

DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2021.01.004

侧柏叶对家兔心肌缺血-再灌注损伤的保护效应 及其胆碱能抗炎作用*

李 丽 高 波 刘梅芳

(济宁医学院药学院,日照 276826)

摘 要 **目的** 探索侧柏叶(Cacumen Biotae,CB)对家兔心肌缺血-再灌注损伤(myocardial ischemia reperfusion injury,MIRI)的保护效应及胆碱能抗炎通路在此过程中的作用。**方法** 将家兔随机分为假手术组、模型对照组、侧柏叶乙酸乙酯提取物组以及侧柏叶迷走神经切断组,每组 8 只,以心率、收缩压、血清肌酸激酶(creatinine kinase,CK)、乳酸脱氢酶(lactic dehydrogenase,LDH)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α ,TNF- α)、白细胞介素-6(interleukin-6,IL-6)、乙酰胆碱(acetyl choline,ACH)以及心肌组织总一氧化氮合成酶(nitric oxide synthetase,NOS)为检测指标,探讨 CB 对家兔 MIRI 的保护效应以及胆碱能抗炎通路在此过程中的作用。**结果** 模型对照组家兔心率明显减慢、收缩压明显降低,血清心肌酶 CK、LDH、血清 TNF- α 、IL-6 和 Ach 水平明显升高($P<0.01$),心肌组织 NOS 含量明显降低($P<0.01$)。与模型对照组相比,侧柏叶乙酸乙酯提取物组能明显减小家兔 MIRI 心率和收缩压的降低率($P<0.01$),显著减弱血清心肌酶 CK 和 LDH 的升高($P<0.01$),明显降低血清 TNF- α 和 IL-6 水平($P<0.01$),增加血清 Ach 及心肌组织 NOS 含量($P<0.01$),而迷走神经切断后,侧柏叶的以上作用明显减弱($P<0.01$)。**结论** 侧柏叶对家兔 MIRI 具有保护作用,此作用与胆碱能抗炎通路有关。

关键词 侧柏叶;心肌缺血-再灌注损伤;家兔;胆碱能抗炎通路

中图分类号:R965;R589 文献标识码:A 文章编号:1000-9760(2021)02-014-04

Study on the protective action of cacumen biotae on rabbits' myocardial ischemia reperfusion injury and its cholinergic anti-inflammatory function

LI Li,GAO Bo,LIU Meifan

(College of Pharmacy,Jining Medical University,Rizhao 276826,China)

Abstract: Objective To study the protective action of Cacumen Biotae (CB) on rabbits' myocardial ischemia reperfusion injury and the cholinergic anti-inflammatory pathway's function during this process. **Methods** Rabbits were divided into sham operation group,model control group,ethyl acetate extract group and CB plus vagus nerve cut group. Each group has 8 rabbits. Heart rate,blood pressure,blood levels of creatine kinase (CK),lactic dehydrogenase (LDH),tumor necrosis factor- α (TNF- α),interleukin (IL-6),acetyl choline (ACH) and the content of nitric oxide synthetase (NOS) in cardiac muscle were detected. According to these indexes,the protective action of CB on myocardial ischemia reperfusion injury and the cholinergic anti-inflammatory pathway's function during this process were evaluated. **Results** For the rabbits in model control group,the blood pressure and heart rate reduced,The blood level of CK,LDH,TNF- α ,IL-6 and ACH rose,the content of NOS in cardiac muscle decreased ($P<0.01$). For the rabbits in ethyl acetate extract group,the reduction ratio of heart rate and blood pressure after myocardial ischemia reperfusion injury minished obviously ($P<0.01$),the rise of blood level of CK and LDH weakened evidently ($P<0.01$),the blood level of TNF- α ,IL-6 reduced and the blood level of ACH and the content of NOS in cardiac muscle increased markedly ($P<0.01$). After cutting the vagus nerve,these above functions of ethyl acetate extract of CB were weakened remarkably ($P<0.01$). **Conclusion** CB has protective function on rabbits' myocardial ischemia reperfusion injury,and this function is closely related to the cholinergic anti-inflammatory pathway.

Keywords: CB;MIRI;Rabbit;Cholinergic anti-inflammatory pathway

* [基金项目] 济宁医学院青年基金项目(JY2016KJ0082)

冠心病严重威胁人类健康,心肌缺血-再灌注损伤(myocardial ischemia reperfusion injury, MIRI)是冠心病治疗过程中面临的一大挑战,而寻求抵抗 MIRI 的药物具有重要的临床应用价值。目前认为, MIRI 的损伤机制与自由基损伤、钙超载和炎性损伤等有关^[1]。

我们的前期研究表明,侧柏叶(Cacumen Biotae, CB)乙酸乙酯提取物具有抗氧化应激、抗炎^[2]等功效,因此我们推测 CB 乙酸乙酯提取物对 MIRI 有治疗作用。本文以心率、收缩压、血清肌酸激酶(creatine kinase, CK)、乳酸脱氢酶(lactic dehydrogenase, LDH)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、乙酰胆碱(acetyl choline, ACH)以及心肌组织总一氧化氮合成酶(nitric oxide synthetase, NOS)为检测指标,探讨 CB 对家兔 MIRI 的保护效应及其相关机制。

1 材料与方法

1.1 动物

健康成年家兔 32 只,体重 2~2.5kg,雌雄不限,由山东大学实验动物中心提供。

1.2 主要试剂

侧柏叶取自济宁医学院本草园,去枝干,留针尖叶。石油醚分析纯(批号:20130419)购自烟台三和化学试剂有限公司;乙酸乙酯(批号:20151214)购自上海山蒲化工有限公司;LDH(批号:20170516)试剂盒、CK(批号:20170511)试剂盒、IL-6(批号:20170518)试剂盒、TNF- α (批号:20170518)试剂盒、ACH(批号:20170517)试剂盒以及 NOS(批号:20170511)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

1.3 侧柏叶乙酸乙酯萃取物制备

新鲜侧柏叶 200g,清洗阴干后,用粉碎机磨成粗粉,并以 1:10 的比例连续 3 次加水煎煮,每次

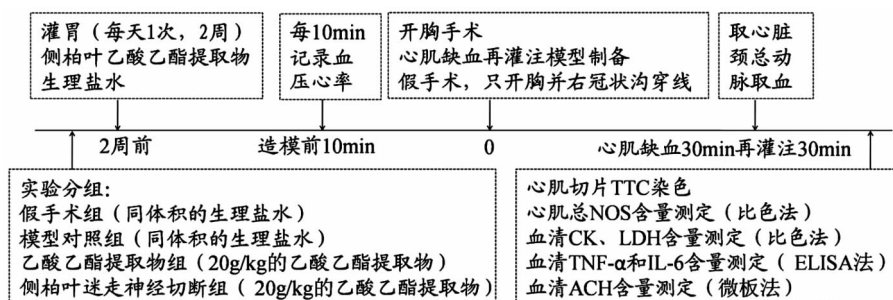
1.5h,合并煎液并用抽滤装置过滤,并将滤液于 60℃ 以下用旋转蒸发仪浓缩,然后用分液漏斗按照 1:1 的比例,先用石油醚萃取分层后取水层,再用同等比例的乙酸乙酯萃取,最后用旋转蒸发仪浓缩为浸膏,得侧柏叶乙酸乙酯萃取物,并置于 4℃ 冰箱备用,用蒸馏水将侧柏叶乙酸乙酯萃取物稀释为 1×10^3 g/L 的混悬液灌胃。

1.4 家兔 MIRI 模型制备

家兔被麻醉、仰卧位固定、气管插管后,沿胸骨正中线右侧旁开 1~2cm 处切开皮肤,钝性分离皮下组织,暴露并剪断 3~5 根肋骨,暴露心脏,剪开心包膜,提起右心耳,将连有缝合线的无创小圆弯针从右冠状沟下方穿过,再用套有橡胶管的细铁钩勾住缝合线的两端,并缓慢拉入橡胶管,之后再家兔的肌肉和皮缝合,并将橡胶管暴露在外。轻拉缝合线,收紧橡皮管,用止血钳同时钳住缝合线和橡胶管 30min,以此造成冠状动脉的缺血,松开止血钳使心脏再灌注 30min,以此制备家兔心肌缺血再灌注的模型。实验过程中,心电图 II 导联显示 ST 段显著抬高或压低说明心肌缺血成功,放松缝合线后,心电图 II 导联显示 ST 段或 T 波较前有回落,说明再灌注成功。

1.5 动物分组及指标测定

健康成年家兔 32 只随机被分为假手术组、模型对照组、侧柏叶乙酸乙酯提取物组以及侧柏叶迷走神经切断组,每组各 8 只。各组动物均按照图 1 所示的实验流程进行操作,心肌缺血 30min 再灌注 30min 后,颈总动脉取血、取心脏后,分别进行心肌切片 TTC 染色,再次确认造模是否成功;心肌总 NOS 含量测定(比色法)、血清 CK、LDH 含量测定(比色法)、血清 TNF- α 、IL-6 含量测定(ELISA 法)以及血清 ACH 含量测定(微板法),以观察侧柏叶对家兔 MIRI 的保护效应及胆碱能抗炎通路在此过程中的作用。



注:TTC. 氯化三苯基四氮唑

图1 实验操作流程

1.6 统计学方法

采用 SPSS17.0 分析软件进行统计分析,所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 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 4 组家兔动脉收缩压和心率变化比较

假手术组家兔手术前后收缩压和心率无明显变化($P > 0.05$),除乙酸乙酯提取物组心肌缺血后

收缩压下降无统计学意义外,其余各组家兔心肌缺血后收缩压均明显下降,心率减慢($P < 0.05$),心肌缺血-再灌注后心率、收缩压进一步下降($P < 0.05$)。与模型对照组相比,侧柏叶乙酸乙酯提取物组心肌缺血-再灌注后心率和收缩压的下降率(缺血前-再灌注后 30min/缺血前)明显降低($P < 0.01$),但与侧柏叶乙酸乙酯提取物组相比,侧柏叶迷走神经切断组收缩压和心率的下降率明显升高($P < 0.01$),如表 1 所示。

表 1 4 组家兔心肌缺血-再灌注前后心率及收缩压的变化 ($n=8, \bar{x} \pm s$)

实验分组	心率/次·min ⁻¹							收缩压/mmHg						
	缺血前	缺血后 30min	t	P	再灌注 30min	t	P	缺血前	缺血后 30min	t	P	再灌注 30min	t	P
假手术组	300±13	293±14	1.04	0.32	302±16	0.27	0.79	109±10	114±12	0.91	0.38	106±9	0.63	0.54
模型对照组	299±15	202±13 **	13.82	<0.001	142±16 **	19.99	<0.001	113±11	90±12 **	4.00	<0.001	77±8 **	7.49	<0.001
乙酸乙酯提取物组	313±16	262±14 **	6.79	<0.001	220±17 **	11.27	<0.001	112±12	102±13	1.60	0.13	95±10 *	3.08	0.01
侧柏叶迷走神经切断组	297±14	214±17 **	10.66	<0.001	161±15 **	18.75	<0.001	119±14	101±9 *	3.06	0.01	83±7 **	6.51	<0.001

注:与缺血前相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

2.2 4 组家兔血清心肌酶的含量比较

与假手术组相比,模型对照组、侧柏叶乙酸乙酯提取物组以及侧柏叶迷走神经切断组血清 CK、LDH 含量明显升高($P < 0.01$),但与模型对照组相比,侧柏叶乙酸乙酯提取物组和侧柏叶迷走神经切断组明显降低($P < 0.01$),而侧柏叶乙酸乙酯提取物组又明显低于侧柏叶迷走神经切断组($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 4 组家兔心率和收缩压变化率以及血清 LDH 和 CK 含量比较 ($n=8, \bar{x} \pm s$)

	心率变化率/%	收缩压变化率/%	LDH/U·L ⁻¹	CK/U·L ⁻¹
假手术组	0.63±0.16	2.83±1.20	369.19±23.47	893.25±36.17
模型对照组	52.94±5.73 **	40.49±4.82 **	834.35±45.68 **	1792.30±33.67 **
乙酸乙酯提取物组	29.65±5.45 ** #	15.71±5.59 ** #	498.51±21.63 ** #	1265.91±78.50 ** #
侧柏叶迷走神经切断组	45.57±8.94 *** #△	27.80±10.87 *** #△	685.60±28.67 *** #△	1659.24±69.07 *** #△
F 值	120.74	47.96	341.65	395.47
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与假手术组相比,* $P < 0.01$;与模型对照组相比,# $P < 0.01$;与乙酸乙酯提取物组相比,△ $P < 0.01$

2.3 4 组家兔血清 Ach、TNF-α、IL-6 及心肌组织总 NOS 的含量

与假手术组相比,模型对照组、侧柏叶乙酸乙酯提取物组和侧柏叶迷走神经切断组血清 Ach、TNF-α、IL-6 含量明显升高($P < 0.01$),心肌组织总 NOS 含量明显降低($P < 0.01$)。与模型对照组相比,侧柏叶乙酸乙酯提取物组血清 TNF-α、IL-6 含量则明显降低($P < 0.01$),血清 Ach 和心肌组织总

NOS 含量明显升高($P < 0.01$)。而侧柏叶乙酸乙酯提取物组血清 TNF-α、IL-6 含量明显低于侧柏叶迷走神经切断组($P < 0.01$),血清 ACh 以及心肌组织总 NOS 含量明显高于侧柏叶迷走神经切断组($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 4 组家兔血清 Ach、TNF-α、IL-6 水平和心肌组织 NOS 含量比较 ($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	ACh/μg·ml ⁻¹	TNF-α/ng·ml ⁻¹	IL-6/ng·ml ⁻¹	NOS/U·mg ⁻¹
假手术组	37.71±6.82	1.13±0.11	0.35±0.04	162.33±25.14
模型对照组	68.74±15.68 **	1.79±0.29 **	0.74±0.02 **	108.99±17.61 **
乙酸乙酯提取物组	99.17±15.32 ** #	1.35±0.12 ** #	0.43±0.04 ** #	145.42±21.33 ** #
侧柏叶迷走神经切断组	52.54±12.61 ** #△	1.55±0.11 ** #△	0.56±0.01 ** #△	126.33±17.92 ** #△
F 值	27.83	20.17	145.51	9.58
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与假手术组相比,* $P < 0.01$;与模型对照组相比,# $P < 0.01$;与乙酸乙酯提取物组相比,△ $P < 0.01$

3 讨论

目前,冠心病发病率和死亡率逐年上升,且发病年轻化趋势明显^[3-4]。冠状动脉再通是治疗冠心病的主要方法,但冠状动脉再通后容易导致 MIRI,所以寻求能对抗 MIRI 的药物具有重要意义。我们的研究表明,侧柏叶乙酸乙酯提取物能明显减小家兔 MIRI 心率和收缩压的降低率,显著减弱血清心肌酶 CK 和 LDH 的升高,提示侧柏叶对 MIRI 具有保护作用,这将对冠心病的治疗提供重要的参考依据。

在人类及哺乳动物, 窦房结、右心房、右心室、房室结、左室后壁等均接受右冠状动脉的供血^[5], 因此右冠状动脉供血不足可导致心率减慢和收缩压降低。缺血-再灌注后可使心肌细胞水肿、胞膜和线粒体的损伤进一步加剧^[6]。这可能是导致心肌缺血-再灌注后心率与收缩压进一步降低的原因^[7]。心肌内存在大量的心肌酶, 在心肌细胞膜通透性增加或心肌缺血性坏死时, 大量的心肌酶释放入血, 引起血清中心肌酶升高, 而血清心肌酶的升高程度在某种程度上与心肌细胞的损伤成正相关^[8]。在本研究中, 侧柏叶能明显降低家兔 MIRI 后血清 CK 和 LDH 水平, 明显减小心率和收缩压的降低率, 提示侧柏叶对家兔心肌 MIRI 具有保护作用。

Bernik 等^[9]研究发现, 刺激迷走神经能明显减轻大鼠心肌缺血-再灌注模型的炎症反应, 而切断迷走神经后这种保护效应消失。Li 等^[10]研究也发现, 在大鼠心肌缺血-再灌注模型, 给予 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体激动剂后能明显减少缺血心肌的炎性细胞浸润, 降低心肌酶含量, 减轻心肌的超微结构损伤。以上结果提示, 在一定程度上, 迷走神经活性增强能明显减轻心肌 MIRI。在本研究中, 侧柏叶能明显减小心肌缺血-再灌注后收缩压、心率的降低率, 但在迷走神经切断后, 侧柏叶的以上保护作用明显减弱, 提示迷走神经切断后侧柏叶对心肌 MIRI 的保护作用明显减小, 说明迷走神经在此过程中作用关键。已有研究证实, 迷走神经释放的乙酰胆碱通过结合免疫细胞表面的 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体阻断 NF- κ B 通路, 抑制炎症因子及 TNF- α 和 IL-6 等细胞因子的表达。而大量释放的 TNF- α 和 IL-6 等却能激活 NF- κ B 通路, 下调 NOS 的表达, 诱发细胞凋亡, 加重心肌损伤。在本研究中, 侧柏叶能明显降低心肌缺血-再灌注后血清 TNF- α 和 IL-6 水平, 增加血清 Ach 及心肌组织 NOS 含量, 提示侧柏叶对 MIRI 的保护作用与胆碱能抗炎通路有关。而迷走神经切断后, 侧柏叶的以上作用明显减弱, 进一步提示侧柏叶对 MIRI 的保护作用与

胆碱能抗炎通路有关。

参考文献:

- [1] 刘宣辰, 崔佳璟, 周玉娟. 心肌缺血再灌注损伤机制的研究进展[J]. 科学大众·科学教育, 2018(5): 198.
- [2] 李丽, 苗文静, 王青. 侧柏叶水煎液对耳廓炎症和腹腔炎症模型的抗炎作用[J]. 中国药房, 2015, 26(25): 3515-3517.
- [3] Liu C, Huang Y. Chinese herbal medicine on cardiovascular diseases and the mechanism of action[J]. Front Pharmacol, 2016, 7: 469. DOI: 10. 3389/fphar. 2016.
- [4] 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.
- [5] Yao ZB, Ren GL. Applied anatomy of the S-A node artery[J]. Chin J Clinician, 1995, 3(13): 171-173.
- [6] Jennings RB. Historical perspective on the pathology of myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. Circ Res, 2013, 113(4): 428-38.
- [7] 张世平, 王臻, 金梅梅, 等. 右美托咪定对糖尿病大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护机制[J]. 解放军医药杂志, 2018, 30(7): 7-11.
- [8] Li HB, Liu ZP, Wang JW, et al. Susceptibility to myocardial ischemia reperfusion injury at early stage of type 1 diabetes in rats[J]. Cardiovasc Diabetol, 2013, 12: 133.
- [9] Bernik TR, Friedman SG, Ochani M, et al. Cholinergic antiinflammatory pathway inhibition of tumor necrosis factor during ischemia reperfusion[J]. J Vasc Surg, 2002, 36(6): 1231-1236. DOI: 10. 1067/mva. 2002. 129643.
- [10] Li H, Zhang ZZ, Zhan J, et al. Protective effect of PNU-120596, a selective $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor-positive allosteric modulator, on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2012, 59(6): 507-513. DOI: 10. 1097/FJC. 0b013e31824c86c3.

(收稿日期 2020-07-09)

(本文编辑: 石俊强)