[文章编号]　1000 - 4718(2008)12 - 2328 - 05

菊米提取液对抗心肌缺血再灌注损伤*

叶挺梅[1,2]，　陈文良[1]，　朱　立[1]，　陈莹莹[1]，　沈岳良[1△]

([1] 浙江大学医学院生理学教研室，浙江 杭州 310058；[2]丽水学院化学与生命科学院生物系，浙江 丽水 323000)

[摘　要]　**目的**：研究菊米提取液的抗心肌缺血作用及其机制。**方法**：采用离体大鼠心脏 Langendorff 灌流模型，观察心脏收缩功能和心肌梗死面积。**结果**：(1)菊米提取液(0.5、1.0、2.0 g/L)灌流心脏后，左室发展压(left ventricular developed pressure，LVDP)、最大左室收缩/舒张速率(maximal rate of increase/decline in left ventricular pressure，$\pm dp/dt_{max}$)和冠脉流量增高。(2)菊米提取液可浓度依赖性增加心肌组织一氧化氮合酶(nitric oxide synthase，NOS)活性和一氧化氮(nitric oxide，NO)含量。(3)在缺血前(预处理)或再灌注早期给予 0.5 g/L 菊米提取液，均可减轻缺血再灌注引起的收缩功能下降，并可缩小心肌梗死面积。预先给予 L - NAME，可取消菊米对抗心肌缺血再灌注损伤。**结论**：菊米提取液具有强心作用。菊米提取液能对抗心肌缺血再灌注损伤，其机制可能依赖于 NO 途径。

[关键词]　野菊花；心肌再灌注损伤；一氧化氮合酶

[中图分类号]　R363　　[文献标识码]　A

Protective effect of Jumi extraction on hearts of ischemia - reperfusion injury in rat

YE Ting - mei[1,2], CHEN Wen - liang[1], ZHU Li[1], CHEN Ying - ying[1], SHEN Yue - liang[1]

([1]*Department of Physiology, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou* 310058, *China*; [2]*Department of Biology, College of Chemistry and Life Sciences, Lishui College, Lishui* 323000, *China. E - mail: shenyl@ hzcnc. com*)

[**ABSTRACT**]　**AIM**: To examine the effect of Jumi (JM) extraction on the contraction of hearts and its cardiac protection against ischemia - reperfusion injury. **METHODS**: Cardiac contractility and infarct area were analyzed by the Langendorff method in isolated rat hearts. **RESULTS**: (1) After perfusion with JM extraction (0.5, 1.0, 2.0 g/L), LVDP, $\pm dp/dt_{max}$ and coronary flow were enhanced. (2) JM extraction increased myocardium nitric oxide synthase (NOS) activity and nitric oxide (NO) content in a concentration - dependent manner. (3) Preconditioning or postconditioning of the heart with JM extraction (0.5 g/L), both provided cardioprotection as evidence by improving postischemic ventricular functional recovery and reduced myocardial infarct size. Preperfusion of the hearts with L - NAME (a NOS inhibitor) abolished the cardioprotection induced by JM extraction preconditioning or postconditioning. **CONCLUSION**: The results demonstrate that JM extraction has positive effect in isolated rat hearts, and it can protect rat heart against ischemia - reperfusion injury through a NO - dependent pathway.

[**KEY WORDS**]　Flos chrysanthemi indici; Myocardial reperfusion injury; Nitric oxide synthase

野菊花(Flos Chrysanthemi Indici)是菊科植物野菊 Chrysanthemum indicum L. 的干燥头状花序，被作为一种常见中药收载于中国药典中。据报道其提取液具有抗病原体作用，可增强毛细血管抵抗力，有抗炎作用[1]。研究发现野菊花还具有一定的体内外抗氧化作用[2]。

