

丹皮酚对心肌缺血再灌注损伤保护作用的实验研究

刘文霞 树俊莲 曹军平 李 莉 马 毅

摘 要 **目的** 探讨丹皮酚(PA)对心肌缺血再灌注(MI/R)损伤的保护作用。**方法** 通过结扎左冠脉前降支 30min 再灌注 2h 建立 MI/R 大鼠模型,随机分为假手术组、模型组、PA 组(10、20、40mg/kg),每组 10 只,各组于术前 1 周开始灌胃给药,每天 1 次。再灌注后取血清,采用比色法测定肌酸激酶(CK)和乳酸脱氢酶(LDH)活性,ELISA 法测定肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白介素-1 β (IL-1 β)水平;取心脏,染色法测定心肌梗死面积;取心肌匀浆,比色法测定髓过氧化物酶(MPO)活力。**结果** PA 高剂量可明显缩小 MI/R 损伤大鼠的心肌梗死面积,与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,PA 各剂量可显著降低血清 CK 活性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),PA 高、中剂量可明显降低 LDH 活性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);PA 各剂量组心肌 MPO 活力明显降低,与模型组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);PA 各剂量组血清 TNF- α 和 IL-1 β 水平均比模型组显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** PA 预处理可抑制中性粒细胞浸润、减少炎性细胞因子的释放,实现对 MI/R 所致心肌损伤的保护作用。

关键词 丹皮酚 心肌缺血再灌注损伤 炎症反应

中图分类号 R965

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.03.041

Cardioprotective Effects of Paeonol Against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury in Rats. Liu Wenxia, Shu Junlian, Cao Junping, et al. Department of Special Diagnosis, The Third Hospital of China Armed Police Forces, Beijing 100141, China

Abstract **Objective** To investigate the protective effects of paeonol (PA) against myocardial ischemia/reperfusion (MI/R) injury in rats. **Methods** Rat model of MI/R injury was established by coronary artery ligation for 30 min followed by 120min reperfusion. Then rats were randomly divided into five groups ($n = 10$): sham group, model group, model + 10mg/kg PA group, model + 20mg/kg PA group and model + 40mg/kg PA group. PA was orally administered once a day for 7 days pre-operation. The CK and LDH activities in sera were detected by chromatometry and the levels of TNF- α and IL-1 β in sera were examined by ELISA after the reperfusion. The size of myocardial infarction was measured by NBT staining. The MPO activity, an index of neutrophil infiltration, in heart homogenate was determined by chromatometry. **Results** PA (40mg/kg) significantly reduced the size of myocardial infarction comparing to that of model group ($P < 0.05$). The CK activities in all PA groups and LDH activities in PA groups (20 and 40mg/kg) were significantly lower than those of model group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). PA evidently reduced the MPO activity in heart homogenate comparing to that of model group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The TNF- α and IL-1 β levels in sera of PA groups were significantly lower than those of model group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** The effectiveness of PA pretreatment in MI/R injury appears to be associated with the inhibition of neutrophil infiltration and expression of inflammatory cytokines.

Key words Paeonol; Myocardial ischemia/reperfusion injury; Inflammatory response

炎症反应在心肌缺血再灌注(myocardial ischemia/reperfusion, MI/R)损伤机制中起重要作用。TNF- α 是 MI/R 炎症连锁反应中的一个关键性介质,心肌细胞在缺血后再灌注的刺激下可合成和分泌大量的 TNF- α ^[1]。TNF- α 本身具有细胞毒作用,可通过不同途径导致心肌细胞受损,甚至溶解、死亡;TNF

- α 能刺激血管内皮细胞和中性粒细胞表达黏附分子,反过来黏附分子又促进中性粒细胞聚集并释放活性氧和蛋白水解酶等物质,导致心肌微血管阻塞,加重 MI/R 心肌损伤的程度^[2]。IL-1 β 作为一种急性炎症因子,广泛参与感染、应激及缺血再灌注等过程。IL-1 β 处于炎症级联反应上游,MI/R 损伤早期即有 IL-1 β 产生^[3];IL-1 β 同样能刺激血管内皮细胞表达黏附分子,加重缺血组织的炎症反应;抑制 IL-1 β 的产生和释放,则可减轻 MI/R 损伤的程度^[4]。

丹皮酚(paeonol, PA)为毛茛科植物牡丹的根皮及萝藦科植物徐长卿的根或全草中的活性成分之一,

作者单位:100141 武警北京总队第三医院特诊科(刘文霞);
100039 中国武警总医院药剂科(树俊莲、李莉),消毒供应科(曹军平),磁共振科(马毅)

