

槐定碱对心肌梗死大鼠心功能及心肌细胞超微结构的影响

路红, 沈亚峰, 曹密, 宋晓伟, 汤莹, 杨勇骥*

第二军医大学基础部生物物理学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的** 研究槐定碱对心肌梗死大鼠心功能及心肌细胞超微结构的影响。**方法** 采用结扎冠状动脉左前降支方法制备SD大鼠心肌梗死模型, 随机分为模型对照组和槐定碱低、中、高(5、10、20 mg/kg)剂量组, 另设假手术组, 每组10只。实验结束后测定左室舒张末压(LVEDP), 左室内压最大上升、下降速率($\pm dp/dt_{\max}$)和心脏质量指数(HM/BM), 用透射电子显微镜观察各组大鼠心肌细胞超微结构的变化。**结果** 与假手术组相比, 模型对照组的 $\pm dp/dt_{\max}$ 降低, LVEDP升高, HM/BM升高(P 均 <0.01); 与模型对照组相比, 加药各组的 $\pm dp/dt_{\max}$ 升高, LVEDP降低, HM/BM降低, 除低剂量组 $-dp/dt_{\max}$ 外, 余者与模型对照组相比差异均有统计学意义($P<0.01, P<0.05$); 电镜结果显示假手术组大鼠心肌细胞肌丝排列整齐, 线粒体结构正常。模型对照组大鼠心肌细胞肌丝溶解, 线粒体肿胀, 嵴模糊不清, 有显著的病理学改变; 槐定碱低剂量组的肌丝溶解有轻微恢复, 中、高剂量组肌丝溶解现象消失, 肌丝排列整齐。**结论** 槐定碱能改善心肌梗死大鼠的心功能, 减轻心肌细胞超微结构的损伤。

[关键词] 槐定碱; 心肌梗死; 心脏功能; 超微结构**[中图分类号]** R 542.22 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)05-0470-04

Effects of sophoridine on cardiac function and myocardial ultrastructure of rats with myocardial infarction

LU Hong, SHEN Ya-feng, CAO Mi, SONG Xiao-wei, TANG Ying, YANG Yong-ji*

Department of Biophysics, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To explore the effects of sophoridine on cardiac function and myocardial ultrastructure of rats with myocardial infarction. **Methods** The SD rat model of myocardial infarction (MI) was obtained by permanent ligation of the left anterior descending coronary artery (LAD), and the model rats were randomly divided into model group (rats with MI), low-dose group (5 mg/kg sophoridine), middle-dose group (10 mg/kg sophoridine), and high-dose group (20 mg/kg sophoridine); a sham operated group was also included. Each group had 10 rats. The elevated left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP), $\pm dp/dt_{\max}$ and heart mass/body mass (HM/BM) were determined after experiment, and the changes of myocardial ultrastructure were observed by transmission electron microscope. **Results** Compared with the sham operated group, $\pm dp/dt_{\max}$ in MI group was significantly decreased, and LVEDP and HM/BM were remarkably increased (all $P<0.01$). Compared with MI group, $\pm dp/dt_{\max}$ in the 3 sophoridine groups were significantly increased, and LVEDP and HM/BM were significantly decreased ($P<0.01, P<0.05$), except for $-dp/dt_{\max}$ in the low-dose sophoridine group. Transmission electron microscope found that the myofilaments of myocardial cells in the sham operated group were well arranged, with normal mitochondria. The myofilaments were dissolved in MI rats, with swollen mitochondria and blurred cristae, showing distinct pathological changes. There was a slight improvement in myofilament dissolution in the low-dose sophoridine group, and the myofilament dissolution disappeared in the middle- and high-dose group, with well arranged myofilaments. **Conclusion** Sophoridine can improve the cardiac function of MI rats, and has protective effects on ultrastructure of myocardial cells.

[Key words] sophoridine; myocardial infarction; heart function; ultrastructure

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(5): 470-473]

心肌梗死(myocardial infarction, MI)是临床心血管科的多发病, 其发病急且病死率高, 而且会引起

心室重构, 并导致患者心力衰竭。近年来心肌梗死的发病率和病死率不断上升, 已成为导致死亡的主

[收稿日期] 2012-01-11 **[接受日期]** 2012-03-31**[基金项目]** 军队医药卫生“十一五”科研项目(06MB202)。Supported by “the 11th-five-year Plan” for Military Medicine Research Project (06MB202).**[作者简介]** 路红, 硕士生. E-mail: avoy-1@163.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81870923, E-mail: yjyang22@163.com

要心血管疾病之一,严重威胁着人类的生存健康。一直以来,对于心肌梗死的病理生理过程及分子生物学变化、药物干预及治疗的探索是国内外医学研究的重点。槐定碱(sophoridine)是从豆科槐属植物苦豆子 *Sophora alopecuroides* L. 中分离的单体生物碱^[1]($C_{15}H_{24}N_2O$,相对分子质量:248.36),其基本结构是由2个三价氮原子稠和的双哌啶环。近年来发现槐定碱在抗心律失常、增强心肌收缩力、抗炎、增强免疫及抗肿瘤等^[2-6]方面有重要的药理活性和应用前途,已有文献报道槐定碱能改善急性心肌缺血损伤的心功能变化,并减轻心肌超微结构的损伤^[7-8],但槐定碱对心肌梗死大鼠心肌的保护作用却少有报道。本研究探讨了不同剂量槐定碱对心肌梗死大鼠心功能及心肌细胞超微结构变化的影响,以期拓宽槐定碱的临床药用价值提供基础性实验资料。

1 材料和方法

1.1 材料 雄性SD大鼠(6~7周龄),体质量(200±20)g(上海西普尔-必凯实验动物有限公司);盐酸槐定碱注射液(通化方大药业股份有限公司,批号:国药准字H20051681);ALC-V8动物呼吸机(上海奥尔科特生物科技有限公司);MPA2000多道信号分析仪(上海奥尔科特生物科技有限公司);万分之一精度电子分析天平(Mettler Toledo公司);H-7650(日本Hitachi公司);UC-6超薄切片机(德国Leica公司)。

1.2 心肌梗死大鼠模型制备 采用冠状动脉左前降支结扎法制备心肌梗死模型^[9-11]。雄性SD大鼠腹腔注射10%水合氯醛(4 ml/kg),麻醉后行气管插管,于胸骨左缘第3、4肋间开胸,在左心耳和肺动脉圆锥交界稍下方1~2 mm处结扎,肉眼可见左心室前壁颜色变白、标准肢体II导联心电图ST段抬高,即为结扎成功。假手术组除只穿线不结扎冠状动脉外,其余步骤相同。闭合胸腔,大鼠自然清醒后常规饲养。造模结束后随机各取5只假手术组大鼠和造模大鼠测定心功能指标,若两组指标差异有统计学意义,确认模型制备成功。

1.3 实验分组及处理 将成模大鼠随机分为模型对照组和槐定碱低、中、高(5、10、20 mg/kg)剂量组,另设假手术组,每组10只。槐定碱低、中、高剂量组用相应剂量槐定碱腹腔注射给药,假手术组和模型对照组给予等体积生理盐水,每日1次,连续4周。

1.4 大鼠心功能测定 实验结束,腹腔注射10%水合氯醛(4 ml/kg)麻醉大鼠,进行心功能检测^[10]。称质量,剪开颈部皮肤,暴露并钝性分离右侧颈动脉,

插入自制硬塑管至左心室,导管另一端连接压力传感器,通过MPA2000多道信号分析仪同步记录心率(HR)、左心室舒张末压(LVEDP)、左室内压最大上升速率($+dp/dt_{max}$)、左室内压最大下降速率($-dp/dt_{max}$)。

1.5 心脏质量指数 心功能记录完毕后,立即摘取心脏置于冷生理盐水中清洗残留血液,滤纸吸干水份,分析天平称取心脏质量,计算心脏质量指数^[12](HM/BM,心质量/体质量)。

1.6 大鼠心肌细胞超微结构观察 按照常规透射电镜样品制备技术^[13]制样。切取所需部位心肌组织,切成1 mm³的小块,置于4%多聚甲醛固定液中4℃固定,0.1 mol/L PBS充分漂洗,锇酸固定2 h,梯度乙醇、丙酮脱水,浸透,环氧树脂包埋,超薄切片机切片,经醋酸铀和柠檬酸铅染色后,透射电镜下观察,拍照记录超微结构。

1.7 统计学处理 采用SPSS 11.0统计软件包进行分析。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。以方差分析(ANOVA)比较组间差异,如差异有统计学意义,进一步用LSD法进行两两比较。检验水平(α)为0.05。

2 结果

2.1 槐定碱对心肌梗死大鼠HM/BM及心功能的影响 与假手术组相比,模型对照组大鼠体质量降低12.27%($P<0.01$),HM/BM升高31.06%($P<0.01$)。与模型对照组相比,槐定碱低剂量组大鼠体质量升高4.45%($P<0.01$),HM/BM降低5.69%($P<0.01$);槐定碱中剂量组体质量升高9.36%($P<0.01$),HM/BM降低20.62%($P<0.01$);槐定碱高剂量组体质量升高7.83%($P<0.01$),HM/BM降低22.51%($P<0.01$)。见表1。

各组大鼠HR差异无统计学意义。与假手术组相比,模型对照组大鼠LVEDP升高($P<0.01$), $\pm dp/dt_{max}$ 降低($P<0.01$)。与模型对照组相比,槐定碱中剂量和高剂量组大鼠的LVEDP降低($P<0.01$), $\pm dp/dt_{max}$ 升高($P<0.01$);槐定碱低剂量组的各指标中LVEDP降低($P<0.05$), $+dp/dt_{max}$ 升高($P<0.01$), $-dp/dt_{max}$ 变化不明显($P>0.05$)。见表1。

2.2 槐定碱对心肌梗死大鼠心肌细胞超微结构的影响 各组大鼠心肌细胞超微结构结果显示,假手术组大鼠心肌细胞肌丝排列整齐,线粒体结构完整,嵴结构清楚(图1A)。模型对照组大鼠心肌细胞出现肌丝断裂溶解现象,大多数肌丝排列松散且发生错位,线粒体电子密度增大,部分线粒体的嵴结构模糊不清,且出现溶解现象(图1B)。低剂量药物干预

组心肌细胞肌丝溶解有轻微恢复,肌丝排列较整齐,线粒体嵴可分辨(图1C)。中剂量药物干预组大鼠心肌细胞肌丝排列整齐,线粒体结构基本完整,大多

数嵴清晰可见(图1D)。高剂量药物干预组大鼠心肌细胞未见肌丝溶解,肌丝排列整齐,明暗带分明,但线粒体电子密度较高(图1E)。

表 1 各组大鼠心脏质量指数及心功能指标的测定

Tab 1 Detection of HM/BM and cardiac function in rats of different groups

$n=10, \bar{x} \pm s$

Group	BM m/g	HM/BM $m_B/(mg \cdot g^{-1})$	HR f/min^{-1}	LVEDP p/mmHg	$+dp/dt_{\max}$ $(\text{mmHg} \cdot \text{s}^{-1})$	$-dp/dt_{\max}$ $(\text{mmHg} \cdot \text{s}^{-1})$
Sham	435.13±9.75	3.22±0.21	430.9±8.45	3.69±0.29	4 151.41±176.83	3 190.31±189.15
MI	381.75±11.37**	4.22±0.13**	424.0±8.62	8.20±0.49**	2 499.11±147.17**	1 603.17±204.05**
Sophoridine						
5 mg · kg ⁻¹	398.75±8.17△△	3.98±0.18△△	425.1±7.75	7.83±0.32△	2 717.40±172.45△△	1 619.31±197.47
10 mg · kg ⁻¹	417.50±15.25△△	3.35±0.17△△	428.1±6.59	4.92±0.33△△	3 888.77±193.29△△	2 642.27±201.77△△
20 mg · kg ⁻¹	411.63±13.71△△	3.27±0.15△△	425.3±5.93	5.06±0.31△△	3 837.54±198.51△△	2 703.86±187.12△△

BM: Body mass; HM/BM: Heart mass/body mass; HR: Heart rate; LVEDP: Left ventricular end-diastolic pressure; MI: Myocardial infarction. 1 mmHg=0.133 kPa. ** $P<0.01$ vs sham operated group; $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ vs MI group

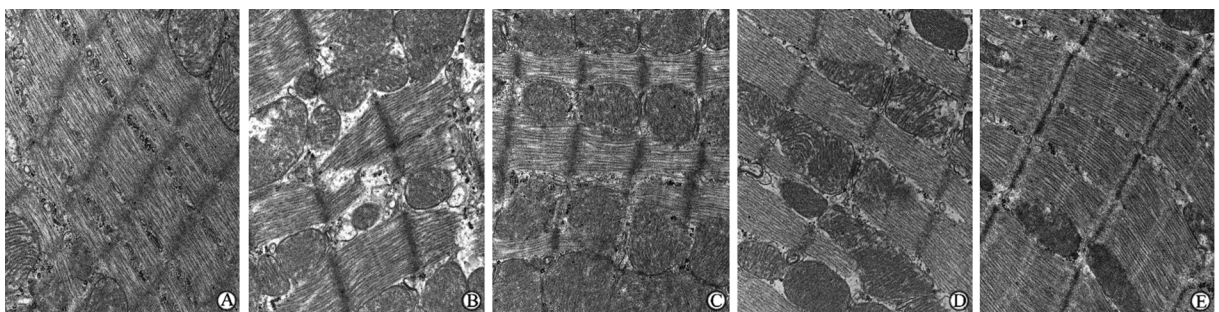


图 1 各组大鼠心肌细胞超微结构

Fig 1 Ultrastructure of rat myocardial cells in each group

MI: Myocardial infarction. A: Sham operated group; B: MI group; C: Low-dose (5 mg · kg⁻¹) sophoridine group; D: Middle-dose (10 mg · kg⁻¹) sophoridine group; E: High-dose (20 mg · kg⁻¹) sophoridine group. Original magnification: $\times 30\ 000$

3 讨论

心肌梗死后心肌纤维化可引起心室重塑,导致心肌收缩和舒张功能下降,并出现钙超载、心肌能量缺乏及酸中毒等引起的心肌缺血损伤,随着心肌病变和心室重构的进一步发展,可引起心肌质的变化,导致慢性心力衰竭的发生和发展。LVEDP和 $-dp/dt_{\max}$ 是反映心脏舒张功能的指标,而 $+dp/dt_{\max}$ 对收缩力变化较敏感,能定量评价心肌收缩能力,是反映心脏收缩功能的指标^[14-15]。本实验中,模型对照组 $\pm dp/dt_{\max}$ 降低,LVEDP升高,HM/BM升高,提示模型对照组大鼠发生心肌重塑而出现心肌肥大,心脏收缩和舒张功能减退。低剂量加药组与模型对照组比较, $-dp/dt_{\max}$ 变化不明显,但LVEDP和 $+dp/dt_{\max}$ 均有明显改善;中、高剂量组与模型对照组相比,LVEDP降低, $\pm dp/dt_{\max}$ 升高,HM/BM降低,说明槐定碱改善了心肌肥大的现象,

并且心肌梗死大鼠的舒张和收缩功能有了一定程度的恢复。

心肌细胞超微结构的改变是衡量心肌损伤的直观指标。与骨骼肌细胞相似,心肌细胞结构上最明显的特点是富含大量排列有序的肌原纤维,肌纤维是心肌收缩和舒张功能的主要参与者,其损伤必然导致心脏收缩性的下降,因此,心肌纤维的结构完整与否对心肌收缩功能有关键性的影响^[16]。本研究电镜结果显示模型对照组大鼠心肌细胞的部分肌丝断裂溶解,槐定碱干预组的肌丝溶解逐渐恢复至溶解现象消失,肌丝排列整齐紧密,说明槐定碱改善了心肌梗死大鼠的心肌肌丝损伤。线粒体是细胞能量转换的主要场所,心肌中线粒体构成心肌细胞胞质的30%左右,几乎参与了胞质中所有的代谢过程^[17]。有文献报道心脏衰竭时线粒体的结构发生紊乱^[18-19],而且功能出现异常^[20-21]。本研究电镜结果显示模型对照组部分线粒体嵴模糊不清,电子密

度增大,造成线粒体结构损伤,低剂量和中剂量加药组线粒体嵴均有一定程度的恢复,说明一定浓度的槐定碱对心肌梗死大鼠心肌细胞线粒体的超微结构损伤有改善作用,高剂量组中线粒体嵴电子密度仍较高,可能是由于高剂量槐定碱对机体产生了药物毒性,李雪梅等^[6,22]有过这方面报道。

本研究可得出如下结论:槐定碱能改善心肌梗死大鼠的心功能,并减轻心肌细胞超微结构(肌丝和线粒体)损伤。由于线粒体在细胞能量转换中起重要作用,而且对缺血缺氧环境具有敏感性,在缺血缺氧的环境下,线粒体通过呼吸链会产生大量的活性氧,导致脂质过氧化反应,并产生一系列的级联反应,从而损伤细胞^[23-24],而本实验所采用的结扎冠状动脉左前降支制备大鼠模型的方法能造成大鼠左心室大面积缺血,使得左心室大部分细胞处在缺血缺氧的环境下,因此我们拟采用该模型进一步探索槐定碱对心脏的保护作用是否与抗氧化损伤有关。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 田真真,万红娇,杨翠萍. 槐定碱的药理研究综述[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16:219-221.
- [2] 谢世荣,黄彩云,黄胜英. 槐定碱抗心律失常作用的实验研究[J]. 大连大学学报,2002,23:104-107.
- [3] 刘太华,刘德芳,王骏,汪晓军,罗陈. 苦参碱、氧化苦参碱和槐定碱对巨噬细胞 RAW264.7 表达 CD91、CD13 和分泌 TNF- α 的抑制作用[J]. 第二军医大学学报,2010,31:399-403. Liu T H, Liu D F, Wang J, Wang X J, Luo C. Matrine, oxymatrine and sophoridine inhibit secretion of TNF- α and expression of CD91 and CD13 in macrophage RAW264.7[J]. Acad J Sec Mil Med Univ,2010,31:399-403.
- [4] Zhao W C, Song L J, Deng H Z. Effect of sophoridine on dextran sulfate sodium-induced colitis in C57BL/6 mice[J]. J Asian Nat Prod Res,2010,12:925-933.
- [5] 王启瑞,黎春华,符秀琼,刘亚伟,唐靖,范钦,等. 槐定碱对裸鼠移植性实体瘤 SW480 生长及 p53、VEGF 表达作用的研究[J]. 南方医科大学学报,2010,30:1593-1596.
- [6] 李雪梅,吴运光,潘达鑫,吴联奎,余月华,张爱华,等. 新型抗肿瘤药槐定碱[J]. 中国新药杂志,2006,15:654-657.
- [7] 丁娟,赵薇,彭涛,聂黎虹,周永忠,周旭. 槐定碱对急性心肌梗死大鼠心功能的影响[J]. 时珍国医国药,2010,21:348-350.
- [8] 丁娟,赵琳,刘红梅,周旭. 槐定碱对急性心肌梗死大鼠心肌细胞超微结构的影响[J]. 宁夏医科大学学报,2010,32:

950-952.

- [9] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社,2001:1053-1054.
- [10] Lin L, Kim S C, Wang Y, Gupta S, Davis B, Simon S I, et al. HSP60 in heart failure: abnormal distribution and role in cardiac myocyte apoptosis[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007,293:H2238-H2247.
- [11] 田颖,王江,李振魁,祝善俊,聂凌,宋熔. 大鼠心肌梗死后心力衰竭模型的建立和评估[J]. 心脏杂志,2006,18:404-405,410.
- [12] 李永民,王保和,贺金,王新生,刘华. 和营安心方对心肌梗死大鼠心功能及心肌细胞内钙离子浓度的影响[J]. 中华中医药杂志,2009,24:536-538.
- [13] 杨勇骥. 实用生物医学电子显微镜技术[M]. 上海:第二军医大学出版社,2003:73-74.
- [14] 洪创雄,李南夷,邓秀娟,李高兴,杨忠奇. 养心方对慢性心衰血流动力学的影响[J]. 中药新药与临床药理,2007,18:298-300.
- [15] 李梅秀,田国忠,欧叶涛,宋汉君,赵勇,王鹏. 大鼠阿霉素慢性心衰模型的制备与心衰指标的判定[J]. 解剖学研究,2005,7:176-178.
- [16] van Heerebeek L, Borbély A, Niessen H W, Bronzwaer J G, van der Velden J, Stienen G J, et al. Myocardial structure and function differ in systolic and diastolic heart failure[J]. Circulation, 2006,113:1966-1973.
- [17] Babcock D F, Herrington J, Goodwin P C, Park Y B, Hille B. Mitochondrial participation in the intracellular Ca²⁺ network[J]. J Cell Biol,1997,136:833-844.
- [18] Joubert F, Wilding J R, Fortin D, Domergue-Dupont V, Novotova M, Ventura-Clapier R, et al. Local energetic regulation of sarcoplasmic and myosin ATPase is differently impaired in rats with heart failure[J]. J Physiol,2008,586(Pt 21):5181-5192.
- [19] van Hees H W, van der Heijden H F, Hafmans T, Ennen L, Heunks L M, Verheugt F W, et al. Impaired isotonic contractility and structural abnormalities in the diaphragm of congestive heart failure rats[J]. Int J Cardiol,2008,128:326-335.
- [20] Ong S B, Hausenloy D J. Mitochondrial morphology and cardiovascular disease[J]. Cardiovasc Res,2010,88:16-29.
- [21] Elas M, Bielanska J, Pustelny K, Plonka P M, Drelicharz L, Skorka T, et al. Detection of mitochondrial dysfunction by EPR technique in mouse model of dilated cardiomyopathy[J]. Free Radic Biol Med,2008,45:321-328.
- [22] 李雪梅,庄文华,姜莺滋,潘达鑫,余月华,龚自力. 高剂量槐定碱对大鼠神经系统长期毒性的病理形态学观察[J]. 癌症,2004,23(11s):1376-1378.
- [23] Bulteau A L, Bayot A. Mitochondrial proteases and cancer[J]. Biochim Biophys Acta,2011,1807:595-601.
- [24] Vendelbo M H, Nair K S. Mitochondrial longevity pathways[J]. Biochim Biophys Acta,2011,1813:634-644.

[本文编辑] 尹茶