

复方丹参滴丸基础研究新进展

郭治昕¹,赵利斌¹,王 蕾²,蒋建兰²,元英进²

(1. 天津天士力集团研究院,天津 300402; 2. 天津大学化工学院 制药工程系,天津 300072)

复方丹参滴丸上市 8年,已成为治疗心脑血管疾病的重要药物,许多科研工作者对其作用机制进行了深入研究,其中,在复方丹参滴丸对脂质代谢及流变学的影响、清除自由基抗氧化作用、对心肌细胞的保护等作用机制方面,科研人员在细胞及分子水平进行了阐述。最近,复方丹参滴丸的基础研究已获得了新的进展。

1 复方丹参滴丸改善微循环障碍的机制

缺血再灌注(I/R)产生的过氧化物可损伤微血管内皮和微血管基膜,促使白蛋白外漏,而肥大细胞脱颗粒释放的血管活性物质,更是加剧了白蛋白的外漏。白蛋白外漏和肥大细胞脱颗粒是微循环障碍的重要标志之一,因此,能否抑制白蛋白外漏和肥大细胞脱颗粒也成为判定改善微循环障碍的指标之一。韩晶岩等进行了复方丹参滴丸对内毒素(LPS)和 I/R所引起的微循环障碍改善作用的机制研究,采用连续性、可视性、多指标的微循环观察系统,应用高速、高感度显微彩色黑白摄影、荧光显微摄影系统等手段,通过与丹参静脉给药组的比较,证实复方丹参滴丸对 I/R引起的大鼠肠系膜微循环障碍有明显的改善作用。从大鼠颈动脉注入 FITC标记的白蛋白,用荧光显微镜连续地观察和记录微血管外白蛋白的外漏情况,以定量地观察复方丹参滴丸对血管通透性的影响。将 1%的 toluidine blue染色剂滴加肠系膜表面,在显微镜下活体观察肥大细胞脱颗粒状态,结果表明复方丹参滴丸的作用表现在:(1)可以抑制丹参不能发挥作用的缺血早期白蛋白外漏;(2)有效抑制肥大细胞脱颗粒,而且作用与丹参静脉给药相同;(3)抑制血管内皮细胞和白细胞过氧化物的产生;(4)抑制白细胞与血管内皮细胞的粘附作用;(5)复方丹参滴丸口服对 I/R后的细胞粘附因子、过氧化物以及白细胞与内皮细胞的相互作用也有影响。

在对抗 I/R引起的微循环障碍作用上,复方丹参滴丸的作用更明显,甚至优于丹参静脉给药,很有可能成为预防和治理心血管疾病等微循环障碍性疾病的理想药物。目前,在复方丹参滴丸口服后对 I/R后的细胞粘附因子、过氧化物以及白细胞与内皮细胞间的相互作用的影响,以及复方丹参滴丸抑制白蛋白外漏的作用机制方面的研究还在进行中。

2 复方丹参滴丸 I/R损伤的保护作用

针对 I/R时自由基生成、细胞内钙超载、高能磷酸化合物缺乏和能量代谢障碍的理论,王孝铭^[1,2]专门研究了复方丹参滴丸对 I/R心肌高能磷酸化合物及心肌细胞内钙离子的影响。

2.1 对高能磷酸化化合物的影响:用 Langendorff离体心脏灌流技术,制备心肌 I/R的操作模型,利用高效液相色谱测定离体大鼠心肌组织中高能磷酸化合物(包括 AMP、ADP、ATP、TAN)含量的变化。实验证明:(1)I/R损伤,心肌能量代谢发生严重障碍;(2)缺血前的灌流液中复方丹参滴丸的加入,使心肌组织中高能磷酸化合物及总腺苷酸水平明显提高,且高于未加保护的单纯缺血再灌注;(3)复方丹参滴丸在提高缺血心肌能量储备方面优于消心痛。复方丹参滴丸对缺血心肌再灌注损伤确实有明显的保护作用。

