

飞龙掌血提取物对高脂血症心肌缺血大鼠炎症因子的影响

刘明^{1,2}, 刘杨¹, 邓颖¹, 胡祖林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大鼠炎症因子的影响,初步探讨TAE对心血管保护作用的机制。**方法** 取SD雄性大鼠,高脂饲料喂养4周,诱导高脂血症,随机分为对照组、模型组、辛伐他汀组、TAE高、低剂量组,继续喂养4周,于试验结束72 h前分3次皮下注射异丙肾上腺素(isoprenaline hydrochloride, Iso),造成高脂血症心肌缺血模型。8周末检测大鼠心电图,心脏、肝脏、脂肪指数,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)及炎症因子肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、干扰素- γ (interferon- γ , INF- γ)、白介素-6(interleukin-6, IL-6)、白介素-10(interleukin-10, IL-10)含量,心肌组织病理观察。**结果** TAE可改善Iso引起的大鼠心肌缺血心电图变化,抑制心脏、肝脏、脂肪指数,降低血清TC、TG、LDL含量,升高血清HDL含量;降低血清TNF- α 、INF- γ 、IL-6水平,升高血清IL-10含量($P < 0.05$),改善心肌组织病理损伤。**结论** 飞龙掌血提取物可能通过调节抗炎与促炎因子的平衡,降低血脂水平,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;炎症因子

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 02-0064-05

doi: 10. 3969. j. issn. 1671 - 7856. 2018. 02. 011

Effects of *Toddalia asiatica* extract on inflammatory cytokines in rats with myocardial ischemia and hyperlipidemia

LIU Ming^{1,2}, LIU Yang¹, DENG Ying¹, HU Zulin¹

(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 inflammatory cytokines in rats with myocardial ischemia and hyperlipidemia. **Methods** The early changes of hyperlipidemia were caused by feeding high fat diet for 4 weeks. Fifty male SD rats were randomly divided into 5 groups: the control group, model group, simvastatin group (3.5 mg/kg), high-dose TAE group (280 mg/kg) and low-dose TAE group (70 mg/kg). At the end of the 4-weeks treatment, isoprenaline hydrochloride (Iso) was subcutaneous injected once a day for consecutive three days. The electrocardiogram (EKG), the heart, liver and fat indexes, the serum levels of TC, TG, HDL, LDL, TNF- α , INF- γ , IL-6 and IL-10, and the pathological changes of myocardium were examined. **Results** TAE significantly improved the Iso-induced EKG changes in rats, reduced the heart, liver and fat indexes, and decreased the levels of TC, TG, LDL, TNF- α ,

【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

INF- γ and IL-6 and increased the contents of HDL and IL-10 ($P < 0.05$ for all), and improved the pathological damages of myocardium. **Conclusions** The Miao nationality medicine *Toddalia asiatica* extract may play an important protective role in cardiovascular diseases by regulating the balance of anti-inflammatory and proinflammatory cytokines.

【Key words】 *Toddalia asiatica*; hyperlipidemia; myocardial ischemia; inflammatory cytokines; rats

据统计,心血管疾病已经成为一个世界性的影响社会各经济群体的健康问题,2015 年全球约有 1792 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险因素^[2]。大量研究表明,炎症因子(TNF- α 、IL-6 等)在高脂血症和心血管疾病的发展中起到重要的诱导作用,调控炎症反应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。本研究利用高脂血症复合心肌缺血大鼠模型,观察飞龙掌血对高脂血症心肌缺血大鼠血脂和炎症因子的影响,并分析可能的机制,为进一步应用飞龙掌血治疗心血管疾病提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠,体重(200 ± 20)g,8 周龄,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(23 ± 1)℃和湿度(55 ± 2)%,自由进食,每日光照/黑暗各 12 h,经贵州医科大学实验动物伦理委员会批准(编号 1509005)。

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 试剂盒,均购于南京建成生物工程研究所;TNF- α 、INF- γ 、IL-6、IL-10 试剂盒,均购于武汉博士德生物工程有限公司。

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;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;RM2015 石蜡切片机,德国莱卡;BX51T-PHD-J11 显微镜,日本奥林巴斯。

1.4 实验方法

1.4.1 高脂血症大鼠模型建立及分组、给药

参照文献方法^[8-9]造模:高脂血症组大鼠每天以高脂饲料(组成:3.5%胆固醇、10%猪油、0.2%丙硫氧嘧啶、0.5%胆酸钠、5%白糖、80.8%基础饲料)喂养,空白组以基础饲料喂养,4 周后对照组与高脂血症组随机取 3 只大鼠检测血脂 4 项,高脂血症组血脂指标与空白组相比较具有明显区别,则说明模型制备成功。

