

葛根素配伍丹酚酸B注射使用对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用

杨 华^{1*},董 兵²,宋莹莹¹(1.江苏省东海县人民医院药剂科,江苏 连云港 222300;2.江苏省东海县市场监督管理局,江苏 连云港 222300)

中图分类号 R542.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)25-3525-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.25.19

摘 要 目的:研究葛根素配伍丹酚酸B注射使用对大鼠心肌缺血再灌注损伤(MIRI)的保护作用。方法:将62只大鼠随机分为假手术组、模型组、葛根素组(20 mg/kg)和葛根素(20 mg/kg)-丹酚酸B不同配比组(质量比分别为1:0.5、1:1、1:2),每组10只。除假手术组外,其余各组大鼠复制MIRI模型。再灌注180 min后,检测大鼠血清中肌酸激酶(CK)、乳酸脱氢酶(LDH)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)水平及心肌梗死面积百分比。结果:与假手术组比较,模型组大鼠血清中CK、LDH、MDA水平明显升高($P<0.01$),SOD水平明显降低($P<0.01$);心肌梗死面积百分比明显升高($P<0.01$)。与模型组比较,各给药组大鼠血清中CK、LDH、MDA水平明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),SOD水平明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),其中葛根素-丹酚酸B(1:1)组指标变化最为明显;心肌梗死面积百分比明显降低($P<0.01$),其中葛根素-丹酚酸B(1:1)组和(1:2)组小鼠的心肌梗死面积小于葛根素注射剂组($P<0.01$)。结论:葛根素注射剂配伍丹酚酸B后较单用葛根素注射剂能更有效地抑制MIRI后心肌细胞损伤、减小心肌梗死面积,且以质量比为1:1时效果最优。

关键词 葛根素;丹酚酸B;缺血再灌注损伤;心肌梗死;大鼠

Protective Effect of the Injection of Puerarin Combined with Salvianolic Acid B on Rats with Myocardial Ischemia Reperfusion Injury

YANG Hua¹, DONG Bing², SONG Yingying¹(1.Dept. of Pharmacy, Jiangsu Province Donghai County People's Hospital, Jiangsu Lianyungang 222300, China; 2.Jiangsu Province Donghai County Market Supervision and Administration Bureau, Jiangsu Lianyungang 222300, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the protective effect of the injection of puerarin combined with salvianolic acid B (Sal B) on rats with myocardial ischemia reperfusion injury (MIRI). METHODS: 62 rats were randomly divided into sham operation group, model group, puerarin group (20 mg/kg) and puerarin (20 mg/kg)-Sal B group (mass ratio of 1:0.5, 1:1, 1:2, respectively), 10 in each group. Except for sham operation group, rats in other groups were reduced for MIRI model. After 180 min of reperfusion, kinase (CK), lactate dehydrogenase (LDH), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) in serum and percentage of myocardial infarction size of rats were detected. RESULTS: Compared with sham operation group, CK, LDH, MDA levels in serum of rats in model group were obviously increased ($P<0.01$), SOD level was obviously decreased ($P<0.01$); and percentage of myocardial infarction size was obviously increased ($P<0.01$). Compared with model group, CK, LDH, MDA levels in serum of rats in each administration group were decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$), SOD levels were obviously increased ($P<0.05$ or $P<0.01$), and indexes changed the most obviously in puerarin-Sal B group (1:1); percentage of myocardial infarction size was obviously decreased ($P<0.01$), and the percentage of myocardial infarction sizes in puerarin-Sal B group (1:1) and group (1:2) were less than Puerarin injection group ($P<0.01$). CONCLUSIONS: Compared with Puerarin injection alone, puerarin combined with Sal B by injection can more effectively inhibit the cardiomyocyte injury and decrease myocardial infarction size after MIRI, with best efficacy when quality ratio is 1:1.

