

不同品系栝楼果皮抗心肌梗死药效学比较研究

赵启韬¹, 孟冰雪², 黄臻辉³, 琚 姝³, 张永清^{1*}

1. 山东中医药大学中药学博士后流动站, 山东 济南 250355

2. 山东中医药大学基础医学院, 山东 济南 250355

3. 上海第一生化药业有限公司药物研究所, 上海 200336

摘要: **目的** 探讨不同品系栝楼果皮抗心肌梗死的药效差异, 为栝楼优良品种选育提供参考。**方法** 选择道地产区 3 个主要品系的栝楼果皮作为研究材料。60 只大鼠随机分成对照组、丹参片(阳性药对照)组以及 1、2、3 号栝楼皮组。结扎大鼠冠状动脉, 制备冠心病急性心肌梗死模型; 对照组实行假手术。栝楼皮制成水煎剂 ig 给药, 丹参片为阳性对照药。氯化三苯四氮唑染色, 测定心肌梗死率; 生理记录仪记录心电图变化, 检测心脏功能; 生化试剂盒检测血浆中肌酸激酶(CK)、肌酸激酶同工酶(CKMB)、谷草转氨酶(AST)、 α -羟基丁酸脱氢酶(LDH)和乳酸脱氢酶(AST)活性, 确定心肌细胞坏死程度; 测定心肌组织丙二醛(MDA)含量及超氧化物歧化酶(SOD)活性, 明确大鼠体内清除氧自由基的能力。**结果** 与模型组相比, 3 个栝楼皮组心电图 Δ ST 值、心肌梗死面积、血浆 5 种心肌酶活性、心肌组织 MDA 含量均显著降低($P < 0.05$ 或 0.01), 与丹参片组比较差异无显著性; 而心肌组织中 SOD 活性明显升高($P < 0.05$); 其中上述 9 种指标以 2 号栝楼组与模型组差异最为显著。**结论** 3 个品系栝楼皮均有显著降低急性心肌梗死模型大鼠心肌梗死率、维护心脏功能、防止心肌细胞坏死、增强其清除氧自由基的能力。其中 2 号品系栝楼皮效果最显著。不同品系栝楼皮干预急性心肌梗死效果有差异, 2 号品系栝楼皮保护效果优于其他品系。

关键词: 栝楼; 品系; 良种选育; 心肌梗死; 心肌酶; 丙二醛; 超氧化物歧化酶

中图分类号: R972 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2013)02-0095-005

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2013.02.004

Pharmacodynamic study on anti-miocardial infarction by different species of *Trichosanthes pericarpium*

ZHAO Qi-tao¹, MENG Bing-xue², HUANG Zhen-hui³, JU Shu³, ZHANG Yong-qing²

1. Chinese Materia Medica Post-doctorate Station, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

2. School of Basic Medicine, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

3. Institute of Medicine Research, The First Biochemistry Medicine Limited Corporation, Shanghai 200336, China

Abstract: **Objective** To investigate the pharmacodynamic differences of anti-miocardial infarction among different species of *Trichosanthes pericarpium*, which could provide the reference for breeding the fine varieties of *T. pericarpium*. **Methods** Pericarps of three species of *T. pericarpium* from geo-authentic areas were selected as objects. Sixty Wistar rats were randomly divided into the control, model, Danshen Pian group (positive control group), trichosanthes 1, trichosanthes 2, and trichosanthes 3 groups. Acute myocardial ischemia model was made through the ligation of coronary artery. The control group was Sham operated. The pericarp of *T. pericarpium* was prepared as decoction and ig administered and Danshen Pian is the positive control group. To measure the infarction area, myocardial tissue was stained with triphenyltetrazolium chloride (TTC). The degree of myocardial infarction was evaluated by electrocardiograph (ECG). To evaluate the myocardial injury, the serum levels of creatine-kinase (CK), creatine-kinase-MB (CKMB), lactate dehydrogenase (LDH), and aspartate-amino transferase (AST) were detected. Moreover, the *in vivo* activity of scavenging oxygen free radical was detected through detecting the content of malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) in myocardial tissue. **Results** Compared with those in the model group, the Δ ST value, the myocardial infarction rate, and the serum activity of CK, CK-MB, LDH, AST, and α -HBDH of rats in three trichosanthes groups were obviously lowered

