

• 基础医学 •

文章编号:1002-0217(2018)06-0523-04

黑果枸杞花色苷对部分睡眠剥夺大鼠心肌损伤的保护作用

温朝玲¹,刘春红²,孙雯雯³,汪 洋⁴

(1.安徽中医药高等专科学校 护理系,安徽 芜湖 241000;2.芜湖市第二人民医院 骨外科,安徽 芜湖 241000;3.芜湖市第二人民医院 病理科,安徽 芜湖 241000;4.安徽中医药高等专科学校 医疗系,安徽 芜湖 241000)

【摘要】目的:研究黑果枸杞花色苷对部分睡眠剥夺(PSD)大鼠心肌损伤的保护作用。方法:采用改良多平台睡眠剥夺法,60只SD大鼠随机分为:正常对照组(N组)、PSD模型组(M组)、复方丹参片对照组(CDT组)、PSD+黑果枸杞花色苷低剂量组(LrM-L组)、PSD+黑果枸杞花色苷中剂量组(LrM-M组)、PSD+黑果枸杞花色苷高剂量组(LrM-H组)6组,每组10只。6组大鼠均每天灌胃1次,LrM-L、LrM-M、LrM-H分别灌服黑果枸杞花色苷0.25、0.5、1.5 g/(L·kg·d),N、M和CDT组均按体质量灌服等量0.9%NaCl和复方丹参片0.32 g/(L·kg·d)。PSD大鼠每天睡眠剥夺18 h,共持续21d后,分别观察各组大鼠一般情况;取血清和心肌组织检测氧化指标:CK-MB、cTnI、T-AOC、SOD、MDA;并采用ELISA法测定心肌特征性损伤标志物含量;HE染色后观察心肌组织病理学改变。结果:PSD模型组大鼠的心肌损伤最明显,而黑果枸杞花色苷可降低PSD大鼠的心肌损伤,且灌胃剂量与心肌损伤呈量效依赖性;与PSD模型组相比较,黑果枸杞花色苷0.25、0.5、1.5 g/(L·kg·d)组大鼠血清CK-MB、cTnI和心肌MDA水平降低($P<0.05$),且随剂量递加而递减;血清T-AOC水平和心肌SOD水平升高($P<0.05$),且随剂量增加而增加;上述各指标变化均以1.5 g/(L·kg·d)组尤为明显。结论:黑果枸杞花色苷能有效提高心肌抗过氧化能力,减少睡眠剥夺产生的过量的自由基损伤,从而抑制PSD所致的心肌细胞病理性损害,提示不同给药剂量的黑果枸杞花色苷对部分睡眠剥夺大鼠具有不同程度的心肌保护作用。

【关键词】黑果枸杞花色苷;部分睡眠剥夺;心肌组织;心肌损伤标志物;抗氧化酶

【中图分类号】R 285.5; R 338.63; R 542.2 **【文献标志码】**A

【DOI】10.3969/j.issn.1002-0217.2018.06.004

Protective effect of *Lycium ruthenicum* Murray anthocyanin extracts on myocardial injury in partial sleep deprived rats

WEN Chaoling, LIU Chunhong, SUN Wenwen, WANG Yang

Department of Nursing, Anhui College of Traditional Chinese Medicine, Wuhu 241000, China

