注射用益气复脉（冻干）对大鼠离体胸主动脉的作用及其机制研究

李陆军[1]，张家丰[2]，万梅绪[3, 4]，李　智[3, 4]，侯　健[5]，李德坤[3, 4*]，戚　进[2*]

1. 黑龙江中医药大学附属第一医院，黑龙江 哈尔滨　150040
2. 中国药科大学，江苏 南京　211198
3. 天津天士力之骄药业有限公司，天津　300410
4. 天津市中药注射剂安全性评价企业重点实验室，天津　300410
5. 天士力控股集团有限公司，天津　300402

摘　要：目的 研究注射用益气复脉（冻干）（YQFM）对大鼠离体胸主动脉环的作用及机制。**方法** 采用大鼠离体胸主动脉血管环，观察YQFM及红参、麦冬、五味子提取物（HS、MD、WWZ）对血管的直接作用，YQFM对KCl或去甲肾上腺素所引发血管收缩作用的影响；对乙酰胆碱所致血管舒张作用的影响；对内钙释放所致血管收缩作用的影响。**结果** YQFM在低浓度下对血管无刺激作用，但是在高浓度时，对血管有刺激收缩作用，且无内皮组收缩幅度明显超出有内皮组。不同浓度的3种药材提取物对血管刺激作用不显著；YQFM可显著抑制KCl或者去甲肾上腺素引起的血管收缩；YQFM对乙酰胆碱引起的血管舒张作用无显著抑制作用；YQFM不能抑制内钙释放。**结论** YQFM在高浓度下对血管有一定的直接刺激收缩作用，且直接刺激作用可能和血管内皮相关；YQFM既有抑制受体操纵性钙通道又有抑制电压依赖性钙通道的调节作用。

关键词： 注射用益气复脉（冻干）；胸主动脉；钙通道

中图分类号： R965　　**文献标志码：** A　　**文章编号：** 1674-6376（2019）07-1304-05

DOI： 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.07.008

Effects of Yiqi Fumai Lyophilized Injection on isolated rats thoracic aorta and possible mechanisms

LI Lujun[1], ZHANG Jiafeng[2], WAN Meixu[3,4], LI Zhi[3,4], HOU Jian[5], LI Dekun[3,4], QI Jin[2]

1. First Affiliated Hospital, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China
2. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China
3. Tianjin Tasly Pride Pharmaceutical Co., Ltd., Tianjin 300402, China
4. Tianjin Key Laboratory of Safety Evaluation Enterprise of Traditional Chinese Medicine Injections, Tianjin 300402, China
5. Tasly Holding Group Co., Ltd., Tianjin 300410, China

Abstract: Objective This study explored the effect and mechanism of Yiqi Fumai Lyophilized Injection (YQFM) on the isolated thoracic aortic rings in rats. **Methods** The isolated thoracic aorta rings of SD rats were used to observe: the direct effects of YQFM and hongshen extract, maidong extract, wuweizi extact on the vascular rings, effect of YQFM on vasoconstriction induced by potassium chloride or phenylephrine, effect on vasodilatation induced by acetylcholine, effect of endocalcium release on vasoconstriction. **Results** At low concentrations, YQFM has no stimulating effect on thoracic aortic rings. At high concentrations, YQFM has a stimulating contraction effect on blood vessels and the amplitude of contraction in the non-endothelial group is significantly higher than that in the endothelial group; the effects of the three extracts on thoracic aortic rings were weak, at high concentration, the effect has no significant difference; the vasoconstriction effect induced by potassium chloride or phenylephrine was inhibited by YQFM; the vasodilatation effect induced by acetylcholine was not inhibited. YQFM could not inhibit the release of

收稿日期： 2019-02-28

基金项目： 天津市中药注射剂关键技术校企协同创新实验室建设项目（17PTSYJC00090）

第一作者： 李陆军，硕士，副主任药师，研究方向为中药化学成分与制剂。Tel：13904600581　E-mail：lilujun7@163.com

***通信作者：** 戚　进（1979—）男，教授，博士，博士生导师，研究方向为中药物质基础及中药质量控制新方法。Tel：（025）86185157　E-mail：qijin2006@163.com

李德坤（1973—），男，工程师，研究方向为中药注射剂工艺及质量控制。Tel：（022）26736712　E-mail：lidekun@tasly.com

internal calcium.**Conclusions** At high concentration, YQFM has a certain direct stimulation and contraction effect on blood vessels, and the stimulation effect may be related to multiple components. Moreover, the vascular endothelium may be the potential target of the direct stimulation effect. Both the receptor-manipulative calcium channel and the voltage-dependent calcium channel can be inhibited by YQFM.

