

天麻素预处理减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤的可能机制

位 凯 王 飞 张 瑾 李 珍 沈 兵 王烈成 孔德虎 胡金兰

摘要 目的 探讨天麻素预处理减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤(MIRI)作用的可能机制。方法 健康SD大鼠60只,随机分为假手术组、MIRI组、天麻素低、中、高剂量组(0.1、0.2、0.4 g/kg),采用结扎大鼠左冠状动脉前降支30 min,再灌注120 min的方法制备MIRI模型,分别测定血清及心肌组织中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白介素-6(IL-6)的变化以及心肌组织中肌浆网 Ca^{2+} -ATP酶(SERCA)的变化。结果 0.2、0.4 g/kg天麻素预处理后,血清及心肌组织中TNF- α 和IL-6的含量均降低($P < 0.05$),心肌组织中SERCA的含量均升高($P < 0.01$)。结论 天麻素预处理减轻大鼠MIRI的机制可能与减少炎症因子TNF- α 和IL-6的释放以及增加SERCA含量有关。

关键词 天麻素;缺血再灌注损伤;肿瘤坏死因子;白介素-6;心肌肌浆网 Ca^{2+} -ATP酶

中图分类号 R 33-33; R 932

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)06-0756-04

心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia reperfusion injury, MIRI)其病理机制主要与氧自由基过多、钙超载、炎症反应、细胞凋亡等有关^[1]。天麻是一种具有多种功效的中药,天麻素(4-羟甲基苯甲醇- β -D-吡喃葡萄糖甙)是其活性最高的有效单体,具有改善神经系统血供、镇静、催眠和抗惊厥的作用^[2],还具有降低外周血管阻力和血压的作用^[3-4]。该课题组前期研究^[5]显示天麻素预处理能明显减轻大鼠MIRI,可能与减轻MIRI时的炎症细胞浸润有关,在炎症反应中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)和白介素-6(interleukin-6,

IL-6)起主要作用,因此该实验在原有实验的基础上,从炎症因子变化的角度进一步探讨天麻素预处理减轻大鼠MIRI作用的可能机制。前期研究^[5]还表明天麻素可能会抑制 Ca^{2+} 超载,这种作用是否与肌浆网 Ca^{2+} -ATP酶(sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase, SERCA)有关,也是本研究要解决的问题。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 60只健康成年SPF级SD大鼠(安徽省实验动物中心),雌雄不拘,体重(230 ± 10) g,随机分为假手术组、MIRI组、0.1、0.2和0.4 g/kg天麻素组。

1.2 主要试剂及仪器 天麻素(批号:2010081,纯度:99.2%,江苏宝泽堂医药科技有限公司);TNF- α 、IL-6、SERCA检测试剂盒(上海森雄科技实业有限公司);其他试剂均为分析纯;BL-420E生物信号采集分析系统、动物呼吸机(成都泰盟科技有限公司);SpectraMax190酶标仪(Molecular Devices公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 大鼠MIRI模型制备 于每日上午9:00对各组大鼠灌胃给药:假手术组与MIRI组均给予生理盐水灌胃,天麻素组分别给予0.1、0.2和0.4 g/kg的天麻素灌胃,连续7 d。于第7天灌胃后建立大鼠MIRI模型:用10%水合氯醛以3 ml/kg的剂量腹腔注射麻醉,做气管插管,连接呼吸机(呼吸频率60次/min,潮气量11 ml/次,呼-吸之比为1:2)。四肢皮下连接电极,标II导联接BL-420E生物信号采集分析系统连续记录心电图。在左侧第3~4肋间隙之间钝性分离肌肉,暴露心脏,在左心耳下缘处以冠状静脉主干为标志,用5-0号带针无创缝合线进针,向肺动脉圆锥方向出针,连同直径2 mm塑料管一起打活结结扎左冠状动脉前降支,缺血成功的

2014-01-05 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:30900420);安徽省杰出青年基金资助(编号:1108085J11);校级优秀青年教师后备人选基金资助(编号:2009A208)

作者单位:安徽医科大学基础医学院生理教研室,合肥 230032

作者简介:位 凯,女,硕士研究生;

胡金兰,女,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: hji-lan1872@163.com

chimeric antigen could react to HCMV positive serum through Western blot. **Conclusion** The recombinant fusion antigen expression plasmid is constructed to obtain target protein. Multi-epitope antigen is confirmed to be the specific antigen for HCHV and has immunity by Western blot.

