

间苯三酚对心力衰竭模型大鼠心脏保护作用的研究

李 军*, 彭 林(遵义市第一人民医院, 贵州 遵义 563000)

中图分类号 R965;R972 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)25-2323-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.25.08

摘要 目的:研究间苯三酚(Phlo)对心力衰竭模型大鼠的心脏保护作用。方法:取大鼠随机分为空白对照组、模型组和间苯三酚[30 mg/(kg·d)]组,每组15只,后2组采用胸主动脉缩窄法建立心力衰竭模型。各组大鼠灌胃给予相应药物12周后,观察其左心室血流动力学指标[平均动脉压(MAP)、心率、左心室舒张末期压(LVEDP)、左心室收缩压(LVSP)和左心室压力上升或下降的最大速率($\pm dp/dt_{max}$)],心肌细胞直径、血浆生化指标[B型钠尿肽(BNP)和心肌肌钙蛋白(cTnI)],氧化应激水平[丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)及氧自由基]和内、外向整流钾电流(I_{K1} 、 I_{K0})的影响。结果:与空白对照组比较,模型组建模成功;与模型组比较,间苯三酚组大鼠的LVSP、 $\pm dp/dt_{max}$ 、 I_{K1} 、 I_{K0} 和MDA水平、SOD活性均明显增加($P<0.05$),LVEDP、心肌细胞直径和BNP、cTnI、氧自由基水平均明显减小($P<0.05$),但与空白对照组比较仍有明显差异($P<0.05$)。结论:间苯三酚可有效改善心力衰竭模型大鼠的心肌肥大,并增强 I_{K1} 、 I_{K0} ,具有明显的心脏保护作用,这可能与降低氧化应激有关。

关键词 间苯三酚;心力衰竭;大鼠;心肌肥大;内向整流钾电流;外向整流钾电流

Protective Effects of Phloroglucinol on Cardiac Tissue in Heart Failure Model Rats

LI Jun, PENG Lin(Zunyi First People's Hospital, Guizhou Zunyi 563000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the protective effects of phloroglucinol (Phlo) on cardiac tissue in heart failure model rats. METHODS: Rats were randomly divided into blank control group, model group and Phlo group [30 mg/(kg·d)] with 15 rats in each group. Heart failure model was induced by aorta thoracica constriction in the latter 2 groups. The hemodynamic parameters of left ventricular [MAP, heart rate, LVEDP, LVSP and the maximal change rate of left intraventricular pressure ($\pm dp/dt_{max}$)], cardiomyocyte diameter, plasma biochemical markers [B type natriuretic peptide (BNP), cardiac troponin (cTnI)], oxidative stress [MDA, SOD and oxygen free radicals] and inward and outward rectifier potassium current (I_{K1} , I_{K0}) were all observed in rats after intragastric administration of Phlo for 12 consecutive weeks. RESULTS: Compared with blank control group, model was induced in model group successfully; compared with model group, LVSP, $\pm dp/dt_{max}$, I_{K1} , I_{K0} , MDA and SOD contents of Phlo group increased significantly ($P<0.05$), while LVEDP, cardiomyocyte diameters, BNP, cTnI and oxygen free radical were decreased significantly ($P<0.05$); but there was no significant different with blank control group. CONCLUSIONS: Phlo can effectively reverse the cardiac hypertrophy and enhance I_{K1} and I_{K0} in heart failure rats, associating with possible mechanisms to reduce oxidative stress.

KEY WORDS Phloroglucinol; Heart failure; Rats; Myocardial hypertrophy; Inward rectifier potassium current; Outward rectifier potassium current

心力衰竭(Heart failure, HF)是多种心脏疾病的终末期,除心功能降低外,还伴有心室肥大及电活动改变,严重危害患者生命健康^[1]。当心肌肥大及电活动改变时,提示心力衰竭的严重程度较高,常规治疗的效果不理想^[2],因此需积极预防心肌肥大及电活动改变。氧化应激是加重心力衰竭症状的常见病因^[3]。间苯三酚(Phloroglucinol, Phlo)是一种常用于临床的解痉止痛药物,此外其还具有抗氧化作用^[4]和多种心脏保护作用,如Li TT等^[5]发现间苯三酚对心肌缺血再灌注损伤具有保护作用,同时可抑制髓过氧化物酶活性及炎性细胞浸润。笔者推测间苯三酚还可用于预防心力衰竭,但目前对间苯三酚能否改善心力衰竭症状还未有相关文献报道,能否改善心室肥大及电活动改变的作用尚不清楚。因此,本文以心肌肥大及电活动等为指标,研究了间苯三酚对心力衰竭模型大鼠的心脏保护作用。