【Abstract】Objective: To observe the protective effects of *Lycium ruthenicum* Murray anthocyanin extracts on the heart injury in rats of partial sleep deprivation (PSD). **Methods:** Rat model of partial sleep deprivation was induced by the modified multiple platform method (MPPM). Sixty SD rats were equally randomized into six groups, namely: blank control group (group N), partial sleep deprivation group (group M), PSD+low dose *Lycium ruthenicum* Murray anthocyanin extract (group LrM-L), PSD+middle dose *Lycium ruthenicum* Murray anthocyanin extract (group LrM-M), and PSD+high dose *Lycium ruthenicum* Murray anthocyanin extract (group LrM-H). Rats in each group were subjected to intragastric administration once a day. Rats in LrM-L, LrM-M, LrM-H group were given *Lycium ruthenicum* Murray anthocyanin extract in dose of 0.25, 0.5, 1.5 g/(L·kg·d), and those in group N, M and control group were intragastrically treated with equal amount of 0.9% NaCl and compound salvia tablet in dose of 0.32 g/(L·kg·d). Rats were deprived of partial sleep by 18 h per day for consecutive 21 days and observed on general conditions. Then the serum and myocardial tissue were taken from all rats to determine the oxidative stress index, including creatine kinase isoenzyme (CK-MB), cardiac troponin I (cTnI), total antioxidant capacity (T-AOC), superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA). ELISA was performed to detect level of characteristic markers of myocardial injury, and the pathological changes of cardiac tissue were examined following H&E staining. **Results:** Myocardial injury was most notable in rats of PSD. *Lycium ruthenicum* Murray anthocyanin extract reduced myocardial damage in PSD rats, and the dose of ingesta administration and myocardial injury were in dose-dependent effect. Rats treated with *Lycium ruthenicum* Murray anthocyanin extract in dose of 0.25, 0.5 and 1.5 g/(L·kg·d) had significantly reduced serum CK-MB and cTnI as well as MDA level compared to the PSD models ($P<0.05$), and the level was reduced with dose increase. Obviously increased level of T-AOC and myocardial SOD was seen in each group ($P<0.05$), and increased with added dose. Change of the above index was more notable in rats treated by 1.5 g/(L·kg·d). **Conclusion:** *Lycium ruthenicum* Murray anthocyanin extract can effectively improve the myocardium against peroxidation, and reduce the damage from excessive free radicals, eventually inhibiting PSD-induced pathological damage of myocardial cells. The findings suggest that different doses of *Lycium*

基金项目:安徽省自然科学基金重点项目(KJ2017A685);安徽省高校优秀青年人才支持计划重点项目(gxyqZD2018095)

收稿日期:2018-02-15

作者简介:温朝玲(1981-),女,讲师,硕士,(电话)18105533183,(电子信箱)wenchaoling866@163.com;

汪 洋,男,讲师,硕士,(电子信箱)42055278@qq.com,通信作者。

ruthenicum Murray anthocyanin extract can be protective effect on the myocardium in rats of PSD.

【Key words】 *Lycium ruthenicum Murray* anthocyanin extract; partial sleep deprivation; myocardial tissue; marker of myocardial injury; antioxidant enzyme

黑果枸杞是我国西部特有的药食两用植物,其代表性的营养成分花色苷是从黑果枸杞成熟果实中提取的一种紫红色水溶性色素,属于天然类黄酮类多酚化合物^[1],具有抗氧化、预防心脑血管疾病、增强非特异性免疫和改善记忆力等多种生理活性功能^[2]。

部分睡眠剥夺(partial sleep deprivation, PSD) 可引起心肌炎、心脏扩大、冠心病等^[3]。但是目前关于黑果枸杞花色苷对 PSD 大鼠心肌损伤的保护研究报道甚少。故本研究通过制备改良多平台 PSD 大鼠模型,研究黑果枸杞花色苷对 PSD 模型大鼠心肌损伤标志物含量、抗氧化标志物含量相关指标以及心肌组织病理学改变来探究黑果枸杞花色苷对 PSD 大鼠心肌损伤的保护作用。

1 材料与方法

1.1 动物 SD 大鼠 68 只,体质量 180~220 g,购自南京青龙山动物中心[许可证号: SCXK(苏) 2017-0001]。实验过程中室内温度控制在(24±1) °C,部分睡眠剥夺时间为中午 2 时至次日上午 8 时。

1.2 药物 复方丹参片(国药准字: G17A011); 黑果枸杞花色苷。黑果枸杞花色苷的制备: 黑果枸杞花色苷由本校中药实验室自行制备。黑果枸杞购自亳州药材市场,取黑果枸杞成熟果实 200 g 粉碎,提取其花色苷用 15 倍量 pH 4 的 70%乙醇浸提 2 h,提取温度为 60°C^[6]。回流提取 3 次,水提物经旋蒸浓缩后,吸附,干燥后的暗紫色粉末即为黑果枸杞花色苷类提取物。运用 pH 示差法测定黑果枸杞提取物中花色苷的含量为 57%^[4-6]。

1.3 试剂 CK-MB、cTnI 测试盒均购于贝克曼库尔特实验系统(苏州) 有限公司(批号分别为 GC8198、EA8168)。T-AOC、SOD、MDA 测试盒购于南京建成生物工程研究所(批号分别为 20180111、20180110、20180109)。