Key words HCMV; fusion antigen; immune reactivity

标志为Ⅱ导联 R 波增宽,ST 段抬高,缺血 30 min 后,松开结扎线,再灌注 2 h,再灌注成功的标志为抬高的 ST 段下降, S 波幅值恢复 50% 以上。假手术组中只穿线,不结扎左冠状动脉前降支。

1.3.2 血清及心肌组织检测 各组于缺血再灌注 2 h 后分别从腹主动脉取血约 4 ml,以 3 500 r/min 离心 10 min,得到大鼠血清,分装, -20℃ 冰箱储存;并取各组结扎线下方左心室前壁心肌组织,切取一部分心肌组织于 -80℃ 冰箱储存,剩余部分置于 4% 福尔马林溶液中固定,将用于形态学实验。按试剂盒说明书检测血清及心肌组织中 TNF- α 、IL-6 和 SERCA 水平,用酶标仪测各组吸光度值。

1.3.3 心肌组织形态学检测 取左心室前壁心肌组织进行 HE 染色,光学显微镜下观察各组大鼠心肌组织形态学的变化。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 天麻素预处理对血清及心肌组织中 TNF- α 的影响 与假手术组相比,MIRI 组血清及心肌组织中 TNF- α 含量均明显增高,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),说明 MIRI 时 TNF- α 参与其中。与 MIRI 组相比,0.1 g/kg 天麻素组血清及心肌组织的 TNF- α 含量略减少,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),而 0.2、0.4 g/kg 天麻素组血清及心肌组织的 TNF- α 含量均减少,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),说明天麻素预处理可以减轻心肌缺血再灌注时 TNF- α 的释放;不同浓度天麻素组两两比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),表明其作用无剂量依赖性,见表 1。

表 1 各组大鼠血清及心肌组织中 TNF- α 含量比较 ($n = 12, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g/kg)	TNF- α (ng/L)	
		心肌组织	血清
假手术	-	135.98 \pm 22.50	129.73 \pm 24.23
MIRI	-	182.76 \pm 30.01 **	170.35 \pm 34.76 **
天麻素	0.1	165.34 \pm 10.74	159.736 \pm 16.04
	0.2	150.72 \pm 18.39 ##	140.77 \pm 24.16 ##
	0.4	148.19 \pm 11.48 ##	39.32 \pm 14.63 ##

与假手术组比较: ** $P < 0.01$; 与 MIRI 组比较: ## $P < 0.01$

2.2 天麻素预处理对血清及心肌组织中 IL-6 的影响 与假手术组相比较,MIRI 组血清及心肌组织中的 IL-6 含量均明显增高,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),说明 MIRI 时 IL-6 参与其中。与 MIRI 组相比,0.1 g/kg 天麻素组血清及心肌组织的 IL-6 含量

略减少,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),而 0.2、0.4 g/kg 天麻素组血清的 IL-6 含量减少,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),心肌组织中的 IL-6 含量亦减少,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),说明天麻素预处理可以减轻心肌缺血再灌注时 IL-6 的释放;不同浓度天麻素组两两比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),表明其作用无剂量依赖性,见表 2。

表 2 各组大鼠血清及心肌组织中 IL-6 含量比较 ($n = 12, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g/kg)	IL-6 (ng/L)	
		心肌组织	血清
假手术	-	162.00 \pm 37.70	149.49 \pm 39.90
MIRI	-	233.40 \pm 38.12 **	225.20 \pm 34.45 **
天麻素	0.1	205.66 \pm 28.62	211.50 \pm 35.18
	0.2	189.38 \pm 23.35 ##	184.04 \pm 45.28 #
	0.4	179.75 \pm 27.81 ##	173.46 \pm 26.27 #

