

· 论著 ·

蝙蝠葛酚性碱对家兔心脑缺血-再灌注损伤保护作用的研究

王芳 赵刚 吕青 曲玲 郭莲军

【摘要】目的 探讨蝙蝠葛酚性碱(PAMd)抗心、脑同时缺血-再灌注损伤的机制。**方法** 采用结扎家兔左冠状动脉前降支及双侧颈总动脉 30 min 后再灌注造成心、脑缺血-再灌注模型,观察 PAMd 对缺血前后及再灌注后不同时间血清、左心室、海马、皮质及小脑中丙二醛(MDA)含量和超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响。**结果** 家兔心、脑缺血-再灌注 10 min 后血清 MDA 含量显著升高,SOD 活性显著降低(P 均 <0.05)。PAMd 3.5 mg/kg 显著降低心、脑缺血-再灌注后血清及组织 MDA 含量,升高 SOD 活性(P 均 <0.05)。**结论** PAMd 通过减轻脂质过氧化所造成的损伤,提高 SOD 活性,对心、脑缺血-再灌注损伤具有一定保护作用。

【关键词】 蝙蝠葛酚性碱; 缺血-再灌注损伤,心肌; 缺血-再灌注损伤,脑; 脂质过氧化

Protective effect of phenolic alkaloids from *Menispermum dauricum* on myocardial and cerebral ischemia/reperfusion injury in rabbits WANG Fang*, ZHAO Gang, LÜ Qing, QU Ling, GUO Lian - jun.
*Department of Pharmacology, Tongji Medical Colleges of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei, China

【Abstract】Objective To explore the mechanism underlying the effects of phenolic alkaloids abstracted from *Menispermum dauricum* (PAMd) on concurrent myocardial and cerebral ischemia/reperfusion injury in rabbits. **Methods** Both left anterior descending coronary artery and bilateral carotid arteries were ligated to induce myocardial and cerebral ischemia/reperfusion injury at the same time in rabbits. At 30 minutes after ischemia, the occlusion was released to allow return of circulation, and 2 ml of blood was collected from the femoral vein 10 minutes before ischemia, 1, 10, 30 minutes after ischemia, and 1, 10, 30, 60, 120, 180, 240 minutes after reperfusion. All rabbits were sacrificed at the end of reperfusion, and the left ventricle, hippocampus, cortex, and cerebellum were removed for examination. Malondialdehyde (MDA) content and superoxide dismutase (SOD) activity were determined. **Results** At 10 minutes after reperfusion, MDA content in serum was significantly higher and SOD activity was significantly lower in ischemia/reperfusion group than those of control group (both $P < 0.05$). In rabbits with administration of PAMd, MDA content was lower and SOD activity was higher in serum compared with ischemia/reperfusion group ($P < 0.05$). Similar results as in the blood in regard to MDA content and SOD activity were obtained in tissues. **Conclusion** PAMd could attenuate the injury induced by lipid peroxidation and enhance the activity of SOD, thus it might play a protective role in concurrent myocardial - cerebral ischemia/reperfusion injury.

【Key words】 phenolic alkaloids from *Menispermum dauricum*; myocardial; cerebral reperfusion injury; reperfusion injury; lipid peroxidation

心、脑缺血是常见严重危害人类健康的疾病,它既可分别发生,又可同时发生,因而在诊断和治疗上颇为棘手。蝙蝠葛酚性碱(phenolic alkaloids from *Menispermum dauricum*, PAMd)是从防己科植物蝙蝠葛(*Menispermum dauricum*)根茎中提取的多种脂溶性生物碱混合物,主要成分为蝙蝠葛碱(Dauricine, Dau)和蝙蝠葛苏林碱(Daurisoline, Ds)^[1]。Dau 和 Ds 均为双苄基异喹啉类生物碱,脂

溶性高,易通过血-脑屏障,在脑组织中有较高的浓度分布。文献报道 Dau 能够抑制血小板活化因子生成,并具有良好的抗心律失常作用^[2,3],Ds 具有钙拮抗作用和抗一氧化氮(NO)毒性损伤的作用^[4-6],因此它们对缺血性脑损伤均有一定的保护作用。但是蝙蝠葛生药中 Dau、Ds 单体含量较低,而 PAMd 含量则比较高,且提取工艺较简单。因此,若 PAMd 具有与单体同样良好的抗脑缺血损伤作用,将其作为中药有效部位用于临床,则有着重要的实用价值。本课题组前期研究表明,PAMd 可拮抗各种激动剂(如 KCl,组胺和甲氧胺)所引起的家兔颈动脉和基底动脉的收缩作用。本实验拟通过研究 PAMd 对家兔心、脑同时缺血-再灌注损伤时丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)的影响,探讨其抗心、脑同时缺血-再灌注损伤的机制。

