

当归挥发油对小鼠急性心肌缺血损伤的保护作用

罗慧英^{1,2}, 黄亚红¹ (1.甘肃中医药大学药理教研室, 兰州 730000; 2.甘肃省中药药理与毒理重点实验室, 兰州 730000)

摘要: 目的 研究当归挥发油对垂体后叶素所致小鼠急性心肌缺血损伤的保护作用。方法 昆明种小鼠 50 只, 随机分为对照组、模型组、当归挥发油高、低剂量组和银杏叶片组。连续灌胃 20 d 后, 采用垂体后叶素(20 U·kg⁻¹)腹腔注射建立小鼠急性心肌缺血损伤模型, 监测造模前后心电图 II 导联 J 点变化; 生化方法检测血清过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽转移酶(GSH-Px)、超氧化物歧化酶(SOD)活性, 以及乳酸(LD)和丙二醛(MDA)水平; Nagar-Olsen 染色观察心肌缺血损伤程度。结果 与模型组比较, 各治疗组缺血所致心电图 J 点的上移均显著降低($P<0.01$); 血清 CAT、GSH-Px、SOD 活力增加($P<0.05$), LD 和 MDA 含量降低($P<0.05$); 心肌缺血损伤面积减少。结论 当归挥发油对小鼠急性心肌缺血损伤具有保护作用。

关键词: 当归挥发油; 急性心肌缺血; 保护作用

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2016)02-0159-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.02.006

Protective Effect of Angelicae Sinensis Radix Volatile Oil on Acute Myocardial Ischemic Injury in Mice

LUO Huiying^{1,2}, HUANG Yahong¹ (1. Department of Pharmacology, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 2. Key Laboratory of Pharmacology and Toxicology for Traditional Chinese Medicine of Gansu Province, Lanzhou 730000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the protective effect of Angelicae Sinensis Radix volatile oil on pituitrin-induced acute myocardial ischemic injury in mice. **METHODS** The mice were randomly divided into normal group, model group, high-, low-dose of Angelicae Sinensis Radix volatile oil, and Yinxingye pian group. The acute myocardial ischemic injury model was made by injecting pituitrin in mice, the height of the J spot was measured by electrocardiogram, serum was afforded for biochemical detections, the heart were fixed for pathological investigation to observe the degree of myocardial ischemic injury. **RESULTS** Compared with the model group, the moving up of J spots in the treated groups was significantly inhibited($P<0.01$); the activities of SOD, GSH-Px and CAT increased, while the content of LD and MDA decreased($P<0.05$); Nagar-Olsen staining showed that high- and low-dose of Angelicae Sinensis Radix volatile oil significantly diminished the areas of cardiac muscles injured by ischemia. **CONCLUSION** Angelica volatile oil has protective effect on acute myocardial ischemic injury in mice. **KEY WORDS:** Angelicae Sinensis Radix volatile oil; acute myocardial ischemia; protective effect

当归(Angelicae Sinensis Radix)为伞形科(Umbelliferae)植物当归[*Angelica sinensis*(Oliv.) Diels]的干燥根, 含有黄酮、香豆素、挥发油、有机酸、多糖、氨基酸、微量元素及维生素等多种成分, 其挥发油虽然仅占当归总成分的 0.62%左右, 却具有广泛的药理作用, 具体表现在: 当归挥发油对正常离体大鼠子宫平滑肌的收缩功能具有双向调节作用^[1], 对痛经具有治疗作用^[2-3], 可解痉平喘、松弛支气管平滑肌^[4], 增强免疫功能^[5-7], 减慢心率、抗心律失常^[8], 抗血小板聚集^[9]等。本实验采用垂体后叶素腹腔注射建立小鼠急性心肌缺血损伤模型, 观察当归挥发油对垂体后叶素所致小鼠急性心肌缺血损伤的保护作用。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

当归挥发油(兰州和盛堂制药有限公司, 批号: 20100709); 银杏叶片(石家庄以岭药业股份有限公司, 批号: 20140815), 临用前稀释到所需浓度; 垂体后叶素(上海第一生化药业有限公司, 批号: 20150212); 过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽转移酶(GSH-Px)、超氧化物歧化酶(SOD)、乳酸(LD)和丙二醛(MDA)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所(批号分别为: 20150315, 20150126, 20150107, 20150217 和 20150309)。其他所用试剂均为国产分析纯。TG328A 型电子分析天平(陕西环宇仪器设备有限公司); XST-5 型动物心电图机(广东汕头无

基金项目: 甘肃省中药药理与毒理重点实验室开放基金(ZDSYS-ZZKJ-2013(B)-001)