收稿日期: 2013-01-22

基金项目: 济南市科技发展计划项目资助(200906028); 上海市科学技术委员会项目资助(11HX1171400)

作者简介: 赵启韬(1970—), 硕士生导师, 主要研究方向为中医药防治心脑血管疾病的机制。Tel: (0531)89628501

*通信作者 张永清(1962—), 教授, 博士研究生导师。E-mail: zyzq622003@163.com

($P < 0.05$ or $P < 0.01$). There was no significant difference compared with Danshen Pian group. The activity of SOD in the myocardia increased observably ($P < 0.05$). Among these nine indexes, the most observable changes could be detected in the trichosanthe 2 group of rats. **Conclusion** All the three species of *T. pericarpium* could significantly reduce the myocardial infarction rate of acute myocardial ischemia model rats, maintain the function of heart, prevent myocardial necrosis, and increase the scavenging activity of free radical. The protective effect of the three varieties of *T. pericarpium* on the acute myocardial ischemia of rats is significant, but the effect of the trichosanthe 2 variety is the most obvious.

Key words: *Trichosanthes kirilowii* Maxim.; species; improved variety breeding; myocardial infarction; cardiac enzymes; malondialdehyde; superoxide dismutase

栝楼 *Trichosanthes kirilowii* Maxim. 为葫芦科多年生草本植物, 其干燥成熟果皮是为常用中药瓜蒌皮, 具有清化热痰、利气宽胸等功效^[1], 临床用于治疗冠心病、心绞痛及心肌梗死等, 效果显著^[2-4]。山东长清、肥城及宁阳一带为栝楼的道地产区, 种植历史悠久。但长期以来, 栝楼种质一直混杂, 缺乏种质均一的优良品种, 从而限制了生产发展。本实验利用大鼠冠心病心肌缺血模型, 根据国家新药研究指南, 采用诊断冠心病心肌梗死最可靠、应用最广泛的心电图 ST 值变化、心肌梗死率、血浆心肌酶谱等指标, 对 3 个品系栝蒌果皮干预冠心病心肌缺血的效果进行了系统比较, 旨在为栝蒌优良品种选育提供药理、药效学依据。

1 材料和方法

1.1 试药

瓜蒌皮: 2011 年 10 月份采自山东省济南市长清区马山镇庄村栝楼种植基地, 经山东中医药大学周凤琴教授鉴定为葫芦科多年生草质藤本植物栝楼 *Trichosanthes kirilowii* Maxim. 的干燥近成熟果实, 分为 1、2、3 号 3 种不同品系, 剖开, 取下果皮, 晒干, 备用。

复方丹参片: 广州白云山和记黄埔中药有限公司生产, 批号 A1A031。

1.2 动物

Wistar 雄性大鼠, 体质量 (230 ± 20) g, 山东鲁抗医药股份有限公司提供。动物合格证号: SCXK20080002。

1.3 试剂与药品

肌酸激酶 (CK)、肌酸激酶同工酶 (CKMB)、乳酸脱氢酶 (LDH)、门冬氨酸氨基转移酶 (AST)、 α -羟基丁酸脱氢酶 (α -HBDH) 试剂盒均由中生北控生物科技股份有限公司生产, 批号 20000271; 超氧化物歧化酶 (T-SOD) 试剂盒、丙二醛 (MDA) 测定试剂盒、考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒均由南京建成生物工程研究所生产; 氯化三苯四氮唑 (TTC)

由北京优尼康生物科技有限公司生产; 水合氯醛、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、甲醛等其他试剂均为分析纯。

1.4 仪器

BL—410 生物信号采集处理系统 (四川成都泰盟科技有限公司); GL—20A 高速低速冷冻离心机; 半自动生化分析仪 (Microlab 300); 微量紫外分光光度计 (岛津 UV—2201)。

