· 学术探讨 ·

冠状动脉微血管异常、心肌细胞凋亡靶向下活血化瘀方剂吸收成分的间接与直接作用

黄 熙 秦 锋 张红敏△ 任 平

摘要 在冠状动脉微血管异常与心肌细胞凋亡的靶向下，发现：冠心Ⅱ号与其三种体内吸收成分（阿魏酸、丹参素、羟基红花黄色素 A）的抗凋亡的疗效一致，且剂量－心肌血流量－心肌细胞凋亡存在一定的联系。本研究在上述对冠心Ⅱ号的工作基础上，进一步提出活血化瘀方剂存在剂量－心肌血流量相关的间接与直接作用的假说，即活血化瘀方高剂量急性口服保护心脏的作用是通过增加心肌血流量的间接途径，发挥抗心肌细胞凋亡作用。而低剂量口服不增加心肌血流量，慢性的心脏保护作用是通过直接途径，发挥抗心肌凋亡的作用。本文也论述了该假说的科学依据和意义。

关键词 冠脉状动脉微血管异常；心肌细胞凋亡；活血化瘀方剂；药动学

Indirect and Direct Effects of Absorption Components of Composite for Activating Blood and Removing Stasis on Coronary Microvascular Dysfunction and Myocardial Cell Apoptosis HUANG Xi, QIN Feng, ZHANG Hong-min, et al *Institute of Integrated Chinese and Western Medicine, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha (410008)*

ABSTRACT It has been found that in case of targeted for coronary microvascular dysfunction and myocardial cell apoptosis, the anti-apoptosis effect of Guanxin No. 2, a Chinese herbal composite for activating blood and removing stasis (ABRS), is identical to that of its three absorption components (ferulic acid, Danshensu and hydroxylcarthamin yellow), and there exists a dose/myocardial flow-dependent direct or indirect acting path. Based on which, a hypothesis regarding the dose/myocardial flow related direct/indirect action of Chinese ABRS composite, with the same targets as before, was put forward by the authors in this paper, that is, the myocardial protective effect of acute high dose administration of the composite is acted through indirectly path by increasing the myocardial flow (MF); while that of chronic low dose administration is realized directly without change of MF. The evidence and significance of this hypothesis were discussed.

KEYWORDS coronary microvascular dysfunction; myocardial cell apoptosis; composite for activating blood and removing stasis; pharmacokinetics

“冠状动脉微血管异常”指冠状动脉微循环功能与结构的异常，通常用冠状动脉/心肌血流量（coronary/myocardial flow, C/MF）、冠状动脉血流储备（coronary flow reserve, CFR）的异常来反映[1]。冠状动脉微血管异常是冠心病的一个治疗靶标[1]，而抗心肌凋亡是治疗冠心病的第二个靶标[2-5]。冠心Ⅱ号由丹参与川芎、红花、赤芍、绛香组成，共同行使行气活血化瘀的功效。新近的研究发现，冠心Ⅱ号及其三种吸收成分（阿魏酸、丹参素、羟基红花黄色素 A 组成的混合物）FTA 在这两个治疗靶标上均能发挥一定的心脏保护作用[6-10]。

对心肌梗死（myocardial infarction, MI）大鼠灌胃 15 g/kg 冠心Ⅱ号和 FTA，能通过增加 MF 的间接途径，达到抗心肌凋亡的效果[6]；长期灌胃 5 g/kg 的冠心Ⅱ号，MF 正常，发挥直接抗心肌细胞凋亡的效果[7]。由此假设：活血化瘀方剂的吸收成分存在剂量-MF 相关的间接/直接作用途径。即高剂量的冠心Ⅱ号增加 MF 而发挥间接的心脏保护作用、低剂量的冠心Ⅱ号未改变 MF 而发挥的直接心脏保护作用。科学依据如下。

