

# 红花提取物对大鼠心脏缺血再灌注的保护作用及机制研究

牛恒立<sup>1</sup>, 伏计能<sup>2</sup>, 马云海<sup>1\*</sup> (1.兰州大学第二医院药学部, 兰州 730000; 2.兰州大学第二医院定西医院, 甘肃 定西 743000)

**摘要:** 目的 研究红花提取物(safflower extract, SE)对心脏缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, IRI)的保护作用及作用机制。方法 50 只大鼠随机分为假手术组, IRI 组, SE 1, 2, 4 g·kg<sup>-1</sup>(以生药量计)组, 每组 10 只。SE 组于缺血前 30 min, 分别腹腔注射对应剂量的 SE, 假手术组及 IRI 组分别腹腔给予生理盐水 1 mL。IRI 组和 SE 组血管夹夹闭左冠状动脉前降支, 30 min 后松开血管夹, 术后测定各组大鼠左心室内压最大上升(下降)速率( $\pm dp/dt_{max}$ )、左心室舒张压(LVDP)、左心室舒张末期压(LVEDP)、心率(HR)。恢复心脏灌注 20 min 后, 收集各组大鼠心脏和血清, 检测各组大鼠心脏结构及心肌梗死面积, 检测肌酸激酶同工酶(CK-MB)、乳酸酶(LDH)活性、蛋白激酶 B 抗体(Akt)、磷酸化蛋白激酶 B 抗体(p-Akt)、磷脂酰肌醇 3-激酶抗体(PI3K)、雷帕霉素靶蛋白抗体(m-TOR)、核因子  $\kappa B$ (NF- $\kappa B$ )、白介素 6(IL-6)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )表达水平。结果 与假手术组相比, IRI 组 HR、LVDP、 $\pm dp/dt_{max}$ 、LVEDP 下降, CK-MB、LDH、Akt、p-Akt、PI3K、m-TOR、NF- $\kappa B$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  表达水平明显升高, 心脏病理结构改变明显。与 IRI 组相比, SE 组 HR、LVDP、 $\pm dp/dt_{max}$ 、LVEDP 升高, CK-MB、LDH、NF- $\kappa B$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  表达水平明显降低, Akt、p-Akt、PI3K、m-TOR 表达水平明显增加, 心脏病理结构改变显著减少。结论 SE 对于心脏 IRI 的保护作用呈现剂量相关性, 其作用机制与激活 PI3K/m-TOR 信号通路, 抑制炎症因子释放相关。

**关键词:** 红花提取物; 心脏缺血再灌注; 氧化应激; 炎症

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2019)12-1492-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.12.009

引用本文: 牛恒立, 伏计能, 马云海. 红花提取物对大鼠心脏缺血再灌注的保护作用及机制研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(12): 1492-1497.

## Protective Effect And Mechanism of Safflower Extract on Cardiac Ischemia-reperfusion in Rats

NIU Hengli<sup>1</sup>, FU Jineng<sup>2</sup>, MA Yunhai<sup>1\*</sup> (1.Department of Pharmacy, Lanzhou University Second Hospital, Lanzhou 730000, China; 2.Dingxi Hospital, Lanzhou University Second Hospital, Dingxi 743000, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To study the protective effect and mechanism of safflower extract(SE) on cardiac ischemia reperfusion injury(IRI) in rats. **METHODS** Fifty SD rats were randomly divided into 5 groups( $n=10$ ): sham group, IRI group, and SE 1, 2, 4 g·kg<sup>-1</sup> group(equivalent to raw material). Rats in the sham group and IRI group received saline at 30 min before operation(1 mL, intraperitoneally), SE groups received corresponding dose of SE by intraperitoneal injection. The IRI and SE groups were clamped the left anterior descending coronary artery, and removed the clamp for reperfusion after 30 min. After surgery, the  $\pm dp/dt_{max}$ , LVDP, LVEDP, HR of these rats were measured. Restore heart perfusion for 20 min, the rats were sacrificed and collected the myocardial tissues and serum, measured the structures and the area of myocardial infarction. Furthermore, CK-MB, LDH, Akt, p-Akt, PI3K, m-TOR, NF- $\kappa B$ , IL-6, TNF- $\alpha$  levels were evaluated. **RESULTS** Compared with sham group, the HR, LVDP,  $\pm dp/dt_{max}$ , LVEDP were decreased and CK-MB, LDH, Akt, p-Akt, PI3K, m-TOR, NF- $\kappa B$ , IL-6, TNF- $\alpha$  levels were decreased especially in the IRI group. The heart pathological structure had a significant change in the IRI group. Compared with the IRI group, the level of the HR, LVDP,  $\pm dp/dt_{max}$ , LVEDP were increased, CK-MB, LDH, NF- $\kappa B$ , IL-6, and TNF- $\alpha$  were increased in SE group. Moreover, the level of the Akt, p-Akt, PI3K and m-TOR were significantly increased. The changes of heart pathological structure was depressed. **CONCLUSION** SE can protect on cardiac IRI in a dose-dependent manner, and its mechanism related to activate the PI3K/m-TOR signaling pathway, and inhibit the release of inflammatory factors.