Key words: Yiqi Fumai Lyophilized Injection; thoracic aorta; calcium channel

注射用益气复脉（冻干）（YQFM）源自古方生脉散，组方为红参、麦冬、五味子，经过现代中药提纯和制备技术制成的现代复方中药冻干粉针，是中药领域的一种全新剂型。现代研究表明，该制剂有抗心衰、抗心肌缺血、增强心脏收缩功能、延缓心室重构、抗炎、抗氧化等多方面药理活性，其主要用于心力衰竭、心绞痛、心肌梗死、休克等疾病的治疗[1-8]。

在临床上，YQFM也被应用于一些低血压患者的治疗，沈元丽等[9]对60例维持性血液透析相关性低血压患者进行药物干预，结果发现与单用0.9%氯化钠注射液比较，透析开始即给予YQFM能显著升高患者透析后收缩期和舒张期血压值，降低心率，血压升高幅度达20 mmHg（1 mmHg=0.133 kPa），表明YQFM可以降低透析中低血压的发生率，提高低血压治疗率。刘志勇[10]报道YQFM对患者的低血压症状也有一定的治疗效果。但是目前，YQFM对血压的调节作用尚未进行系统科学的深入研究。

血管环研究在世界范围内广泛应用于基础研究与新药开发等领域[11]，有研究者发现五味子中的主要成分五味子醇甲对血管的钙离子通道和血管内皮可能有影响[12]，由于血管张力是调节血管外周阻力的重要因素，也是血流动力学改变的重要指征，因此本实验初步探索了YQFM及其组成药材对大鼠离体胸主动脉的作用及可能的作用机制。

1 实验材料

YQFM由天津天士力之骄药业有限公司提供，批号20170311。红参（HS）、麦冬（MD）、五味子（WWZ）由天士力之骄药业有限公司技术研究部提供。雄性SD大鼠，6～8周龄，体质量180～210 g，SPF级，北京维通利实验动物技术公司，实验动物生产许可证号SCXK（京）2016-006。

2 实验方法

2.1 大鼠离体胸主动脉血管环的制备

取SD大鼠断头处死，迅速取出胸主动脉，剪成2～3 mm。量取10 mL预先经37 ℃恒温水浴过的K-H液，置于37 ℃恒温槽中，并持续通入95% O_2和5% CO_2的混和气体，取出制备好的血管环置于恒温槽中，张力变化由生理记录仪配套生物机能实验系统进行采集和记录。调节静息张力分别为0.5、1.0、1.5、2.0 g左右，分别稳定15 min，期间每15 min洗1次。之后用60 mmol/L的KCl预刺激血管，达到最大收缩幅度后冲洗3次，使血管环恢复到刺激前的状态。

去内皮成功检测方法：用60 mmol/L的KCl刺激血管环收缩，等待其到达收缩高峰，加入10^{-2} mol/L的Ach，正常血管舒张幅度一般在50%左右，若血管张力舒张幅度在30%以下，证明血管环去内皮成功[11-15]。

舒张幅度=（加受试药前张力−加受试药后张力）/（药物刺激后张力−药物刺激前张力）

2.2 血管环实验分组

（1）YQFM对血管环的直接作用；（2）红参提取物、麦冬提取物、五味子提取物和YQFM对血管环的直接作用；（3）KCl预刺激血管环收缩后，YQFM对血管环的作用；（4）去氧肾上腺素预刺激血管环收缩后，YQFM对血管环的作用；（5）YQFM对Ach引起的KCl引起的血管收缩后舒张作用的影响；（6）YQFM对Ach引起的去氧肾上腺素血管收缩后舒张作用的影响；（7）YQFM在无钙克式液中对去氧肾上腺素引起胸主动脉血管环收缩的抑制作用。

