

山核桃叶总黄酮对小鼠抗心肌缺血及心肌细胞 缺氧损伤保护作用研究*

慈海登, 杨 仙, 朱学鑫, 邢丽婉, 黄燕芬, 蒋福升, 金 波, 丁志山[△]

(浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053)

摘要: **目的** 探究山核桃叶总黄酮对小鼠心肌缺血及心肌细胞(H9c2)缺氧损伤的保护作用及机制。**方法** 1. 建立皮下注射盐酸异丙肾上腺素造成小鼠急性心肌缺血模型, 心脏切片 HE 染色, 并测定小鼠血清中肌酸激酶(CK)、乳酸脱氢酶(LDH)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)含量。2. 建立心肌细胞过氧化氢缺氧损伤模型, 观察细胞形态, 测定细胞存活率并检测细胞培养液中 CK、SOD、MDA 含量。**结果** 与模型组相比, 山核桃叶总黄酮高中低剂量组的心肌组织完整, 炎症因子较少, 血清中 CK、LDH、MDA 的活性显著降低, SOD 活性显著升高; 山核桃叶总黄酮各剂量组均能显著提高过氧化氢损伤心肌细胞的存活率, 抑制 LDH 的释放, 减少 MDA 的生成, 提高 SOD 活性。

结论 山核桃叶总黄酮对小鼠心肌缺血及心肌细胞缺氧损伤具有保护作用。

关键词: 山核桃叶; 总黄酮; 心肌缺血; 缺氧损伤; 心肌酶; 乳酸脱氢酶; 超氧化物歧化酶; 丙二醛; H9c2

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2015)04-0001-05

心血管疾病在许多国家成为致死率最高的疾病之一, 而冠心病是其中最主要的一种心脏病。治疗冠心病的措施一般可对心脏造成一定的心肌缺血再灌注损伤。心肌缺血时有大量自由基生成, 使心肌细胞膜中不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应, 会加重心肌缺血, 增加心肌细胞的凋亡和心肌组织的坏死, 引起心脏供氧减少, 心肌能量代谢不正常, 从而引发一系列心脏疾病, 如心绞痛、心肌梗死、冠状动脉性猝死等^[1-4]。

山核桃(*Carya Cathayensis Sarg.*)是胡桃科山核桃属的一种落叶乔木, 其果实具有极高的营养和保健价值, 外果皮具有抑菌消炎的作用, 叶片中富含黄酮类化合物^[5], 具有多种生物学活性, 如抗氧化和清除自由基、抗肿瘤、保护心血管、抑菌等^[6-11]。本文通过建立小鼠心肌缺血模型和心肌细胞缺氧损伤模型, 探究山核桃叶总黄酮对心肌缺血和心肌细胞缺氧损伤的保护作用及机制。

1 材料

1.1 药物

山核桃叶于 2012 年夏采自浙江临安市昌化镇, 经浙江中医药大学丁志山教授鉴定为山核桃(*Carya Cathayensis Sarg.*)树叶, 聚酰胺(80~100 目, 浙江省台州市路桥四甲生化塑料厂, 批号: 201204276), 盐酸异丙肾上腺素(东京仁成工业株式会社), SOD、MDA、CK、LDH 试剂盒(南京建成生物工程研究所), 醇溶性伊红 Y(上海三爱思试剂有限公司, 批号: 20070607), 进口血清(美国 GIBCO-BRL 公司), 细胞培养液(DMEM 高糖 美国 GIBCO-BRL 公司), 胎牛血清(杭州四季青生物工程材料研究所), 胰蛋白酶(吉诺生物制药技术有限公司)。

1.2 动物及细胞

KM 小鼠, 雌雄各半, 体质量 18~22g, 购于上海莱克实验动物有限责任公司, 生产许可证号: SCXK(沪)2012-0002。H9c2 细胞, 购于中国科学院上海细胞库。

1.3 仪器

旋蒸仪(上海申顺生物科技有限公司), 万分之一精密电子天平(AR2130 Ohaus-Corp. Pine Brook,

* 基金项目: 国家自然科学基金(81303258); 浙江省医药卫生科技计划项目(Y201233485); 中国博士后科学基金(2014M550335)