**KEYWORDS:** safflower extract; cardiac ischemia reperfusion; oxidative stress; inflammation

心脏缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, IRI)是在缺血损伤的基础上再次引起的损伤<sup>[1]</sup>, 其临床表现为梗死冠状动脉再通、梗死部位血液灌流再通后, 患者会发生血压骤降、心功能

不全、心律失常甚至猝死等一系列病情恶化的现象<sup>[2]</sup>。但其具体发病机制尚不明确, 有研究表明其与自由基、Ca<sup>2+</sup>超载、血管内皮细胞、细胞黏附分子及细胞凋亡等相关<sup>[3]</sup>。

作者简介: 牛恒立, 男, 副主任药师 Tel: (0931)8463553 E-mail: 13919199868@163.com \*通信作者: 马云海, 男, 副主任药师 Tel: (0931)8463553 E-mail: mayunhai213@126.com

红花为菊科植物红花(*Carthamus tinctorius* L.)的干燥花,其性温、味辛,具有活血化瘀之功效。临床主要用于闭塞性脑血管、冠心病等疾病的治疗<sup>[4]</sup>。研究表明<sup>[5]</sup>,红花提取物可影响血小板的聚集,能够延长凝血时间,抑制血栓形成,对于大鼠急性心肌缺血有很好的保护作用<sup>[6]</sup>。当前对红花的研究受到国内外专家的高度重视,本实验通过研究红花提取物(safflower extract, SE)对大鼠心脏 IRI 的心脏组织中相关指标的影响,探讨其对于大鼠心脏 IRI 的保护作用及其机制。

## 1 仪器与材料

### 1.1 动物

SD 大鼠 50 只,♂,清洁级,体质量( $180 \pm 20$ )g,购自兰州大学动物实验中心,合格证号: SCXK(G) 2009-0004,饲养于兰州大学第二医院药剂科动物实验室,饲养室温为 18~20 °C,自由饮水。

### 1.2 药物及试剂

SE(远方药业有限公司,批号: 20130326);肌酸激酶同工酶(CK-MB,批号: 171211)、乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(批号: 20161026)、辣根过氧化酶(HRP)、标记兔抗山羊抗体(批号: 20161026)、0.2% TritonX-100 溶液(批号: 20170311)、大鼠抗 beta-actin, HRP 标记羊抗大鼠(批号: 20170517)均购自北京中杉金桥生物科技有限公司; NF- $\kappa$ B(批号: 20170414)、IL-6(批号: 20161102)、TNF- $\alpha$  试剂盒(批号: 20170612)、PMSF(批号: 20161113)、RIP(强)裂解液(批号: 20161221)、BCA 蛋白测定试剂盒(批号: 20171201)、52 蛋白上样 buffer 缓冲液(批号: 20180304)均购自碧云天生物公司; 磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)抗体(批号: 20180116)、磷酸化蛋白激酶 B(p-AKT)抗体(批号: 20171223)、蛋白激酶 B(AKT)抗体(批号: 20171221)、雷帕霉素靶蛋白(m-TOR)抗体(批号: 20171120)均购自 Santa Cruz Biotechnology; 10% 水合氯醛(兰州大学第二医院,批号: 201306); 30% 丙烯酰胺(批号: 20161311), 10%过硫酸铵, SDS、102TBST、1.5M Tris-HClPH8.8、1M Tris-HClPH6.8(索莱宝生物公司), 0.45  $\mu$ m PVDF 膜(Millipore 公司), 预染蛋白 Marker26616(thermo 公司,批号: 20171005); TRIS、甘氨酸(amsco 公司)。