菊米，据《增广本草纲目》记载，为处州一种山中野菊，土人采其蕾(蕊)干之，如半粒绿豆大，甚香且清圆黄亮。目前被广泛用于保健茶饮。经研究发现菊米富含挥发油、蛋白质、菊米内脂、野菊花素、黄酮等。其成分和野菊花类似。民间一般认为冲饮不仅可解渴生津，又能发挥其独特的药理作用：增强各种免疫力，具有清火明目、消热解暑、抗菌消炎平肝、降血压等多种功效。因此开发菊米为主料或辅料的饮品具有广泛的市场前景。但目前对菊米的科学研究报道甚少。故本文将研究菊米的抗心肌缺血作用。

[收稿日期] 2007 - 09 - 14　　[修回日期] 2008 - 04 - 05

*[基金项目]浙江省科技厅基金资助项目(No. 2004C33104)

△通讯作者 Tel: 0571 - 88208250; E - mail: shenyl@ hzcnc. com

材 料 和 方 法

1 动物和试剂

雄性 Sprague - Dawley(SD)大鼠(220 - 270 g)清洁级,购于浙江大学医学院实验动物中心。菊米提取液(Juimi,JM):干原药 200 g 水煎后加石灰乳沉淀,滤液加 HCl 静止过夜,抽干得粗品,取粗品重悬于蒸馏水中,煮沸后抽滤至干,得精品,临用时加入改良 Krebs - Henseleit(K - H)液溶解。K - H 液成分如下(mmol/L):NaCl 118.0,KCl 4.7,K_2HPO_4 1.2,$MgSO_4$ 1.2,$NaHCO_3$ 25.0,$CaCl_2$ 1.25,葡萄糖 10.0,pH 7.4。Nω - Nitro - L - arginine methyl ester(L - NAME)和氯化三苯基四氮唑(2,3,5 - triphenyltetrazolium chloride,TTC)为 Sigma 产品。一氧化氮(nitric oxide,NO)和一氧化氮合酶(nitric oxide synthase,NOS)试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

2 方法

2.1 *离体心脏 Langendorff 灌流模型* 雄性 SD 大鼠,用木锤击昏后,迅速取出心脏,置于 4 ℃ KH 液中除去血液;然后迅速转移、固定于 Langendorff 灌流装置,以 K - H 液(95% O_2 + 5% CO_2 饱和)行常规恒压灌流(76 mmHg),维持灌流液温度 37 ℃。采用左心室内水囊传递压力测定心室内压,通过 MedLab 生物信号采集处理系统(南京美易科技公司)记录左室收缩曲线,并计算左室舒张末压(left ventricular end diastolic pressure,LVEDP)、左室发展压(left ventricular developed pressure,LVDP)、最大左室收缩速率(maximal rate of increase in left ventricular pressure,$+dp/dt_{max}$)、最大左室舒张速率(maximal rate of decline in left ventricular pressure,$-dp/dt_{max}$)和心率(heart rate,HR)。各组行不同处理前先用 K - H 液稳定灌流 20 min。

2.2 *心脏缺血/再灌注模型和梗死面积测定* 以结扎冠脉的左前降支 30 min 作为缺血(ischemia,IS),以松开结扣 120 min 作为再灌注。在灌流结束后,在左前降支结扎处重新结扎,从主动脉逆行推注 1% 伊文斯蓝,使非缺氧区染成兰色,心脏冰冻后,自心尖向心底平行于房室沟方向将左室切成相等厚度的 6 片,将切片放在 1% TTC 溶液(TTC 溶于 pH7.8 的 $NaHPO_4/NaH_2PO_4$ 缓冲液)中孵育 15 min 后,在切面上看见红色的非梗死区和灰白色的梗死区。将切片扫描后,用 ImageJ 图像分析软件计算梗死面积,以梗死区心肌面积占危险区面积(红色 + 灰白色)的百分比表示。

2.3 *心肌组织 NO 含量和 NOS 活性的测定* 各组大鼠心脏灌流结束后,用滤纸吸干并称重,加入生理盐水,用匀浆器制备成 10% 的匀浆液,按试剂盒说明书测定心肌组织中 NO 含量,以及诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase,iNOS)和内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase,eNOS)的活性。

