

冠心 II 号抗缺血性心肌损伤的自由基机理实验研究*

王振宇^{1△} 钱瑞琴¹ 关树宏² 冯雪芝² 果德安² 殷俊杰³ 卢景芬²

摘要 目的:比较研究冠心 II 号及其组成成分丹参、赤芍、川芎、红花、降香清除活性氧自由基(OFR),克服实验性急性心肌缺血所致损伤及保护心肌组织的分子作用机制。方法:大鼠腹腔注射垂体后叶素(pit),致急性心肌缺血作为实验动物模型,采用低温电子顺磁共振(EPR)技术直接测定动物组织内氧自由基的水平。结果:模型组大鼠心肌组织的病理切片(HE染色)及通过大鼠心电图的描述证实心肌组织发生了急性心肌缺血的典型病变,EPR实验表明心肌组织内 OFR 水平异常增高,而冠心 II 号及其各单味药的乙醇粗提物均可使心肌组织内异常的自由基水平降低或接近正常,因而减轻了心肌组织的损伤程度。结论:氧自由基过量生成导致心肌组织损伤。运用低温 EPR 技术可直接测定其水平。冠心 II 号及其组分抵抗并修复心肌损伤作用的分子机理之一是清除组织内异常增高的活性氧自由基。为进一步探讨中药复方的组方机理提供依据。

关键词 冠心 II 号 活性氧自由基 电子顺磁共振技术 急性心肌缺血

Study on Free Radical Mechanism of Guanxin II in Antagonizing Ischemic Myocardial Damage WANG Zhen-yu, QIAN Rui-qin, GUAN Shu-hong, et al *Modern Research Center of TCM, Peking University, Beijing (100083)*

Objective: To study comparatively the effect of Guanxin II and its constituents, including Salvia, Red Peony root, Chuanxiong, Safflower and Dalbergia wood, in scavenging active oxygen free radical (OFR) to explore their mechanism in overcoming the experimental acute ischemic myocardial injury and protecting myocardial tissue. **Methods:** The experimental acute myocardial ischemic model was established by intraperitoneal injection of pituitrin to rats. OFR level in animal heart tissue was directly measured with low-temperature electron paramagnetic resonance (EPR) spectrometer. **Results:** The pathological examination of HE stained slide of myocardial tissue and electrocardiography of model animal showed that typical changes of acute myocardial ischemia occurred in myocardial tissue, EPR showed that OFR level in myocardial tissue increased abnormally. The ethanol extract of Guanxin II and its constituents could lower the increased OFR level close to normal, thus to alleviate the myocardial damage. **Conclusion:** Overproduction of OFR could induce damage of heart tissue, its level could be measured directly using low temperature EPR. One of the molecular mechanisms of Guanxin II and its constituents in antagonizing and repairing myocardial damage is to scavenge the abnormal increased active OFR in tissue. This study has provided a basis for further studying the mechanism of Chinese composite recipes and their constituents.

Key words Guanxin II, active oxygen free radical, electron paramagnetic resonance technique, acute myocardial ischemia

冠心 II 号系北京地区冠心病协作组^[1]首选方剂,含丹参、赤芍、川芎、红花、降香 5 种中药。经 1~4 年

* 北京大学 985 资助课题

1. 北京大学中医药现代研究中心(北京 100083); 2. 北京大学药学院天然药物及仿生药物国家重点实验室; 3. FDA/CFSAN 5100 Paint Branch Pkwy, MD 20740

△现在北京大学医学部医院(北京 100083)

通讯作者:卢景芬, Tel: 010-62091517, Fax: 010-62092724,

E-mail: zdsj@163.com

的观察治疗冠心病心绞痛患者 100 例,证实其疗效随疗程延长而提高,有效率达 86%,心电图改善率达 45.46%^[2]。已有文献^[3]证实该方具有降脂、降胆固醇,能增加心肌血流量和扩张血管,缓解心肌缺血状况,可降低血粘度、抗血小板聚集,促纤溶,解痉。还具有促进蛋白质合成,提高机体免疫力等作用。虽然有单味药物的有效成分如:丹参酮、川芎嗪、没食子酸等抗氧化作用的研究报道^[4],但是由于受历史和技术条件的限制,至今还未有对该方及其组成成分治疗心绞