基金项目：国家自然科学基金资助项目（No. 30572339）；国家杰出青年基金资助项目（No. 30325045）

作者单位：中南大学湘雅医院中西医结合研究所（长沙 410008）

通讯作者：黄 熙，Tel：0731－84327222，E-mail：tcmhuangx59@163.com

△现在河南省眼科研究所

万方数据

1　选择 C/MF、CFR 异常与心肌细胞凋亡作为靶点的依据　冠脉微血管异常学说将 C/MF、CFR 异常，和冠脉微循环功能与结构的异常定为冠心病的重要的危险标志与心肌缺血的发病机制[1]；冠心病血瘀证的概念是冠脉的血液循环障碍，两者内涵近似。冠脉微血管异常学说为心肌缺血与冠状动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)之间建立起了很好的联系[11,12]。选择心肌细胞凋亡的依据：心肌细胞凋亡长期以来一直作为冠心病发病的基本机制、预防与治疗的靶标[2-5]。Webster 等[5]发表在国际著名期刊 TiPS 上的论文中也突出强调了心肌细胞凋亡作为减少 MI 的治疗靶的作用。

2　冠心Ⅱ号在抗心肌凋亡的间接作用与直接作用

2.1　间接作用　甘洪全等使用经胸多普勒回声心动描记术法(transthoracic Doppler echocardiography, TTDE)测定了冠脉血流速率，舒张期最大血流速度和舒张期血流速度时间积分等。结果显示：健康人口服冠心Ⅱ号，当剂量为 3 g/kg 时，药后 30 min 明显增加冠脉血流速率，而心率、射血分数、血压无明显变化[13]。而大鼠一次灌胃冠心Ⅱ号(15 g/kg)用荧光微球技术测定结果表明，也能明显增加 MF[6]。

研究发现，冠心Ⅱ号(15 g/kg)在缺血大鼠造模前一次灌胃可明显减小 MI 面积。其机制涉及抑制心肌细胞凋亡和 Caspase-3 的活性，而 5 g/kg 冠心Ⅱ号则无此结果[9]。同时用液质联用法研究冠心Ⅱ号的药物动力学，发现该方吸收入人体内的成分为阿魏酸、丹参素、红花黄色素 A、芍药苷、原儿茶醛/酸[6]。药理学研究发现右阿魏酸、丹参素、羟基红花黄色素 A 组成的混合物 FTA(剂量等于冠心Ⅱ号中含量)能够增加 MF、抗凋亡疗效与母方冠心Ⅱ号一致[6]。冠心Ⅱ号增加了冠脉血流(CF)，间接的发挥了心肌保护作用。进一步研究表明，一次给予 15 g/kg 冠心Ⅱ号的间接的心肌保护作用与其抗氧化应激、抗心肌细胞凋亡，以及调节线粒体的细胞色素 C 的转移等机理有密切关系[9,10]。

2.2　直接作用　同样使用上述指标，我们发现低剂量的冠心Ⅱ号[人体：1.5 g/(kg·d)；大鼠 5 g/(kg·d)]一次给药，不增加 MF，也不具有心肌保护作用[8-10]。但 MI 大鼠在造模前多次给药(每天 5 g/kg 连续灌胃给药 15 天)，则具有同样心肌保护作用[7]。进一步研究表明，长期给予 5 g/kg 冠心Ⅱ号的心肌保护作用与其抗心肌细胞凋亡，降低 Caspase-3 和 Caspase-9 的活性，调节 Bcl-2 家族的平衡有密切联系[7]。

根据上述冠心Ⅱ号抗凋亡疗效，建立了高剂量时 CF 增加-间接作用、小剂量时 CF 不增-直接作用的联系。而冠心Ⅱ号与吸收成分 FTA 的药效一致，基本阐明冠心Ⅱ号的抗心肌凋亡作用主要是由吸收入血中的 FTA 引起的。冠心Ⅱ号的临床研究表明：它对减缓心绞痛、降低心电图 ST 段、调节血脂、降低内皮素和血黏度均有良好疗效[14]，这与早年陈可冀等人的结果一致[15]。冠心Ⅱ号通过下调凋亡刺激基因 bax、fas 表达、上调凋亡抑制基因 bcl-2 表达从而保护灌注/再狭窄(I/R)心脏，且存在一定的量-效关系[16]。