作者简介: 罗慧英, 女, 博士, 副教授, 硕导

Tel: (0931)8765395

E-mail: louria@163.com

线电二厂); 722 可见光分光光度计(上海精密仪器有限公司); GL-20G 高速冷冻离心机(西安麒麟实验仪器有限公司)。

1.2 动物分组及给药

SPF 级昆明种小鼠 50 只, 体质量 18~20 g, ♀♂ 各半, 由甘肃中医学院实验动物中心提供, 合格证号: 21-223。随机分为对照组、模型组和当归挥发油高、低剂量组和银杏叶片组(阳性对照), 灌胃给药 20 d, 每天 2 次, 当归挥发油高、低剂量组每次分别灌胃 40, 20 mg·kg⁻¹ 的当归挥发油(0.01 mL·g⁻¹), 银杏叶片组每次灌胃 20 mg·kg⁻¹, 对照组、模型组分别灌胃等容积的生理盐水。

1.3 急性心肌缺血模型的建立

各实验组连续灌胃 20 d, 于末次给药 1 h 后, 小鼠腹腔注射乌拉坦 1.3 g·kg⁻¹ 麻醉, 仰卧位固定, 将针状电极插入四肢皮下, 用动物心电图机(标准电压 1 mV=10 mm, 纸速 50 mm·s⁻¹)记录正常小鼠 II 导联心电图。而后, 正常组腹腔注射同体积生理盐水, 其余各组腹腔注射垂体后叶素(20 U·kg⁻¹)建立急性心肌缺血模型, 30 min 后再次记录小鼠 II 导联心电图。观察小鼠缺血前后心电图 J 点电压变化, 并以 PR 段为基线记录各组小鼠 J 点位移(mV)。

1.4 组织样采集

小鼠造模后 30 min, 摘眼球取血, 5 000 r·min⁻¹ 4 °C 离心, 取血清。按照试剂盒使用说明书测定

CAT、GSH-Px 和 SOD 活性, 以及 LD 和 MDA 含量。取血后, 立即摘取心脏, 置于 4%多聚甲醛内固定, 制成心肌石蜡切片, Nagar-Olsen 染色观察心肌病理改变。方法如下: 蜡片经常规脱蜡入水, 入明矾苏木素液 10~30 s, 蒸馏水洗涤, 碱性复红染液浸染 3 min, 蒸馏水、丙酮依次洗涤, 0.1%苦味酸丙酮液分化 5~10 s, 丙酮脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封片。显微镜下观察, 摄影。

1.5 统计处理

实验数据用 SPSS 13.0 软件处理。以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验。*P*<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 当归挥发油对心肌缺血损伤小鼠心电图 J 点的影响

造模后 30 min, 与正常组 J 点高度比较, 模型组和各治疗组 J 点心电图明显上移(*P*<0.01); 与模型组相比, 各治疗组均能显著降低缺血所致心电图 J 点的上移(*P*<0.01)。结果见表 1。

2.2 当归挥发油对心肌缺血损伤小鼠 CAT、GSH-Px 和 SOD 活性影响

小鼠经缺血损伤后, SOD、GSH-Px 和 CAT 活性明显降低(*P*<0.05); 与模型组比较, 各给药组 SOD、GSH-Px、CAT 活性都显著增强(*P*<0.05)。结果见表 1。

表 1 当归挥发油对心肌缺血损伤小鼠心电图 J 点及血清 CAT、GSH-Px 和 SOD 活性影响($\bar{x} \pm s$, *n*=10)

Tab. 1 Effects of Angelica volatile oil on the J spots and the activities of CAT, GSH-Px, SOD in mice with myocardial ischemic injury($\bar{x} \pm s$, *n*=10)

组 别	J 点高度/mV	SOD/mkat·mL ⁻¹	CAT/mkat·mL ⁻¹	GSH-Px/mkat·mL ⁻¹
正常组	0.015±0.02	4.05±0.24	6.31±0.59	0.29±1.27
模型组	0.279±0.12 ²⁾	2.49±0.54 ¹⁾	3.21±0.55 ¹⁾	0.17±0.88 ¹⁾
当归挥发油低剂量组	0.158±0.09 ²⁾⁴⁾	2.98±0.56 ¹⁾³⁾	3.99±0.56 ¹⁾³⁾	0.21±1.07 ¹⁾³⁾
当归挥发油高剂量组	0.143±0.56 ²⁾⁴⁾	3.24±0.89 ¹⁾³⁾	4.18±0.54 ¹⁾³⁾	0.25±1.25 ¹⁾³⁾
银杏叶片组	0.107±0.44 ²⁾⁴⁾	3.79±1.02 ¹⁾³⁾	5.23±0.65 ¹⁾³⁾	0.24±2.11 ¹⁾³⁾

注: 与对照组比较, ¹⁾*P*<0.05, ²⁾*P*<0.01; 与模型组比较, ³⁾*P*<0.05, ⁴⁾*P*<0.01。

Note: Compared with normal group, ¹⁾*P*<0.05, ²⁾*P*<0.01; compared with model group, ³⁾*P*<0.05, ⁴⁾*P*<0.01.