1 材料

1.1 仪器

PowerLab 4SP 四通道高速记录仪(澳大利亚 Adinstru-

*主管药师。研究方向:医院药学。E-mail:1246875837@qq.com

ments公司);CM1850冰冻切片机(德国Leica公司);毛细玻璃微管电极(中国科学院电子所);高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司)。

1.2 药品与试剂

间苯三酚原料药(美国Sigma公司,批号:P-3505,纯度: $>98\%$);苏木精-伊红(HE)染料(华美生物工程有限公司);丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)活性试剂盒(南京建成生物工程研究所);B型钠尿肽(B-type natriuretic peptide, BNP)试剂盒(上海贝西科技发展有限公司);心肌肌钙蛋白(Cardiac troponin, cTnI)试剂盒(上海西唐生物科技有限公司)。

1.3 动物

Sprague-Dawley大鼠45只,清洁级,成年 δ ,体质量280~300g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,动物合格证号:SCXK(京)2007-0001。

2 方法与结果

2.1 分组与给药

根据研究设计,取大鼠随机分为空白对照组、模型组和间

苯三酚[30 mg/(kg·d)^[5]]组,每组15只,后2组采用胸主动脉缩窄(TAC)法建立心力衰竭模型^[6]。除间苯三酚组灌胃给予相应剂量的间苯三酚外,其余2组灌胃给予相同体积的生理盐水,连续给药12周。所有大鼠均饲养于同一环境,保证充足的饲料和饮用水。

2.2 左心室血流动力学评价

各组大鼠末次给药后,每组取10只,腹腔注射10%水合氯醛0.3 ml/kg,给予机械维持性通气,颈部正中切口,逐层分离筋膜和肌肉,钝性分离右侧颈总动脉并剪口,将PE-50聚乙烯管(充有肝素)插入颈总动脉,采用PowerLab 4SP四通道高速记录仪分析记录各组大鼠的平均动脉压(Mean arterial pressure, MAP)和心率(Heart rate, HR);将PE-50聚乙烯管进一步插入左心室,分别记录左心室舒张末期压(Left ventricular end-diastolic pressure, LVEDP)、左心室收缩压(Left ventricular systolic pressure, LVSP)、左心室压力上升或下降的最大速率($\pm dp/dt_{max}$)。采用SPSS 13.0统计软件,多组比较采用单因素方差,两两比较采用*t*检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。各组大鼠左心室血流动力学指标比较见表1(1 mm Hg = 133.322 Pa)。

表1 各组大鼠左心室血流动力学指标比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 1 Comparison of left ventricular hemodynamics index in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	MAP, mm Hg	HR, 次/min	LVSP, mm Hg	LVEDP, mm Hg	dp/dt_{max} , mm Hg/s	$-dp/dt_{max}$, mm Hg/s
空白对照组	93.7 ± 6.2	362.7 ± 17.8	137.2 ± 11.5	7.5 ± 4.2	3 042.4 ± 216.6	2 537.3 ± 174.6
模型组	89.4 ± 8.1	357.5 ± 14.6	125.8 ± 9.2*	12.6 ± 7.3*	2 536.1 ± 173.7*	1 982.4 ± 126.3*
间苯三酚组	90.5 ± 6.5	379.2 ± 34.7	132.7 ± 8.8**	10.2 ± 5.5**	2 826.3 ± 192.4**	2 138.4 ± 182.7**

与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

vs. blank control group: * $P < 0.05$; vs. model group: # $P < 0.05$

由表1可知,与空白对照组比较,模型组大鼠的LVSP、 $\pm dp/dt_{max}$ 均明显减小($P < 0.05$),LVEDP明显增加($P < 0.05$)。与模型组比较,间苯三酚组大鼠的LVSP、 $\pm dp/dt_{max}$ 均明显增加($P < 0.05$),LVEDP明显减小($P < 0.05$),但与空白对照组比较仍具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 心肌细胞形态学分析

