

木犀草素对冷保存大鼠心脏心功能及氧化应激反应的影响

闫庆峰¹⁾, 闫高峰²⁾, 李跃萍³⁾, 杨达宽⁴⁾

(1) 海南医学院附属医院心脏外科; 2) 预防医学系; 3) 生殖中心, 海南海口 570102; 4) 昆明医学院第二附属医院心胸外科, 云南昆明 650101)

[摘要] **目的** 研究木犀草素对冷保存大鼠心脏心功能及氧化应激反应的影响. **方法** 将 40 只成年 SD 大鼠随机分成 2 组 (n=20): 对照组 (心脏保存液为 UW 液) 及实验组 (心脏保存液为含 30 $\mu\text{mol/L}$ 木犀草素的 UW 液). 利用 Langendorff 离体心脏灌流法, 观察 2 组液体保存心脏 18 h 并复灌 60 min 后心脏的收缩与舒张功能, 冠脉流出液中磷酸肌酸激酶 (CK)、乳酸脱氢酶 (LDH) 的释放量及心肌组织中超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA) 的含量变化. **结果** 实验组复灌期心脏的收缩功能 (LVSP, +dp/dtmax)、舒张功能 (-dp/dtmax) 及心率显著高于对照组 ($P<0.05$), 冠脉流出液中 CK、LDH 的漏出量和心肌组织中 MDA 含量明显低于对照组 ($P<0.05$), 而心肌组织中 SOD 活力明显高于对照组 ($P<0.05$). **结论** 木犀草素能显著改善冷保存后心脏的心功能, 减少心肌氧化损伤.

[关键词] 木犀草素; 心脏保存; 氧化应激

[中图分类号] Q463 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-4706 (2012) 02-0027-04

Effects of Luteolin on Isolated Heart Function and Oxidative Stress Reaction after Hypothermic Preservation

YAN Qing-feng¹⁾, YAN Gao-feng²⁾, LI Yue-ping³⁾, YANG Da-kuan⁴⁾

(1) Dept. of Cardiac Surgery, The Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou Hainan 570102; 2) Dept. of Preventive Medicine, Hainan Medical College, Haikou Hainan 570102; 3) Reproduction Medicine Center, The Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou Hainan 570102; 4) Dept. of Cardiothoracic Surgery, The 2nd Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650101, China)

[Abstract] **Objective** To study effects of luteolin on isolated heart function and oxidative stress reaction after hypothermic preservation. **Methods** Forty male SD rats were randomly divided into 2 groups (n=20 in each group): control group (heart preservative solution was UW solution) and experiment group (added 30 $\mu\text{mol/L}$ luteolin in UW solution). Langendorff model of isolated rat heart was used. The cardiac contractile function and diastolic function were determined 18 hours after hypothermic preservation followed by 60 min reperfusion. The amount of creatine kinase (CK) and lactic dehydrogenase (LDH) leakage in the coronary effluent, the content of Superoxide Dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) in myocardial tissue were measured. **Results** Luteolin significantly improved the recovery of cardiac contractile function (LVSP, +dp/dtmax) and diastolic function (-dp/dtmax) after hypothermic preservation, reduced the leakage of CK and LDH in the coronary effluent, reduced the content of MDA in myocardial tissue and increase the content of SOD in myocardial tissue, compared with control group. **Conclusion** Luteolin can significantly improve isolated heart function and reduce oxidative stress reaction in myocardial tissue after hypothermic preservation.

[Key words] Luteolin; Heart cold preservation; Oxidative stress

[基金项目] 海南省自然科学基金资助项目 (809042)

[作者简介] 闫庆峰 (1977~), 男, 山西大同市人, 医学博士, 讲师, 主要从事心肺保护临床工作.

在心脏冷保存过程中产生的氧自由基能导致心肌组织损伤并降低心功能,而研究证实木犀草素(Luteolin)具有清除氧自由基、降低脂质过氧化反应、抗菌、抗病毒、抗癌、抗过敏、舒张冠脉血管等药理活性^[1-5]。本研究中,笔者采用Langendorff离体鼠心灌注模型,观察添加木犀草素的UW保存液对大鼠离体心脏低温保存后心功能及心肌组织氧化应激反应的影响。