2.2 对钙离子平均荧光强度的影响:用新生 Wistar乳鼠心肌细胞离体培养 36 h,给予缺氧再给氧刺激,采用分子探针新型荧光指标 Fluo-3/AM(戊二酰甲甲基酯),用共聚焦显微镜检测细胞内钙离子分布情况。实验结果表明,心肌细胞缺氧前加入复方丹参滴丸可以使心肌细胞内钙离子荧光强度明显下降,证明复方丹参滴丸可以抵抗心肌细胞“钙超载”,从而保护心肌细胞。

2.3 对外源性自由基导致心律失常的影响:由于自由基可以导致心律失常,王孝铭等^[1]用 Langendorff离体心肌,灌注外源性自由基(硫酸亚铁 0.25 mmol/L和抗坏血酸 1.0 mmol/L)比较观察复方丹参滴丸及异搏定对自由基所致心律失常影响。实验结果表明,复方丹参滴丸能使动作电位延长,钙离子内流增加,拮抗氧自由基,而降低自由基引发的心律失常发生率。

2.4 对 Fas/Fas1蛋白表达的影响:针对 I/R导致心肌细胞凋亡、坏死作用,王孝铭等进行了复方丹参滴丸对乳鼠心肌细胞培养缺氧及缺氧/复氧后 Fas/Fas1蛋白表达影响的研究。采用免疫组化方法和图像分析方法,经显微镜放大 100倍后,每组选择 5个视野,每个视野统计 Fas/Fas1蛋白表达阳性细胞数,平均计算阳性细胞所占百分比作为 Fas/Fas1蛋白阳性表达指数(PEE)。由结果可以看出,缺氧及缺氧/复氧后,心肌细胞均有凋亡,相关基因 Fas/Fas1表达增强,复方丹参滴丸可通过下调 Fas/Fas1蛋白表达以减少心肌细胞凋亡,从而减弱缺氧及缺氧/复氧损伤。

2.5 血小板细胞膜流动性的影响:李全凤等采用荧光偏振法观察对照组和实验组(给予复方丹参滴丸)家兔血小板膜参数的变化,测定血小板细胞膜荧光偏振度 P 、微粘度 Z 、膜流动性 LFU。结果证明,复方丹参滴丸可明显增加家兔血小板细胞膜流动性(LFU),并使微粘度明显下降。

3 复方丹参滴丸对胰岛素抵抗血管保护作用的研究

张雷等通过建立胰岛素抵抗狗动脉损伤模型,进行了复方丹参滴丸在胰岛素抵抗条件下对胰岛素抵抗保护作用的动物实验,并通过形态学、组织化学、分子生物学研究,初步研究复方丹参滴丸对血管保护作用的机制。研究发现: (1)复方丹参滴丸在胰岛素抵抗条件下具有血管保护作用; (2)可能是通过抑制血管中膜平滑肌细胞过度增殖、过度凋亡的作用机制来达到血管保护的目的。对复方丹参滴丸血管保护作用,如在胰岛素抵抗条件下对血管平滑肌细胞凋亡的影响等方面的深入研究,仍在进行之中。

4 复方丹参滴丸模拟和加强缺血预适应的机制

张伯礼等^[3]针对心绞痛患者存在的心肌缺血预适应(IPC),进行了复方丹参滴丸模拟和加强心肌缺血和预适应保护作用的研究。该试验通过建立经典大鼠冠脉结扎、缺血 5 min,反复循环 3 次的缺血性预适应模型,以及缺血 30 min,再灌 2 h 的单纯缺血再灌注模型,以坏死区占缺血区的百分比、恶性心律失常的发生率、心肌酶、自由基为评价指标,观察复方丹参滴丸模拟或加强缺血预适应的效应。结果显示: (1)复方丹参滴丸可模拟和加强心肌预缺血的效应,但对早期心肌缺血适应的效果不及缺血预处理组,而晚期心肌缺血预适应效果不及复方丹参滴丸预处理组; (2)复方丹参滴丸治疗心肌缺血的机制主要是通过促进内源性保持物质的释放,达到抗心肌缺血的作用。它可模拟和协同 IPC 使心