KEYWORDS Puerarin; Salvianolic acid B; Myocardial ischemia reperfusion injury; Myocardial infarction; Rats

葛根素是从豆科植物野葛或干葛藤的干燥根中提取的一种黄酮苷,具有扩张冠状动脉、保护心肌缺血再灌注损伤(MIRI)、阻断 β -肾上腺素能受体、抗心律失常、抑制血栓形成、改善微循环等作用^[1-2],临床上主要用于冠心病的防治。丹酚酸B是丹参水溶性成分,具有很强

的清除自由基和抗氧化作用^[3-4],对缺血再灌注后的心脏微血管内皮细胞损伤具有保护作用^[5-6]。由丹参、葛根及血竭等中药组成的冠脉宁片常用于治疗冠心病、心绞痛及冠状动脉缺血不足,其中葛根素和丹酚酸B为其主要活性成分^[7-8];用于治疗由气滞血瘀型冠心病引起的胸闷、心绞痛等症的心可舒制剂,其主要成分也是葛根素和丹酚酸B。可见,葛根素与丹酚酸B配伍的疗效是相

*副主任医师。研究方向:临床药学。电话:0518-80305071。E-mail: dhyyyy@sina.com

辅相成的。本研究通过建立大鼠MIRI模型,探讨葛根素配伍丹酚酸B注射使用对MIRI大鼠的保护作用,同时寻找两者最佳配比,为其临床联合用药提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

MP150多导生理记录仪(美国Biopac公司);SC-3人工呼吸器(上海医疗器械股份有限公司医疗设备厂);UV-120-02紫外分光光度计(日本岛津公司);AR-100全自动生化分析仪(美国Dupont公司)。

1.2 药品与试剂

葛根素注射剂(山东方明药业有限公司,批号:160502,规格:0.1 g/mL);丹酚酸B标准品(四川宏益生物工程有限公司,批号:160418,纯度:≥98%);乳酸脱氢酶(LDH)活性检测试剂盒(上海拜力生物科技有限公司,批号:160201);磷酸激酶(CK)活性检测试剂盒(北京雷根生物技术公司,批号:121129);超氧化物歧化酶(SOD)活性检测试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号:160214);丙二醛(MDA)活性检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:151223);其余试剂均为分析纯。

1.3 动物

SD大鼠60只,♂,体质量(200±20)g,购自南京医科大学实验动物中心,动物合格证号:SYXK(苏)2015-0009。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

将60只大鼠随机分为6组,分别为假手术组、模型组、葛根素组(20 mg/kg)^[9-10]和葛根素(20 mg/kg)-丹酚酸B不同配比组(质量比分别为1:0.5、1:1、1:2),每组10只。将各组大鼠适应性饲养3 d后,ip戊巴比妥钠麻醉(45 mg/kg),仰位固定,采用多导生理记录仪以标准Ⅱ导联进行心电图监测。然后切开气管,插入气管插管,连接呼吸机;胸骨左缘第4肋间隙开胸,打开心包膜,暴露心脏;在左心耳下缘3~4 mm处进针,向肺动脉圆锥方向出针,将一小段1.5 mm聚乙烯管置于结扎线下,收紧结扎线以阻断左冠状动脉前降支血流。观察心电图,以出现心电图幅度最大的波群出现高大、增宽为结扎成功标志^[11]。缺血45 min后,取出聚乙烯管(即再灌注),以心电图幅度最大的波群振幅逐渐回落为再灌注成功标志。假手术组大鼠只结扎不进行手术。于再灌注开始时各组大鼠iv给药(给予葛根素立即给予丹酚酸B),假手术组和模型组大鼠给予等体积生理盐水。

2.2 血清心肌损伤标记物水平及心肌梗死面积检测

再灌注180 min后,大鼠腹主动脉取血,严格按照试剂盒说明书操作,测定各组大鼠血清中CK、LDH、SOD、MDA水平。然后立即处死大鼠并取其心脏,以生理盐水冲洗后,在左前降支灌入4%伊文氏蓝2 mL,2 h后去除心房组织,切成约2 mm厚的心肌组织切片,氯化三苯

基四唑氮37℃染色20 min,最后使用10%甲醛固定。光镜下检查,存活心肌区域呈深红色,梗死心肌区域呈白色。采集图像并以Image Pro Plus 6.0图像分析软件分析心肌组织梗死区、危险区(伊文氏蓝未染区)和心肌总面积,心肌梗死面积百分比(%)=左心室组织切片梗死区面积/左心室心肌组织切片总面积×100%。

2.3 统计学方法

采用SPSS 19.0统计软件处理数据。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用独立样本t检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 血清中CK、LDH、SOD、MDA水平测定结果

与假手术组比较,模型组大鼠血清中CK、LDH、MDA水平明显升高($P < 0.01$),SOD水平明显降低($P < 0.01$)。与模型组比较,各给药组大鼠血清中CK、LDH、MDA水平均明显降低,SOD水平均明显升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);其中葛根素-丹酚酸B(1:1)组大鼠血清中各指标水平改善程度最大,葛根素-丹酚酸B(1:0.5)组大鼠血清中上述指标改善程度相对较低,结果见表1。

