

DOI:10. 3969/j. issn. 1000-9760. 2020. 06. 004

大蒜素对异丙肾上腺素诱导大鼠心肌缺血的保护作用*

韩贵芝¹ 顾宸铭¹ 张丹丹¹ 张正升^{2△} 张兆强¹ 林立¹

(¹ 济宁医学院公共卫生学院, 济宁 272013; ² 济宁医学院附属济宁市第一人民医院, 济宁 272011)

摘要 **目的** 探讨大蒜素对大鼠心肌缺血的保护作用及其作用机制。**方法** 腹腔注射异丙肾上腺素建立大鼠心肌缺血损伤模型, 将建模成功的大鼠随机分成模型组和大蒜素高、中、低剂量组, 正常大鼠作对照组, 每组 10 只。HE 染色观察各组大鼠心肌纤维组织形态的变化, ELISA 法检测各组血清中心肌酶的变化以及血清和心肌组织中 CGRP 和 ET-1 含量水平。**结果** 模型组大鼠心肌组织发生显著的病理学变化, AST、CK 和 LDH 水平平均高于对照组(均 $P < 0.05$)。与模型组相比, 大蒜素低、中、高剂量组血清 AST、CK 和 LDH 水平显著降低(均 $P < 0.05$), 心肌组织 ET-1 含量明显降低($F = 9.590, P < 0.05$), CGRP 含量明显升高($F = 9.268, P < 0.05$)。大蒜素各剂量组大鼠心肌组织病理较模型组均有所改善。**结论** 大蒜素可降低大鼠心肌缺血模型血清心肌酶和心肌组织 ET-1 含量, 增加心肌组织 CGRP 的表达, 扩张心血管, 增加供血量, 减少心肌组织炎症损伤, 保护心肌。

关键词 大蒜素; 缺血性心脏病; 内皮素-1; 降钙素基因相关肽

中图分类号: R542.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-9760(2020)12-393-04

The protective effect of allicin on isoprenaline-induced myocardial ischemia in rats

HAN Guizhi¹, GU Chengming¹, ZHANG Dandan¹, ZHANG Zhengsheng^{2△}, ZHANG Zhaoqiang¹, LIN Li¹

(¹School of Public Health, Jining Medical University, Jining 272013, China;

²Jining NO. 1 People's Hospital & the Affiliated Hospital of Jining Medical University, Jining 272011, China)

Abstract: Objective To explore the protective effect of allicin on myocardial ischemia in rats and its mechanism. **Methods** Isoproterenol was injected intraperitoneally to establish a rat model of myocardial ischemia injury. The successfully modeled rats were randomly divided into model groups, high, medium, and low dose allicin intervention groups, and normal rats as the control group, each with 10 rats. HE staining was used to observe the changes of rat myocardial fibrous tissue morphology of each group. The changes of serum myocardial enzymes and the levels of CGRP and ET-1 in serum and myocardial tissue were detected by ELISA. **Results** The myocardial tissue of the model group had significant pathological changes, and the levels of AST, CK and LDH were higher than those of the control group ($P < 0.05$). Compared with the model group, the levels of AST, CK and LDH in the serum of the allicin groups were significantly reduced ($P < 0.05$), the content of ET-1 in myocardial tissue was significantly reduced ($F = 9.590, P < 0.05$), and the content of CGRP was significantly increased high ($F = 9.268, P < 0.05$). The pathology of myocardial tissue of rats in each dose of allicin was improved compared with the model group. **Conclusion** Allicin can reduce serum myocardial enzymes and myocardial tissue ET-1 levels in rat myocardial ischemia model, increase the expression of CGRP in myocardial tissue, expand cardiovascular, increase the blood supply, slow down the inflammation damage in the myocardial tissue, and protect the myocardium.

Keywords: Allicin; Ischemic heart disease; ET-1; CGRP

* [基金项目] 山东省医药卫生科技发展计划项目(2017WS650, 2017WS652); 济宁医学院大学生创新项目(cx2019021)
△ [通信作者] 张正升, E-mail: 393177940@qq.com

心肌缺血性疾病是由于心肌病理性变化引起冠脉供血量和心肌细胞需求量之间不平衡,导致心肌供血不足引起的损伤,其中最常见为心绞痛和急性心肌梗死^[1-2]。大蒜素具有降血脂、扩张血管、抗动脉粥样硬化、抗氧化、降血压、防治心脑血管疾病等药理作用^[3-5]。乔蕾等^[6]研究发现大蒜素对心肌缺血具有保护作用,其机制主要是增加心肌的抗氧化能力。目前,大蒜素对心肌缺血保护作用机制还不太清楚。本实验通过建立大鼠心肌缺血模型,探讨大蒜素对心肌缺血的保护作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 成年雄性 Wistar 大鼠,体重 210~225g,由济宁医学院实验动物中心提供。适应性饲养 1 周,自由摄食、饮水,室温 20℃~25℃,相对湿度 45%~60%,符合动物伦理学原则。