### 1.3 仪器

Langendorff 离体心脏灌流系统、MLP844 压力换能器,日立 7020 全自动生化分析仪均来自日

本 Hitachi 公司; HPD-25 真空泵(天津市恒奥科技发展有限公司); BX-50 显微镜(奥林巴斯有限公司); TG18-WS 高速离心机(湖南省长沙市康湘离心机有限公司); 病理组织漂烘机(上海之信仪器有限公司); EG1150C 包埋机(德国 leica 公司); 超净工作台(苏净集团安泰公司); 微量可调移液器(德国 Eppendorf 公司); 磁力搅拌器(美国 Corring 公司); 精密 PH 仪(美国 Beckman 公司); GTZA 型精密电子天平、AE160 型电子分析天平均来自瑞士 Mettler 公司; 通用手术器械(上海医疗器械有限公司); 电热恒温培养箱(湖北省黄石市医疗器械厂); 高速离心机(长沙维尔康湘鹰离心机有限公司); 凝胶电泳仪、多功能酶标仪、全自动凝胶成像仪均来自 Bio-RAD 公司; 脱色摇床(江苏海门麒麟医用仪器厂), 电动玻璃匀浆机(宁波新芝生物科技有限公司)。

### 1.4 SE 的制备

定量称取红花 1 000 g, 加入乙醇-水(20:80)溶液 1 000 mL, 在低压、低温下萃取, 第 1 次 50 min; 第 2 次 90 min, 合并 2 次滤液, 冷冻干燥, 得到干浸膏粉 120 g, 对其进行换算, SE 1 g=红花生药 8.33 g, 用生理盐水对干浸膏粉进行溶解得到不同浓度的 SE 溶液。

## 2 方法

### 2.1 动物分组及模型建立

将 50 只 SD 大鼠, 随机分为假手术组, IRI 组, SE 1, 2, 4 g·kg<sup>-1</sup>(以生药量计)组, 每组 10 只。SE 组于缺血前 30 min, 分别腹腔注射给予相应剂量的红花提取物, 假手术组和 IRI 组分别腹腔给予 1 mL 生理盐水, 按照文献方法<sup>[7]</sup>术前大鼠禁食 12 h, 自由饮水, 10%水合氯醛按照 10 mL·kg<sup>-1</sup>腹腔注射麻醉处理, 麻醉后仰卧固定于手术台板上。IRI 组和 SE 组大鼠心脏部位及颈部去除皮毛, 连接心电图机, 用肢体导联进行心电图监测。进行人工气管插管手术, 用小动物呼吸机进行人工呼吸, 同时开胸暴露心脏、血管, 在肺动脉圆锥和左心耳之间, 以左冠状静脉主干为标志, 于左心耳根部下方 2 mm 处进针, 进针深度 0.5 mm; 用缝合线穿过心肌表层, 在肺动脉圆锥旁出针; 丝线两端穿聚聚乙烯小管, 用止血钳夹闭小管阻断前降支。以 I、avL 导联 ST 段弓背向上抬高持续 30 min 以上作为模型成功的标志。30 min 后松开止血钳, ST 段下降显示心肌再灌注成功。假手术

组操作同上,但不夹闭左冠状动脉前降支。

## 2.2 心脏功能测定

在术后测定各组大鼠左心室内压最大上升(下降)速率( $\pm dp/dt_{max}$ )、左心室舒张压(LVDP)、左心室舒张末期压(LVEDP)、心率(HR)。

## 2.3 肌酸激酶同工酶(CK-MB)、乳酸酶(LDH)活性测定

恢复心脏灌注 20 min 后,通过腹主动脉取血,后用全自动生化仪监测各组大鼠 CK-MB、LDH 活性。

## 2.4 心肌梗死面积计算

心脏再灌注结束后,开胸取出各组大鼠心脏,取 1/4 心脏,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冷冻 20 min,从心尖到心基底部平行切成 1~2 mm 厚薄片 5~6 片,切片放入 1% TTC( $\text{pH}=7.4$ , 温度  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ )中染色 15 min,存活的心肌细胞呈红色,梗死区心肌细胞呈白色。用 Image J 图像分析软件计算心肌梗死面积百分比(心肌梗死面积%=梗死心肌面积/总心肌面积 $\times 100\%$ )。

## 2.5 心脏病理结构检查

取 1/4 心脏置于 10%多聚甲醛做石蜡切片,置于光镜下观察,余心脏组织置于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中冷冻保存,并根据形态结构评分。分级评分标准:无损伤=0 分;轻微损伤=1 分(局灶性心肌细胞损伤或变性);中度损伤=2 分(广泛的肌原纤维变性,肿胀,炎性细胞浸润);重度损伤=3 分(弥漫性坏死,肿胀,变性,大量炎细胞浸润)。

