

(中草药), 2000, 31(2): 150-152.

[3] Xu J H, Zhao R, Ke D R. Anticancer effects of curcumin on human tumor cell lines *in vitro* and the stability of curcumin in water solution [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 1998, 14(5): 415-418.

[4] Li H M, Yan X S, Ming A P, *et al.* The effect of liposome-curcumin on inhibiting Bel-7402 cell proliferation and inducing apoptosis [J]. *Chin J Integr Tradit West Med Liver Dis* (中西医结合肝病杂志), 2005, 15(4): 214-217.

平律复方对大鼠心肌缺血-再灌注心律失常的影响

安 薇¹, 杨 静^{1*}, 张建忠², 汪俊军², 刘茂南²

(1. 武汉大学医学院 药理学系, 湖北 武汉 430071; 2. 武汉市新洲区人民医院, 湖北 武汉 430400)

摘要:目的 研究平律复方对大鼠心肌缺血-再灌注心律失常的影响。方法 采用结扎冠状动脉左前降支 15 min, 再灌注 45 min 造成大鼠心肌缺血-再灌注模型, 监测标准 I 导联心电图变化, 测定心肌细胞膜 Ca²⁺-ATP 酶、Mg²⁺-ATP 酶及 Na⁺, K⁺-ATP 酶的活力, 采用 RP-HPLC 法检测心肌组织 ATP 水平、腺苷酸池 (TAN) 水平和能量负荷值 (EC)。结果 平律复方 (ig, 0.04、0.20、1.00 g/kg) 能有效降低大鼠心肌缺血-再灌注心律失常的发生率, 显著缩短室性心律失常的持续时间, 能对抗缺血-再灌注心肌 ATP 酶活力的异常变化; 各剂量组心肌组织 ATP 水平恢复为正常对照组的 58%、68% 和 86%, TAN 水平和 EC 值比模型对照组分别增加了 25%、49%、66% 和 24%、27%、29%。结论 平律复方具有抗大鼠心肌缺血-再灌注心律失常的作用, 其机制可能与改善心肌组织的能量代谢有关。

关键词:平律复方; 心肌缺血-再灌注; 心律失常; 能量代谢

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)04-0565-04

Effect of Pinglü Formula on arrhythmia of myocardial ischemia-reperfusion in rats

AN Wei¹, YANG Jing¹, ZHANG Jian-zhong², WANG Jun-jun², LIU Mao-nan²

(1. Department of Pharmacology, Medical College of Wuhan University, Wuhan 430071, China;

2. Wuhan Xinzhou People's Hospital, Wuhan 430400, China)

Abstract: Objective To study the effect of Pinglü Formula (PL) on the arrhythmia of myocardial ischemia-reperfusion in rats. **Methods** Rat arrhythmia models were established by occlusion of the LAD coronary artery for 15 min and thereafter reperfusion for 45 min. At the same time, the changes were observed on lead I dynamic ECG. The activities of Ca²⁺-ATPase, Mg²⁺-ATPase, and Na⁺, K⁺-ATPase were determined, respectively. The levels of ATP, total adenine nucleotides (TAN), and energy charge (EC) of the myocardial organized energy state were analyzed by RP-HPLC. **Results** PL (ig 0.04, 0.20, and 1.00 g/kg) showed to decrease the incidence of arrhythmia induced by ischemia-reperfusion, shorten the duration of ventricular arrhythmia and eliminate the incidence of ventricular fibrillation. The activities of Ca²⁺-ATPase, Mg²⁺-ATPase, and Na⁺, K⁺-ATPase were increased by PL. In the PL (0.04, 0.20, and 1.00 g/kg) groups, ATP levels recovered to 58%, 68%, and 86% as compared with normal group, simul-taneously, TAN values were enhanced to 25%, 49%, and 66% and EC values to 24%, 27%, and 29%, respectively. **Conclusion** PL has obvious antiarrhythmic effect on rat, the protective action is related to the improvement of energy metabolism.

