

# 扶芳藤丹参合剂预处理对AS大鼠心肌缺血再灌注损伤中TNF- $\alpha$ 及NF- $\kappa$ B的影响

王庆高<sup>1</sup> 卢健棋<sup>1</sup> 李成林<sup>2</sup> 朱智德<sup>3</sup> 覃裕旺<sup>2</sup> 刘靖<sup>2</sup> 杨春花<sup>1</sup> 罗锦伟<sup>1</sup>

(1.广西中医药大学第一附属医院,广西 南宁 530023; 2.广西中医药大学,广西 南宁 530001;  
3.广西中医药大学制药厂,广西 南宁 530023)

**摘要** [目的] 观察扶芳藤丹参合剂对动脉粥样硬化(AS)大鼠心肌缺血再灌注损伤中肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )及核转录因子(NF- $\kappa$ B)的影响。[方法] 选用 Wistar 大鼠建立冠状动脉粥样硬化模型,造模成功后随机分4组:假手术组、缺血再灌注(I/R)组、缺血预处理(IPC)组及扶芳藤丹参合剂预处理组。假手术组冠脉穿线不结扎;缺血再灌注(I/R)组结扎冠脉60 min后恢复冠脉血流120 min;缺血预处理(IPC)组先结扎冠脉5 min,再灌注10 min,共反复4次,然后结扎冠脉60 min后恢复冠脉血流120 min;扶芳藤丹参合剂预处理组:AS造模结束后第2日开胸前先灌胃给予扶芳藤丹参合剂,然后结扎冠脉60 min后恢复冠脉血流120 min;缺血再灌注后观察各组心肌梗死面积,CK,LDH,TNF- $\alpha$ 及NF- $\kappa$ B含量。[结果] 扶芳藤丹参合剂预处理及缺血预处理均能显著减少心肌梗死面积,与I/R组比较有显著性差异( $P < 0.01$ )。I/R组CK,LDH,TNF- $\alpha$ 及NF- $\kappa$ B的水平明显增高,扶芳藤丹参合剂预处理及缺血预处理后,与I/R组相比,CK,LDH,TNF- $\alpha$ 及NF- $\kappa$ B明显降低( $P < 0.01$ )。[结论] 扶芳藤丹参合剂预处理能够通过抑制炎症反应而减少心肌缺血再灌注损伤。

**关键词** 扶芳藤丹参合剂;心肌缺血再灌注;NF- $\kappa$ B;TNF- $\alpha$ ;预处理

中图分类号 R285.5 文献标识码 A 文章编号 2095-4441(2013)02-0009-03

心肌梗死急性期的溶栓治疗和冠脉血管成形术的目的均是尽早恢复缺血心肌的血供,以尽可能减少心肌不可逆的损伤,但再灌注后可导致缺血的心肌损伤更为严重。炎症反应在心肌缺血再灌注损伤中发挥了重要作用<sup>[1]</sup>。因此,抑制炎症反应在防治缺血再灌注损伤中具有重要意义。本研究观察扶芳藤丹参合剂对动脉粥样硬化(AS)大鼠心肌缺血再灌注损伤中TNF- $\alpha$ 及NF- $\kappa$ B的影响,为开发防治冠心病的中药新药提供实验依据。

## 1 实验材料

**1.1 动物** 健康清洁级 Wistar 大鼠 100 只,雌雄各半,体重 220~250 g,由广西医科大学医学实验动物中心提供,合格证号 SCXK 桂 2003-0003。

**1.2 药物** 扶芳藤丹参合剂(由扶芳藤 15 g,青蒿 10 g,黄连 6 g,丹参 20 g,檀香 6 g,赤芍 10 g,川芎 6 g,当归 6 g,红花 6 g,生地黄 12 g 等组成)由广西中医药大学第一附属医院制剂室提供,经干燥、称重、浸泡、煎煮 3 次,浓缩至含生药 2 g/ml。

**1.3 试剂及仪器** 兔抗 NF- $\kappa$ B 多克隆抗体(Santa Cruz 公司);组织细胞裂解液(北京博奥森生物技术有限公司);ELISA 试剂盒(购自武汉博士德公司);凝胶成像分析系统(BIORAD 公司);紫外分光光度计(日立公司);低温高速离心机(Sigma 公司);酶标仪(Lab systems 公司);移液器(Eppendorf 公司);低温超速离心机(Eppendorf 公司);垂直电泳装置

