

米槁心乐滴丸对大鼠心肌缺血再灌注损伤 氧自由基和血清一氧化氮的影响*

章仁安¹ 孙学惠^{2△} 邱德文^{2△} 隋艳华² 聂红² 齐敏友²

内容提要 目的:从细胞保护的角度出发,观察米槁心乐滴丸(MXLDP)对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用。方法:在结扎大鼠冠状动脉左前降支(LAD)45min 复灌后复制出的大鼠心肌缺血再灌注损伤模型上,研究 MXLDP 对氧自由基的清除效能和血清一氧化氮(NO)含量。结果:MXLDP(30mg/kg 和 120mg/kg)能显著保护大鼠心肌组织超氧化物歧化酶(SOD)活性,降低心肌组织中丙二醛(MDA)含量和减少心肌细胞肌酸磷酸激酶(CPK)的释放。能显著缩小梗塞面积,降低乳酸脱氢酶(LDH)活性并能增加血清 NO 浓度,与生理盐水对照组比较差异显著($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论:MXLDP 对大鼠心肌缺血再灌注损伤有保护作用,作用机理与抗氧化作用有关,也与防止 NO 释放减少有关。

关键词 米槁心乐滴丸 超氧化物歧化酶 脂质过氧化物 一氧化氮 心肌再灌注损伤

Effect of Migao Xinle Droplet Pills on Free Radicals and Serum Nitric Oxide on Myocardial Ischemia Reperfusion Injury in Rats QIN Ren-an, SUN Xue-hui, QIU De-wen, et al Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang(550004)

Objective: To observe the protective effects of Migao Xinle Droplet Pills(MXLDP) on experimental myocardial injury induced by ischemia and reperfusion in rat on the basis of the cytoprotection theory. **Methods:** Studied the clearance capacity of MXLDP to oxygen free radicals and the contents of serum nitric oxide(NO) on the myocardial ischemia reperfusion injury model was produced by the 45 min ligation of left descending coronary artery and reperfusion in rats. **Results:** MXLDP pretreatment(30 and 120 mg·kg⁻¹·d⁻¹) prevented significantly reduction of myocardial superoxide dismutase(SOD) activity, reduced malondialdehyde(MDA) content and myocardial creatine phosphokinase(CPK) release; diminished significantly myocardial infarction size, decreased lactate dehydrogenase(LDH) activity and increased the concentration of serum NO in comparison with the control($P < 0.05 \sim 0.01$). **Conclusions:** It has a protective effect on myocardial ischemia/reperfusion injury. The action is considered to be related to the inhibition of the oxygen free radicals and subsequent lipid peroxidation as well as prevented reduction of NO.

Key words Migao Xinle Droplet Pills, superoxide dismutase, lipid peroxide, nitric oxide, myocardial reperfusion injury

近年来心血管药物药理学尤其是血管内皮细胞药理学发展迅速。血管内皮细胞衍生的血管舒张因子(endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide, EDRF/NO)具有抗血小板聚集,抗血管平滑肌增生和舒张血管作用,这对研制新药提供了新的思路。本研究以麻醉大鼠心肌缺血再灌注损伤为模型,用染色定量组织学、酶学和生化药理学等方法,研究米槁心乐滴丸

(Migao Xinle Droplet Pills, MXLDP)对缺血心肌的保护作用并探讨其机理。

材料和方法

1 实验动物 Wistar 大鼠,雄性,体重(283±36)g,由贵州省中医研究所动物室提供。随机分为:(1)生理盐水组(生理盐水,5ml/kg);(2)米槁心乐小剂量组(30mg/kg);(3)米槁心乐大剂量组(120mg/kg);(4)消心痛组(消心痛,25mg/kg)。各组动物均为 8 只。

2 药物及试剂 MXLDP 为米槁、挥发油、冰片、薤白醇提物,阿魏酸钠等中药有效成分的提取物制成,

*国家中医药管理局资助重点项目(No.965L028)

