

# 高乌头生物碱高乌甲素对大鼠心肌缺血 / 再灌注损伤的保护作用研究

高雅淇<sup>1</sup> 谢红<sup>1</sup> 陈玲<sup>2</sup>

(1.苏州大学附属第二医院麻醉科,江苏苏州 215004; 2.上海长海医院,上海 200433)

**摘要** 目的:研究高乌甲素注射液预处理和后处理对大鼠在体心肌缺血/再灌注损伤的保护作用。方法:随机将48只雄性SD大鼠分为假手术组、模型组、高乌甲素预处理组和高乌甲素后处理组。除假手术组外其余各组大鼠采用可逆性冠脉左前降支结扎的方法复制心肌缺血/再灌注模型,给予大鼠心脏缺血30min再灌注120min;假手术组不缺血维持生命体征2h。高乌甲素预处理组于心肌缺血开始前15min静脉注射高乌甲素注射液(4mg/kg),高乌甲素后处理组于心肌缺血开始后10min静脉注射高乌甲素注射液(4mg/kg)。实验结束后用氯化三苯四氮唑染色法(TPT)测定心肌梗死范围,并测定血清中一氧化氮(NO)、丙二醛(MDA)的含量和超氧化物歧化酶(SOD)的活性。结果:模型组大鼠心肌出现缺血、梗死区,血清NO含量、SOD活性明显低于假手术组( $P<0.01$ ),MDA含量明显高于假手术组( $P<0.01$ ),说明造模成功。与模型组比较,高乌甲素预处理组和后处理组大鼠心肌梗死范围显著减少( $P<0.05$ ),NO含量、SOD活性显著增加( $P<0.01$ ),MDA含量显著降低( $P<0.05$ )。结论:高乌甲素预处理和后处理可以减小心肌缺血/再灌注大鼠心肌梗死范围,其可能通过抗氧化机制对缺血再灌注心肌发挥保护作用。

**关键词** 高乌甲素 缺血再灌注损伤 心肌缺血 一氧化氮 丙二醛 超氧化物歧化酶 SD大鼠 实验研究  
中图分类号 R282.710.5 文献标志码 A 文章编号 1672-397X(2015)06-0079-03

高乌头是毛茛科植物高乌头(*Aconitum sinomontanum* Nakai)的干燥根,是甘肃、青海、陕西太白地区、山西、湖北神农架地区、贵州、四川等地

的民间草药,味辛、苦、温,有毒,具有祛风除湿、理气止痛、活血散瘀的功效,主要用于治疗风湿腰腿痛、胃痛、心悸、跌打损伤等。高乌头主要成分为高

离子可以明显抑制SOD的活性,会使细胞受到脂质过氧化反应的损害。SOD活力的高低间接反映了机体清除氧自由基的能力,而MDA的高低又间接反映了机体细胞受自由基攻击的严重程度,故通过SOD活性、MDA含量的测定,可间接反映自由基的产生情况及脂质过氧化的程度,从而判断眼组织的破坏程度<sup>[1]</sup>。本实验结果显示,在实验性玻璃体积血时,视网膜组织中SOD活性显著降低,MDA含量显著增加,证实了玻璃体积血对视网膜有毒性作用。而中药清亮饮及西药安妥碘均能提高SOD活性,降低MDA含量,且中药清亮饮治疗组改善作用更为明显。表明中药清亮饮可以减少玻璃体积血过程中自由基的生成,阻断自由连锁反应,抑制脂质过氧化反应的程度,减轻眼组织的损伤,且其作用优于安妥碘,这也为临床应用清亮饮治疗玻璃体积血提供了科学依据。下一步我们将对清亮饮抑制PVR(增殖性玻璃体视网膜病变)的作用机理进行研究。