与假手术组比较: ** $P < 0.01$; 与 MIRI 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

2.3 天麻素预处理对心肌组织中 SERCA 的影响

与假手术组相比较,MIRI 组心肌组织中的 SERCA 含量明显减少,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),说明 MIRI 时心肌组织中 SERCA 含量减少。与 MIRI 组相比,0.1 g/kg 天麻素组心肌组织中的 SERCA 含量略增高,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),而 0.2、0.4 g/kg 天麻素组心肌组织中的 SERCA 含量明显增高,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),说明天麻素预处理可以增加心肌缺血再灌注时 SERCA 的含量;不同浓度天麻素组两两比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),表明其作用无剂量依赖性,见表 3。

表 3 各组大鼠心肌组织中 SERCA 含量比较 ($n = 12, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g/kg)	SERCA (μ mol/ml)
假手术	-	0.67 \pm 0.16
MIRI	-	0.39 \pm 0.05 **
天麻素	0.1	0.47 \pm 0.05
	0.2	0.59 \pm 0.11 ##
	0.4	0.62 \pm 0.12 ##

与假手术组比较: ** $P < 0.01$; 与 MIRI 组比较: ## $P < 0.01$

2.4 天麻素预处理对心肌组织形态学的影响 各组心肌组织经 HE 染色后可见:假手术组心肌细胞排列整齐,胞膜完整,界限清晰,胞质、胞核着色均匀,见图 1A; MIRI 组心肌细胞排列不整齐,界限不清,有明显水肿,毛细血管扩张,可见红细胞、炎症细胞浸润,见图 1B,这从形态学上进一步证明模型制备成功;0.1 g/kg 天麻素组排列不整齐,界限不清,

水肿较明显,毛细血管扩张,可见红细胞、炎症细胞浸润,见图1C;而0.2、0.4 g/kg天麻素组心肌细胞排列较整齐,横纹较清晰,界限较清楚,无明显水肿,仅有少量红细胞、炎症细胞浸润,见图1D、E。从形态学上进一步证明天麻素预处理后可以减轻MIRI时的炎细胞浸润。