1.5 试药制备

栝楼皮水煎液: 分别将 3 个品系栝楼果皮 5 kg 加入 8 倍量水, 煎煮 2 次, 合并 2 次煎煮液继续煎煮, 至最终质量浓度为 2 g/mL。

复方丹参片: 蒸馏水制成混悬液。液体体积使灌胃量与栝楼皮组相同。

1.6 动物处理方法

将 60 只大鼠随机分为对照组、模型组、阳性药对照组 (复方丹参片组)、1 号栝楼皮组、2 号栝楼皮组、3 号栝楼皮组。栝楼皮组连续 ig 给药 3 d, 剂量为 30 g/(kg·d)。复方丹参片组为 0.96 g/(kg·d), 模型组及对照组给予等容积生理盐水。保持大鼠自由饮食、饮水, 于末次给药后 30 min 用 4% 水合氯醛麻醉, 仰卧固定于鼠板上, 用 BL—410 生物信号采集处理系统采集信号。对大鼠进行气管插管, 连接呼吸机, 建立辅助呼吸通道。

1.7 模型制备

参照文献^[5-7]结扎大鼠冠状动脉左前降支, 制造急性心肌梗死模型。胸部去毛消毒, 沿左胸骨中线纵行切开皮肤约 2 cm, 在第三四肋间开胸暴露心脏, 距左冠状动脉起点约 2 mm 处穿一手术线结扎, 挤出进入胸腔的血液, 缝合胸壁。对照组实施假手术, 仅穿线不结扎。

1.8 心电图测量

分别将 BL—410 生物信号采集处理系统的黄色、黑色、红色电极插入大鼠右前肢、右后肢及左后肢内侧皮下, 记录手术前、手术后 30 min 及存活

6 h 后的心电图。

1.9 心肌梗死率测定

参照文献^[8]进行。动物取血后立即取出心脏，用冰生理盐水冲洗残血，剔除血管、脂肪等非心肌组织，用吸水纸吸去水分，称全心湿质量。切取心尖部位 0.1 g，检测 MDA、SOD 活性等。将剩余心脏沿心尖到心基部平行切成 0.1 cm 厚心肌切片，将心肌切片放入 1% TTC 磷酸缓冲液 (pH 7.4)，37 °C 温浴 10 min 染色。染色过程中不时搅拌染色液，使之与心肌充分接触。染色后立即用生理盐水冲洗多余染料，放入 4% 福尔马林溶液中固定。正常心肌被染成红色，梗死心肌不着色。固定一段时间后，进行心脏切片扫描。剪下梗死心肌并称质量，计算心肌梗死率。

心肌梗死率=梗死心肌质量/心脏湿质量

1.10 生化指标检测

冠状动脉结扎 6 h 腹腔动脉取血 5 mL，低温分离血浆 (4 °C，3 000 r/min 离心 15 min)。按试剂盒要求测定血浆 5 项心肌酶 (CK、CK-MB、LDH、 α -HBDH、AST) 及心尖组织脂质 MDA、SOD 活性。

1.11 数据统计

采用 SPSS16.0 统计软件包对各组数据进行统计分析。数据以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示，多组均数用 *F* 检验，组间比较用 *Q* 检验。

2 结果

2.1 心电图 Δ ST 值

心脏结扎 6 h 后，大鼠心电图 ST 段显著抬高。与模型组相比，3 个品系栝楼组大鼠 Δ ST 值均显著降低。其中 2 号栝楼降低最为显著，优于复方丹参片组 ($P < 0.05$)。表明 3 个品系栝楼皮均能减轻大鼠心肌缺血程度，2 号栝楼皮作用效果更明显 (表 1)。

表 1 各组大鼠心电图 Δ ST 值 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Δ ST values of rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	Δ ST 值	
		结扎前	结扎 6 h 后
对照	—	0.338 ± 0.094	0.323 ± 0.093
模型	—	0.387 ± 0.103	0.390 ± 0.105**
丹参片	0.96	0.299 ± 0.106	0.284 ± 0.057
1 号栝楼	30	0.282 ± 0.079	0.274 ± 0.105 [#]
2 号栝楼	30	0.320 ± 0.055	0.310 ± 0.098 ^{#△}
3 号栝楼	30	0.299 ± 0.069	0.296 ± 0.050

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与丹参片组比较: [△] $P < 0.05$

** $P < 0.01$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [△] $P < 0.05$ vs danshen group

2.2 心肌梗死率

如图 1、2 所示，心脏结扎 6 h 后，模型组大鼠心肌缺血严重，心肌梗死率显著大于对照组。与模型组相比，3 个品系栝楼皮干预组大鼠心肌梗死率均显著降低；其中 2 号栝楼降低最为明显 ($P < 0.05$)。表明 3 个品系栝楼皮均能降低心肌梗死率，2 号栝楼皮作用效果更明显。