2.3 统计学方法

大鼠胸主动脉血管环血管紧张度变化均以相对值的百分比来表示，结果以均数±标准差表示。数据由Graphpad Prism7.0及SPSS 17.0软件进行统计学分析，组间比较采用*t*检验。

3 实验结果

3.1 累积浓度的YQFM对血管环的直接作用

与对照组相比，YQFM质量浓度在7.5 mg/mL时，其对有内皮和无内皮的血管无明显的刺激收缩作用；当增加YQFM质量浓度至15～60 mg/mL时，与对照组相比，对有内皮和无内皮血管组均有明显的刺激收缩作用，且收缩幅度随着YQFM的浓度增高而增高，呈现明显的量效关系，且无内皮组血管环收缩幅度明显要高于有内皮组（$P<0.01$）。见图1。

3.2 累积浓度的HS、MD、WWZ提取物和YQFM

对血管环的直接作用

HS、MD、WWZ 3种提取物在质量浓度为5.2～20.8 mg/mL时，对血管都有微弱的刺激收缩作用，与YQFM组相比无显著差异；但是在药物质量浓度上升到41.6 mg/mL（临床两倍剂量）时，3种药材提取物对血管的刺激收缩作用没有显著提升，而YQFM组对血管的刺激作用上升至45%，与其余3组相比显著提高（$P<0.01$）。见图2。

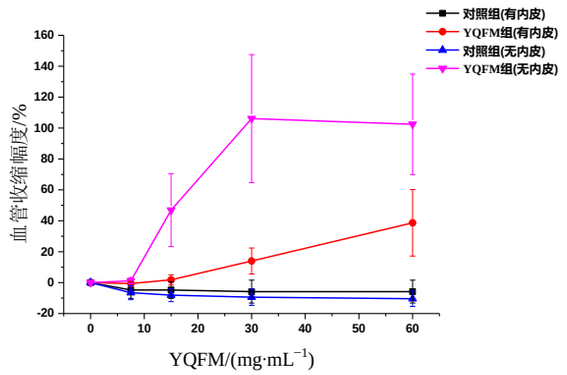

图1 累积浓度的YQFM对血管环的直接作用

Fig. 1 Direct effect of cumulative concentration of YQFM on vascular rings

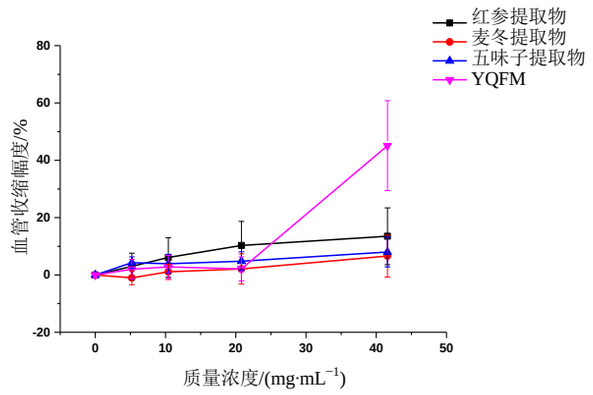

图2 累积浓度的红参提取物、麦冬提取物、五味子提取物和YQFM对血管环的直接作用

Fig. 2 Direct effects of *Red Ginseng* extract, *Ophiopogon Ophiopogonis* extract, *Schisandra chinensis* extract and YQFM on vascular ring

3.3 累积浓度的YQFM对KCl预刺激血管收缩后的作用

与空白对照组相比，YQFM质量浓度在7.5～30 mg/mL时，对60 mmol/L KCl预刺激的血管作用没有显著差异；与对照组相比，YQFM质量浓度在60 mg/mL时，其对KCl所引起的血管环收缩有显著抑制作用（$P<0.01$），且无内皮组与有内皮组趋势相同，经统计分析无显著差异。结果见图3。