收稿日期: 2015-06-02

作者简介: 慈海登(1986-), 男, 河北阜城人, 在读硕士研究生, 研究方向: 中医药抗感染与免疫调节作用的研究。

△通信作者: 丁志山, E-mail: zjtcmdzs@163.com

NJ, USA), 恒温干燥箱(DGG-9070A 型, 上海森信实验仪器有限公司), KD-BM 生物组织石蜡包埋机(浙江金华科迪仪器设备有限公司), FINESSE 325 组织切片机(Thermo), 酶标仪(北京普朗新技术有限公司), 恒温水浴箱(上海森信实验仪器有限公司, DK-S24), 细胞培养箱(Thermo), 荧光倒置显微镜(Nikon Eclipse Ti)。

2 方法

2.1 山核桃叶总黄酮的制备

山核桃叶自然晾干后打粉, 称取 200g 干粉用 2 500mL 95% 乙醇提取 2 次, 过滤, 合并 2 次滤液, 加入聚酰胺 20 g, 双蒸水 400 mL, 40 °C 减压除去乙醇, 残余混悬液直接装柱, 自然沉降后 1 L 30% 乙醇洗脱, 然后 40% 乙醇洗脱, 收集 40% 乙醇洗脱液, 减压蒸干得山核桃叶总黄酮棕黄色固体^[12]。

2.2 山核桃叶总黄酮抗小鼠心肌缺血实验

2.2.1 山核桃叶总黄酮及异丙肾上腺素的配制

精确称量 1.0 g 山核桃叶总黄酮, 用 1% 的吐温 80 生理盐水溶液溶解, 分别调为两个浓度: 高浓度 20.0 mg·mL⁻¹, 低浓度 10.0 mg·mL⁻¹。普萘洛尔, 蒸馏水配制, 超声至完全溶解, 配为浓度 2.0 mg·mL⁻¹。称取适量盐酸异丙肾上腺素粉末, 蒸馏水配制浓度为 3 mg·mL⁻¹。

2.2.2 实验分组及急性心肌缺血模型的建立

KM 小鼠喂养 5d, 使其适应饲养环境, 随机选取 60 只, 雌雄各半。实验小鼠随机分为 5 组, 每组 12 只, 普萘洛尔组(给药量 20.0 mg·kg⁻¹)、模型组、正常对照组、山核桃叶黄酮高剂量组(200.0 mg·kg⁻¹)和低剂量组(100.0 mg·kg⁻¹)。实验小鼠连续灌胃 30d, 于第 29 天, 灌胃 6 h 后(正常对照组除外), 于小鼠后肢外侧皮肤注射盐酸异丙肾上腺素(3 mg·mL⁻¹), 第 30 天, 再次于小鼠后肢外侧皮下注射盐酸异丙肾上腺素, 按小鼠体重注射量为 30.0 mg·kg⁻¹。

2.2.3 切片制作及染色

①切片制作: 取各组小鼠, 解剖取心脏, 剪刀剪取心室壁面积最大处, 于蒸馏水中洗净。将组织依次置于 50% 乙醇, 70%, 80%, 95% I, 95% II 乙醇, 脱水后浸二甲苯无水乙醇混合液(1:1), 浸二甲苯 I, II, 石蜡 I, 石蜡 II 浸泡 60 min(60~65 °C), 石蜡包埋(65~70 °C), 包埋好切片, 40 °C 水浴中展片, 70 °C 烘烤 1 h。

②HE 染色: 烤片完成后放入二甲苯 I, II 分别

浸泡 15 min 后, 放入无水乙醇 I, II, 95%, 85%, 70%, 50% 乙醇进行复水, 用蒸馏水充分冲洗, 苏木精染细胞核, 蒸馏水冲洗多余染液; 浸 1% HCl 酒精分化, 蒸馏水洗涤, 伊红染细胞质, 蒸馏水冲洗, 将染色完成的切片分别在 70%, 80%, 90%, 95%, 无水乙醇 I, II 脱水, 然后放入二甲苯 I, II, 最后中性树胶封片。

2.2.4 血清 CK, LDH, SOD, MDA 测定

小鼠摘眼球取血后, 离心 3 500 r·min⁻¹, 15 min 获得血清样本, 分别按照 CK, LDH, SOD, MDA 试剂盒的说明书操作, 并分别在酶标仪 660, 450, 550, 532 nm 处测取吸光度。

2.3 山核桃叶总黄酮抗心肌细胞(H9c2)氧化应激损伤实验

2.3.1 H9c2 复苏及传代培养

将购买的 H9c2 接种于含 10% 胎牛血清、100 U·mL⁻¹ 青霉素和 100 U·mL⁻¹ 链霉素的 DMEM 高糖培养液中, 于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中常规培养, 1~2 d 传代 1 次。

