基础研究

DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2011.10.015

不同剂量小檗碱对大鼠梗死后心肌组织的保护作用

丁世豪，李真真，王石雄，卢俊阳，高秉仁
（兰州大学第二医院心脏外科，兰州 730030）

【摘 要】目的：对心肌梗死后大鼠灌胃不同剂量小檗碱，探讨小檗碱对大鼠梗死后心肌组织的保护作用和对梗死后心功能的影响。方法：开胸结扎冠脉方法制作大鼠心梗模型，模型建立成功后持续灌胃 5 d，每天灌胃 1 次，末次灌胃后测量相关心功能参数，随后处死大鼠做心肌形态学和血清酶学分析。结果：小檗碱可以改善梗死后心脏的心功能，减小心肌缺血范围和梗死范围，减少心肌乳酸脱氢酶（Lactate dehydrogenase，LDH）的释放。不同剂量小檗碱的心肌保护作用有所差异。结论：小檗碱对大鼠梗死后心肌组织有明显保护作用，能明显改善心功能，且其这种作用随剂量的不同有统计学差异。

【关键词】小檗碱；心肌梗死；心肌保护
【中国图书分类法分类号】R654.2 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-03-05

The protective effect of berberine with different doses on the myocardial infarction in rats

DING Shi-hao, LI Zhen-zhen, WANG Shi-xiong, LU Jun-yang, GAO Bing-ren
(*Department of Cardiac Surgery, the Second Hospital, Lanzhou University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the protective effects of different doses of berberine (BBR) on the myocardial infarction and the cardiac function in rats by using different doses of BBR to drench the rats. *Methods*: The method of ligaturing coronary artery was used to set up the models of the myocardial infarction in the rats. After the operations, the different groups of the rats were drenched with different drugs and different doses for 5 days. After the last drench, the relevant parameters of the function were measured, and then samples of the hearts and blood were collected for analysis. *Results*: BBR improve the function of the rats and the infarct and the ischemia sizes. It also decrease the level of LDH. The results of the groups of different doses had significant difference. *Conclusion*: BBR can significantly protect the heart after infarction and improve the heart function. The ability varies with different doses.

【Key words】berberine; myocardial infarction; myocardial protection

心脏的冠状动脉被脂质阻塞后会造成单位时间内血流减少，影响接受该冠脉血液供应的心肌细胞生化代谢，严重时甚至会发生心肌组织的缺血缺氧性坏死，即心肌梗死。如何对发生梗死的心肌组织进行有效保护一直以来都是心血管病研究的重点。有实验研究报道氧自由基、细胞内钙超载、线粒体损伤可引起心肌细胞的凋亡[1]，其中氧自由基是一项主要因素。一些实验报道了我国传统中药黄连素能够抑制氧自由基对细胞的损伤作用[2]。黄连素是一种多成分的混合药物，其主要成分为小檗碱。有研究报道了小檗碱有抗细胞氧化作用和抗心肌缺血再灌注损伤作用[3,4]，甚至能拮抗心律失常和充血性心衰的作用[5]。近年来有人报道了小檗碱对急性心肌缺血有一定的保护作用[6]。但其是否对梗死后的心肌具有保护作用还未见报道。本研究通过结扎大鼠心脏左冠脉前降支的方法建立大鼠心肌梗死模型，再灌胃给予不同剂量小檗碱，期望研究小檗碱是否对梗死后心肌组织具有保护作用以及其剂量与保护作用之间的关系。

作者介绍：丁世豪（1985-），男，硕士，研究方向：心脏疾病的外科治疗。
通信作者：高秉仁，男，教授，Email:bingrengao@sina.com。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组 取健康雄性 Wistar 大鼠 56 只（由兰州大学实验动物中心提供。实验动物质量合格证号：兰大动检（08）第 034 号-0002361；动物实验许可证号：SCXK（甘）2009-0005），重量 200~250 g。按照处理方式的不同随机分为 7 组：假手术组、模型组、小檗碱 100 mg/kg 组、小檗碱 150 mg/kg 组、小檗碱 200 mg/kg 组、小檗碱 250 mg/kg 组和普奈洛尔组，每组 8 只大鼠。