3　本假说相关机制有待深入研究的问题

3.1　冠心Ⅱ号的相关工作概述　对中药复方进行质量控制，是保证研究结果的稳定性和可重复性的必要保证。冠心Ⅱ号汤剂中主要含有阿魏酸、丹参素、羟基红花黄色素 A、芍药苷、原儿茶醛 5 种活性成分。黄熙课题组的大量研究均以冠心Ⅱ号进行了质量控制为基础，探讨药效学机制[6-10]。Zhao J 等[8]对健康志愿者进行了研究，表明冠心Ⅱ号具有时间、剂量依赖性地增加健康人 CF 的作用；动物研究表明，高剂量冠心Ⅱ号增加健康大鼠 MF；冠心Ⅱ号及其 FTA 在 MI 大鼠一次灌胃能减小 MI 面积、抗凋亡、抑制 Caspase-3 活性，且基本阐明该方的疗效是由吸收入体内的 FTA 引起的[6]。慢性口服冠心Ⅱ号颗粒剂也能上调模型大鼠 Bcl-2 蛋白的 mRNA 的表达[16]；而含阿魏酸成分的相关方剂对 AS 模型的泡沫细胞-AS 最早期的特征和标志-相关的 MCP-1、CAM-1、CD36 基因的 mRANs 表达的影响[17]、降低 C-反应蛋白/TNF-α 而提高大鼠存活率[18]。上述工作的积累为本假说提供了部分依据。

3.2　冠心Ⅱ号对冠心病患者(或疾病模型)的治疗效果有待进一步研究　目前对该假说验证，仍然停留在健康人、健康大鼠的水平上[6,7]，冠心Ⅱ号是否增加 AS 模型的 MF 仍然需要进一步的研究。缺乏冠脉张力舒张及其分子调控机制的研究，使得冠脉舒张导致 CF 增加的观点停留在推测上。另外，缺乏细胞水平研究来排除间接途径可能存在的对细胞的直接作用，这也有待深入下去。

3.3　慢性口服 FTA 在抗凋亡方面的效果也有待进一步研究　进行 FTA 与母方抗凋亡的比较药效学，使剂量-MF 介导的直接途径作用仍然停留在粗制剂上。冠心Ⅱ号慢性疗效是否由 FTA 引起？该方与 FTA 是否在 AS 混合 MI 模型上具有抗凋亡效果？该方是否对冠脉细胞的作用？可以有助于探讨该方对 AS 的作用机制。

万方数据

随着相关的科学理论与技术的发展，一些上述存在的问题均有望得到解决。新近的文献报道用 TTDE 方法测定 LDLR/ApoB48 双基因敲除鼠(高度 AS 模型)的 CFR 明显下降并与病理性 AS 阻塞一致[19]；将 MI 区的影象学与定量结合起来的方法，用放射微球法测定 MI 区的血流[20]，可以作为冠心Ⅱ号与 FTA 改善 MI 区血流，支持其抗 MI 的可靠证据。而阐明药物抑制凋亡的分子机制，需要从抗心肌细胞凋亡，抗氧化应激，抗炎等多个方面进行探讨。

4 本假说对复方在离体血管环和细胞水平研究及阐明复方体内药效物质及其作用机制研究的意义

长期以来，方剂的离体实验采取血清药理学方法，即将口服方剂后的含药血清进行离体实验。这可避免被吸收成分加入离体系统对结果的干扰，但血清内仍然存在内源性活性物质的干扰。而粗制剂直接加入法中未被吸收成分肯定也干扰离体实验结果。如银杏叶粗提物的研究表明，离体实验对 CYP2C9 具有抑制效果，在体研究则无效[21]。本假说提出的生物方剂分析离体药效方法[22]：通过方剂的药动学研究，明确方剂吸收成分，将方剂吸收入血成分(如冠心 II 的 FTA)加入离体的反应体系，而不是直接将粗制剂加入，可避免上述未吸收成分的干扰。

冠心病的发病率高、病死率高，已成为人类健康的“头号杀手”，MI 是其主要致死原因。目前抗凋亡取得许多实验成就，但临床上至今未使用抗凋亡西药。冠心Ⅱ号具有行气活血功效，大量临床和实验证实了该方对冠心病的疗效和抗心肌缺血的作用[23]。冠心Ⅱ号的机制涉及抑制 Caspase-3 活性和细胞凋亡[6-9]、抗氧化应激[10]和增加 C/MF 等作用[7,8,13]，并初步证明这些疗效与吸收体内的 FTA 有关[6,23]。这些药理学机制的探讨为本假说打下了坚实的基础。

总而言之，通过阐明活血方吸收成分抗心肌缺血的间接与直接作用的分子机制，对揭示行气活血与君臣佐使的本质，丰富冠心病抗凋亡治疗学内涵，开辟方剂作用原理研究新途径和促进中医药学科发展具有重要意义。

参 考 文 献

[1] Paolo GC, Filippo C. Coronary microvascular dysfunction [J]. N Eng J Med, 2007, 356(8): 830-840.

