

飞龙掌血提取物对高脂血症心肌缺血小鼠氧化损伤的影响

刘 明^{1,2}, 邓 颖¹, 刘 杨¹, 陈 运¹

(1. 贵阳中医学院基础医学院, 贵阳 550025; 2. 国家苗药工程技术研究中心, 贵阳 550002)

【摘要】 目的 观察飞龙掌血提取物(*Toddalia asiatica* extract, TAE)对高脂血症心肌缺血小鼠氧化损伤的影响,初步探讨 TAE 对心血管保护作用的机制。**方法** 选用雄性 KM 小鼠,随机分成对照组、模型组、辛伐他汀组、TAE 高、低剂量组,除对照组外,其余各组均用牛奶代替水自由饮用,诱导高脂血症。同时灌胃给予相应的药物,每天一次,连续 28 d。于试验结束 72 h 前分 3 次皮下注射盐酸异丙肾上腺素(isoprenaline hydrochloride, Iso),造成心肌缺血模型。检测小鼠体重、心电图、心脏和肝脏指数、心肌含水量、血清总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)、低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPx)活性。**结果** TAE 可改善模型小鼠心肌缺血心电图变化,降低体重,抑制心脏、肝脏指数,降低心肌含水量;降低血清 TC、TG、LDL-C 含量,升高血清 HDL-C 含量;降低血清 MDA 含量,升高血清 SOD、GPx 活性。**结论** TAE 可能通过调节氧自由基代谢,改善氧化损伤,发挥其保护心血管的作用。

【关键词】 飞龙掌血;高脂血症;心肌缺血;氧化损伤

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 12-0051-05

doi: 10. 3969. j. issn. 1671 - 7856. 2017. 12. 009

Protective effects of *Toddalia asiatica* extract on oxidative damages in mice with myocardial ischemia and hyperlipidemia

LIU Ming^{1,2}, DENG Ying¹, LIU Yang¹, CHEN Yun¹

(1. Basic Medical School, Guiyang College of Chinese Medicine, Guiyang 550025, China;

2. National Engineering and Technological Research Center of Miao Medicine, Guiyang 550002)

【Abstract】 Objective To explore the effects of *Toddalia asiatica* extract(TAE)on oxidative damages in mice with myocardial ischemia and hyperlipidemia. **Methods** Fifty SPF male KM mice were randomly divided into 5 groups: control group, model group, simvastatin group (5 mg/kg), high-dose TAE group (400 mg/kg) and low-dose TAE group (100 mg/kg). Hyperlipidemia was induced by feeding milk for 4 weeks. At the same time, the corresponding drug was given by oral administration with 20 mL/kg for 28 d. At the end of four-week treatment, isoprenaline hydrochloride (Iso) was subcutaneously injected every 24 hours for three times. The body weight, electrocardiogram, heart and liver indexes, myocardial water content, and the serum levels of TC, TG, HDL, LDL, SOD, MDA and GPx were measured. **Results**

[基金项目] 贵州省科学技术基金(黔科合 J 字[2012]2087 号);贵阳中医学院博士基金(2011 年);贵州省科技计划项目(黔科合院士站[2014]4013 号)。

[作者简介] 刘明(1981-),男,博士,副教授,研究方向:中药、民族药防治心脑血管疾病药理研究。E-mail: 393617518@qq.com

TAE significantly improved the electrocardiogram changes induced by Iso and milk in the mice, weight lose, inhibited the heart and liver indexes, reduced the myocardial water content, decreased the levels of TC, TG, LDL and MDA, and increased the contents of HDL, SOD and GPx. **Conclusions** TAE may play an important role in cardiovascular protection by regulating oxygen free radical metabolism and improving oxidative damages.