## 2.6 Western blotting 检测心脏 Akt、p-Akt、PI3K、m-TOR 蛋白表达水平

将冻存的心脏组织称重,以每 50 mg 组织 200  $\mu\text{L}$  裂解液的比例加入事先已经预冷的 1.5 mL 无酶管中,用电动玻璃匀浆机在冰浴环境下充分研磨,后将研磨液置于  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 14 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ ,离心 5 min,小心吸取上清液,放入另一  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  预冷的

无酶管中,放置于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中储存,蛋白浓度用 BCA 法进行测定。采用湿法转膜法转膜,转膜结束后,将 PVDF 膜放入含有 10%脱脂奶粉的 TBST 封闭液中,置于水平摇床,室温封闭 3 h,用配置好的 TBST 冲洗 5 次,每次 5 min。封闭好的 PVDF 膜放分别置于含有 Akt(1:500)、p-Akt(1:1 000)、PI3K(1:500)、NF- $\kappa$ B(1:200)、IL-6(1:1 000)、TNF- $\alpha$ (1:500)、m-TOR(1:200)、 $\beta$ -actin(1:5 000)的一抗的 TBST 中,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  过夜处理,室温下 TBST 清洗 5 次,每次 5 min,冲洗干净的膜置于含有二抗(1:5 000)的 TBST 中,室温孵育 2 h, TBST 清洗 5 次,每次 5 min。取 ECL 发光液中 A 液和 B 液各 200  $\mu\text{L}$ ,混匀,均匀涂抹于冲洗干净膜上反应 60 s,滤纸吸干上面多余试剂,将膜放于发光板上,放于凝胶成像系统暗室中,成像即可。

## 2.7 ELISA 检测血清中 NF- $\kappa$ B、IL-6、TNF- $\alpha$ 表达水平

按照 ELISA 试剂盒说明书操作方法,测定血清中 NF- $\kappa$ B、IL-6、TNF- $\alpha$  的表达水平。

## 2.8 统计学方法

所有数据均采用 SPSS 17.0 中 One-way ANOVA 进行处理,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。方差齐性时,采用 LSD 方法进行组间多重比较,方差不齐时,采用 Dunnett T3 方法进行组间多重比较。

## 3 结果

### 3.1 SE 对于在体心脏功能的影响

在术后测定各组大鼠的心脏功能,与假手术组相比,IRI 组 HR、LVDP、 $\pm dp/dt_{max}$ 、LVEDP 下降( $P<0.05$ );与 IRI 组相比,SE 组 HR、LVDP、 $\pm dp/dt_{max}$ 、LVEDP 升高( $P<0.05$ ),其中 SE  $4\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$  组各项指标与假手术组相比不存在显著性差异。结果见表 1。

表 1 红花提取物对于在体心脏功能的影响( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=10$ )

Tab. 1 Effects of extracts of safflower extract of cardiac function in rats( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=10$ )

| 组别       | $+dp/dt_{max}/\text{kPa}\cdot\text{s}^{-1}$ | $-dp/dt_{max}/\text{kPa}\cdot\text{s}^{-1}$ | LVDP/mmHg                          | LVEDP/mmHg                        | HR(R/M)                            |
|----------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| 假手术组     | 254.32 $\pm$ 23.47                          | 198.16 $\pm$ 17.26                          | 73.05 $\pm$ 19.43                  | 96.37 $\pm$ 14.69                 | 263.42 $\pm$ 24.41                 |
| 缺血再灌注损伤组 | 96.19 $\pm$ 51.36 <sup>1)</sup>             | 73.05 $\pm$ 19.43 <sup>1)</sup>             | 24.31 $\pm$ 9.37 <sup>1)</sup>     | 27.25 $\pm$ 10.31 <sup>1)</sup>   | 143.52 $\pm$ 41.04 <sup>1)</sup>   |
| 红花提      | 134.57 $\pm$ 16.27 <sup>1)2)</sup>          | 97.41 $\pm$ 22.04 <sup>1)2)</sup>           | 35.63 $\pm$ 12.44 <sup>1)2)</sup>  | 42.59 $\pm$ 14.24 <sup>1)2)</sup> | 178.21 $\pm$ 33.09 <sup>1)2)</sup> |
| 取物       | 2 g $\cdot$ kg <sup>-1</sup>                | 176.43 $\pm$ 33.42 <sup>1)2)</sup>          | 142.19 $\pm$ 20.51 <sup>1)2)</sup> | 46.27 $\pm$ 8.77 <sup>1)2)</sup>  | 62.24 $\pm$ 10.37 <sup>1)2)</sup>  |
|          | 4 g $\cdot$ kg <sup>-1</sup>                | 225.42 $\pm$ 33.61 <sup>2)</sup>            | 183.17 $\pm$ 12.11 <sup>2)</sup>   | 68.39 $\pm$ 11.85 <sup>2)</sup>   | 84.52 $\pm$ 24.36 <sup>2)</sup>    |
|          |                                             |                                             |                                    |                                   | 246.17 $\pm$ 59.21 <sup>2)</sup>   |

注:与假手术组比较,<sup>1)</sup> $P<0.05$ ;与缺血再灌注损伤组比较,<sup>2)</sup> $P<0.05$ 。

Note: Compared with sham group, <sup>1)</sup> $P<0.05$ ; compared with ischemia reperfusion injury group, <sup>2)</sup> $P<0.05$ .