3 实验分组

3.1 *菊米对心脏收缩功能的影响* A1 组(JM):不同浓度菊米提取液(0、0.5、1.0、2.0 g/L)灌流 15 min,再用 K - H 液灌流 15 min。A2 组(L - NAME):L - NAME(30 μmol/L)灌流 10 min 后,2.0 g/L 菊米提取物灌流 15 min,再用 K - H 液灌流 15 min。

3.2 *菊米对缺血心脏收缩功能的影响* 各组按以下不同处理后,行缺血再灌注。B1 组(IS):K - H 液灌流 40 min。B2 组(pre - JM):K - H 液灌流 10 min 后,用 0.5 g/L 菊米提取物灌流 15 min,再用 K - H 液灌流 15 min。B3 组(post - JM):K - H 液灌流 40 min 后,行缺血再灌注(并在再灌注的第 1 个 15 min 用 0.5 g/L 菊米提取物灌流)。B4 组(L - NAME + pre - JM):L - NAME(30 μmol/L)灌流 10 min 后,0.5 g/L 菊米提取物灌流 15 min,再用 K - H 液灌流 15 min。B6 组(L - NAME + post - JM):L - NAME(30 μmol/L)灌流 10 min 后,用 K - H 液灌流 30 min,行缺血再灌注(并在再灌注的第 1 个 15 min 用 0.5 g/L 菊米提取物灌流)。

4 统计学处理

数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用方差分析以及 Newman - Keuls post hoc test 比较各组均数差异的显著性。

结 果

1 菊米对心脏收缩功能的影响

不同浓度的菊米提取液灌流心脏 15min 后,LVEDP 和 HR 与对照组相比无明显差异;而冠脉流量均明显高于对照组[分别为(10.1 ± 1.5,10.3 ± 1.8,9.7 ± 1.3) mL/min *vs* 对照组(7.6 ± 1.0) mL/min,$P < 0.01$],见表 1。菊米提取液灌流心脏 15 min 后,浓度依赖性增高 LVDP($P < 0.01$),见图 1,$\pm dp/dt_{max}$在高浓度菊米提取液组高于对照组($P < 0.01$),见图 2。换用 K - H 液继续灌流后,0.5 g/L 菊米提取液组 LVDP 恢复正常,而 1.0 g/L 和 2.0 g/L 菊米提取液组 LVDP 和 $\pm dp/dt_{max}$ 仍高于对照组($P < 0.05$)。L - NAME 可减轻菊米提取液组增加冠脉流量的作用($P < 0.05$)和增强心功能的作用($P < 0.01$),见图 1、2。

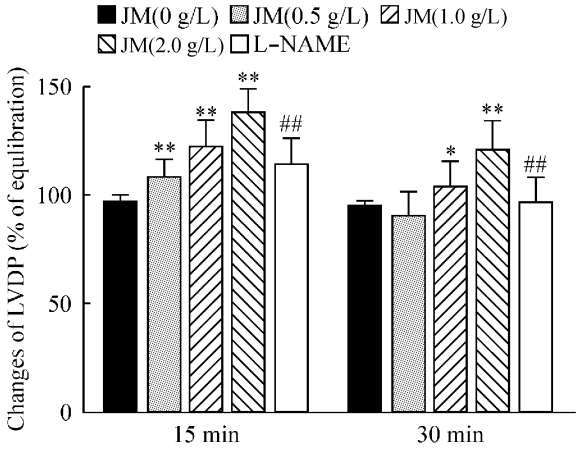

Fig 1 Effect of JM extracts on left ventricular developed pressure in the isolated rat hearts. Left ventricular developed pressure (LVDP) was measured at 15 min of JM perfusion and 15 min of K - H reperfusion. $\bar{x} \pm s$. $n = 8$. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ *vs* JM(0 g/L) group; $^{\#\#}P < 0.01$ *vs* JM(2.0 g/L) group.