[Key words] *Toddalia asiatica*; Hyperlipidemia; Myocardial ischemia; Oxidative damages

尽管医学领域取得了长足的发展,但心血管疾病仍然是世界范围内导致死亡的主要原因之一,每年大约有 1800 万人死于心血管疾病^[1]。动脉粥样硬化是心血管疾病的根本原因,脂质代谢异常是动脉粥样硬化最重要的危害因素^[2]。大量研究表明,脂质过氧化参与心血管疾病从发生到发展以及恶化的全过程,调控氧自由基代谢是心血管疾病治疗的一种可靠、有效的手段^[3,4]。

飞龙掌血为芸香科植物飞龙掌血 *Toddalia asiatica* Lam. 的根或根皮,为贵州苗族习用药材^[5]。药理研究表明其具有抗炎、镇痛、抗氧化、抗病毒、保护心肌等作用^[6,7]。因此,飞龙掌血显示潜在的对心血管疾病的治疗作用。本研究利用牛奶诱导高脂血症及异丙肾上腺素诱导心肌缺血小鼠模型,探讨飞龙掌血是否通过调节氧自由基代谢、降血脂等环节,实现对心血管系统的保护作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 KM 小鼠,雄性,体重 (20 ± 2) g, 50 只,购自中国人民解放军第三军医大学实验动物中心 [SCXK-(军)2014-0011]。动物饲养于贵州省实验动物工程技术中心 [SYXK(黔)2012-0001], 饲养环境:温度 (25 ± 2) °C 和湿度 (55 ± 2) %, 自由进食,每日光照/黑暗各 12 h。并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.2 实验药物和试剂

飞龙掌血提取物(TAE)是由飞龙掌血根皮提取获得(飞龙掌血根皮购自贵阳市药材市场,加 8 倍 70% 乙醇回流提取 2 次,滤液经水沉淀后,浓缩干燥,提取率为 10%),临床人日用生药量为 10~30 g,本研究依据预实验结果拟定人日用生药量为 12 g,折算为提取物为 1.2 g;辛伐他汀片(每片 10 mg),山东鲁抗医药集团赛特有限责任公司;盐酸异丙肾上腺素注射液(1 mg/mL),上海禾丰制药有限公司;TC、TG、LDL、HDL、SOD、MDA、GPx 试剂盒,南京建成生物工程研究所;山花纯牛奶(每袋 200

mL),贵阳三联乳业有限公司。

1.3 实验仪器

MS-200 生物信号记录仪,成都泰盟科技有限公司;TGL-12 GB-C 台式高速离心机,上海安亭科学仪器厂;FA3204 电子分析天平,上海良平仪器仪表有限公司;721 分光光度计,北京普析通用仪器有限公司;ZS-3 型酶标仪,北京新凤机电厂。

1.4 实验方法

1.4.1 分组、给药及高脂血症模型制备

将 50 只小鼠随机分成对照组(control)、模型组(model)、辛伐他汀组(SVTT, 5 mg/kg)、飞龙掌血提取物高、低剂量组(TAE, 400、100 mg/kg),每组 10 只,灌胃给予相应的药物,20 mL/kg,每天一次,连续 28 d,对照组和模型组灌胃等容积生理盐水。同时,参照文献方法^[8]制备高脂血症模型:除对照组外,其余各组小鼠每天以牛奶代替水饮用(在饮水瓶中加入足量牛奶,每天更换新鲜牛奶),各组均以基础饲料喂养,自由进食。

1.4.2 小鼠冠状动脉痉挛性心肌缺血的诱导

参照文献方法^[9]造模:于末次给药前 72 h,除空白对照组外,于灌胃给药 30 min 后,各组动物皮下注射 Iso 20 mg/kg,对照组给予等容量的生理盐水,连续 3 次,每间隔 24 h,诱发冠状动脉痉挛心肌缺血。

1.4.3 观察指标及检测

第 3 次皮下注射 Iso 前,小鼠用 20% 乌拉坦(7.5 mL/kg)腹腔注射麻醉,与 MS-200 生物信号记录仪相连,先描记一段注射 Iso 前的心电图,然后皮下注射 Iso,记录 30 min 的 II 导联心电图。主要观察阳性标准 T 波和 ST 段,参照文献标准^[10],具备以下条件之一者即可判断为心肌缺血阳性,①心电图 ST 段水平上抬或向下偏移 >0.1 mV;②T 波高耸超过同导联 R 波的 1/2 及以上者。每间隔 10 min 记录一次小鼠 II 导联心电图,共记录 30 min,分别测量 II 导联在各时刻 ST 段偏移的幅度,计算各组 II 导联注射 Iso 前与注射 Iso 后各时刻 ST 段偏移幅度的差值 Δ ST。