### 3.2 SE 对 CK-MB、LDH 水平的影响

恢复心脏灌注 20 min 后, 测定各组大鼠 CK-MB、LDH 水平, 与假手术组相比, IRI 组 CK-MB、LDH 水平显著升高( $P<0.05$ ); 与 IRI 组相比, SE 组 CK-MB、LDH 水平显著下降( $P<0.05$ ), 其中 SE  $4\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$  组各项指标与假手术组相比不存在显著性差异。结果见表 2。

表 2 红花提取物对 CK-MB、LDH 水平的影响( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=10$ )

Tab. 2 Effects of extracts of safflower extract of CK-MB and LDH in rats( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=10$ )

| 组别                   | CK-MB/mU·mL <sup>-1</sup>    | LDH/mU·mL <sup>-1</sup>         |
|----------------------|------------------------------|---------------------------------|
| 假手术组                 | 87.42±10.12                  | 345.21±31.04                    |
| 缺血再灌注损伤组             | 242.15±33.56 <sup>1)</sup>   | 2 937.45±55.17 <sup>1)</sup>    |
| 红花提<br>取物            |                              |                                 |
| 1 g·kg <sup>-1</sup> | 221.61±27.12 <sup>1)2)</sup> | 2 673.41±63.24 <sup>1)2)</sup>  |
| 2 g·kg <sup>-1</sup> | 165.39±17.38 <sup>1)2)</sup> | 1 937.45±101.53 <sup>1)2)</sup> |
| 4 g·kg <sup>-1</sup> | 98.47±21.03 <sup>2)</sup>    | 831.06±79.04 <sup>2)</sup>      |

注: 与假手术组比较, <sup>1)</sup> $P<0.05$ ; 与缺血再灌注损伤组比较, <sup>2)</sup> $P<0.05$ 。  
Note: Compared with sham group, <sup>1)</sup> $P<0.05$ ; compared with ischemia reperfusion injury group, <sup>2)</sup> $P<0.05$ 。

### 3.3 SE 对大鼠心肌梗死面积的影响

1%TTC 染色后, IRI 组较假手术组心脏缺血区域呈白色或灰白色明显增多( $P<0.05$ ), SE 组较 IRI 组白色或灰白色区域减少, 鲜红色或砖红色区域增多, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ), SE  $4\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$  组较 IRI 组鲜红色或砖红色区域明显增多( $P<0.05$ )。结果见图 1。

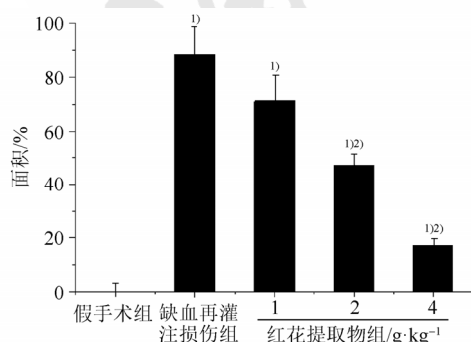


图 1 红花提取物对大鼠心肌梗死面积的影响( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=10$ )

与假手术组比较, <sup>1)</sup> $P<0.05$ ; 与缺血再灌注损伤组比较, <sup>2)</sup> $P<0.05$ 。

Fig. 1 Effects of safflower extract of area of myocardial infarction in rats( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=10$ )

Compared with sham group, <sup>1)</sup> $P<0.05$ ; compared with ischemia reperfusion injury group, <sup>2)</sup> $P<0.05$ 。

### 3.4 SE 对心脏病理结构的影响

与假手术组相比, IRI 组心肌纤维肿胀、坏死、

中心粒细胞浸润明显增加, 其损伤评分明显增加( $P<0.05$ )。与 IRI 组相比, SE 组心肌纤维肿胀、坏死、中心粒细胞浸润明显减少, 损伤评分明显减少( $P<0.05$ ), 尤其 SE  $4\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$  组与 IRI 组相比, 损伤评分存在显著性差异( $P<0.05$ )。结果见图 2~3。

