

· 药理实验与临床观察 ·

葛根素口服制剂抗心肌缺血及对心肌细胞的保护作用

宋浩亮^{1,2}, 陈士林^{1,4*}, 梅学仁³, 杨大坚¹, 黄梦雨¹, 刘行先¹, 黄国钧², 陈新滋¹, 徐宏喜⁵, 利德裕^{5*}

(1. 香港理工大学, 香港 红; 2. 成都中医药大学, 四川 成都 610075; 3. 天津药物研究院, 天津 300193; 4. 中国医学科学院 中国协和医科大学药用植物研究所, 北京 100094; 5. 香港赛马会中药研究院有限公司, 香港 九龙)

摘要: 目的 研究葛根素口服制剂对在体大鼠心肌和离体新生大鼠心肌细胞的保护作用。方法 实验大鼠随机分为空白对照组、阳性对照组(造模前尾 iv 0.0335 g/kg 葛根素注射液)和葛根素口服制剂高、低剂量组(ig 0.8, 0.4 g/kg, 连续 6 d), 以 1 U/kg 垂体后叶素(Pit)诱导大鼠心肌缺血, 记录尾 iv Pit 前及注射后 5, 15, 30 s 和 2, 5, 10 min 大鼠心电图变化; 显微镜观察心肌细胞形态学变化及测定不同时间点培养液中乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)和 α -羟丁酸脱氢酶(α -HBDH)的活性。结果 葛根素口服制剂 ig 给药对心肌缺血大鼠的心电图 T 波、P-R 间期、Q-T 间期变化有明显的改善; 能对抗缺氧状态下离体新生大鼠心肌细胞形态学和酶学的异常变化。结论 葛根素口服制剂对缺氧大鼠心肌细胞有保护作用。

关键词: 葛根素口服制剂; 心肌缺血; 保护作用

中图分类号: R 286.2 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)12-1104-04

Protective effect of Puerarin Oral Formulation on myocardial ischemia in rats and on cardiomyocytes of neonatal rats during hypoxia

SONG Hao-liang^{1,2}, CHEN Shi-lin^{1,4}, MEI Xue-ren³, YANG Da-jian¹, HUANG Meng-yu¹,
LIU Xing-xian¹, HUANG Guo-jun², Albert S C Chan¹, Kevin Xu H X⁵, Edmund T Y Lee⁵

(1. Hong Kong Polytechnic University, Hung Hom, China; 2. Chengdu University of TCM, Chengdu 610075, China; 3. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China; 4. Institute of Medicinal Plants, CAMS & PUMC, Beijing 100094, China; 5. Hong Kong Jockeyclub Institute of Chinese Medicine Limited, Kowloon, China)

Abstract: **Object** To study the protective effect of Puerarin Oral Formulation (POF) on myocardial ischemia in rats and on cardiomyocytes of neonatal rats during hypoxia. **Methods** The experimental rats were randomly divided into the control group, the positive group (iv 0.033 5 g/kg Puerarin Injection before myocardial ischemia) and two POF groups (ig 0.8, 0.4 g/kg for 6 days continually), myocardial ischemia rats were induced by posterior pituitary Pit injection. The normal ECG and the changed ECG of rats at 5, 15, 30 s, 2, 5, 10 min after giving Pit were recorded; The changes of cardiomyocytes form of neonatal rats in all groups were observed with microscope and the activity of LDH, CK, α -HBDH in cell culture medium were assayed. **Results** Compared with the ECG of rats in control group, T-wave, P-R and Q-T of ECG of rats in the treatment groups had significant difference; The activity of LDH, CK, α -HBDH were inhibited by POF. **Conclusion** Myocardial ischemia caused by Pit in rats could be inhibited by POF. It shows that POF has protective effect on cardiomyocytes of neonatal rats during hypoxia.