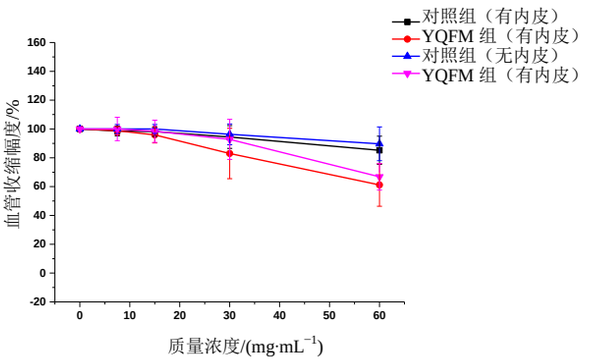

图3 累积浓度的YQFM对的KCl预刺激血管收缩后的作用

Fig. 3 Effect of cumulative concentration of YQFM on pre-stimulated vasoconstriction induced by KCl

3.4 YQFM对去氧肾上腺素预刺激血管收缩后的作用

与空白对照组相比，YQFM质量浓度在7.5～15 mg/mL时，对10^{-6} mol/L去氧肾上腺素预刺激的血管作用无显著差异。YQFM质量浓度在30～60 mg/mL时，对去氧肾上腺素所引起的血管环收缩与对照组相比具有显著抑制作用（$P<0.05$）。同时，无内皮组与有内皮组趋势相同，经统计学分析无明显差异。见图4。

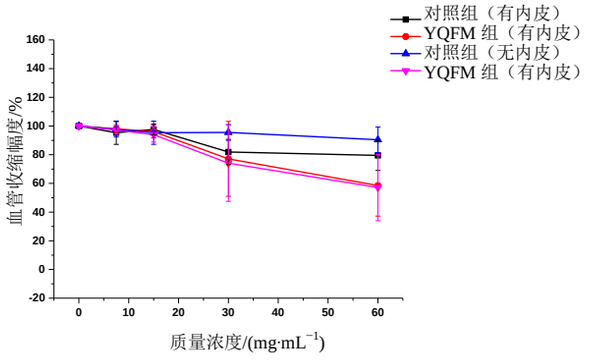

图4 累积浓度的YQFM对去氧肾上腺素预刺激血管收缩后的作用

Fig. 4 Effect of cumulative concentration of YQFM on vasoconstriction induced by norepinephrine

3.5 YQFM对ACH引起的氯化钾血管收缩的舒张作用的影响

以20 mg/mL的YQFM孵浴有内皮的胸主动脉血管环20 min后，与空白组对比，累积浓度的乙酰胆碱对60 mmol/L KCl引起的血管环收缩的舒张无显著抑制作用。见图5。

3.6 YQFM对ACH引起的去氧肾上腺素血管收缩的舒张作用的影响

以20 mg/mL的YQFM孵浴有内皮的胸主动脉血管环20 min后，乙酰胆碱的舒张作用与空白组相比，无明显抑制作用。见图6。

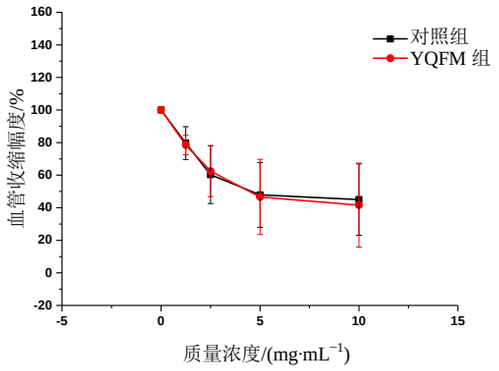

图5 YQFM对ACH引起的KCl血管收缩的舒张作用的影响

Fig. 5 Effect of YQFM on vasodilation of ACH-induced vasoconstriction induced by KCl

