

DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2020.01.005

苹果多酚对蟾蜍心脏活动的影响及其机制*

孙悦 李晓 刘梅芳[△]

(济宁医学院药学院,日照 276826)

摘要 目的 研究苹果多酚(apple polyphenols, AP)对蟾蜍心脏活动的影响及其机制。方法 采用在体心搏曲线记录法,观察 AP 对蟾蜍心肌收缩力和心率的影响;离体蛙心灌流法观测 AP 作用的剂量和时间曲线,并探讨其作用与 β 受体和钙内流之间的关系。结果 AP 在离体和在体两个水平均能显著抑制蟾蜍心肌收缩力,而对心率没有明显影响;AP 对心肌收缩力的抑制作用具有浓度和时间依赖性;AP 可以部分抑制肾上腺素引起的正性肌力作用;AP 对心肌收缩力的抑制作用具有钙离子依赖性。结论 AP 可以显著抑制蟾蜍心肌收缩力,其作用机制可能与抑制 β 受体和减少钙内流有关。

关键词 苹果多酚;离体蛙心;心率;心肌收缩力;机制

中图分类号:R258.5 文献标识码:A 文章编号:1000-9760(2020)02-019-05

Effects of apple polyphenols on cardiomotility of toads and the underlying mechanisms

SUN Yue, LI Xiao, LIU Meifang[△]

(College of Pharmacy, Jining Medical University, Rizhao 276826, China)

Abstract: Objective To investigate the direct effects of apple polyphenols (AP) on heart rates and myocardial contractility of toads. **Methods** In the experiment in vivo, heart beat curve of toad was recorded with the BL-420F data acquisition and analysis system. AP or normal ringer's solution were given by lymph gland injection. In the experiment in vitro, isolated toad heart perfusion method was used to observe the effect of AP on myocardial contractility. **Results** AP obviously depressed the myocardial contractility both in vivo and in vitro, but AP had little effects on heart rates. AP decreased the myocardial contractility in both time- and dose-dependent manner. AP significantly inhibited the enhanced myocardial contractility stimulated by β -adrenal agonist or elevated calcium ions in the perfusion solution. **Conclusion** AP reduced the cardiac contractility of the toad in both normal condition and adrenaline stimulated condition. The effect of AP on heart was calcium-dependent, and the mechanism was concerned with the inhibition of β -adrenal receptors and the influx of calcium ions.

Keywords: Apple polyphenols; Isolated heart of toad; Heart rate; Cardiac contractility; Mechanism

苹果多酚(apple polyphenols, AP)是苹果中所含多元酚类物质的总称,具有清除自由基、抗氧化、降血压等多种生物学功能^[1]。AP 可通过抑制血管紧张素转换酶来降低血压^[2],缓解和减少高血压以及心肌缺血过程中的氧化应激和炎症^[3],改善血管内皮功能,降低血中胆固醇,具有抗动脉粥样

硬化的作用^[4-6]。经常吃苹果可使心脏病的发病率降低 13% ~ 22%^[7]。本研究以蟾蜍为实验对象,在离体和在体两个水平观测 AP 对于心脏活动的影响,并探讨其作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物 健康蟾蜍,体重 80 ~ 100g,雌雄不限,由济宁医学院日照校区实验动物中心提供。在体研究中,蟾蜍分为对照组和实验组,每组 8 只;离

* [基金项目] 国家级大学生创新训练计划项目(201610443038),济宁医学院大学生创新训练计划项目(cx2016038)

[△] [通信作者] 刘梅芳, E-mail: lmf_bjmu@163.com

体水平研究中,每组 5~8 只,制备离体蛙心,用于灌流实验。

1.1.2 主要试剂 AP 干粉由东北林业大学王振宇教授惠赠,纯度约 70%^[8];盐酸肾上腺素注射液(上海禾丰制药有限公司)。所用其他试剂均为分析纯,包括 NaCl、KCl、无水 CaCl_2 、 NaHCO_3 、 NaH_2PO_4 和葡萄糖。蛙心灌流所用任氏液 6 种,无钙任氏液和 5 种不同钙离子浓度的任氏液(CaCl_2 浓度分别为 0.06、0.12、0.18、0.24 和 0.30mg/ml)。其中含有 0.12mg/ml CaCl_2 的任氏液为正常钙离子浓度任氏液(正常任氏液)。用正常任氏液将 AP 干粉配制成 100mg/ml 的原液,分装后置于 -20°C 冻存,实验前将 AP 原液配稀释成不同浓度的灌流液。