取“2.2”项下的各组大鼠,静脉注射过量氯化钾使心脏停留在舒张期,大鼠死后快速取出心脏并用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗干净,依次置于4%福尔马林溶液固定和梯度酒精中脱水。修剪心脏标本,保留心室部分,采用冰冻切片机将心室切成5 μ m的冠状面切片,进行HE染色,于光学显微镜下观察并选取10个高倍视野,采用Image Pro Plus 6.0软件分析心肌细胞直径。各组大鼠心肌细胞组织显微镜图见图1。

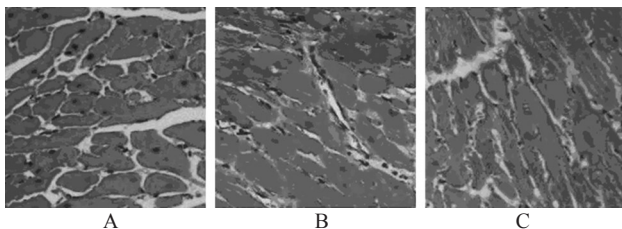


图1 各组大鼠心肌细胞组织显微镜图($\times 400$)

A.空白对照组;B.模型组;C.间苯三酚组

Fig 1 Microscopic images of cardiomyocyte in each group ($\times 400$)

A. blank control group; B. model group; C. Phlo group

由图1可知,模型组大鼠的心肌细胞直径为(17.24 \pm 6.33) μ m,明显大于空白对照组大鼠的心肌细胞直径(8.72 \pm 3.90) μ m和间苯三酚组大鼠的心肌细胞直径(13.61 \pm 5.72) μ m ($P < 0.05$),但间苯三酚组大鼠的心肌细胞直径与空白对照组比较仍具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.4 血浆生化指标评价

取“2.2”项下的各组大鼠,采用含乙二胺四乙酸(EDTA)的抗凝管抽取大鼠动脉血,12 000 \times g离心30 min,保留上清液。根据试剂盒说明书操作,检测各组大鼠血浆中BNP、cTnI水平,具体结果见表2。

表2 各组大鼠血浆中BNP、cTnI和心肌细胞中MDA、SOD水平比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 2 Comparison of BNP and cTnI in plasma and MDA and SOD in myocardial tissue cell in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	BNP, pg/ml	cTnI, ng/ml	MDA, nmol/ml	SOD, U/ml
空白对照组	122.73 ± 16.63	0.11 ± 0.06	5.17 ± 1.42	157.36 ± 10.65
模型组	506.18 ± 79.48*	0.35 ± 0.13*	5.53 ± 2.28*	98.52 ± 12.37*
间苯三酚组	275.35 ± 65.70**	0.24 ± 0.09**	11.56 ± 2.38**	133.74 ± 9.58**

与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

vs. blank control group: * $P < 0.05$; vs. model group: # $P < 0.05$

由表2可知,与空白对照组比较,模型组大鼠血浆中BNP和cTnI水平均明显增加($P < 0.05$)。与模型组比较,间苯三酚组大鼠血浆中BNP和cTnI水平均明显减小($P < 0.05$),但与空白对照组比较仍具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.5 氧化应激水平评价

取“2.2”项下的各组大鼠,取心室,剪碎并与蛋白提取液混匀,加入全蛋白提取缓冲液充分裂解细胞,高速离心后保留上清液,并采用二喹啉甲酸(BCA)法检测蛋白浓度。根据试剂盒说明书操作,检测各组大鼠心肌细胞中MDA水平和SOD活性,结果见表2。由表2可知,与空白对照组比较,模型组大鼠心肌细胞中MDA水平明显增加($P < 0.05$),SOD活性明显减小($P < 0.05$)。与模型组比较,间苯三酚组大鼠心肌细胞中MDA水平和SOD活性均明显增加($P < 0.05$),与空白对照组比较也具有统计学意义($P < 0.05$)。