## 参考文献

[1] 施新猷.医用实验动物学.西安:陕西科学技术出版社,1989:417

- [2] Forrester J V, Edger W, Millar W, et al. Enhancement of vitreous clot lysis by urokinase: mode of action. *Exp Eye Res*, 1982, 34: 895
- [3] 陈可冀, 张之南. 血瘀证与活血化瘀研究. 上海: 上海科学技术出版社, 1990: 12, 114
- [4] 王浩, 薄加春, 朱宁云. 治疗糖尿病视网膜病变玻璃体积血经验. *辽宁中医药大学学报*, 2007, 9(6): 95
- [5] 陈本懋. 自由基和过氧化脂质与医学的关系. *河南医科大学学报*, 1987, 22(3): 319
- [6] 曹锡清. 脂质过氧化对细胞与机体的作用. *生物化学与生物物理进展*, 1986(2): 17
- [7] 李凤鸣. 眼科全书. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 2407
- [8] 田清芬, 郭希让, 尹卫靖. 视网膜脱离PVR形成与脂质过氧化关系的实验研究. *眼科研究*, 1999, 17(3): 60
- [9] 吴先诚, 杨以嘉, 杨为中. 超氧化物歧化酶与眼病. *国外医学·眼科学分册*, 1990, 14(3): 139
- 第一作者: 回世洋(1975—), 男, 医学硕士, 副教授, 副主任医师, 研究方向: 中医药治疗眼科疾病。hsy-750318@163.com

收稿日期: 2015-04-24

编辑: 吴宁

乌甲素等二萜生物碱,高乌甲素又名拉巴乌头碱(lappaconitine),临床常用其氢溴酸盐,具有强镇痛作用,还具有抗炎消肿、抗氧化、降温解热、抗心律失常、局部麻醉和免疫调节等作用<sup>[1-3]</sup>。还有研究报告高乌甲素可减轻颅脑创伤(TBI)大鼠的神经功能障碍和脑水肿程度,降低血清白细胞介素-1(IL-1)、白细胞介素-2(IL-2)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )浓度,从而发挥对TBI大鼠的脑保护作用<sup>[4]</sup>,但高乌甲素是否具有活血散瘀功能国内尚未有研究报道。本实验基于在体大鼠心肌缺血再灌注模型,研究高乌甲素预处理及后处理对心肌缺血性损伤的保护作用,并初步探讨其作用机理。

## 1 实验材料

1.1 动物 清洁级雄性SD大鼠,体重(200±20)g,由浙江省实验动物中心提供,许可证号:SCXK(浙)2008-0033。

1.2 试剂与仪器 高乌甲素(采用氢溴酸高乌甲素注射液,批准文号:国药准字H20023150);甲醛(西陇化工股份有限公司,批号:140218);动物呼吸机(ALC-V9,上海奥尔科特生物科技有限公司);智能恒温控制仪(JR-1,成都泰盟科技有限公司);V24E多通道生理记录仪(Philips公司,德国);Anke LXJ-IIB离心机(上海安亭科学仪器厂);电子分析天平(BT125D,sartorius,德国)。

## 2 实验方法

2.1 分组、造模与给药 48只雄性SD大鼠随机分为假手术组、模型组、高乌甲素预处理组、高乌甲素后处理组,每组12只。大鼠采用腹腔注射戊巴比妥钠(50mg/kg)进行麻醉,于右侧颈内静脉和颈内动脉置入充满肝素的导管,供补充液体、给药或监测动脉血压之用。气管切开后插入气管导管,连接动物呼吸机,行呼气末正压通气,吸入氧浓度30%,调节呼吸频率或潮气量,维持pH值7.35~7.45、PaCO<sub>2</sub>25~40mmHg(1kPa=7.5mmHg)、PaO<sub>2</sub>90~150mmHg,采用智能恒温控制仪维持大鼠体温在36~37℃。于第5肋间行左胸切开术,打开心包,采用6-0无损伤缝合线在左心耳下缘缝扎左冠状动脉前降支(LAD),缝线末端穿入自制圈套管,止血钳夹紧圈套管以阻断LAD血供,建立在体大鼠心肌缺血再灌注损伤模型<sup>[5]</sup>,当心外膜发绀苍白,心电图示一过性心律失常、ST段弓背向上抬高表示缺血模型成功,松开圈套管进行再灌注,可见心外膜重新充血。假手术组只穿线不结扎,高乌甲素预处理

理组于心肌缺血开始前15min经尾静脉注入高乌甲素注射液4mg/kg,高乌甲素后处理组于心肌缺血开始后10min经尾静脉注入高乌甲素注射液4mg/kg。

## 2.2 指标检测

2.2.1 血清中超氧化物歧化酶(SOD)活力和一氧化氮(NO)、丙二醛(MDA)含量的测定 各组大鼠于再灌注末,采用颈总动脉插管取血5mL,室温或37℃恒温静置一段时间后,3000r/min离心10min得血清进行分装,-80℃贮存备用。血清中的NO含量采用硝酸还原酶法测定,操作步骤严格按照说明书进行;SOD采用化学比色法测定,测定波长为550nm;MDA采用硫代巴比妥酸盐法测定。