通讯作者:马毅,电子信箱:158130707@qq.com

具有多种生物学活性和药用价值,如神经保护、改善血液流变学、抑制脂质过氧化、抗炎镇痛等,在医学等方面的应用前景广阔^[5,6]。近年研究发现,PA对心肌缺血再灌注(myocardial ischemia/reperfusion, MI/R)大鼠具有一定的心肌保护效应^[7,8]。本研究拟探讨PA的心肌保护作用及对炎性细胞因子TNF- α 和IL-1 β 的影响,以期为临床用药提供科学依据。

材料与方法

1. 动物:清洁级SD大鼠,雌雄各半,体重180~220g,由河北医科大学实验动物中心提供,实验动物许可证号:SCXK(冀)2008-1-003。

2. 药品和试剂:PA(纯度99%)购自Sigma公司,用0.5%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)配成所需浓度。氯化硝基四氮唑蓝(NBT)、髓过氧化物酶(MPO)试剂盒、肌酸激酶(CK)试剂盒、乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白介素-1 β (IL-1 β)ELISA检测试剂盒,均购自武汉博士德生物工程有限公司。

3. 方法:(1)建立MI/R大鼠模型:参照参考文献[9]加以改进,采用冠脉结扎法建立模型。取大鼠,术前12h禁食不禁水,戊巴比妥钠35mg/kg腹腔注射麻醉后,仰位固定,四肢连接ECG-1350P型十二导联心电图机。颈部分离气管,插入气管插管,连接DW-3000型动物人工呼吸机(呼吸频率60次/分,潮气量2ml/100g)。顺肋间隙方向于胸骨左旁第3、4肋间开胸,分别在第3、4肋上环绕1根0号手术线,牵拉手术线使肋骨撑开,暴露心脏,沿左心耳下缘冠脉前降支起始部3~4mm处用4-0带线缝合针穿过,进针深度控制在0.1cm左右,将一段直径1.5mm的乳胶管置于结扎线下,收紧结扎线以造成心肌缺血,约30min后(冠脉结扎成功的标志:心电图ST段明显抬高或T波高耸),松开结扎线再灌注2h(再灌注成功的标志:抬高的ST段下降1/2以上或高耸的T波下降)。结扎前心电图不正常者,未到观察终点而死亡者及造模不成功者剔除。(2)分组和给药:将成模大鼠随机分为PA高、中、低剂量组(40、20、10mg/kg)和模型组,每组10只。另取10只大鼠,开胸但不结扎冠脉,作为假手术组。各组于术前1周开始灌胃给药,每天1次,假手术组和模型组给予等体积0.5%CMC-Na。(3)血清指标的测定:再灌注结束后,各组动物由腹主动脉采血,2500r/min离心10min得血清,采用比色法分别于分光光度计660nm和440nm下测定吸光度A值,并计算CK和LDH活性,

ELISA法酶标仪下检测TNF- α 和IL-1 β 的表达水平,具体步骤按试剂盒说明书进行。(4)心肌梗死面积的测定:取心脏,用PBS缓冲液洗后,去除心房、血管及脂肪组织,在冠脉结扎线下,从心尖起将心室平行切成厚度相等的5片,放入0.1%NBT溶液中,37℃染色15min。梗死心肌呈灰白色,正常心肌则呈蓝色,图像采集后,通过软件Image Pro Plus 7.0测算梗死区面积和心室总面积,计算心肌梗死面积(%)^[10]。(5)心肌髓过氧化物酶(MPO)活力测定:另取部分心脏,生理盐水洗后,上自动匀浆机制成匀浆,3500r/min离心10min得上清,采用比色法分光光度计460nm下测定吸光度A值,并计算MPO活力,具体步骤按试剂盒说明书进行。

4. 统计学方法:采用SPSS 18.0软件进行统计处理,数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较行单因素方差分析,两两比较采用LSD-t检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. PA对MI/R大鼠心肌梗死面积的影响:心肌缺血30min再灌注2h后,模型组大鼠心肌梗死面积达40.78%,PA各剂量组可不同程度地使心肌梗死面积缩小,其中高剂量组与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.05$,表1)。

表1 各组心肌梗死面积比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量(mg/kg)	心肌梗死面积(%)
假手术组	-	0.00 $\pm$ 0.00
模型组	-	40.78 $\pm$ 6.53
PA组	10	38.10 $\pm$ 4.97
	20	34.06 $\pm$ 8.12
	40	34.05 $\pm$ 4.19*

