

八味沉香散对异丙肾上腺素诱导心肌缺血损伤大鼠抗氧化作用

李永芳,寇毅英,杨梅,冯伟力,格日力(青海大学医学院,西宁 810001)

摘要:目的 研究八味沉香散对异丙肾上腺素(ISO)诱导大鼠心肌缺血损伤组织病理学、氧化-抗氧化系统的影响。方法 大鼠 50只,随机分为正常对照组,模型对照组,阳性对照组(心得安 $0.02 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),八味沉香散 $1.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组。均灌胃给药,每天 1次,连续 10 d。除正常对照组外,其余各组均于第 8,9,10 d灌胃给药 30 min后腹腔注射 ISO $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,每天 1次,连续 3 d。末次给 ISO后 24 h,取心观察组织形态学改变,同时测定心肌组织大鼠 SOD、GSH-Px、NOS活性以及 NO和 MDA含量。结果 与正常对照组比,模型对照组心肌 SOD和 GSH-Px活性明显降低,iNOS活性、MDA和 NO含量明显升

基金项目:青海大学医学院资助项目(青医科技-2004-003)

作者简介:李永芳,女,硕士,副教授 Tel: (0971) 6104046 E-mail: yongfang9@hotmail.com

高,心肌组织严重受损;预先给予八味沉香散可明显升高心肌 SOD和 GSH-Px活性,降低 MDA、NO含量和 iNOS活性,并减轻心肌组织损伤。结论 八味沉香散对 ISO致大鼠心肌缺血损伤具有保护作用,其作用机制与减少活性氧产生,增强抗氧化剂活性,阻断脂质过氧化有关。

关键词:八味沉香散;异丙肾上腺素;心肌缺血损伤;脂质过氧化

中图分类号:R944.24;R972.9 文献标识码:A 文章编号:1007-7693(2008)06-0487-04

The Antioxidative Effect of Baweichenxiang Powder on Isoproterenol Induced Myocardial Infarction in Rats

LI Yong-fang, KOU Yi-ying, YANG Mei, FENG Wei-li, GE Ri-li(Qinghai University Medical College, Xining 810001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the effect of Baweichenxiang powder on myocardial pathologic change, myocardium lipid peroxidation and antioxidation in rats with isoproterenol(ISO)-induced myocardial injury. **METHODS** Fifty rats were random divided into normal control group, model control group, propranolol group, Baweichenxiang powder 1.0 g·kg⁻¹ group and 0.5 g·kg⁻¹ group. All rats were administered orally daily for a period of 10 days. A myocardial ischemia model on rats was established by intraperitoneal injection of isoproterenol 5 mg·kg⁻¹ once a day for consecutive 3 days. After ip ISO 24 h, the hearts were dissected and examined with microscope, the activities of SOD, GSH-Px and NOS and the contents of MDA and NO were measured. **RESULTS** In the ISO group, the myocardium activities of SOD, GSH-Px were significantly decreased ($P < 0.01$), the contents of NO and MDA and the activity of iNOS were higher than those in the normal control group. Compared with the ISO group, Baweichenxiang powder 1.0 g·kg⁻¹ group and 0.5 g·kg⁻¹ group significantly increased the activities of SOD and GSH-Px and reduced the contents of NO and MDA and the activity of iNOS. The rats in both Baweichenxiang powder 1.0 g·kg⁻¹ group and 0.5 g·kg⁻¹ group showed less histological changes than that in the ISO group. **CONCLUSION** The protective effects of Baweichenxiang powder on the myocardial injury induced by isoproterenol may be related to reducing the oxygen free radicals, protecting the antioxidants and inhibiting the lipid peroxidation in the myocardium.

KEY WORDS: Baweichenxiang powder; isoproterenol; myocardial injury; lipid peroxidation

八味沉香散是由沉香、肉豆蔻、广酸枣、白芸香、木棉花等 8味藏药组成。具有消心热、宁心安神、醒脑开窍之功效,是藏医临床治疗各种急慢性心脑血管系统疾病常用的药物^[1]。文献报道^[2]八味沉香散能显著延长小鼠耐缺氧时间。本试验主要观察八味沉香散对异丙肾上腺素诱导的大鼠心肌缺血组织损伤及氧化损伤的保护作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 药品与试剂 八味沉香散(青海省金诃藏药厂,批准文号:国药准字 Z-63020049,成人推荐剂量为 3.0 g·d⁻¹);异丙肾上腺素(上海禾丰制药有限公司,规格 2 mL·支⁻¹,批号 3E2002);普奈洛尔(心得安)(山西三普药业有限公司,规格 10 mg·片⁻¹,批号 20020619);一氧化氮合酶(NOS)、一氧化氮(NO)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒均为南京建成生物工程研究所产品。