2.3 心肌酶活性

手术后 6 h，模型组大鼠血浆 5 项心肌酶活性显著高于对照组 ($P < 0.01$)，3 个栝楼皮干预组动物血浆 5 种心肌酶活性升高并不显著，与对照组、复方丹参片组相比差异无显著性。和 1、3 号栝楼干预组、丹参组相比，2 号栝楼组血浆肌酸激酶及其同工酶、门冬氨酸氨基转移酶活性更接近对照组 ($P < 0.05$)。该结果表明 3 种栝楼皮均能在缺血缺氧的情况下维持心肌细胞膜的完整性，降低细胞坏死率。2 号栝楼皮对心肌细胞保护作用效果最显著 (图 3、4)。

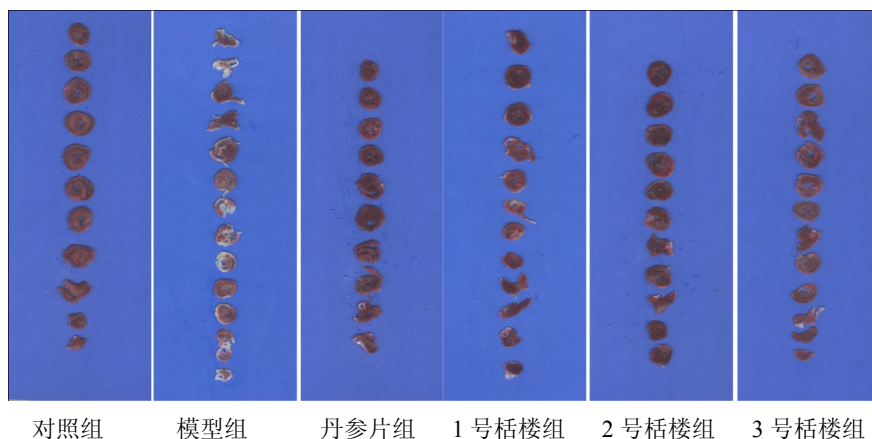
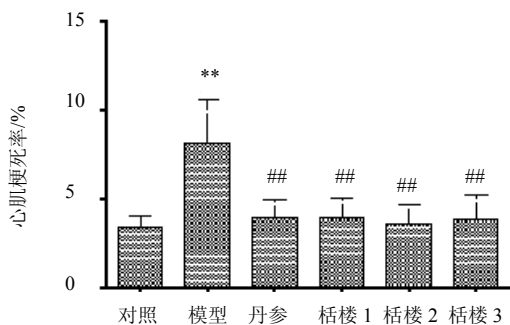


图 1 各组大鼠手术后 6 h 心肌切片

Fig. 1 Myocardial sections of rats in each group 6 h after coronary artery ligation



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$; 与 2 号栝楼组比较: $\Delta P < 0.05$; 下同

** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs model group; $\Delta P < 0.05$ vs 2nd trichosanthes group; same as below

图 2 各组大鼠手术后 6 小时心肌梗死率

Fig. 2 Myocardial infarction rate of rats in each group 6 h after coronary artery ligation

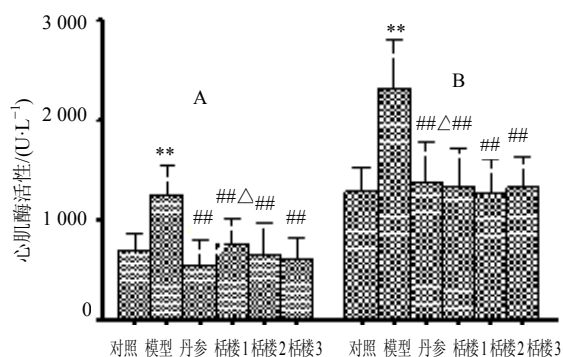


图 3 各组大鼠手术后 6 h 血浆肌酸激酶 (A) 及其同工酶 (B) 的活性

Fig. 3 Activities of plasma creatine-kinase (A) and creatine-kinase-MB (B) of rats in each group 6 h after coronary artery ligation