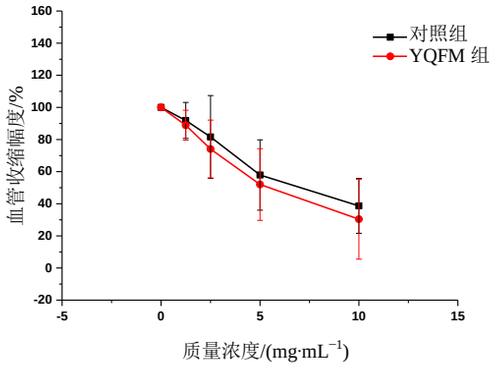

图6 YQFM对ACH引起的去氧肾上腺素血管收缩的舒张作用的影响

Fig 6 Effect of YQFM on vasodilation of norepinephrine induced by ACH

3.7 YQFM对去氧肾上腺素引起胸主动脉血管环收缩的抑制作用

在提前加入了YQFM，各组血管环在给予去氧肾上腺素之后，引起的收缩作用无显著差异。结果表明，YQFM不能抑制此时的去氧肾上腺素引起的收缩。见图7。

4 讨论

YQFM作为新型的中药注射剂，其临床应用十分广泛，其可能的作用机制也是多靶点、多成分的，前期研究主要集中于关于抗心肌缺氧缺血作用、抗心衰作用和保护心肌作用等，而对YQFM在血压方面的调节作用研究较少。本实验通过YQFM对大鼠离体胸主动脉的作用及其可能机制进行初步探讨，为YQFM在治疗心衰的血压方面的调节作用提供研究基础。

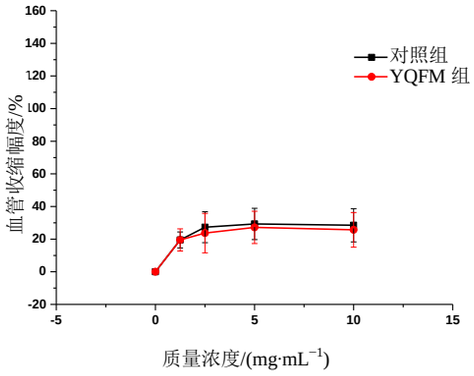

图7 YQFM对去氧肾上腺素引起胸主动脉血管环收缩中内钙外流的抑制作用

Fig. 7 Inhibitory effect of YQFM on intracellular calcium efflux induced by norepinephrine in thoracic aortic rings

本实验观察到，YQFM及其各组成药材提取物（红参、麦冬、五味子提取物）在较低浓度下对血管刺激作用不显著，在高浓度下，3种药材提取物引起的血管收缩几乎没有变化，但是YQFM所引起的血管收缩程度明显上升，说明YQFM刺激血管收缩的作用不是通过单一提取物导致，可能是多种提取物中多成分共同作用。而且本实验中无内皮组收缩幅度明显高于有内皮组，说明YQFM使血管收缩的作用可能和血管内皮有关系。

YQFM对KCl和去氧肾上腺素引起的血管环收缩有明显的抑制作用，且对于无内皮组和有内皮组，YQFM的抑制作用并无明显差异，说明YQFM抑制KCl和去氧肾上腺素的收缩作用可能是通过血管平滑肌产生，和血管内皮无明显关系。本实验说明，YQFM既有抑制受体操纵性钙通道（ROC通道）又有抑制电压依懒性钙通道（VDC通道）的调节作用[16-17]。

血管环在预加入钙螯合剂EDTA的无钙克式液中孵育后，再加入去氧肾上腺素，此时细胞外无任何可以引起收缩的钙，其所引起血管环的收缩是通过磷酸肌醇途径，作用于内质网，使内质网储存的钙释放所引起。本实验观察到，YQFM组与对照组比较，在预加入钙螯合剂EDTA的无钙克式液中，YQFM不能抑制细胞内肌质网内钙离子的释放。

血管的内皮细胞和血管平滑肌细胞中均存在相应的乙酰胆碱受体，但对血管活动却起相反的作用。乙酰胆碱通过血管平滑肌上的乙酰胆碱受体引起收缩，而通过血管内皮细胞上的乙酰胆碱受体引起内皮依赖性舒张因子的释放而导致血管舒张。由血管内皮细胞上的乙酰胆碱受体介导的血管舒张作用总是强于血管平滑肌细胞乙酰胆碱受体介导的血管收缩作用，因此只要血管内皮细胞存在时乙酰胆碱总是引起血管舒张[16-17]。本实验观察到，YQFM基本不能抑制乙酰胆碱引起的舒张作用。