采用特异性荧光探针二氢乙锭(DHE)原位检测活性氧自由基,红色荧光强弱可表示活性氧自由基水平,荧光越强提示活性氧自由基水平越高。取“2.3”项下各组大鼠的心室冠状面切片于载玻片上,加入DHE(1 μ mol/L)避光孵育5 min,采用共聚焦显微镜观察红色荧光情况。各组大鼠心肌细胞中活性氧自由基的染色图见图2。

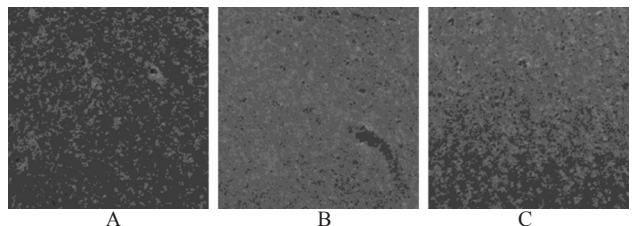


图2 各组大鼠心肌细胞中活性氧自由基的染色图($\times 400$)

A.空白对照组;B.模型组;C.间苯三酚组

Fig 2 HE staining of active oxygen free radicals in cardiomyocyte in each group ($\times 400$)

A. blank control group; B. model group; C. Phlo group

由图2可知,与空白对照组比较,模型组大鼠心肌细胞中

活性氧自由基水平明显增加。与模型组比较,间苯三酚组大鼠心肌细胞中活性氧自由基水平明显降低。

2.6 电活动评价

采用全细胞膜片钳记录方法^[7]:选用横纹肌清晰的心肌细胞,将控制好的玻璃微电极(2~5 MΩ)形成高阻封接后,负压破膜,并行全细胞记录。在电压钳制下记录离子通道电流,信号经过膜片钳放大器、模数转换器采集、贮存和分析,记录各组剩余5只大鼠在-100 mV时的内向整流钾电流(I_{K1})和-60 mV时的外向整流钾电流(I_{K0})。结果表明,空白对照组大鼠的 I_{K1} 、 I_{K0} 分别为(-8.32±0.74) pA/pF和(2.94±0.17) pA/pF,模型组大鼠的 I_{K1} 、 I_{K0} 分别为(-6.36±0.89) pA/pF和(2.33±0.25) pA/pF,间苯三酚组大鼠的 I_{K1} 、 I_{K0} 分别为(-7.21±1.14) pA/pF和(2.63±0.18) pA/pF。与空白对照组比较,模型组大鼠的 I_{K1} 、 I_{K0} 差异具有统计学意义($P<0.05$);与模型组和空白对照组比较,间苯三酚组大鼠的 I_{K1} 、 I_{K0} 差异具有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨论

心力衰竭是多种心脏疾病的终末期,慢性压力超负荷可进一步导致心肌肥厚及电活动改变,进而降低心力衰竭的心功能。心力衰竭时,机体氧化还原的平衡被打破,导致氧化应激,后者在心力衰竭的病情进展中发挥重要的作用。Hecker PA等^[8]发现由葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症导致的氧化应激增强可加速心力衰竭的病程进展;Hummel SL等^[9]发现降低氧化应激水平可改善心力衰竭症状;而Witman MA等^[10]发现氧化应激可在心力衰竭的血流动力学调控中起作用。以上均提示降低氧化应激是防治心力衰竭的重要措施。

间苯三酚,又名1,3,5-三羟基苯,是一种黄酮类物质,临床常用于手术镇痛。间苯三酚只作用于平滑肌,无抗胆碱作用,对心脏血管及其他重要脏器的影响较小,因此安全性高。近年来发现该药还具有抗氧化的作用,如Lin KW等^[9]发现间苯三酚可抑制黄嘌呤氧化酶,并减少活性氧水平,对顺铂诱导的膀胱癌细胞的凋亡具有保护作用,并可通过活性氧(ROS)依赖通路抑制人NTUB1细胞凋亡^[11]。提示间苯三酚可降低氧化应激水平,但具体的机制不是很清楚,推测可能与黄酮类的抗氧化作用有关。