1.1.3 仪器 FT-100 生物张力换能器、蛙心插管、BL-420F 生物机能实验系统购自成都泰盟科技有限公司。其他实验用品均由济宁医学院药学院综合实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 在体心搏曲线记录法 记录蟾蜍在体心搏曲线^[9],待曲线稳定后,采用大腿淋巴囊注射给药的方式研究 AP 对心脏活动的影响。对照组注射正常任氏液 100 μl ;实验组注射 100mg/ml AP 液 100 μl 。比较两组给药后 3min 和 6min 的心率以及心肌收缩力变化。

1.2.2 离体蛙心灌流法 采用斯氏法制备离体蛙心标本^[9]。为保证曲线的稳定性,我们对传统蛙心灌流法进行改进^[10]。蛙心离体后每 3min 更换 1 次正常任氏液,待收缩曲线稳定后进行药物灌流实验,为观察 AP 对肾上腺素作用的影响,采用以下灌流方案。对照灌流组,首先更换新鲜正常任氏液,观察正常曲线 1min,然后换入含 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 肾上腺素的灌流液,观察效应 2min;实验灌流组采用药物预孵育的方式,先用含 AP(0.5mg/ml 或 1mg/ml)的灌流液预孵育 1min,再换入含有 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 肾上腺素和 AP 的灌流液,观察 2min。为观察灌流液中钙离子浓度对 AP 作用的影响,采用以下灌流方案:首先,用正常任氏液进行灌流。曲线稳定后,

加入含有特定浓度 CaCl_2 的任氏液,待曲线稳定后(约 1min),再加入 1mg/ml AP 灌流液,观察 2min。观察效应完毕后,均更换 3~4 次正常任氏液,每次间隔 1min,待曲线恢复到正常水平进行下一组灌流观察^[10-11]。

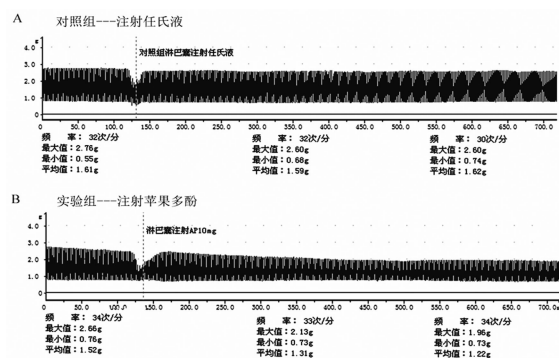
1.3 统计学方法

实验数据属于正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 PRISM 8.0 软件进行统计学分析。两组多个时间点的比较,首先采用重复测量资料的方差分析进行比较,然后选用 Sidak's multiple comparisons test 对两组同一时间点进行两两比较。多组之间比较采用单因素方差分析,然后选用 Tukey's multiple comparisons test 进行两两比较。

2 结果

2.1 在体条件下 AP 对心脏活动的影响

淋巴囊注射给药后,实验组蟾蜍心肌收缩力下降幅度大于对照组,差异具有统计学意义($F = 10.11, P = 0.0067$);不同时间点的心肌收缩力差异有统计学意义($F = 59.39, P < 0.001$);AP 对心肌收缩力的抑制作用随时间发生改变($F = 50.34, P < 0.001$)。与对照组相比,实验组蟾蜍的心肌收缩力在 AP 注射后第 3min 和第 6min 均显著降低,而心率没有显著性变化。见图 1、表 1。



注:图为蟾蜍在体心搏曲线,曲线分两段,给药前和给药后。组别如图所示,A 对照组,注射正常任氏液 100 μl ;B 实验组,注射 100mg/ml AP 100 μl 。