1.4 仪器 BX43 普通光学显微镜及显微照相机(Olympus 公司); 组织匀浆机(德国 IKA T10); Anthos Zenyth 200 酶标仪(安图生物); RE-5298A 型旋转蒸发仪(西安禾普生物科技有限公司); 1-4K 台式冷冻离心机(德国 Sigma 公司); 贝克曼库尔特 AU5800 全自动血细胞生化分析仪。

1.5 实验方法

1.5.1 动物分组及给药 60 只 SD 大鼠随机分为: 正常对照组(N 组)、PSD 模型组(M 组)、复方丹参

片对照组(CDT 组)、PSD+黑果枸杞花色苷低剂量组(LrM-L 组)、PSD+黑果枸杞花色苷中剂量组(LrM-M 组)、PSD+黑果枸杞花色苷高剂量组(LrM-H 组) 6 组,每组 10 只。6 组大鼠均每天灌胃 1 次, LrM-L、LrM-M、LrM-H 分别灌服黑果枸杞花色苷 0.25、0.5、1.5 g/(L·kg·d); 正常对照组(给予等体积的 0.9%NaCl)、PSD 模型组(给予等体积的 0.9%NaCl)、复方丹参片对照组[复方丹参片 0.32 g/(L·kg·d)]。PSD 4 组大鼠均每天睡眠剥夺 18 h,共持续 21 d。

1.5.2 大鼠 PSD 模型建立 采用改良多平台大鼠睡眠剥夺法建立大鼠 PSD 模型^[7-8],大鼠睡眠剥夺箱设计成长方体(105 cm×60 cm×65 cm 的有机玻璃做成),箱内设置 15 个直径 6.5 cm,高 10.0 cm 的小平台,小平台之间间隔为 15 cm。每天实验开始前 2 h 开始加水,水深约 8.5 cm。上面罩有 4 目的铁丝网。

1.6 血清指标检测 以 2.2 mL/kg 乌拉坦腹腔注射麻醉,腹主动脉取全血约 5 mL 并离心(1200 r/min,10 min,4°C) 后取血清,按试剂盒采用 ELISA 法测定血清 cTnI、CK-MB、T-AOC 水平。

1.7 心肌组织匀浆制备及 SOD、MDA 等指标 取麻醉后大鼠的左心室前壁心肌组织约 0.3~0.4 g,用冰的生理盐水洗涤数次。剪碎心肌组织,加入冷的生理盐水 2.7~3.6 mL,用 IKA T10 匀浆器得到 10% 心肌组织匀浆液。离心(3000 r/min,10 min) 后取上清液分装-20°C 冻存备用,待测 SOD、MDA。

1.8 统计学方法 采用 SPSS 12.0 软件进行数据分析,实验数据以均值±标准差表示,组间比较采用单因素方差分析,组间两两采用 *q* 检验, *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PSD 大鼠一般情况观察 在预实验中,前 3 天有 4 例大鼠死亡。实验早期,PSD 大鼠表现出一定的交感神经亢奋的行为,如活动量增多,体质量减少,少数 PSD 大鼠在小平台间不停地跳动,进食量增大,对声光的刺激较为敏感。随着睡眠剥夺时间的延长,PSD 大鼠则表现为异常地狂躁,进食及饮水量均明显减少,攻击性强^[9]。但是 LrM-L、LrM-M、LrM-H 组、CDT 组大鼠的交感神经亢奋的行为较 PSD 大鼠有改善, LrM-H 组除体质量减少行为无明显变化。

2.2 黑果枸杞花色苷对 PSD 大鼠血清中心肌损伤标志物 CK-MB、cTnI 及 T-AOC 含量的影响 与正常组相比,PSD 模型组大鼠的 CK-MB 和 cTnI 含量升高($P<0.01$) 但血清 T-AOC 活力下降($P<0.01$); 与 PSD 模型组相比,CDT 对照组的 CK-MB 和 cTnI 下降($P<0.05$) ,LrM-H 和 LrM-M 组的 CK-MB 和 cTnI 含量下降($P<0.01$ 、 $P<0.05$)。说明黑果枸杞花色苷的高剂量能改善 PSD 所致的大鼠血清中心肌损伤标志性酶的异常升高。