表1 各组大鼠血清中CK、LDH、SOD、MDA水平测定结果($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 1 Results of CK, LDH, SOD, MDA levels in serum of rats in each group($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	CK, U/mL	LDH, U/mL	SOD, U/mL	MDA, nmol/mL
假手术组	28.75 ± 5.76	248.64 ± 87.98	315.57 ± 104.38	14.76 ± 1.78
模型组	43.28 ± 8.97**	397.59 ± 189.64**	210.36 ± 68.79**	20.25 ± 2.74**
葛根素组	31.28 ± 7.40**	326.78 ± 131.75**	314.97 ± 118.59*	16.79 ± 0.51**
葛根素-丹酚酸B(1:0.5)组	32.58 ± 6.10**	335.43 ± 117.68**	304.76 ± 122.78*	17.63 ± 1.65*
葛根素-丹酚酸B(1:1)组	27.85 ± 5.68**	298.65 ± 97.53**	358.96 ± 126.83**	15.48 ± 1.34**
葛根素-丹酚酸B(1:2)组	30.47 ± 5.49**	317.58 ± 142.58**	312.67 ± 118.75*	16.17 ± 1.27**

注:与假手术组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Note: vs. sham operation group, ** $P < 0.01$; vs. model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3.2 心肌梗死面积百分比测定结果

与假手术组比较,模型组大鼠心肌组织切片总面积明显增大($P < 0.05$),心肌梗死面积百分比明显升高($P < 0.01$)。与模型组比较,各给药组大鼠心肌组织切片总面积差异无统计学意义($P > 0.05$),心肌梗死面积百分比明显降低($P < 0.01$);其中葛根素-丹酚酸B(1:1)组和(1:2)组大鼠心肌梗死面积百分比低于葛根素组($P < 0.01$),且以葛根素-丹酚酸B(1:1)组大鼠心肌梗死面积百分比最低,结果见表2。

4 讨论

目前,缺血性心脏病是危害人类生命最严重的一类常见病、多发病,其主要病因是冠状动脉痉挛或阻塞引起心肌缺血、缺氧。再灌注治疗是有效恢复心肌供血、拯救缺血心脏的常用方法,但再灌注带来的自由基暴发

表2 各组大鼠心肌梗死面积百分比测定结果($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Tab 1 Results of percentage of myocardial infarction size of rats in each group($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	心肌组织切片总面积, cm ²	心肌组织切片梗死区面积, cm ²	心肌梗死面积百分比, %
假手术组	5.06 ± 0.27	0	0
模型组	5.44 ± 0.42 [*]	1.21 ± 0.16	24.15 ± 2.56 ^{*#}
葛根素组	5.48 ± 0.34	1.34 ± 0.09	20.67 ± 1.77 ^{##}
葛根素-丹酚酸B(1:0.5)组	5.36 ± 0.29	1.12 ± 0.12	21.42 ± 2.43 ^{##}
葛根素-丹酚酸B(1:1)组	5.21 ± 0.31	0.75 ± 0.13	15.44 ± 1.79 ^{###}
葛根素-丹酚酸B(1:2)组	5.45 ± 0.36	0.94 ± 0.21	17.16 ± 1.93 ^{###}

注:与假手术组比较, ^{*} $P<0.01$;与模型组比较, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$;与葛根素组比较, ^Δ $P<0.01$

Note: vs. sham operation group, ^{*} $P<0.01$; vs. model group, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$; vs. puerarin group, ^Δ $P<0.01$

和心肌钙离子超载会导致心肌细胞损伤进一步加重^[12]。研究表明,SD大鼠于左前降支结扎45 min后再灌注3 h,可有效建立在体急性MIRI模型^[13]。本研究发现,与假手术组比较,模型组大鼠血清中LDH、CK、MDA水平明显升高,SOD水平明显降低,左心室组织切片总面积明显增加,提示急性MIRI模型成功建立,左心室发生重构。