(美国 GE 公司);转膜装置(Bio-Rad 公司)。

## 2 方法

**2.1 冠状动脉粥样硬化(AS)模型的建立** 参照《药理实验方法学》<sup>[2]</sup>进行。选用 Wistar 大鼠,按 70 万 IU/kg 的总剂量腹腔注射维生素 D<sub>3</sub>,分 3 d 给完,之后每天喂高脂饲料 15 g(在大鼠标准饲料的配方中添加 1%胆固醇、0.35%胆酸、5%猪油、0.61%丙基硫氧嘧啶),喂养 21 d。

**2.2 心肌缺血再灌注(I/R)的方法** 参照《药理实验方法学》<sup>[2]</sup>进行。大鼠注射麻醉后,背位固定,联接多道生理记录仪,记录标准导联心电图。气管切开,连接动物呼吸机(潮气量 21 ml,频率为每分钟 50 次)。沿胸骨左缘 3~4 肋间打开胸腔,暴露心脏,剪开心包膜做简易心包吊床,用止血钳轻轻提起左心耳,于左心耳下左冠状动脉前降支上 1/3 处穿线,在线两端各穿 1 结扎环,拉紧结扎环以阻断冠脉血流,以心电图出现弓背样抬高为结扎成功。结扎冠脉不同的时间后可造成心肌细胞不同程度的缺血损害。

**2.3 分组及给药** 取 Wistar 大鼠 45 只进行造模,于造模结束后第 2 日随机处死 5 只,分离大鼠主动脉弓,置于 10%中性福尔马林中固定,作 HE 染色,以主动脉内皮细胞有局部脱落现象,符合动脉粥样硬化早期病理学变化特征判断 AS 造模成功<sup>[3]</sup>。将其余造模大鼠随机分为 4 组,每组 10 只。假手术组:AS 造模结束后第 2 日开胸,冠脉穿线不结扎。缺血再灌

收稿日期 2013-05-23

基金项目 广西自然科学基金(桂科自 0991162)

注(I/R)组:AS造模结束后第2日开胸,结扎冠脉60 min后恢复冠脉血流120 min。缺血预处理(IPC)组:AS造模结束后第2日开胸,结扎冠脉5 min,再灌注10 min,共反复4次,然后结扎冠脉60 min后恢复冠脉血流120 min。扶芳藤丹参合剂预处理组:AS造模结束后第2日开胸前先灌胃给予扶芳藤丹参合剂,灌胃量换算按《药理实验方法学》<sup>[2]</sup>计算,每100 g大鼠每日药量为2 mg。然后结扎冠脉60 min后恢复冠脉血流120 min。

**2.4 TTC法测定心肌梗死面积** 再灌注结束后迅速取出心脏,用吸水纸吸去水分。将全心室置-20℃冻存10 min后,从心尖至心底横切成1.0~2.0 mm的心室组织切片,置于1% TTC磷酸缓冲液(pH7.4)中,37℃孵育20 min,于10%的甲醛溶液中固定24 h,随后将坏死区(灰白色)和非坏死区(砖红色)分离,滤纸吸干,分别称重,梗死面积以坏死心肌重量与缺血区心肌重量之比表示。

**2.5 CK,LDH的检测** 缺血再灌注后取股动脉血,然后用低速自动平衡离心机离心20 min,转速3 000 r/min,取上清液用全自动生化自动仪测定CK,LDH含量。

**2.6 TNF- $\alpha$ 含量的测定** 术后取股动脉血,2 000转/分高速离心2 min,取血清,采用酶联免疫分析法(ELISA法)对TNF- $\alpha$ 含量进行测定,严格按试剂说明书进行操作。

**2.7 NF- $\kappa$ B蛋白测定** 采用蛋白免疫印迹(Western blotting)检测心肌组织NF- $\kappa$ B蛋白表达。取心肌组织,采用细胞裂解液提取总蛋白。经电泳、转膜、封闭、一抗二抗孵育后曝光显影。用Scion Corporation分析软件对NF- $\kappa$ B进行灰度值半定量分析。以 $\beta$ -actin为内参,NF- $\kappa$ B/ $\beta$ -actin代表条带强度的相对值,相应蛋白表达值为条带的灰度值除以 $\beta$ -actin内参照校正。

**2.8 统计学处理** 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,用四川大学华西医学院PEMS3.1统计软件进行统计。

### 3 结果

**3.1 扶芳藤丹参合剂预处理对大鼠心肌梗死面积及CK,LDH的影响** 假手术组大鼠心肌未出现梗死,I/R组大鼠出现大面积梗死(52.11 $\pm$ 3.73)%,扶芳藤丹参合剂预处理及缺血预处理均能显著减少心肌梗死面积,与I/R组比较有显著性差异( $P < 0.01$ )。I/R组CK,LDH的水平较假手术组明显增高( $P < 0.01$ ),扶芳藤丹参合剂预处理及缺血预处理后,与I/R组相比,CK,LDH明显降低( $P < 0.01$ );且两组作用相当( $P > 0.05$ ),见表1。