Key words: Pinglü Formula (PL); myocardial ischemia-reperfusion; arrhythmia; energy metabolism

心肌缺血-再灌注是一种复杂的病理生理过程, 再灌注心律失常是目前临床冠脉搭桥术、血管成形术及溶栓术等心脏介入性治疗中常见的严重并发

症^[1]。平律复方 (以下简称 PL) 是结合中医理论研制的复方中药制剂, 主要由苦参、豆根、黄芩、麦冬、甘草、五味子、党参、射干等组成, 多年临床实践表

收稿日期: 2005-07-28

基金项目: 湖北省武汉市科技局科学技术计划项目 (Z20036002009)

作者简介: 安 薇 (1980—), 女, 苗族, 湖北恩施土家族苗族自治州人, 硕士研究生, 主要从事分子药理与新药研究。Tel: (027) 68759727

E-mail: weier0713@hotmail.com

* 通讯作者 杨 静 Tel: (027) 68759727 E-mail: yangjingliu@yahoo.com.cn

明, PL 对诊断明确的心律失常患者有较好的疗效, 但其对心肌缺血-再灌注心律失常的影响尚未见报道。本实验采用大鼠心肌缺血-再灌注模型观察 PL 对心肌缺血-再灌注心律失常的作用, 并对作用机制进行了探讨。

1 材料

1.1 实验动物: SPF 级健康 SD 大鼠, 体重 (250±10) g, 雌雄各半, 由武汉大学实验动物中心提供, 合格证号为 SYXK (鄂) 2004-0004。

1.2 药品与试剂: 平律复方 (批号 20040628) 由苦参、豆根、黄芩、麦冬、甘草、五味子、党参、射干等组成。以上药物由中国科学院武汉植物研究所江明喜研究员鉴定, 共同煎煮 3 次, 每次 1 h, 合并煎出液, 滤过, 静置 24 h 后取上清液, 浓缩至含生药 1.2 g/mL, 由武汉市新洲区人民医院药剂科制备, 经 RP-HPLC 法检测, 含苦参碱 2.8 mg/mL、黄芩苷 3.84 mg/mL、异甘草素 0.45 mg/mL。步长稳心颗粒 (批号 20040713), 山东步长制药有限公司产品; ATP 酶检测试剂盒 (批号 20040628), 购自南京建成生物工程研究所; 5'-ATP 二钠盐、5'-ADP 二钠盐和 5'-AMP, Sigma 公司; 苦参碱、黄芩苷和异甘草素对照品由中国药品生物制品检定所提供。

1.3 仪器: ECG—6511 型心电图机, 上海光电医用电子仪器有限公司; DW—2000 型动物人工呼吸机, 上海嘉鹏科技有限公司; 日本岛津 LC—10ATvp 型高效液相色谱仪和 UV—1601 紫外分光光度计。

2 方法

2.1 动物分组及给药: 健康 SD 大鼠 60 只, 随机分为 6 组: 正常组、模型组、PL 小、中、大剂量 (0.04、0.20、1.00 g/kg) 组, 阳性对照组 (步长稳心颗粒 80 mg/kg), ig 给药, 每天 1 次, 连续 5 d。

2.2 心肌缺血-再灌注模型的制备: 参照文献方法^[2,3]制备大鼠心肌缺血-再灌注模型。以 20% 乌拉坦 (1.0 g/kg) ip 麻醉, 切开气管, 接人工呼吸机 (频率每分钟 50 次, 潮气量 1.5 mL/100 g)。于左胸前纵行切开皮肤 3 cm 左右, 分离肌层, 在心尖搏动明显处上方开胸。分离心包, 暴露心脏, 在肺动脉圆锥与左心耳之间找到与左冠状动脉伴行的左心大静脉, 在左心耳下方 2 mm 处用 4/0 无损缝线穿线, 进针深度 1~1.5 mm, 宽 2~3 mm, 采用压管法连同心大静脉一齐结扎冠状动脉左前降支, 同时监测 I 导联心电图 (ECG)。结扎成功的标准为: ST 段抬高, QRS 幅度升高, 左室前壁缺血区紫绀。缺血 15 min 后恢复心脏灌流, 45 min 后取下心脏, 迅速放

入液氮中保存。

2.3 ECG 观察: 缺血-再灌注性心律失常以室性最为多见, 动态监测标准 I 导联 ECG, 记录各组动物室性早搏 (premature ventricular beats, PVB)、室性心动过速 (ventricular tachycardia, VT)、心室颤动 (ventricular fibrillation, VF) 的发生率, 心律失常的持续时间及心率的变化。

2.4 心肌细胞膜 ATP 酶活力分析: ATP 酶活力分析严格按试剂盒说明操作, 测定 Na⁺, K⁺-ATP 酶、Mg²⁺-ATP 酶和 Ca²⁺-ATP 酶活力。