与正常组相比,PSD 模型组血清 T-AOC 活力下降($P<0.01$); 与 PSD 模型组相比,黑果枸杞花色苷(LrM-L、LrM-M、LrM-H)组、CDT 对照组升高($P<0.05$)。LrM-H 和 LrM-M 组的 T-AOC 含量升高($P<0.01$ 、 $P<0.05$); LrM-L 组和 CDT 组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

表 1 黑果枸杞花色苷对大鼠血清心肌损伤标志物 CK-MB、cTnI、及 T-AOC 含量的影响

组别	CK-MB/(U/L)	cTnI/(μ g/L)	T-AOC/(U/L)
N 组	650.33±57.83	1.05±0.19	9.87±3.0
M 组	1717.35±287.40 [▲]	1.88±0.22 [▲]	6.50±2.3 [▲]
CDT 组	910.75±183.56 ^{◆◆}	1.42±0.18 [◆]	7.18±1.8 [◆]
LrM-L 组	1253.62±147.38 ^{◆◆}	1.50±0.23 [◆]	7.12±1.2 [◆]
LrM-M 组	1087.5±148.36 ^{◆◆}	1.40±0.20 [◆]	7.81±1.4 ^{◆◆}
LrM-H 组	874.45±163.75 ^{◆◆}	1.28±0.17 ^{◆◆}	8.91±1.5 ^{◆◆}
F	36.93	14.56	4.27
P	0.000	0.000	0.002

注:与正常组比较,▲ $P<0.01$,与模型组比较,◆◆ $P<0.01$,◆ $P<0.05$ 。

2.3 黑果枸杞花色苷对 PSD 大鼠心肌 SOD 及 MDA 活性的影响 与正常组比较,PSD 组的心肌 SOD 含量降低($P<0.05$); 与 PSD 组对比,CDT 对照组($P<0.05$)、黑果枸杞花色苷各组升高(LrM-L 组 $P<0.05$,LrM-M 组 $P<0.05$,LrM-H 组 $P<0.01$),且 LrM-H 组($P<0.01$)、LrM-M 组($P<0.05$) 高于 LrM-L 组、LrM-L、LrM-M、LrM-H 组血清 SOD 的活性随剂量的增加而递增。

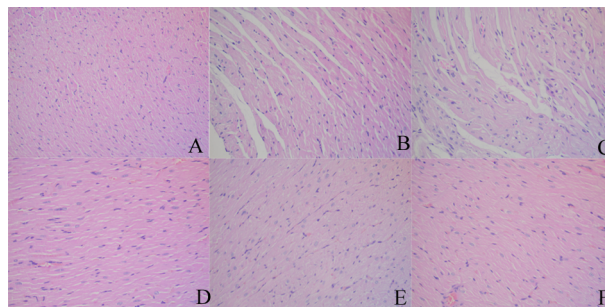
与正常组比较,PSD 组 MDA 含量升高($P<0.05$) 与 PSD 组对比,CDT 对照组($P<0.05$)、黑果枸杞花色苷各组的心肌 MDA 降低(LrM-L 组 $P<0.05$,LrM-M 组 $P<0.05$,LrM-H 组 $P<0.01$) 且 LrM-H 组($P<0.01$)、LrM-M 组($P<0.05$) 低于 LrM-L 组,LrM-L、LrM-M、LrM-H 组血清 MDA 的活性随剂量的增加而递减。LrM-H 组心肌 SOD 活性 MDA 含量要优于 CDT 组。见表 2。

2.4 各组大鼠心肌组织病理学比较 PSD 模型组大鼠的心肌细胞排列松散,见心肌纤维化程度不一、细胞水肿和炎性细胞浸润;和模型组相比,黑果枸杞花色苷各剂量组 PSD 大鼠心肌病理性改变有由重到轻的演变,以黑果枸杞花色苷高剂量组改善尤为显著。说明黑果枸杞高剂量组和复方丹参片组均可减轻心室重构,改善睡眠剥夺所造成的心肌细胞纤维化,对心肌细胞的损伤有保护作用。见图 1。