与模型组比较,* $P < 0.05$

2. PA对MI/R大鼠心肌酶活性的影响:模型组大鼠血清CK和LDH活性比假手术组明显升高,组间差异均有统计学意义($P < 0.01$);PA各剂量组可显著降低血清CK活性,与模型组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与模型组比较,PA高、中剂量组可明显降低LDH活性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$,表2)。

3. PA对MI/R大鼠心肌MPO活力的影响:冠脉结扎30min再灌注2h后,模型组大鼠心肌MPO活力显著升高,与假手术组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$);PA各剂量组心肌MPO活力明显降低,与模型

表 2 各组血清 CK 和 LDH 活性比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 (mg/kg)	CK (U/L)	LDH (U/ml)
假手术组	-	295.40 ± 73.15	0.93 ± 0.15
模型组	-	967.12 ± 168.83 *	2.86 ± 0.74 *
PA 组	10	799.34 ± 149.00 ^Δ	2.55 ± 0.90
	20	732.66 ± 187.51 ^{ΔΔ}	2.17 ± 0.46 ^Δ
	40	745.27 ± 113.91 ^{ΔΔ}	2.02 ± 0.51 ^{ΔΔ}

与假手术组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, ^Δ $P < 0.05$, ^{ΔΔ} $P < 0.01$

组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 提示 PA 可减轻中性粒细胞浸润程度 (表 3)。

表 3 各组心肌 MPO 活力比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 (mg/kg)	MPO (U/g)
假手术组	-	51.45 ± 8.63
模型组	-	227.30 ± 31.98 *
PA 组	10	191.44 ± 40.26 ^Δ
	20	181.47 ± 29.38 ^{ΔΔ}
	40	160.99 ± 42.71 ^{ΔΔ}

与假手术组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, ^Δ $P < 0.05$, ^{ΔΔ} $P < 0.01$

4. PA 对 MI/R 大鼠炎性细胞因子表达水平的影响: 模型组大鼠血清 TNF- α 和 IL-1 β 的表达水平明显升高, 与假手术组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$); PA 各剂量组血清 TNF- α 水平比模型组显著降低, 组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); PA 各剂量均能降低血清 IL-1 β 水平, 与模型组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$, 表 4)。

表 4 各组血清 TNF- α 和 IL-1 β 的表达水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 (mg/kg)	TNF- α (pg/ml)	IL-1 β (pg/ml)
假手术组	-	47.25 ± 9.03	98.51 ± 24.34
模型组	-	200.10 ± 30.24 *	526.76 ± 100.15 *
PA 组	10	170.06 ± 29.88 ^Δ	439.50 ± 71.82 ^Δ
	20	159.42 ± 37.19 ^Δ	420.84 ± 49.97 ^{ΔΔ}
	40	158.27 ± 22.53 ^{ΔΔ}	405.63 ± 50.41 ^{ΔΔ}

与假手术组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, ^Δ $P < 0.05$, ^{ΔΔ} $P < 0.01$

讨 论

缺血预处理可对缺血再灌注造成的组织器官损伤产生明显保护作用, 但由于伦理学和方法学的原因, 临床上难以实施; 药物预处理可通过促使机体释放生物活性物质或直接激活保护机制而增强心脏对缺血、缺氧的耐受, 实现对缺血再灌注所致心肌损伤的保护作用^[11]。本研究采用缺血前给药的方式观察

PA 预处理对 MI/R 损伤的保护作用, 结果显示 PA (40mg/kg) 能显著缩小心肌梗死面积 ($P < 0.05$)。CK 和 LDH 是存在于心肌细胞中的蛋白酶, 当 MI/R 发生导致心肌细胞受损或坏死时, 这些酶的释放量增加, 其释放入血的多少被认为与心肌坏死程度呈正相关^[12]。因此, 通过测定血清中 CK 和 LDH 水平可以作为反映 MI/R 损伤程度的诊断标准之一^[13]。本研究结果表明 PA (10、20、40mg/kg) 预处理可显著降低血清 CK 活性 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), PA 高、中剂量组 (20、40mg/kg) 可明显降低 LDH 活性 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 提示 PA 可通过提高细胞膜的稳定性而发挥心肌保护作用。

