

映山红花总黄酮对盐酸异丙肾上腺素诱导大鼠心肌缺血的保护作用

袁丽萍^{a,b}, 陈飞虎^a, 范丽^b, 陈志武^{b*} (安徽医科大学 a. 药学院, b. 药理学教研室, 合肥 230032)

摘要:目的 观察映山红花总黄酮(TFR)对盐酸异丙肾上腺素诱导的实验性心肌缺血的保护作用。方法 采用皮下(sc)注射盐酸异丙肾上腺素(Iso)(8 mg·kg⁻¹×2 d)诱导大鼠实验性心肌缺血模型,测定血清中MDA含量、GSH-PX活力、SOD及心肌组织中ATPase活性。同时行心肌组织病理组织学检查。结果 TFR 30 mg·kg⁻¹显著降低血清中MDA的生成,30,15 mg·kg⁻¹及60,30 mg·kg⁻¹升高SOD、GSH-PX的活力,60,30 mg·kg⁻¹ TFR可抑制心肌组织中Na⁺-K⁺-ATPase、Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase,总ATPase活力的降低,TFR 60,30 mg·kg⁻¹能显著改善sc Iso后心肌病理损伤程度,降低其病理损伤评分。结论 TFR对盐酸异丙肾上腺素诱导的实验性心肌缺血有保护作用,其机制可能与减少体内自由基生成、改善心肌能量代谢有关。

关键词:映山红花总黄酮 TFR; 心肌缺血; 盐酸异丙肾上腺素

中图分类号: R931.6; R965.1 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2007)05-0356-04

Effect of Total Flavones of Rhododendra on Experimental Myocardial Ischemic Injury Induced by Isoproterenol

YUAN Li-ping^{a,b}, CHEN Fei-hu^a, FAN Li^b, CHEN Zhi-wu^{b*} (a. College of Pharmacy, b. Department of Pharmacology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

ABSTRACT; OBJECTIVE To observe the effect of total flavones of Rhododendra (TFR) on experimental myocardial ischemic injury in rats induced by Isoproterenol. **METHODS** The experimental myocardial ischemic injury was induced by subcutaneous injection (sc) of Isoproterenol (Iso). MDA content, SOD, GSH-PX activity in serum and ATPase activity in myocardium were assayed according to test kits. Moreover the histopathologic changes of myocardium in rats were examined with HE dying method, and pathobiological

基金项目: 安徽省自然科学基金资助课题, No 99044433

作者简介: 袁丽萍, 女, 博士研究生 * 通讯作者: 陈志武, 男, 博士, 教授, 博士生导师 Tel: (0551)5161133 E-mail: wzcxiang@mail.hf.ah.cn

grading was analyzed with Ridit method. **RESULTS** 30 mg · kg⁻¹ of TFR could significantly reduce MDA content, 30, 15 mg · kg⁻¹ and 60, 30 mg · kg⁻¹ TFR markedly increase SOD, GSH-PX activity. 60, 30 mg · kg⁻¹ TFR increased ATPase activity in myocardium. TFR 60, 30 mg · kg⁻¹ could also improve histopathologic changes of myocardium and reduce the pathobiological grading. **CONCLUSION** TFR had protective effect on myocardial ischemic injury induced by Isoproterenol, and its mechanism may be related with the decreasing the production of free radical and ameliorating the energy metabolism in myocardium.

KEY WORDS: total flavones of Rhododendron (TFR); myocardial ischemic injury; isoproterenol

近年来黄酮类化合物^[1,2]对心脑血管的保护作用日益受到重视,映山红花总黄酮是从映山红的花中提取的总黄酮成分。本室初步研究发现映山红花总黄酮能明显延长缺血管后小鼠心电图持续时间,降低iv Pit大鼠ECG中ST段和T波的抬高。因此,笔者观察映山红花总黄酮对异丙肾诱导大鼠缺血心肌组织和血清学的影响,进一步探讨其保护作用的可能机制。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

映山红花总黄酮(TFR)由安徽医科大学天然药物研究所提供,总黄酮含量>60%,实验前用生理盐水配成所需浓度;银杏叶提取物(EGB):宁波市中药制药厂出品,批号:20021001;盐酸异丙肾上腺素(Iso):上海禾丰制药有限公司产品,批号:011001;MDA,SOD,GSH-PX和ATPase试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

1.2 动物

Wistar大鼠,体重180~200g,♀♂各半,均由安徽医科大学实验动物中心提供,动物合格证号:皖医实动准第01号。

表1 TFR对异丙肾诱导大鼠血清中MDA含量,SOD和GSH-Px活性的影响($n=8, \bar{x} \pm s$)