1.1.2 药品及仪器 小檗碱标准品购于上海源叶生物公司[高效液相色谱（High performance liquid chromatography，HPLG ≥98%）]，普奈洛尔购于成都锦华药业有限责任公司，氯化三苯基四氮唑（TTC）购于美国 Sigma 公司。动物呼吸机（成都

泰盟科技有限公司 HX-300S 型），生物信号采集系统（成都泰盟科技有限公司 BL-420S 生物机能实验系统），恒温摇床（上海一恒科学仪器有限公司 THZ-300 型），离心机（海门市其林贝尔仪器制造有限公司 LX-200 型）等均由兰州大学生命科学院动物发育研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 各实验组大鼠给药 假手术组和模型组大鼠灌胃 2.5 ml 生理盐水，小檗碱 100 mg/kg 组、小檗碱 150 mg/kg 组、小檗碱 200 mg/kg 组、小檗碱 250 mg/kg 组大鼠按各自组规定剂量灌胃，普奈洛尔组灌胃剂量为 20 mg/kg。各组大鼠均每天灌胃 1 次。7 组大鼠均于手术前 1 d 开始灌胃，第 2 天灌胃 4 h 后行开胸冠脉结扎建立心梗模型，模型建立成功继续灌胃 5 d，末次灌胃 4 h 后测量心功能，随后处死大鼠收集心脏和血液标本。

1.2.2 心肌梗死模型的建立 取各组大鼠，用 7%的水合氯醛 0.4 ml/100 g 腹腔注射麻醉。清洁条件下做气管切开，插管，接动物呼吸机辅助呼吸（潮气量：5 ml，频率：60 次/min）。在胸骨左缘处纵行剪开皮肤约 2 cm，钝性分离皮下组织和肌肉，剪开第 2~4 肋骨打开胸腔，暴露心脏。沿肺动脉向下、于左心耳下缘约 2 mm 处，用医用 6~0 的手术线结扎左冠状动脉前降支。约 5 min 见结扎冠脉远端供血区心肌组织呈苍白色，同时观察到生物信号采集系统实时记录的心电图相应导联上 ST 段呈弓背抬高样改变，证明结扎阻断左冠脉前降支血流成功。持续观察 30 min，确定相应导联 ST 段弓背抬高样呈稳定改变后，心肌梗死模型即建立成功。随后关闭胸腔，缝皮。假手术组大鼠开胸后，只在左冠脉前降支相应部位穿针，不进行结扎，随后关胸缝皮。

1.2.3 监测心功能指标及收集心脏、血浆标本 心肌梗死模型建立成功后，将大鼠放回饲养间正常饲养，继续按各组要求灌胃 5 d。末次灌胃 4 h 后，用生物信号采集系统测量并记录相关心功能参数。记录完毕后，采用空气栓塞法处死大鼠，收集大鼠心脏标本，胸腔内采集血液标本。

1.3 指标检测

1.3.1 LVSP 值和 LVEDP 值 将直径 1 mm 聚乙烯塑料导管经左颈总动脉插入左心室，连接生物信号采集系统测量并记录左室收缩压（Left ventricular systolic pressare，LVSP）值和左室舒张末压（Left ventricular end diastolic pressure，LVEDP）值。