2.5 心肌组织能量代谢水平的检测: 采用 RP-HPLC 法测定。

2.5.1 样品处理^[4,5]: 称取心肌组织 0.2 g, 加入 0.3 mmol/L 高氯酸 2 mL, 冰水浴中迅速制成匀浆, 4 000 r/min、4 °C 离心 10 min。取上清液 1 mL, 用 1 mol/L K₂HPO₄ 0.6 mL 中和至 pH 6.5, 再次以 4 000 r/min、4 °C 离心 10 min, 取上清液, 以 0.45 μm 滤膜滤过, -80 °C 保存。临用时解冻, 吸取 10 μL, 测定 ATP、ADP 和 AMP 的水平。

2.5.2 色谱条件^[6]: SPD—10Avp 型可变波长 UV 检测器; Hypersil C₁₈ 不锈钢色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 100 mmol/L KH₂PO₄-K₂HPO₄ 缓冲液 (pH 6.0); UV 检测波长: 254 nm; 柱温 25 °C; 体积流量: 1.0 mL/min; 进样体积: 10 μL。

2.5.3 腺苷酸池 (total adenine nucleotides, TAN) 及能量负荷值 (energy charge, EC) 的计算: TAN=ATP+ADP+AMP; EC=(ATP+0.5 ADP)/TAN

2.6 统计学处理: 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 11.5 统计软件进行方差分析。

3 结果

3.1 对大鼠心肌缺血-再灌注心律失常的影响: 冠脉结扎 15 min, 解除结扎后各组大鼠均出现心律失常, 包括 PVB、VT、VF, PL 和步长稳心颗粒均能显著缩短心律失常的持续时间, 减慢心率, 有明显的负性频率作用 (表 1 和 2), 且 PL 组的 VF 发生率也明显低于缺血-再灌注模型组 (表 2)。

3.2 心肌细胞膜 ATP 酶活力分析: 与缺血-再灌注模型组比较, PL 小、中、大剂量组的心肌细胞膜 Na⁺, K⁺-ATP 酶活力分别升高了 11%、61%、84%, Mg²⁺-ATP 酶与 Ca²⁺-ATP 酶活力也有升高趋势, 但小剂量和中剂量组与模型组比较差异无显著性 (表 3)。

3.3 对缺血-再灌注心肌组织能量代谢的影响: 模

表 1 PL 对心肌缺血-再灌注大鼠心率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 Effect of PL on heart rate of myocardial ischemia-reperfusion rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ (g · kg ⁻¹)	心率/(次 · min ⁻¹)		
		缺血再灌前	缺血再灌后	心率变化
模型	—	381 ± 18	477 ± 19	80 ± 16
PL	0.04	402 ± 49	462 ± 25	71 ± 38
	0.20	383 ± 10	428 ± 42	57 ± 28*
	1.00	427 ± 25	469 ± 34	43 ± 23**
步长稳心颗粒	0.08	418 ± 23	474 ± 15	55 ± 24**

与模型组比较: *P<0.05 **P<0.01

*P<0.05 **P<0.01 vs model group

表 2 PL 对心肌缺血-再灌注大鼠心律失常的影响 (n=10)

Table 2 Effect of PL on arrhythmia of myocardial ischemia-reperfusion rats (n=10)

组别	剂量/ (g · kg ⁻¹)	心律失常发生率/%			心律失常持续 时间/min
		PVB	VT	VF	
模型	—	100	80	80	3.27 ± 1.07
PL	0.04	60*	60	50	2.25 ± 0.96*
	0.20	40**	30	10**	1.83 ± 1.03*
	1.00	30**	10**	0***	0.33 ± 0.58**
步长稳心颗粒	0.08	40**	30	0***	1.81 ± 1.55*

与模型组比较: *P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001

*P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001 vs model group

表 4 PL 对心肌缺血-再灌注大鼠心肌能量代谢的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 4 Effect of PL on myocardial energy state in myocardial ischemia-reperfusion rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ (g · kg ⁻¹)	心肌组织能量代谢指标/($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$)				
		ATP	ADP	AMP	TAN	EC
正常	—	2.63 ± 0.31	2.75 ± 0.36	0.92 ± 0.12	6.31 ± 0.79	0.67 ± 0.03
模型	—	1.05 ± 0.13 $\Delta\Delta\Delta$	1.31 ± 0.42	0.66 ± 0.25	3.01 ± 0.81 $\Delta\Delta\Delta$	0.49 ± 0.01 $\Delta\Delta\Delta$
PL	0.04	1.52 ± 0.24**	1.61 ± 0.32	0.54 ± 0.10	3.76 ± 0.05**	0.63 ± 0.01**
	0.20	1.79 ± 0.20***	1.85 ± 0.08	0.69 ± 0.25	4.47 ± 0.20***	0.65 ± 0.02***
	1.00	2.27 ± 0.35***	2.06 ± 0.23	0.69 ± 0.13	5.01 ± 0.45***	0.66 ± 0.04***
步长稳心颗粒	0.08	1.83 ± 0.15***	1.70 ± 0.11	0.54 ± 0.15	4.21 ± 0.09**	0.66 ± 0.03**