基金项目:湖北省武汉市青年科技晨光计划基金资助项目(20045006071-11)

作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医学院药理学系(王芳,吕青,曲玲,郭莲军);华中科技大学同济医学院附属协和医院胰腺外科中心(赵刚)

作者简介:王芳(1975-),女(汉族),湖北省武汉市人,博士,讲师,从事心脑血管药理研究,发表论文 10 余篇。

1 材料与方 法

1.1 药品和试剂: PAMd, 纯度为质量分数 95%, 中科院昆明植物研究所潘锡平博士提供。用 HCl 1 mol/L 溶解后, 1 mol/L NaOH 调 pH 值至 6.4。MDA 和 SOD 试剂盒均为南京建成生物工程研究所产品。

1.2 动物与分组: 新西兰白兔 24 只, 雌雄不拘, 体重(2.0±1.0)kg, 由华中科技大学同济医学院实验动物部提供(证书号: 19-025), 随机分为对照组、假手术组、模型组和 PAMd 组, 每组 6 只。

1.3 动物模型制作及各组处理方法: ①模型组: 用质量分数为 3% 的戊巴比妥钠 1.0 ml/kg 经耳缘静脉注射麻醉。行颈外静脉插管以供给药, 股动脉插管供取血。气管插管、开胸、结扎左冠状动脉前降支, 同时行双侧颈总动脉结扎, 缺血 30 min 后再灌注 240 min。②对照组: 仅行股动脉插管供取血。③假手术组: 左冠状动脉前降支和双侧颈总动脉穿线但不结扎。④PAMd 组: 缺血前 10 min 经颈外静脉给予 PAMd 3.5 mg/kg, 其余同模型组。

1.4 取材及指标检测: 分别于缺血前 10 min, 缺血 1、10 和 30 min, 以及再灌注 1、10、30、60、120、180 和 240 min 由股动脉取血 2 ml。实验结束迅速取出左心室、海马、小脑和皮质, 并分别制成体积分数为 10% 的组织匀浆。采用比色法检测血清和组织中的 MDA 含量和 SOD 活性。

1.5 统计学处理: 实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, *t* 检验和 ANOVA 进行统计学检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 PAMd 对血清 MDA 含量的影响(表 1): 模型组血清 MDA 含量于再灌注 10 min 后开始明显升高, 120 min 达峰值; 再灌注 10 min 后 MDA 含量明显高于对照组和假手术组(*P* 均 < 0.05)。PAMd 组血清 MDA 含量于再灌注 60 min 达峰值, 随后逐渐下降; 再灌注 10 min 后 MDA 含量显著低于模型组(*P* 均 < 0.05)。

2.2 PAMd 对血清 SOD 活性的影响(表 2): 假手术组血清 SOD 活性无明显改变。模型组血清 SOD 活性于再灌注后 10 min 开始出现明显下降, 且明显低于对照组和假手术组; 再灌注 120 min 达最低值(*P* < 0.05)。给予 PAMd 后, 血清 SOD 活性于再灌注 120 min 达最低值, 再灌注 30 min 后 SOD 活性明显高于模型组(*P* < 0.05)。

2.3 PAMd 对组织 MDA 含量的影响(图 1): 与对照组相比, 模型组 MDA 含量分别在小脑增加了 64.4%, 皮质增加了 76.8%, 海马增加了 78.5%, 左心室增加了 83.5% (*P* 均 < 0.05)。给予 PAMd 后, 与模型组相比, PAMd 分别使小脑 MDA 含量降低了 28.0%, 皮质降低了 29.1%, 左心室降低了 34.7%, 海马降低了 32.9% (*P* 均 < 0.05)。

表 1 PAMd 对心、脑缺血-再灌注损伤时血清 MDA 含量的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Effects of PAMd on blood content of MDA in myocardial-cerebral ischemia/reperfusion injury in rabbits($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	缺血-再灌注时间(min)										
	缺血前 10	缺血 1	缺血 10	缺血 30	再灌注 1	再灌注 10	再灌注 30	再灌注 60	再灌注 120	再灌注 180	再灌注 240
对照组	2.81±0.32	2.82±0.40	2.64±0.43	2.82±0.39	2.83±0.37	2.80±0.27	2.84±0.29	2.74±0.44	2.63±0.54	2.72±0.43	2.82±0.50
假手术组	2.83±0.40	2.82±0.42	2.84±0.34	2.83±0.39	2.89±0.37	2.87±0.28	2.91±0.42	2.99±0.44	3.02±0.38	2.94±0.29	3.03±0.36
模型组	2.82±0.38	2.23±0.41	3.30±0.46	3.34±0.48	3.42±0.43	4.30±0.60 ⁺	4.43±0.62 ⁺	4.54±0.44 ⁺	4.94±0.91 ⁺	4.89±0.79 ⁺	4.82±0.52 ⁺
PAMd 组	2.82±0.41	2.89±0.44	2.98±0.64	3.04±0.46	3.10±0.42	3.14±0.52 [△]	3.22±0.51 [△]	3.37±0.25 [△]	3.23±0.35 [△]	3.14±0.42 [△]	3.10±0.60 [△]