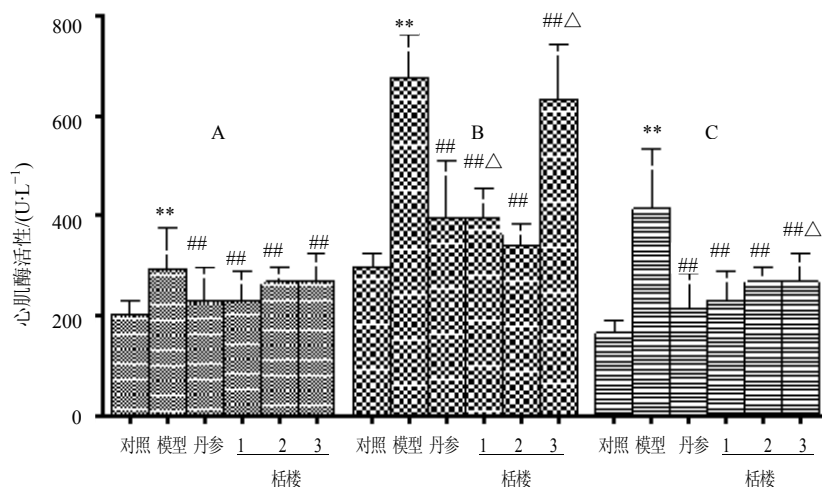


图 4 各组大鼠手术 6 h 后血浆乳酸脱氢酶 (A)、门冬氨酸氨基转移酶 (B) 及 α -羟丁酸脱氢酶 (C) 活性

Fig. 4 Activities of lactate dehydrogenase (A), aspartate-aminotransferase (B), and hydroxy butyric acid dehydrogenase (C) of rats in each group 6 h after coronary artery ligation

2.4 心肌组织 MDA 含量及 SOD 活性

与模型组相比, 3 个品系栝楼组的 MDA 含量均有下降趋势; SOD 活性显著上升 ($P < 0.05$), 1 号栝楼组上升最为显著 ($P < 0.01$), 见图 5、6。该结果表明 3 个品系栝楼皮水煎液能够增加心肌缺血大鼠 SOD 活性, 并在一定程度上减少 MDA 含量。1 号栝楼组可明显升高心肌缺血大鼠 SOD 活性, 表明其对恢复缺血组织正常的氧化还原状态具有积极作用。

3 讨论

心电图 ST 段和 5 项心肌酶均可反应急性心肌

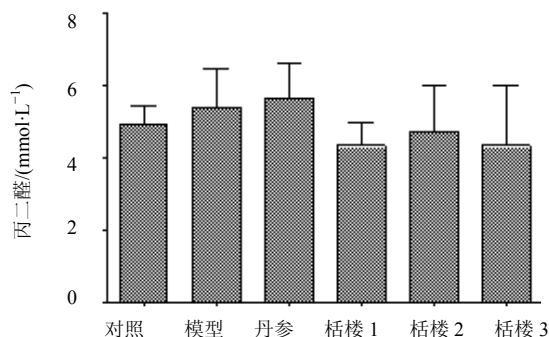


图 5 各组大鼠手术 6 h 后心肌组织丙二醛含量

Fig. 5 MDA in myocardial tissue of rats in each group 6 h after coronary artery ligation

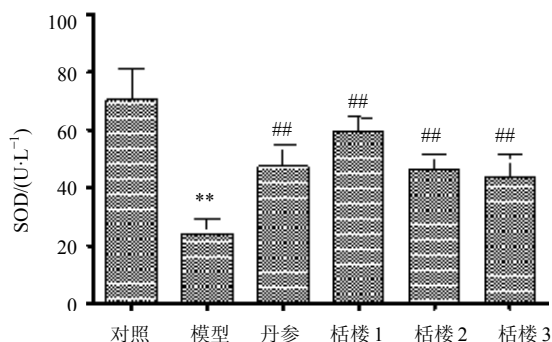


图6 各组大鼠手术6 h后心肌组织超氧化物歧化酶活性

Fig. 6 SOD activity in myocardial tissue of rats in each group 6 h after coronary artery ligation