图 1 不同浓度的菊米提取液对大鼠离体心脏 LVDP 的影响

2 菊米对心肌组织 NO 含量和 NOS 活性的影响

菊米提取液灌流心脏可浓度依赖性地增加心肌组织 NO 含量[分别为(6.737 ±0.782、7.367 ±1.413 和 8.120 ±0.836) μmol/g protein *vs* 对照组(5.173 ±0.722) μmol/g protein, $P < 0.05$]。心肌组织 eNOS 活性也随着菊米提取液的浓度增加而增加(分别为 1.096 ±0.128、1.150 ±0.069 和 1.209 ±0.093 *vs* 对照组 0.925 ±0.134, $P < 0.05$);而菊米提取液灌流心脏后 iNOS 活性与对照组相比无明显差异。

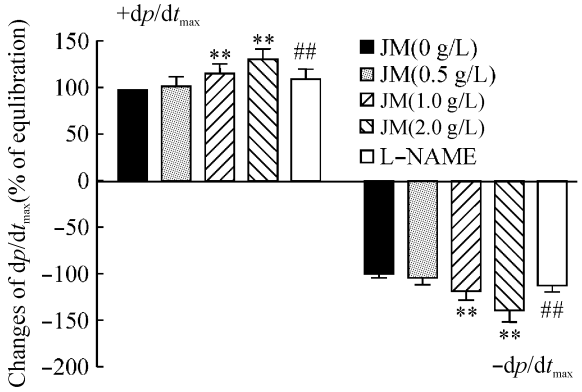

Fig 2 Effect of JM extracts on $\pm dp/dt_{max}$ in the isolated rat hearts. $\pm dp/dt_{max}$ were measured at 15min of JM perfusion. $\bar{x} \pm s$. $n = 8$. $^{**}P < 0.01$ *vs* JM(0 g/L) group; $^{\#\#}P < 0.01$ *vs* JM(2 g/L) group.

图 2 不同浓度的菊米提取液对大鼠离体心脏 $\pm dp/dt_{max}$ 的影响

3 菊米预处理对缺血心脏收缩功能的影响

用 0.5 g/L 菊米提取液预处理心脏后,发现可减轻缺血再灌注引起的 LVEDP 的增高,同时 LVDP 和 $\pm dp/dt_{max}$ 明显高于 IS 组($P < 0.01$),见图 3。而心肌梗死面积明显低于 IS 组(图 4)。预先给予 L - NAME,可拮抗菊米预处理引起的心功能和心肌梗死面积各指标的改善,见图 3、4。