2.3.2 探究不同浓度 H₂O₂ 作用不同时间对 H9c2 细胞存活率的影响

取对数期的心肌细胞(H9c2)于 96 孔板培养, 密度为 5×10⁴ 个·mL⁻¹, 培养 24 h, 弃去培养液, 改用无血清培养液继续培养 24h, 分别用 0.1~1.0 mmol·L⁻¹ 的 H₂O₂ 处理, 分为 H₂O₂ 处理组, 正常组, 培养 3 h, 6 h 后, 分别加入 MTs 作用 2 h, 于酶标仪 490 nm 处测得吸光度, 并计算细胞存活率。

2.3.3 探究山核桃叶总黄酮对 H9c2 氧化应激损伤的保护作用

实验细胞分为 6 组: ①正常对照组: 正常培养 ②过氧化氢组: 正常培养 24 h 后, 用 H₂O₂ 造成氧化应激损伤模型。③槲皮素: 预先给予槲皮素 24 h 后用 H₂O₂ 氧化应激损伤。④山核桃叶黄酮高, 中, 低剂量组: 预先给予高, 中, 低剂量的山核桃叶黄酮, 24 h 后 H₂O₂ 氧化应激损伤。

2.3.4 细胞培养液中 LDH, SOD, MDA 含量测定

收集各组细胞培养液, 按 LDH, SOD, MDA 试剂盒说明书操作, 于酶标仪 450, 550, 532 nm 处测定吸光度。

2.4 数据处理

所有数据以平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 用 SPSS17.0 统计软件, 进行 One-way ANOVA 分析, 组

间均数比较用 LSD 法, 设置 $P < 0.05$ 具有统计学意义。

3 结果与分析

3.1 山核桃叶总黄酮对急性心肌缺血小鼠血清中 LDH, CK, MDA, SOD 的影响

表 1 显示, 模型组与正常组比较存在极显著差异 ($P < 0.01$), 总黄酮高剂量组, 普萘洛尔组与模型组比较存在极显著差异, 总黄酮低剂量组与模型组比较存在极显著差异或显著差异, CK, LDH 存在于小

鼠心肌中, 只有当心肌缺血或受损时, 血液中的肌酸激酶和乳酸脱氢酶上升。结果显示, 给予总黄酮药物的小鼠血清中 CK 和 LDH 活性得到抑制。同时, 血清中的 SOD 活性增高, MDA 活性得到抑制。SOD 是机体重要的抗氧化酶, 可以清除自由基, MDA 是脂质过氧化反应的中间产物, 给药组小鼠血清中 SOD 升高, MDA 降低, 表明山核桃叶总黄酮保护心肌的作用与清除自由基和减少脂质代谢产物密切相关。

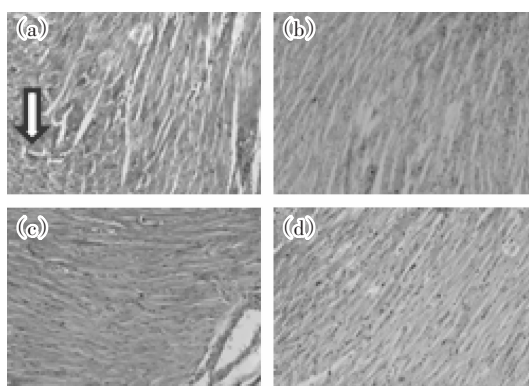
表 1 小鼠血清中 CK, LDH, SOD, MDA 含量

组别	浓度/(mg·mL ⁻¹)	CK/(U·L ⁻¹)	LDH/(U·L ⁻¹)	SOD/(U·mL ⁻¹)	MDA/(nmol·mL ⁻¹)
正常组	—	529.39±169.23**	739.25±49.43**	15.64±0.23**	13.90±3.24**
模型组	—	1390.15±150.37	974.45±30.85	10.49±0.56	27.17±4.72
普萘洛尔组	2	740.52±120.15 ^{##}	881.13±73.72 ^{##}	13.02±0.59 ^{##}	15.16±4.56 ^{##}
黄酮高剂量组	20	983.74±62.59 ^{##}	902.41±114.37	11.51±0.50 ^{##}	16.34±2.56 ^{##}
黄酮低剂量组	10	1275.65±131.42 [#]	912.08±42.74	11.43±0.24 ^{##}	19.02±2.47 ^{##}