梗死的程度,其中CKMB对于诊断心肌坏死具有高度特异性。综合分析各组大鼠上述9种指标的检测数据,发现1号和2号品系的栝楼皮水煎液能够明显抑制实验性急性心肌缺血大鼠栝楼心电图ST段的抬高,3个品系栝楼皮水煎液均可缩小心肌梗死面积,降低血浆5种心肌酶活性。该结果表明在缺血、缺氧状态下,3个品系栝楼皮在抑制心肌细胞坏死,维持心脏的正常生理功能等方面均可发挥作用。其中2号栝楼皮的抗急性心肌梗死效果明显优于其他两种。3号栝楼皮可显著升高SOD活性,并在一定程度上降低心肌组织MDA含量。这表明栝楼皮在缺血、缺氧状态下,可以更好地减轻心肌细胞膜的氧化损伤、提供清除氧自由基的能力,这可能与其抗心肌梗死作用有关。

栝楼含多种化学成分,主要包括有机酸类、甾醇、三萜及其苷类、氨基酸类、多肽、蛋白质、生物碱等,这些化学成分的药理作用多数未知;3个品系栝楼皮药理活性的差异,提示其中活性成分的种类及含量不同。有研究表明,栝楼皮提取物中的类生物碱可干预冠心病等心血管疾病,栝楼酸也具有抗血栓形成、减少胆固醇和动脉粥样硬化的作用^[9],但具体哪种化学成分可干预急性心肌梗死仍有待进一步研究。

瓜蒌清热涤痰、宽胸散结,是中医治疗胸痹、心痛的经典药材,药用历史悠久^[10-13]。瓜蒌皮注射液、瓜蒌含片等也是我国最早被批准生产上市的中成药之一,目前被广泛用来治疗冠心病、心绞痛及心肌梗死,效果显著^[2-4]。山东长清是栝楼著名的道地产区,种植历史悠久。经过长期的自然选择与人工选择,栝楼植株外部形态出现了明显的分化,形

成了不同的种质。长清地区也是栝楼种质资源的集散中心,具有多种遗传变异类型。目前多个种质的栝楼皮均是瓜蒌类成药生产的原材料。瓜蒌皮注射液等瓜蒌类成药生产所用种质混乱,致使产品疗效不稳定。本研究首次联合应用临床上广泛应用的9种冠心病心肌缺血诊断指标,全面、系统地评价了不同品系栝楼皮对心肌缺血的保护效果,为栝楼优良品种的筛选提供了最直接的药效学实验依据。同时也为栝楼类药品建立与功效相关的质量标准评价体系、及其国家质量标准的升级和修订积累了资料。

参考文献

- [1] 中国药典[S].一部.2010
- [2] 李红.参附注射液合瓜蒌皮注射液治疗心力衰竭30例[J].江西中医药,2010,3(41):33-34.
- [3] 宋宏雁,班努库肯.瓜蒌皮注射液治疗不稳定型心绞痛疗效观察[J].现代中西医结合杂志,2009,18(31):3820-3821.
- [4] 赵然尊,石蓓,王冬梅,等.瓜蒌皮注射液治疗冠心病稳定型心绞痛合并2型糖尿病的临床观察[J].中国新药杂志,2010,19(20):1871-1874.
- [5] Yamaguchi F, Sanbe A, Takeo S. Cardiac sarcoplasmic reticular function in rats with chronic heart failure following myocardial infarction [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1997, 29: 753-763.
- [6] 周文武,林玲,陈军,等.冠脉结扎法制做大鼠心肌缺血模型[J].中国实验动物学报,2004,12(4):226-231.
- [7] Takimoto Y, Aoyama T, Keyamura R, et al. Differential expression of three types of nitric oxide synthase in both infarcted and noninfarcted left ventricles after myocardial infarction in the rat [J]. *Int J Cardiol*, 2000, 76(2/3): 135-145.
- [8] 吴向群,徐鸣,毛靖峰,等.救尔心胶囊对大鼠急性心肌缺血的保护作用[J].中国药师,2001,4(4):287-288.
- [9] 屠婕红,余菁,陈伟光.瓜蒌的化学成分和药理作用研究概况[J].中国药师,2004,7(7):562-563.
- [10] 周岩.本草思辨录(卷二)[M].北京:中国书店影印,1987.
- [11] 李敬孝,韩超,焦赢君.从痰论治冠心病[J].长春中医药大学学报,2009,25(5):85-86.
- [12] 朱德乾.瓜蒌薤白桂枝汤加味治疗冠心病心绞痛68例[J].临床和实验医学杂志,2008,(9):54.
- [13] 李克光.金匱要略译释[M].上海:上海科技出版社,1993.