[2] Haunstetter A, Izumo S. Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease [J]. Circ Res, 1998, 82(11): 1111-1129.

[3] Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points [J]. Cell, 2004, 116(2): 205-219.

[4] Willis SN, Fletcher JI, Kaufmann T, et al. Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not bax or bak [J]. Science, 2007, 315(5813): 856-859.

[5] Webster KA. Programmed death as a therapeutic target to reduce myocardial infarction [J]. Trends Pharmacol Sci, 2007, 28(9): 492-499.

[6] Huang X, Qin F, Zhang HM, et al. Cardioprotection by Guanxin Ⅱ in rats with acute myocardial infarction is related to its three compounds [J]. J Ethnopharmacol, 2009, 121(2): 268-273.

[7] Huang X, Zhang XY, Qin F, et al. Pretreatment with a traditional Chinese formula, Guanxin Ⅱ, reduces cardiac apoptosis via the Akt survival pathway in rats with myocardial ischemia [J]. Tohoku J Exp Med, 2010, 220(2): 157-163.

[8] Zhao J, Huang X, Tang WF, et al. Effect of oriental herbal prescription Guan-Xin-Er-Hao on coronary flow in healthy volunteers and antiapoptosis [J]. Phytother Res, 2007, 21(10): 926-931.

[9] Zhao HW, Qin F, Liu YX, et al. Antiapoptotic mechanisms of Chinese medicine formula, Guan-Xin-Er-Hao, in the rat ischemic heart [J]. Tohoku J Exp Med, 2008, 216(4): 309-316.

[10] Qin F, Liu YX, Zhao HW, et al. Chinese medicinal formula Guan-Xin-Er-Hao protects the heart against oxidative stress induced by acute ischemic myocardial injury in rats [J]. Phytomedicine, 2009, 16(2-3): 215-221.

[11] Buffon A, Sestito A, Natale L, et al. Relation between stress-induced myocardial perfusion defects on cardiovascular magnetic resonance and coronary microvascular dysfunction in patients with cardiac syndrome X [J]. J Am Coll Cardiol, 2008, 51(4): 466-472.

[12] Erbs S, Linke A, Schachinger V, et al. Restoration of microvascular function in the infarct-related artery by intracoronary transplantation of bone marrow progenitor cells in patients with acute myocardial infarction: the Doppler substudy of the reinfusion of enriched progenitor cells and infarct remodeling in acute myocardial infarction (REPAIR-AMI) trial [J]. Circulation, 2007, 116(4): 366-374.

[13] 甘洪全，黄熙，田新桥，等. 冠心Ⅱ号汤剂对健康男性冠脉血流和心脏收缩舒张功能的影响[J]. 中国中西医结合杂志，2004，24(9)：785-789.
Gan HQ, Huang X, Tian XQ, et al. Effect of oral administration of Guanxin Ⅱ decoction on coronary blood flow and cardiac systolic/diastolic function in healthy males [J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2004, 24(9): 785-789.

万方数据

[14] 徐睿，黄熙. 冠心Ⅱ号治疗冠心病心绞痛的临床观察[J]. 成都中医药大学学报，2001，24(4)：17-19.
Xu R, Huang X. Clinical observation of treating coronary heart disease with Guanxin-erhao[J]. J Chengdu Univ Tradit Chin Med, 2001, 24(4): 17-19.

[15] 陈可冀，钱振淮，翁维良. 活血冲剂治疗冠心病心绞痛100例临床疗效分析. 见陈可冀主编. 活血化瘀研究与临床[M]. 北京：中国协和医科大学北京医科大学联合出版社，1993，290-295.
Chen KJ, Qian ZH, Weng WL. Clinical observation of treating coronary heart disease 100 cases with Huoxue-Chongji. In: Chen KJ, ed. The research of blood stasis syndrome and activating blood to remove blood stasis [M]. Beijing: Peking Medical College and Peking Union Medical College Press, 1993, 290-295.