1. 贵阳医学院附属医院药剂科(贵阳 550004);2. 贵阳中医学院

△导师

每克滴丸含中药提取物 300mg, 由我院制剂教研室提供, 实验前用生理盐水配成等体积(5ml/kg)备用; 消心痛(ISDN, 25mg/片, 山东博山制药厂, 批号 920607); 硫代巴比妥酸(TBA, 上海试剂二厂, 批号 920620); 1, 1, 3, 3-四乙氧基丙烷, (瑞士 Fluka 公司产品, 批号 86577); 氯化硝基四氮唑蓝(N-BT, 上海前进试剂厂, 批号 920403); NO 试剂盒由军事医学科学院放射医学研究所提供。

3 仪器 Σ 960 型全自动酶标仪 METERTech 公司生产; 723 型分光光度计由上海第三分析仪器厂生产。

4 测定项目及方法

4.1 缺血再灌注心肌超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)和血清肌酸磷酸激酶(CPK)的测定 Wistar 大鼠 32 只, 按前述分组给药, 每日灌胃 1 次, 共 5 次, 末次给药后 10min, 用乌拉坦与氯醛糖混合液(7:1)0.5g/kg 腹腔麻醉, 作气管插管, 正压人工呼吸, 侧位经胸骨旁切口纵行开胸, 暴露心脏, 在肺动脉圆锥左缘, 于左心耳下 2mm 处经浅层心肌穿 1 条 000 号丝线, 将 1 根直径 2mm, 长 10mm 的槽状硅胶管置于结扎线与心肌之间, 结扎冠状动脉左前降支(LAD)。实验过程中定期监测肢体 II 导联心电图(ECG), 45min 后剪断丝线再灌注 10min⁽¹⁾。再灌注结束即刻从左心室取血, 分离血清待测。同时摘取心脏, 迅速取左心室前壁全层心肌约 0.2g, 用冰生理盐水制成 5% 的心肌匀浆, 2000r/min 离心 5min, 上清液按邻苯三酚自氧化法⁽²⁾(略加改进)测 SOD 活力; 按 TBA 反应比色法⁽²⁾(利用 TBA 与丙二醛缩合形成红色产物)在 532nm

处测 OD 值, 根据以四乙氧基丙烷为标准所得的回归方程 $C = 13.92A - 0.093$, 相关系数 $r = 0.9988$, $P < 0.01$, 计算 MDA 的生成量。分离后的血清按文献⁽³⁾方法测 CPK 的活性(各标本均取双管平均值)。

4.2 缺血再灌注心肌梗塞范围、血清乳酸脱氢酶(LDH)及一氧化氮(NO)含量测定 Wistar 大鼠 32 只, 分组及用药如前述, 于实验前 1 天灌胃 1 次, 实验当日麻醉后经十二指肠再给药 1 次, 按前法结扎 LAD, 45min 后剪断丝线再灌 30min, 然后在左心室取血, 分离血清, 置氯化硝基四氮唑蓝(N-BT)染液中于 37℃ 染色, 用求积仪(自制)测量每片心肌总面积和梗塞面积, 按文献⁽³⁾方法计算梗塞面积占心脏总面积的百分比。血清用 NO 测定试剂盒按其操作办法在酶标仪(545nm)处测定吸光度值 A, 根据以亚硝酸钠为标准品所做标准曲线计算出血清中 NO 含量。另按文献⁽³⁾方法测定血清 LDH 活性(取双管平均值)。

5 统计学处理 组间比较采用 t 检验。

结 果

1 对大鼠心肌 SOD 活力 MDA 含量和血清 CPK 活力的影响 见附表。米槁心乐小剂量组、大剂量组及消心痛组心肌缺血 45min 再灌 10min 后其 SOD 活力明显高于生理盐水对照组; MDA 生成明显低于生理盐水对照组, 差异非常显著($P < 0.05$, $P < 0.01$); 且米槁心乐小、大剂量组及消心痛组均能显著减少 CPK 的释放, 与生理盐水组比, 差异显著($P < 0.01$); 而米槁心乐两个剂量组与消心痛组的作用无显著差异。

