

丹参饮对冠脉结扎大鼠心肌缺血的保护研究

袁 渊¹, 蒲清荣^{1*}, 黄 锐¹, 吴建明²

1. 西南医科大学附属中医医院, 四川 泸州 646000

2. 西南医科大学, 四川 泸州 646000

摘要: **目的** 评价丹参饮对冠脉结扎大鼠心肌缺血的保护作用, 并探讨其作用机制。**方法** 雄性 Wistar 大鼠按体质量随机分为对照组、模型组、硝苯地平组、复方丹参片组和丹参饮低、中、高剂量组, 每组各 10 只。硝苯地平剂量为 0.167 mg/kg、复方丹参片剂量为 10 g/kg, 按 10 mL/kg ig 给药; 丹参饮按 0.5、1.0、2.0 mL/kg (相当于原药材 0.27、0.54、1.08 g/kg) ig 给药。各组动物均连续给药 7 d。于第 7 天给药 30 min 后通过结扎冠脉建立大鼠心肌缺血模型。分别记录正常和结扎后心电图 S-T 段变化, 测定血清乳酸脱氢酶 (LDH)、肌酸激酶 (CK) 活性, 计算心脏指数、左心室指数、左心室/心脏质量比和心肌梗死率。**结果** 与模型组各时间点比较, 丹参饮组在结扎后 15~180 min 心电图 S-T 段均明显降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 各组 LDH、CK 活性均明显降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 各组大鼠心脏指数、左心室指数、左心室/心脏质量比均明显降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 各组心肌梗死质量和梗死率均明显降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 丹参饮对冠脉结扎大鼠心肌缺血具有保护作用, 可能是增强冠脉供血和心肌代谢, 改善心功能, 有效抑制大鼠心肌缺血梗死。

关键词: 丹参饮; 大鼠心肌缺血; 心电图 S-T 段; 乳酸脱氢酶; 肌酸激酶; 心脏指数; 心肌梗死率

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2017)12-2299-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2017.12.003

Protection of Danshen Drink on myocardial ischemia in rats with coronary artery ligation

YUAN Yuan¹, PU Qing-rong¹, HUANG Rui¹, WU Jian-ming²

1. The Affiliated Hospital of TCM of Southwest Medical University, Luzhou, 646000, China;

2. Southwest Medical University, Luzhou, 646000, China

Abstract: Objective To evaluate the protective effect of Danshen Drink on myocardial ischemia in rats with coronary artery ligation, and study its mechanisms. **Methods** Sixty male Wistar rats were randomly divided into control group, model group, nifedipine group, Compound Danshen Tablets group, and Danshen Drink low, medium, and high dose group according to body weight, and each group had 10 rats. The dose of nifedipine was 0.167 mg/kg, the dose of Compound Danshen Tablets was 10 g/kg, and rats in these group were ig administer 10 mL/kg. Rats in Danshen Drink groups were ig administer Danshen Drink 0.5, 1.0, and 2.0 mL/kg (Equivalent to 0.27, 0.54, and 1.08 g/kg of raw materials). All the animals were treated for 7 d. Myocardial ischemia model of rats was established by ligating coronary artery after 7th day of administration of 30 min. The ST segment changes of ECG after normal and ligation were recorded, the activity of serum lactate dehydrogenase (LDH) and creatine kinase (CK) were determined, and cardiac index, left ventricular index, left ventricular / heart mass ratio and myocardial infarction were calculated. **Results** Compared with the time points of the model group, the ST segments of the 15 — 180 min electrocardiogram in the Danshen Drink group were significantly decreased after the ligation, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the model group, LDH and CK activity in each group was significantly decreased, and there was difference between two groups ($P < 0.05$); the rats cardiac index, left ventricular index, left ventricular / heart mass ratio were significantly decreased, and there was difference between two groups ($P < 0.05$); myocardial infarction quality and infarct rate were significantly decreased, and there was difference between

收稿日期: 2017-08-16

基金项目: 四川省科技厅-泸州市人民政府-泸州医学院联合科研专项资金计划项目 (14ZC0040)

作者简介: 袁 渊, 男, 主管药师, 硕士, 从事药物临床试验质量管理、中药药理学方面研究。Tel: 18228967262 E-mail: yypower@qq.com

*通信作者 蒲清荣, 男, 主任中药师, 从事院内制剂研发和生产管理。Tel: (0830)3162253 E-mail: 365369747@qq.com

two groups ($P < 0.05$). **Conclusion** Danshen Drink has protective effect on myocardial ischemia in rats with coronary artery ligation, which may enhance coronary blood supply and myocardial metabolism, improve cardiac function, and effectively inhibit myocardial ischemia in rats.