痛的分子机制进行深入定性、定量的研究。

Black 在 1960 年用垂体后叶素(pit)成功地建立了急性心肌缺血动物模型,继而该模型被广泛地用于抗心肌缺血药物的研究^[5,6]。由于发现大量活性氧自由基的生成及脂质过氧化反应的增强是心肌缺血的主要机制^[7] 故本试验用低温电子顺磁共振(EPR)技术直接检测组织内的氧自由基(OFR)水平,试从清除活性氧自由基的角度,研究冠心 II 号抗缺血性心肌损伤的分子机制。

资料与方法

1 药物与试剂

1.1 药材 丹参为唇形科植物丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bge)的干燥根,购于四川省成都市杜臣物流有限公司,赤芍为毛茛科植物芍药(*Paeonia lactiflora* Pall)的干燥根,购于内蒙古多伦医药公司;川芎为伞形科植物川芎(*Ligusticum chuanxiong* Hort)的干燥根茎,购于四川省都江堰市杜臣物流有限公司,红花为菊科植物红花(*Carthamus tinctorius* L)的干燥筒状花冠,购于四川省成都市杜臣物流有限公司,降香为豆科常绿小乔木降香檀(*Dalbergia odorifera* T. Chen)的干燥根,购于广东省广州市致信药业有限公司。以上药材均为一级品并经本实验室鉴定,样品凭证标本存于北京大学医学部现代中医药研究中心生药标本室。

1.2 冠心 II 号及其组成成分药物的制备 丹参、赤芍、川芎、红花、降香按 2:1:1:1:1 的比例称重混合,依次用 10 倍量、8 倍量、6 倍量的水煎煮 3 次,每次 1h,提取液合并、浓缩并冷冻干燥得冻干粉备用,每克冻干粉含生药 5g。各单味成分的粗提物为乙醇提取物并蒸干成粉备用。每克生药依上述顺序制成粉的剂量分别是 0.412g、0.206g、0.382g、0.397g、0.048g。

1.3 试剂的制备 冠心 II 号冻干粉用蒸馏水配成药液,每毫升含生药 0.5g。同样,丹参、赤芍、川芎、红花、降香等单味药提取物依次用蒸馏水配成药液,每毫升含生药分别为 0.1373g、0.0343g、0.0637g、0.0662g、0.008g,垂体后叶素(pit)注射液(6u/支),由南京新天生物化学制药有限公司生产。

2 实验动物

雄性 SD 大鼠,二级动物,体重 200~300g,由北京大学医学部实验动物中心提供。

3 实验方法

3.1 分组与给药 80 只心电图正常的雄性大鼠,随机分为 9 组,每组 7~9 只。(1)对照组:灌胃饮用水(2)加药对照组:灌胃冠心 II 号(3)模型组:灌胃

饮用水(4)冠心 II 号组:灌胃冠心 II 号药液(5)丹参提取物组(丹参组):灌胃丹参提取物药液(6)赤芍提取物组(赤芍组):灌胃赤芍提取物药液(7)川芎提取物组(川芎组):灌胃川芎提取物药液(8)红花提取物组(红花组):灌胃红花提取物药液(9)降香提取物组(降香组):灌胃降香提取物药液。以上均每次 0.5ml/100g 2 次/日。灌胃 2 周后(3)~(9)组均用垂体后叶素造成“缺血”损伤。

3.2 动物模型和组织形态学观察 参照文献^[4]并作一定修改后建立模型。模型组及给药组于最后一次灌胃 30min 后,以戊巴比妥钠(0.05g/kg)行腹腔注射麻醉,仰卧固定在鼠板上,将多导生理记录仪(日本 San·ei 公司)的针状电极分别插入皮下。此时仪器灵敏度调至 1mV=2cm、100mm/s。先用示波器连续观察并记录一段 II 导的正常心电图,然后自腹腔注射 Pit(20u/kg),对照组腹腔注射等剂量的生理盐水,于注射后每 5min 记录 1 次心电图,直至 60min。2h 后开胸,取心脏,快速放入 4% 的多聚甲醛固定液中,经固定、包埋、切片、HE 染色后,光镜下观察组织形态学的变化。

3.3 心电图的观察指标 参照文献^[8],本实验对心肌缺血的观察指标主要为 S-T 段的偏移程度,一般以 J 点(指 QRS 终点和 S-T 段开始交接之点)后 0.04s 处为测定点,每时点测 5 个波型,取其平均值,记录并计算 J 点的变化值(无论升高或降低,取其变化的绝对值)及心率的实测值。

