

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.33.004

氧化苦参碱预处理对急性心肌梗死大鼠的保护作用与机制*

崔华楠^{1#} 李 燕^{2#} 周自强¹ 王妍军¹ 陈 楠¹ 吴明营^{1△}

(1 首都医科大学附属北京同仁医院心脏中心 北京 100730; 2 北京军区总医院体检中心 北京 100007)

摘要 目的:探讨氧化苦参碱(OMT)对冠脉结扎诱导的急性心肌梗死大鼠的保护作用与机制。**方法:**将 SD 大鼠随机分为 4 组:假手术组、假手术 +OMT 组、心梗模型组、OMT 预处理组(ig 给予 OMT 100 mg/kg)。给药 12 小时后,结扎冠状动脉左前降支(LAD)复制大鼠急性心肌梗死模型。8 小时后,取大鼠心肌组织,通过 TUNEL 染色观察大鼠心肌细胞损伤及凋亡情况;收集大鼠血清,检测 LDH 与 CK 水平,过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH)的活力,丙二醛(MDA)含量,ELISA 法分析血清中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的水平。**结果:**与假手术组比较,模型组大鼠的凋亡心肌细胞数明显增加($P<0.05$),血清 CK、LDH 水平显著升高($P<0.05$);同时,血清 CAT、SOD 与 GSH 的活性明显降低($P<0.001$),MDA 的含量、IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平显著增加($P<0.001$)。OMT 预处理明显减轻了心肌梗死大鼠心肌细胞的损伤和凋亡,降低了其血清 MDA 含量,IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平,增加了其 CAT、SOD 与 GSH 的活性。**结论:**氧化苦参碱预处理能够显著减轻心肌梗死大鼠的心肌损伤,这可能与抗炎、抗凋亡与抗氧化损伤作用有关。

关键词:氧化苦参碱;心肌梗死;凋亡;炎症反应;氧化应激

中图分类号:Q95-3;R542.22 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2014)33-6411-04

Protective Effects and Mechanisms of Oxymatrine Pretreatment on a Rat Model of Acute Myocardial Infarction*

CUI Hua-nan¹, LI Yan^{2#}, ZHOU Zi-qiang¹, WANG Yan-jun¹, CHEN Nan¹, WU Ming-ying^{1△}

(1 Cardiac Centre of Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Beijing, 100730, China;

2 Medical Examination Center, Beijing Military General Hospital, Beijing, 100007, China)

ABSTRACT Objective: To explore the protective effects and mechanisms of oxymatrine pretreatment on coronary artery ligation induced myocardial infarction. **Methods:** SD rats were randomly assigned into sham, sham+OMT, myocardial infarction, and OMT pretreatment groups. OMT (100 mg/kg) was given orally before the left anterior descending branch of coronary artery (LAD) ligation operation. LAD ligation induced rat myocardial infarction models of rat were made 12 hour after the administration of OMT. After 8 hours' observation, rat cardiac tissue was obtained and TUNEL staining was performed to analyze the injury and apoptosis of myocardial cells. Rat serum was collected, and LDH, CK, activities of CAT, SOD, GSH, and MDA levels were detected. Inflammatory factors of IL-1 β , IL-6, and TNF- α were detected by ELISA. **Results:** Compared with the sham group, the LAD ligation myocardial infarction resulted in significant injuries and myocardial cells apoptosis. Significant increased levels of CK, LDH, inflammatory factors, and MDA; and obvious decreased CAT, SOD, and GSH were found after myocardial infarction. OMT pretreatment attenuated myocardial infarction induced injuries and apoptosis of rat myocardial cells; decreased inflammatory factors expression and MDA production, increased levels of CAT, SOD, and GSH. **Conclusion:** OMT pretreatment attenuated myocardial infarction induced cardiac injuries; and the underlying mechanisms may due to its anti-inflammation, anti-apoptosis, and anti-oxidative effects.