1.1.2 材料和试剂 大蒜素纯品(上海源叶生物科技有限公司);CGRP、ET-1 试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.2 方法

1.2.1 大鼠心肌缺血模型的制备 腹腔注射异丙肾上腺素 3mg/kg,每天 2 次,连续 30d,制备大鼠心肌缺血模型^[7]。

1.2.2 分组及处理 动物模型建立后喂养 7d,使大鼠适应环境,记录大鼠的饮水摄食、精神状态、体重等,当充分适应环境后,随机分为低、中、高剂量组和模型组,正常大鼠作对照组,每组 10 只。低、中、高剂量组分别灌胃 100mg/kg. bw、200mg/kg. bw、400mg/kg. bw 大蒜素,正常对照组和模型对照组灌胃等容量的生理盐水。每日灌胃前观察并记录各组大鼠的体重、饮水、摄食,精神状态等。连续灌胃 30d 后,停止灌胃,继续喂养 7d。用乙醚在麻醉缸中麻醉,摘眼球取血,离心取上层血清。解剖取心脏,称取 1.0g 左心室心肌组织,加入 1ml PBS,组织匀浆,离心取上清液,冷冻备用。

1.2.3 形态学观察 取左心室心尖处心肌组织 1~2mm,放在 4%多聚甲醛中固定 24h,常规脱水、石蜡包埋,切片,HE 染色,电光镜观察大鼠左心室心肌组织的病理变化。

1.2.4 天门冬氨酸氨基转移酶 (AST)、肌酸激酶 (CK) 和乳酸脱氢酶 (LDH) 含量的测定 取血清

严格按试剂盒操作说明,采用 ELISA 方法测定 AST、CK 和 LDH 含量。

1.2.5 血清和心肌组织中 ET-1、CGRP 含量的测定 取血清和心肌组织匀浆液严格按试剂盒说明操作,采用 ELISA 方法测定 ET-1 和 CGRP 含量。

1.3 统计学方法

用 SPSS17.0 软件统计分析,所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 Bonferroni 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

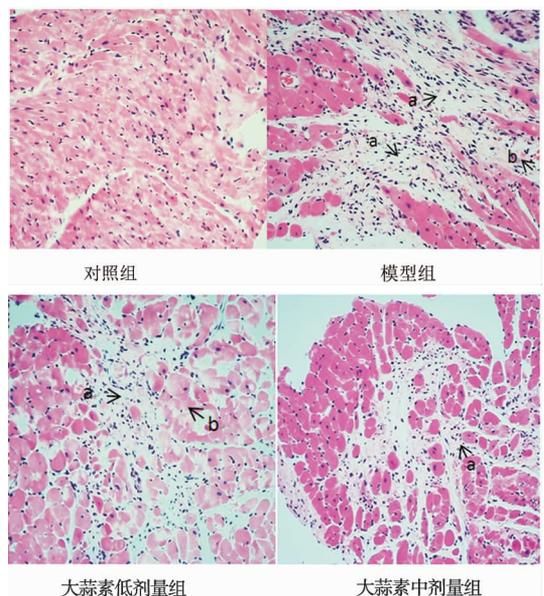
2 结果

2.1 心肌形态学观察

对照组大鼠心肌组织纤维排列有序纹理清晰,微血管均匀地分布在心肌间质中且结构正常;模型组心肌组织纤维排列紊乱模糊,心肌间质中充斥着嗜酸性粒细胞出现嗜酸样改变,心肌组织纹理出现波浪状损伤和心肌细胞和心间质有炎性细胞浸润;大蒜素高、中、低剂量组较模型组损伤明显减轻,心肌纤维组织排列较为规律整齐,存在少量的点状嗜酸性染色,未见波浪状损伤和炎性细胞的浸润。见图 1。

2.2 各组大鼠血清 AST、LDH 和 CK 含量变化

模型组 AST、LDH 和 CK 水平均高于对照组,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。大蒜素低、中、高剂量组 AST、LDH 和 CK 水平均低于模型组,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。见表 1。





大蒜素高剂量组

注:a. 炎性细胞浸润和损伤;b. 嗜酸性粒细胞嗜酸样改变

图 1 各组大鼠心肌组织 HE 染色病理切片 (HE×100)