注: 正常组与模型组比较, ** $P < 0.01$; 给药组与模型组比较, ^{##} $P < 0.01$, [#] $P < 0.05$

3.2 组织切片分析

从心脏切片 HE 染色结果可看出, 模型组 (图 a) 组织有明显的坏死组织, 充血带。以高剂量 (图 d) 组织最完整和正常, 证明造模是成功的。且山核桃叶总黄酮对心肌缺血的组织有一定保护作用, 与总黄酮的剂量呈正比关系。红色箭头指向的是坏死组织。如图 1 所示。



a. 模型组 (200×); b. 正常组 (200×);
c. 低剂量组 (200×); d. 高剂量组 (200×);

图 1 小鼠心脏组织切片

3.3 H₂O₂ 不同浓度和不同时间对 H9c2 存活率的影响

MTS 检测不同浓度 H₂O₂ 处理 3 h, 6 h 后 H9c2 细胞存活率。通过图 2 可以看出, 随着时间和浓度

的增加, 细胞存活率降低, 与正常组相比具有统计学意义。

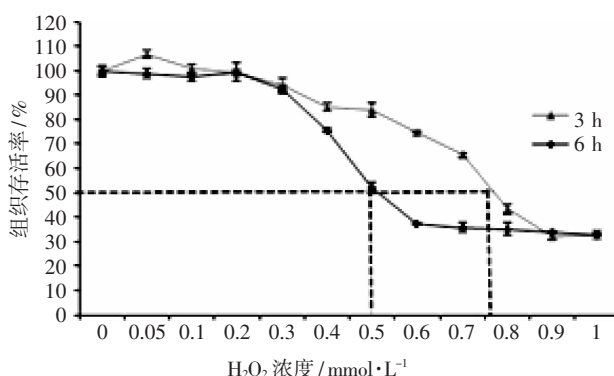
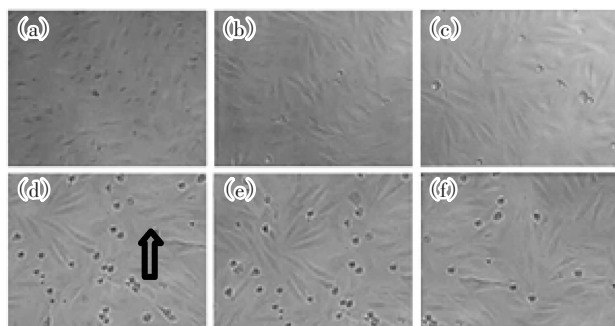


图 2 不同浓度 H₂O₂ 作用不同时间 H9c2 的存活率

3.4 山核桃叶总黄酮预处理对 H9c2 细胞形态的影响

正常对照组心肌细胞生长旺盛, 细胞结构清晰, 氧化应激模型组心肌细胞裂解, 细胞变圆, 皱缩。山核桃叶总黄酮高剂量 (10 μg·mL⁻¹), 中剂量 (5 μg·mL⁻¹), 低剂量 (2.5 μg·mL⁻¹) 组心肌细胞损伤明显低于氧化应激损伤组, 表现为心肌细胞虽有部分损伤, 但伪足尚存, 细胞尚未裂解。其中, 高剂量组的心肌细胞损伤程度最低, 与槲皮素预给药组相似。红色箭头指向的是皱缩的 H9c2 细胞, 如图 3 所示。



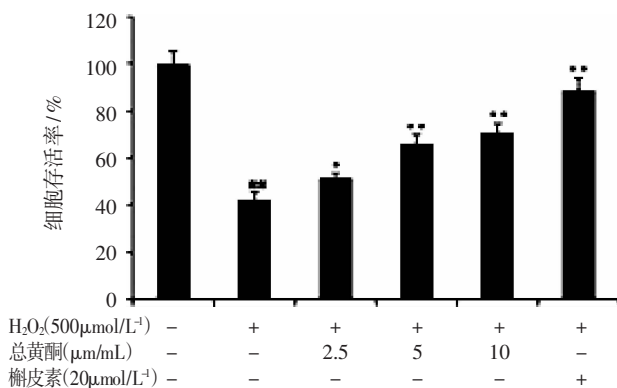
a. H_2O_2 组; b. 正常组; c. 槲皮素组;
d. 中剂量组; e. 低剂量组; f. 高剂量组;