1.1.2 动物 SD大鼠,体重(230±30)g,♀♂各半,由青海省实验动物中心提供,合格证号:青医动管 001号。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组 大鼠 50只,随机分为 5组,每组 10只,分别为正常对照组、模型对照组、阳性对照组(心得安 0.02 g·kg⁻¹)、八味沉香散 1.0 g·kg⁻¹组和 0.5 g·kg⁻¹组。均为灌胃给药,正常对照组和模型对照组给同体积生理盐水,

各组均每天给药 1次,连续 10 d。

1.2.2 心肌缺血损伤模型的制备 按照文献^[3-4]方法复制异丙肾上腺素诱导的心肌缺血损伤模型。除正常对照组外,其余各组均于第 8,9,10天灌胃给药 30 min后腹腔注射异丙肾上腺素(ISO)5 mg·kg⁻¹,制备大鼠心肌缺血损伤模型。

1.2.3 心肌组织 GSH-Px、SOD、NOS活性和 MDA、NO含量的测定 末次给 ISO后 24 h,麻醉大鼠,立即开胸取出心脏,置于冰冷的生理盐水冲洗,除去血液,滤纸吸干,称重,用生理盐水制备 10%和 5%的组织匀浆,严格按照试剂盒说明测定心肌组织 NOS、SOD、GSH-Px的活性及 MDA和 NO含量。

1.2.4 病理组织学观察 心肌经福尔马林固定后石蜡包埋并连续切片(每只大鼠约 3张切片),HE染色,光镜下观察病理改变,参照文献^[3-4]将心肌病理损伤分为 4级。0级:心肌细胞排列紧密,横纹清晰,核居中,间质未见血管扩张及炎细胞浸润,组织间隙无水肿,无出血,心外膜、心内膜无异常;I级:心肌细胞排列稀疏,间质血管扩张及少量炎细胞浸润,心肌间质水肿,可见心肌散在的点状坏死,主要为凝固性坏死灶,局限在心内膜下。II级:心肌坏死灶呈片状分布,灶间无连接,病变累及心壁全层,间质可见血管扩张及炎细胞浸润,心肌间质水肿;III级:心肌广泛性大片坏死,灶间相互连接累及心壁全层,有明显的间质血管扩张、水肿及炎细胞浸润。

1.2.5 统计学处理 采用 SPSS 12.0软件完成,计量资料,

用方差分析和 LSD-*t*检验,等级资料用秩和检验(编秩,确定秩次范围,计算平均秩次(mean rank),实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 八味沉香散对 ISO 致心肌缺血损伤大鼠心肌组织 MDA 含量、SOD 和 GSH-Px 活性的影响

模型对照组大鼠心肌的 SOD 和 GSH-Px 活性明显低于正常对照组 ($P < 0.01$), MDA 含量高于正常对照组 ($P < 0.01$)。八味沉香散 $1.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组和 $0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组及阳性对照组大鼠心肌 SOD, GSH-Px 活性高于模型对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), MDA 含量低于模型对照组 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 八味沉香散对 ISO 诱导的心肌缺血损伤大鼠心肌 MDA, GSH-Px 和 SOD 的影响 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

Tab 1 Comparison of MDA, GSH-Px, SOD activities in myocardium of rat among groups ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	MDA/ $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{pro}$	GSH-Px/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{pro}$	SOD/ $\text{nU} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{pro}$	平均秩次
正常对照组	-	1.89 ± 0.81	376.2 ± 51.6	236.5 ± 42.3	5.5
模型对照组	-	$7.67 \pm 0.45^{3)}$	$270.6 \pm 38.9^{3)}$	$113.8 \pm 7.9^{3)}$	$40.1^{3)}$
阳性对照组	0.02	$4.20 \pm 1.81^{2)}$	$332.5 \pm 39.5^{2)}$	$178.1 \pm 35.6^{2)}$	$25.8^{2)}$
八味沉香散 $1.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组	1.0	$5.44 \pm 1.71^{2)}$	$324.9 \pm 33.6^{2)}$	$165.8 \pm 23.7^{2)}$	$27.2^{2)}$
八味沉香散 $0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组	0.5	$4.58 \pm 1.57^{2)}$	$318.8 \pm 34.2^{1)}$	$154.2 \pm 33.6^{2)}$	$28.9^{1)}$