Tab 1 Effects of TFR on the content of MDA and the activities of SOD, GSH-Px in serum of rats ($n=8, \bar{x} \pm s$)

Group	Dose /mg · kg ⁻¹	MDA /nmol · mL ⁻¹	SOD NU · mL ⁻¹	GSH-PX /U · mL ⁻¹
Normal		0.244 ± 0.117	205.74 ± 8.34	454.06 ± 28.42
Model		0.446 ± 0.189 ¹⁾	191.37 ± 10.97 ²⁾	378.98 ± 30.57 ²⁾
TFR	60	0.379 ± 0.160	195.99 ± 11.89	453.45 ± 15.70 ³⁾
	30	0.080 ± 0.037 ⁴⁾	200.40 ± 3.91 ³⁾	512.32 ± 101.90 ⁴⁾
	15	0.258 ± 0.172	205.60 ± 7.35 ⁴⁾	398.32 ± 80.38
EGB	100	0.153 ± 0.071 ⁴⁾	200.64 ± 3.98 ³⁾	423.09 ± 31.03 ³⁾

注:与正常组比较,¹⁾ $P < 0.01$,²⁾ $P < 0.05$;与模型组比较,³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$

Note:¹⁾ $P < 0.01$,²⁾ $P < 0.05$, vs normal group; ³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$, vs model group

2.2 TFR对心肌缺血大鼠心肌组织中ATPase活力的影响

Mg²⁺-ATPase以及T-ATPase的降低有明显的抑制作用,显著改善大鼠缺血心肌中ATPase的活力。见表2。

TFR 30 mg · kg⁻¹对sc Iso后Na⁺-K⁺-ATPase, Ca²⁺-

表2 TFR对异丙肾诱导大鼠心肌组织中ATPase活性的影响($n=8, \bar{x} \pm s$)

Tab 2 Effect of TFR on the activity of ATPase in myocardium of Iso-induced myocardial ischemia rats ($n=8, \bar{x} \pm s$)

Group	Dose /mg · kg ⁻¹	Na ⁺ -K ⁺ -ATPase	Ca ²⁺ -Mg ²⁺ -ATPase /Umolpi · mgpro ⁻¹ · h ⁻¹	T-ATPase
Normal		0.282 ± 0.069	0.136 ± 0.043	0.418 ± 0.103
Model		0.204 ± 0.050 ¹⁾	0.092 ± 0.028 ²⁾	0.296 ± 0.072 ²⁾
TFR	60	0.232 ± 0.019	0.111 ± 0.014	0.343 ± 0.032 ³⁾
	30	0.273 ± 0.033 ⁴⁾	0.120 ± 0.021 ³⁾	0.394 ± 0.055 ³⁾
	15	0.193 ± 0.033	0.081 ± 0.015	0.274 ± 0.048
EGB	100	0.257 ± 0.037 ⁴⁾	0.122 ± 0.018 ³⁾	0.380 ± 0.055 ³⁾

注:与正常组比较,¹⁾ $P < 0.01$,²⁾ $P < 0.05$;与模型组比较,³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$

Note:¹⁾ $P < 0.01$,²⁾ $P < 0.05$, vs normal group; ³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$, vs model group

1.3 方法^[3]

Wistar大鼠48只(180~200g),随机分为正常对照组,模型组,TFR 60,30,15 mg · kg⁻¹ 3个剂量组及EGB阳性药对照组,每组8只,♀♂各半。ig给药,连续7d,第6天ig 2h后,除正常对照组sc生理盐水,其余组sc Iso,第7天处理同第6天。实验结束后,取血,待测血清中MDA含量,SOD及GSH-PX活力;取固定部位心肌组织,待测ATPase活性。同时行病理组织学检查,并根据其病理损伤程度进行分级。

1.4 统计学处理

用SPSS 10.0软件进行分析,组间比较采用t检验,病理分级结果组间比较采用Ridit分析。

2 结果

2.1 TFR对心肌缺血大鼠血清中MDA含量,SOD及GSH-PX活力的影响

sc Iso后模型组大鼠血清中MDA的生成与正常对照组相比显著增加,而SOD和GSH-PX酶的活性降低,TFR显著降低心肌缺血大鼠血清中MDA的生成,明显升高其血清中SOD和GSH-Px活力。见表1。