Key words: Danshen Drink; myocardial ischemia in rat; ST segment; LDH; CK; cardiac index; myocardial infarction rate

冠心病是造成我国老年人群死亡的三大疾病之一,也是目前国内外医药研究的重要方向。冠心病是脂代谢紊乱导致动脉粥样硬化病变,血管内壁血脂沉着引起心脏缺血,进而出现心绞痛的过程^[1-2],因此心肌缺血是冠心病的重要致死因素。丹参饮源自《时方歌括》,组方为丹参、檀香和砂仁,该方兼具活血止痛、化痰行气之功效,用于治疗血瘀气滞所致心痛、胃脘诸痛。本实验尝试从中医血瘀证的诱因以及活血化瘀药的主要药理作用出发,以临床典型检测指标为依据,通过经典成熟的冠心病动物模型,分析评价丹参饮对心肌缺血的保护作用,并探讨其可能的作用机制。

1 实验材料

1.1 实验药物

丹参饮:西南医科大学附属中医医院提供,组方为丹参、檀香、砂仁 3 味中药,其中丹参加 95% 乙醇浸泡 12 h,收集渗漉液,回收乙醇,流浸膏备用。檀香、砂仁加水浸泡 0.5 h,蒸馏,收集蒸馏液,备用。上述丹参、檀香和砂仁的药渣加水提取,合并煎液,滤过,取上清液,加入丹参流浸膏和蒸馏液,减压浓缩至流浸膏,4 °C 冰箱冷藏存放。其含 0.533 g 原药材/mL,批号 20150624。

硝苯地平缓释片:地奥集团成都药业股份有限公司,规格 10 mg,批号 150117;复方丹参片:云南白药集团股份有限公司,规格 0.32 g,批号 ZLB1403。

1.2 实验试剂

乌拉坦:分析纯,成都市科龙化工,批号 20130323;红四氮唑(TTC):分析纯,Amresco 公司,批号 0765;肝素钠:国药集团化学试剂有限公司,批号 F20040924;氯化钠注射液:四川科伦药业股份有限公司,批号 M15031717;多聚甲醛:分析纯,天津市博迪化工股份有限公司,批号 20060309;LDH、CK 测定试剂盒,比色法,南京建成生物工程研究所,批号分别为 20150618、20150701。

1.3 实验动物

大鼠:Wistar, SPF 级,全雌,体质量 220~250 g,

由四川省人民医院实验动物研究所提供,动物使用合格证号 SYXK(川)2013-058,试验在西南民族大学现代生物技术国家民委重点实验室进行。

1.4 实验仪器

BL-420F 生物机能学实验系统/HX-101E 小动物呼吸机,成都泰盟科技有限公司;UV-Vis/V-1600PC 可见光/紫外光光分度仪,上海美谱达仪器有限公司;控温水浴锅,上海波络实验仪器有限公司;TGL-16G 离心机,无锡瑞江离心机厂;000 号缝线,上海医用缝合针厂。

2 实验方法

2.1 分组与给药

雄性 Wistar 大鼠,按体质量随机分为对照组、模型组、硝苯地平组、复方丹参片组和丹参饮低、中、高剂量组,每组各 10 只。按人体与大鼠每千克体质量剂量折算系数换算,硝苯地平剂量为 0.167 mg/kg、复方丹参片剂量为 10 g/kg。临用前将硝苯地平缓释片、复方丹参片碾成粉末,加蒸馏水分别配制成 16.7 μg/mL 和 1 g/mL 的混悬液,按 10 mL/kg ig 给药;丹参饮按 0.5、1.0、2.0 mL/kg (相当于原药材 0.27、0.54、1.08 g/kg) ig 给药。各组动物均连续给药 7 d。

2.2 造模^[3-5]

于第 7 天给药 30 min 后,以 25%乌拉坦 ip 麻醉大鼠,并将电极插入大鼠四肢皮下记录 II 导联心电图。剪开大鼠胸腔,气管插管,接呼吸机(设置呼吸比 1:2,频率 70,潮气量 2.5 mL)稳定 5 min 后记录一段正常心电图,于第 4、5 肋间分离肋间肌,充分暴露心脏,剪开心包,于冠脉前降支下段穿入外科缝线。除对照组外,其余各组于左冠脉前降支根部 2~3 mm 结扎,观察心电图 S-T 段,以弓背抬高视为冠脉结扎模型建立成功。迅速还纳心脏,逐层缝合关胸,并抽空胸腔积气,撤出气管导管,关闭呼吸机,清理气管。