图 1 在体条件下 AP 对蟾蜍心率和心肌收缩力的影响

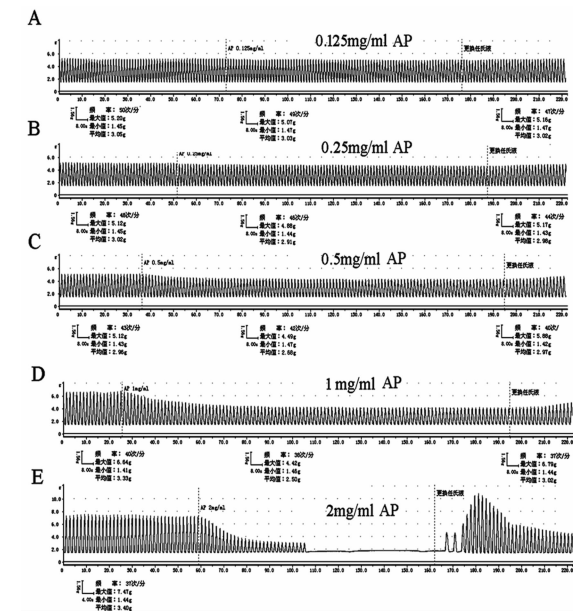
表 1 在体条件下 AP 对蟾蜍心率和心肌收缩力的影响(n=8)

	心肌收缩力/g			心率/次·min ⁻¹		
	给药前	给药后 3min	给药后 6min	给药前	给药后 3min	给药后 6min
对照组	2.35 ± 0.07	2.36 ± 0.08	2.32 ± 0.06	43.38 ± 2.17	42.50 ± 1.69	41.62 ± 2.44
实验组	2.40 ± 0.08	1.96 ± 0.06*	1.72 ± 0.09**	42.81 ± 2.53	42.25 ± 1.97	40.75 ± 2.06

注:与对照组同一时间点相比,* $P < 0.01$,** $P < 0.001$ 。

3.2 不同浓度 AP 对心肌收缩力的影响

AP 在离体水平也可以显著降低心肌收缩力(见图 2)。0.125mg/ml AP 对心肌收缩力没有明显影响;0.25mg/ml、0.5mg/ml 和 1mg/ml AP 均使心肌收缩力显著降低(见表 2)。计算给药前后的差值,对不同浓度 AP 的负性肌力作用进行比较,结果显示不同浓度 AP 对心肌收缩力的抑制作用不同($F=63.41, P<0.001$),其作用随浓度增加而增强(见表 2)。此外,实验中发现 2 mg/ml AP 可以引起心脏收缩骤停(图 2E)。值得注意的是 AP 的抑制作用可以通过换洗消除,三次换洗后心肌收缩力可以恢复到正常水平,甚至高于正常水平。这说明,AP 对心肌收缩力的抑制作用不是由于急性损伤导致的。



注:图为蛙心灌流心搏曲线,A-E 来自同一只蟾蜍,灌流液中 AP 浓度如图所示。每组灌流曲线分为 3 段,给药前、给药后以及换洗恢复阶段。

图 2 不同浓度 AP 对蟾蜍心肌收缩力的影响

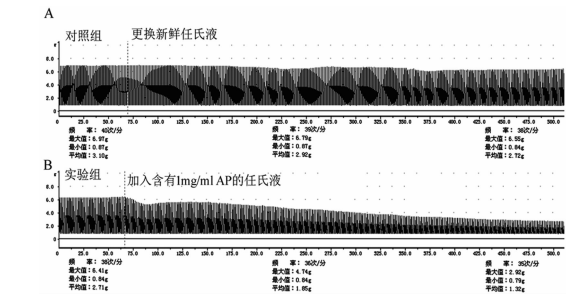
表 2 不同浓度 AP 对蟾蜍心肌收缩力的影响(n=8)

心肌收缩力/g	AP 浓度/mg · ml ⁻¹			
	0.125	0.25	0.5	1
给药前	5.03±0.05	5.02±0.07	4.95±0.08	5.33±0.17
给药后	4.92±0.05	4.67±0.08*	4.19±0.09*	3.47±0.12*
差值	0.12±0.02	0.36±0.07	0.76±0.08**	1.86±0.10***

注:与给药前相比,* $P<0.001$;与 0.25mg/ml AP 组的差值相比,** $P<0.001$;与 0.5mg/ml AP 组的差值相比,*** $P<0.001$ 。