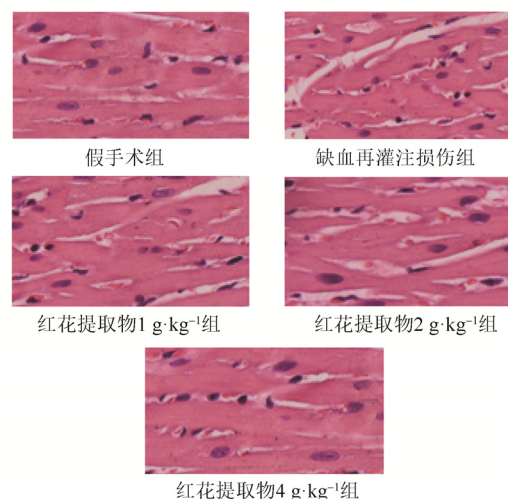


图 2 HE 染色检测心肌组织病变(1 100×)

Fig. 2 Pathological changes of liver tissues were observed by HE staining(1 100×)

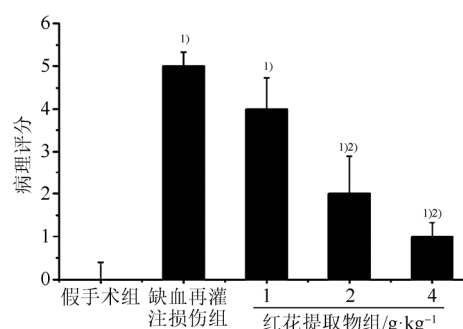


图 3 红花提取物对心脏病理结构的影响( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=10$ )

与假手术组比较, <sup>1)</sup> $P<0.05$ ; 与缺血再灌注损伤组比较, <sup>2)</sup> $P<0.05$ 。

Fig. 3 Effects of safflower extract of cardiac pathological structure in rats( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=10$ )

Compared with sham group, <sup>1)</sup> $P<0.05$ ; compared with ischemia reperfusion injury group, <sup>2)</sup> $P<0.05$ 。

### 3.5 SE 对 Akt、p-Akt、PI3K、m-TOR 蛋白表达水平的影响

与假手术组相比, IRI 组 p-Akt、PI3K、m-TOR 蛋白表达水平显著升高( $P<0.05$ ), 而 Akt 表达无显著性改变。与 IRI 组相比, SE 组 p-Akt、PI3K、m-TOR 蛋白表达水平进一步升高( $P<0.05$ ), 尤其 SE  $4\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$  组与 IRI 组相比, 蛋白水平存在显著性差异( $P<0.05$ )。结果见表 3。

**表 3** 红花提取物对大鼠 Akt、p-Akt、PI3K、m-TOR 蛋白表达水平的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

**Tab. 3** Effects of safflower extract for expression of Akt, p-Akt, PI3K and m-TOR in rats( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

| 组别                      | Akt/ $\beta$ -actin | p-Akt/ $\beta$ -actin           | PI3K/ $\beta$ -actin            | m-TOR/ $\beta$ -actin           |
|-------------------------|---------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 假手术组                    | 0.28 $\pm$ 0.12     | 0.21 $\pm$ 0.03                 | 0.32 $\pm$ 0.17                 | 0.24 $\pm$ 0.13                 |
| 缺血再灌注损伤组                | 0.33 $\pm$ 0.15     | 0.43 $\pm$ 0.12 <sup>1)</sup>   | 0.47 $\pm$ 0.03 <sup>1)</sup>   | 0.51 $\pm$ 0.12 <sup>1)</sup>   |
| 红花 1 g·kg <sup>-1</sup> | 0.37 $\pm$ 0.07     | 0.52 $\pm$ 0.06 <sup>1)</sup>   | 0.59 $\pm$ 0.15 <sup>1)</sup>   | 0.59 $\pm$ 0.04 <sup>1)</sup>   |
| 提取 2 g·kg <sup>-1</sup> | 0.32 $\pm$ 0.04     | 0.73 $\pm$ 0.17 <sup>1)2)</sup> | 0.78 $\pm$ 0.14 <sup>1)2)</sup> | 0.73 $\pm$ 0.09 <sup>1)2)</sup> |
| 物 4 g·kg <sup>-1</sup>  | 0.35 $\pm$ 0.09     | 1.04 $\pm$ 0.13 <sup>1)2)</sup> | 0.94 $\pm$ 0.09 <sup>1)2)</sup> | 0.92 $\pm$ 0.16 <sup>1)2)</sup> |

注:与假手术组比较, <sup>1)</sup> $P<0.05$ ;与缺血再灌注损伤组比较, <sup>2)</sup> $P<0.05$ 。  
Note: Compared with sham group, <sup>1)</sup> $P<0.05$ ; compared with ischemia reperfusion injury group, <sup>2)</sup> $P<0.05$ .