2.3 心电图变化

分别记录正常和结扎后 5、15、30、60、90、150、180 min 时心电图 S-T 段变化。以 T-P 段基线为参照,记录 S-T 段上移高度和 S-T 段偏移幅度。

2.4 心肌酶学指标

造模后3h大鼠股动脉取血,3000 r/min离心,取血清,按试剂盒方法分别测定血清乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)活性。

2.5 心脏系数

测定心脏质量、左心室质量,计算心脏指数、左心室指数、左心室/心脏质量比。

2.6 心肌梗死面积分析

采血后取心脏,生理盐水冲洗,滤纸吸水,称定质量,称量左心室质量。沿长轴从心尖到心底横向切片,将切片后的心肌组织放入0.1% TTC溶液中,37℃下持续10min避光孵育,生理盐水冲洗,甲醛溶液固定。正常区域呈红色,梗死区域呈苍白色。取梗死部分称定质量,计算心肌梗死率。

心肌梗死率=梗死质量/心脏质量

2.7 统计学处理

所有数据使用 Excel 建立数据库,采用 SPSS

18.0 数据分析软件分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间数据采用单因素方差分析(方差齐: LSD 检验,方差不齐: Tamhane's T2 非参数检验)。自身前后对比试验各数据比较均以测定值的变化百分率表示,再利用单因素方差分析法对差值的变化百分率进行组间比较。

3 实验结果

3.1 丹参饮对大鼠心电图 S-T 段的影响

与对照组比较,模型组心电图 S-T 段明显上升 ($P < 0.05$)。与模型组各时间点比较,丹参饮组在结扎后 15~180 min 心电图 S-T 段均明显降低,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 1。

3.2 丹参饮对大鼠心肌酶学指标的影响

与对照组比较,模型组大鼠 CK、LDH 活性明显增强 ($P < 0.05$)。与模型组比较,各组 LDH、CK 活性均明显降低,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 2。

表 1 丹参饮对大鼠心电图 S-T 段的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effects of Danshen Drink on ECG S-T section in rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	S-T/mV							
		结扎前	5 min	15 min	30 min	60 min	90 min	150 min	180 min
对照	—	0.02±0.03	0.01±0.03	0.02±0.03	0.03±0.04	0.02±0.03	0.03±0.04	0.03±0.04	0.03±0.04
模型	—	0.00±0.00	0.41±0.11 [△]	0.50±0.07 [△]	0.54±0.06 [△]	0.54±0.05 [△]	0.54±0.03 [△]	0.53±0.05 [△]	0.51±0.07 [△]
硝苯地平	1.67×10 ⁻⁵	0.01±0.02	0.23±0.09	0.24±0.10*	0.27±0.11*	0.27±0.10*	0.27±0.10*	0.25±0.09*	0.26±0.09*
复方丹参片	10	0.00±0.00	0.24±0.14	0.29±0.09*	0.28±0.10*	0.30±0.11*	0.29±0.11*	0.30±0.11*	0.28±0.08*
丹参饮	0.27	0.00±0.00	0.25±0.10	0.29±0.10*	0.27±0.11*	0.28±0.11*	0.35±0.11*	0.35±0.11*	0.35±0.12*
	0.54	0.01±0.02	0.25±0.08	0.28±0.10*	0.31±0.12*	0.27±0.09*	0.28±0.04*	0.27±0.05*	0.24±0.05*
	1.08	0.00±0.00	0.24±0.11	0.29±0.12*	0.30±0.16*	0.31±0.14*	0.30±0.13*	0.27±0.11*	0.27±0.10*

与对照组比较: [△] $P < 0.05$; 与模型组比较: * $P < 0.05$

[△] $P < 0.05$ vs control group; * $P < 0.05$ vs model group

表 2 丹参饮对大鼠 LDH 和 CK 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effects of Danshen Drink on LDH and CK in rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	LDH/(U·L ⁻¹)	CK/(U·mL ⁻¹)
对照	—	2 515.5±473.0	0.9±0.2
模型	—	5 115.7±258.7 [△]	3.4±0.2 [△]
硝苯地平	1.67×10 ⁻⁵	4 185.2±434.4*	2.2±0.1*
复方丹参片	10	4 098.8±587.1*	1.5±0.3*
丹参饮	0.27	3 726.9±326.7*	1.2±0.2*
	0.54	4 117.3±330.2*	1.4±0.3*
	1.08	4 265.4±443.8*	1.5±0.2*