选取体重相近的造模动物继续喂饲高脂饲料,并随机分成模型组(model)、辛伐他汀组(SVTT,3.5 mg/kg),飞龙掌血提取物高、低剂量组(TAE,280、70 mg/kg)及对照组(control),每组 10 只。灌胃给予相应的药物,10 mL/kg,每天一次,连续 4 周,对照组与模型组灌胃等容积蒸馏水。

1.4.2 心肌缺血模型建立

参照文献方法^[6,10-11]造模:于末次给药前 72 h,除对照组外,于灌胃给药 30 min 后,各组动物皮下注射 Iso 4 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,大鼠用 1%戊巴比妥钠 3 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^[11],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 记录一次大鼠 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(mV)。

上述检测完成后,腹主动脉取血,3500 r/min 离心 15 min,取上清液,每组随机选取 8 个样本按照试剂盒说明书操作,检测血清 TC、TG、LDL、HDL、TNF- α 、INF- γ 、IL-6、IL-10 含量。

取心脏、肝脏,生理盐水清洗,滤纸吸干水,称重;剥离生殖器等肾周围的脂肪,称取脂肪的重量,计算脏器指数。脏器指数(g/100 g) = 脏器重 $\div$ 体重 $\times$ 100。

每组随机取 6 只动物心脏,4% 多聚甲醛固定,进行切片制作,HE 染色,显微镜下观察心肌组织病理变化。

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 $\pm$ 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。以 $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 心电图变化

模型组大鼠 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大鼠心肌缺血变化,各时刻 ST 段偏移幅度的差值显著下降($P < 0.05$)。如表 1、图 1 所示。

2.2 脏器指数的变化

结果显示模型组大鼠的脏器指数显著升高;与模型组相比,TAE 高、低剂量组能显著降低心脏指数、脂肪指数,TAE 高剂量组能明显降低肝脏指数($P < 0.05$)。如表 2 所示。

2.3 血脂水平的变化

模型组大鼠血清 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、低剂量组能显著降低血清 TC、TG、LDL 含量,TAE 高剂量组能升高血清 HDL 含量($P < 0.05$)。如表 3 所示。

2.4 炎症因子的变化

模型组大鼠血清 TNF- α 、INF- γ 、IL-6 含量显著升高,血清 IL-10 含量明显降低;与模型组相比,TAE 高、低剂量组能显著降低血清 TNF- α 、INF- γ 、IL-6 含量,TAE 高、低剂量组能升高血清 IL-10 含量($P < 0.05$)。如表 4 所示。

表 1 对模型大鼠心电图的影响($\bar{x} \pm s$,mV)
Tab.1 Effects of TAE on electrocardiogram of the model rats

组别 Groups	剂量(mg/kg) Doses	10 min Δ ST	20 min Δ ST	30 min Δ ST
对照组 Control group	—	0.041 $\pm$ 0.012 **	0.053 $\pm$ 0.021 **	0.045 $\pm$ 0.020 **
模型组 Model group	—	0.256 $\pm$ 0.070	0.203 $\pm$ 0.049	0.147 $\pm$ 0.034
辛伐他汀组 SVTT	3.5	0.157 $\pm$ 0.046 **	0.125 $\pm$ 0.056 **	0.100 $\pm$ 0.031 **
飞龙掌血组 TAE	280	0.178 $\pm$ 0.034 **	0.128 $\pm$ 0.044 **	0.105 $\pm$ 0.024 **
	70	0.207 $\pm$ 0.037 *	0.165 $\pm$ 0.032 *	0.104 $\pm$ 0.033 **

注:与模型组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。
Note. Compared with the model group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$.

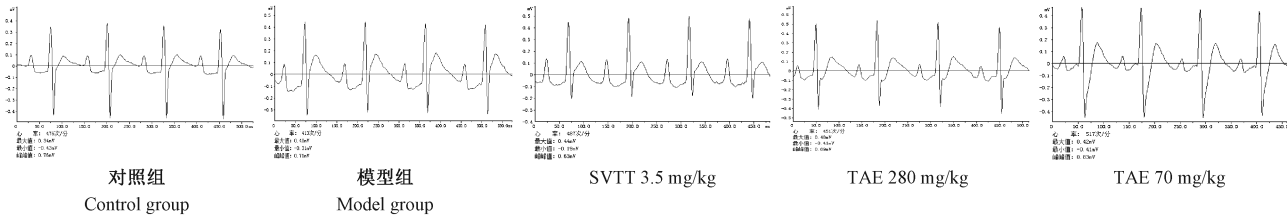


图 1 对模型大鼠心电图的影响
Fig.1 Effects of TAE on electrocardiogram of the model rats

表 2 对模型大鼠脏器指数的影响($\bar{x} \pm s, \text{g}/100 \text{ g}$)
Tab.2 Effects of TAE on the heart, liver and fat indexes of the model rats

