玉郎伞水提物对大鼠离体心脏缺血再灌注损伤的影响

吕纪华，黄建春，郭又嘉，黄媛恒，黄仁彬(广西医科大学药学院，广西 南宁 530021)

摘要：目的 探讨玉郎伞水提物对大鼠离体心脏缺血再灌注损伤的作用及其机制。**方法** 将大鼠随机分为 5 组，即正常对照组，模型组，玉郎伞水提物低、高剂量组(含生药量 3，12 g·L^{-1})，阳性对照药维拉帕米组(含维拉帕米 5×10^{-7} mol·L^{-1})。离体大鼠心脏采用 Langendorff 法灌流，停灌 30 min 再灌 30 min 造成心肌缺血－再灌注损伤模型。于左心室插入水囊导管，采用 MPA 心功能分析系统记录心脏血流动力学各项指标，测定冠脉流量(coronary artery flow，CF)和冠脉流出液中肌酸激酶(creatine kinase，CK)、肌酸激酶同工酶(MB isoenzyme of creatine kinase，CK-MB)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase，LDH)、乳酸脱氢酶同工酶－1(lactate dehydrogenase isozyme-1，LDH-1)活性以及心肌组织超氧化物歧化酶(superoxide dismutase，SOD)活性、丙二醛(malondialdehyde，MDA)含量。**结果** 与模型组比较，玉郎伞水提物高剂量组可明显改善缺血－再灌注损伤心功能的各项指标，降低 CK、CK-MB、LDH、LDH-1 的活性，增加心肌组织 SOD 的活性，减少 MDA 的产生。**结论** 玉郎伞水提物对缺血－再灌注所致的心肌损伤具有保护作用，其作用机制可能与清除氧自由基、抑制脂质过氧化反应有关。

关键词： 玉郎伞；心肌缺血再灌注；心脏血流动力学；心肌酶

中图分类号： R285.5 **文献标志码：** A **文章编号：** 1003-9783(2014)06-0697-04

doi： 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.06.012

Effect of Water Extract of Radix Millettia Pulchra on Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury in Isolated Rat Heart

LV Jihua，HUANG Jianchun，GUO Youjia，HUANG Yuanheng，HUANG Renbin(School of Pharmacy，Guangxi Medical University，Nanning 530021 Guangxi，China)

Abstract：Objective To study the therapeutic effect and mechanism of water extract of Radix Millettia Pulchra (*Yulangsan*) on myocardial ischemia-reperfusion injury in isolated rat hearts. **Methods** Rats were randomized into 5 groups，namely normal control group，model group，Verapamil group(5×10^{-7} mol·L^{-1})，and low- and high-dosage *Yulangsan* water extract groups(at the concentration of 3，12 g·L^{-1}). Langendorff-perfusion method was used for the establishment of isolated rat heart model of myocardial ischemia reperfusion injury by global ischemia for 30 minutes and then reperfusion for 30 minutes. The effect of *Yulangsan* water extract on cardiac hemodynamics was observed by MPA cardiac function system(CFS). The coronary artery flow(CF) was monitored，and the activities of creatine kinase (CK)，MB isoenzyme of creatine kinase(CK-MB)，lactate dehydrogenase(LDH)，lactate dehydrogenase isozyme-1 (LDH-1) in the effluent from coronary artery were measured. Meanwhile，the activities of superoxide dismutase (SOD) and the content of malondialdehyde(MDA) in the myocardial tissues were determined. **Results** *Yulangsan* water extract at 12 g·L-1 could recover cardiac function，and reduce the activities of CK，CK-MB，LDH and LDH-1. It could increase the activity of SOD，and decrease the MDA product. **Conclusion** *Yulangsan* water extract exerts myocardial protective effects against ischemia reperfusion injury，and its mechanism may be related to the effects on scavenging oxygen free radical and reducing lipid peroxidation.