3.4 心肌组织 EPR 检测 各组最后一次灌胃 30min 后,先戊巴比妥钠(0.05g/kg)腹腔注射麻醉后,模型组及给药组分别腹腔注射 pit(20u/kg),对照组腹腔注射等剂量生理盐水,注射后 30min 时打开胸腔,迅速取下心肌组织,在低温(4℃)条件下迅速剪成条块装入直径为 0.4cm、长 3cm 的塑料管内,投入液氮冷冻待测。测定时,样品放入低温杜瓦中并置于 EPR 波谱仪(Bruker-ESR-300 型,德国)谐振腔的中心部位测定。测定条件:X 波段、中心磁场 336mT、微波功率 20mW、频率调制 100kHz、调制幅度 0.5mT、增益 2×10⁵、时间常数 167.77ms、扫描宽度 60mT、扫描时间 167.77s、温度 77K。以所测得的 EPR 图谱的第一个峰的高度即为被测组织中 OFR 的信号强度^[9]。

4 统计学处理

采用 SPSS 统计软件进行方差分析(ANOVA)和组间 t 检验。

结 果

1 pit 所致急性心肌缺血的最佳实验条件 心电

图(图 1)中以 J 点及心率的变化为指标,当 pit 用量为 10u/kg,腹腔注射后 5min,缺血情况较明显($P < 0.05$)随后逐渐恢复正常;而当 pit 用量为 30u/kg,腹腔注射后 5min,心肌缺血程度较重($P < 0.001$),20~30min 时稍有稳定,随后又加重($P < 0.01$),且易致大鼠死亡。当 pit 用量为 20u/kg,缺血程度适中(各时点 $P < 0.05$),腹腔注射后 20~30min 时可作为最佳实验条件。

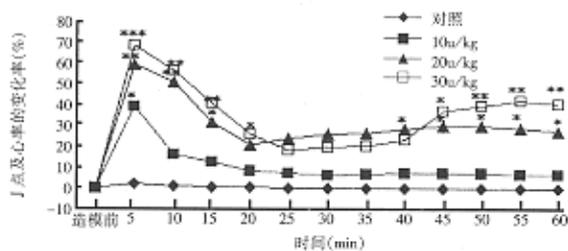


图 1 腹腔注射不同剂量 pit 对心电图 J 点的影响

注:与腹腔注射 pit 前比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; $n = 9$

2 冠心 II 号对 pit 所致急性心肌缺血心电图的影响 见图 2。冠心 II 号能改善 pit 所致急性心肌缺血,图 2 中心电图描记的心肌缺血及心率减慢的程度所测各时点指标,与模型组比较差异有显著性($P < 0.05$);与对照组比较,随着时间的延长(至 60min 时),心肌缺血的程度逐渐减轻并接近正常水平,提示冠心

II 号有保护心肌的作用。

3 冠心 II 号对 pit 所致急性心肌缺血心肌结构的影响 见图 3。对照组 心肌细胞排列整齐,肌纹理

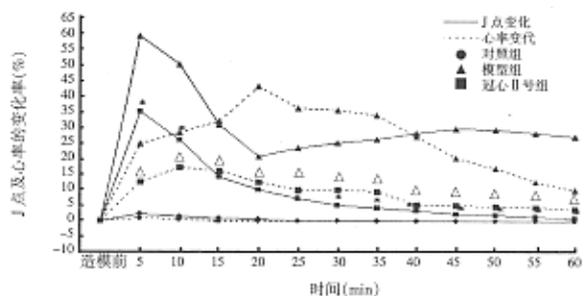


图 2 冠心 II 号对 pit 所致急性心肌缺血心电图 J 点变化及心率的影响

注:与模型组比较, * $P < 0.05$ (J 点的变化), ^ $P < 0.05$ (心率的变化); $n = 9$

清楚,心肌间小血管无明显扩张、瘀血或出血。模型组 心肌细胞可见灶状变性坏死,HE 染色下表现为肌浆凝聚,肌纹理消失。胞浆明显红染,细胞核固缩或溶解、消失。心肌纤维变化呈波浪形,排列紊乱,肌纤维间距增宽,心肌间小血管可见明显扩张、瘀血。冠心 II 号方组:偶见心肌细胞变性坏死,心肌间小血管轻度扩张充血。