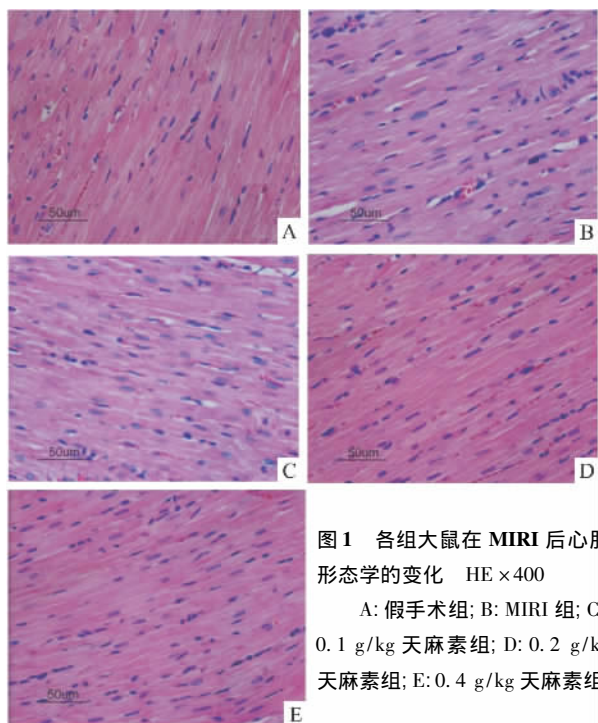


图1 各组大鼠在MIRI后心肌形态学的变化 HE ×400

A: 假手术组; B: MIRI组; C: 0.1 g/kg 天麻素组; D: 0.2 g/kg 天麻素组; E: 0.4 g/kg 天麻素组

3 讨论

MIRI是心肌在缺血的基础上恢复血流后,组织器官的损伤反而加重的现象,是一个复杂的病理生理过程,其中炎症反应贯穿于心肌细胞损伤的全过程^[6]。本课题组前期研究^[5]显示天麻素预处理后能减轻MIRI时心肌组织间隙炎症细胞的浸润,说明天麻素能抑制炎症细胞浸润,在炎症反应中TNF- α 和IL-6起到主要作用,那么天麻素是否通过影响TNF- α 和IL-6来实现抑制炎症细胞浸润?因此,本实验通过观察大鼠血清及心肌组织中炎症因子TNF- α 、IL-6的含量变化来进一步研究天麻素预处理对MIRI的作用。

TNF- α 是一种重要的细胞炎症因子,心肌是其作用的靶器官^[7],通过多种机制参与MIRI过程,不仅可以激活细胞因子级联反应,而且还可以促进氧自由基的产生、活化中性粒细胞、诱导心肌细胞凋亡,加重心肌损伤^[8]。IL-6被称为白介素家族的核心成员,具有广泛的生物学效应^[9],参与炎症反应的调节,可以诱导中性粒细胞内流入缺血的心肌组

织,刺激中性粒细胞、心肌细胞表面分别表达CD11b/CD18及细胞间黏附分子-1,介导与心肌细胞结合,损伤心肌^[10]。这两种细胞因子的水平与缺血再灌注后的损伤程度有密切关联。本研究显示MIRI组的血清及心肌组织中炎症因子TNF- α 和IL-6含量明显高于假手术组,这说明TNF- α 和IL-6均参与了缺血再灌注损伤时的炎症反应,而0.2、0.4 g/kg天麻素组与MIRI组相比,TNF- α 和IL-6含量显著降低,说明天麻素预处理能减轻缺血再灌注损伤时炎症因子TNF- α 和IL-6的释放。同时形态学表明,缺血再灌注时炎症细胞浸润明显,而0.2、0.4 g/kg天麻素预处理后炎症细胞浸润明显减轻,亦从形态学角度再次证明了上述观点。以上结果提示天麻素预处理后能通过减少缺血再灌注时炎症因子TNF- α 和IL-6的释放,从而抑制炎症因子引起的中性粒细胞迁移浸润,减轻炎症损伤的恶性循环,对心肌细胞起到保护作用。

Ca²⁺作为第二信使在心肌兴奋收缩耦联中起关键作用。肌浆网中的SERCA负责调控肌浆网对Ca²⁺的摄取,将心肌细胞胞浆中的Ca²⁺摄回肌浆网中。缺血再灌注后,由于细胞内环境的改变,导致细胞内酸中毒,从而抑制SERCA的活性,降低肌浆网摄钙的能力,久之细胞内就会发生钙超载,加重心肌损伤^[11]。本研究显示0.2、0.4 g/kg天麻素预处理后心肌组织中的SERCA含量增加,提示天麻素能够增加缺血再灌注损伤时心肌组织中的SERCA的含量,从而增加对肌浆网Ca²⁺的摄取,减轻细胞内钙超载,对心肌细胞起到一定的保护作用。因此天麻素抑制Ca²⁺超载可能与其增加SERCA含量有关。

综上所述,本实验进一步证明天麻素预处理能够减轻MIRI,其机制可能与减少炎症因子TNF- α 和IL-6的释放,增加SERCA的含量有关。

参考文献

- [1] 唐丽敏, 贺永贵, 张义东, 等. 心肌缺血/再灌注损伤发生机制及其保护研究进展[J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2013, 16(1): 159-63.
- [2] 孙中吉, 王 辉. 天麻素注射液的药理作用和临床应用[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(4): 1011-3.
- [3] 黄丽亚. 天麻素注射液上调抗氧化酶表达作用的实验研究[J]. 陕西中医药杂志, 2006, 27(2): 242-3.
- [4] 王正荣, 罗红淋, 肖 静, 等. 天麻素对动脉血管顺应性以及血流动力学的影响[J]. 生物医学工程杂志, 1994, 11(3): 197-201.