炎性反应在 MI/R 损伤机制中起重要作用, 以中性粒细胞浸润为主的炎症是造成 MI/R 损伤的重要因素之一, 抗中性粒细胞治疗有可能成为防治 MI/R 的有效措施^[14,15]。MI/R 发生时激活的中性粒细胞聚集到心肌组织, 通过一系列病理机制造成心肌细胞的损伤和功能的丧失, 如释放炎性介质、细胞毒性产物, 直接损伤心肌; 黏附于微循环, 阻塞毛细血管, 造成无复流现象; 释放氧自由基, 增强脂质过氧化反应, 导致内皮细胞功能障碍等。吴志峰等^[16]通过对大鼠 MI/R 心肌组织的中性粒细胞进行定量分析, 发现其含量较之正常心肌组织显著升高, 且在再灌注 2h 时达到峰值。MPO 酶为中性粒细胞所特有, 通过分析该酶的活力, 可判断中性粒细胞浸润的程度。本研究结果表明缺血再灌注后 MPO 活性显著升高, 提示中性粒细胞浸润明显; PA 预处理可使心肌 MPO 活性明显下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 提示 PA 可通过抑制心肌内中性粒细胞浸润、减轻炎性反应来保护受损的心肌组织。

据报道, 大鼠 MI/R 损伤早期心肌组织及血清中 TNF- α 明显表达, 峰值出现在再灌注 2~4h^[17]。朱俊超等^[18]研究发现 MI/R 损伤大鼠海马内 IL-1 β 蛋白表达增多, 可在再灌注后持续数天。在大鼠 MI/R 模型中应用脂质体转染过度表达 IL-1 β 受体拮抗剂, 可减轻心肌组织的炎性浸润和细胞凋亡, 从另一个角度证明了 IL-1 β 参与 MI/R 过程中的炎性反应和心肌细胞凋亡。本研究结果表明冠脉结扎 30min 再灌注 2h 后, 血清 TNF- α 和 IL-1 β 水平明显升高, 提示这些炎性细胞因子参与了 MI/R 损伤的过程, 加重了心肌组织的灌注障碍; 经 PA 预处理, 各剂量组 (10、20、40mg/kg) 均能降低血清 TNF- α 和 IL-1 β 水平 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 这与 Quan 等关于丹酚酸 B 对 MI/R 大鼠炎性因子的研究结果相似。

提示 PA 预处理可减少炎性细胞因子的生成,抑制炎性反应,实现对 MI/R 的心肌保护作用。

参考文献

- Jin J, Chen F, Wang Q, *et al.* Inhibition of TNF- α by cyclophosphamide reduces myocardial injury after ischemia-reperfusion [J]. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*, 2013, 19(1): 24-29
- Flaherty MP, Guo Y, Tiwari S, *et al.* The role of TNF- α receptors p55 and p75 in acute myocardial ischemia/reperfusion injury and late preconditioning [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2008, 45(6): 735-741
- Takahashi M. Role of the inflammasome in myocardial infarction [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2011, 21(2): 37-41
- Yu M, Wen N, Wenzhong Z, *et al.* Effect of repeated ischaemic preconditioning on TLR4 and proinflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β in myocardial ischaemia-reperfusion injury in a rat model [J]. *Arch Med Sci*, 2010, 6(6): 843-847
- 杨正生,彭振辉,姚青海,等. 丹皮酚的药理作用研究进展[J]. *中国药物与临床*, 2011, 11(5): 545-547
- Liu J, Wang S, Feng L, *et al.* Hypoglycemic and antioxidant activities of paeonol and its beneficial effect on diabetic encephalopathy in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *J Med Food*, 2013, 16(7): 577-586
- Nizamutdinova IT, Jin YC, Kim JS, *et al.* Paeonol and paeoniflorin, the main active principles of *Paeonia albiflora*, protect the heart from myocardial ischemia/reperfusion injury in rats [J]. *Planta Med*, 2008, 74(1): 14-18
- 翟昌林,黎莉,张运. 丹皮酚对大鼠心肌缺血再灌注损伤保护中 HMGB1 表达的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2012, 30(10): 2284-2286
- Ahmed LA, Salem HA, Attia AS, *et al.* Pharmacological preconditioning with nicorandil and pioglitazone attenuates myocardial ischemi-