1.3.2 缺血心肌重量（Weight of myocardial ischemia，WMI）/左心室重量（Weight of ventriculus sinister，WVS）值和梗死心肌重量（Weight of cardial infarctian，WCI）/WMI 值 将收集的心脏标本放入 3%PBS 缓冲液中置于摇床震荡，转速为 1 500 r/min，时间为 10 min。取出震荡后心脏标本，在 37℃，pH7.4 条件下将心脏标本放入 3%TTC 染液中，静置染色 10 min，取出并拍照留取心脏整体标本图像。随后将心脏置于-20℃冰箱冰冻 20 min 后取出，沿垂直于心脏长轴方向迅速切片，每个切片厚约 1 mm 且包含心室腔。将心脏切片置于含 3%TTC 的 PBS 缓冲液 12 孔培养板里放置约 10 min，再将 7 组心脏标本切片中结扎水平切片放置于一起比对并用数码相机拍照，用 Imagetool 3.0 软件分析切面图像。标本依颜色不同可分为 TTC 深染色区域（深红区，未受缺血影响的心肌组织），TTC 浅染色区域（浅红区，缺血后尚存活的心肌组织）以及 TTC 未染色区域（白色，梗死心肌组织）。缺血范围用 WMI 与 WVS 之比，即 WMI/WVS 表示；而梗死范围用 WCI 与 WMI 之比，即 WCI/WMI 表示。

1.3.3 LDH 值 用容积为 2 ml 的注射器采集胸腔内血液标本，后置于离心机离心，转速：1 500 r/min，离心 10 min，得到血清样本后测 LDH 值。

1.4 统计学方法

实验数据计量资料均以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，采用 SPSS17.0 统计软件进行分析，2 组之间用 t 检验，多组之间用单因素方差分析，以 $P<0.05$ 认为有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组大鼠 LVSP 值和 LVEDP 值结果

与假手术组和普奈洛尔组相比小檗碱各剂量组 LVSP 值（$P<0.01$）明显降低，与模型组相比小檗碱各剂量组 LVSP 值（$P<0.01$）明显升高；与假手术组和普奈洛尔组相比小檗碱各剂量组 LVEDP 值（$P<0.01$）明显升高，与模型组相比小檗碱各剂量组 LVEDP 值（$P<0.01$）明显降低（表 1）。

表 1 不同组别大鼠 LVSP 值和 LVEDP 值的比较

（LVSP mmHg，LVEDP mmHg，$\bar{x}\pm s$）

组别	例数（n）	LVSP（mmHg）	LVEDP（mmHg）
假手术组	8	130.03 ± 4.19	2.32 ± 0.33
模型组	8	62.97 ± 3.29	19.81 ± 0.61
小檗碱 100 mg/kg 剂量组	8	69.21 ± 3.56	16.49 ± 0.73
小檗碱 150 mg/kg 剂量组	8	74.51 ± 4.06	14.72 ± 0.39
小檗碱 200 mg/kg 剂量组	8	75.23 ± 3.84	14.33 ± 0.29
小檗碱 250 mg/kg 剂量组	8	76.17 ± 4.11	13.76 ± 0.43
普奈洛尔组	8	82.33 ± 3.74	11.89 ± 0.51

注：LVSP 值 7 组间方差分析 $P<0.01$，组间比较假手术组比其他 7 组 $P<0.01$，模型组比其他 7 组 $P<0.01$，小檗碱 100 mg/kg 剂量组比小檗碱 150 mg/kg 剂量组、小檗碱 200 mg/kg 剂量组、小檗碱 250 mg/kg 剂量组 $P<0.05$，小檗碱 150 mg/kg 剂量组、小檗碱 200 mg/kg 剂量组、小檗碱 250 mg/kg 剂量组之间无统计学差异 $P>0.05$，普奈洛尔组比其他 7 组 $P<0.01$；LVEDP 值 8 组间方差分析 $P<0.01$，组间比较结果同 LVSP 值组间比较结果

2.2 各组大鼠 WMI/WVS 和 WCI/WMI 结果

假手术组大鼠心肌组织未观察到明显的缺血区域和梗死区域（图 1），模型组、小檗碱各组和普奈洛尔组大鼠的心脏标本均观察到明显的缺血区和梗死区（图 2~7）。各组大鼠心脏结扎水平切片对比（图 8）。