组别 Groups	剂量(mg/kg) Doses	心脏指数 Heart index	肝脏指数 Liver index	脂肪指数 Fat index
对照组 Control group	—	0.371 ± 0.069 **	3.032 ± 0.391 **	1.742 ± 0.171 **
模型组 Model group	—	0.499 ± 0.076	4.169 ± 0.428	2.640 ± 0.141
辛伐他汀组 SVTT	3.5	0.423 ± 0.059 *	3.817 ± 0.373 *	1.909 ± 0.176 **
飞龙掌血组 TAE	280	0.418 ± 0.075 *	3.784 ± 0.445 *	1.999 ± 0.192 **
	70	0.426 ± 0.069 *	3.921 ± 0.446	2.246 ± 0.178 **

注:与模型组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。
Note. Compared with the model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

表 3 对模型大鼠血清 TC, TG, LDL, HDL 含量的影响($\bar{x} \pm s, \text{nmol/L}$)
Tab.3 Effects of TAE on the serum contents of TC, TG, LDL and HDL of the model rats

组别 Groups	剂量(mg/kg) Doses	TC	TG	LDL	HDL
对照组 Control group	—	1.15 ± 0.28 **	0.37 ± 0.17 *	0.56 ± 0.16 **	1.04 ± 0.20 **
模型组 Model group	—	2.13 ± 0.59	0.53 ± 0.12	1.32 ± 0.11 ^a	0.69 ± 0.28 ^a
辛伐他汀组 SVTT	3.5	1.50 ± 0.21 **	0.35 ± 0.11 **	1.02 ± 0.22 **	1.04 ± 0.32 *
飞龙掌血组 TAE	280	1.46 ± 0.37 **	0.37 ± 0.12 *	1.11 ± 0.23 *	0.98 ± 0.26 *
	70	1.71 ± 0.32 *	0.41 ± 0.10 *	1.07 ± 0.34 *	0.90 ± 0.23

注:与模型组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。
Note. Compared with the model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

表 4 对模型大鼠血清 TNF- α , INF- γ , IL-6, IL-10 含量的影响($\bar{x} \pm s, \text{pg/mL}$)
Tab.4 Effects of TAE on the serum contents of TNF- α , INF- γ , IL-6 and TL-10 of the model rats

组别 Groups	剂量(mg/kg) Doses	TNF- α	INF- γ	IL-6	IL-10
对照组 Control group	—	17.96 ± 5.06 **	60.97 ± 12.06 **	28.35 ± 3.49 **	69.23 ± 9.04 **
模型组 Model group	—	94.21 ± 15.54	99.65 ± 13.17	42.91 ± 10.68	38.22 ± 20.96
辛伐他汀组 SVTT	3.5	75.13 ± 22.66 *	79.79 ± 13.34 **	33.74 ± 9.40 *	45.94 ± 18.96
飞龙掌血组 TAE	280	71.69 ± 21.89 *	77.53 ± 11.89 **	27.85 ± 7.47 **	68.72 ± 13.27 **
	70	75.02 ± 19.61 *	83.88 ± 16.84 *	32.14 ± 7.09 *	58.29 ± 15.59 *

注:与模型组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。
Note. Compared with the model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

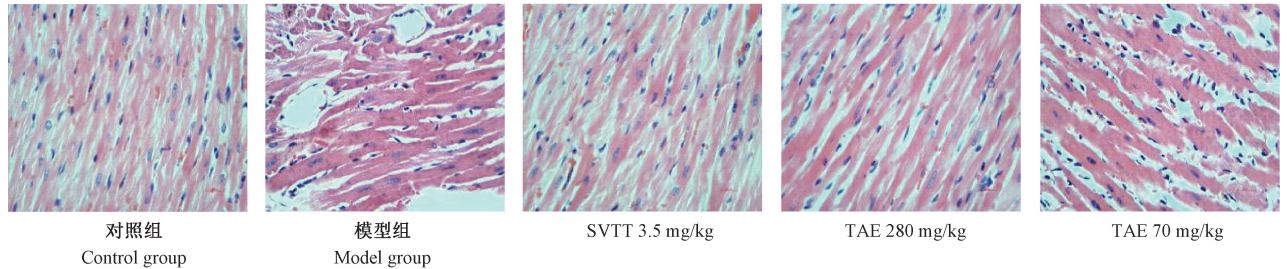


图 2 对模型大鼠心肌组织病理形态的影响(HE × 100)

Fig.2 Effects of TAE on the pathological changes of myocardial tissue in the model rats. HE staining.