表 1 各组大鼠血清中 AST、LDH 和 CK 含量(U/ml, $\bar{x}\pm s$)

| 组别 | AST | LDH | CK |
|---------|------------------------|------------------------|------------------------|
| 对照组 | 0.35±0.14 | 3.24±0.57 | 2.01±0.47 |
| 模型组 | 0.82±0.12* | 9.27±0.87* | 5.25±0.87* |
| 大蒜素低剂量组 | 0.64±0.08 [△] | 7.14±0.54 [△] | 4.44±0.97 [△] |
| 大蒜素中剂量组 | 0.55±0.06 [△] | 5.01±0.41 [△] | 3.85±0.58 [△] |
| 大蒜素高剂量组 | 0.42±0.07 [△] | 4.54±0.81 [△] | 3.04±0.53 [△] |
| F 值 | 3.844 | 4.587 | 6.547 |
| P | <0.001 | <0.001 | <0.001 |

注:与对照组比较,*表示 $P<0.05$;与模型组比较,[△]表示 $P<0.05$

2.3 各组大鼠血清和心肌组织中 ET-1、CGRP 含量变化

与模型组相比,大蒜素高、中、低剂量组心肌中 ET-1 含量显著降低,CGRP 含量明显升高 ($P<0.05$)。见表 2。

表 2 各组大鼠 ET-1 和 CGRP 含量(pg/ml, $\bar{x}\pm s$)

| 组别 | ET-1 | | CGRP | |
|---------|------------|------------------------|------------|-------------------------|
| | 血清 | 心肌 | 血清 | 心肌 |
| 对照组 | 32.50±4.24 | 14.6±3.17 | 41.56±1.99 | 55.15±1.67 |
| 模型组 | 41.53±5.74 | 29.4±2.29* | 27.56±4.37 | 48.65±3.4* |
| 大蒜素低剂量组 | 35.25±3.29 | 23.4±4.71 [△] | 30.43±2.00 | 50.35±2.44 [△] |
| 大蒜素中剂量组 | 36.89±4.22 | 16.9±3.70 [△] | 39.09±2.81 | 51.85±3.21 [△] |
| 大蒜素高剂量组 | 37.37±3.86 | 15.4±4.72 [△] | 39.78±7.51 | 52.05±4.12 [△] |
| F 值 | 1.268 | 9.590 | 1.678 | 9.268 |
| P | 0.297 | <0.001 | 0.177 | <0.001 |

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,[△] $P<0.05$

3 讨论

我国每年突发性冠心病心绞痛和急性心肌梗死引起的缺血性心脏病死亡率高达 3.2%,居病因

死亡之首。在我国缺血性心脏病发病率和死亡率呈上升趋势,早期预防和控制是降低缺血性心脏病发生的重要策略^[8]。近年来研究发现大蒜素对心肌具有保护作用,其对心肌作用的机制主要包括^[9-10]:有效清除超氧阴离子自由基,抗脂质过氧化反应、促进扩张血管物质 NO、H₂S、NOS 的产生、抑制心房心肌细胞内钙超载钙拮抗、抑制血小板黏附聚集、降低血浆纤维蛋白原作用、增加纤溶酶活性,促进纤溶,阻止血栓形成^[11],延缓心肌细胞凋亡,促进受损心肌细胞的自我修复等。大蒜素对心肌缺血性家兔具有明显的拮抗 LVDP 升高、+dp/dtmax 降低及拮抗心肌缺血期 LVSP 的作用,通过减轻心脏负荷,加强左心功能^[12-13]。本文结果显示,模型组大鼠心肌组织受损,肌纤维排列紊乱,出现断裂、断层、不清晰,有炎症细胞浸润,大蒜素剂量组心肌组织纤维排列大致规律,可见部分少量的炎症细胞浸润,微血管清晰。说明大蒜素对心肌缺血具有保护作用。

降钙素基因相关肽 (calcitonin gene-related peptide, CGRP) 是一种由多个氨基酸组成的小链活性多肽,有舒张血管和收缩心肌的作用,抑制血管平滑肌细胞凋亡和增殖,参与调节消化系统和神经功能等^[14]。内皮素 (endothelin 1, ET-1) 由 21 个氨基酸组成的活性多肽,具有强烈的促平滑肌增殖和缩血管的作用^[15]。有研究表明,通过建立大鼠离体心脏缺血/再灌注模型,避免体液调节的影响,通过灌注外源性 CGRP 和 ET-1,检测大鼠心脏功能的变化。研究发现灌注 CGRP 能明显的增加心肌组织中 CGRP 受体的表达,心功能明显改善^[16]。

大蒜素低、中、高剂量组血清 AST、CK 和 LDH 水平较模型组显著降低,心功能有所改善。大蒜素低、中、高剂量组心肌组织 ET 含量显著降低,CGRP 含量显著升高。表明大蒜素可以使血清中具有收缩血管作用的 ET 含量降低,使心肌组织中具有舒张血管作用的 CGRP 含量升高,扩张心血管,改善心肌供血,改善心肌组织的炎性损伤,达到保护心肌的作用。