Keywords： Radix Millettia Pulchra；Myocardial ischemia-reperfusion；Cardiac hemodynamics；cardiac enzyme

收稿日期： 2013-11-14

作者简介： 吕纪华，女，助理研究员，研究方向：中药新药的研究与开发。Email：ljh2203@163.com。通讯作者：黄仁彬，男，教授，博士生导师，研究方向：心血管药理学与生化药理学。Email：huangrenbin518@163.com。

基金项目： 广西科技基础条件平台建设(12-97-20，10-108-19)；广西自然科学基金重点项目(2011GXNSFD018030)；南宁市科技攻关与新产品试制(201102084C)；南宁市青秀区科学研究与技术开发计划(2013S12)；2011 年度留学人员科技活动项目择优资助(人发 <2001>33 号)。

缺血再灌注(ischemia/reperfusion，I/R)是导致心肌损害的常见原因，心绞痛、心肌梗死后的溶栓治疗、冠状动脉成形术等均可发生缺血再灌注。玉郎伞是广西壮族的一种习用草药，为蝶形花科植物疏叶崖豆 *Millettia pulchra* Kurz var.laxior (Dunn)Z. Wei 的块根，用于治疗跌打损伤、消化不良、病后虚弱等。本课题组的前期研究[1]表明，玉郎伞水提物具有保护缺血心肌的作用。本实验拟采用离体心脏缺血再灌注模型，探讨玉郎伞水提物对心肌缺血再灌注损伤的影响及其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 药品及试剂　玉郎伞水提物，广西医科大学药学院提取制备，批号：20070101；盐酸维拉帕米注射液，上海禾丰制药有限公司，批号：5E12002。上述药品均在实验时用 K-H 液配成所需浓度。肌酸激酶(creatine kinase，CK)试剂盒，批号：20070103；乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase，LDH)试剂盒，批号：20070105；丙二醛(malondialdehyde，MDA)试剂盒，批号：20070210；超氧化物歧化酶(superoxide dismutase，SOD)试剂盒，批号：20070225；考马斯亮兰蛋白测定试剂盒，批号：20070116，均由南京建成生物工程研究所提供。肌酸激酶同工酶(MB isoenzyme of creatine kinase，CK-MB)试剂盒，批号：20070106；乳酸脱氢酶同工酶-1(lactate dehydrogenase isozyme-1，LDH-1)试剂盒，批号：20070102，由上海复星长征医学科学公司提供。其余试剂均为国产分析纯。K-H 液配方($g \cdot L^{-1}$)[2]：NaCl 6.92，KCl 0.35，$CaCl_2$ 0.28，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.29，KH_2PO_4 0.16，$NaHCO_3$ 2.1，Glu 2.0，pH=7.4。

1.2 动物　Wistar 大鼠，雌雄兼用，体质量(250 ± 10)g，广西医科大学实验动物中心提供，动物许可证号：SCXK(桂)2003-0003。

1.3 仪器　MPA 离体心脏灌流实验系统，ALC-B5 恒流泵，MPA 心功能分析系统，均为上海奥尔科特生物科技有限公司产品。

1.4 离体大鼠心肌缺血-再灌注损伤模型的制备　参考文献[3]方法，将大鼠击枕致昏，开胸迅速取出心脏置于 4 ℃预冷的 K-H 缓冲液中，轻轻挤出余血，经主动脉将其固定于 MPA 离体心脏灌流实验系统中，以饱含 95 % O_2 和 5 % CO_2 的 K-H 液[(37 ± 0.5) ℃，pH=7.4]逆行恒压灌注，压力为 80 cm 水柱。剪开左心耳，将连接于压力换能器一端的小乳胶水囊导管插入左心室，压力换能器的另一端连接至 MPA 心功能分析系统，调整水囊容积，使左室舒张末压维持于 10 mmHg 左右。连续记录左室收缩压(left ventricular systolic pressure，LVSP)、左室内压最大变化速率($\pm dp/dt_{max}$)等血流动力学指标，定时记录冠脉流量(coronary artery flow，CF)。平衡灌注 30 min，待心脏各项功能稳定后停灌 30 min，再灌注 30 min。