Key words: Oxymatrine; Myocardial infarction; Apoptosis; Inflammatory response; Oxidative stress

Chinese Library Classification: Q95-3; R542.22 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)33-6411-04

前言

急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)是由于冠状动脉急性、持续性缺血所导致的不可逆的心肌细胞的损伤或坏

死,是心血管疾病的重要死亡病因。目前,心肌梗死的发病率呈逐年升高趋势,并且越来越年轻化^[1]。心肌梗死治疗目的以减少心肌损伤为主,并尽快恢复心室的收缩功能,目前主要使用溶栓剂及血管舒张剂^[2]。氧化苦参碱(oxymatrine, OMT)是豆科植物

* 基金项目:北京市教委科技发展计划项目(KM201010025018)

作者简介:崔华楠(1976-),男,硕士研究生,主要研究方向:心血管疾病, E-mail: huanancui@126.com;

李燕,硕士, E-mail: anglexu0_0@yahoo.com.cn

为共同第一作者

△ 通讯作者:吴明营,电话:01058266400, E-mail: wmy0_0@126.com

(收稿日期:2014-03-30 接受日期:2014-04-25)

苦参中的主要有效成分,研究表明其具有抗炎、抗氧化、抗病毒、抑制肝纤维化、改善心肌缺血并增加正性肌力等药理作用^[9],但有关其对心肌梗死的具体作用及机制研究少有报道。因此,本研究观察了 OMT 预处理对急性心肌梗死大鼠的保护作用,并初步探讨了其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

氧化苦参碱(购于中国药品生物制品检定所,HPLC 纯度>98%),IL-6、IL-1 β 、TNF- α 酶联免疫测定试剂盒(美国 R&D 公司),CK 和 LDH 测定试剂盒(南京建成),酶标仪(美国 BioTek 公司),低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司),小动物呼吸机(美国 Harvard 公司),TUNEL 凋亡检测试剂盒(罗氏公司),CAT、SOD、GSH 与 MDA 检测试剂盒(江苏碧云天生物技术研究所以)。

1.2 动物实验与分组

SD 大鼠(250-300 克),按照实验设计分为四组:假手术组(Sham 组,n=6),假手术 +OMT 组(Sham+OMT 组),模型组(AMI 组,n=6),OMT 预处理组(OMT 组)。

1.3 动物模型的复制及处理

OMT 预处理按照 100 mg/kg 给予 OMT,给药 12 小时后,复制急性心肌梗死大鼠动物模型,步骤如下:麻醉动物后,行气管插管,连接呼吸机辅助呼吸,以心尖搏动最强点为中心,沿胸骨左缘做纵形切口,并逐层分离打开胸腔,用手术拉钩撑开肋间肌切口,用眼科剪剪开心包膜,暴露左心耳后从左心耳下方 2~3 mm 处入针,结扎冠状动脉左前降支,以体表心电图肢体 II 导联出现 QRS 波降低,J 点上移,ST 段明显抬高,并持续 30 分钟以上作为模型成功的标志,然后关胸,待动物复苏后撤掉呼吸机,继续观察 8 小时,再次麻醉动物后取血液样本,处死动物,并留取左心室缺血区心肌组织,在同一部位取其它组的动物心肌组织。Sham 组动物仅经过所有的操作准备,不开胸,不结扎冠脉。

1.4 检测指标

1.4.1 心肌酶学检测 根据商品化试剂盒的使用操作说明检测大鼠血清中 CK 与 LDH 的水平:将大鼠血样 4℃ 离心(5000 rpm,10 分钟),取上清,按照说明加入各种试剂。酶标仪 460 nm 波长检测光密度值,根据标准曲线计算得出 CK 与 LDH 的相对浓度。

1.4.2 原位细胞凋亡检测 (TUNEL 实验) 大鼠心肌组织常规石蜡包埋,4 μ m 切片,常规脱蜡至水后柠檬酸盐缓冲液高温修复,牛血清封闭,PBS 洗涤,均匀将配好的反应液加至组织上,37℃ 孵育 1 小时,PBS 洗涤后,荧光下采用激发波长 488nm 观察,观察到有绿色荧光后以 POD 标记,梯度脱水透明后封片,光镜下观察,拍照。

1.4.3 CAT、SOD、GSH 与 MDA 的含量测定 CAT、SOD 与 GSH 的活力可反映细胞抗氧化能力大小,MDA 的含量则反映组织中氧化应激损伤的水平,根据相应试剂盒说明测定各个因子的浓度。

1.4.4 炎症因子检测 按照酶联免疫法试剂盒说明测定大鼠血清中的 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 炎症因子水平,酶标仪 450 nm 波长检测光密度值,根据标准曲线得出各个炎症因子的浓度。