- a/reperfusion injury in rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 663(1-3): 51-58
- 杨建业,张迎春,唐俊明,等. 大鼠心肌缺血再灌注后心功能变化与心肌梗死面积的相关性分析[J]. *实验动物与比较医学*, 2008, 28(1): 4-9
- 张宝红. 药物预处理与缺血预处理对心肌缺血再灌注损伤保护作用的实验研究[D]. 太原:山西医科大学学位论文, 2003
- Quan W, Yin Y, Xi M, *et al.* Antioxidant properties of magnesium lithospermate B contribute to the cardioprotection against myocardial ischemia/reperfusion injury in vivo and in vitro [J]. *J Tradit Chin Med*, 2013, 33(1): 85-91
- Nakai K, Nakai K, Suwabe A. Biochemical marker for myocardial injury [J]. *Rinsho Byori*, 2002, 50(12): 1140-1145
- Goldmann BU, Rudolph V, Rudolph TK, *et al.* Neutrophil activation precedes myocardial injury in patients with acute myocardial infarction [J]. *Free Radic Biol Med*, 2009, 47(1): 79-83
- Al-Amran F, Shahkolahi M. Oxytocin ameliorates the immediate myocardial injury in rat heart transplant through downregulation of neutrophil-dependent myocardial apoptosis [J]. *Transplant Proc*, 2013, 45(6): 2506-2512
- 吴志峰,余伯阳,朱丹妮,等. 大鼠心肌缺血再灌注模型中中性粒细胞与心肌损伤程度的相关性研究[J]. *中国药科大学学报*, 2002, 33(3): 231-233
- 邹吉丽,尹照萍,张利群,等. 大鼠心肌缺血再灌注早期心肌及血清中 IL-6, TNF- α 的表达 [J]. *中国医科大学学报*, 2013, 42(9): 830-833
- 朱俊超,马虹,王俊科. 急性心肌缺血再灌注损伤大鼠海马长时程增强及 TNF- α , IL-1 β 表达的变化 [J]. *中国医科大学学报*, 2008, 37(1): 124-127

(收稿日期:2015-07-02)

(修回日期:2015-09-17)

(上接第 153 页)

参考文献

- Nakaguchi H, Tanishima T, Yoshimasu N. Factors in the natural history of chronic subdural hematomas that influence their postoperative recurrence [J]. *J Neurosurg*, 2001, 95(2): 256-262
- Song Y, Wang Z, Liu L, *et al.* The level of circulating endothelial progenitor cells may be associated with the occurrence and recurrence of chronic subdural hematoma [J]. *Clinics*, 2013, 68(8): 1084-1088
- Hara M, Tamaki M, Aovaqi M, *et al.* Possible role of cyclooxygenase-2 in developing chronic subdural hematoma [J]. *J Med Dent Sci*, 2009, 56(3): 101-106
- Fрати A, Salvati M, Mainiero F, *et al.* Inflammation markers and risk factors for recurrence in 35 patients with a posttraumatic chronic subdural hematoma: a prospective study [J]. *J Neurosurg*, 2004, 100(1): 24-32
- Delgado Lopez PD, Martin-Velasco V, Castilla-Diez JM, *et al.* Dexamethasone treatment in chronic subdural haematoma [J]. *Neurocirugia: Astur*, 2009, 20(4): 346-359
- Li T, Wang D, Tian Y, *et al.* Effects of atorvastatin on the inflammation regulation and elimination of subdural hematoma in rats [J]. *J Neurol Sci*, 2014, 341(1-2): 88-96
- Suzuki M, Endo S, Inada K, *et al.* Inflammatory cytokines locally ele-

vated in chronic subdural haematoma [J]. *Acta Neurochir-Wien*, 1998, 140(1): 51

- 陶志强,惠国桢,朱志刚,等. 外伤性硬脑膜下积液转化成慢性硬脑膜下水肿的可能机制 [J]. *江苏医药*, 2006, 32(6): 534-536
- Feng JF, Jiang JY, Bao YH, *et al.* Traumatic subdural effusion evolves into chronic subdural hematoma: two stages of the same inflammatory reaction? [J]. *Med Hypotheses*, 2008, 70(6): 1147-1149
- 张文胜,陈槐卿. 白细胞介素-8 研究进展 [J]. *生物医学工程杂志*, 2003, 19(4): 697-702
- 段立彬,何先弟,汪华学. 兔急性肺损伤早期肺泡灌洗液中促炎性细胞因子的变化 [J]. *蚌埠医学院学报*, 2014, 39(11): 1457-1459 和 1469
- Richard H. The duffy antigen receptor for chemokines DARC/ACKR1 [J]. *Front Immunol*, 2015, 6(6): 279
- Wallwork B, Coman W, Feron F, *et al.* Clarithromycin and prednisolone inhibit cytokine production in chronic rhinosinusitis [J]. *Laryngoscope*, 2002, 112(10): 1827-1830
- Chin-Yee I, Keeney M, Krueger L, *et al.* Supernatant from stored red cells activates neutrophils [J]. *Transfus Med*, 1998, 8(1): 49-56

(收稿日期:2015-08-30)

(修回日期:2015-09-07)