1.5 分组及给药　将大鼠随机分为 5 组，即正常对照组，模型组，玉郎伞水提物低、高剂量组(含生药量 3，12 $g \cdot L^{-1}$)；阳性对照药维拉帕米组(含维拉帕米 5×10^{-7} $mol \cdot L^{-1}$)。各给药组在停灌前 10 min 分别加入不同浓度的含药灌注液，并持续整个再灌注过程；除正常对照组持续灌流 90 min 外，其余离体心脏均停灌 30 min，再灌注 30 min。

1.6 玉郎伞水提物对缺血再灌注后各种生化指标的影响　收集再灌注 30 min 时的冠脉流出液，按试剂盒说明书测定冠脉流出液中 CK、LDH、CK-MB、LDH-1 的含量。再灌注结束后取各组大鼠心尖组织约 100 mg，冰浴下制成 10 %的匀浆，离心后取上清液，按照试剂盒方法测定 SOD 活性、MDA 含量，以考马斯亮蓝试剂盒进行蛋白定量。

1.7 统计学处理方法　应用 SPSS13.0 软件进行统计学处理，计量资料均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组均数比较采用方差分析。

2 结果

2.1 玉郎伞水提物对 I/R 大鼠心功能的影响　玉郎伞水提物高剂量组 CF(再灌注 10，20，30 min)、再灌注各时点的 LVSP、$+dp/dt_{max}$、$-dp/dt_{max}$ 均显著高于模型组($P < 0.05$，$P < 0.01$)，而玉郎伞水提物低剂量组再灌注各时点各项指标与模型组比较，差异无统计学意义($P > 0.05$)。说明玉郎伞水提物高剂量可明显改善 I/R 所致的心功能减退，对 I/R 造成的心功能损伤有保护作用，见表 1。

2.2 玉郎伞水提物对 I/R 大鼠心肌酶活性的影响　玉郎伞水提物高剂量组冠脉流出液中 CK、CK-MB、LDH、LDH-1 活性，与模型组比较明显降低，具有显著性差异($P < 0.01$)，玉郎伞水提物低剂量组 CK、LDH、CK-MB、LDH-1 活性与模型组比较，差异无统计学意义($P > 0.05$)，见表 2。

2.3 玉郎伞水提物对 I/R 大鼠心肌组织 SOD 活性及 MDA 含量的影响　与模型组比较，玉郎伞水提物高剂量组心肌中 SOD 活性明显升高，MDA 含量明显降低($P < 0.01$)，玉郎伞水提物低剂量对 SOD 活性及 MDA 含量均无明显影响($P > 0.05$)，见图 1 和图 2。

表 1 各组对 I/R 大鼠心功能的影响($\bar{x}\pm s$，n=8)