与模型组相比小檗碱各剂量组和普奈洛尔组 WMI/WVS（$P<0.01$）明显降低，与普奈洛尔组相比小檗碱各剂量组 WMI/WVS（$P<0.01$）均明显升高；WCI/WMI 结果同 WMI/WVS 比较结果（表 2）。



图 1 假手术组大鼠心脏标本



图 2 模型组大鼠心脏标本



图 3 小檗碱 100 mg/kg 组大鼠心脏标本



图 4 小檗碱 150 mg/kg 组大鼠心脏标本



图 5 小檗碱 200 mg/kg 组大鼠心脏标本



图 6 小檗碱 250 mg/kg 组大鼠心脏标本



图 7 普奈洛尔组大鼠心脏标本

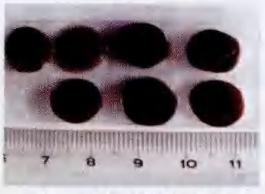


图 8 各组大鼠心脏同水平切面梗死区对比

表 2 各组大鼠心肌 WMI/WVS 和 WCI/WMI 比较（$\bar{x} \pm s$）

组别	例数（n）	WMI/WVS值	WCI/WMI值
假手术组	8	0	0
模型组	8	0.75 ± 0.07	0.79 ± 0.05
小檗碱 100 mg/kg 剂量组	8	0.62 ± 0.06	0.69 ± 0.05
小檗碱 150 mg/kg 剂量组	8	0.47 ± 0.04	0.56 ± 0.06
小檗碱 200 mg/kg 剂量组	8	0.45 ± 0.06	0.54 ± 0.05
小檗碱 250 mg/kg 剂量组	8	0.44 ± 0.04	0.52 ± 0.06
普奈洛尔组	8	0.37 ± 0.06	0.41 ± 0.07

注：WMI/WVS 7 组间方差分析 $P < 0.01$，假手术组因在图像分析中未观察到明显的缺血区和梗死区，故 WMI/WVS 和 WCI/WMI 均为 0。WMI/WVS 组间比较模型组比小檗碱各组和普奈洛尔组 $P < 0.01$，小檗碱 100 mg/kg 剂量组比小檗碱 150 mg/kg 剂量组、小檗碱 200 mg/kg 剂量组、小檗碱 250 mg/kg 剂量组和普奈洛尔组 $P < 0.01$，小檗碱150 mg/kg 剂量组、小檗碱 200 mg/kg 剂量组和小檗碱 250 mg/kg 剂量组之间无统计学差异 $P > 0.05$，普奈洛尔组比模型组和小檗碱各组 $P < 0.01$；WCI/WMI 组间比较结果同 WMI/WVS 组间比较结果

2.3 各组大鼠血浆 LDH 值结果

同假手术组相比，其余 6 组大鼠 LDH 值（$P<0.01$）均明显升高。小檗碱各组和普奈洛尔组的 LDH 值均较模型组（$P<0.01$）有明显减小，小檗碱各组的 LDH 值均较普奈洛尔组（$P<0.01$）有明显增大，小檗碱 100 mg/kg 组较 150、200 mg/kg 组和 250 mg/kg 组的 LDH 值（$P<0.05$）明显升高，但小檗碱150、200 mg/kg 组和 250 mg/kg 组之间的 LDH 值（$P>0.05$）无统计学差异（表 3）。

表 3 各组大鼠血浆 LDH 值的比较（LDH U/L，$\bar{x} \pm s$）

组别	例数（n）	LDH（U/L）
假手术组	8	213.00 ± 43.09
模型组	8	3 451.25 ± 453.94
小檗碱 100 mg/kg 剂量组	8	2 651.63 ± 345.47
小檗碱 150 mg/kg 剂量组	8	2 344.28 ± 385.66
小檗碱 200 mg/kg 剂量组	8	2 335.76 ± 422.91
小檗碱 250 mg/kg 剂量组	8	2 296.61 ± 407.37
普奈洛尔组	8	1 135.25 ± 171.24