[16] 陈慧，杨玉兴. 活血舒心合剂(冠心Ⅱ号)对心肌缺血再灌注大鼠 Fas 蛋白表达的影响[J]. 安徽中医学院学报，2004，23(5)：27-30.
Chen H, Yang YX. Influence of Huoxue Shuxin Mixture on expression of Fas protein in rat hearts with myocardial ischemia reperfusion injury [J]. J Anhui Tradit Chin Med Coll, 2004, 23(5): 27-30.

[17] Zhang H, Chen S, Deng X, et al. The effects of Danggui-Buxue-Tang on blood lipid and expression of genes related to foam cell formation in the early stage of atherosclerosis in diabetic GK rats [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2007, 77(3): 479-481.

[18] Zhang H, Chen S, Deng X, et al. Danggui-Buxue-Tang Decoction has an anti-inflammatory effect in diabetic atherosclerosis rat model [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2006, 74(2): 194-196.

[19] Saraste A, Kytö V, Laitinen I, et al. Severe coronary artery stenoses and reduced coronary flow velocity reserve in atherosclerotic mouse model Doppler echocardiography validation study [J]. Atherosclerosis, 2008, 200(1): 89-94.

[20] Wu KC, Kim RJ, Bluemke DA, et al. Quantification and time course of microvascular obstruction by contrast-enhanced echocardiography and magnetic resonance imaging following acute myocardial infarction and reperfusion [J]. J Am Coll Cardiol, 1998, 32(6): 1756-1764.

[21] Mohutsky MA, Anderson GD, Miller JW, et al. Ginkgo biloba: evaluation of CYP2C9 drug interactions *in vitro* and *in vivo*[J]. Am J Therapeutics, 2006, 13(1): 24-31.

[22] 黄熙. 生物方剂分析中医药学研究的设想、背景与意义[J]. 中国中西医结合杂志，2002，22(4)：251-252.
Huang X. Idea, background and significance of traditional Chinese medicine research according to bioethnopharmaceutical analyses [J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2002, 22(4): 251-252.

[23] Qin F, Huang X. Guanxin Ⅱ for the management of coronary heart disease [J]. Chin J Integr Med, 2009, 15(6): 472-476.

(收稿：2008-05-28　修回：2010-02-04)

《中国中西医结合杂志》第七届编委会名单

总 编 辑　陈可冀

副总编辑　沈自尹　肖培根　雷　燕

顾　　问　吴咸中　辛育龄　陈维养　邓铁涛　王永炎　侯　灿　曹洪欣

编辑委员(以姓氏笔画字母为序)

于德泉　马必生　王一涛　王卫霞　王今达　王文健　王宁生　王　伟　王　阶　王拥军
王昌恩　王学美　王宝恩　王硕仁　王雪苔　车镇涛　尹光耀　叶文才　史大卓　史载祥
白彦平　吕志平　吕爱平　吕维柏　朱　兵　危北海　庄曾渊　刘干中　刘　平　刘　良
刘建平　刘建勋　刘耕陶　刘猷枋　齐清会　阮新民　孙汉董　孙　燕　杨任民　杨秀伟
李乃卿　李大金　李玉光　李廷谦　李连达　李国栋　李顺成　李　恩　李焕荣　连　方
吴伟康　吴泰相　吴根诚　时毓民　邱　峰　张大钊　张永贤　张永祥　张伯礼　张国玺
张荣华　张亭栋　张家庆　张敏州　陆付耳　陈士奎　陈小野　陈冬燕　陈香美　林志彬
林求诚　林瑞超　郁仁存　果德安　金益强　周文泉　周　俊　周霭祥　赵一鸣　赵伟康
赵健雄　洪传岳　栗原　博(日本)　顾振纶　徐治鸿　徐　浩　郭赛珊　唐由之　唐旭东
凌昌全　黄光英　黄怡超　黄晓愚　黄　熙　曹小定　梁晓春　葛秦生　董竞成　董福慧
韩济生　谢竹藩　谢明村　蔡定芳　裴正学　廖家桢　廖福龙　衡先培　戴瑞鸿

Yung-chi CHENG(美国)　Sheng-xing MA(美国)　Qun-hao ZHANG(美国)

万方数据