上述检测完成后,心脏取血,3500 r/min 离心

15 min,取上清液,按照试剂盒说明书操作,检测血清 TC、TG、LDL、HDL、SOD、MDA、GPx 含量。

取心脏、肝脏,用实际分度值为 0.1 mg 的电子分析天平精密称重,计算脏器指数。脏器指数 = 脏器重 ÷ 体重 × 100%。

将心脏置于烘箱中 80℃ 烘干,取出精密称重,计算心肌含水量。心肌含水量 = (心脏湿重 - 心脏干重) ÷ 心脏湿重 × 100%。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件对各组小鼠的实验数据进行统计分析,结果以平均数 ± 标准差表示 ($\bar{x} \pm s$)。多组均数比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 Bonferroni 法,不符合正态分布的选用非参数检验。 $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 体重、脏器指数及心肌含水量的变化

结果显示模型组小鼠体重明显增加,心脏和肝脏指数、心肌含水量显著升高;与模型组相比,TAE 高剂量组能显著降低小鼠心脏指数,TAE 高、低剂

量组均能明显降低小鼠体重、肝脏指数和心肌含水量($P < 0.01, P < 0.05$)。如表 1 所示。

2.2 心电图变化

模型组小鼠 S-T 段缺血改变明显,各时刻 ST 段偏移幅度的差值显著增加;与模型组相比,TAE 高、低剂量组均能明显改善小鼠心肌缺血变化,各时刻 ST 段偏移幅度的差值显著下降 ($P < 0.01, P < 0.05$)。如表 2、图 1 所示。

2.3 血清血脂水平的变化

模型组小鼠血清 TC、TG、LDL 含量显著升高,血清 HDL 含量明显降低;与模型组相比,TAE 高剂量组能显著降低小鼠血清 LDL 含量,TAE 高、低剂量组均能显著降低血清 TC、TG 含量并升高血清 HDL 含量($P < 0.01, P < 0.05$)。如表 3 所示。

2.4 血清 SOD、MDA、GPx 水平的变化

模型组小鼠血清 SOD、GPx 含量明显降低,MDA 含量显著升高;与模型组相比,TAE 高、低剂量组均能显著降低血清 MDA 含量,升高 SOD、GPx 含量($P < 0.01, P < 0.05$)。如图 2 所示。

表 1 对模型小鼠体重和脏器指数的影响($\bar{x} \pm s$)
Tab.1 Effects of TAE on the body weight, heart and liver indexes of the model mice

组别 Groups	剂量/mg/kg Doses	体重/g Weight	心脏指数/% Heart index	肝脏指数/% Liver index	心肌含水量/% Water content
对照组 Control group	—	37.9 ± 0.9 **	0.40 ± 0.02 **	4.19 ± 0.62 *	70.59 ± 2.99 **
模型组 Model group	—	41.1 ± 0.7	0.43 ± 0.02	4.74 ± 0.38	75.91 ± 2.59
辛伐他汀组 SVTT group	5	37.2 ± 1.1 **	0.41 ± 0.03 *	4.31 ± 0.43 *	72.46 ± 3.92 *
飞龙掌血组	400	38.6 ± 1.1 **	0.41 ± 0.03 *	4.20 ± 0.48 **	70.76 ± 3.99 **
TAE group	100	39.4 ± 0.9 **	0.42 ± 0.04	4.37 ± 0.37 *	71.95 ± 4.53 *

注:与模型组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。表 2、3、4 同。
Note. Compared with the model group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$. The same as in Tab. 2, 3, 4.