本研究发现,模型组大鼠的心功能降低,具体表现在LVSP、±dp/dt_{max}减小,LVEDP增加,主要的原因因为胸主动脉缩窄法可加大压力负荷,导致心功能异常。而给予间苯三酚处理后可逆转以上指标,表明间苯三酚可改善心力衰竭症状,提示其可用于心力衰竭的预防,对延缓病程发展具有效果。BNP是一种内源性多肽,主要由心肌细胞合成和分泌,而心衰导致的心脏损伤可诱导cTnI的释放,因此心力衰竭时血浆BNP和cTnI水平增加。间苯三酚处理可抑制TAC导致的BNP和cTnI增加,进一步表明间苯三酚对心力衰竭的症状有预防作用。

心肌肥大和电活动改变可加重心力衰竭相关损伤,心肌细胞直径是评价心肌肥大的直观指标。 I_{K1} 可引发起搏电位,在心脏电活动中起重要作用^[12]。模型组大鼠的心肌细胞直径和 I_{K1} 均出现异常,而间苯三酚处理可减小细胞直径、改善 I_{K1} ,提示间苯三酚可缓解心力衰竭的继发损伤。本研究发现间苯三酚可抑制TAC导致的氧化应激增加,如抑制MDA和氧自由基水平,增加SOD活性,提示间苯三酚可抑制心力衰竭的氧化应激,是其改善心力衰竭心功能及继发损伤的基础,同时也表

明抑制氧化应激是防治心力衰竭的可行途径。

综上所述,间苯三酚可有效改善心力衰竭模型大鼠的心肌肥大,并增加 I_{K1} 、 I_{K0} ,具有明显的心脏保护作用,这可能与其降低氧化应激有关。

参考文献

- [1] 刘韬,秦牧,陈阵,等.慢性心力衰竭兔离体心室电整复性变化对室性心律失常的影响[J].中华心血管病杂志,2012,40(6):467.
- [2] 王琦,吴赛珠,徐嫵,等.老年男性慢性心力衰竭患者血浆睾酮与心室重构和氧化应激的关系[J].中华老年心脑血管病杂志,2012,14(4):340.
- [3] Deedwania PC, Carbajal E. Evidence-based therapy for heart failure[J]. *Med Clin North Am*, 2012,96(5):915.
- [4] Lin KW, Huang AM, Tu HY, et al. Phloroglucinols inhibit chemical mediators and xanthine oxidase, and protect cisplatin-induced cell death by reducing reactive oxygen species in normal human urothelial and bladder cancer cells[J]. *J Agric Food Chem*, 2009,57(19):8782.
- [5] Li TT, Zhang YS, He L, et al. Protective effect of phloroglucinol against myocardial ischaemia-reperfusion injury is related to inhibition of myeloperoxidase activity and inflammatory cell infiltration[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2011,38(1):27.
- [6] 冯俊,李树生,梁黔生,等.丹参酮II A对心力衰竭大鼠的心肌凋亡及miR-133水平的影响[J].中国中西医结合杂志,2012,32(7):930.
- [7] 刘清华,吴博威,张杨,等.Zacopride增强心肌内向整流钾电流(I_{K1})发挥抗心律失常效应[J].中国病理生理杂志,2010,26(6):1041.
- [8] Hecker PA, Lionetti V, Ribeiro RF Jr, et al. Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency increases redox stress and moderately accelerates the development of heart failure[J]. *Circ Heart Fail*, 2013,6(1):118.
- [9] Hummel SL, Seymour EM, Brook RD, et al. Low-sodium dietary approaches to stop hypertension diet reduces blood pressure, arterial stiffness, and oxidative stress in hypertensive heart failure with preserved ejection fraction[J]. *Hypertension*, 2012,60(5):1200.
- [10] Witman MA, McDaniel J, Fjeldstad AS, et al. A differing role of oxidative stress in the regulation of central and peripheral hemodynamics during exercise in heart failure[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2012,303(10):H1237.
- [11] Lin KW, Huang AM, Tu HY, et al. Xanthine oxidase inhibitory triterpenoid and phloroglucinol from guttiferaceous plants inhibit growth and induced apoptosis in human NTUB1 cells through a ROS-dependent mechanism[J]. *J Agric Food Chem*, 2011,59(1):407.
- [12] Cerda O, Trimmer JS. Activity-dependent phosphorylation of neuronal Kv2.1 potassium channels by CDK5[J]. *J Biol Chem*, 2011,286(33):28738.

(收稿日期:2013-01-18 修回日期:2013-03-27)