(下转第841页)

Biological features of the mouse HL-60 leukemia models constructed by different inoculation methods

Shan Wulin, Zhang Chengfang, Ma Xiaoling, et al

(Dept of Laboratory Medicine, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract HL-60 cells were conventionally inoculated into each cyclophosphamide pretreated SCID mouse *via* subcutaneous injections (A group), intraperitoneal injections (B group). Mice in C group were untreated and used as the control group. Then the biological characteristics of mouse HL-60 leukemia models inoculated differently were investigated. The results showed that both two inoculation methods were feasible for developing mouse leukemia models. Compared to A group, the duration of tumor formation was longer and the survival time of mice was shorter in B group. However, organs infiltration was more obvious in B group. There was statistically significant difference in the number of leukocytes among the peripheral blood between A and B groups from the forth week. Leukemic cells could also be found in peripheral blood in A and B groups, but the percent was low, not more than 3%.

Key words acute myeloid leukemia; SCID; model; subcutaneous; intraperitoneal

(上接第 758 页)

- [5] 王飞, 位凯, 沈兵, 等. 天麻素预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国药理学杂志, 2012, 47(23): 1905-10.
- [6] Yellon D M, Hausenloy D J. Myocardial reperfusion injury [J]. N Engl J Med, 2007, 357(11): 1121-35.
- [7] 张步升, 张郁林. 肿瘤坏死因子- α 在心肌缺血再灌注损伤中的作用[J]. 实用临床医药杂志, 2009, 13(4): 115-7.
- [8] 刘晟, 蔡晨, 唐益中, 等. 葛根素对烫伤大鼠心肌损伤的保护作用[J]. 安徽医科大学学报, 2005, 40(5): 426-8.
- [9] 唐婷婷. 实验性矽肺大鼠肺泡灌洗液中巨噬细胞和白介素 6 的变化及意义[J]. 安徽医药, 2012, 16(7): 894-6.
- [10] Gwechenberge M, Mendoxa L H, Youker K A, et al. Cardiac myocytes produce interleukin-6 in culture and in viable border zone of reperfused infarctions[J]. Circulation, 1999, 99(4): 546-51.
- [11] 蒋艳伟, 郑娜, 刘秀娟, 等. 大鼠心肌缺血后 SERCA 和 PLB 基因表达变化的观察[J]. 中国法医学杂志, 2008, 23(4): 231-4.

The possible mechanism of gatrodin precondition on attenuating reaction of myocardial ischemia reperfusion injury in rats

Wei Kai, Wang Fei, Zhang Jin, et al

(Dept of Physiology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To observe the possible mechanism of Gatrodin precondition on attenuating reaction of myocardial ischemia reperfusion injury (MIRI) in rats. **Methods** Sixty SD rats were randomized into five groups such as Sham group, MIRI group and Gatrodin low-dose (0.1 g/kg), middle-dose (0.2 g/kg) and high-dose (0.4 g/kg) groups. Then the rats mode of myocardial I/R injury were prepared by closing the left anterior descending coronary artery for 30 mins and then releasing it for 2 hrs under anesthesia. The changes of tumor necrosis factor α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) in blood serum and myocardial tissue were determined, and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATP (SERCA) was determined in myocardial tissue. **Results** Compared with MIRI group, the TNF- α and IL-6 of blood serum and myocardial tissue were lower ($P < 0.05$) and the concentration of SERCA of myocardial tissue was higher ($P < 0.01$) in Gatrodin group of middle and high concentrations. **Conclusion** Gatrodin preconditioning can attenuate myocardium ischemia reperfusion injury in rats which maybe related to its anti-inflammation function and its increase of SERCA.

Key words Gatrodin; ischemia and reperfusion injury; tumor necrosis factor; interleukin-6; sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATP