· 实验研究 ·

叶黄素对大鼠心肌纤维化保护作用*

赵丽晶[1], 李贺[2], 赵宗仁[2], 余召辉[2], 时宇佳[2], 柏玲[2], 丁佳明[2]

摘　要: 目的　探讨叶黄素(lutein)对异丙肾上腺素(ISO)诱导的大鼠心肌纤维化保护作用及机制。**方法**　60 只大鼠随机分为 6 组,除对照组外,其余各组大鼠皮下注射 ISO 5 mg/kg,连续 7 d;造模第 2 d,低、中、高剂量叶黄素组大鼠灌胃给予 lutein 20、40、80 mg/kg,阳性对照组大鼠给予卡托普利(cap)10 mg/kg,模型组和对照组大鼠给予等量蒸馏水,连续 28 d。检测大鼠心脏指数、心电图、运动耐力、心肌组织中羟脯氨酸(HYP)、谷胱甘肽(GSH)、丙二醛(MDA)含量和血清中超氧化物歧化酶(SOD)含量;苏木素-伊红染色(HE)观察大鼠心肌病理学变化。**结果**　与对照组比较,模型组大鼠运动耐力降低、心指数与左心室指数〔分别为(3.73 ± 0.58)、(2.57 ± 0.43) mg/g〕增加(P < 0.01),心率明显增加,心肌组织中 HYP、MDA 含量〔分别为(0.48 ± 0.07) g/mg、(2.37 ± 0.84) nmol/mgpr〕升高(P < 0.05),心肌组织中 GSH 含量、血清中 SOD 水平〔分别为(55.19 ± 2.08) U/mg、(512.17 ± 26.48) U/mL〕明显下降(P < 0.01),心肌组织间质成分增多,细胞核间距较宽,有大量炎性细胞浸润且纤维组织增生伴心肌萎缩;与模型组比较,高剂量叶黄素组大鼠运动耐力提高、心指数与左心室指数〔分别为(3.02 ± 0.28)、(2.09 ± 0.17) mg/g〕降低(P < 0.01),心肌组织中 HYP 和丙二醛含量〔分别为(0.28 ± 0.06) g/mg、(1.89 ± 0.61) nmol/mgpr〕明显降低(P < 0.05),心肌组织中 GSH 含量、血清中 SOD 水平〔分别为(72.70 ± 0.05) U/mg、(571.19 ± 15.58) U/mL〕明显升高(P < 0.01),心肌组织间质成分略增多,无炎细胞浸润,可见轻度纤维组织增生,无心肌萎缩。**结论**　叶黄素对异丙肾上腺素所致大鼠心肌纤维化具有一定保护作用,其机制可能与改善大鼠机体抗氧化能力有关。

关键词: 纤维化; 叶黄素; 异丙肾上腺素; 心电图; 羟脯氨酸

中图分类号: R 181.2+4　**文献标志码**: A　**文章编号**: 1001-0580(2017)11-1603-04　DOI: 10.11847/zgggws2017-33-11-16

Protectional effect of lutein on myocardial fibrosis in rats

ZHAO Li-jing*, LI He, ZHAO Zong-ren, et al (* *College of Basic Medicine, Jilin Medical University, Jilin, Jilin Province* 132013, China)

Abstract: Objective　To explore the protective effect and mechanism of lutein on myocardial fibrosis induced by isopropyl adrenaline in rats. **Methods**　Sixty Wistar rats (half male and half female) were divided into six groups randomly. All the rats were subcutaneously injected with isoproterenol (Iso) at the dose of 5 mg/kg/d for 7 consecutive days to establish myocardial fibrosis model, except for those of the normal control group. At the second day of Iso treatment, the rats of low-, moderate-, and high-lutein groups were gavaged with lutein at the dosages of 20, 40, and 80 mg/kg/d and the rats of positive control group were gavaged with captopril (10 mg/kg/d); the rats of model and normal control group were given distilled water of same quantity for 28 consecutive days. By the end of last treatment, the heart weight index of the rats were calculated; BI-420E + biological function experiment system was adopted to detect the heart function, electrocardiogram, and exercise endurance of the rats; hydroxyproline (HYP), glutathione (GSH), and malondialdehyde (MDA) in myocardial tissues and serum superoxide dismutase (SOD) were measured; and myocardial pathological changes of the rats were observed with hematoxylin-eosin (HE) staining. **Results**　Compared with the normal control rats, the model rats showed decreased exercise tolerance, significantly increased heart weight index (HWI) (3.73 ± 0.58 mg/g) and left ventricular mass index (LVMI) (2.57 ± 0.43 mg/g) (both P < 0.01) and obviously increased heart rate. Significantly increased HYP (0.48 ± 0.07 g/mg), MDA (2.37 ± 0.84 nmol/mgpr), and GSH (55.19 ± 2.08 U/mg) (P < 0.05 for all) in myocardial tissues and significantly decreased serum SOD (512.17 ± 26.48 U/ml) (P < 0.01) were detected in the model rats. The increase of stroma components, distance enlargement between cell nucleus, large number of inflammatory cells, and fibrous hyperplasia complicated with myocardial hypotrophy were observed in myocardial tissues of the model rats. Compared with the model rats, the rats with high-dose lutein treatment exhibited increased exercise tolerance, significantly decreased HWI (3.02 ± 0.28 mg/g) and LVMI (2.09 ± 0.17 mg/g) (both P < 0.01), remarkably decreased myocardial HYP (0.28 ± 0.06 g/mg) and MDA (1.89 ± 0.61 nmol/mgpr) (both P < 0.05) and obviously increased myocardial GSH (72.70 ± 0.05 U/mg) and serum SOD (571.19 ± 15.58 U/ml) (both P < 0.01). Minor increase of stroma components and fibrous hyperplasia but no inflammatory cell infiltration and hypotrophy were observed in myocardial tissues of the rats with high-dose lutein treatment. **Conclusion**　Lutein presents certain protective effect on isopropyl adrenaline-induced myocardial fibrosis in rats and the mechanism of the effect may be related to the improvement of antioxidant ability.

Key words: fibrosis; lutein; isoproterenol; electrocardiogram; hydroxyproline

* **基金项目**: 吉林省教育厅"十二五"科学技术研究项目(2015396)
作者单位: 1. 吉林医药学院基础医学院,吉林 吉林 132013; 2. 吉林医药学院临床医学院 2012 级临床本科
作者简介: 赵丽晶(1971 -),女,吉林公主岭人,副主任医师,硕士,研究方向:心血管药理。
数字出版日期: 2017 - 2 - 4 11:29
数字出版网址: http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20170204.1129.024.html

心肌纤维化是指在正常的心肌组织中胶原含量明显升高或胶原成分发生改变[1],心脏收缩功能障碍,最终导致心力衰竭。据国家心血管疾病中心报告,在 2014 年中国心血管疾病患病率处于持续上升阶段,全国该病患者已高达 2.9 亿,每 5 个成人中就有 1 人患病,住院总费用每年高达千亿元,严重影响中国经济发展和居民的生活质量[2]。因此,寻求有效的药物保护心肌组织、预防治疗心血管疾病至关重要[3]。叶黄素(lutein)是一种广泛存在于蔬菜、水果、花卉等植物中的天然类胡萝卜素,因其安全无毒、富有营养、无副作用等优点,越来越受到人们的重视[4-5]。Lutein 分子有一条含 40 个碳原子的长链,有多个共轭双键,这些共轭双健使 lutein 具有很强的抗氧化能力[6],通过抑制氧自由基和调节机体氧化应激水平有效减轻心肌细胞的氧化损伤,从而对心肌组织起到保护作用。近年来研究表明,叶黄素具有预防视黄斑退化、抗动脉硬化、抗肿瘤等作用[7-8],但对心肌纤维化的保护作用研究较少。本研究采用异丙肾上腺素(isoprenaline, ISO)建立大鼠心肌纤维化模型,探讨叶黄素对心肌纤维化的保护作用及机制,结果报告如下。

1　材料与方法

1.1　*实验动物*　Wistar 大鼠 60 只(200 ~ 300 g),雌雄各半,由吉林大学基础医学部实验动物中心提供,许可证号:SCXK (吉) 2014 - 0005。饲养条件:室温(25 ± 2)℃,湿度 50% ~ 70%,昼夜节律时间 12 h/12 h、自由摄食饮水。

1.2　*主要试剂与仪器*　叶黄素(lutein)(西安草翠芯生物科技有限公司),纯度:80.14%,批号:Lu150516;ISO(西安融升生物科技有限公司),批号:140202;卡托普利(captopril, cap)(上海普康药业有限公司)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malon dialdehy de, MDA)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)和羟脯氨酸(hydroxyproline, HYP)试剂盒(南京建成生物工程研究所)。BL-420E + 生物机能实验系统、FT-200 大鼠跑步机(成都泰盟科技有限公司)、722 分光光度计(上海光学仪器厂)。

1.3　*分组与处理*　大鼠适应性饲养 1 周后,用乙醚吸入麻醉,BL-420E + 生物信号采集系统描记大鼠心电图和心率,进行筛选实验;选出正常大鼠 60 只,按体重随机分为对照组、模型组、阳性对照组、叶黄素低、中、高剂量组,每组 10 只。除对照组外,其余各组大鼠颈背部皮下注射 ISO 溶液 5 mg/kg,连续 7 d,复制心肌纤维化模型,对照组皮下注射等量生理盐水;造模第 2 天开始灌胃给药,阳性对照组大鼠给予 cap 10 mg/kg,模型组、对照组大鼠给予等量蒸馏水,低、中、高剂量叶黄素组大鼠分别给予 lutein 20、40、80 mg/kg,连续 28 d。

1.4　*指标与方法*

1.4.1　*运动耐力和心脏指数测定*　末次给药后,采用大鼠跑步机检测大鼠运动耐力,大鼠跑步体力衰竭时滑落跑带被电击的次数作为衡量大鼠运动耐力的指标,电击次数与运动耐力成反比,跑步机速度为 14 m/min,坡度为 10 度,时间为 6 min。大鼠跑步结束后禁食水 12 h,称量体重,用 10% 水合氯醛(3 mL/kg)腹腔注射麻醉,采用 BL-420E + 生物机能实验系统描记大鼠心电图,然后取血、全心和左心室,分别称量全心和左心室重量,计算心指数与左心室指数(mg/g)。

1.4.2　*生化指标检测*　取左心室心肌组织 80 mg,采用碱水解法测定 HYP 含量,硫代巴比妥酸法测 MDA 含量,二硫代-双-硝基苯甲酸法测 GSH 含量;腹主动脉取血,离心(3 000 r/min)10 min,取血清,采用羟胺法测 SOD 含量,严格按照试剂盒说明书操作。

1.4.3　*心脏组织病理学观察*　取大鼠左心室组织约 1.2 cm × 0.9 cm × 0.3 cm,4% 多聚甲醛溶液固定,经石蜡包埋后,沿组织切面连续切片 5 张,每张厚约 5 μm,常规苏木素-伊红染色(HE),光镜 10 × 40 倍视野下观察心肌病理结构变化。

1.5　*统计分析*　数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.5 软件进行统计分析,多个样本均数比较采用单因素方差分析,两两比较采用最小显著差法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　*叶黄素对心肌纤维化大鼠心指数及运动耐力影响(表 1)*　与对照组比较,模型组大鼠造模后烦躁、易激惹等,心指数与左心室指数增加,运动耐力(被电击次数)下降($P < 0.01$);与模型组比较,阳性对照组大鼠左心指数和运动耐力均增加($P <$

表 1　叶黄素对心肌纤维化大鼠心指数和运动耐力影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 (mg/kg)		心指数 (mg/g)	左心室指数 (mg/g)	运动耐力 (电击次数)
对照组		2.82 ± 0.22	1.98 ± 0.16	1.28 ± 0.11
模型组		3.73 ± 0.58^b	2.57 ± 0.43^b	12.71 ± 0.92^b
叶黄素	20	3.13 ± 0.40^c	2.19 ± 0.27^c	5.42 ± 0.23^c
	40	2.82 ± 0.17^d	1.99 ± 0.12^d	4.42 ± 0.23^d
	80	3.02 ± 0.28^d	2.09 ± 0.17^d	2.14 ± 0.34^d
阳性对照组		3.26 ± 0.61	2.01 ± 0.29^c	7.14 ± 0.69^c

注:与对照组比较,a $P < 0.05$,b $P < 0.01$;与模型组比较,c $P < 0.05$,d $P < 0.01$。

0.05)，叶黄素各剂量组大鼠心指数与左心室指数明显降低，运动耐力明显升高($P<0.05$)。

2.2　叶黄素对心肌纤维化大鼠心肌组织中 HYP 含量影响　对照组、模型组、叶黄素低、中、高剂量组、阳性对照组大鼠心肌组织中 HYP 含量分别为(0.25 ± 0.04)、(0.48 ± 0.07)、(0.39 ± 0.06)、(0.38 ± 0.03)、(0.28 ± 0.06)、(0.37 ± 0.011) g/mg；与对照组比较，模型组大鼠心肌组织中 HYP 含量明显升高，差异有统计学意义($P<0.01$)；与模型组比较，叶黄素高剂量组大鼠心肌组织中 HYP 含量明显下降($P<0.01$)。

2.3　叶黄素对心肌纤维化大鼠心电图影响(表 2)　与对照组比较，模型组大鼠心电图 PR 间期缩短，J 点(即 ST 段)明显下移，心率明显加快($P<0.01$)；与模型组比较，中、高剂量叶黄素组大鼠心电图 PR 间期延长，J 点下移不明显，心率明显减慢($P<0.05$)。

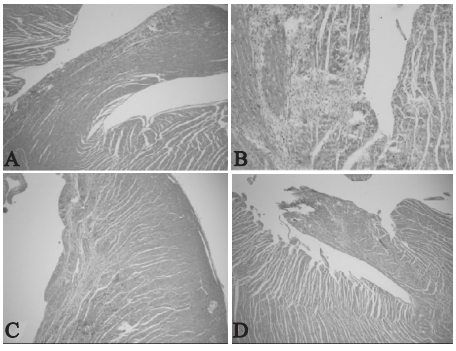
表 2　叶黄素对心肌纤维化大鼠心电图影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别 (mg/kg)		PR 间期 (ms)	J 点位移 (mV)	心率 (次/min)
对照组		46.5 ± 2.1	0.041 ± 0.05	369.33 ± 20.34
模型组		31.2 ± 4.2[b]	0.324 ± 0.06[b]	298.73 ± 22.54[b]
叶黄素	20	31.5 ± 5.7	0.273 ± 0.02[c]	288.74 ± 21.01
	40	33.4 ± 4.9[c]	0.264 ± 0.02[c]	312.35 ± 37.17[c]
	80	35.8 ± 5.2[d]	0.182 ± 0.04[d]	388.66 ± 29.91[d]

注：与对照组比较，b $P<0.01$；与模型组比较，c $P<0.05$，d $P<0.01$。

2.4　叶黄素对心肌纤维化大鼠心肌病理结构影响(图 1)　结果显示，对照组大鼠心肌组织肌束排列整齐、肌细胞形态完整且未见病理性肥大，无胶原组织增生且无炎细胞浸润(图 1A)；模型组大鼠心肌组织间质成分明显增多且不规则，细胞核间距较宽，有大量炎性细胞浸润，纤维组织增生伴心肌萎缩(图 1B)；阳性对照组大鼠心肌细胞肥大，部分肌束断裂，间质中可见胶原组织增生及淋巴细胞浸润(图 1C)；高剂量叶黄素组大鼠心肌组织间质成分略增多，无炎细胞浸润，可见轻度纤维组织增生，无心肌萎缩(图 1D)。

2.5　叶黄素对心肌纤维化大鼠抗氧化能力影响(表 3)　与对照组比较，模型组大鼠心肌组织中 MDA 含量升高($P<0.05$)、GSH 含量明显下降($P<0.01$)，血清中 SOD 水平下降($P<0.01$)；与模型组比较，阳性对照组大鼠心肌组织中 GSH 活性增加($P<0.05$)，叶黄素高剂量组大鼠心肌组织中 MDA 含量明显降低($P<0.05$)，叶黄素中、高剂量组大鼠心肌组织中 GSH 含量、血清中 SOD 水平明显升高($P<0.01$)。



注：A：对照组；B：模型组；C：阳性对照组；D：叶黄素组(80 mg/kg)。

图 1　叶黄素对心肌纤维化大鼠心肌组织病理结构影响(HE，×400)

表 3　叶黄素对心肌纤维化大鼠机体抗氧化能力影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别 (mg/kg)		MDA (nmol/mgpr)	SOD (U/mL)	GSH (U/mg)
对照组		2.04 ± 0.73	589.42 ± 30.59	73.28 ± 1.58
模型组		2.37 ± 0.84[a]	512.17 ± 26.48[b]	55.19 ± 2.08[b]
叶黄素	20	2.36 ± 0.39	518.68 ± 36.70	58.99 ± 1.65
	40	2.20 ± 0.77	541.80 ± 14.87[c]	65.62 ± 0.23[c]
	80	1.89 ± 0.61[c]	571.19 ± 15.58[d]	72.70 ± 0.05[d]
阳性对照组		2.25 ± 0.35	510.34 ± 18.89	67.34 ± 0.13[c]

注：与对照组比较，a $P<0.05$，b $P<0.01$；与模型组比较，c $P<0.05$，d $P<0.01$。

3　讨　论

心肌纤维化普遍存在于各种心血管疾病的发展过程中，是决定疾病预后的重要因素，其病理改变为心肌成纤维细胞增多和组织胶原蛋白过量积聚，由缺氧缺血和炎性因子等导致。HYP 是构成胶原蛋白的特有成分之一，正常情况下，HYP 占胶原蛋白总含量的 13.4%。在弹性蛋白中含量很少，不存在于其他蛋白中。因此，组织中 HYP 含量成为衡量纤维化程度的重要指标之一[9]。心肌纤维化动物模型制备方法很多，本研究采用 ISO 药物诱导法[10-11]。ISO 为 β 肾上腺素受体激动剂，可激活肾素-血管紧张素系统，增加心肌收缩力和心肌耗氧量。本研究结果显示，与对照组比较，模型组大鼠心指数和心肌组织中 HYP 含量均明显增高，心肌组织间质成分增多并可见较多纤维组织，有大量炎性细胞浸润，且纤维组织增生伴心肌萎缩。提示，大鼠心肌纤维化模型复制成功。本研究结果显示，与模型组比较，叶黄素各组大鼠心指数和心肌组织中 HYP 含量明显降低，心肌组织无炎性细胞浸润，虽然可见轻度纤维组织增生，但无心肌萎缩，表明叶黄素可明显减轻由 ISO 引起的心肌肥厚和心肌纤维化程度。

中国公共卫生 CPH

研究表明大鼠跑步机实验能够反映大鼠运动能力,从而反映心肌、骨骼肌、肝脏等损伤情况[9]。在跑步速度与坡度和时间恒定情况下,大鼠被电击的次数越多,表明大鼠运动耐力越差,心肌供血功能越低。本研究结果显示,与对照组比较,模型组大鼠被电击次数明显增多,表明大鼠心功能下降;与模型组比较,叶黄素组大鼠被电击次数明显减少,表明叶黄素可减轻大鼠心肌损伤。Nako 等[12]研究表明在大鼠心肌纤维化过程中,由于供血不平衡,脂质过氧化物堆积、自由基产生增加等,均能引起心电图 ST 段下移、心率等改变。本研究结果显示,与对照组比较,模型组大鼠心电图 PR 间期缩短,J 点(即 ST 段)明显下移,心率明显加快,表明大鼠心肌缺血明显;与模型组比较,叶黄素组大鼠心电图 PR 间期延长,J 点下移不明显,同时心率也明显减慢,表明大鼠心肌缺血状况得到明显改善。

研究显示,氧自由基及过氧化反应是形成心肌纤维化的重要因素。氧自由基通过多种途径引起心肌纤维化。生物机体内的抗氧化酶系统主要包括 SOD、GSH 等。抗氧化酶系统能在机体内清除自由基,SOD 的活性可代表机体对氧自由基的清除能力[13],SOD 为氧自由基特异性降解酶,其主要功能是将 O2-转化为 H_2O,以至 O2-不会分解为氧自由基从而预防自由基对机体的损伤[14]。GSH 也是测量过氧化物的重要指标之一。它能使活性氧转化为过氧化氢,最后分解成水和分子氧,从而清除自由基。MDA 为细胞膜脂质氧化代谢的标志性产物之一。叶黄素结构中含有多个不饱合共扼双键,它能够抑制单线态氧的氧化能力,可以与自由基反应,生成对机体无害的产物,叶黄素还可破坏自由基链反应,清除自由基。本研究结果表明模型组大鼠心肌组织中 MDA 含量明显升高,GSH 含量及血清中 SOD 水平明显下降;而叶黄素组大鼠心肌组织中 MDA 含量明显降低,心肌组织中 GSH 含量及血清中 SOD 水平明显升高。提示,叶黄素对 ISO 所致的大鼠心肌纤维化具有明显的保护作用,其机制可能与提高机体抗氧化能力,抑制氧自由基的生成有关。

参考文献

[1] 张召才,杨英珍,陈灏珠. 心肌纤维化的研究进展[J]. 临床心血管疾病杂志,2004,20(1):58-60.

[2] 陈伟伟,高润霖,刘力生,等.《中国心血管病报告 2014》概要[J]. 中国循环杂志,2015,30(7):617-622.

[3] Scott RL, Ratllif NB, Starling RC, et al. Recurrence of giant cell myocarditis in cardiac allograft[J]. Heart Lung Transplant, 2001,20(3):375-380.

[4] Haase VH. The sweet side of HIF[J]. Kidney Int, 2010,78(1):10-13.

[5] Zhang Z, Han S, Wang H, et al. Lutein extends the lifespan of Drosophila melanogaster[J]. Archives of Gerontology and Geriatrics, 2014(1):153-159.

[6] 李晋生,靳冉,陈霞,等. 万寿菊叶黄素抗氧化作用量效关系研究[J]. 中国医药信息杂志,2013,20(9):26-27.

[7] 郭志有,高翠玲,宋儒,等. 叶黄素的功能及应用[J]. 河北农业科学,2010,14(2):52-53.

[8] 刘会芳,赵元华,王淑静,等. 叶黄素抗肿瘤作用的研究进展[J]. 医学综述,2015,21(9):1654-1656.

[9] 祝自新. 紫芝在力竭大鼠抗运动性疲劳和抗组织损伤中的作用[J]. 体育科学,2012,32(9):75-80.

[10] 李萌,吕仕超. 不同原因诱导的心肌纤维化动物模型的建立[J]. 医学研究生学报,2014,27(3):330-334.

[11] 范红艳,王艳春,任旷,等. 苦参总黄酮抑制大鼠心肌纤维化作用研究[J]. 中草药,2015,46(20):3055-3059.

[12] Nako H, Kataoka K, Koibuchi N. Novel mechanism of angiotensin-induced cardiac injury in hypertensive rats: the critical role of ASK1 and VEGF[J]. Hypertension Research, 2012,(2):194-200.

[13] 蔡智慧,任丽萍. 栀子苷对大鼠心肌缺血再灌注损伤保护作用[J]. 中国公共卫生,2015,31(12):1619-1622.

[14] 王若仲,沈新南,施冬云,等. 叶黄素对人肝癌细胞 HepG2 的抑制作用及其机制研究[J]. 营养学报,2012(4):332-335.

收稿日期: 2016-09-19　　(解学魁编辑　吴少慧校对)

中国公共卫生 CPH