与对照组比较: [△] $P < 0.05$; 与模型组比较: * $P < 0.05$

[△] $P < 0.05$ vs control group; * $P < 0.05$ vs model group

3.3 丹参饮对大鼠心脏系数的影响

与对照组比较, 模型组大鼠心脏指数、左心室指数、左心室/心脏质量比均明显升高, 差异具有统

计学意义 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 各组大鼠心脏指数、左心室指数、左心室/心脏质量比均明显降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 3。

表 3 丹参饮对大鼠心脏系数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 3 Effects of Danshen Drink on heart coefficient in rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	体质量/g	心脏质量/g	左心室质量/g	心脏指数	左心室指数	左心室/心脏质量比
对照		269.4±29.6	0.660±0.066	0.504±0.046	2.453±0.076	1.874±0.071	0.764±0.014
模型		278.0±24.9	0.742±0.062	0.605±0.045	2.675±0.143 [△]	2.182±0.116 [△]	0.816±0.012 [△]
硝苯地平	1.67×10 ⁻⁵	297.5±39.1	0.734±0.101	0.564±0.077	2.470±0.151*	1.896±0.081*	0.769±0.024*
复方丹参片	10	308.3±42.5	0.746±0.106	0.581±0.080	2.425±0.189*	1.892±0.146*	0.780±0.026*
丹参饮	0.27	297.5±23.8	0.723±0.080	0.571±0.059	2.429±0.118*	1.917±0.073*	0.790±0.015*
	0.54	317.8±32.3	0.759±0.076	0.589±0.055	2.394±0.143*	1.859±0.115*	0.777±0.013*
	1.08	298.3±22.0	0.722±0.052	0.565±0.037	2.404±0.166*	1.882±0.114*	0.784±0.011*

与对照组比较: [△] $P < 0.05$; 与模型组比较: * $P < 0.05$

[△] $P < 0.05$ vs control group; * $P < 0.05$ vs model group

3.4 丹参饮对大鼠冠脉结扎后心肌梗死的影响

与对照组比较, 模型组心肌梗死质量和梗死率明显升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 各组心肌梗死质量和梗死率均明显降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 4。

表 4 丹参饮对大鼠心肌梗死率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 4 Effects of Danshen Drink on myocardial infarction rate in rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	梗死质量/g	心肌梗死率/%
对照	—	0.000±0.000	0.000±0.000
模型	—	0.159±0.015 [△]	21.491±1.122 [△]
硝苯地平	1.67×10 ⁻⁵	0.091±0.014*	12.448±1.529*
复方丹参片	10	0.099±0.017*	13.270±1.453*
丹参饮	0.27	0.115±0.013*	15.871±0.896*
	0.54	0.095±0.013*	12.528±1.785*
	1.08	0.094±0.014*	13.056±1.690*

与对照组比较: [△] $P < 0.05$; 与模型组比较: * $P < 0.05$

[△] $P < 0.05$ vs control group; * $P < 0.05$ vs model group

4 讨论

现代药理学和临床研究发现^[6-8], 丹参对调节人体心血管的血脂代谢、血循环、保护缺血再灌注损伤等方面具有积极的作用, 适用于冠心病、心肌炎和脑血栓等疾病。丹参饮源自我国古典医籍名方, 目前临床上丹参饮已经广泛应用于冠心病、心肌炎和脑血栓等疾病^[9]。血瘀证与血液黏稠、血小板黏附聚集、血循环障碍等组织病理学的改变有关, 中成药的活血化瘀作用主要体现在改善微循环、优

化血液流变学指标、溶栓等方面^[3, 10]。丹参饮具有活血止痛、化瘀行气的功效, 是典型的活血药, 故本实验从上述血瘀证的诱因以及活血化瘀药的主要药理作用上出发, 分别以心肌酶学、心肌梗死面积、心电图 S-T 段变化、心脏系数为指标, 评价该药对心肌缺血的保护作用。

心肌酶学指标中, CK、LDH 是心肌梗死、心肌缺血的特异性诊断指标, 心肌细胞受损后于缺血早期将上述酶释放; 缺血性心肌损伤会直接导致 S-T 段波形的变化, 所以在评价抗心肌缺血药物的疗效作用时, 可将 S-T 段上移程度、偏移幅度作为指标; TTC 是光敏脂溶性结合剂, 作为电子传递链中吡啶核苷酶系统的质子受体, 正常机体组织的脱氢酶可将其还原成红色 TTF, 而缺血组织酶活性降低, 氧化还原反应不能完成, 所以检测心肌梗死面积时, 正常组织为红色, 缺血组织为苍白色, 该指标常用于直观的判断组织的缺血梗死程度^[11-12]。