表1 各组大鼠心肌梗死面积及CK,LDH比较

( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	CK(U/L)	LDH(U/L)	心肌梗死面积(%)
假手术组	10	94.37 $\pm$ 11.56	203.10 $\pm$ 28.98	0
I/R组	10	291.92 $\pm$ 26.45 <sup>①</sup>	768.51 $\pm$ 59.01 <sup>①</sup>	50.11 $\pm$ 3.73
IPC组	10	130.86 $\pm$ 17.69 <sup>②</sup>	300.64 $\pm$ 82.46 <sup>②</sup>	37.62 $\pm$ 5.61 <sup>②</sup>
扶芳藤丹参合剂预处理组	10	127.08 $\pm$ 14.27 <sup>②③</sup>	288.57 $\pm$ 51.83 <sup>②③</sup>	35.95 $\pm$ 9.07 <sup>②③</sup>

注:与假手术组比较,① $P < 0.01$ ;与I/R组比较,② $P < 0.01$ ;与IPC组比较,③ $P > 0.05$ ;下同

**3.2 扶芳藤丹参合剂预处理对大鼠TNF- $\alpha$ ,NF- $\kappa$ B的影响** 与假手术组比较,I/R组血清TNF- $\alpha$ 含量和心肌组织NF- $\kappa$ B含量均显著升高( $P < 0.01$ ),扶芳藤丹参合剂预处理及缺血预处理后,与I/R组相比,TNF- $\alpha$ ,NF- $\kappa$ B明显降低( $P < 0.01$ ),且两组作用相当( $P > 0.05$ ),见表2。

表2 各组大鼠TNF- $\alpha$ ,NF- $\kappa$ B比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	TNF- $\alpha$ (pg/ml)	NF- $\kappa$ B(%)
假手术组	10	37.57 $\pm$ 8.61	0.216 $\pm$ 0.018
I/R组	10	105.22 $\pm$ 11.53 <sup>①</sup>	0.973 $\pm$ 0.075 <sup>①</sup>
IPC组	10	55.13 $\pm$ 10.92 <sup>②</sup>	0.421 $\pm$ 0.054 <sup>②</sup>
扶芳藤丹参合剂预处理组	10	50.34 $\pm$ 9.22 <sup>②③</sup>	0.455 $\pm$ 0.103 <sup>②③</sup>

### 4 讨论

心肌梗死急性期的溶栓治疗和冠脉血管成形术的目的均是尽早恢复缺血心肌的血供,以尽可能减少心肌不可逆的损

伤。但是,心肌缺血再灌注(I/R)可以导致缺血再灌注损伤,表现为临床缺血症状加重、心肌酶出现新的高峰、各种心律失常等。因此,对抗缺血及缺血后再灌注损伤所引起的心肌梗死及功能障碍才是治疗缺血性心脏病的根本目的。

研究发现,炎症在缺血再灌注损伤的发生发展中起到了非常重要的作用<sup>[1]</sup>。炎症反应在心肌缺血阶段即被激活,再灌注时显著加剧。其中,TNF- $\alpha$ ,NF- $\kappa$ B直接或间接参与缺血再灌注损伤炎症过程,刺激其它细胞因子及炎症介质的产生。TNF- $\alpha$ 是一种促炎细胞因子,在缺血和再灌注期间,TNF- $\alpha$ 促进IL-6、IL-8的产生,促进炎症反应<sup>[4]</sup>。NF- $\kappa$ B的活化和其致炎调节物级联反应促进心脏的炎症反应<sup>[5]</sup>。

IPC可以激发自身的适应性反应,使心肌对随后发生的持续性缺血的耐受力提高。虽然IPC是一种强有力的心肌保护方法,但由于它是一种损伤性的过程,从而限制了它的临床应用。中医认为缺血再灌注损伤的炎症过程属于毒瘵的范畴,在冠心病治疗中采用清热解毒法与其它治法结合,可以收到很好的疗效<sup>[6-7]</sup>。笔者前期的临床与实验研究已表明,加味丹参饮对冠心病患者有较好的降脂作用,对家兔食饵性动脉粥

样硬化具有显著的防治作用,并具有模拟缺血预处理样的心肌保护作用<sup>[8-10]</sup>。但加味丹参饮化痰清热解毒之力略显不足,笔者在此基础上加入具有较好防治冠心病作用的中草药扶芳藤、青蒿及黄连,组成行气活血、化痰解毒的扶芳藤丹参合剂。实验结果表明,心肌缺血再灌注时,扶芳藤丹参合剂预处理可以很好地降低TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B含量,减少心肌梗死面积面积,提示扶芳藤丹参合剂预处理能够通过抑制炎症反应而减少心肌缺血再灌注损伤。