附表 各组大鼠缺血再灌注心肌组织 SOD 活力、MDA 含量心肌梗塞范围、血清 CPK 活力、NO 及 LDH 含量影响的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	鼠数	剂量 (mg/kg)	SOD (U/g)	MDA (nmol/g)	CPK (U)	心梗区/心脏 (%)	NO (μ mol/L)	LDH (U/ml)
生 理 盐 水	8	5ml/kg	600.5 $\pm$ 131.4	390.9 $\pm$ 147.4	35.57 $\pm$ 4.70	28.8 $\pm$ 5.8	6.76 $\pm$ 1.30	18.85 $\pm$ 6.13
米槁心乐小剂量	8	30	818.4 $\pm$ 94.6**	184.4 $\pm$ 63.7**	29.54 $\pm$ 4.02*	15.5 $\pm$ 4.1**	8.45 $\pm$ 1.76*	11.61 $\pm$ 1.95**
米槁心乐大剂量	8	120	838.5 $\pm$ 107.9**	150.8 $\pm$ 63.4**	28.05 $\pm$ 4.27**	8.7 $\pm$ 4.3**	8.48 $\pm$ 1.38*	11.51 $\pm$ 2.88**
消 心 痛	8	25	752.0 $\pm$ 86.6*	217.6 $\pm$ 70.1**	29.76 $\pm$ 5.25*	10.2 $\pm$ 3.5**	9.30 $\pm$ 1.89**	12.96 $\pm$ 2.85*

注: 与生理盐水组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2 对大鼠心肌梗塞范围、血清 LDH 及 NO 含量的影响 见附表。米槁心乐小剂量、大剂量及消心痛组均能缩小梗塞面积, 大剂量组作用比小剂量组明显, 与生理盐水组比, 差异非常显著($P < 0.01$); 米槁心乐小、大剂量组及消心痛组血清中 NO 明显高于生理盐水组($P < 0.05$, $P < 0.01$), LDH 活力明显低于生理盐水组($P < 0.05$, $P < 0.01$)。而米槁心乐两个剂量组与消心痛组的作用无显著差异。

讨 论

近年研究发现, 自由基产生增加, 血管内皮损伤和内皮舒张因子(EDRF)释放减少是导致心肌缺血再灌注损伤的重要因素⁽⁴⁾。心肌缺血再灌注损伤时, 自由基产生增加, 组织内抗氧化能力下降, 氧自由基与细胞膜上的多聚不饱和脂肪酸反应, 发生脂质过氧化, 其过氧化产物丙二醛(MDA)对膜有很强的破坏作用⁽⁵⁾, 可

不断损伤心肌形态和含巯基的蛋白质和酶,引起钙超载,进而抑制心功能,并可导致严重的心律失常,最终导致心肌细胞从可逆性损伤发展至不可逆损伤,直至细胞死亡。本研究结果表明,米槁心乐滴丸(30mg/kg, 120mg/kg)能显著保护缺血再灌注时心肌细胞的 SOD 活力,减少 MDA 的生成,对 CPK 和 LDH 的释放有明显的抑制作用,并能缩小梗塞面积。表明该药对心肌缺血再灌注损伤有明显的保护作用。此作用可能与该药保护内源性氧自由基清除剂 SOD 活力,减轻了氧自由基对心肌膜脂质过氧化物的损伤有关。

1988 年 Moncada S 等人首次用化学发光法定量证明一氧化氮(NO)就是内皮细胞衍生的 EDRF⁽⁶⁾,它是一种新的细胞间信息交换的重要载体。血管内皮细胞中的左旋精氨酸(L-Arg)在 NO 合成酶(NOS)催化下,可合成 NO,在体内通过一系列复杂的生理生化过程而松弛血管平滑肌,调节血管基本张力并调整局部组织血流分布⁽⁷⁾。本研究发现,米槁心乐滴丸能显著提高大鼠心肌缺血再灌注后血清中 NO 水平,表明本药抗实验性心肌缺血作用还与防止血清中 NO 的减少有关,从而保护心肌细胞和血管内皮细胞免受缺血性损害,这可能是本药抗实验性心肌缺血的另方面的原因。