2.5 心肌组织病理变化

对照组大鼠的心肌组织结构正常,心肌纤维排列整齐,没有变性、坏死、肥大、萎缩的病变。模型组大鼠注射 Iso 后,引起了心肌损伤,有大片坏死

灶,肌纤维排列紊乱、坏死细胞质溶解以及水肿。与模型组相比,TAE 高、低剂量组大鼠心肌组织病变的程度明显减轻。如图 2 所示。

3 讨论

在制备高脂血症动物模型中,给动物喂饲高脂饲料是最为常用的方法。尽管高脂饲料造模存在诸如饲料过于油腻而影响动物的进食,饲料损耗大,成本较高,且油脂对整个实验环境也造成一定的污染等缺点,但长期高脂饮食制备高脂血症是最符合人类高脂血症形成特点,因此,高脂饲料制备高脂血症动物模型依然是目前实验研究中最常用的造模方法。本研究结果表明,给大鼠进行高脂饲料喂饲 4 周,即可形成高脂血症,继续喂饲高脂饲料致 8 周时,大鼠血清 TC、TG、LDL 含量显著升高,血清 HDL 水平明显下降,肝脏、脂肪指数显著升高,经飞龙掌血治疗后,血清 TC、TG、LDL 含量明显降低,血清 HDL 水平显著升高,肝脏、脂肪指数明显下降,表明飞龙掌血对高脂饲料引发的大鼠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]。随着 AS 炎症学说的提出,人们逐渐认识到冠心病心肌缺血是一个炎症性疾病过程,炎症被认为是 AS 的核心发病机制,参与了 AS 从发生到发展以及恶化的所有病理过程^[13]。大量临床观察也都证明炎症因子水平与高脂血症有着密切的联系^[14]。因此,通过降血脂及抗炎性损伤预防和治疗心血管疾病已经成为目前的研究热点。大量研究表明,高脂血症产生的大量脂肪细胞可以诱导巨噬细胞的活化,进而分泌炎症因子如 IL-6,引起高 TG 血症,造成潜在的心血管疾病风险;脂肪细胞也可以诱导 T 淋巴细胞的活化,进而分泌炎症因子如 INF- γ ,分泌的 INF- γ 可进一步促进巨噬细胞的活化,分泌 IL-1 β ,并联合 IL-1 β 共同刺激巨噬细胞分泌 IL-6,加重炎症反应和高脂血症心肌损伤,形成恶性循环^[15]。另一方面,活化的 T 淋巴细胞会调节 IL-10 等的分泌,抑制 IL-6 的生理活性,减轻炎症反应,达到动态平衡^[16]。本研究结果显示,飞龙掌血对高脂血症心肌缺血大鼠具有保护作用,表现为大鼠心脏指数显著降低,明显改善心电图 S-T 段,降低血清 TNF- α 、INF- γ 、IL-6 水平,升高血清 IL-10 水平,改善心肌组织病理损伤,说明飞龙掌血通过调节抗炎与促炎因子的平衡,减轻心肌缺血损伤,保护心肌细胞。

本研究对飞龙掌血提取物降血脂、抗心肌缺血和抗炎性损伤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,调节抗炎与促炎因子平衡,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] Roth GA, Johnson C, Abajobir A, et al. Global, regional, and national burden of cardiovascular diseases for 10 causes, 1990 to 2015 [J]. J Am Coll Cardiol, 2017, 70(1): 1-25
- [2] 刘静,赵冬. Framingham 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] 李大伟,张玲,夏作理. 建立高脂血症模型的动物选择与常造模方法分析及改进 [J]. 中国临床康复, 2006, 48(10): 145-147.
- [9] 石鹤坤,张宏,杜清,等. 三种高脂乳剂诱导实验性大鼠高脂血症模型的比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2012, 22(9): 55-57
- [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] 贾广乐,董培智. 对肾上腺素心肌缺血模型大鼠相关指标的探讨 [J]. 中国实验动物学报, 2005, 13(2): 106-109.
- [12] Selwyn AP. Antiatherosclerotic effects of statins: LDL versus non-LDL effects [J]. Curr Atheroscler Rep, 2007, 9(4): 281-285.
- [13] Libby P. Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease [J]. Nutr Rev, 2007, 65(12 Pt 2): S140-S146.
- [14] Laskin DL, Laskin JD. Macrophages, inflammatory mediators, and Lung injury [J]. Methods, 1996, 10(1): 61-70.
- [15] García de Tena J. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease [J]. New Engl J Med, 2005, 33(4): 429-430.
- [16] Martínez FO, Sica A, Mantovani A. Macrophage activation and polarization [J]. Front Biosci, 2008, 13(4): 453-461.