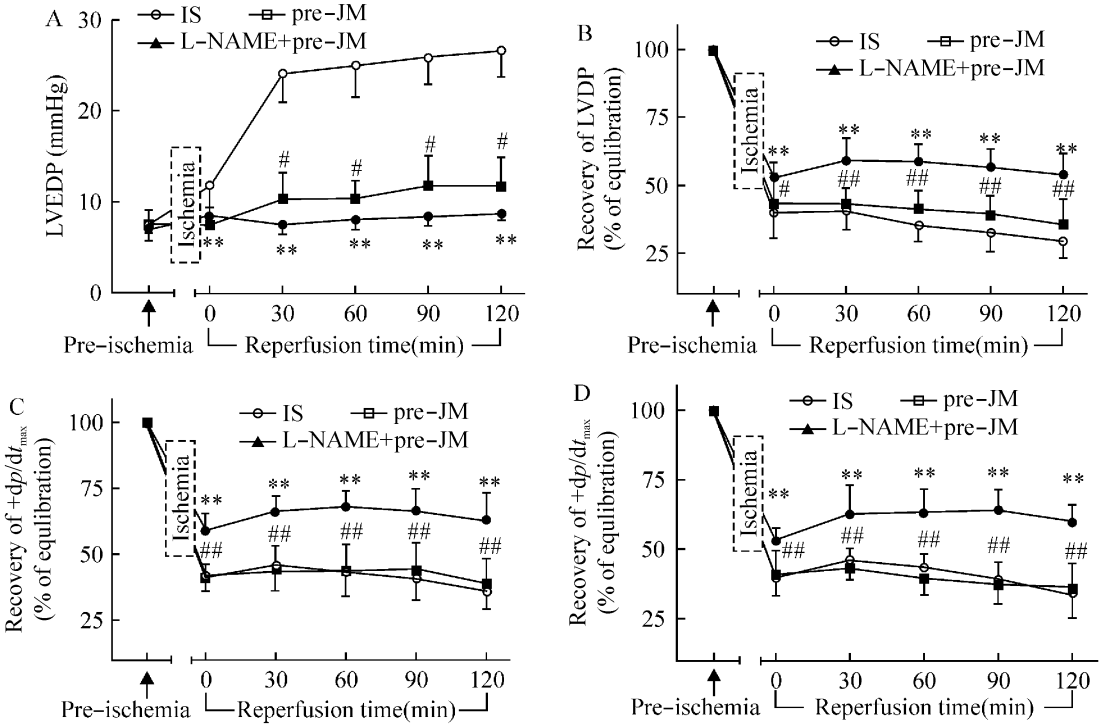

Fig 3 Effect of JM extracts preconditioning on LVEDP, LVDP and $\pm dp/dt_{max}$ in the ischemic rat hearts. $\bar{x} \pm s$. $n = 8$. $^{**}P < 0.01$ *vs* IS group; $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$ *vs* pre - JM group.

图 3 菊米预处理对大鼠缺血心脏 LVEDP、LVDP 和 $\pm dp/dt_{max}$ 的影响

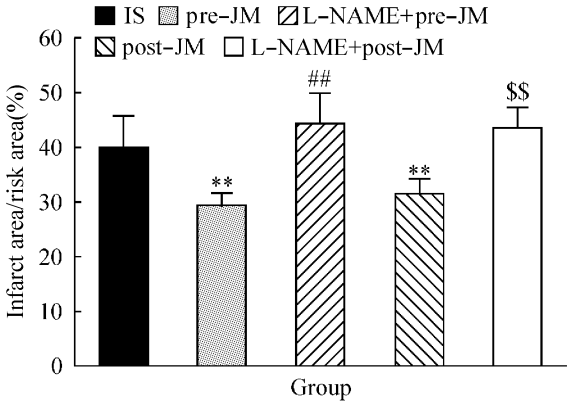

Fig 4 Effect of various interventions on infarct size in the ischemia/reperfusion rat hearts. The ratios of infarct area/risk area were calculated after hearts suffered from 30 min of ischemia followed by 120 min of reperfusion. $\bar{x} \pm s$. $n = 8$. $^{**}P < 0.01$ *vs* IS group; $^{\#\#}P < 0.01$ *vs* pre - JM group; $^{\$\$}P < 0.01$ *vs* post - JM group.

图 4 各组心脏心肌梗死面积的改变

4 再灌注早期给予菊米提取液对缺血心脏收缩功能的影响

在缺血后的再灌注早期加入 0.5 g/L 菊米提取液,发现与 IS 组相比 LVEDP 降低、LVDP 增高($P < 0.01$),而 $\pm dp/dt_{max}$ 无明显变化(图 5)。心肌梗死面积明显低于 IS 组(图 4)。预先给予 L - NAME,可拮抗菊米引起的心功能和心肌梗死面积各指标的改善,见图 4、5。

讨 论

本研究发现菊米提取液具有浓度依赖性地强心作用,其强心作用可能与扩张冠脉、增加冠脉流量、增加心肌供能有关。本实验发现菊米提取液具有浓度依赖性地增加心肌组织 eNOS 活性和 NO 含量;而 NOS 抑制剂 L - NAME 可取消菊米预处理引发的冠脉流量增加和 LVDP 增高等作用,提示 NO 参与了菊米的强心作用。