#### 参考文献

- [1] 臧益民,樊荣.加强多学科协作 争取心血管病研究取得新进展[J].心脏杂志,2006,18(5):483-488.
- [2] 魏伟,吴希美,李元建.药理实验方法学[M].4版.北京:人民卫生出版社,2010:1025,886,1698.
- [3] 张桂清,曾秋棠,曹林生,等.氯沙坦对兔实验性动脉粥样硬化血管内皮细胞的保护作用[J].中国药理学通报,2003,19(3):309-313.
- [4] 陈燕,夏豪,鲍翠玉,等.益赛普联合川芎嗪对大鼠心肌缺血再灌注后肿瘤坏死因子- $\alpha$ 表达的影响[J].时珍国医国药,2012,23(3):771-774.
- [5] Lu L, Chen S S, Zhang J Q, et al. Activation of nuclear factor-kappaB and its proinflammatory mediator cascade in the infarcted rat heart[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 321(4): 879-885.
- [6] 王少英.清热解毒药物在治疗冠心病中的运用[J].北京中医,2004,23(1):14-15.
- [7] 丁书文,李晓.治疗冠心病的常法与变法[J].中医杂志,2004,45(6):464-466.
- [8] 黄政德,张玉生,葛金文.加味丹参饮对家兔动脉粥样硬化形成影响的研究[J].湖南中医学院学报,2002,22(4):4-6,20.
- [9] 黄政德,葛金文,张玉生.加味丹参饮对家兔缺血再灌注损伤心肌延迟保护作用的研究[J].湖南中医杂志,2003,19(6):52-53.
- [10] 王庆高,黄政德,肖健,等.加味丹参饮预处理对乳鼠缺氧/复氧心肌细胞的延迟保护作用及对PKC影响的实验研究[J].中西医结合心脑血管病,2007,5(10):953.

(编辑 陈明伟)

## 赧桐根水提物抗炎作用研究

陈俊,唐云丽,梁洁,秦祖杰,覃祖,潘盈利

(广西中医药大学,广西南宁 530001)

**摘要** [目的] 评价赧桐根水提物的抗炎作用。[方法] 建立二甲苯致小鼠耳肿胀、醋酸致小鼠腹腔毛细血管通透性增加及小鼠棉球肉芽肿等急性炎症模型,评价赧桐根水提物对急、慢性炎症的抗炎作用。[结果] 在小鼠耳肿胀实验中,赧桐根水提取物中、高剂量组(20,40 g/kg)与模型组比较有显著性差异( $P < 0.05$ ),耳肿胀抑制率分别为51.0%、55.1%;在醋酸所致小鼠腹腔毛细血管通透性实验中,赧桐根水提取物中、高剂量组(20,40 g/kg)与模型组比较有明显降低腹腔毛细血管通透性的作用( $P < 0.05$ );赧桐根水提物各剂量组小鼠棉球肉芽肿质量显著低于模型组( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。[结论] 赧桐根水提物对急性慢性炎症均有明显的抗炎作用。

**关键词** 赧桐;水提物;抗炎;实验研究

中图分类号 R285.5 文献标识码 A 文章编号 2095-4441(2013)02-0011-03

赧桐来源于马鞭草科大青属植物赧桐 *Clerodendrum japonicum* (Thunb.) Sweet., 又名红龙船、荷包花、抽须红、木通莲、珍珠梧桐<sup>[1]</sup>、“个朋被”(广西壮族语)<sup>[2]</sup>。全株均可入药,其花可安神、止血,主治心悸失眠、痔疮出血,叶具有祛风散瘀、解毒消肿等功效,主治偏头痛、跌打瘀肿、痈疮疔毒,根、茎

可清肺热、利小便、凉血止血,临床用于肺热咳嗽、热淋、小便不利、咳血、尿血、痔疮出血、风湿骨痛的治疗<sup>[1]</sup>。目前国内外对赧桐根化学成分的研究暂处于基础研究阶段,本实验首次探讨了赧桐根水提物的抗炎作用,以明确其抗炎活性,为以后的研究和开发利用提供依据。

收稿日期 2013-05-25

基金项目 广西自然科学基金项目(2010GXNSFA013196);广西中医药管理局中医药科技专项课题(GZKZ09-12)

作者简介 陈俊,讲师,在读博士生,研究方向:从事中药药理学研究

通讯作者 秦祖杰