2.3 当归挥发油对心肌缺血损伤小鼠 LD 和 MDA 含量的影响

小鼠经缺血损伤后, 血清中 LD 和 MDA 含量明显增加(*P*<0.05); 与模型组比较, 所有给药组 LD 和 MDA 含量都显著降低(*P*<0.05)。结果见表 2。

2.4 当归挥发油对心肌缺血损伤小鼠心肌病理变化的影响

光学显微镜下可见, 对照组心肌组织呈黄染。模型组缺血心肌呈红染。与模型组相比, 当归挥发油治疗组心肌红染面积显著减少, 黄染面积增多, 组间差异不明显。结果见图 1。

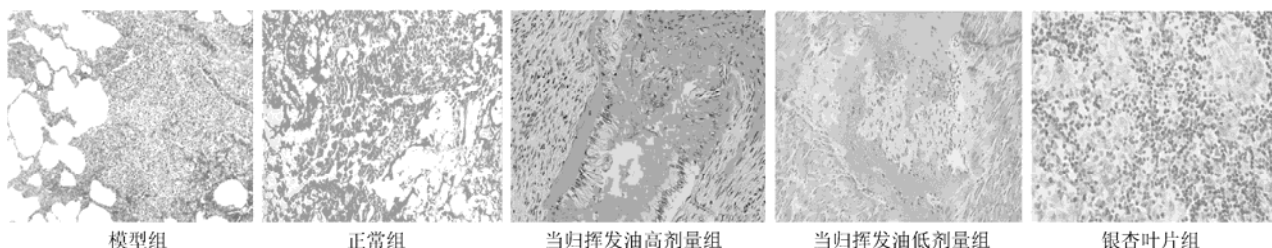


图 1 当归挥发油对心肌缺血损伤小鼠心肌病理变化的影响(Nagar-Olsen 染色, 200×)

Fig. 1 Effects of *Angelica* volatile oil on cardiac muscle psychopathology change in mice with myocardial ischemic injury(Nagar-Olsen staining, 200×)

表 2 当归挥发油对心肌缺血损伤小鼠血清 LD 和 MDA 含量的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Tab. 2 Effects of *Angelica* volatile oil on the contents of LD and MDA in mice with myocardial ischemic injury($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组 别	LD/nmol·L ⁻¹	MDA/nmol·L ⁻¹
正常组	1.53±0.21	1.52±0.41
模型组	2.17±1.00 ¹⁾	2.44±0.47 ¹⁾
当归挥发油低剂量组	1.97±0.51 ¹⁾²⁾	2.07±0.41 ¹⁾²⁾
当归挥发油高剂量组	1.87±0.74 ¹⁾²⁾	1.95±0.23 ¹⁾²⁾
银杏叶片	1.69±0.21 ¹⁾²⁾	1.82±0.54 ¹⁾²⁾

注: 与对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$ 。

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

3 讨论

心肌缺血是指心脏的血液灌注减少, 导致心脏的供氧减少, 心肌能量代谢不正常, 不能支持心脏正常工作的一种病理状态, 主要临床表现为胸闷、心悸、气短、胸痛不适等。随着人们生活水平的提高, 心肌缺血在我国的患病率呈逐年上升的趋势。垂体后叶素是从动物脑垂体后叶中提取的一种水溶性物质。具有收缩血管, 特别是毛细血管, 升高血压的作用, 同时可以诱导心肌缺血缺氧。近年来, 采用垂体后叶素建立心肌缺血动物模型已广泛应用于抗心肌缺血药物的筛选研究^[10-11]。本实验应用垂体后叶素腹腔注射建立小鼠急性心肌缺血模型, 通过监测心电图变化、检测血清生化指标及心肌组织特殊染色, 评价当归挥发油对小鼠急性心肌缺血损伤的影响。

一般来讲, 心电图变化是判断心肌缺血模型成功与否最直观的指标。QRS 波群的终点与 ST 段交接处称为 J 点, J 点上移、ST 段抬高或降低 >0.1 mV、T 波先高耸后低平者均可视为心肌缺血的心电图表现。通常大鼠、家兔、狗等动物心肌缺血模型的心电图表现可通过 ST 段的变化显示。但由于小鼠心电图 ST 段不明显。故可将 J 点位移作