注:与模型对照组比,¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与正常对照组比,³⁾ $P < 0.01$

Note: Compared with model control group,¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$; compared with normal control group,³⁾ $P < 0.01$

2.2 八味沉香散对 ISO 致心肌缺血损伤大鼠心肌组织中 NO 含量及总 NOS, iNOS 的影响

模型对照组大鼠心肌总 NOS, iNOS 活性和 NO 含量,明显高于正常对照组 ($P < 0.01$)。八味沉香散 $1.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组和 $0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组心肌总 NOS, iNOS 活性和 NO 含量显著低于模型对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 2。

表 2 八味沉香散对 ISO 致心肌缺血损伤大鼠心肌组织中 NO 含量及总 NOS, iNOS 的影响 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

Tab 2 Comparison of NOS, iNOS, NO in rat hearts among groups ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	NO/ $\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{pro}$	NOS / $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{pro}$	iNOS / $\text{nU} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{pro}$	平均秩次
正常对照组	-	2.95 ± 0.63	0.56 ± 0.27	0.73 ± 0.27	5.5
模型对照组	-	$5.90 \pm 1.67^{3)}$	$1.78 \pm 0.95^{3)}$	$2.43 \pm 0.68^{3)}$	$40.1^{3)}$
阳性对照组	0.02	$3.07 \pm 1.14^{2)}$	$0.85 \pm 0.65^{1)}$	$1.39 \pm 0.59^{2)}$	$25.8^{2)}$
八味沉香散 $1.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组	1.0	$3.75 \pm 1.47^{2)}$	$0.97 \pm 0.29^{1)}$	$1.43 \pm 0.71^{2)}$	$27.2^{2)}$
八味沉香散 $0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组	0.5	5.39 ± 1.44	1.13 ± 0.43	2.06 ± 0.59	$28.9^{1)}$

注:与模型对照组比,¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与正常对照组比,³⁾ $P < 0.01$

Note: Compared with model control group,¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$; compared with normal control group,³⁾ $P < 0.01$

2.3 八味沉香散对 ISO 诱导的心肌缺血损伤大鼠心肌组织病理学的影响

正常对照组 10 只大鼠心肌组织均无异常。病理损伤均为 0 级;模型对照组 7 只大鼠心肌可见有广泛的心肌纤维损伤,心肌广泛性片状坏死,细胞间隙水肿明显,毛细血管扩张,有大量的炎细胞浸润。组织病理损伤为 III 级,而 3 只大鼠心肌损伤相对较轻,病理损伤为 II 级;应用心得安、八味沉香散 $1.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 预处理后,心肌组织点片状坏死,细胞间隙水肿,有少量的炎细胞浸润。心肌组织损伤明显减轻。见表 3。

表 3 八味沉香散对 ISO 诱导的心肌缺血损伤大鼠心肌组织病理学的影响 ($n=10$)

Tab 3 Comparison of pathologic change of myocardial ischemia induced by ISO in rats among groups myocardial pathologic change ($n=10$)

组别	心肌病理改变				平均秩次
	0	I	II	III	
正常对照组	10	0	0	0	5.5
模型对照组	0	0	3	7	$40.1^{3)}$
阳性对照组	0	3	6	1	$25.8^{2)}$
八味沉香散 $1.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组	0	2	7	1	$27.2^{2)}$
八味沉香散 $0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组	0	2	6	2	$28.9^{1)}$

注:与模型对照组比,¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与正常对照组比,³⁾ $P < 0.01$

Note: Compared with model control group,¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$; compared with normal control group,³⁾ $P < 0.01$

3 讨论

机体内存在着氧化与抗氧化系统,此系统的平衡是保证机体生物膜结构完整和功能正常所必须的。大剂量异丙肾上腺素可引起机体产生大量自由基,而自由基清除剂 SOD、GSH-Px 等活性下降,使机体的氧化与抗氧化系统平衡被打破,活性很强的自由基使生物膜的多不饱和脂肪酸发生脂质过氧化,其过氧化产物 MDA 进一步破坏生物膜,导致心肌细胞损伤^[5]。本研究中大鼠腹腔注射 ISO $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 后,心肌 MDA 含量明显增高, SOD、GSH-Px 活性明显降低,心肌组织灶性坏死,细胞间隙明显水肿,大量炎细胞渗出。此结果与文献^[6]报道一致。应用心得安、八味沉香散 1.0 和 $0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 预处理后,明显改善心肌病理学损伤,心肌组织 SOD、GSH-Px 活性显著增高,MDA 含量显著降低。提示八味沉香散可能干预自由基的产生并增强自由基清除剂的功能,维持心肌细胞氧化和抗氧化平衡,阻断脂质过氧化的链锁反应,发挥了抗心肌缺血损伤作用。