3.3 不同孵育时间对 AP 负性肌力作用的影响

1mg/ml AP 可以降低蟾蜍心肌收缩力($F=26.22, P=0.0005$);孵育时间不同,AP 对心肌收缩力的抑制作用也有差异($F=210.20, P<0.001$);AP 的负性肌力作用随孵育时间的延长发生改变($F=464.90, P<0.001$)。与对照组相比,1mg/ml AP 在第 1min 已经使心肌收缩力略有下降,无统计学差异;在第 3、5、7min AP 均表现出显著的负性肌力作用;不同时间点,AP 对心肌收缩力的抑制作用不同($F=55.18, P<0.001$),且其抑制作用随时间延长而增加。见图 3、表 3。



注:图为蛙心灌流心搏曲线,A,B 来自同一只蟾蜍,组别如图所示;每组灌流曲线分为两段,给药前和给药后。

图 3 AP 对心肌收缩力的抑制作用与时间的关系

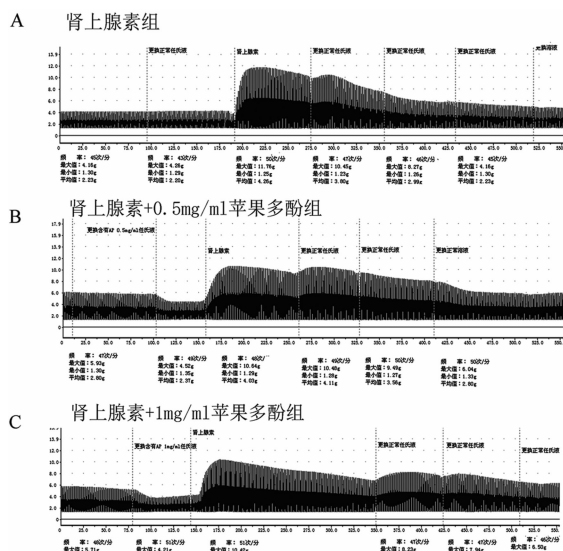
表 3 1mg/ml AP 在不同孵育时间对心肌收缩力的抑制作用(n=6)

分组	心肌收缩力/g				
	给药前	1min	3min	5min	7min
对照组	5.45±0.27	5.4±0.25	5.34±0.23	5.13±0.52	4.75±0.21
实验组	5.36±0.22	4.68±0.20	3.70±0.19*#	2.74±0.14*△	2.27±0.10*△

注:与同一时间点的对照组相比,* $P<0.01$;与 AP 处理后 1min 组相比,# $P<0.01$;与 AP 处理后 3min 组相比,△ $P<0.01$ 。

3.4 AP 对肾上腺素(AD)正性肌力作用的影响

与给药前相比,0.1μg/ml AD、0.1μg/ml AD + 0.5mg/ml AP 和 0.1μg/ml AD + 1mg/ml AP 3 个组均可以使心肌收缩力明显增强,但是在 0.5mg/ml 和 1mg/ml AP 存在的条件下,AD 的正性肌力作用显著降低。见图 4、表 4。



注:图为蛙心灌流心搏曲线,A、B、C 来自同一只蟾蜍,灌流组别如图所示。每组灌流曲线分为 4 段,给药前、预孵育、给药后以及换洗恢复阶段。

图 4 AP 对肾上腺素刺激条件下心肌收缩力的影响

表 4 AP 抑制肾上腺素刺激引起的心肌收缩力增强 (n=6)

组别	心肌收缩力/g		
	给药前	给药后	差值
0.1 μ g/ml AD	5.51 $\pm$ 0.22	13.68 $\pm$ 0.40 *	8.17 $\pm$ 0.36
0.5mg/ml AP+0.1 μ g/ml AD	5.49 $\pm$ 0.28	10.69 $\pm$ 0.88 *	5.19 $\pm$ 1.78 [#]
1mg/ml AP+0.1 μ g/ml AD	5.53 $\pm$ 0.37	9.09 $\pm$ 0.50 *	3.55 $\pm$ 0.19 [#]

注:与给药前相比,* P <0.001;与 0.1 μ g/ml AD 组差值相比, $\#P$ <0.001。

3.5 灌流液中钙浓度对 AP 抑制作用的影响

表 5 灌流液中钙离子浓度对 AP 抑制心肌收缩力的影响 (n=5)