为判定模型成功与否的观察指标^[12]。在本实验中, 小鼠经腹腔注射垂体后叶素后心电图 J 点明显上移, 提示心肌缺血模型复制成功。高、低剂量当归挥发油均可有效降低心肌缺血所致心电图 J 点的上移。提示其对急性心肌缺血损伤具有一定的保护作用。

正常心肌组织中葡萄糖总量的 15%经糖酵解生成 LD^[13], 经三羧酸循环产生三磷酸腺苷(ATP), 当归挥发油可降低缺血小鼠血清中 LD 含量, 可能是由于促进心肌组织中糖的有氧氧化, 抑制了酵解过程, 也可能是增强了心肌组织中 LDH 的活性, 使其转化为丙酮酸, 2 种机制共同作用使心肌组织酸中毒减轻。

活性氧是指活泼的氧自由基及其他具有氧自由基特性的含氧物质的总称, 包括超氧阴离子、羟自由基、单线态氧及过氧化氢等。生理状态下机体产生适量的自由基以维持正常代谢过程, 多余的自由基可被即时清除以维持体内含量的动态平衡。自由基平衡状态的维持依赖于氧自由基(OFR)清除酶系统^[14], 包括 SOD、CAT 和谷胱甘肽等。实验证明^[15-17], 当组织细胞缺血缺氧时, OFR 清除系统功能降低或丧失, 而生成系统却活性增强, OFR 与心肌细胞膜的多不饱和脂肪酸结合, 发生脂质过氧化作用形成脂质过氧化物, 并与细胞内的蛋白质、核酸等发生反应, 从而造成细胞结构和功能的一系列改变, 最终导致心肌细胞的损伤。在本实验中, 小鼠经腹腔注射垂体后叶素后 SOD、GSH-Px、CAT 活性明显降低, 而脂质过氧化产物 MDA 的含量显著增加, 提示 OFR 清除酶系统功能的降低, 当归挥发油可以增强 OFR 清除酶系统的活性, 减轻脂质过氧化损伤, 这一点在病理学检测中也得到了印证。这也与中药通过提高机体清除氧自由基的能力保护心脑血管抗缺血损伤的观点^[18-19]相一致。

REFERENCES

- [1] XIAO J H, ZHOU J, DING L L, et al. Dualistic actions of *Angelica naphtha* on rat uterus and screening of its active components [J]. J Huazhong Univ Sci Technol(Health)(华中科技大学学报: 医学版), 2003, 32(6): 589-596.
- [2] LIU L N, MEI Q B, CHENG J F, et al. Study on anti-dysmenorrhea effect of essential oil from *Angelica sinensis* Diels [J]. Pharm J Chin PLA(解放军药学报), 2002, 18(2): 77-79.
- [3] WANG X R, QIU M F, XIE G X, et al. Effect of essential oil from *Angelica sinensis* on level of nitric oxide and calcium ion in uterine tissue of mice [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2006, 17(5): 723-724.
- [4] 陶静仪, 阮于平, 梅其炳, 等. 当归成分藁本内酯平喘作用的实验研究[J]. 药学学报, 1984, 19(8): 561-565.
- [5] 李健蕊, 柳钟勋, 左增艳. 当归内酯对小鼠细胞免疫功能的影响[J]. 中药药理与临床, 2004, 20(5): 13-14.
- [6] 冯景奇, 柳钟勋. 当归多糖及当归内酯对小鼠细胞免疫功能的影响[J]. 中国免疫学杂志, 1998, 14(4): 279-282.
- [7] 冯景奇, 柳钟勋. 当归内酯拮抗环孢菌素 A、氢化可的松及抗肿瘤药物的免疫抑制作用[J]. 中国免疫学杂志, 2000, 16(1): 22-24.
- [8] XIAO J H, DING L L, ZHOU J, et al. Effects of A3 site from *Angelica naphtha* on myocardial physiological properties and action potentials [J]. Chin Pharm Bull(中国药理学通报), 2003, 19(9): 1066-1069.
- [9] LI M, SUN H, LI Y, et al. Comparison of *Angelica sinensis* Diels. from different habitats on the platelet aggregation and clotting time [J]. China J Basic Med Tradit Chin Med(中国中医基础医学杂志), 2003, 9(2): 47-50.
- [10] WANG Q J, PAN Z W, YUE P, et al. Effects of total flavones from *Herba Epimedii* on experimental myocardial ischemia and hemorheology of animals [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2007, 38(7): 1039-1042.
- [11] WANG Z W, HONG T, YANG Z. Protective effect of anxin on pituitrin-induced myocardial ischemic injury [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2007, 18(1): 81-82.
- [12] ZHOU Q, LU D X, FU Y M, et al. Glycine protection against the myocardial ischemic injury in mice [J]. Chin J Pathophysiol(中国病理生理杂志), 2002, 18(4): 360-362.
- [13] 王淑仙. 小红参、茜草和丹参提取物对小鼠心肌、脑 ATP 含量的影响[J]. 中草药, 1986, 17(2): 19-21.
- [14] GALANG N, SASAKI H, MAULIK N. Apoptotic cell death during ischemia/reperfusion and its attenuation by antioxidant therapy [J]. Toxicology, 2000, 148(2/3): 111-118.
- [15] KIM J K, PEDRAM A, RAZANDI M, et al. Estrogen prevents cardiomyocyte apoptosis through inhibition of reactive oxygen species and differential regulation of p38 kinase isoforms [J]. J Biol Chem, 2006, 281(10): 6760-6767.
- [16] CASTEDO E, SEGOVIA J, ESCUDERO C, et al. Ischemia-reperfusion injury during experimental heart transplantation: evaluation of trimetazidine's cytoprotective effect [J]. Rev Esp Cardiol, 2005, 58(8): 941-950.
- [17] MAENPAA C J, SHAMES B D, VANWHY S K, et al. Oxidant-mediated apoptosis in proximal tubular epithelial cells following ATP depletion and recovery [J]. Free Radical Biol Med, 2008, 44(4): 518-526.
- [18] 谢赞, 陈寿权, 李章平. 中药对心肌损伤保护作用的研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2007, 5(10): 980-981.
- [19] 高潞. 心肌缺血再灌注损伤的中药保护作用[J]. 天津药学, 2007, 19(4): 60-63.