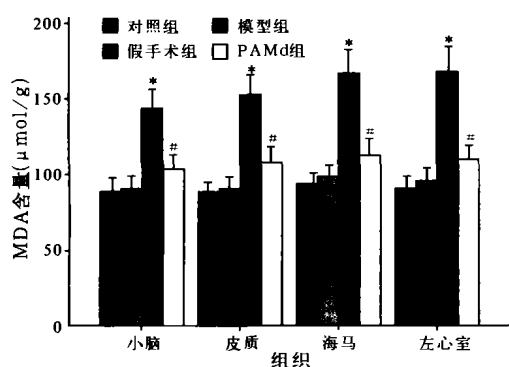
注: 与对照组和假手术组比较: * *P* < 0.05; 与模型组比较: [△] *P* < 0.05; 与缺血 1 min 比较: ⁺ *P* < 0.05; 与缺血 10 min 比较: ⁺ *P* < 0.05

表 2 PAMd 对心、脑缺血-再灌注损伤时血清 SOD 活性的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Effects of PAMd on blood activity of SOD in myocardial-cerebral ischemia/reperfusion injury in rabbits($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	缺血-再灌注时间(min)										
	缺血前 10	缺血 1	缺血 10	缺血 30	再灌注 1	再灌注 10	再灌注 30	再灌注 60	再灌注 120	再灌注 180	再灌注 240
对照组	476.42±40.23	477.39±28.56	469.35±28.69	478.96±32.12	480.36±35.98	475.56±31.56	485.29±28.96	484.41±36.12	478.68±33.42	480.89±30.07	476.33±33.37
假手术组	480.59±30.18	476.03±33.48	481.22±29.59	476.59±32.91	474.46±29.98	485.03±30.59	480.28±33.21	481.46±30.78	475.89±32.18	484.00±29.16	479.62±30.18
模型组	480.23±30.98	481.36±33.62	469.12±31.25	459.98±33.31	448.28±29.65	422.25±38.42 ⁺	398.12±27.95 ⁺	338.41±22.29 ⁺	314.29±21.78 ⁺	326.56±27.46 ⁺	351.25±29.55 ⁺
PAMd 组	477.56±30.91	474.56±33.26	468.27±30.01	463.00±38.36	457.15±31.21	442.56±30.31	436.18±32.05 [△]	437.56±29.48 [△]	432.99±28.19 [△]	445.81±31.03 [△]	467.18±31.81 [△]

注: 与对照组和假手术组比较: * *P* < 0.05; 与模型组比较: [△] *P* < 0.05; 与缺血 1 min 比较: ⁺ *P* < 0.05; 与缺血 10 min 比较: ⁺ *P* < 0.05

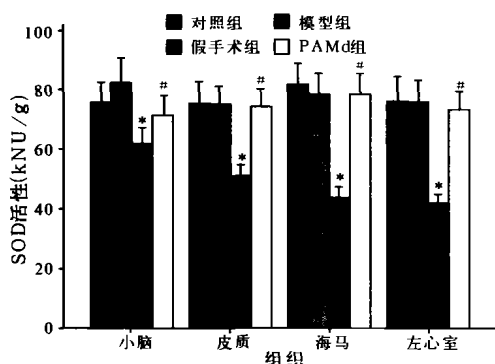


注:与对照组比较: * $P < 0.05$;与模型组比较: # $P < 0.05$

图 1 PAMd 对心、脑缺血-再灌注损伤时组织 MDA 含量的影响

Figure 1 Effects of PAMd on content of MDA in myocardial and brain tissues after 240 minutes of reperfusion in rabbits

2.4 PAMd 对组织 SOD 活性的影响(图 2):和组织中 MDA 含量变化规律相反,与对照组相比,模型组 SOD 活性在小脑降低了 18.8%,皮质降低了 32.1%,海马降低了 46.5%,左心室降低了 45.2% (P 均 <0.05)。与模型组相比,PAMd 能增加各组织中的 SOD 活性,其中小脑增加了 16.5%,皮质增加了 44.3%,海马增加了 80.0%,左心室增加了 75.3% (P 均 <0.05)。