Table 1 Effect of each group on cardiac function of I/R in isolated rat hearts

组别	剂量	CF/mL·min^{-1}				LVSP/KPa				+dp/dt$_{max}$/Kpa·s^{-1}				−dp/dt$_{max}$/Kpa·s^{-1}			
	/g·L^{-1}	5 min	10 min	20 min	30 min	5 min	10 min	20 min	30 min	5 min	10 min	20 min	30 min	5 min	10 min	20 min	30 min
正常对照组	–	8.11±1.00**	7.99±0.98**	7.84±0.90**	7.61±0.91**	9.31±0.42**	9.21±1.23**	9.08±0.59**	8.87±0.53**	284.93±26.87**	284.64±19.51**	283.50±18.16**	279.10±27.23**	−209.49±14.34**	−209.38±21.38**	−209.27±14.34**	−207.57±19.90**
模型组	–	3.60±0.53	3.76±0.53	3.98±0.44	4.13±0.63	2.70±0.30	3.35±0.64	4.76±0.35	5.43±0.23	66.13±14.53	84.29±13.58	112.60±10.96	123.53±16.44	−57.36±14.08	−66.81±14.29	−80.08±8.97	−84.60±10.22
维拉帕米组	5×10^{-7}mol·L^{-1}	4.58±0.50**	4.85±0.59**	4.98±0.54**	5.06±0.53**	3.85±0.30**	4.99±0.78**	6.14±0.51**	6.10±0.66*	108.05±22.57**	131.20±24.87**	165.60±21.82**	160.44±24.38**	−90.38±11.32**	−103.07±16.95**	−112.45±19.21**	−122.57±11.60**
玉郎伞水提物高剂量组	12	4.31±0.60	4.78±0.58**	5.04±0.56**	5.14±0.64**	3.74±0.36**	5.25±1.13**	6.22±0.50**	6.16±0.52*	102.27±16.56**	130.32±19.14**	162.15±23.51**	158.76±16.17*	−82.03±11.20**	−100.94±21.53**	−111.96±17.32**	−119.07±11.26**
玉郎伞水提物低剂量组	3	3.91±0.42	4.13±0.46	4.08±0.51	4.00±0.47	2.89±0.20	3.81±0.54	5.00±0.33	5.64±0.31	72.18±17.15	93.88±13.79	130.12±14.34	135.97±20.02	−61.01±15.58	−71.16±14.34	−90.28±17.75	−95.03±12.66

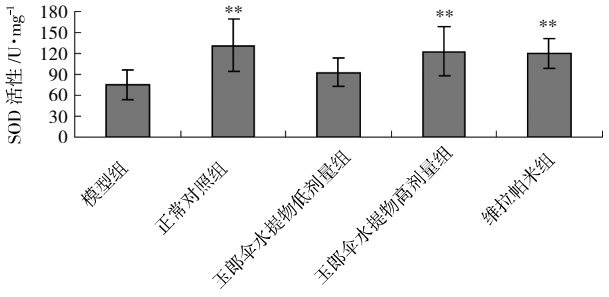
注：与模型组比较，*P<0.05，**P<0.01。

表 2 各组对 I/R 大鼠心肌酶活性的影响($\bar{x}\pm s$，n=8)

Table 2 Effect of each group on cardiac enzyme activities in I/R hearts of rats

组别	剂量 /g·L^{-1}	CK /U·L^{-1}	CK-MB /U·L^{-1}	LDH /U·L^{-1}	LDH-1/U·L^{-1}
正常对照组	–	536.9±76.2**	665.7±76.3**	627.4±89.1**	544.3±114.1**
模型组	–	1590.4±176.1	1987.1±286.9	1869.8±245.4	1328.0±170.6
维拉帕米组	5×10^{-7}mol·L^{-1}	1009.9±204.7**	1073.3±198.7**	907.6±180.8**	981.1±190.4**
玉郎伞水提物高剂量组	12	973.3±197.5**	1162.5±206.0**	941.2±143.9**	824.8±226.3**
玉郎伞水提物低剂量组	3	1467.7±165.5	1851.7±208.7	1656.0±188.3	1139.1±228.3

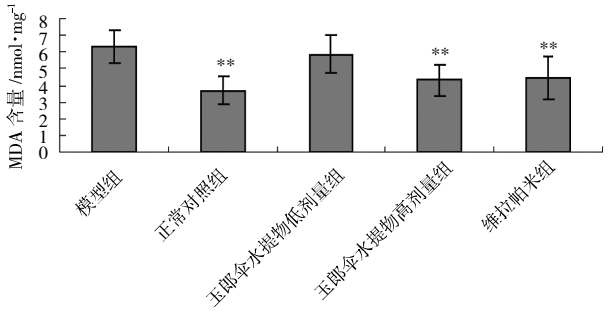
注：与模型组比较，*P<0.05，**P<0.01。



注：与模型组比较，**P<0.01。

图 1 各组对 I/R 大鼠心肌组织 SOD 活性的影响($\bar{x}\pm s$，n=8)