收稿日期: 2015-05-19

氧化苦参碱对病毒性心肌炎小鼠心肌细胞凋亡及相关因子的影响

陈碧涛^{1,2}, 朱荣金¹, 杨红宇³, 朱颜鑫¹, 牟秋菊¹, 赵兵兵¹, 沈祥春³, 江滢^{1,3*} (1. 贵州医科大学微生物学教研室, 贵阳 550004; 2. 贵州省清镇市第一人民医院综合科, 贵州 清镇 551400; 3. 贵州医科大学实验动物中心, 贵阳 550004)

摘要: 目的 探讨氧化苦参碱(oxymatrine, OMT)对病毒性心肌炎小鼠心肌细胞凋亡及其凋亡相关因子蛋白表达的影响。方法 42 只 BALB/c 小鼠随机分为正常对照组(NC)、病毒性心肌炎模型组(VM)、OMT 高剂量组(OMT-H, 25 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、OMT 中剂量组(OMT-M, 12.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、OMT 低剂量组(OMT-L, 6.25 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、OMT 极低剂量组(OMT-EL, 3.125 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、利巴韦林对照组(RB, 100 mg·kg⁻¹·d⁻¹)。病毒性心肌炎小鼠由柯萨奇病毒 B3 型腹腔注射感染所致, 各治疗组从末次给予病毒 24 h 后开始, 腹腔注射, 每日 1 次。于治疗第 12 天, 每组处死小鼠 6 只, 留取心肌标本。TUNEL 法检测心肌细胞凋亡情况, 免疫印迹法和免疫组织化学法检测 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达情况。结果 OMT 治疗显著降低了病毒性心肌炎小鼠凋亡心肌细胞的数量, 与病毒性心肌炎模型组比较, OMT-L 组效果最佳($P < 0.01$)。与病毒性心肌炎模型组小鼠比较, OMT 治疗组的小鼠心肌组织中 Bax 蛋白表达降低, 而 Bcl-2 蛋白表达没有明显改变。结论 氧化苦参碱可减少病毒性心肌炎小鼠心肌细胞的凋亡, 该作用与下调 Bax 蛋白表达有关。

关键词: 氧化苦参碱; 病毒性心肌炎; 柯萨奇病毒 B3 型; 细胞凋亡

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2016)02-0162-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.02.007

基金项目: 贵州省科技计划项目(黔科合 SY 字[2012]3085 号); 贵阳医学院 2014 年高等学校大学生创新创业训练计划项目(201410660002)

作者简介: 陈碧涛, 女, 博士, 教授 Tel: (0851)86908928 E-mail: 2816837108@qq.com *通信作者: 江滢, 女, 博士, 教授 Tel: (0851)86908928 E-mail: jiangyan3313@sina.com