与正常组比较: $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$; 与模型组比较: **P<0.01 ***P<0.001

$\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ vs normal group; **P<0.01 ***P<0.001 vs model group

表 3 PL 对心肌缺血-再灌注大鼠心肌细胞膜 ATP 酶活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 3 Effect of PL on activities of ATPase in myocardial cell membrane of myocardial ischemia-reperfusion rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ (g · kg ⁻¹)	酶活力/(mmol pi · mg ⁻¹ · h ⁻¹)		
		Na ⁺ , K ⁺ -ATP 酶	Mg ²⁺ -ATP 酶	Ca ²⁺ -ATP 酶
正常	—	19.55 ± 3.14	17.54 ± 5.12	17.66 ± 4.88
模型	—	7.45 ± 0.93 $\Delta\Delta\Delta$	10.28 ± 2.32 $\Delta\Delta\Delta$	10.42 ± 1.94 $\Delta\Delta\Delta$
PL	0.04	8.28 ± 2.27**	10.16 ± 2.83	8.01 ± 0.95
	0.20	12.05 ± 3.84**	11.35 ± 2.59	10.13 ± 1.52
	1.00	13.26 ± 2.83***	13.85 ± 2.39**	13.86 ± 2.32**
步长稳心颗粒	0.08	12.99 ± 3.27***	14.17 ± 1.69**	13.15 ± 2.43*

与正常组比较: $\Delta\Delta\Delta P < 0.01$ $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$

与模型组比较: *P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001

$\Delta\Delta\Delta P < 0.01$ $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ vs normal group

*P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001 vs model group

型组出现了明显的能量代谢障碍, ATP、TAN 水平和 EC 值与正常组相比分别下降了 75%、38% 和 53%。PL 小、中、大剂量组与模型组相比 TAN 水平分别增加了 28%、43%、45%, EC 值分别增加了 41%、76%、90%, ATP 水平分别恢复为正常组的 55%、75%、83% (表 4)。

4 讨论

心律失常是心脏病致死的主要原因之一, 目前临床上尚缺乏理想的治疗药物。因此, 积极寻找疗效高、毒性低的抗心律失常药物具有重要的理论及实际意义。多年来, 应用传统化学药如洋地黄等有一定疗效, 但因其治疗量与中毒量接近, 以及个体的差异性, 容易导致新的心律失常, 甚至心脏骤停, 因此, 其临床应用仍存在不少顾虑。中药抗心律失常具有较好的临床疗效, 而且普遍存在毒性低、副作用小等特点, 所以其研究开发已逐步为人们所重视。平律复方 (PL) 由苦参、豆根、黄芩、麦冬、甘草、五味子、党参等组成, 文献报道, 党参与苦参益气养心、清热燥湿, 二药合用有调脉律和抗心律失常的功效^[7,8]; 五味子

收敛心气, 安神镇静; 甘草补益心气, 调和诸药, 也具有抗心律失常的作用。本研究结果显示, PL 可减少心肌缺血-再灌注心律失常的发生, 缩短其持续时间, 提示 PL 对心肌缺血-再灌注心律失常有明显的保护作用。

心肌缺血-再灌注损伤是临床上常见的病理生理过程, 其发病机制与能量代谢障碍、自由基堆积以及钙离子超载有关。心肌细胞的能量代谢是心脏活动的物质基础, 心肌缺血-再灌注损伤发生的重要原因之一就在于能量供应不足。ATP 酶依靠水解 ATP 而获得能量, ATP 对于维持 ATP 酶活性, 继而调节细胞内外离子梯度, 维持细胞的兴奋性和传导性等功能至关重要^[9]。本实验结果表明, 心肌缺

血-再灌注时高能磷酸物质生成严重不足,心肌组织 ATP 水平较正常时降低了 60%,TAN 水平仅达到正常组的 48%,Na⁺,K⁺-ATP 酶、Mg²⁺-ATP 酶、Ca²⁺-ATP 酶活力均不同程度下降,而 PL 各剂量组心肌组织 ATP、TAN 水平和能量负荷值 (EC) 均显著高于模型组,此结果提示 PL 可能通过减慢能量物质的分解,改善心肌有氧代谢而发挥抗心肌缺血-再灌注心律失常的作用。

References:

[1] Du G H, Qiu Y, Zhang J T. Protective effect of salvianolic acid A on ischemia-reperfusion induced injury in isolated rat heart [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1995, 30(10): 731-735.