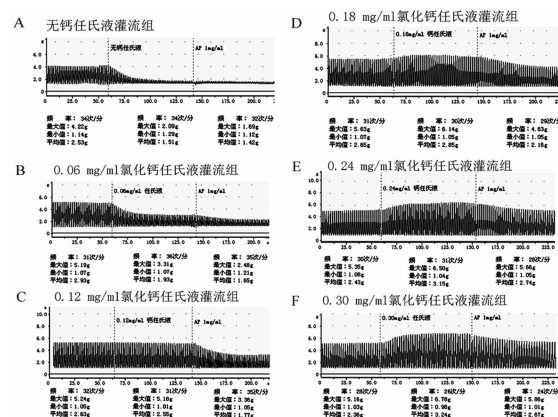
心肌收缩力/g	灌流液中氯化钙的浓度/mg $\cdot$ ml $^{-1}$					
	0	0.06	0.12	0.18	0.24	0.3
给药前	1.53 $\pm$ 0.13	3.35 $\pm$ 0.19	5.27 $\pm$ 0.11	6.91 $\pm$ 0.12	8.16 $\pm$ 0.22	8.62 $\pm$ 0.22
给药后	1.33 $\pm$ 0.15	2.43 $\pm$ 0.21 *	3.47 $\pm$ 0.07 *	5.12 $\pm$ 0.11 *	5.85 $\pm$ 0.17 *	6.21 $\pm$ 0.21 *
差值	0.17 $\pm$ 0.03	0.92 $\pm$ 0.06	1.81 $\pm$ 0.14 [#]	1.79 $\pm$ 0.13 [#]	2.31 $\pm$ 0.21 [#]	2.40 $\pm$ 0.09 [#] Δ

注:与给药前相比,* P <0.001;与 0.06mg/ml 钙离子浓度组相比, $\#P$ <0.001;与 0.12mg/ml 钙离子浓度组相比, ΔP <0.001。

4 讨论

AP 是一种非常安全的功能性食品^[12],具有良好的抗氧化性和抗炎作用^[3,4,7],其对于心脏的保护作用受到国内外广泛关注。苹果提取物可以降低小鼠血清中胆固醇、低密度脂蛋白和甘油三酯的含量,增加高密度脂蛋白,增强血液的抗氧化活性,

我们进一步观察灌流液中钙离子浓度对 AP 负性肌力作用的影响。将正常灌流液更换为无钙任氏液后,心肌收缩幅度很小,此时 AP 对心肌收缩力抑制作用微弱;灌流液中 CaCl_2 浓度范围在 0.06~0.30mg/ml 时,1mg/ml AP 均能降低心肌收缩力(见图 5)。AP 给药前后心肌收缩力变化显著($F=965.78, P<0.001$),不同钙离子灌流液条件下心肌收缩力有差异($F=236.27, P<0.001$),AP 对心肌收缩力的抑制作用随灌流液中钙离子浓度的变化而改变($F=48.99, P<0.001$)。计算不同钙离子浓度灌流条件下给药前后的差值后进行比较,结果显示 AP 对心肌收缩力的抑制作用随着钙离子浓度的增加而增强(见表 5)。



注:图为蛙心灌流心搏曲线,A-F 来自同一只蟾蜍,灌流液中 CaCl_2 浓度如图所示,AP 均为 1mg/ml;每组灌流曲线分为 3 段,正常灌流,特定钙离子浓度任氏液灌流,特定钙离子浓度任氏液+AP 灌流阶段。

图 5 灌流液中钙离子浓度对 AP 抑制作用的影响

从而减少心血管疾病的发生^[5]。苹果类黄酮可以扩张血管,降低血压,具有预防心血管疾病的作用^[6]。国内文献报道,AP 可以通过抗氧化和减少性粒细胞浸润发挥对缺血-再灌注后心肌的保护作用^[13]。这些研究表明,AP 可以通过扩张血管、降血压、抗氧化、抑制炎症等作用对心脏发挥保护作用。但是 AP 对心脏的直接影响却鲜有报道。

本文以蟾蜍为实验对象,在离体和在体两个水平研究 AP 对于心脏的直接作用。在体的研究结果表明,AP 可以显著抑制蟾蜍心肌收缩力,但对心率无明显影响;离体水平的研究结果显示,AP 可呈剂量和时间依赖性抑制正常条件下的心肌收缩力,并可显著拮抗肾上腺素的正性肌力作用。这提示 AP 抑制心肌收缩力的作用可能与抑制 β 受体有关。交感神经系统兴奋时,血中肾上腺素和去甲肾上腺素增加,作用于心脏 β_1 受体引起心肌收缩力增强,升高血压。本文结果显示 AP 可以抑制肾上腺素刺激引起的心肌收缩力增强,这提示 AP 可能通过抑制心肌收缩力发挥降低血压的作用。此外,心脏 β_1 受体过度激动会诱发心肌缺血和损伤,AP 可能通过抑制心肌收缩力避免心肌过度劳累,从而发挥对心脏的保护作用。