Key words: Puerarin Oral Formulation (POF); myocardial ischemia; protective effect

葛根素是葛根的主要成分之一,在药品和保健品中应用广泛,尤其在冠心病、心绞痛、心肌梗死、视网膜动脉静脉阻塞、突发性耳聋等方面疗效显著^[1]。临床上以葛根素注射剂应用为多,口服制剂较少,本实验研究了葛根素口服制剂抗垂体后叶素(Pit)致大鼠心肌缺血作用及其对心肌细胞的保护作用。

1 材料

1.1 药品与试剂: 葛根素口服制剂(葛根素原料纯度 $\geq 98\%$),制剂葛根素含量 60%,香港理工大学现代中药研究所中药分析室提供,批号 030220;葛根素注射液(100 mg/支),益侨(湖南)制药有限公司生产,批号 20020109;垂体后叶素(Pit, 6 U/mL),

* 收稿日期: 2003-06-02

作者简介: 宋浩亮(1972—),男,博士,现在香港理工大学从事新药研发工作,主要研究方向为心血管系统新药的药理及其作用机制研究。Tel: (0755) 26737465 E-mail: songhaoliang@sina.com

* 通讯作者: Tel: (0852) 27665607 E-mail: beslechan@inet.polyu.edu.hk

南京新天生物化学制药有限公司生产,批号 20020601; DMEM 培养液 (Gibco); PBS 液(自制); 0.25% 的胰蛋白酶-EDTA (Sigma); 胎牛血清 (上海赛达生物科技有限公司生产); 乳酸脱氢酶 (LDH) 试剂盒、肌酸激酶 (CK) 试剂盒和 α -羟丁酸脱氢酶 (α -HBDH) 试剂盒 (中生北控生物科技股份有限公司生产)。

1.2 动物: SD 大鼠, SPF 级, 体重 (200±20) g, 雌雄各半; 出生后 0~4 d 的 SD 大鼠, SPF 级, 雌雄兼用。动物及饲料由广州中医药大学实验动物中心提供, 动物质量合格证号: 粤检证字第 2002A005 号。

1.3 仪器: RM 6240 生理记录仪 (成都仪器厂); Leica 显微镜 (德国); SHED LAB CO₂培养箱 (美国); ESCO 超净工作台 (美国)。

2 方法与结果

2.1 葛根素口服制剂抗心肌缺血作用: 选取 SPF 级 SD 大鼠 40 只, 体重 (200±20) g, 雌雄各半, 随机分 4 组, 每组 10 只。空白对照组, ig 生理盐水 1

mL/100 g; 阳性对照组, 尾 iv 葛根素注射液 0.0335 g/kg; 葛根素口服制剂高、低剂量组, 分别 ig 0.8, 0.4 g/kg 葛根素口服制剂, 给药体积 1 mL/100 g。空白对照组和葛根素口服制剂组预先连续给药 5 d, 第 6 天给药后 1 h, 以 3% 戊巴比妥钠 40 mg/kg ip 麻醉大鼠后, 连接 II 导联电极, 先描记正常心电图, 待稳定后, 尾 iv Pit 1 U/kg, 立刻记录心电图, 连续描记 30 min^[2~4]。阳性对照组尾 iv 葛根素注射液后, 以相同方法造模、记录, 结果见表 1~3。

表 1 结果表明葛根素口服制剂有抗 Pit 的作用, 可使 iv Pit 后 15, 30 s 和 2, 5 min 的 T 波下降 (造模后 T 波值减去造模前 T 波值), 与对照组相比差异非常显著。

表 2 显示, 葛根素口服制剂可使 iv Pit 后 15 s 的 P-R 间期变化值 (造模后 P-R 间期值减去造模前 P-R 间期值) 减小, 与对照组相比, 差异显著, iv Pit 后 30 s 和 2, 5, 10 min 的 P-R 间期变化值显著减小, 差异非常显著。

表 1 葛根素口服制剂对 Pit 致心肌缺血大鼠 T 波的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 1 Effect of POF on T-wave of myocardial ischemia in rats caused by Pit ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组 别	剂 量 $/(g\cdot kg^{-1})$	T 波幅度/ μV					
		5 s	15 s	30 s	2 min	5 min	10 min
对照	-	15.29±6.79	120.09±39.98	56.41±35.56	78.11±39.28	75.62±29.33	12.68±7.09
葛根素注射液	0.0335	18.06±10.09	9.82±7.59**	19.08±14.44**	19.01±8.62**	9.69±6.58**	16.62±8.31
葛根素口服制剂	0.8	11.67±10.33	22.54±17.01**	19.45±10.62*	16.64±13.89**	15.67±13.21**	11.85±9.72
	0.4	19.23±9.58	20.51±9.39**	17.79±12.65*	20.55±15.04**	17.52±13.32**	14.27±11.09