综上所述，YQFM对大鼠离体胸主动脉血管环在低浓度下有微弱的刺激收缩作用，可能是由红参、麦冬、五味子3种提取物共同作用，且这种作用可能和血管内皮有一定联系。YQFM能抑制去VDC和ROC通道，从而抑制血管环的收缩，但不能抑制乙酰胆碱对血管环所引起的舒张作用。因此，YQFM对血管张力的调节可能是通过多途径、多种成分共同作用的结果，其作用机制及物质基础[18]仍需进一步深入探讨。

参考文献

[1] 鞠爱春, 罗瑞芝, 秦袖平, 等. 注射用益气复脉(冻干)药理作用及临床研究进展 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(3): 354-364.

[2] 王宇卿, 朱丹妮, 寇俊萍, 等. HPLC-ABTS-DAD在线检测生脉散和益气复脉粉针的体外抗氧化能力 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(16): 51-54.

[3] Wang Y Q, Liu C H, Zhang J Q, et al. Protective effects and active ingredients of Yi-Qi-Fu-Mai sterile powder against myocardial oxidative damage in mice [J]. J Pharmacol Sci, 2013, 122(1): 17-27.

[4] Li F, Zheng X J, Fan X X, et al. YiQiFuMai powder injection attenuates Ischemia / Reperfusion-induced myocardial apoptosis through AMPK activation [J]. Rejuv Res, 2016, 19(6): 495-508.

[5] 张秋月, 王保和, 刘伟爽, 等. 益气复脉方对慢性心衰大鼠心功能及心衰标志物的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2015, 42(11): 2233-2235.

[6] 赵雅彬. 益气复脉注射液治疗慢性心力衰竭的临床观察 [J]. 中国现代医药杂志, 2015, 17(1): 72-73.

[7] 孙兰军, 郑偕扣, 郝长颖. 益气复脉注射液治疗心力衰竭临床疗效观察 [J]. 中国当代医药, 2012, 19(17): 7-10.

[8] 郑志鹏, 陈功雷, 康 德, 等. 益气复脉联合多巴胺在创伤失血性休克的应用 [J]. 内科急危重症杂志, 2013, 19(6): 360-361.

[9] 沈元丽, 陈 凯, 钱莉莉, 等. 益气复脉注射液治疗血液透析相关性低血压的效果观察 [J]. 中国当代医药, 2016, 23(19): 147-149.

[10] 刘志勇, 张慧玲. 注射用益气复脉对维持性血液透析患者低血压的影响 [J]. 中医临床研究, 2013, 5(22): 56-57.

[11] 李秋影. 血管环模型的研究进展 [J]. 医学综述, 2011, 17(3): 339-342.

[12] 孔李婷, 黄 颖, 翟华强, 等. 五味子醇甲对大鼠离体胸主动脉环作用研究 [J]. 山东中医药大学学报, 2018, 42(1): 74-77.

[13] 谢水孟, 孔叶英, 徐 坚. 参麦注射液对大鼠离体胸主动脉血管环作用及机制的研究 [J]. 江西医药, 2007, 42(6): 502-504,498.

[14] 钱 健, 朱建华. 参麦注射液对大鼠离体胸主动脉血管环的作用及其机制 [J]. 医药导报, 2005, 24(6): 475-477.

[15] 胡致君, 李 勇, 刘 超. 金钱草提取物的血管舒张作用及机制研究 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017(5): 198-200.

[16] Putney J W Jr. Receptor-regulated calcium entry [J]. Pharmacol Ther, 1990, 48(3): 427-434.

[17] Fasolato C, Innocenti B, Pozzan T. Receptor-activated Ca^{2+} influx: how many mechanisms for how many channels? [J]. Trends Pharmacol Sci, 1994, 15(3): 77-83.

[18] 李德坤, 苏小琴, 李 智, 等. 注射用益气复脉(冻干)的质量标志物研究 [J]. 中草药, 2019, 50(2): 290-298.