钙离子是心肌细胞电活动和机械活动的关键离子,本文结果显示,AP 对心肌收缩力的抑制效果随灌流液中钙离子浓度增加而增强。这提示 AP 对心肌收缩力的抑制作用具有钙离子依赖性。研究还发现,AP 可以抵消或者部分抵消高钙引起的心肌收缩力增强,这说明 AP 对心肌收缩力的抑制作用与抑制钙离子内流有关。钙超载是引起心肌缺血一再灌注损害的重要机制之一。心肌细胞内大量 Ca^{2+} 累积,会影响线粒体氧化磷酸化过程,导致细胞能量代谢障碍^[12]。本文结果提示,AP 可能通过抑制钙离子内流,防止心肌细胞钙超载,发挥心脏保护作用。

综上所述,本文首次发现 AP 可以显著降低正常以及肾上腺素刺激条件蟾蜍心肌收缩力,其作用具有钙离子依赖性,可能与抑制 β 受体和钙离子内流有关。

参考文献:

- [1] 杨薇,张晓旭,李景明. 苹果多酚功能及其作用机理的研究进展[J]. 食品研究与开发,2012,33(1):193-196. DOI:10.3969/j.issn.1005-6521.2012.01.054.
- [2] 王艺璇,王世平,马丽艳. 苹果多酚提取物对血管紧张素转化酶活性的抑制[J]. 中国农学通报,2012,28(6):257-261. DOI:10.3969/j.issn.1000-6850.2012.06.048.
- [3] Denis MC, Furtos A, Dudonne S, et al. Apple peel polyphenols and their beneficial actions on oxidative stress and inflammation[J]. PLoS One, 2013, 8(1): e53725. DOI:10.1371/journal.pone.0053725.
- [4] Auclair S, Silberberg M, Gueux E, et al. Apple polyphenols and fibers attenuate atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice[J]. J Agric Food Chem, 2008, 56(14):5558-63. DOI:10.1021/jf800419s.
- [5] Ogino Y, Osada K, Nakamura S, et al. Absorption of dietary cholesterol oxidation products and their downstream metabolic effects are reduced by dietary apple polyphenols[J]. Lipids, 2007, 42(2):151-161. DOI:10.1007/s11745-006-3008-2.
- [6] Bondonno CP, Yang X, Croft KD, et al. Flavonoid-rich apples and nitrate-rich spinach augment nitric oxide status and improve endothelial function in healthy men and women: a randomized controlled trial[J]. Free Radic Biol Med, 2012, 52(1):95-102. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.028.
- [7] 谭颺,秦晓晓,苏卿,等. 苹果生物活性物质研究与利用现状[J]. 食品工业科技,2013,34(1):58-361,367.
- [8] 王振宇,刘春平. 大孔树脂 AB-8 对苹果多酚的分离纯化[J]. 食品研究与开发,2009,30(4):21-24. DOI:10.3969/j.issn.1005-6521.2009.04.007.
- [9] 张艳霞. 生理学实验指导[M]. 北京:人民卫生出版社,2005:63-65.
- [10] 刘梅芳,刘世东. 蛙心灌流实验中心肌收缩力不稳定的原因分析与对策[J]. 生物学通报,2015,50(7):45-47.
- [11] 刘峰,马庆坤,李艳芝,等. 枸骨叶水提物对蟾蜍心肌收缩力的影响及其机制初探[J]. 济宁医学院学报,2016,39(4):275-279. DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2016.04.014.
- [12] Akazome Y, Kametani N, Kanda T, et al. Evaluation of safety of excessive intake and efficacy of long-term intake of beverages containing apple polyphenols[J]. J Oleo Sci, 2010, 59(6):321-338. DOI:10.5650/jos.59.321.
- [13] 生守喜. 苹果多酚的提取及对心脏保护作用的研究[D]. 济南:山东师范大学,2015.

(收稿日期 2016-03-28)

(本文编辑:石俊强)