2.3 TFR 对心肌缺血大鼠心肌组织病理学的影响

参照文献^[4]将心肌病理损伤程度分为4级,即:0级为无病变,Ⅰ级为心内膜下局灶性病变;Ⅱ级为心肌大范围灶性病变,肌纤维肿胀和断裂;Ⅲ级为心肌广泛融合性病变。光镜检查发现:模型组大鼠在 sc Iso 后心肌细胞病理损伤明显,有多处点状坏死灶,炎性细胞浸润,心肌纤维断裂,坏死融合。正常组心肌无明显变化。TFR 60,30 mg · kg⁻¹明显改善心肌损伤,可见少量的炎性细胞浸润。结果见图1。采用 Ridit 分析方法对其病理学分级进行统计分析,TFR 60,30 mg · kg⁻¹组较模型组明显降低,结果见表3。

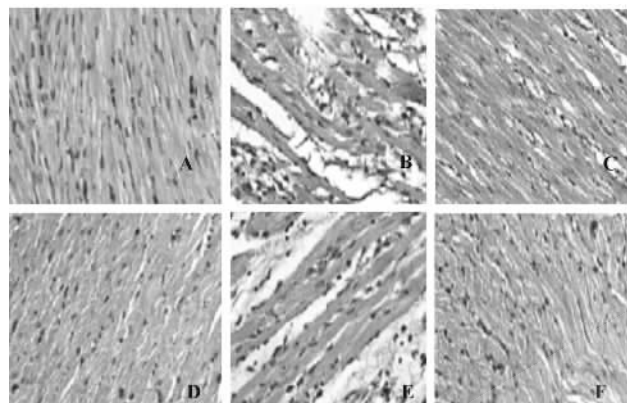


图1 TFR 对异丙肾诱导心肌缺血大鼠心肌病理组织学的影响
A: 正常组(HE × 200); B: 模型组(HE × 200); C: TFR 60 mg · kg⁻¹(HE × 200); D: TFR 30 mg · kg⁻¹(HE × 200); E: TFR 15 mg · kg⁻¹(HE × 200); F: EGB 100 mg · kg⁻¹(HE × 200)

Fig 1 Effect of TFR on histopathologic examination of myocardium in rats

A: Normal group(HE × 200); B: Model group(HE × 200); C: TFR 60 mg · kg⁻¹(HE × 200); D: TFR 30 mg · kg⁻¹(HE × 200); E: TFR 15 mg · kg⁻¹(HE × 200); F: EGB 100 mg · kg⁻¹(HE × 200)

表3 TFR 对异丙肾诱导心肌缺血大鼠心肌病理组织学评分的影响

Tab 3 TFR influence on the degree of ischemic myocardial pathobiological grades

Group	Dose /mg · kg ⁻¹	n	Pathobiological Grades			
			0	I	II	III
Normal		8	6	2	0	0
Model		8	0	0	3	5 ¹⁾
TFR	60	8	0	7	1	0 ³⁾
	30	8	0	5	2	1 ²⁾
	15	8	0	3	3	2
EGB	100	8	0	5	2	1 ²⁾

注:与正常组比较,¹⁾P < 0.01;与模型组比较,²⁾P < 0.05,³⁾P < 0.01

Note:¹⁾P < 0.01, vs normal group; ²⁾P < 0.05, ³⁾P < 0.01, vs model group

3 讨论

心血管疾病是严重危害人类健康的疾病,其中冠心病是心血管疾病中最为严重的疾病之一,发病率高、死亡率高。其病因是冠状动脉血管粥样硬化、痉挛等导致通道狭窄,造

成心肌血氧平衡失调而产生心肌损伤。目前临床用于治疗心肌缺血的药物效果却不尽如人意,治疗药物主要有溶血栓药和钙拮抗剂,前者早期使用虽能溶解血栓,使阻塞的血管实现再通,但由于缺血后的再灌注,可使心肌细胞损伤进一步加重。后者虽广泛用于临床治疗,但疗效评价并不一致。因此,寻找开发预防和治疗心脑血管缺血有效药物的研究已成为目前国内外医药界特别关注的课题。TFR 是从映山红花中提取的总黄酮成分,本实验主要是观察 TFR 对 sc Iso 诱发心肌缺血大鼠心肌损伤的保护作用及可能机制。

sc Iso 会诱发大鼠心肌出现持续缺血缺氧导致心肌组织损害,且由于 Iso 诱发大鼠出现急性心肌缺血的效果确实、可靠,该模型已成为研究抗心肌缺血药物的经典模型。本研究发现 sc Iso 后模型组大鼠心肌组织中有多处点状坏死灶,炎性细胞浸润,心肌纤维断裂,坏死融合,TFR 60,30 mg · kg⁻¹组仅见少量的炎性细胞浸润。提示 TFR 能显著改善 sc Iso 后大鼠心肌病理损伤程度。