1 材料与方法

1.1 药品及试剂

木犀草素(纯度>99%),由杭州福斯特化学有限公司提供;UW液(University of Wisconsin solution)由美国施贵宝-百事美公司提供;NaCl等化学试剂由北京化学试剂二厂提供。戊巴比妥钠,购自美国Sigma公司。乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)检测试剂盒由南京建成生物工程研究所提供;灌注前采用双蒸水配制KH液,滤纸过滤后使用。

1.2 实验动物及分组

40只健康雄性SD大鼠(体重250~300g)由西安交通大学动物中心提供,随机分成2组,每组20只,即对照组(心脏保存液为UW液)和实验组(心脏保存液为含30 μmol/L木犀草素的UW液)。

1.3 离体心脏灌注模型

大鼠称重后,戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔注射,仰卧固定,经腹腔注入肝素3 mg/kg。迅速开胸,于主动脉和右锁骨下动脉交界处离断主动脉,切取的心脏立即放入4℃KH液中,冲洗残留在主动脉内的血液,插主动脉灌注管,迅速移至Langendorff灌注装置上,并开始用KH液灌注,灌注压为75 cm H₂O。灌流1 min后,切开左心房,

经左心房、二尖瓣将带有测压导管的球囊送入左心室,测压导管的另一端连接电生理多导记录仪。给心室胶球充液,所充生理盐水量以使采集的信号最大为度(约0.15 mL),使左心室舒张末压(LVEDP)稳定为4 mmHg,监测心功能指标。于基础灌流30 min后,以4℃冷UW液或添加木犀草素的UW液恒压灌注1 min停搏后取下心脏,放入20 mL同种保存液中,4℃保存18 h后,再次进行Langendorff装置灌注,条件同前,持续监测心功能指标60 min。

1.4 检测指标

1.4.1 心功能指标 4℃保存18 h后复灌60 min时测定心律(HR)、左心室最大收缩压(LVPSP)、左心室压力变化率(±dp/dtmax)。

1.4.2 心肌酶漏出量 于4℃保存18 h后复灌5 min、30 min及60 min时各收集1 min的冠脉流出液,用LDH、CK试剂盒测定其中CK、LDH的含量。

1.4.3 心肌组织中SOD及MDA水平测定 留取冷保存18 h再灌注60 min后实验组与对照组部分心室肌,并用SOD、MDA试剂盒检测心肌组织中SOD活力和MDA含量。

1.5 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组内比较采用方差分析,组间比较采用 t 检验,数据资料采用SPSS统计学软件处理, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 低温保存18 h复灌60 min测定心功能

离体大鼠心脏冷保存18 h复灌60 min后的功能学测定结果显示:对照组心脏的收缩功能(LVPSP, +dp/dtmax)、舒张功能(-dp/dtmax)及心率明显低于实验组,提示木犀草素能明显改善冷保存后离体大鼠心脏功能(见表1)。

表1 冷保存18 h后大鼠心脏功能的测定与比较($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Determination and comparison of rat heart function after cold preservation for 18 h ($\bar{x} \pm s$)

组别	LVPSP (mmHg/s)	+dp/dtmax (mmHg/s)	-dp/dtmax (mmHg/s)	HR (beats/min)
对照组	21.3 ± 4.7	260.5 ± 46.3	239.3 ± 15.7	203.3 ± 22.7
实验组	53.3 ± 6.5*	881.3 ± 44.1*	685.9 ± 29.3*	331.6 ± 23.1*

与对照组比较,* $P < 0.05$ 。

2.2 冷保存18 h后CK及LDH含量的变化

冷保存18 h再灌注5 min、30 min及60 min后,实验组CK及LDH均显著低于对照组,提示

木犀草素对冷保存心肌细胞具有保护作用(见表2、表3)。冷保存18 h后心肌组织中SOD活力与MDA含量测定结果,见表4。

表2 冷保存18 h后大鼠心脏冠脉流出液中CK含量测定 $[(\bar{x} \pm s), U/L]$ Tab. 2 Determination of CK activity in coronary effluent after cold preservation for 18 h $[(\bar{x} \pm s), U/L]$

组别	5 min	30 min	60 min
对照组	865.78 ± 34.64	645.52 ± 25.78	513.14 ± 24.04
实验组	347.15 ± 29.62*	207.78 ± 17.19*	188.32 ± 14.25*

与对照组比较, * $P < 0.05$.