表 2 黑果枸杞花色苷对大鼠心肌 SOD 及 MDA 含量的影响

组别	SOD/(U/mgprot)	MDA/(nmol/mgprot)
N 组	238.5±11.30	2.19±0.14
M 组	142.23±8.35 [▲]	4.24±0.17 [▲]
CDT 组	179.5±13.21 [◆]	1.69±0.11 ^{◆◆}
LrM-L 组	175.53±9.25 [◆]	1.50±0.16 [◆]
LrM-M 组	189.46±8.28 ^{◆◆}	1.62±0.14 ^{◆◆}
LrM-H 组	204.17±11.91 ^{◆◆}	1.82±0.15 ^{◆◆}
F	136.08	526.13
P	0.000	0.000

注:与正常组比较,▲ $P<0.01$,与模型组比较,◆◆ $P<0.01$,◆ $P<0.05$ 。



A.N 组; B.M 组; C.LrM-L 组; D.LrM-M 组; E.LrM-H 组; F.CDT 组。

图 1 各组大鼠心肌病理学改变(HE ×400)

3 讨论

人类生命的 1/3 时间是在睡眠中度过的。在我国约 45.4% 的人存在不同程度的睡眠剥夺问题^[10]。昼夜节律是普遍存在于生物界的一种生理现象^[11-12]。Everson 等^[13]研究表明,睡眠剥夺是一种氧化应激模型,影响了机体的昼夜节律并通过多靶点、多路径诱发机体的氧化应激反应。PSD 作为强烈的应激源,在高水平儿茶酚胺和糖皮质激素作用下,机体自由基产生和清除失衡,引发广泛的损伤效应,引起心血管炎症反应^[3]。PSD 降低心肌细胞抗氧化酶(SOD、CAT)的活性,伴有心肌细胞损伤标志物(CK-MB、cTnI)过度表达;T-AOC 水平能够反映机体整体抗氧化能力^[14],MDA 含量水平能够直接反映机体过氧化损伤程度^[15]。

本研究采用 PSD 大鼠来模拟成人的睡眠障碍, 通过观察各组大鼠一般情况, 检测血清和心肌组织中氧化及抗氧化指标, 分析心肌病理学变化来探讨黑果枸杞花色苷对 PSD 大鼠心肌损伤的保护作用。从以上的实验结果可知黑果枸杞花色苷对 PSD 大鼠心肌损伤具有保护作用, 呈剂量依赖性。LrM-H 组消减氧化自由基的能力优于 CDT 组, 未发现重要脏器的损害现象。其机制可能与黑果枸杞中的花色苷成分在部分睡眠剥夺过程中稳定心肌细胞的细胞膜, 延缓或抑制心肌细胞在急性应激损害的过程中释放炎性介质物所引发的心肌损伤, 稳定机体睡眠剥夺所引起的氧化应激、降低自由基水平有关, 其确切机制有待进一步研究。

【参考文献】

[1] 丁玉静, 刘俊秀, 李金红, 等. 黑果枸杞生理活性成分及作用研究进展[J]. 中国临床药理学杂志, 2017, 33(13): 1280-1283.

[2] 加杨娥, 任立余, 燕华玲, 等. 黑枸杞水提物对中波紫外线辐射人永生角质形成细胞抗氧化的作用[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2017, 31(3): 251-254.

[3] 杨明, 曾勇, 沈珠军, 等. 大动脉炎累及冠状动脉的临床特点及介入治疗效果分析[J]. 中华医学杂志, 2014, 94(24): 1874-1877.

[4] 张东, 单斌. 黑果枸杞中花色苷提取工艺研究[J]. 青海农林科技, 2015(4): 21-24.

[5] 林丽, 李进, 李永洁, 等. 黑果枸杞花色苷对氧化低密度脂蛋白损伤血管内皮细胞的保护作用[J]. 中国药理学杂志, 2013(8):

606-611.

[6] OZTURK I, KARAMAN S, BASLAR M, *et al.* Aroma, sugar and anthocyanin profile of fruit and seed of mahlab: optimization of bioactive compounds extraction by simplex lattice mixture design [J]. Food Analytical, 2015(241): 683-695.

[7] 郭兴道, 郝苗苗, 李婷婷, 等. 24 h 快速眼动睡眠剥夺大鼠血清的蛋白质组学初步研究[J]. 天津医药, 2016, 44(5): 577-581.