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group

表 2 葛根素口服制剂对 Pit 致心肌缺血大鼠 P-R 间期的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 2 Effect of POF on P-R of myocardial ischemia in rats caused by Pit ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组 别	剂 量 $/(g\cdot kg^{-1})$	P-R 间期变化/ $(10^{-3}s)$					
		5 s	15 s	30 s	2 min	5 min	10 min
对照	-	1.8±0.7	3.2±1.9	18.5±5.4	16.9±4.6	10.3±2.3	10.2±6.9
葛根素注射液	0.0335	1.3±0.7	1.2±0.8**	1.6±1.1**	1.2±0.9**	1.5±1.2**	1.3±1.1**
葛根素口服制剂	0.8	1.2±0.5	1.4±1.1**	2.2±1.5**	1.7±1.1**	1.5±1.1**	1.8±1.4**
	0.4	1.1±0.8	1.5±1.0*	1.5±1.1**	1.5±0.9**	1.7±1.3**	1.7±1.2**

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group

表 3 葛根素口服制剂对 Pit 致心肌缺血大鼠 Q-T 间期的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 3 Effect of POF on Q-T of myocardial ischemia in rats caused by Pit ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组 别	剂 量 $/(g\cdot kg^{-1})$	Q-T 间期变化/ $(10^{-3}s)$					
		5 s	15 s	30 s	2 min	5 min	10 min
对照	-	4.3±1.1	5.2±1.9	1.5±0.4	2.3±0.6	5.0±2.1	2.0±0.9
葛根素注射液	0.0335	1.6±1.1***	1.7±1.3***	1.6±1.1	1.0±0.9**	1.5±1.2***	1.2±1.1
葛根素口服制剂	0.8	1.5±0.5***	1.3±1.3***	2.0±1.4	1.4±1.1**	1.2±1.1***	1.7±1.4
	0.4	1.1±0.9	1.2±1.0***	1.4±1.2	1.3±0.9**	1.7±1.4***	1.2±0.9

与对照组比较: ** $P<0.01$ *** $P<0.001$

** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs control group

表 3 显示,与对照组相比,葛根素口服制剂可使 iv Pit 后 5, 15 s 和 5 min 的 Q-T 间期变化值(造模后 Q-T 间期值减去造模前 Q-T 间期值)明显减小,差异极显著,iv Pit 后 2 min 的 Q-T 间期变化值减小,差异非常显著。

2. 2 葛根素口服制剂对心肌细胞的保护作用

2. 2. 1 心肌细胞的培养: 无菌条件下剪取 20 只乳鼠心室,清洗去除血液,剪碎成 1 mm³ 的碎块,加入 0. 25% 的胰蛋白酶-EDTA 37 °C 搅拌消化 15 min,离心,收集上清液,继续消化数次,每次消化后收集上清液,以冷 DMEM 培养液终止上清液消化,离心,沉淀加入新的胰蛋白酶进行消化,收集数次上清液以培养液洗净胰蛋白酶,沉淀细胞加入含有 10%

FBS 的 DMEM 培养液,配成 5×10⁵/mL 的细胞悬液分装于培养皿中,放入培养箱培养,24 h 换液,选取生长状态良好的细胞培养 72 h 后进行实验^[5]。

2. 2. 2 分组给药与指标测定: 正常组, 10% FBS 的 DMEM 培养液, 细胞培养箱培养; 模型组, 10% FBS 的 DMEM 培养液, 培养皿放于密闭容器内, 37 °C 保温, 容器内抽空空气, 以干冰和液氮气化的混合气体通入, 造成缺氧状态; 给药组, 培养环境同模型组, 培养液中分别加入葛根素口服制剂 1, 0. 1, 0. 01 g/L。观察心肌细胞形态的变化, 分别在给药后 1, 6, 12, 24 h 测定 CK, LDH 和 α-HBDH 活性。结果见表 4~6。