表3 冷保存18 h后大鼠心脏冠脉流出液中LDH活力测定 $[(\bar{x} \pm s), U/L]$ Tab. 3 Determination of LDH activity in coronary effluent after cold preservation for 18h $[(\bar{x} \pm s), U/L]$

组别	5 min	30 min	60 min
对照组	2 715.68 ± 40.06	960.78 ± 34.38	628.10 ± 38.52
实验组	156.86 ± 19.41*	127.89 ± 18.27*	101.30 ± 19.60*

与对照组比较, * $P < 0.05$.

表4 冷保存18 h后大鼠心肌组织中SOD活力与MDA含量测定与比较 $(\bar{x} \pm s)$ Tab. 4 Determination and comparison of SOD activity and MDA content in cardiac muscle after cold preservation for 18h $(\bar{x} \pm s)$

组别	SOD (U/mg)	MDA (nmol/mg)
对照组	105.69 ± 28.7	10.14 ± 0.75
实验组	237.68 ± 19.91*	6.92 ± 0.42*

与对照组比较, * $P < 0.05$.

3 讨论

已知器官保存过程中缺血和再灌注损伤是导致组织器官损伤, 功能下降的重要原因. 体内外的研究均表明缺血心肌再灌注后产生大量的毒性氧代谢产物—氧自由基, 如超氧阴离子 ($O_2^{\cdot-}$) 和羟自由基 ($\cdot OH$) 等, 这些氧自由基可以直接攻击生物膜, 从而导致膜渗透性增加, 细胞内的各种酶漏出, 且随灌注时间延长组织和器官的功能受损加重. 心肌细胞中存在很多种酶体系, 包括肌酸磷酸激酶、乳酸脱氢酶等, 它们在维持心肌正常生理功能方面发挥着重要的作用, 研究表明^[6]在细胞遭遇到氧自由基攻击时, 早期往往表现为细胞膜的通透性增加, 细胞内各种酶 (包括 LDH 和 CK 等) 漏出, 晚期则表现为 DNA 受损、细胞坏死或凋亡. 本研究结果显示: 添加 30 $\mu\text{mol/L}$ 木犀草素的 UW 液能显著提高冷保存心脏后大鼠心室肌的收缩与舒张功能, 并能显著减少心肌细胞中 CK 与 LDH 的漏出, 提示木犀草素能够减少心脏冷保存过程中的结构损伤、提高心脏功能. 而最近国外研究也证明木犀草素能够减少缺血再灌注过程中心律失常、心

肌结构损害的发生^[7].

1998 年 Brown JE^[8,9]研究表明木犀草素可清除氧自由基、降低脂质过氧化反应并阻止低密度脂蛋白氧化. 2004 年, Elizabeth J^[10]的研究进一步证明木犀草素具有清除超氧化物阴离子和 DPPH 自由基能力, 木犀草素可能通过酚羟基与自由基反应生成较稳定的半醌式自由基, 从而终止自由基链式反应, 或通过还原作用直接给出电子而清除自由基实现抗氧化作用. 在本研究中, 笔者发现木犀草素可以提高心肌组织中 SOD 活力水平, 降低心肌组织中的 MDA 含量. SOD 是细胞抗氧化系统中重要的抗氧化酶之一, 它能清除超氧阴离子 ($O_2^{\cdot-}$), 并维持机体的氧化与抗氧化平衡, 从而保护细胞免受损伤, 它的活力高低直接反映了细胞内抗氧化系统的状况; MDA 是自由基与膜脂质中不饱和脂肪酸发生氧化反应生成的具有氧化功能的产物, 它可以损伤生物膜, 使膜脆性增加, 易于破裂等, 其含量的变化间接反映了组织中自由基含量变化. 因此, 本研究结果提示在 UW 液中添加木犀草素有助减少再灌注心肌组织氧自由基的含量, 提高心肌细胞抗氧化能力.

本研究表明, 木犀草素能显著减少冷保存心脏氧自由基含量、提高心肌组织抗氧化能力、减少心肌坏死和改善心脏功能, 从而提高 UW 液的心脏保存效果.

[参考文献]

- [1] HARRIS G K, QIAN Y, LEONARD S S, et al. Luteolin and chrysin differentially inhibit cyclooxygenase-2 expression and scavenge reactive oxygen species but similarly inhibit prostaglandin-E2 formation in RAW 264.7 cells [J]. J Nutr, 2006, 136(6): 1 517 - 1 521.