[8] MUELLER AD, POLLOCK MS, LIEBLICH SE, *et al.* Sleep deprivation can inhibit adult hippocampal neurogenesis independent of adrenal stress hormones [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2008, 29(5): 1693-1703.

[9] 张如意, 游秋云, 王平, 等. 酸枣仁汤对慢性睡眠剥夺老年失眠大鼠心肌细胞凋亡及相关蛋白 Bcl-2、Bax 表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(4): 1691-1693.

[10] 谌剑飞. 睡眠障碍的现代病因病机探索[J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(2): 151-152.

[11] FUJISAWA K, TAKAMI T, KIMOTO Y, *et al.* Circadian variations in the liver metabolites of medaka *Oryzias latipes* [J]. Sci Rep, 2015, 6(10): 209-216.

[12] CHAIX A, ZARRINPAR A, PANDA S. The circadian coordination of cell biology [J]. J Cell Biol, 2016, 215(1): 15-25.

[13] EVERSON CA, LAATSCH CD, HOGG N. Antioxidant defense response to sleep loss and sleep recovery [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2005, 288: 374.

[14] 刘社星. 大豆异黄酮对糖尿病大鼠心肌损伤的保护作用[J]. 中医学报, 2017, 32(233): 1939-1942.

[15] LAUMBACH RJ, KIPEN HM, KO S, *et al.* A Controlled trial of acute effects of human exposure to traffic particles on pulmonary oxidative stress and heart rate variability [J]. Part Fibre toxicol, 2014, 11(1): 45-51.

(上接第 518 页)

[5] SCOTT JE, BOSWORTH TR, CRIBB AM, *et al.* The chemical morphology of age-related changes in human intervertebral disc glycosaminoglycans from cervical, thoracic and lumbar nucleus pulposus and annulus fibrosus [J]. J Anat, 1994, 184 (Pt 1): 73-82.

[6] MELLO MA, TUAN RS. High density micromass cultures of embryonic limb bud mesenchymal cells: an in vitro model of endochondral skeletal development [J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 1999, 35(5): 262-269.

[7] SEKIYA I, LARSON BL, SMITH JR, *et al.* Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality [J]. Stem Cells, 2002, 20(6): 530-541.

[8] HANSRAJ KK. Stem Cells in Spine Surgery [J]. Surg Technol Int, 2016, 29: 348-358.

[9] GOLDSCHLAGER T, JENKIN G, GHOSH P, *et al.* Potential applications for using stem cells in spine surgery [J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2010, 5(4): 345-355.

[10] HUGHES SP, FREEMONT AJ, HUKINS DW, *et al.* The pathogenesis of degeneration of the intervertebral disc and emerging therapies in the management of back pain [J]. J Bone Joint Surg Br, 2012, 94(10): 1298-1304.

[11] HUANG S, TAM V, CHEUNG KM, *et al.* Stem cell-based approach

for intervertebral disc regeneration [J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2011, 6(4): 317-326.

[12] MIYAMOTO T, MUNETA T, TABUCHI T, *et al.* Intradiscal transplantation of synovial mesenchymal stem cells prevents intervertebral disc degeneration through suppression of matrix metalloproteinase-related genes in nucleus pulposus cells in rabbits [J]. Arthritis Res Ther, 2010, 12(6): R206.

[13] NORIEGA DC, ARDURA F, HERNÁNDEZ-RAMAJO R, *et al.* Intervertebral disc repair by allogeneic mesenchymal bone marrow cells: a randomized controlled Trial [J]. Transplantation, 2017, 101(8): 1945-1951.

[14] VADALÀG, SOWA G, HUBERT M, *et al.* Mesenchymal stem cells injection in degenerated intervertebral disc: cell leakage may induce osteophyte formation [J]. J Tissue Eng Regen Med, 2012, 6(5): 348-355.

[15] LI YY, DIAO HJ, CHIK TK, *et al.* Delivering mesenchymal stem cells in collagen microsphere carriers to rabbit degenerative disc: reduced risk of osteophyte formation [J]. Tissue Eng Part A, 2014, 20(9-10): 1379-1391.

[16] LIANG CZ, LI H, TAO YQ, *et al.* Dual release of dexamethasone and TGF-β3 from polymeric microspheres for stem cell matrix accumulation in a rat disc degeneration model [J]. Acta Biomater, 2013, 9(12): 9423-9433.