2.2.2 心肌梗死范围的测定 采用氯化硝基四氮唑(TPT)染色法<sup>[6]</sup>。心肌缺血再灌注结束后,再次阻断LAD,从颈内静脉注射5%伊文思蓝使左心室(LV)正常区域蓝染,并迅速取出心脏,分离出LV,并横断分割成5~6块2mm厚的组织。将LV中蓝染的正常组织与未染色的LV缺血区分离,并都放入0.5%TPT中,37℃水浴15min,10%甲醛过夜以固定组织。在解剖显微镜下将LV分成正常、缺血未梗死区和缺血梗死区三部分,并分别称重,计算缺血区心肌重量(缺血未梗死区心肌重量+梗死区心肌重量)占LV心肌重量的百分比,缺血区心肌重量占危险区心肌重量的百分比以及梗死区心肌重量占LV心肌重量的百分比。

2.3 统计学方法 采用SAS 8.2统计软件进行统计处理。计量资料以( $\bar{x}\pm s$ )表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 为有统计学差异。

## 3 实验结果

3.1 心肌梗死范围测定结果 各实验组左心室重无明显差异。与模型组比较,高乌甲素预处理组和高乌甲素后处理组的梗死区重、梗死区/左心室、梗死区/缺血区均显著降低( $P<0.05$ ),说明高乌甲素预处理和高乌甲素后处理对心肌缺血再灌注损伤有保护作用。见表1。

3.2 各组大鼠血清NO、SOD和MDA含量测定结果 与假手术组比较,模型组大鼠血清NO含量和SOD活性明显下降( $P<0.01$ ),MDA含量显著升高

表1 各组大鼠心肌梗死范围比较( $\bar{x}\pm s$ )

组别	动物数(只)	左心室重(g)	缺血区重(g)	梗死区重(g)	缺血区/左心室(%)	梗死区/左心室(%)	梗死区/缺血区(%)
假手术组	12	0.5831±0.0102	—	—	—	—	—
模型组	12	0.5921±0.0204	0.2045±0.0192	0.1228±0.0174	36.28±2.56	19.22±2.61	50.77±6.05
高乌甲素预处理组	12	0.5590±0.0701	0.1886±0.0276	0.0665±0.021 <sup>*</sup>	33.96±2.22	11.42±1.65 <sup>*</sup>	33.55±5.67 <sup>*</sup>
高乌甲素后处理组	12	0.6000±0.0446	0.1789±0.0495	0.0678±0.033 <sup>*</sup>	32.56±2.12	11.22±1.35 <sup>*</sup>	33.25±5.34 <sup>*</sup>

注:与模型组比较,\* $P<0.05$ 。

( $P<0.05$ ),提示造模成功。与模型组比较,高乌甲素预处理组和高乌甲素后处理组大鼠血清NO含量和SOD活性明显升高( $P<0.01$ ),MDA含量显著降低( $P<0.05$ )。见表2。

#### 4 讨论

缺血性心血管疾病是危害人类健康及生命的一类疾病,且具有发病率高和致死率高等特点,其致命后果就是由冠状动脉急性闭塞所致的急性心肌梗死及/或心脏性猝死,所以尽早恢复血流是减轻损伤的关键。经皮冠状动脉成形术(percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA)、冠状动脉内溶栓(thrombolysis)和冠脉搭桥手术等治疗手段的出台可以有效改善缺血,达到治疗目的。然而随之出现的心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia reperfusion injury, MIRI)不仅不能使组织、器官功能恢复,反而引起心肌进一步功能障碍或者心肌细胞死亡,例如氧自由基堆积、细胞内钙超载、细胞凋亡等,已然成为心脏血管外科手术取效的主要障碍<sup>[7-8]</sup>。

一氧化氮(NO,即血管内皮舒张因子),在生物体内作为一种反应性极强的自由基,兼有第二信使和神经递质的作用,同时又是一种效应分子,在体内具有广泛的生理作用,如松弛血管平滑肌。超氧化物歧化酶(SOD)对机体的氧化与抗氧化平衡起着至关重要的作用,此酶能清除超氧阴离子自由基( $O_2^{\cdot-}$ )保护细胞免受损伤。机体通过酶系统与非酶系统产生氧自由基,后者能攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid, PUFA),引发脂质过氧化作用,并因此形成脂质过氧化物,如醛基(丙二醛),测试MDA的量常常可反映机体内脂质过氧化的程度,间接地反映出细胞损伤的程度<sup>[9-10]</sup>。