注：LDH 值 7 组间方差分析 $P < 0.01$，组间比较假手术组较其他 6 组 $P < 0.01$，模型组较小檗碱各组和普奈洛尔组 $P < 0.01$，小檗碱 100 mg/kg 剂量组较小檗碱 150 mg/kg 剂量组、小檗碱 200 mg/kg 剂量组和小檗碱 250 mg/kg 剂量组 $P < 0.05$，小檗碱 150 mg/kg 剂量组、小檗碱 200 mg/kg 剂量组和小檗碱 250 mg/kg 剂量组之间 $P > 0.05$，普奈洛尔组较模型组和小檗碱各组 $P < 0.01$

3 讨 论

心脏形态学数据可以直接反应心肌梗死的严重程度。心脏的左心室是心脏发挥泵血功能的主要部位，如果梗死发生在左心室就会影响心脏的泵血功能，LVSP 值和 LVEDP 值可以较为客观准确的反应左心室的泵血功能。心肌组织梗死后会释放大量的心肌酶进入血液，目前临床上多以血浆中 CK 值和 LDH 值升高作为检测心肌梗死的重要依据，因 CK 值在梗死发生 1 周左右能反应心肌梗死严重程度，故本实验仅以 LDH 值作为反映心肌组织梗死后严重程度的血清学依据。以上实验结果说明：小檗碱可以明显减小大鼠梗死后心肌组织的缺血范围和梗死范围，明显改善左心室梗死后 LVSP 值和 LVEDP 值，明显降低血浆 LDH 值。证明了小檗碱具有对梗死后心肌组织的保护能力。我们在实验中设计了不同剂量的小檗碱组，希望能探讨不同剂量小檗碱对梗死后心肌组织保护作用的差别。实验结果表明：小檗碱 100 mg/kg 组已经具有了对梗死后心肌组织的保护作用，但其保护效果与小檗碱 150、200 mg/kg 组和 250 mg/kg 组相比有明显的差别；小檗碱 150、200 mg/kg 组和 250 mg/kg 组之间的心肌组织保护效果没有明显差异，但是均比普奈洛尔组保护效果要差。这说明，在实验中，小檗碱 150、200 mg/kg 组和 250 mg/kg 对大鼠梗死后心肌组织的保护作用相似，且均优于小檗碱 100 mg/kg 组，但小檗碱对梗死后心肌组织的保护效果不及普奈洛尔。据此，我们进一步推测小檗碱的这种保护作用的剂量上线应该在 150~250 mg/kg 之间。

已有研究表明：心脏在心肌梗死后的一段时间内会发生心室重构现象，该现象包括心肌细胞肥大、心肌纤维化、胞外基质沉积以及神经激素、细胞因子表达的变化等[1]。心室重构

技术与方法

DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2011.10.016

抗血吸虫药物吡喹酮的新合成路线

程训官，郑小红，夏　铸，张昕宇，王　宇，余　瑜
（重庆医科大学药学院药物化学教研室、重庆市药物工程研究中心，重庆　400016）

【摘　要】目的：构建一条绿色、环保且能适合工业化生产抗血吸虫药物吡喹酮的新合成路线。方法：以苯乙胺为原料，用氯乙酰氯酰化，再用邻苯二甲酰亚胺钾氨基化反应，在 P_2O_5 作用下经 Bischler-Napieralski 环合反应制得 N-[(1-亚甲基)-3,4-二氢异喹啉]邻苯二甲酰亚胺，经肼解和还原得到 1-氨甲基-1,2,3,4-四氢异喹啉盐酸盐，经环己烷甲酰化、氯乙酰氯酰化和环合得目标化合物。结果：该合成路线的总收率可达 32.8%，为原总收率的 2.13 倍。结论：该合成工艺路线操作简便，原料廉价易得，条件温和，绿色环保，收率较高，具有一定的工业化生产前景。