4 冠心 II 号及其各单味药的粗提物对 pit 所致急性心肌缺血大鼠心肌组织中 OFR 的影响 见图 4。

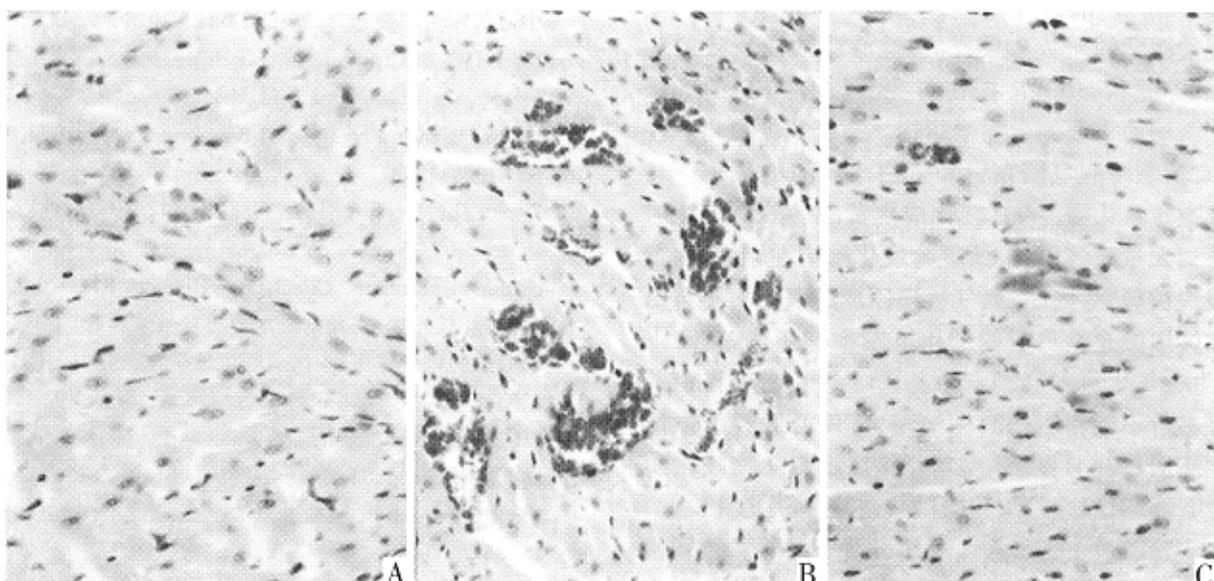


图 3 冠心 II 号对 pit 所致急性心肌缺血大鼠心肌结构的影响

注:A 为对照组,心肌细胞排列整齐,肌纹理清楚,心肌间小血管无明显扩张、瘀血或出血;B 为模型组,心肌细胞可见灶状变性坏死,肌浆凝聚,肌纹理消失,细胞核固缩或溶解、消失,心肌纤维变化呈波浪形,排列紊乱,肌纤维间距增宽,心肌间小血管可见明显扩张、瘀血;C 为冠心 II 号方组,偶见心肌细胞变性坏死,心肌间小血管轻度扩张充血(HE 染色 $\times 200$)

低温 EPR 实验直接测定 pit 所致急性心肌缺血大鼠的心肌组织中 OFR 水平。各组所测得的 OFR 强度与模型组比较, 差异有显著性 ($P < 0.05$); 与对照组比较, 差异无显著性 ($P > 0.05$), 说明冠心 II 号及其组成成分对心肌组织的 OFR 具有清除作用。而加药对照组与对照组比较, 差异无显著性 ($P > 0.05$), 说明冠心 II 号对心肌组织内正常的 OFR 无明显的影响。

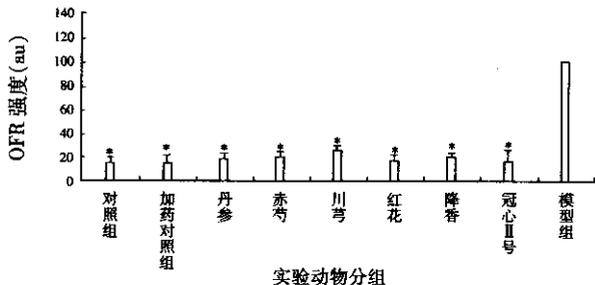


图 4 冠心 II 号及其组成成分对 pit 所致急性心肌缺血大鼠的心组织中 OFR 的影响

注: 与模型组比较, * $P < 0.05$; $n = 8$

讨 论

冠心 II 号方中丹参、红花活血祛瘀; 川芎活血行气; 赤芍祛瘀止痛; 降香活血散瘀, 止血定痛。诸药合用, 共奏活血化瘀, 行气止痛之功。现代药理学试验证明了上述 5 种中药分别具有扩张血管、降低血粘稠度、抗炎、解痉等作用。