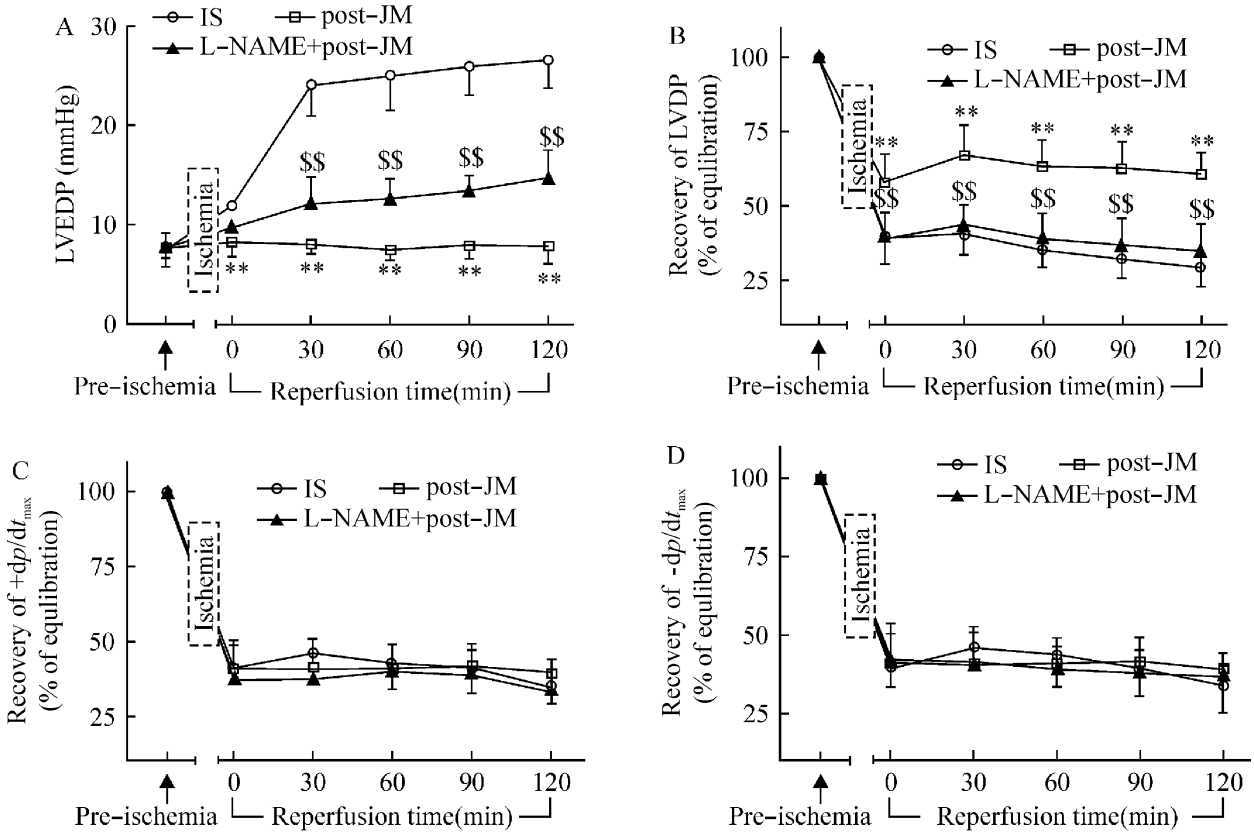

Fig 5 Effect of JM extracts perfusion at the early reperfusion period on LVEDP, LVDP and $\pm dp/dt_{max}$ in the ischemic rat hearts. $\bar{x} \pm s$. $n = 8$. $^{**}P < 0.01$ *vs* IS group; $^{\$\$}P < 0.01$ *vs* post - JM group.

图 5 再灌注早期给予菊米提取液对大鼠缺血心脏 LVEDP、LVDP 和 $\pm dp/dt_{max}$ 的影响

1986 年,Murry 等[3]首次发现缺血预处理(ischemic preconditioning,IP)现象,即短暂的心肌缺血可以减轻随后长时间缺血对心肌的损害。随后的研究发现,阿片[4],腺苷[5]等药物预处理均可对抗心肌缺血再灌注损伤。本实验发现,低浓度的菊米提取液预处理后,可减轻缺血再灌注损伤。有研究报道,NO 的供体可模拟缺血预处理的心肌保护作用,缩小缺血心肌的梗死面积,减轻心肌顿抑的发生[6]。而

L－NAME 可完全阻断经典的 IP 心肌保护作用[7]。随后在不同的药物预处理模型上均发现，NO 是重要的一个中介因子[8]。本实验用 L－NAME 同样可阻断菊米预处理引发的心肌保护作用，提示 NO 参与了菊米预处理的心肌保护作用。