【关键词】吡喹酮；合成；环合；四氢异喹啉；血吸虫病
【中国图书分类法分类号】R916　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2011-05-20

A new and efficient method for the synthesis of praziquantel, an antischistosomiasis drug

CHENG Xun-guan, ZHENG Xiao-hong, XIA Zhu, ZHANG Xin-yu, WANG Yu, YU Yu
(*Department of Pharmacochemistry, College of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing Engineering Research Center for Drug*)

作者介绍：程训官（1985-），男，硕士，研究方向：药物化学。
通信作者：余　瑜，男，教授，Email：yuyu3519@163.com。

基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：30772595、30171070、30371632）；科技重大专项资助项目（编号：2010ZX09401-306-1-1）；重庆市科委攻关资助项目（编号：20021425）；重庆市教委资助项目（编号：20021804）。

【Abstract】*Objective*: To establish an industrial synthetic route for praziquantel. *Methods*: Praziquantel was synthesized with an overall yield of about 32.8% from phenylethylamine via acylation, amination with phthalimide potassium, Bischler-Napieralski cyclization, hydrazine solution, reduction, followed by acylation with cyclohexanecarboxylic acid chloride and chloroacetyl chloride, and then cyclization. *Results*: Target structures were

的基础是心肌细胞外基质改建，而基质金属蛋白酶在改建过程中起到了重要作用[8-10]。此前一些实验研究证明：小檗碱能够抑制多种组织细胞中的基质金属蛋白酶的生成[8-10]。此外小檗碱还具有抗氧化的功能[3]。基于以上研究报道，我们推测：小檗碱通过影响心室重构过程中基质金属蛋白酶的质和量以及抗氧化功能，最终实现其对梗死后心肌组织的保护作用。由于受到客观实验条件的限制，没有能对小檗碱拮抗心肌组织梗死的分子生物学机制进行深入研究，对该部分的研究还需要进一步的相关实验探讨。

参　考　文　献

[1] 熊利华，苏艳玲，华　平，等.不停跳心内直视手术的临床研究[J].中山大学学报(医学科学版)，2004，25(S1)：221-223.
[2] Spinale F G.Myocardialm atrix remodeling and the matrix metalloproteluases influence on cardiacform and functional[J].Physiol Rev，2007，87(4)：1285-1342.
[3] 句海松.小檗碱的抗氧化作用[J].中华药理学报，1991，11(6)：539.
[4] 熊茂来，魏　蕾.小檗碱对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J].湖北民族学院院报(医学版)，2009，26(1)：8-10.
[5] 付明耀.小檗碱(黄连素 berberine，BR)的药理作用及临床应用[J].中华医学杂志，2004，4(3)：87-89.
[6] 房　辉，汪　晖，李　泱.小檗碱对急性缺血心肌的保护作用[J].咸宁学院学报(医学版)，2004，18(5)：308-310.
[7] Tinyyagara S R，Pinney S P.Left Ventricalar Remodeling after myocardial infarction[J].Past，Present and Future.Mt Sinai J Med，2006，73(6)：840-851.
[8] Huang Z，Wang L，Meng S，et al.Berberine reduces both MMP-9 and EMMPRN expression through prevention of P38 pathway activation in PMA-induced macrophages[J].Cardiol，2011，146(2)：153-158.
[9] Kim S，Choi J H，Kim J B，et al.Berberine suppresses TNF-alpha-induced MMP-9 and cell invasion through inhibition of AP-1 activity in MDA-MB-231 human breast cancer cells[J].Molecules，2008，13(12)：2978-2985.
[10] Lin J F，Yang J S，Wu C C，et al.Berberine induced down-regulation of matrix metalloproteinase-1，-2 and-9 in human gastric cancer cells(SNU-5) in vitro[J].In Vivo，2008，22(2)：223-230.

（责任编辑：关蕴良）