### 3.6 SE 对血清中 NF- $\kappa$ B、IL-6、TNF- $\alpha$ 表达水平的影响

与假手术组相比, IRI 组 NF- $\kappa$ B、IL-6、TNF- $\alpha$  表达水平显著升高( $P<0.05$ )。而 SE 组与 IRI 组相比较, NF- $\kappa$ B、IL-6、TNF- $\alpha$  表达水平显著下降( $P<0.05$ ), 尤其 SE 4 g·kg<sup>-1</sup> 组与 IRI 组相比, 表达水平存在显著性差异( $P<0.05$ )。结果见表 4。

**表 4** 红花提取物对大鼠 NF- $\kappa$ B、IL-6、TNF- $\alpha$  蛋白表达水平的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

**Tab. 4** Effects of safflower extract for expression of NF- $\kappa$ B, IL-6 and TNF- $\alpha$  in rats( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

| 组别                       | NF- $\kappa$ B                | IL-6                         | TNF- $\alpha$                 |
|--------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| 假手术组                     | 202 $\pm$ 8                   | 230 $\pm$ 10                 | 305 $\pm$ 12                  |
| 缺血再灌注损伤组                 | 1 100 $\pm$ 104 <sup>1)</sup> | 950 $\pm$ 87 <sup>1)</sup>   | 1 350 $\pm$ 170 <sup>1)</sup> |
| 红花提 1 g·kg <sup>-1</sup> | 800 $\pm$ 65 <sup>1)2)</sup>  | 640 $\pm$ 91 <sup>1)2)</sup> | 880 $\pm$ 154 <sup>1)2)</sup> |
| 取物 2 g·kg <sup>-1</sup>  | 630 $\pm$ 87 <sup>1)2)</sup>  | 470 $\pm$ 63 <sup>1)2)</sup> | 670 $\pm$ 69 <sup>1)2)</sup>  |
| 4 g·kg <sup>-1</sup>     | 270 $\pm$ 37 <sup>2)</sup>    | 240 $\pm$ 21 <sup>2)</sup>   | 370 $\pm$ 17 <sup>2)</sup>    |

注:与假手术组比较, <sup>1)</sup> $P<0.05$ ;与缺血再灌注损伤组比较, <sup>2)</sup> $P<0.05$ 。  
Note: Compared with sham group, <sup>1)</sup> $P<0.05$ ; compared with ischemia reperfusion injury group, <sup>2)</sup> $P<0.05$ .

## 4 讨论

心脏 IRI 发生的病因及机制是多因素多环节的, 极其复杂。其引起的心脏细胞死亡是心脏缺血再灌注患者预后不佳的重要原因<sup>[8-10]</sup>。研究表明无论是氧自由基的产生, 钙超载, 凋亡基因的激活, 炎症因子等均发挥着重要的作用, 贯穿整个心脏缺血再灌注的整个过程。更有研究表明, 炎症因子是造成心脏缺血再灌注的始动因素, 在心脏缺血再灌注数秒即开始发生, 呈级联反应, 在心脏 IRI 中起着关键性作用<sup>[11]</sup>。心脏缺血再灌注后触发的

炎症反应是典型的非感染性炎症反应, NF- $\kappa$ B、IL-6、TNF- $\alpha$  等炎症因子在缺血再灌注过程中发挥着重要的作用, NF- $\kappa$ B、IL-6 及 TNF- $\alpha$  水平高低提示着心肌炎症反应的严重程度, 与心脏再灌注损伤的严重程度呈正相关<sup>[12-13]</sup>。研究表明, 抑制 NF- $\kappa$ B、IL-6、TNF- $\alpha$  等炎症因子的活性, 可明显减轻 IRI<sup>[14]</sup>。

SE 含有红花黄色素、苷类、绿原酸、挥发性成分八十余种, 具有抗血小板凝集、抗血栓形成等多种药理作用<sup>[15-16]</sup>。本研究发现, 与假手术组相比, IRI 组 HR、LVDP、 $\pm dp/dt_{max}$ 、LVEDP 下降, CK-MB、LDH、p-Akt、PI3K、m-TOR、NF- $\kappa$ B、IL-6、TNF- $\alpha$  表达水平升高明显, 及心脏病理结构改变明显。这与既往研究报道相一致, 证实心脏 IRI 与氧化应激及炎症反应密切相关<sup>[17]</sup>。而 SE 组与 IRI 组相比, HR、LVDP、 $\pm dp/dt_{max}$ 、LVEDP 升高, CK-MB、LDH、NF- $\kappa$ B、IL-6、TNF- $\alpha$  表达水平明显降低, 可显著减少心脏病理结构改变。p-Akt、PI3K、m-TOR 表达水平明显增加, 提示 SE 可减少心脏病理形态改变, 进一步证实了 SE 对心脏 IRI 有保护作用, 也提示其保护心脏 IRI 与抑制氧化应激和减少炎症因子释放相关。