虽然通过 IP 方式来调动机体的内源性抗损伤机制从而对抗心肌缺血性损伤的方法已经得到医学界的广泛关注和认识[9]。但由于在病理情况下心肌缺血损伤的发生往往是不可预知的，所以目前 IP 方式在临床上的应用非常有限，仅在经皮腔内冠状动脉成形术等生理情况下，IP 有保护作用，在防治心肌梗死等情况时，无法实施这一策略。近 2 年来，缺血后处理（ischemic postconditioning）的发现为我们提供了一种更为简单有效的心肌保护手段，即在缺血发生后，在再灌注的早期给予反复短暂的缺血，可以模拟 IP，抑制再灌注损伤的发生[10]。缺血后处理的心脏保护作用已在犬[10]、鼠[11]等动物心脏缺血再灌注模型中得到了证实。本文在缺血后的再灌注早期加入菊米提取液后处理可模拟缺血后处理的心肌保护作用，但和菊米预处理组相比作用较弱。有报道，缺血后处理心肌保护作用亦涉及多种内源性物质的释放，激动相应的受体（如腺苷受体[12]等），继而激活信号转导通路（如 NO[13]等）。本文用 L－NAME 可取消菊米后处理对抗缺血损伤的作用，提示 NO 亦参与了菊米后处理的心肌保护作用。

［参 考 文 献］

［1］ 胡 春，丁霄霖，唐莉莉，等. 菊花提取物对实验动物抗疲劳和降血脂作用的研究［J］. 食品科学，1996，10（1）：58－63.

［2］ 蒋惠娣，娄小娥，严亦慈. 野菊花水提液抗氧化作用的实验研究［J］. 中国现代应用药学杂志，1999，16（6）：16－18.

［3］ Murry CE，Jennings RB，Reimer KA. Preconditioning with ischemia：a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium［J］. Circulation，1986，74（5）：1124－1136.

［4］ Saraiva J，Oliveira SM，Rocha－Sousa A，et al. Opioid receptors and preconditioning of the heart［J］. Rev Port Cardiol，2004，23（10）：1317－1333.

［5］ Headrick JP，Hack B，Ashton KJ. Acute adenosinergic cardioprotection in ischemic－reperfused hearts［J］. Am J Physiol Heart Circ Physiol，2003，285（5）：H1797－H1818.

［6］ Shinmura K，Tang XL，Takano H，et al. Nitric oxide donors attenuate myocardial stunning in conscious rabbits［J］. Am J Physiol Heart Circ Physiol，1999，277（6 Pt 2）：H2495－H2503.

［7］ 李伟杰，贾国良，郭文怡，等. 一氧化氮通过诱导热休克蛋白 72 的表达打开缺血预处理的第二保护窗［J］. 中国病理生理杂志，2003，19（10）：1386－1390.

［8］ Hattori R，Otani H，Maulik N，et al. Pharmacological preconditioning with resveratrol：role of nitric oxide［J］. Am J Physiol Heart Circ Physiol，2002，282（6）：H1988－H1995.

［9］ 李春梅，张兴华，马晓静，等. 肢体缺血后处理对兔急性心肌缺血再灌注损伤的影响［J］. 中国病理生理杂志，2006，22（12）：2332－2335.

［10］ Kin H，Zhao ZQ，Sun HY，et al. Postconditioning attenuates myocardial ischemia－reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion［J］. Cardiovasc Res，2004，62（1）：74－85.

［11］ Serviddio G，Di Venosa N，Federici A，et al. Brief hypoxia before normoxic reperfusion（postconditioning）protects the heart against ischemia－reperfusion injury by preventing mitochondria peroxyde production and glutathione depletion［J］. Faseb J，2005，19（3）：354－361.

［12］ Kin H，Zatta AJ，Lofye MT，et al. Postconditioning reduces infarct size via adenosine receptor activation by endogenous adenosine［J］. Cardiovasc Res，2005，67（1）：124－133.

［13］ Yang XM，Proctor JB，Cui L，et al. Multiple，brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by targeting cell signaling pathways［J］. J Am Coll Cardiol，2004，44（5）：1103－1110.