一氧化氮(NO)为一种细胞信使分子,由一氧化氮合酶(NOS)合成, NOS 有结构型(cNOS)和诱导型(iNOS)两类。生理情况下,主要是通过 cNOS 产生少量的 NO,调节冠脉血管的舒缩功能,抑制血小板的黏附与聚集,防止血栓形成,改善组织局部血运等保护作用^[7];但在一些因素的刺激下,如

缺血、创伤、感染等可诱导 iNOS 产生,从而释放大量的 NO,产生大量的过氧化硝酸阴离子 (ONOO⁻)和氧自由基,使细胞膜脂质过氧化、核酸硝基化, DNA 断裂,产生严重的细胞毒作用^[8-9]。有研究表明:大剂量异丙肾上腺素过度兴奋 β 肾上腺素受体,可诱导 iNOS 活性,产生过量的 NO,引起严重的细胞毒作用,导致心肌细胞损伤^[10]。本研究中,模型对照组大鼠心肌组织总 NOS、iNOS 活性以及 NO 含量明显高于正常对照组,进一步证实 iNOS 和 NO 在异丙肾上腺素引起的心肌缺血损伤中起很重要的作用。八味沉香散能降低异丙肾上腺素引起的 iNOS 活性和 NO 含量的增加,提示其可能通过抑制心肌 iNOS 活性,减少 NO 过量产生,保护心肌细胞免受 NO 及其 ONOO⁻ 的损害,发挥抗心肌缺血损伤作用。

心肌缺血可使细胞线粒体呼吸功能降低,ATP 生成减少,细胞内酸中毒以及钙超载等心肌损伤,钙超载又可激活一种蛋白酶,促进自由基生成,自由基使细胞膜的不饱和脂肪酸发生脂质过氧化,引起细胞膜和细胞器损伤,进一步加重心肌损伤。八味沉香散是否通过抑制钙超载等其他途径,改善心肌损伤,抑制自由基生成,从而减轻了过氧化损伤,还有待进一步研究。

REFERENCES

- [1] Health Bureau in Qinghai Province. Qinghai Province Tibet Medicine Standard(青海省藏药标准)[S]. 1992:118.
- [2] YANG M, GE R L, ZHOU X M, *et al*. The study on antianoxic effects of Tibetan drugs[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2004, 29(11):1117-1118.
- [3] RONA G, CHAPPEL C I, BALAZS T, *et al*. An infarct-like

myocardial lesion and other toxic manifestations produced by isoproterenol in the rat[J]. AMA Arch Pathol, 1959, 67(4): 443-455.

- [4] BERTINCHANT J P, ROBERT E, POLGE A, *et al*. Comparison of the diagnostic value of cardiac troponin I and T determinations for detecting early myocardial damage and the relationship with histological findings after isoprenaline-induced cardiac injury in rats[J]. Clin Chim Acta, 2000, 298(1-2):13-28.
- [5] ZHANG G X, KIMURA S, NISHIYAMA A, *et al*. Cardiac oxidative stress in acute and chronic isoproterenol-infused rats[J]. Cardiovasc Res, 2005, 65(1): 230-238.
- [6] SARVANAN G, PRAKASH J. Effect of garlic(Allium sativum) on lipid peroxidation in experimental myocardial infarction in rats[J]. J Ethnopharmacol, 2004, 94(1): 155-158.
- [7] KIM Y M, BOMBECK C A, BILLIAR T R. Nitro oxide as a bifunctional regulator of apoptosis[J]. Circ Res, 1999, 84(3): 253-256.
- [8] KELLY R A, BALLIGAND J L, SMITH T W. Nitro oxide and cardiac function[J]. Circ Res, 1996, 79(3): 363-380.
- [9] WANG D, YANG X P, LIU Y H, *et al*. Reduction of myocardial infarct size by inhibition of inducible nitric oxide synthase[J]. Am J Hypertens, 1999, 12(2 Pt1): 174-182.
- [10] LI D, QU Y, TAO L, *et al*. Inhibition of iNOS protects the aging heart against beta-adrenergic receptor stimulation-induced cardiac dysfunction and myocardial ischemic injury[J]. J Sury Res, 2006, 131(1): 64-72.

收稿日期: 2007-11-27