综上所述, SE 可通过抑制氧化应激和减少炎症因子释放, 减轻心脏 IRI, 其保护作用机制可能是通过激活 PI3K/m-TOR 信号通路, 但其具体作用机制尚不明确, 需进一步深入研究。

## REFERENCES

- [1] ZHANG D J, DU H, LIU M C, et al. Influence of oxytropis falcate bunge on NO and NOS of myocardial ischemia-reperfusion injury in rats [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2013, 30(10): 1054-1058.
- [2] GAO F, SUN G B, REN X Y, et al. Protective effect of salvianolic acid B on isolated heart ischemia/reperfusion injury in rats [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2012, 37(3): 358-361.
- [3] XIONG N, WEI S. Study on protection of Ginkgolide B against myocardial ischemia reperfusion injury and its mechanism [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2015, 32(3): 289-294.
- [4] JIN M, LI J R, WU W. Study on the antioxidative effect of Safflor Yellow [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2004, 29(5): 447-449.
- [5] GU C L, ZHOU J. Anti-inflammatory effect of Safflower Yellow on adjuvant arthritis rats [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2017, 34(4): 521-523.
- [6] YU L R, HE X Y, HUANG Y R. Simultaneous determination of paeoniflorin, salvianolic acid B and hydroxysafflor yellow A in Guanxinkang Granules by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2015, 32(5): 561-564.

- [7] MORRISON R R, TENG B, OLDENBURG P J, et al. Effects of targeted deletion of A1 adenosine receptors on postischemic cardiac function and expression of adenosine receptor subtypes [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, 291(4): H1875-H1882.
- [8] MA X J, WANG H M, ZHANG J L, et al. Changes of cardiac energy metabolism and structure during ischemia/ reperfusion injury of liver in rats [J]. *Chin J Pathophysiol(中国病理生理杂志)*, 2008, 24(7): 1297-1301.
- [9] 殷慧群, 许敏, 张定国, 等. 鸿宝心脑康胶囊对大鼠心肌缺血和再灌注损伤的保护作用[J]. *中华中西医杂志*, 2005, 20(6): 1135-1137.
- [10] 吴斌. 大黄素对缺血再灌注损伤猪心肌保护及炎症反应机制研究[D]. 湖北: 湖北中医药大学, 2009.
- [11] MOREIRA D M, DA SILVA R L, VIEIRA J L, et al. Role of vascular inflammation in coronary artery disease: potential of anti-inflammatory drugs in the prevention of atherothrombosis: Inflammation and anti-inflammatory drugs in coronary artery disease [J]. *Am J Cardiovasc Drugs*, 2014, 36(2): 147-158.
- [12] TIMMERS L, PASTERKAMP G, DE HOOG V C, et al. The innate immune response in reperfused myocardium [J]. *Cardiovasc Res*, 2012, 94(2): 276-283.
- [13] MARCHANT D J, BOYD J H, LIN D C, et al. Inflammation in myocardial diseases [J]. *Circ Res*, 2012, 110(1): 126-144.
- [14] 张宇琳, 高淑蓉. 熊果酸通过抑制 TLR-4/NF- $\kappa$ B 发挥对心脏缺血再灌注损伤保护作用的研究[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2015, 20(11): 1256-1260.
- [15] 李路江, 吴子芳, 吕文伟, 等. 红花提取物对犬急性心肌缺血的保护作用[J]. *中草药*, 2007, 38(9): 1381-1383.
- [16] CHEN X H, XU X, CHEN Y, et al. Fast measurement method based on near infrared spectroscopy in purifying process of *Carthamus tinctorius* extracts [J]. *China J Chin Mater Med(中国中药杂志)*, 2012, 37(20): 3062.
- [17] SHEN J L, ZHU K J, GU H J, et al. Changes of oxidative stress indicators at different time phases of myocardial ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *J Clin Exp Med(临床和实验医学杂志)*, 2013, 12(3): 177-178.

收稿日期: 2018-05-15

(本文责编: 沈倩)