表 2 对模型小鼠心电图的影响($\bar{x} \pm s, mV$)
Tab.2 Effects of TAE on electrocardiogram of the model mice

组别 Groups	剂量/mg/kg Doses	10 min ΔST	20 min ΔST	30 min ΔST
对照组 Control group	—	0.039 ± 0.015 **	0.051 ± 0.016 **	0.043 ± 0.017 **
模型组 Model group	—	0.247 ± 0.071	0.194 ± 0.048	0.138 ± 0.033
辛伐他汀组 SVTT group	5	0.181 ± 0.030 **	0.121 ± 0.058 **	0.095 ± 0.030 **
飞龙掌血组	400	0.163 ± 0.021 **	0.160 ± 0.029 *	0.098 ± 0.031 **
TAE group	100	0.183 ± 0.032 **	0.151 ± 0.029 *	0.111 ± 0.022 **

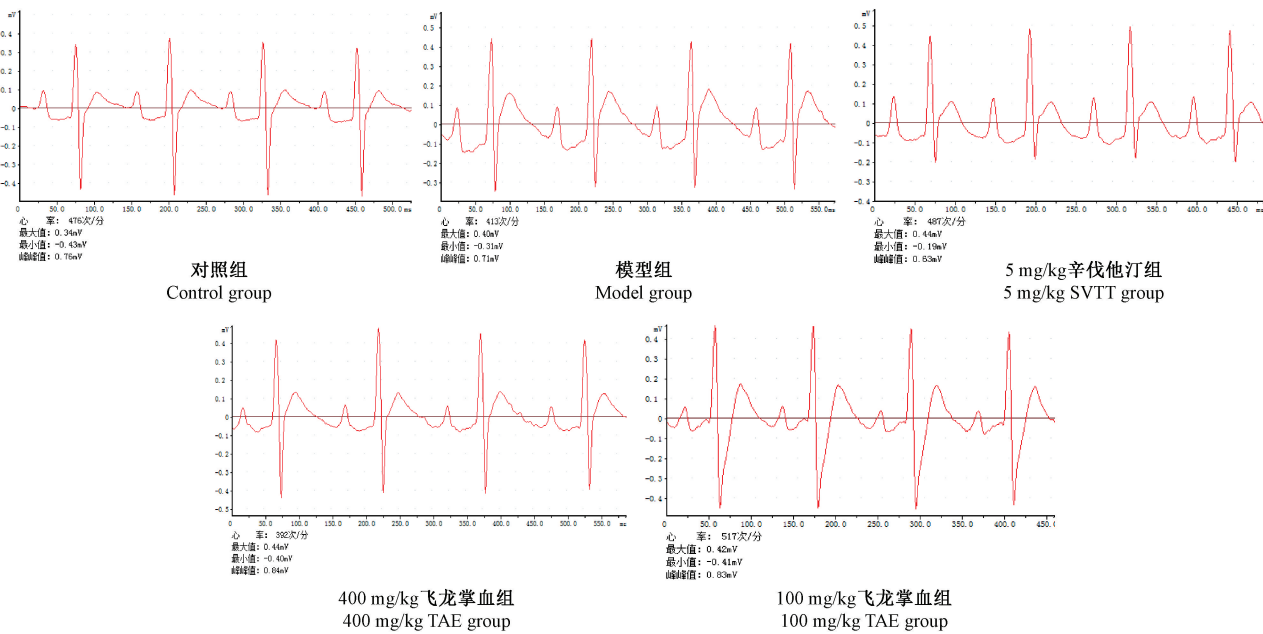


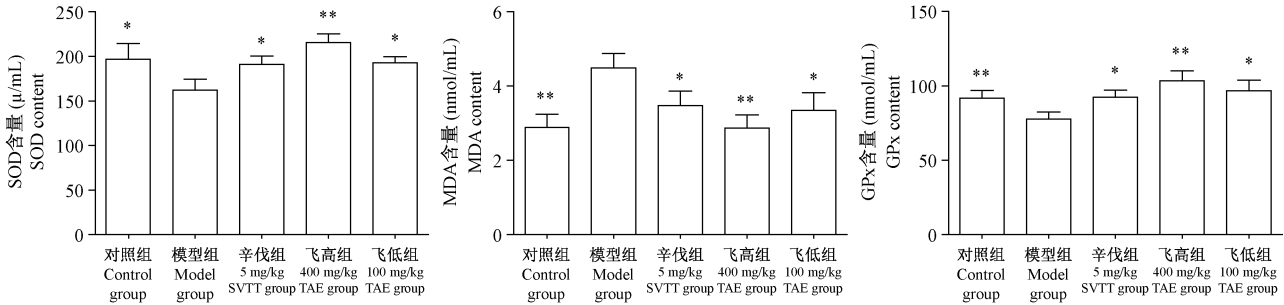
图 1 对模型小鼠心电图的影响

Fig. 1 Effects of TAE on electrocardiogram of the model mice

表 3 对模型小鼠血清 TC,TG,LDL,HDL 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

Tab.3 Effects of TAE on the serum contents of TC,TG,LDL and HDL of the model mice

组别 Groups	剂量/mg/kg Doses	TC	TG	LDL	HDL
对照组 Control group	—	0. 87 ± 0. 16 *	0. 58 ± 0. 18 **	0. 56 ± 0. 16 **	0. 46 ± 0. 17 *
模型组 Model group	—	1. 04 ± 0. 16	0. 88 ± 0. 19	0. 80 ± 0. 14	0. 30 ± 0. 11