中医学以活血、化瘀、止痛作为缺血性心脏病基本治则^[14]。葛根素是从中药葛根中提取的效应成分,可扩张心血管、改善微循环,临床多用于急性脑梗死、冠心病等治疗^[15]。丹酚酸B可通过提高SOD的活力、提高抗氧化自由基能力、抑制缺氧缺血所致炎症反应等途径发挥抗心肌缺血的作用。葛根素配伍丹酚酸B后,既可发挥葛根素扩张冠状血管、改善冠脉微循环、抗氧化的作用,又能发挥丹酚酸B提高SOD的活力、对抗氧自由基、减少缺氧缺血所致炎症反应的作用,两者在药效方面可优势互补^[16]。本研究结果发现,葛根素配伍丹酚酸B注射使用可降低MIRI大鼠血清中心肌损伤标记物CK、LDH及MDA水平,升高血清中SOD水平,显著改善MIRI大鼠心脏内皮功能。当葛根素与丹酚酸B质量比为1:1时,两者产生的药效最强,对心肌损伤的保护作用最为显著。与模型组比较,各给药组大鼠心肌梗死面积百分比均降低;葛根素组大鼠心肌梗死面积大于葛根素-与丹酚酸B(1:1)组和(1:2)组;在3个配伍组中,以葛根素-丹酚酸B(1:1)组大鼠心肌梗死面积最小,葛根素-丹酚酸B(1:0.5)组大鼠心肌梗死面积最大。这提示葛根素与丹酚酸B以质量比为1:1配伍时对心室重构的抑制作用和受损心肌的保护作用效果最优。

综上所述,葛根素配伍丹酚酸B注射使用可有效抑制MIRI后心肌细胞损伤、降低心肌梗死面积百分比,且以葛根素与丹酚酸B质量比为1:1时效果最优。

参考文献

[1] 崔岚,祝德秋,陶达人.葛根素药理作用研究进展[J].中国

药师,2004,7(12):924-927.

[2] 崔书霞,田炜,郝志梅.根素对心脏疾病的保护作用[J].广东医学,2013,34(7):1139-1140.

[3] Tian LL, Wang XJ, Sun YN, *et al.* Salvianolic acid B, an antioxidant from salvia miltiorrhiza, prevents 6-hydroxy-dopamine induced apoptosis in SH-SY5Y cells[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, 40(3): 409-422.

[4] 田影,何克江,朱靖博.丹酚酸B的体外抗氧化活性[J].大连工业大学学报,2008,27(4):304-308.

[5] Zhang Y, Li X, Wang ZZ. Antioxidant activities of leaf extract of Salvia miltiorrhiza Bunge and related phenolic constituents[J]. *Food Chem Toxicol*, 2010, 48 (10) : 2656-2662.

[6] 胡旭光,相湘,杨超燕,等.丹酚酸B对实验性大鼠急性心肌缺血的保护作用[J].广东医学,2010,31(3):334-336.

[7] 程夏倩,张文婷,程维明,等. RP-HPLC法同时测定冠脉宁片中葛根素和丹酚酸B[J].中成药,2012,32(12): 2355-2358.

[8] 饶毅,魏慧珍,崔金国,等. HPLC法同时测定心可舒制剂中葛根素和丹酚酸B的含量[J].药物分析杂志,2007,27(9):1431-1433.

[9] 龚红岩,秦元旭,王更富,等.葛根素对大鼠体外循环后心肌缺血再灌注损伤的保护作用及抗氧化应激机制的探讨[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(1):165-167.

[10] 贾长海,秦亚玲,任斌蓉.葛根素对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及抗氧化应激机制的探讨[J].辽宁中医药大学学报,2010,12(11):230-231.

[11] 陈业农,周逸平,汪克明,等.急性心肌缺血再灌注损伤大鼠模型制备方法的改进与评价[J].中国中医急症,2008,17(3):359-360,363.

[12] Frank A, Bonney M, Bonney S, *et al.* Myocardial ischemia reperfusion injury: from basic science to clinical bedside[J]. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth*, 2012, 16 (3) : 123-132.

[13] 邓宇珩,符永恒,谭宁,等.大鼠活体心肌缺血再灌注损伤模型的建立与综合评估[J].中国病理生理杂志,2011,27(2):412-416.

[14] Yuan Y, Jing Z, Zhou H, *et al.* Puerarin attenuates pressure overload-induced cardiac hypertrophy[J]. *J Cardiol*, 2014,63(1):73-81.

[15] Francis FYL, John HKY, Kwan YW, *et al.* Salvianolic acid B, an aqueous component of danshen (Salvia miltiorrhiza), relaxes rat coronary artery by inhibition of calcium channels[J]. *Eur J Pharmacol*, 2006, 553(1):240-245.

[16] 杨倩,王四旺.丹酚酸B配伍丹皮酚对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护[J].华西医学,2010,25(2):303-305.

(收稿日期:2017-01-04 修回日期:2017-06-01)

(编辑:林 静)