Figure 1 Effect of each group on SOD activity of I/R rat hearts



注：与模型组比较，**P<0.01。

图 2 各组对 I/R 大鼠心肌组织 MDA 含量的影响($\bar{x}\pm s$，n=8)

Figure 2 Effect of each group on MDA concent of I/R rat hearts

3 讨论

心肌 I/R 导致的心肌可逆性或不可逆性损伤均可造成心肌舒缩功能降低，表现为持久的心输出量减少，心室内压最大变化速率降低，再灌注性心律失常、心肌内酶的外漏和冠脉流量减少等[4]。本实验结果显示，I/R 后心脏 LVSP、±dp/dt$_{max}$ 均下降，CF 减少；玉郎伞水提物高剂量能使再灌注时 LVSP、+dp/dt$_{max}$、−dp/dt$_{max}$ 明显升高，并可显著增加心脏 I/R 时的 CF，表明玉郎伞水提物能增强心肌收缩力，提高心肌供氧量，改善心脏功能，从而对 I/R 造成的心肌损伤发挥保护作用。

心肌 I/R 后细胞膜通透性增高，心肌组织中的多种酶漏出到血管中，引起一系列血清酶学变化。因此，心肌酶是反映心肌缺血损伤的重要血液生化指标之一[5]。本实验结果显示玉郎伞水提物可减少冠脉流出液中的 CK、LDH、CK-MB、LDH-1 的水平，提示玉郎伞水提物可能具有维护心肌细胞膜稳定性和通透性，进而减轻心肌损伤、保护心脏的作用。

研究表明，心肌缺血一定时间以后恢复灌注，氧自由基含量突然明显增加，内源性抗氧化酶系统活性降低，其中以 SOD 活性降低最为明显[4]。因抗氧化酶系统活性下降，无法清除过多的氧自由基，从而引发强烈的脂质过氧化反应，导致组织细胞的损伤[6]。MDA 是脂质过氧化反应的代谢产物，其含量间接反映了机体组织的氧化应激状态。本实验结果显示，玉郎伞水提物能升高心肌组织抗氧化酶 SOD 的活性，减少 MDA 的产生，表明玉郎伞水提物能增强抗氧化酶系统，加速氧自由基的清除，具有明显的抗脂质过氧化作用。

上述结果表明，玉郎伞水提物可以对抗 I/R 引起的心肌损伤，改善心功能，稳定心肌细胞膜，减少心肌酶的释放，其机制可能与与增强抗氧化酶系统，清除氧自由基，抑制脂质过氧化反应有关。

参考文献：

[1] 焦杨，段小群，孔晓龙，等. 玉郎伞提取物对大鼠心肌缺血再灌注

损伤的保护作用[J]. 中国医院药学杂志，2004，24(12)：726-727.
[2] 徐叔云，卞如濂，陈修. 药理实验方法学[M]. 北京：人民卫生出版社，2002：1835.
[3] 廉洪，陈欢，杜景霞，等. 甘氨酸对离体缺血再灌注大鼠心脏的保护作用[J]. 华中科技大学学报(医学版)，2006，35(6)：728-730.
[4] 黄志华，李良东，肖海，等. 3'-大豆苷元磺酸钠对心肌缺血/再灌注损伤及抗氧化作用的影响[J]. 中国药理学通报，2009，25(4)：481-483.
[5] 谷万里，史载祥. 中药保护心肌缺血损伤的非循环机制研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志，2005，3(5)：422-424.
[6] Mair P，Mair J，Bleier J，et al. Reperfusion after cardioplegic cardiac arrest-effects on intracoronary leucocyte elastase release and oxygen free radical mediated lipid peroxidation [J]. Acta Anaesthesiol Scand，1995，39 (7)：960-964.