图 3 心肌细胞形态学观察

3.5 山核桃叶总黄酮预处理对 H_2O_2 氧化应激损伤 H9c2 的保护作用

3.5.1 MTs 检测

各组 H9c2 细胞加入 MTs 后检测细胞存活率, 结果表明山核桃叶高浓度 ($10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 预处理心肌细胞对心肌细胞存活率无明显影响。在终浓度 $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 作用心肌细胞 6 h 后, 心肌细胞的存活率明显低于正常对照组 ($P < 0.01$), 而槲皮素预给药组和山核桃叶总黄酮高 ($10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 中 ($5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 剂量组的细胞存活率则明显高于模型组 ($P < 0.01$), 表明山核桃叶总黄酮高, 中剂量组和槲皮素作用相近, 可使 H_2O_2 氧化应激损伤导致的心肌细胞存活率降低。如图 4 所示。



注: 与正常组相比; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$

图 4 山核桃叶总黄酮预处理对 H9c2 存活率的影响

3.5.2 细胞培养液中 LDH, MDA, SOD 含量检测

与正常组相比, H_2O_2 组 LDH, MDA 的含量显著升高 ($P < 0.01$), SOD 含量显著降低 ($P < 0.01$); 而山核桃叶低, 中, 高剂量预处理的 H9c2 细胞培养液中, LDH, MDA 含量与 H_2O_2 组相比明显降低, 且有量效关系, SOD 含量与 H_2O_2 组相比明显升高, 且有量效

关系。如表 2 所示。

表 2 山核桃叶总黄酮预处理的 H9c2 细胞培养液中 LDH, SOD, MDA 含量

组别	LDH/(U·L ⁻¹)	SOD/(U·mL ⁻¹)	MDA/(nmol·mL ⁻¹)
正常组	252.95±30.12	5.50±1.70	0.73±0.09
H_2O_2 组	1483.38±73.12 ^{##}	4.25±1.55 ^{**}	1.35±0.25 ^{**}
槲皮素	588.79±39.22 ^{**}	5.48±2.16 ^{##}	0.88±0.15 ^{##}
总黄酮低	924.38±53.45 ^{**}	4.30±1.32	1.33±0.15
总黄酮中	888.89±24.35 ^{**}	4.94±0.85 ^{○##}	1.06±0.20 ^{○##}
总黄酮高	740.74±76.23 ^{○**△}	5.17±1.42 ^{○##△}	0.92±0.24 ^{○##}

注: 给药组与正常组比较, ** $P < 0.01$; 给药组与 H_2O_2 组比较, ^{##} $P < 0.05$; 总黄酮高中剂量与低剂量比较, [○] $P < 0.01$; 总黄酮高剂量与中剂量比较, [△] $P < 0.05$

4 讨论

本实验采用动物体内实验和体外细胞实验, 探究山核桃叶总黄酮对小鼠心肌缺血和心肌细胞缺氧损伤的保护作用机制。盐酸异丙肾上腺素致小鼠心肌缺血是常用的造成动物实验性心肌缺血缺氧损伤模型的方法, 观察山核桃叶总黄酮对小鼠心肌缺血缺氧损伤的保护作用。心肌缺血时会产生大量自由基, 自由基作用于生物大分子, 破坏细胞结构, 最终导致诸如动脉粥样硬化、缺血-再灌注损伤等心血管疾病。H9c2 细胞来源于胚胎期 BD1X 大鼠心脏组织的亚克隆细胞系, 由于来源于心脏, H9c2 细胞常用于心肌疾病的研究。氧化应激是体内氧化与抗氧化作用失衡, 导致中性粒细胞炎症浸润, 蛋白酶分泌增加, 产生大量自由基。其中应用最广泛的是过氧化氢氧化损伤模型, H_2O_2 极易透过细胞膜, 与细胞内铁离子通过 FENTON 反应形成高活性的自由基, 导致一系列反应, 其易于获得, 性质相对稳定 H_2O_2 易于获得, 常用于建立氧化应激模型^[13-14]。

综上所述, 山核桃叶总黄酮可以提高心肌细胞抗氧化能力, 对抗 H_2O_2 活性氧自由基对心肌细胞的损伤作用, 从而对抗心肌缺血损伤, 为山核桃叶的开发利用提供了新思路, 为临床上治疗缺血性心脏病提供了理论依据。

参考文献:

- [1] 许波华, 许立. 中药抗心肌缺血作用机制的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(15): 265-269.
- [2] 陈可冀, 刘玥. 稳定性冠心病: PCI 还是药物治疗的选择——一项新的 Meta 分析结果的启示 [J]. 中国中西医

- 结合杂志,2012,32(5):583-584.
- [3] 陈秋红,李钦,杨伟俊,等. 黄酮类化合物抗心肌缺血再灌注损伤的相关机制研究进展 [J]. 中国临床药理学杂志, 2013,29(12):958-960.
- [4] 纪冰,宋涛,徐晟伟,等. 荷叶黄酮对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 齐鲁医学杂志,2009,24(6):515.
- [5] 潘亚琴,李全清,张森尧,等. 山核桃叶与美国山核桃叶中化学成分初步分析[J]. 中华中医药学刊,2008,26(11): 2517-2519.
- [6] Pratheeshkumar P, Son YO, Budhreja A, et al. Luteolin inhibits human prostate tumor growth by suppressing vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated angiogenesis[J]. PloS one,2012,7(12):e52279.
- [7] Karthikeyan K, Bai BR, Devaraj SN. Cardioprotective effect of grape seed proanthocyanidins on isoproterenol-induced myocardial injury in rats [J]. International journal of cardiology,2007,115(3):326-333.
- [8] Schnorr O, Brossette T, Momma TY, et al. Cocoa flavanols lower vascular arginase activity in human endothelial cells in vitro and in erythrocytes in vivo[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics,2008,476(2):211-215.
- [9] Spoerlein C, Mahal K, Schmidt H, et al. Effects of chrysin, apigenin, genistein and their homoleptic copper(II) complexes on the growth and metastatic potential of cancer cells [J]. Journal of inorganic biochemistry,2013,127:107-115.
- [10] 汤容,樊瑞霞. 大豆异黄酮抗癌作用的研究进展[J]. 中国药理学杂志,1999,34(7):435-438.
- [11] 郭春梅,刘淑清,郭一萌,等. 黄酮类化合物清除羟自由基($\text{HO}\cdot$)功能及其构效研究[J]. 天然产物研究与开发, 2012(12):1724-1728.
- [12] 沈勇,刘楠楠,徐敏,等. 高效液相色谱法测定山核桃叶中5个黄酮苷元含量 [J]. 药物分析杂志,2013,33(5): 804.
- [13] 张斌,夏作理,赵晓民,等. 氧化应激模型的建立及其评价[J]. 中国临床康复,2006,10(44):112-114.
- [14] 顾玉梅,吴扬. 氧化应激在心肌肥厚中的作用及其机制 [J]. 南通大学学报:医学版,2005,25(3):233-234.

(编辑:杨阳)

The Mechanisms of the Total Flavonoid in Hickory Leaves on Anti-myocardial Ischemia in Mice and the Protective Study of Hypoxia Injury of Myocardial Cells

CI Haideng, YANG Xian, ZHU Xuexin, XING Liwan, HUANG Yanfen,
JIANG Fusheng, JIN Bo, DING Zhishan[△]
(Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT: **Objective** To investigate the mechanisms of total Flavonoid in Hickory Leaves on anti-myocardial ischemia in mice and the protective study of hypoxia injury of myocardial cells (H9c2). **Methods** 1. Establish the model in mice. subcutaneous injection of hydrochloric acid isopropyl adrenaline cause acute myocardial ischemia; hearts slicing; HE staining; and determine contents of the Creatine Kinase(CK)、lactate dehydrogenase(LDH)、Superoxide Dismutase(SOD)、Malondialdehyde(MDA) in mice serums. 2. Establish the model of hypoxia injury of myocardial cells injury by H_2O_2 ; observe cells morphology; determine cells survival rate and contents of the Creatine Kinase(CK)、Superoxide Dismutase(SOD)、Malondialdehyde(MDA) in the cells culture medium. **Results** Compared with the model group, total flavonoid could decrease inflammatory cytokines in the myocardial tissue, could effectively decrease serums LDH、MDA and CK enzymic activity, increase the level of SOD. The total flavonoid could significantly increased the viability of myocardial cells, inhibited the release of LDH, decreased the content of MDA, increased SOD activity. **Conclusion** The total flavonoid in hickory Leaves has protective effects on myocardial ischemia in mice and hypoxia injury of myocardial cells.

KEY WORDS: hickory Leaves; total flavonoid; myocardial ischemia; hypoxia injury; CK; LDH; SOD; MDA; H9c2