从表4~6可见,在缺氧状态下,心肌细胞分泌

表 4 葛根素口服制剂对心肌细胞分泌 CK 的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 4 Effect of POF on CK in cell culture medium ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组 别	剂 量 /(g·kg ⁻¹)	CK/(U·L ⁻¹)			
		1 h	6 h	12 h	24 h
对照	—	12. 20±5. 76	20. 05± 6. 39* *	22. 63± 9. 55*	25. 50± 5. 96* *
模型	—	11. 71±8. 30	33. 67±10. 52	40. 69± 8. 16	45. 52± 9. 51
葛根素口服制剂	1	15. 14±7. 63	22. 98±10. 01* *	25. 30±10. 20* *	26. 02±12. 11* *
	0. 1	17. 15±6. 39	22. 63± 9. 06* *	27. 39±10. 06* *	29. 04± 9. 38* *
	0. 01	17. 89±5. 04	23. 12± 8. 69* *	30. 19± 9. 62* *	33. 12± 8. 76* *

与模型组比较: * * $P<0. 01$ (表 5, 6 同)

* * $P<0. 01$ vs model group (Table 5 and Table 6 are same to Table 4)

表 5 葛根素口服制剂对心肌细胞分泌 LDH 的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 5 Effect of POF on LDH in cell culture medium ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组 别	剂 量 /(g·kg ⁻¹)	LDH/(U·L ⁻¹)			
		1 h	6 h	12 h	24 h
对照	—	23. 09±11. 66	29. 28±10. 94* *	39. 05±13. 19* *	46. 15±10. 23* *
模型	—	31. 50±11. 67	45. 58± 9. 36	60. 02±14. 25	71. 62±20. 05
葛根素口服制剂	1	25. 98± 9. 44	26. 28±12. 12* *	35. 09±11. 71* *	43. 71±15. 38* *
	0. 1	27. 01± 8. 46	31. 59±11. 12* *	37. 62±11. 51* *	49. 46±14. 39* *
	0. 01	26. 67±10. 96	31. 91± 8. 73* *	40. 29±15. 62* *	50. 09±10. 72* *

表 6 葛根素口服制剂对心肌细胞分泌 α-HBDH 的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 6 Effect of POF on α-HBDH in cell culture medium ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组 别	剂 量 /(g·kg ⁻¹)	α-HBDH/(U·L ⁻¹)			
		1 h	6 h	12 h	24 h
对照	—	19. 08± 9. 26	23. 26± 9. 09* *	33. 45±10. 01* *	40. 51± 6. 56* *
模型	—	30. 05±12. 33	50. 12±10. 69	59. 11±12. 96	75. 15±11. 62
葛根素口服制剂	1	16. 25± 4. 91	25. 60±10. 58* *	35. 12± 8. 25* *	46. 19±13. 16* *
	0. 1	17. 66± 5. 96	23. 28±10. 44* *	39. 31±12. 55* *	50. 05± 9. 44* *
	0. 01	19. 45±10. 12	27. 88± 9. 08* *	45. 16±13. 60* *	55. 05±10. 71* *

CK, LDH, α-HBDH 增多。显微镜下观察显示心肌细胞发生了明显的形态改变, 表现为胞浆空泡形成, 胞浆颗粒形成, 异形心肌细胞数目增加。而葛根素口服制剂能明显对抗细胞形态的改变和心肌酶的分泌, 对心肌细胞有保护作用。

3 讨论

冠心病、心绞痛主要因血管梗死后造成心肌缺血, 进一步引发心肌细胞损伤, 心电图主要表现为心脏电生理活动的异常变化, 如 T 波升高或倒置、P-R 间期和 Q-T 间期延长、心率减慢以及心肌细胞内酶释放增多。葛根素制剂广泛应用于临床治疗冠心病、心绞痛, 但以注射给药居多, 本实验研究了葛根素口

服制剂的抗心肌缺血作用, 正常状况下, 大鼠在 iv Pit 后, 心电图有明显的变化, 实验中对照组在 iv Pit 后心电图发生明显的变化, 表现为 T 波升高, P-R, Q-T 间期延长, 而葛根素口服制剂在给药 6 d 后, 大鼠 iv Pit 后 T 波变化不明显, 证明葛根素口服制剂有抗心肌缺血作用。通过观察葛根素口服制剂在缺氧条件下对原代培养心肌细胞的作用显示, 缺氧条件下心肌细胞形态发生改变, 胞浆空泡形成, 胞浆颗粒形成, 异形心肌细胞数目增加, 同时心肌细胞分泌 CK, LDH, α -HBDH 明显增多, 给葛根素口服制剂后心肌细胞形态未发生明显改变, CK, LDH, α -HBDH 未见明显增多, 说明该药具有提高大鼠心肌细胞抗缺氧能力, 对心肌细胞有明显的保护作用。

References:

- [1] Song H L, Chen S L. Effect of puerarin on action and oxygen radicals and lipid peroxide in mice suffering from alcohol [J]. *Res Pract Chin Med* (现代中药研究与实践), 2003, 17 (3): 36-37.
- [2] Wang B Y, Li Y K. *Methodology and Technology in Research and Development of New Chinese Materia Medica* (中药新药研制开发技术与方法) [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Publishers, 2001.
- [3] Xu S Y. *Methodology in Pharmacological Experiments* (药理学实验方法学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002.
- [4] Chen Q. *Methodology in Pharmacological Study on Chinese Materia Medica* (中药药理研究方法学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1993.
- [5] David L S, Rodert D G, Leslie A L. *Cell A Laboratory Manual* (细胞实验指南) [M]. Beijing: Science Press, 2001.

Antithrombotic effects of *Veratrum nigrum* var. *ussuriense* alkaloids

HAN Guo-zhu¹, LI Xin-yan¹, LÜ Li¹, LI Wei-ping¹, ZHAO Wei-jie^{*}

(1. Department of Pharmacology, Dalian Medical University, Dalian 116027, China; 2. Department of Chemical Pharmaceutics, Dalian University of Sciences & Technology, Dalian 116027, China)

Abstract: **Object** To investigate antithrombotic effects of *Veratrum nigrum* L. var *ussuriense* Nakai alkaloids (VnA) in rats. **Methods** The electrically induced rat carotid artery thrombosis model was used to examine the antiarterial thrombosis effect of VnA using occlusion time (OT) of carotid artery as pharmacologic index; the stasis-induced inferior vena cava thrombosis model was used to evaluate antivenous thrombosis effect of VnA in terms of thrombosis formation rate and decrease in thrombus dry weight. **Results** The iv administration of VnA (7.2—42.9) $\mu\text{g}/\text{kg}$ to rats resulted in a dose-dependent effect and significant prolongation in OT. VnA at the dose of 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ produced an antiarterial thrombosis effect equal to that of LAS (18.0 mg/kg). Also, a single bolus iv VnA (30 $\mu\text{g}/\text{kg}$) increased OT in a time-dependent manner; the antiarterial thrombosis effect was rapid in onset and lasted at least 80 min, and peaked at 15 min postdosing. VnA (15—45 $\mu\text{g}/\text{kg}$ iv) decreased the thrombus dry weight significantly and dose-dependently. **Conclusion** VnA has powerful inhibitory effects against both arterial and venous thrombosis in rats and acts in a dose- and time-dependent manner. Its effective dose is as low as μg per kg body weight of rats. The finding of the VnA antithrombotic effects reveal a bright future of its R & D.

Key words: thrombosis; *Veratrum nigrum* L. var *ussuriense* Nakai; alkaloid; Lili

乌苏里藜芦碱抗血栓作用的研究

韩国柱¹, 李欣燕¹, 吕莉¹, 李卫平¹, 赵伟杰²

(1. 大连医科大学 药理教研室, 辽宁 大连 116027; 2. 大连理工大学 化学制药系, 辽宁 大连 116027)

摘要: 目的 研究乌苏里藜芦生物碱(VnA)对大鼠的抗血栓作用。方法 分别应用电刺激诱发大鼠颈总动脉血栓形成模型和瘀血诱发下腔静脉血栓形成模型评价VnA的抗动脉、静脉血栓形成作用。结果 大鼠iv 6种不同剂量的VnA(7.2~42.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$)导致血管阻塞时间(OT)显著延长,且具明显的剂量依赖性,VnA 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 产生的抗动脉血栓形成作用与赖氨匹林 18.0 mg/kg 的作用相当。单次iv VnA 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 使OT呈时间依赖性延长。VnA

* 收稿日期: 2003-04-15

基金项目: 辽宁省教育委员会资助项目(20272271)

作者简介: 韩国柱(1943—),男,江苏省泰州市人;大连医科大学药理学教授,主要从事抗血栓药理及药动学研究。

Tel: (0411) 3647531; E-mail: hgzhx2236@sina.com.cn