注:与对照组比较: * $P < 0.05$;与模型组比较: # $P < 0.05$

图 2 PAMd 对心、脑缺血-再灌注损伤时组织 SOD 活性的影响

Figure 2 Effects of PAMd on activity of SOD in myocardial and brain tissues after 240 minutes reperfusion in rabbits

3 讨论

本实验首次详细观察了心、脑同时缺血-再灌注损伤中血清与组织的 MDA 含量和 SOD 活性变化。结果表明,心、脑同时缺血-再灌注后 10 min,血清 MDA 含量开始升高,再灌注 120 min 达峰值;血清 SOD 活性于再灌注后 10 min 开始明显下降,再灌注 120 min 达最低值。有研究表明,单纯兔脑缺血-再灌注损伤时,血清 MDA 含量于再灌注后 60 min 开始升高,180 min 达峰值;血清 SOD 活性的变化恰好相反^[7,8]。单纯家兔心肌缺血-再灌注损伤时,血清 MDA 含量逐渐升高,于再灌注 120 min 达峰值;

血清 SOD 活性于再灌注后 30 min 开始明显下降,120 min 达最低值^[9,10],显示 MDA 含量和 SOD 活性达峰值和谷值时间相同,但 MDA 含量明显升高和 SOD 活性明显降低出现的时间较晚。而从本研究结果可以发现,心、脑同时缺血-再灌注损伤时,MDA 含量和 SOD 活性的变化更快,达峰值时间提前;且 MDA 含量和 SOD 活性的变化较单纯脑或心肌缺血-再灌注损伤更为显著,提示脂质过氧化作用更为剧烈;组织中 MDA 含量和 SOD 活性的变化与血清中相类似,尤以海马和左心室中变化最明显。

给予 PAMd 后,血清和组织中 MDA 含量较模型组明显降低,SOD 活性明显升高,提示心、脑同时缺血-再灌注损伤时,PAMd 可以减轻脂质过氧化作用所引起的细胞损伤,增加机体对氧自由基的清除能力,因而发挥抗心、脑同时缺血-再灌注损伤的作用。PAMd 对缺血 10 和 30 min 时 MDA 含量和 SOD 活性无影响,这与 PAMd 只有给药后 60 min 才能在心脏和脑中达到有效浓度相关。

综上所述,PAMd 通过减轻细胞脂质过氧化作用,增强 SOD 的活性,调节体内脂质过氧化和抗脂质过氧化间的平衡,从而对心、脑同时缺血-再灌注损伤具有保护作用。

参考文献:

- 1 龚培力,杜佐华,曾繁典,等. 蝙蝠葛酚性碱的抗心律失常作用[J]. 中药新药与临床药理,1995,6:13-16.
- 2 Guo T,Zhang Y Z,Liu D X,et al. Dauricine inhibits redistribution of platelet membrane glycoprotein IV and release of intracellular α -granule thrombospondin induced by thrombin [J]. Acta Pharmacol Sin,1999,20:533-536.
- 3 Xia J S,Tu H,Li Z,et al. Dauricine suppressed CsCl-induced early after depolarizations and triggered arrhythmias in rabbit heart in vivo[J]. Acta Pharmacol Sin,1999,20:513-516.
- 4 Liu J G,Li R,Liu G Q. I-S-R-aurisoline protects cultured hippocampal neurons against glutamate neurotoxicity by reducing nitric oxide production [J]. Acta Pharmacol Sin,1999,20:21-26.
- 5 王霆,朱兴族,刘国卿,等. 蝙蝠葛苏林碱对缺血性损伤细胞的保护作用[J]. 中国药科大学学报,1998,29:52-56.
- 6 Dawson V L. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures [J]. Proc Natl Acad Sci USA,1991,88:6368-6370.
- 7 简道林,余金甫,黄海波,等. 三七总皂甙对缺血-再灌注兔脑保护作用机制的研究[J]. 中国危重病急救医学,1999,11:145-147.
- 8 徐江平,孙莉莎,杨雪梅. 银杏内酯对大鼠脑缺血-再灌注损伤的保护作用[J]. 中国中西医结合急救杂志,2003,10:31-33.
- 9 管绯. 蝙蝠葛酚性碱对心肌缺血再灌注损伤内皮功能的影响[J]. 中医药研究,2000,16:46-47.
- 10 刘迎午,范友兰. Losartan 对实验性心肌缺血-再灌注损伤的保护作用研究[J]. 中国危重病急救医学,2001,13:624-625.

(收稿日期:2005-02-02 修回日期:2005-02-24)

(本文编辑:李银平)