[2] Cheng S Y, Zhao D H, Guo S, et al. Protective effect of 1-cinnamyl-4-(2, 3, 4-trimethoxybenzyl)-tetrahydropyrazine hydrochloride on arrhythmia induced by ischemia-reperfusion in rat [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中国药理学与毒理学杂志), 1996, 10(1): 42-44.

[3] Lei X L, Zhang R P, Dong X F, et al. Protective effect of Yunnan folk medicine *Rhododryum roseum* on experimental myocardial ischemia of rat [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中

草药), 2001, 32(12): 1103-1106.

[4] Kou Y L, He C Y, Liu Z M, et al. Application of high-performance liquid chromatography (HPLC) in the determination of ATP, ADP, and AMP in cardiac muscle [J]. *West China Med J* (华西医学), 2000, 15(3): 295-296.

[5] Hu B, Sun S G, Mei G W, et al. Protective effects on *Ginkgo biloba* extract on rats during cerebral ischemia-reperfusion [J]. *Natl Med J China* (中华医学杂志), 2002, 115(9): 1316-1320.

[6] Lu F, Lin P Y, Zhang N, et al. Optimization of HPLC conditions in determining the adenosine phosphate in cardiac muscle [J]. *J Pharm Pract* (药物实践杂志), 2001, 19(6): 350-351.

[7] Zhang Y, Wang M Z, Huang Q F, et al. The effect of Baoxin Pills on arrhythmia induced by ischemia and reperfusion in rats [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 1998, 6(18): 290-292.

[8] Huang C Y, Xie S R, Yang J X, et al. Anti-arrhythmic effect of water extract liquid of *Glycyrrhiza uralensis* [J]. *J Dalian Med Univ* (大连医科大学学报), 2003, 25(1): 13-15.

[9] Wan F S, Zhao X M, Liu B, et al. Protective effect of liqstrazin on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *Chin J Clin Pharm Ther* (中国临床药理学与治疗学杂志), 1998, 3(3): 184-186.

雷公藤甲素对健康人外周血单个核细胞分泌 TNF-α 的抑制作用与 TNF-α 基因多态性的关系

涂胜豪, 陈红波, 盛冬云, 胡永红, 刘沛霖

(华中科技大学同济医学院附属同济医院 中西医结合科, 湖北 武汉 430030)

摘要:目的 探讨雷公藤甲素对外周血单个核细胞 (PBMC) 分泌肿瘤坏死因子-α (TNF-α) 的抑制作用与 TNF-α 基因多态性之间的关系。方法 采用等位基因特异引物 PCR 法对健康人 TNF-α 基因启动子区-308 位点基因多态性进行检测, ELISA 法检测 TNF-α 的量。结果 TNF-α-308 非 G/G 纯合子基因型健康志愿者 PBMC 经脂多糖 (LPS) 刺激后 TNF-α 的分泌量明显较 TNF-α-308 G/G 纯合子基因型的志愿者高; 雷公藤甲素能够抑制 TNF-α-308 G/G 纯合子基因型健康志愿者 PBMC 分泌 TNF-α, 而对 TNF-α-308 非 G/G 纯合子基因型健康志愿者 PBMC 分泌 TNF-α 没有明显的抑制作用。结论 雷公藤甲素抑制外周血单个核细胞分泌 TNF-α 的量与 TNF-α 基因多态性有关。

关键词: 肿瘤坏死因子-α (TNF-α); 基因多态性; 雷公藤甲素; 外周血单个核细胞

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2006)04-0568-04

Relationship between inhibition of triptolide on TNF-α production from peripheral blood mononuclear cells in healthy humans and TNF-α gene polymorphism

TU Sheng-hao, CHEN Hong-bo, SHENG Dong-yun, HU Yong-hong, LIU Pei-lin

(Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Tongji Hospital Affiliated Tongji Medical College, China-Central University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Key words: tumor necrosis factor-α (TNF-α); gene polymorphism; triptolide; peripheral blood mononuclear cells (PBMC)

收稿日期: 2005-08-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (90209049)

作者简介: 涂胜豪 (1965-), 男, 湖北武汉人, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事中西医结合治疗风湿病研究。

Tel: (027) 83663379 E-mail: shtu@tjh.tjmu.edu.cn