辛伐他汀组 SVTT group	5	0. 89 ± 0. 15 *	0. 70 ± 0. 18 *	0. 62 ± 0. 15 *	0. 41 ± 0. 14 *
飞龙掌血组 TAE group	400	0. 86 ± 0. 23 *	0. 71 ± 0. 21 *	0. 67 ± 0. 15 *	0. 43 ± 0. 18 *
	100	0. 83 ± 0. 17 *	0. 66 ± 0. 17 *	0. 70 ± 0. 21	0. 44 ± 0. 16 *



注:与模型组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 2 对模型小鼠血清 SOD、MDA、GPx 水平的影响

Note. Compared with the model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Fig. 2 Effects of TAE on the levels of serum SOD, MDA and GPx of the model mice.

3 讨论

引起高脂血症的原因很多,其中最常用的是给动物喂饲高脂饲料或高脂乳剂,但因饲料过于油

腻、胆盐具有苦味等而影响动物的进食,动物的体重并无明显增长,不能形成肥胖症;且在不同时间点内动物血脂检测 TC、TG、HDL、LDL 的差异较大^[11];且油脂对整个实验环境也造成一定的污染。

吴争荣等^[8]用牛奶喂养小鼠,成功建立了高脂血症动物模型。该方法与常用的高脂血症造模方法相比,投入成本相对较少,又避免了室内由于高脂饲料导致气味难闻等缺点,造模比较简单、经济、有效,且小鼠在比较自然的条件下造模,所以更加符合人类高脂血症的形成特点。本研究结果表明,给小鼠饮用牛奶,可使小鼠的进食量明显增加,牛奶和饮食量过多,导致体内脂肪蛋白过剩,进而引起体内脂肪累积,引起高脂血症,造成模型组小鼠的体重明显增加,肝脏指数显著升高,血清 TC、TG、LDL 含量显著升高,血清 HDL 水平明显下降。经飞龙掌血治疗后,小鼠的体重明显降低,肝脏指数显著下降,血清 TC、TG、LDL 含量显著降低,血清 HDL 水平明显上升,表明飞龙掌血对牛奶引发的高脂血症具有显著的抑制作用。