有研究表明高乌甲素以及其他几种从乌头地上部分分离得到的二萜类生物碱具有抗氧化、抗炎和抗酪氨酸酶活性的作用<sup>[11]</sup>,另外高乌甲素还可能通过阻滞电位依赖性的钠离子通道从而降低心肌的收缩力,提高心肌兴奋阈,导致心动过缓<sup>[12]</sup>,从而通过减少心肌氧耗发挥心肌细胞保护作用。本研究结果表明,与模型组比较,高乌甲素预处理及后处理组血清中NO含量、SOD活性显著提高,MDA含量显著下降,心肌梗死范围明显降低,由此可以推测高乌甲素可能通过抗氧化机制对缺血再灌注心肌发挥保护作用。因此,高乌甲素注射液预处理及后处理对心肌缺血再灌注损伤具有保护作用,可作为治疗缺血性心血管疾病的候选药物开展进一步研究。

表2 各组大鼠缺血再灌注后血清NO、SOD和MDA含量比较( $\bar{x}\pm s$ )

组别	动物数(只)	NO( $\mu\text{mol/L}$ )	SOD(U/mL)	MDA( $\mu\text{mol/L}$ )
假手术组	12	58.52±9.65	183.04±4.52	2.30±0.58
模型组	12	25.38±2.14 <sup>###</sup>	144.13±10.03 <sup>###</sup>	5.03±1.02 <sup>###</sup>
高乌甲素预处理组	12	45.67±4.13 <sup>**</sup>	163.29±9.32 <sup>**</sup>	3.21±0.68 <sup>*</sup>
高乌甲素后处理组	12	44.69±3.87 <sup>**</sup>	170.81±9.51 <sup>**</sup>	3.41±0.59 <sup>*</sup>

注:与假手术组比较,### $P<0.01$ ;与模型组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ 。

#### 参考文献

- [1] Fujita Y. Aconite poisoning. Chudoku Kenkyu, 2013, 26(2): 102
- [2] Ahmad M, Ahmad W, Ahmad M, et al. Norditerpenoid alkaloids from the roots of Aconitum heterophyllum wall with antibacterial activity. J Enzyme Inhib Med Chem, 2008, 23(6): 1018
- [3] Shaheen F, Ahmad M, Khan MT, et al. Alkaloids of aconitum leave and their anti-inflammatory antioxidant and tyrosinase inhibition activities. Phytochemistry, 2005, 66(8): 935
- [4] 欧珊, 林露, 李军. 高乌甲素对脑外伤大鼠IL-1、IL-2、TNF- $\alpha$ 水平的影响. 中华创伤杂志, 2012, 28(5): 456
- [5] Wang C, Weihrauch D, Schwabe DA, et al. Extracellular signal-regulated kinases trigger isoflurane preconditioning concomitant with upregulation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and vascular endothelial growth factor expression in rats. Anesth Analg, 2006, 103: 281
- [6] 唐庆年, 莫桂花. 高乌甲素的药理作用及临床应用进展. 山东医药, 2007(25): 1167
- [7] Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. Circulation, 1986, 74: 1124
- [8] 吕晶晶, 王振兴. 中医防治心肌缺血再灌注损伤的研究进展. 江苏中医药, 2012, 44(5): 77
- [9] 高敏, 徐祖浩, 林木灿. 中医综合疗法对急性缺血性中患者血清SICAM-1、SOD及NO的影响. 江苏中医药, 2013, 45(12): 19
- [10] 尹翠翠, 简建军, 杨勇, 等. 四逆汤对急性缺血性心肌梗死模型大鼠SOD和MDA的动态药效及各指标间相关性研究. 江苏中医药, 2014, 46(2): 75
- [11] 王晓岚, 张蕴慧, 周次清. 心痛宁对大鼠缺血心肌细胞游离钙浓度的影响. 江苏中医药, 2002, 23(7): 44
- [12] Tolstikova TG, Bryzgalov AO, Sorokina IV, et al. Formation of salts with hydrobromic acid determines the antiarrhythmic effect of lappaconitine derivatives. Dokl Biol Sci, 2007, 415(3): 265

第一作者: 高雅淇(1985—), 女, 硕士研究生, 住院医师, 研究方向: 麻醉药物对心肌的保护作用。

通讯作者: 谢红, 博士, 主任医师, 硕士研究生导师。924831060@qq.com

收稿日期: 2015-03-30

编辑: 吴宁