现代医学的研究表明^[3]: 急性心肌缺血所致的胸痛、缺氧等症状与 OFR 损伤有关, 因此, OFR 的水平是一个敏感而重要的生物学指标。在心肌缺血再灌注过程中, 黄嘌呤脱氢酶在钙和蛋白水解酶的催化下转化成黄嘌呤氧化酶, ATP 转化成次黄嘌呤。再灌注时突然得到大量氧气供应, 黄嘌呤氧化酶活性剧增, 次黄嘌呤很快被氧化, 同时, 氧气被还原成超氧阴离子自由基。在体内微量铁离子的催化下发生 Haber-Weiss 反应, 产生过氧化氢和羟基自由基^[10]。当大量氧自由基与膜上多价不饱和脂肪酸侧链结合, 使心肌组织血清过氧化脂质(LPO)显著增多。同时, 超氧化物歧化酶(SOD)下降, 引起心肌细胞膜结构改变, 心肌受损。

本实验通过 pit 致急性心肌缺血, 证实了需氧代谢旺盛的心肌组织易产生较多量的毒性氧化物, 这些毒性产物对所在的组织结构与功能交替损伤, 从而出

现心肌缺血、心率减慢及心肌细胞损害, 进一步通过低温 EPR 技术也直接检测到了大量氧自由基生成。冠心 II 号及其各单味药的乙醇粗提物在预防性服用的方式下, 均具有抗氧化、保护心肌细胞和抗缺血的能力, 而且验证了冠心 II 号对正常心肌组织内的 OFR 无明显的影响, 说明该方在清除异常增生的 OFR 方面作用显著, 表明了中医复方的合理性、科学性。

总之, 本研究通过心电图和心肌结构形态的观察, 以及低温 EPR 实验证实: pit 所致实验动物心肌产生类似急性心肌缺血损伤, 造成心肌结构的改变, 并且使得心肌组织内活性 OFR 的浓度明显升高产生氧化性损伤, 经冠心 II 号灌胃的实验动物中, pit 所致的损伤及组织 OFR 的水平明显降低。表明冠心 II 号抗心肌损伤的分子机理之一是清除了组织内因心肌缺血所产生的过多的活性 OFR, 为进一步深入探讨中药复方的组方机理提供了一种新的思路。

参 考 文 献

- 何嘉延. 内科病最新治疗. 天津: 天津科技翻译出版公司, 1987: 415.
- 王润生, 杨淑坤, 王继红. 中医复方研究和应用. 北京: 中国科学技术出版社, 1993: 266.
- 上海第二医科大学附属第三医院. 冠状动脉粥样硬化性心脏病. 上海: 上海科技出版社, 1978: 7.
- 赵克然, 杨毅军, 曹道俊. 氧自由基与临床. 北京: 中国医药科技出版社, 2000: 355—359.
- 吴伟康, 侯 灿, 卢景芬. 垂体后叶素性心肌缺血模型再探. 中国病理生理杂志 1993; 9(2): 124—127.
- Black JW. Electrocardiographic changes produced in rabbits by vasopressin (pitressin) and their alterations by prolonged treatment with a commercial heart extract. Pharma Pharmacol 1960; 12: 87.
- Zweier JL, Rayburn BK, Flaherty JT, et al. The effect of superoxide dismutase on free radical concentration in post-ischemic myocardium. Circulation 1986; 74: 371—380.
- 何小萍, 任先达. 飞龙掌血水提物对垂体后叶素所致大鼠缺血心肌的保护作用. 中国病理生理杂志 1998; 14(3): 283—285.
- Zweier JL, Kuppusamy P, Williams R, et al. Measurement and characterization of post-ischemic free radical generation in the isolated perfused heart. J Biol Chem 1989; 261: 18890—18895.
- 赵保路, 张春爱, 忻文娟. 心肌缺血再灌注损伤和活性氧自由基. 生理科学 1989; 9: 193—201.

(收稿 2002-07-16 修回 2003-01-26)