参考文献:

[1] Liu C, Huang Y. Chinese herbal medicine on cardiovascular diseases and the mechanisms of action[J]. Front

- Pharmacol, 2016, 7: 469. DOI: 10. 3389/fphar. 2016. 00469.
- [2] 卢秀英,刘红. 青年与老年急性心肌梗死患者危险因素及冠状动脉病变特征对比分析[J]. 宁夏医科大学学报, 2017, 39(3): 348-350. DOI: 10. 16050/j. cnki. issn1674-6309. 2017. 03. 032.
- [3] Zeng Y, Li Y, Yang J, et al. Therapeutic role of functional components in alliums for preventive chronic disease in human being [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2017, 2017: 9402849. DOI: 10. 1155/2017/9402849.
- [4] Dubey H, Singh A, Patole AM, Tenpe CR. Antihypertensive effect of allicin in dexamethasone-induced hypertensive rats [J]. Integr Med Res, 2017, 6(1): 60-65. DOI: 10. 1016/j. imr. 2016. 12. 002.
- [5] Ding G, Zhao J, Jiang D. Allicin inhibits oxidative stress-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis by promoting PI3K/AKT and CREB/ERK signaling in osteoblast cells [J]. Exp Ther Med, 2016, 11(6): 2553 - 2560. DOI: 10. 3892/etm. 2016. 3179.
- [6] Wang SL, Liu DS, Liang ES, et al. Protective effect of allicin on high glucose/hypoxia-induced aortic endothelial cells via reduction of oxidative stress [J]. Exp Ther Med, 2015, 10(4): 1394-1400. DOI: 10. 3892/etm. 2015. 2708.
- [7] 韩芬,杨晓. 异丙肾上腺素对心肌缺血大鼠氧化应激反应及 caspase-9 的影响[J]. 中国老年学杂志, 2019, 39(19): 4843-4846. DOI: 10. 3969/j. issn. 1005-9202. 2019. 19. 065.
- [8] Louis XL, Murphy R, Thandapilly SJ, et al. Garlic extracts prevent oxidative stress, hypertrophy and apoptosis in cardiomyocytes: a role for nitric oxide and hydrogen sulfide [J]. BMC Complement Altern Med, 2012, 12: 140. DOI: 10. 1186/1472-6882-12-140.
- [9] 廖家有,夏勇. 大蒜素对腹主动脉缩窄大鼠左室肥厚及钙调神经磷酸酶信号通路的影响[J]. 中国医药导报, 2012, 9(5): 18-20. DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-7210. 2012. 05. 007.
- [10] 陆晓丹,宗刚军,周建英,等. 大蒜素改善糖尿病心脏病大鼠心功能及纤维化的作用及对 NF- κ B 信号通路的影响[J]. 中国药业, 2019, 28(13): 22-25. DOI: 10. 3969/j. issn. 1006-4931. 2019. 13. 006.
- [11] González-Hernández A, Marichal-Cancino BA, Lozano-Cuenca J, et al. Heteroreceptors modulating CGRP release at neurovascular junction: potential therapeutic implications on some vascular-related diseases [J]. Biomed Res Int, 2016, 2016: 2056786. DOI: 10. 1155/2016/2056786.
- [12] Mai TH, Wu J, Diedrich A, et al. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) in autonomic cardiovascular regulation and vascular structure [J]. J Am Soc Hypertens, 2014, 8(5): 286-296. DOI: 10. 1016/j. jash. 2014. 03. 001.
- [13] Wang JW, Li AY, Guo QH, et al. Endothelin-1 and ET receptors impair left ventricular function by mediated coronary arteries dysfunction in chronic intermittent hypoxia rats [J]. Physiol Rep, 2017, 5(1): e13050. DOI: 10. 14814/phy2. 13050.
- [14] 展宏刚,孙淑娟,梁孝印,等. 大蒜素对大鼠心肌缺血的保护作用及相关机制研究[J]. 中国生化药物杂志, 2015, 35(1): 74-76, 80.
- [15] Chen X, Pang S, Lin J, Xia J, Wang Y. Allicin prevents oxidized low-density lipoprotein-induced endothelial cell injury by inhibiting apoptosis and oxidative stress pathway. [J]. BMC Complement Altern Med, 2016, 16: 133. DOI: 10. 1186/s12906-016-1126-9.
- [16] 张正升,韩贵芝,张丹丹,等. 大蒜素对心肌缺血大鼠心肌组织 CGRP 及其受体 mRNA 表达水平的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2020, 18(10): 1543-1546. DOI: 10. 12102/j. issn. 1672-1349. 2020. 10. 008.

(收稿日期 2020-04-08)

(本文编辑:石俊强)