近年研究发现,90% 以上的缺血性心脏病是由于冠状动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)引起的高脂血症是 AS 的重要促进因素^[12]。高脂血症本身引起的死亡并不多见,但高脂血症由于脂质代谢紊乱、脂质过氧化、血液流变学异常等^[13],易引起 AS、冠心病、高血压、糖尿病等多种疾病,严重危害人类健康,因此高脂血症及其引发的疾病的预防和治疗已经成为目前的研究热点。大量研究表明,高脂血症造成机体脂质代谢紊乱的同时及心肌缺血时均会引起机体氧化与抗氧化平衡失调,即机体氧自由基产生增加而自由基相关清除酶活力下降^[14,15]。SOD 是体内清除氧自由基的关键酶,反映机体清除氧自由基的能力。MDA 是过氧化脂质氧化分解的产物,对细胞膜及细胞功能具有一定的损伤作用,同时干扰脂肪酸的氧化降解。GPx 是一种重要的过氧化物分解酶,抑制脂质过氧化反应对细胞的损伤。本研究结果显示,飞龙掌血对高脂血症心肌缺血小鼠心肌具有保护作用,表现为小鼠心脏指数显著降低、心肌含水量下降,明显改善心电图 S-T 段,降低血清 MDA 含量,升高血清 SOD、GPx 水平,说明飞龙掌血通过增加高脂血症心肌缺血小鼠的心肌抗氧化能力和减少氧自由基的产生,以减少细胞损伤,保护心肌细胞。

本研究对飞龙掌血提取物降血脂、抗心肌缺血和抗氧化的作用机制做了初步的探讨,发现飞龙掌血提取物可有效降低高血脂和改善心肌缺血损伤,改善脂质代谢紊乱和脂质过氧化,为进一步开发利

用飞龙掌血植物资源和研制新药提供了实验依据和理论基础。

参考文献:

- [1] 马依彤,谢翔. 心血管疾病的预防研究进展[J]. 中华医药信息导报, 2017, 32(6): 20.
- [2] 刘静,赵冬. 心脏研究的过去、现在和将来[J]. 中华心血管病杂志, 2009, 37(5): 470-472.
- [3] Fox KM, Wang L, Gandra SR, et al. Clinical and economic burden associated with cardiovascular events among patients with hyperlipidemia: a retrospective cohort study [J]. BMC Cardiovasc Disord, 2016, 16: 13.
- [4] Han D, Wei J, Zhang R, et al. Hydroxysafflor yellow A alleviates myocardial ischemia/reperfusion in hyperlipidemic animals through the suppression of TLR4 signaling [J]. Sci Rep, 2016, 6: 35319.
- [5] 邱德文,杜江. 贵州十大苗药研究 [M]. 北京: 中医古籍出版社, 2008: 465-467.
- [6] 任先达,何小萍. 飞龙掌血水提取物对异丙肾上腺素致大鼠心肌缺血的保护作用 [J]. 暨南大学学报(医学版), 1998, 19(2): 22-25.
- [7] 云雪林. 苗药飞龙掌血的药理作用和临床应用研究进展 [J]. 中国民族医药杂志, 2012, 18(7): 58-60.
- [8] 吴争荣,马志刚,董永喜,等. 一种小鼠高脂血症新模型的建立 [J]. 中国药理学通报, 2010, 26(3): 405-407.
- [9] 吕建英. 曲马多对异丙肾上腺素所致小鼠心肌缺血损伤的抑制作用 [J]. 华北煤炭医学院学报, 2010, 12(5): 609-610.
- [10] 焦宏,陈彦静,鞠大宏,等. 桂枝汤对高脂血症心肌缺血大鼠心肌缺血损伤的保护作用 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2011, 17(3): 279-282.
- [11] 王燕萍,彭丹虹,刘晓琪,等. 高脂饮食喂养建立高脂血症模型的验证及规律探讨 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(1): 5-10.
- [12] Selwyn AP. Antiatherosclerotic effects of statins: LDL versus non-LDL effects [J]. Curr Atheroscler Rep, 2007, 9(4): 281-285.
- [13] 苏曼曼,于晓风,曲绍春,等. 分蘖葱头总黄酮对实验性高脂血症大鼠血脂代谢的影响 [J]. 中国药理学通报, 2007, 23(12): 1593-1597.
- [14] Rodriguez-Portel M, Lerman A, Best PJ, et al. Hypercholesterolemia impairs myocardial perfusion and permeability: role of oxidative stress and endogenous scavenging activity [J]. J Am Coll Cardiol, 2001, 37(2): 608-615.
- [15] 杨超燕,吉国辉,何伟,等. 参芎滴丸对心肌缺血大鼠抗脂质过氧化损伤的保护作用 [J]. 井冈山大学学报(自然科学版), 2015, 36(4): 84-89.