1.5 统计学分析

所有数据均以均数 $\pm$ 标准差表示(Mean $\pm$ SD),采用 Graph-Pad Prism 5.01 进行数据分析,行单因素方差分析(ANOVA)及 Bonferroni 多组间分析,以 P<0.05 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠心肌细胞凋亡情况的比较

模型组大鼠 AMI 出现大量区心肌细胞凋亡,凋亡细胞数显著多于假手术组(P<0.001,图 1),而 OMT 预处理使 AMI 大鼠的心肌细胞凋亡数显著减少(P<0.001,图 1),在假手术组与 OMT 预处理 + 假手术组中仅发现极少量的凋亡细胞存在。

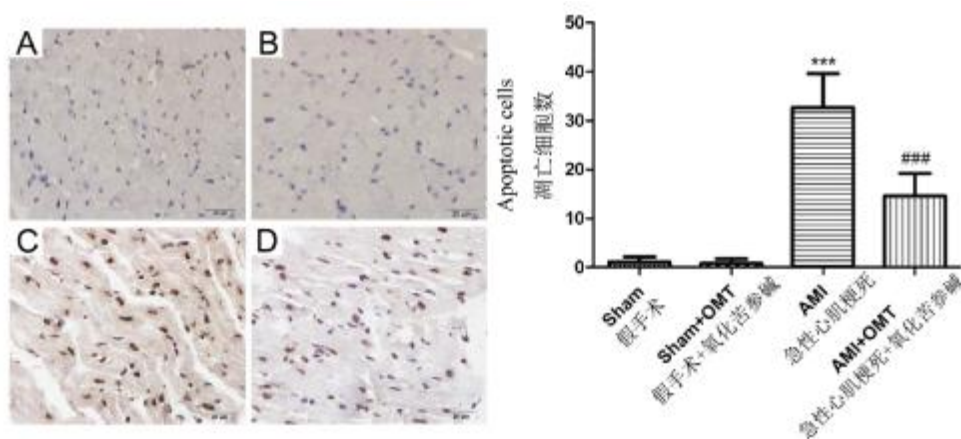


图 1 各组大鼠心肌细胞凋亡情况的比较

Fig. 1 Comparison of the apoptosis of rat myocardial cells among different groups

注:数据以 $\pm$ SD 表示,n=6。***P<0.001,与 Sham 组比较;###P<0.001,与 AMI 组比较。

Note: Data are expressed as $\pm$ SD, n=6. ***P<0.001, compared with group Sham; ###P<0.001, compared with AMI group.

2.2 各组大鼠血清 CK、LDH 水平的比较

血清 CK 与 LDH 水平及代表了心肌组织的损伤程度,与

Sham 组比较,AMI 组的血清 CK 与 LDH 水平均明显升高(P<0.001,图 2),而 OMT 预处理显著降低了 AMI 大鼠的血清

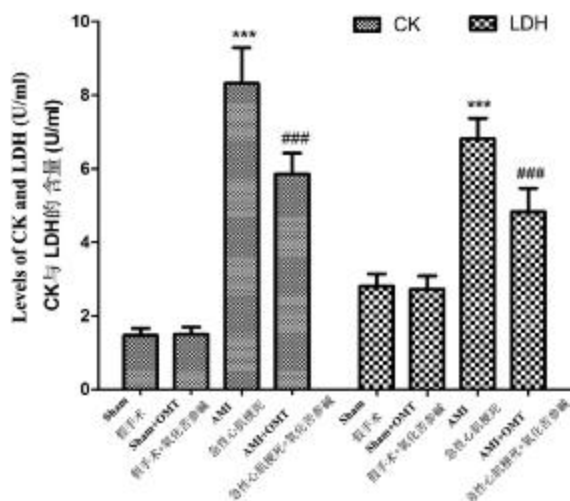


图2 各组大鼠血清CK、LDH水平的比较

Fig. 2 Comparison of the serum CK and LDH levels among different groups

注:数据以 $\pm$ SD表示, $n=6$ 。*** $P<0.001$,与Sham组比较;### $P<0.001$,与AMI组比较。

Note: Data are expressed as $\pm$ SD, $n=6$. *** $P<0.001$, compared with group Sham; ### $P<0.001$, compared with AMI group.

CK与LDH水平($P<0.001$,图2)。Sham组与Sham+OMT组的血清CK与LDH水平比较无明显差异。

2.3 各组大鼠血清CAT、SOD、GSH与MDA的含量的比较

与Sham组比较,AMI组大鼠血清CAT、SOD与GSH的活性明显降低($P<0.001$,表1),MDA的含量显著增加($P<0.001$,表1),OMT预处理明显逆转了AMI大鼠血清CAT、SOD与GSH的活性及MDA含量的变化($P<0.05$,表1),Sham组与Sham+OMT组之间血清CAT、SOD、GSH与MDA的含量都没有明显差异。

表1 OMT预处理对大鼠血清中CAT、SOD、GSH活性与MDA含量的影响

Table 1 Effect of OMT on the activities of CAT, SOD, GSH and MDA content of rats

Group	CAT (U/ml)	SOD (U/ml)	GSH (U/ml)	MDA (μ mol/l)
Sham	8.2 $\pm$ 0.9	97.1 $\pm$ 9.6	1899 $\pm$ 149	5.8 $\pm$ 0.8
Sham+OMT	8.8 $\pm$ 0.5	100.2 $\pm$ 7.8	1852 $\pm$ 133.7	5.6 $\pm$ 0.8
AMI	3.9 $\pm$ 0.7***	34.8 $\pm$ 4.1***	1114 $\pm$ 101.6***	11 $\pm$ 1.8***
AMI+OMT	5.9 $\pm$ 0.5###	65.9 $\pm$ 5.0###	1466 $\pm$ 103.6###	8.7 $\pm$ 1.2#

注:数据以 $\pm$ SD表示, $n=6$ 。*** $P<0.001$,与Sham组比较;### $P<0.001$,与AMI组比较。

Note: Data are expressed as $\pm$ SD, $n=6$. *** $P<0.001$, compared with group Sham; ### $P<0.001$ and # $P<0.05$, compared with AMI group.

2.4 各组大鼠血清IL-1 β 、IL-6和TNF- α 水平的比较

与Sham组比较,AMI组大鼠血清中炎症因子IL-1 β 、

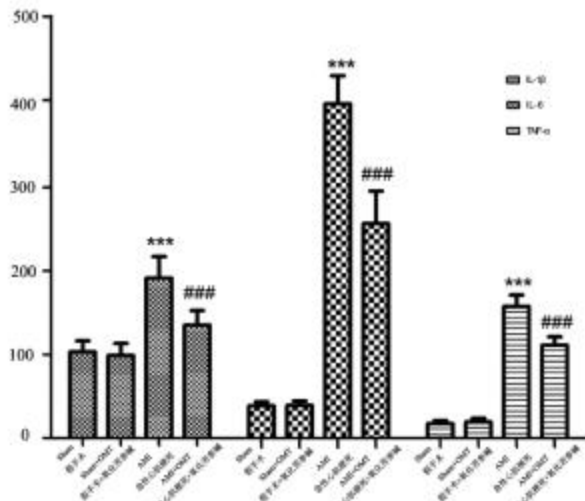
图3 各组大鼠血清IL-1 β 、IL-6和TNF- α 水平的比较

Fig. 3 Comparison of the serum IL-1 β , IL-6, and TNF- α levels among different groups

注:数据以 $\pm$ SD表示, $n=6$ 。*** $P<0.001$,与Sham组比较;### $P<0.001$,与AMI组比较。

Note: Data are expressed as $\pm$ SD, $n=6$. *** $P<0.001$, compared with group Sham; ### $P<0.001$, compared with AMI group.

IL-6和TNF- α 水平均明显升高($P<0.001$,图3),而OMT预处理明显减少了这三种炎症因子水平的升高($P<0.001$,图3)。

3 讨论

心肌梗死的病理生理过程复杂,由于冠脉供血不足导致心肌组织缺血缺氧,致使其缺血区心肌的有氧代谢中断,糖酵解加强,进一步导致ATP耗竭、心肌细胞膜上的Na⁺-K⁺-ATP酶及钙泵功能失调、细胞内钙离子聚积、心肌传导抑制、乳酸增加,导致缺血部位心肌内酸中毒,从而引起传导延缓,不应期延长及心肌的收缩障碍^[4]。同时,心肌缺血缺氧会导致细胞释放各种细胞因子及活性氧簇,引起疼痛及心肌细胞的炎症反应、损伤、凋亡或者坏死。

炎症反应是心肌梗死过程中的一个重要的促进因素。炎症因子TNF- α 、IL-6和IL-2能够通过影响心肌一氧化氮合酶对心肌细胞产生负性肌力的作用^[9]。有研究认为IL-6可以作为预测ST段抬高心肌梗死患者死亡率的一个指标^[6]。正常机体的活性氧等氧化应激产物为各种抗氧化物和抗氧化酶所平衡。抗氧化作用最强的酶类抗氧化物为SOD和CAT,SOD可以使O⁻转化为H₂O₂。然后,在GSH或CAT的作用下,将H₂O₂还原为H₂O^[7,8]。活性氧簇增多而抗氧化保护功能减弱导致的机体氧化/抗氧化失衡的氧化应激状态会导致多器官的不同损伤^[9]。心肌梗死过程中氧化应激通过过氧化细胞中的蛋白、破坏细胞脂质膜的完整加速了细胞的凋亡与坏死,并损伤能量代谢相关基因,进一步加剧了心肌梗死过程中的心肌细胞损伤和能量代谢障碍^[10]。

苦参碱首先被作为抗肝炎药物应用于临床^[11],后来的研究发现苦参碱不仅具有抗炎作用,还具有抗肿瘤、抗氧化应激、心功能保护等多种生物学作用^[12-14]。本研究结果显示:氧化苦参碱预处理不仅显著减轻了心肌梗死导致的大鼠心肌细胞的损伤

和凋亡;同时,减少了各种炎症因子的表达,并增加了抗氧化酶类 CAT、SOD 与 GSH 的活性,减少了 MDA 的产生。研究表明多种离子通道参与了缺血性心脏病的发病过程^[15],如苦参碱可能能够阻断心室肌细胞上的快速延迟整流钾电流,延长有效不应期,降低心肌梗死时异位节律的发生率^[16];也可能可以逆转乌头碱对豚鼠动作电位时程的延长作用,并能抑制钠离子通道^[17]。因此,这些离子通道可能参与了苦参碱对心肌梗死的保护;此外,研究还发现苦参碱可能调控了各类疾病过程中的氧化还原酶的表达,从而发挥抗氧化应激的作用^[18,19]。

综上所述,氧化苦参碱预处理能够显著减轻心肌梗死大鼠的心肌损伤,这可能与抗炎、抗凋亡与抗氧化损伤作用有关,具体的分子机制尚有待于进一步的研究证实。

参考文献(references)

- [1] Lapointe-Shaw L, Bell CM. Acute myocardial infarction [J]. BMJ, 2014, 348: f7696
- [2] Welch TD, Yang EH, Reader GS, et al. Modern management of acute myocardial infarction[J]. Curr Probl Cardiol, 2012, 37(7): 237-310
- [3] 程丽艳,沈佳,沈陶治,等. 苦参碱对缺血性脑中鼠小鼠神经元及星形胶质细胞的保护作用 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2012, 17(12): 1343-1348
Cheng Li-yan, Shen Jia, Shen Tao-ye, et al. Protective effects of matrine on Neurons and Astrocytes in focal ischemia induced by pMCAO in mouse [J]. Chinese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 2012, 17(12): 1343-1348
- [4] 彭章平, 朱建华. 现代缺血性心脏病 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2000: 30
Peng Zhang-ping, Zhu Jian-hua. Modern ischemic heart disease [M]. Beijing, People's military medical press, 2000: 30
- [5] Chen X, Gu M, Zhao X, et al. Deterioration of cardiac function after acute myocardial infarction is prevented by transplantation of modified endothelial progenitor cells overexpressing endothelial NO synthases[J]. Cell Physiol Biochem, 2013, 31(2-3): 355-365
- [6] Fan ZX, Hua Q, Li YP, et al. Interleukin-6, but not soluble adhesion molecules, predicts a subsequent mortality from cardiovascular disease in patients with acute ST-segment elevation myocardial infarction[J]. Cell Biochem Biophys, 2011, 61(2): 443-448
- [7] Qin C, Yap S, Woodman OL. Antioxidants in the prevention of myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. Expert Rev Clin Pharmacol, 2009, 2(6):673-695
- [8] Aruoma OI, Grootveld M, Bahorun T. Free radicals in biology and medicine: from inflammation to biotechnology [J]. Biofactors, 2006, 27(1-4): 1-3
- [9] Frank A, Bonney M, Bonney S, et al. Myocardial ischemia reperfusion injury: from basic science to clinical bedside [J]. Semin Cardiothorac Vasc Anesth, 2012, 16(3): 123-132
- [10] Bagatini MD, Martins CC, Battisti V. Oxidative stress versus antioxidant defenses in patients with acute myocardial infarction[J]. Heart Vessels, 2011, 26(1): 55-63
- [11] 孙小萌, 邱力军, 范斌, 等. 苦参碱在治疗病毒性肝炎中的临床应用[J]. 中国急救复苏与灾害医学杂志, 2011, 6(5): 427-429
Sun Xiao-meng, Qiu Li-jun, Fan Bin, et al. Clinical effect of Matrine application in treating viral hepatitis [J]. Chinese journal of emergency recovery and disaster medicine, 2011, 6(5): 427-429
- [12] 杨茜. 苦参碱与其联合顺铂对 U14 荷瘤小鼠抑制作用的研究[J]. 中国医药科学, 2012, 2(7): 34-36
Yang Qian. Inhibitory effects of Matrine and Matrine in combination with cisplatin on U14 tumor-bearing mice [J]. China medicine and pharmacy, 2012, 2(7): 34-36
- [13] 高艳, 郑萍, 闫琳, 等. 苦参碱对大鼠慢性酒精性肝损伤的作用及初步机制研究[J]. 中国药理学通报, 2013, 29(7): 1012-1016
Yan Gao, Zheng Ping, Yan Lin, et al. Preliminary mechanism study of matrine on chronic alcohol-induced hepatic injury in rats [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2013, 29(7): 1012-1016
- [14] 王小萍, 郑萍, 杨彩艳, 等. 苦参碱对高血脂致大鼠心肌损伤的保护作用[J]. 华西药科学杂志, 2008(4)
Wang Xiao-ping, Zheng Ping, Yang Cai-yan, et al. Protective effect of matrine on myocardial injury in hyperlipemia rats [J]. West China Journal of Pharmaceutical Sciences, 2008(4)
- [15] RichardConti C, 陈丽竹, 丁荣晶. 离子通道疗法在缺血性心脏病治疗中的应用[J]. 中华心血管病杂志, 2012, 40(3): 254-255
RichardConti C, Chen Li-zhu, Ding Rong-jing. Ion channel therapy of ischemic heart disease[J]. Chinese Journal of Cardiology, 2012, 40(3): 254-255
- [16] 张婉, 潘振伟, 冯铁明, 等. 苦参碱对缺血性心室肌细胞快速延迟整流钾电流的作用[J]. 中国药理学通报, 2008, 24(3): 322-326
Wan Zhang, Pan Zhen-wei, Feng Tie-ming, et al. Effects of matrine on the rapid component of delayed rectifier potassium current in ischemic ventricular myocytes[J]. Chin Pharmacol Bull, 2008, 24(3): 322-326
- [17] 李妙龄, 唐汉庆, 王勇, 等. 苦参碱对豚鼠心室肌细胞动作电位及钠通道的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2012, 18(11)
Li Miao-ling, Tang Han-qing, Wang Yong, et al. Effects of matrine on action potential and sodium channel in guinea pig papillary muscles [J]. Chinese Journal of Basic Medicine In Traditional Chinese Medicine, 2012, 18(11)
- [18] 包桂兰, 陈勇, 于铃, 等. 氧化苦参碱对局灶性脑缺血大鼠氧化应激反应的干预作用[J]. 吉林大学学报(医学版), 2012, 38(2): 245-248
Bao Gui-lan, Chen Yong, Yu Ling, et al. Interventional effects of oxymatrine on oxidative stress response of focal cerebral ischemia in rats[J]. Journal of Jilin University(Medicine Edition), 2012, 38(2): 245-248
- [19] 唐美岸, 何振华, 张秀峰, 苦参碱对肺纤维化大鼠肺线粒体氧化应激的影响[J]. 广东医学 2012, 33(2): 182-185
Tang Mei-an, He Zhen-hua, Zhang Xiu-feng, Effects of matrine on mitochondrial oxidative stress of rat models of pulmonary fibrosis[J]. Guangdong Medical Journal, 2012, 33(2): 182-185