（编辑：宋威）

金苓痛风舒微丸抗炎作用及其机制研究

王晓倩[1]，李　鑫[1,2]，郭建生[1,3]，阳松威[1](1. 湖南中医药大学中药现代化研究重点实验室，湖南 长沙 410208；2. 湖南中医药大学中医诊断研究所，湖南 长沙 410208；3. 湖南中医药大学药学院，湖南 长沙 410208)

摘要：目的　研究金苓痛风舒微丸的抗炎作用及其作用机制。**方法**　采用二甲苯致小鼠耳廓肿胀及角叉菜胶致大鼠足肿胀实验探索金苓痛风舒微丸的抗炎作用。采用腺嘌呤、乙胺丁醇灌胃及关节腔注射尿酸钠复合造模的方法复制大鼠痛风性关节炎模型。将大鼠随机分为正常组，模型组，别嘌醇组(0.036 g·kg^{-1})，痛风定组(0.432 g·kg^{-1})，金苓痛风舒微丸高、中、低剂量组（37.8，18.9，9.45 g·kg^{-1})，共7组，每组10只。采用酶联免疫法(ELISA)检测血清中前炎症因子肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、干扰素-γ(IFN-γ)及白介素-8(IL-8)的表达。并观察关节滑膜组织病理形态学的改变。**结果**　金苓痛风舒微丸可有效抑制小鼠耳廓炎症肿胀（$P<0.05$)及大鼠足肿胀($P<0.05$，$P<0.01$)。显著抑制痛风性关节炎大鼠血清中TNF-α、IFN-γ、IL-8的表达($P<0.05$，$P<0.01$)，减轻大鼠关节滑膜的炎性细胞浸润、充血、肿胀和坏死($P<0.05$，$P<0.01$)。**结论**　金苓痛风舒微丸对急性炎症具有显著的抗炎作用，其对痛风性关节炎的抗炎机制可能是通过抑制前炎症因子TNF-α、IFN-γ、IL-8的表达，进而调控滑膜组织中炎症反应链，从而发挥抗炎作用。

关键词：金苓痛风舒微丸；痛风性关节炎；抗炎作用；作用机制
中图分类号：R285.5　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1003-9783(2014)06-0700-05
doi：10.3969/j.issn.1003-9783.2014.06.013

Experimental Study on Anti-inflammatory Effects of *Jinling Tongfengshu* Pellets and Its Mechanism

WANG Xiaoqian[1]，LI Xin[1,2]，GUO Jiansheng[1,3]，YANG Songwei[1](1. Key Laboratory of Modernization of Chinese Medicine，Hunan University of Chinese Medicine，Changsha 410208 Hunan，China；2. Institute of Traditional Chinese Medicical Diagnosis，Hunan University of Chinese Medicine，Changsha 410208 Hunan，China；3.College of Pharmacy，Hunan University of Chinese Medicine，Changsha 410208 Hunan，China)

Abstract：Objective　To investigate the anti-inflammatory effects and mechanism of *Jinling Tongfengshu* Pellets. **Methods**　Xylene-induced mice ear edema test and carrageenan-induced rat paw edema test were carried out to explore the anti-inflammatory effects of *Jinling Tongfengshu* Pellets. Gouty arthritis model was induced with gastric gavage of adenine and ethambutol and by intra-articular injection of monosodium sodium urate(MSU). Rats were randomized into normal control group，model group，allopurinol(0.036 g·kg^{-1}) group，Tongfeng Ding(0.432 g·kg^{-1}) group，and high-，medium- and low-dose *Jinling Tongfengshu* Pellets groups(37.8，18.9，9.45 g·kg^{-1})，10 rats in each group. After the last administration，enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) was used to detect the expression of proinflammatory cytokines of tumor necrosis factor alpha(TNF-α)，interferon gamma(IFN-γ) and

收稿日期：2014-05-20
作者简介：王晓倩，女，博士研究生，研究方向：中药新药研究与开发。Email：603688804@qq.com。通讯作者：郭建生，男，教授，博士生导师，研究方向：中药药性理论与中药新药研究。
基金项目：2014年湖南省研究生科研创新项目(CX2014B350)。