] 吴启端. 石菖蒲挥发油及 β -细辛醚防治急性心肌缺血的药效学研究及机理探讨 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2006.
- [6] 龚莉, 向大雄, 隋艳华. 黄精醇提物对心肌缺血大鼠心脏组织中 AST、CK、LDH 等活性及心肌坏死病理变化的影响 [J]. 中医药导报, 2007, 13(6): 99-101.
- [7] 严蓓, 阿基业, 郝海平, 等. 基于血浆和心肌内小分子的代谢组学方法评价心肌缺血大鼠模型 [J]. 药科学报, 2013, 48(1): 104-112.
- [8] 李粮辉, 陈文华, 郑宏. 改进的 TTC 染色法显示大鼠心肌缺血再灌注损伤 [J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(5): 75-78.
- [9] 罗慧英, 黄亚红. 当归挥发油对小鼠急性心肌缺血损伤的保护作用 [J]. 中国现代应用药学, 2016, 33(2): 159-162.
- [10] 王秀丽, 张艳秋. 降香挥发油-HP- β -CD 的制备及对急性心肌缺血模型大鼠的保护作用 [J]. 山东中医药大学学报, 2010, 34(3): 256-257.
- [11] 陈艳芬, 杨超燕, 李坤平, 等. 布渣叶总黄酮对大鼠急性心肌缺血的保护作用及其机制 [J]. 中草药, 2013, 44(8): 1003-1007.
- [12] 宋春华, 孙景明, 王聘红. 针刺预处理对心肌缺血模型大鼠 CK、CK-MB 影响的研究 [J]. 针灸临床杂志, 2008, 24(3): 39-40.
- [13] 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.
- [14] 刘杰, 高秀梅, 王怡, 等. 丹酚酸 B 对急性心肌缺血大鼠血流动力学的影响及作用分子机制研究 [J]. 中草药, 2006, 37(3): 409-412.