肌梗死这一指标得到改善,且心肌酶释放减少; (3)复方丹参滴丸可以激活蛋白激酶 C(PKC)蛋白,使其发生转位,促进其蛋白、mRNA 表达水平增高。这可能是复方丹参滴丸模拟和加强 IPC 的主要机制之一; (4)复方丹参滴丸可以增加 SOD 的活力,降低 MDA 的含量,这也是复方丹参滴丸抗缺血再灌注损伤的作用机制之一。PKC 激活后发生磷酸化并参与心肌细胞保护作用的蛋白质的种类,以及复方丹参滴丸激活了 PKC 的亚型,仍在研究之中。

5 结语

综上所述,随着国内外研究人员对复方丹参滴丸基础研究的逐步深入,复方丹参滴丸的作用机制将得到进一步揭示。

References

[1] Wang X M. Effect of Composite Dripping Pill on the arrhythmias induced by exogenous free radical [J]. *J Haerbin Med Univ* (哈尔滨医科大学学报), 2001, 35(5): 335-336.
[2] Yang Z W, Wang X M. Effect of Fufang danshen Diwan on cerebellum of D-galactose induced aged rat [J]. *J Haerbin Med Univ* (哈尔滨医科大学学报), 2002, 36(2): 115-117.
[3] Wang Y, Kang L Y. Comparative research on pharmacodynamics of Fufang Danshen Dripping Pill and Guanxin Danshen Dripping Pill in experimental myocardiac ischemia [J]. *Tianjin Chin Med* (天津中医), 2002, 19(2): 48-50.

(上接第 273 页)
水;流速: 1 mL/min;检测波长: 210 nm;柱温: 35℃。
3.4 线性考察: 取适量对照品,用甲醇配制成浓度为 0.3 mg/mL 的标准溶液,按上述色谱条件,在进样量为 0.3~ 2.5 μg 时,峰面积和进样量呈线性关系,回归方程: $Y=16\,740X-2\,103$, $r=0.999\,8$
3.5 精密度试验: 精密吸取上述对照品溶液,重复

进样 5 次,梓醇峰面积积分值 $RSD=1.37\%$ 。
3.6 回收率试验: 在已知含量的样品中加入梓醇对照品,按供试品溶液制备方法处理,平行实验 4 次,结果平均回收率 98%。
3.7 样品测定: 分别精密吸取对照品溶液 5 μL,供试品溶液各 10 μL,按上述色谱条件测定。按外标法计算含量。结果见表 1

表 1 不同贮藏时间、条件下梓醇的含量

Table 1 Contents of catalpol in different store time and condition

贮藏条件	贮藏时间 (月)					
	0		3		6	
	外观	含量 %	外观	含量 %	外观	含量 %
砂埋鲜地黄	光滑,黄色	2.63	皱缩,黄色	2.47	皱缩,黄色	2.35
冷藏鲜地黄	光滑,黄色	2.69	部分腐烂,黄色	2.56	大部分腐烂,黄色	2.11
冷冻鲜地黄	光滑,黄色	2.54	光滑,黄白色	1.39	光滑,黄白色	0.85

4 小结

从本实验结果来看,鲜地黄经砂埋后梓醇含量没有明显下降,只是外观有些皱缩,经冷藏贮藏后含量虽未下降,但大部分已经腐烂,而冷冻后梓醇含量明显下降,所以认为砂埋是贮藏鲜地黄较好的方法

References

[1] Liu M, Li G S. Technological process for catalpol of

Rehmannia glutinosa Libosch [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2000, 11 (4): 301-302
[2] Wang H J, Bian B L, Yang J. Studies on the change condition of catalpol of *Rehmannia glutinosa* Libosch [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1997, 22 (7): 408-409.
[3] Bian B L, Yang J, Wang H J. Effects of different dry condition on the quantity of catalpol of *Rehmannia glutinosa* Libosch [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1996, 21 (6): 346-347.