消心痛是已知的扩张血管抗心肌缺血药,本实验在用消心痛作阳性对照药时也证实了硝基类扩血管药可在体内经代谢而释放 NO,通过其舒血管作用而保护缺血心肌。

芳香温通法是中医治疗寒凝气滞血瘀型胸痹的常用治法,代表方如瓜蒌薤白白酒汤,苏合香丸等应用十分广泛。本方是以米槁(又名大果木姜子)和天然冰片为主,配伍薤白等中药,运用现代工艺精制而成⁽⁸⁾。方中米槁性微温,味甘辛,能温中散寒、理气止痛;薤白温

阳散结,行气导滞;冰片开窍止痛,三药合用具有辛温通阳,行气止痛功效,是一种用于防治冠心病心绞痛(胸痹)的现代中药复方制剂。已报道米槁挥发油能松弛血管平滑肌,对猫实验性心肌缺血有保护作用^(9,10)。本课题研究了米槁心乐滴丸抗心肌缺血作用和作用机理,为临床用治胸痹提供药理依据,值得进一步深入研究。

参 考 文 献

1. 黄 宁,陈 璇,陆振刚.大鼠在体心脏缺血再灌流氧自由基产生的研究.中华医学杂志 1990;70(12):691—693.
2. 陈 奇主编.中药药理研究方法学.第 1 版.北京:人民卫生出版社,1993:942—943;951—953.
3. 徐叔云,卞如濂,陈 修.药理实验方法学.第 2 版.北京:人民卫生出版社,1991:922—926.
4. 苏静怡主编.心血管疾病的病理生理基础和发病机制.第 1 版.北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1994:336—338.
5. 华 玥,程 时.心肌缺血再灌注损伤与生物膜损伤.基础医学与临床 1993;13(1):26—29.
6. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide physiology, pathophysiology and pharmacology. Pharmacol Rev 1991;43(2):109—142.
7. Yao SK, Akhtar S, Charru A, et al. Endogenous and exogenous nitric oxide protect against intracoronary thrombosis and reocclusion after thrombolysis. Circulation 1995;92:1005—1010.
8. 林亚平,邱德文.用均匀设计法优选米槁心乐滴丸的制剂工艺条件.中国中药杂志 1995;20(4):219—220.
9. 孙学惠,隋艳华,邱德文.大果木姜子油对猫急性实验性心肌缺血的保护作用.中国药理学杂志 1995;30(6):341—343.
10. 孙学惠,隋艳华,邱德文.大果木姜子油对麻醉猫血流动力学的影响.中国中药杂志 1995;20(10):622—624.

(收稿:1996-07-12 修回:1997-05-12)

《中国骨伤》1998 年征订启事

《中国骨伤》是由中国中西医结合学会、中国中医研究院主办的国家级专业性学术刊物,由著名骨科专家尚天裕教授担任主编。本刊主要报道中医、中西医结合和西医在骨科领域的理论探讨、科研成果和临床实践经验,是广大骨伤科医务人员和科研工作者以及骨伤科业余爱好者的良师益友。本刊为双月刊,80 页。电脑排版,激光胶印,胶版纸印刷,铜版彩封,每册定价 6.00 元,国内外公开发行。国内读者请到当地邮局订购,期刊代号为 82—393;国外读者请与中国国际图书贸易总公司(北京 399 信箱)联系,国外代号 BM—587。如错过邮局预订时间,请汇款至本编辑部(加收 20% 邮寄、包装、保价费)。地址:北京东直门中国中医研究院内,邮政编码 100700。