相关研究表明^[5]心肌缺血时有大量自由基生成,使心肌细胞膜中不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应,加重心肌缺血。MDA 是细胞膜脂质过氧化产物,是评价心肌缺血损伤的较好指标之一^[6]。且心肌缺血时,SOD 和 GSH-Px 酶的活性降低,可导致 OFR 堆积,OFR 可转变为 ·OH,而后者活性更强,可加剧细胞膜的结构和功能损伤,所以 SOD 和 GSH-Px 活性的高低可间接反应机体清除氧自由基的能力。研究显示 TFR 显著降低心肌缺血大鼠血清中 MDA 的生成,明显升高其血清中 SOD 和 GSH-Px 的活力,提示抑制心肌脂质过氧化是 TFR 抗心肌缺血的重要机制之一。

文献报道^[7]ATPase 是存在于细胞和细胞器膜上的一种蛋白质,在物质转运、能量转换、信息传递等方面有重要作用。机体组织在缺氧缺血及一些疾病状态下,该酶的活性会明显降低。它主要有 Na⁺-K⁺-ATPase 和 Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase。Na⁺-K⁺-ATPase 镶嵌于线粒体内膜,是维持正常线粒体膜流动的关键酶。线粒体钠泵功能出现障碍,膜流动性下降导致线粒体氧化磷酸化功能障碍,ATP 合成不足,又直接降低 Na⁺-K⁺-ATPase 的活性,两者互为因果,造成恶性循环^[8]。Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase 是维持细胞内 Ca²⁺-Mg²⁺平衡的物质。正常细胞内钙维持在较低水平。Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase 的活性下降、细胞内钙超载,是导致线粒体氧化磷酸化功能障碍、结构受损和细胞坏死的重要原因^[9]。本研究发现 TFR30 mg · kg⁻¹能抑制心肌缺血大鼠心肌组织中 Na⁺-K⁺-ATPase, Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase,总 ATPase 活力的降低。提示改善心肌细胞能量代谢可能是 TFR 抗心肌缺血损伤的又一重要机制。

综上所述,TFR 对缺血性心肌损伤具有保护作用,其作用机制可能与抑制氧自由基生成、改善心肌能量代谢有关。

REFERENCES

[1] LI Q L, CHEN Z W, MA C G, *et al.* Protective effects and mechanism of total flavone of the flowers of *Abelmoschus* on the injury of

- myocardial ischemia[J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报),2001,17(4):466-468.
- [2] WU P, HUANG Y P, YE D J *et al.* Progress in studies on mechanism of promoting blood circulation and removing blood stasis of 3,4-dihydroxyacetophenone[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药),2001,32(3):277-279.
- [3] WANG Y M, LIU X J, WANG M W. Effect of Zandansongtang oral liquor on experimental myocardial ischemia[J]. Chin Pharm J(中国药理学杂志),2002,8(3):37-38.
- [4] LING Z Q, XIE B J, JIANG T *et al.* Protective effect of procyanidins' extract from the lotus' speedpod on experimental myocardial injury in rats[J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报),2001,17(6):687-689.
- [5] SALVATORE C, DENNIS P. R, ACHILLE P. C *et al.* Antioxidant therapy; a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury [J]. Pharmacol Rev, 2001,53(1):135-159.
- [6] CHEN Z W, ZHANG J S, CEN D Y *et al.* Protective effect of compound Ginkgo solution on experimental myocardial ischemia [J]. Chin Tradit Pat Med(中药材),1998,20(7):30-31.
- [7] HACKENBROCK C K, BAUE A E, JOHNSON D, *et al.* Lateral diffusion and electron transfer in the mitochondrial inner membrane [J]. Trends Biochem Sci,1998,6:151-158.
- [8] SLATER E C, TODA K, KAYANO K, *et al.* A hypothesis for the mechanism of respiratory chain phosphorylation not involving the electrochemical gradient of protons as obligatory intermediate [J]. Biochem Biophys Acta,1995,811:217-219.
- [9] LENEN S, GORLICH J K, RUSTENBECK I, *et al.* Regulation of transmembrane in transport by reaction products of phospholipase as infects of lypiphospholipilid on mitochondrial Ca^{2+} transport [J]. Biochem Biophys Acta,1999,982:140-146.

收稿日期:2006-10-20