将模型组的心电图 S-T 段改变、CK 和 LDH 活性、心肌梗死质量、梗死率、心脏系数等指标与对照组进行比较, 发现差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$), 说明本实验成功建立大鼠冠脉结扎模型, 大鼠冠脉结扎后, 由于长时间的心脏供血不足, 心肌代谢障碍, 导致心肌细胞代偿性增加或表现出一定的炎性水肿。各用药组在冠脉结扎后 15~180 min 这一时间段内各个时间点与模型组比较, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$), 结果说明丹参饮、复方丹参片、硝苯地平平均具有降低大鼠心电图 S-T 段抬

高的作用,提示丹参饮同样具有改善心功能的作用。丹参饮组的心肌酶指标活性与模型组比较,差异具有显著性 ($P<0.05$),提示丹参饮能减弱损伤大鼠血清 CK 和 LDH 活性,显示出较好的改善心脏代谢作用。丹参饮组的心肌梗死质量、梗死率、心脏系数与模型组比较差异具有显著性意义 ($P<0.05$),提示丹参饮具有出较好的增加冠脉供血,改善心脏功能,抗心肌梗死的作用。

实验采用手术结扎冠脉建立心肌缺血大鼠模型,该法的优点是可直观地反映心肌缺血的程度和范围,过程具有可重复性,便于在组间比较和给药前后比较,缺点是该模型为急性心肌缺血模型,不能模仿慢性低血流灌注的病理过程,无法用于慢性实验的观察。丹参饮为中药复方制剂,该方对心脑血管疾病的疗效是比较客观的,其未来的市场开发前景广阔,但丹参饮本身活性成分非常复杂,对于其有效单体成分的研究还需要进一步深入探索。

综上所述,丹参饮对冠脉结扎大鼠心肌缺血具有保护作用,推测其主要作用机制可能是促进冠脉侧支循环开放,改善冠脉供血,减小心肌梗死范围,抗缺血坏死;改善心功能,抑制心肌缺血导致的 S-T 段上升;改善心肌代谢,降低心肌酶学指标和心脏系数,减缓心肌细胞受损。

参考文献

[1] 郭东梅,胡蓉. 冠心病新的危险因素研究进展 [J]. 重庆医学, 2011, 40(24): 2462-2465.
 [2] Blankenberg S, Luc G, Ducimetière P, et al. Interleukin-18 and the risk of coronary heart disease in European

men: the prospective epidemiological study of myocardial infarction (PRIME) [J]. *Circulation*, 2003, 108(20): 2453-2459.

[3] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M] 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 551-557, 530.
 [4] 魏伟, 吴希美, 李元健. 药理实验方法学 [M]. 第4版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 866-867.
 [5] Johns T N, Olson B J. Experimental myocardial infarction: A method of coronary occlusion in small animals [J] *Ann Surg*, 1954, 140(5): 675-682.
 [6] Qiao Z, Xu Y. Salvianolic acid B alleviating myocardium injury in ischemia reperfusion rats. [J] *Afr Tradit Complement & Altern Med*, 2016, 13(4): 157-161.
 [7] Ji H S, Yu F, Yang J. Comparative research on pharmacodynamics of Danshen co-microemulsion on hemorheology in rats with hyperlipidemia [J]. *J Chin Med Mater*, 2008, 31(4): 566-559.
 [8] Chen J, Deng J, Zhang Y, et al. Lipid-lowering effects of Danhong injection on hyperlipidemia rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 154(2): 437-442.
 [9] 赵富花, 刘永刚, 何进来. 丹参饮的临床新用途 [J]. 时珍国医国药, 2005, 16(2): 160-161.
 [10] 颜琳琳, 周利红, 李琦. 中医血瘀证动物模型研究概况 [J]. 中医杂志, 2014, 55(3): 255-258.
 [11] Kramer M, Dang J, Baertling F, et al. TTC staining of damaged brain areas after MCA occlusion in the rat does not constrict quantitative gene and protein analyses [J]. *J Neurosci Methods*, 2010, 187(1): 84-89.
 [12] 于占久, 王炳璋, 杨鸣刚, 等. 关于心肌梗塞的实验研究-动物模型的建立及心外膜电图标测术 [J]. 中华心血管病杂志, 1980, 8(1): 65-67.