- [2] HWANG J T, PARK O J, LEE Y K, et al. Anti-tumor effect of luteolin is accompanied by AMP-activated protein kinase and nuclear factor- κ B modulation in HepG2 hepatocarcinoma cells [J]. *Int J Mol Med*, 2011, 28(1):25 - 31.
- [3] 阎高峰, 李学刚, 袁吕江. 木犀草素生物活性研究 [J]. *粮食与油脂*, 2006, 3(31):27 - 29.
- [4] 汪丽燕, 韩传环, 王萍. 等. 半合成木犀草素降压作用的实验研究 [J]. *中国药理学通报*, 1986, 2(2):34 - 36.
- [5] 汪丽燕, 韩传环. 木犀草素对冠脉血流动力学的实验研究 [J]. *中国药理学通报*, 1992, 8(5):388 - 391.
- [6] HUANG H, PATEL P B, SALAHUDEEN A K. Lazaroid compounds prevent early but not late stages of oxidant-induced cell injury: potential explanation for the lack of efficacy of lazarooids in clinical trials [J]. *Pharmacol Res*, 2001, 43(1):55 - 61.
- [7] LIAO P H, HUNG L M, CHEN Y H, et al. Cardioprotective effects of luteolin during ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *Circ J*, 2011, 75(2):443 - 450.
- [8] BROWN J E, RICE-EVANS C A. Luteolin-rich artichoke extract protects low density lipoprotein from oxidation in vitro [J]. *Free Radic Res*, 1998, 9:247 - 255.
- [9] BOIDO J A, RICE-EVANS C A. Luteolin protects low density lipoprotein from oxidation in vitro [J]. *Free Radic Res*, 1998, 9:247 - 255.
- [10] ELIZABETH JOUBERT, PAULA WINTERTON, TREVOR J, et al. Superoxide anion and a; a-diphenyl-b-picryl-hydrazyl radical scavenging capacity of rooibos (*Aspalathus linearis*) aqueous extracts, crude phenolic fractions, tannin and flavonoids [J]. *Food Research International*, 2004, 37:133 - 138.

(2012-01-13 收稿)

(上接第 16 页)

态, 为研究醛固酮的致病机理构建了很好的平台。

[参考文献]

- [1] LUMACHI F, ERMANI M, BASSO S M, et al. Long-term results of adrenalectomy in patients with aldosterone-producing adenomas: multivariate analysis of factors affecting unresolved hypertension and review of the literature [J]. *Am Surg*, 2005, 71(10):864 - 869.
- [2] MEYER A, BRABANT G, BEHREND M. Long-term follow-up after adrenalectomy for primary aldosteronism [J]. *World J Surg*, 2005, 29(2):155 - 159.
- [3] STRAUCH B, PETRAK O, WICHTERLE D, et al. Increased arterial wall stiffness in primary aldosteronism in comparison with essential hypertension [J]. *Am J Hypertens*, 2006, 19(9):909 - 914.
- [4] ROSSI G P, BOLOGNESI M, RIZZONI D, et al. Vascular remodeling and duration of hypertension predict outcome of adrenalectomy in primary aldosteronism patients [J]. *Hypertension*, 2008, 51(5):1366 - 1371.
- [5] HATAKEYAMA H, MIYAMORI I, FUJITA T, et al. Vascular aldosterone. Biosynthesis and a link to angiotensin II-induced hypertrophy of vascular smooth muscle cells [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(39):24316 - 24320.
- [6] FUNDER J W, PEARCE P T, SMITH R, et al. Vascular type I aldosterone binding sites are physiological mineralocorticoid receptors [J]. *Endocrinology*, 1989, 125(4):2224 - 2226.
- [7] HATAKEYAMA H, INABA S, TAKEDA R, et al. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in human vascular cells [J]. *Kidney Int*, 2000, 57(4):1352 - 1357.
- [8] LACOLLEY P, LABAT C, PUJOL A, et al. Increased carotid wall elastic modulus and fibronectin in aldosterone-salt-treated rats: effects of eplerenone [J]. *Circulation*, 2002, 106(22):2848 - 2853.
- [9] PARK J B, SCHIFFRIN E L. ET (A) receptor antagonist prevents blood pressure elevation and vascular remodeling in aldosterone-infused rats [J]. *Hypertension*, 2001, 37(6):1444 - 1449.
- [10] IGLARZ M, TOUYZ R M, VIEL E C, et al. Involvement of oxidative stress in the profibrotic action of aldosterone interaction with the renin-angiotensin system [J]. *Am J Hypertens*, 2004, 17(7):597 - 603.

(2011-12-21 收稿)