回心草心脏保护作用的活性部位筛选

王东晓, 刘屏*, 王波, 戴畅, 王中孝, 汪进良, 陈桂芸

(中国人民解放军总医院 临床药理研究室, 北京 100853)

摘要:目的 探讨回心草各极性部位抗心律失常、抗心肌缺血及耐缺氧作用, 初步筛选其活性部位。方法 采用导联生理仪观察回心草不同极性部位对氯仿诱发小鼠室颤的作用; 并采用常压耐缺氧、特异性心肌缺血、缺氧及小鼠断头模型, 观察回心草各部位对小鼠存活时间的影响。结果 回心草醋酸乙酯相低剂量和正丁醇相低剂量均可显著降低氯仿诱发小鼠室颤的发生率、延长心律失常出现时间; 还可明显延长小鼠常压耐缺氧存活时间, 并可使特异性心肌缺血、缺氧小鼠存活时间显著增加, 其中醋酸乙酯相各剂量还可显著延长断头小鼠张口动作持续时间。结论 回心草可提高小鼠耐缺氧能力, 具有明显的抗心律失常、抗心肌缺血作用, 其 95% 乙醇提取物的醋酸乙酯及正丁醇部分可能是有效活性部位。

关键词: 回心草; 心肌缺血; 心律失常

中图分类号: R285.51

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)10-1536-04

Screening of active fraction on heart protection from *Rhodobryum roseum*

WANG Dong-xiao, LIU Ping, WANG Bo, DAI Chang, WANG Zhong-xiao,

WANG Jin-liang, CHEN Gui-yun

(Research Institute for Clinical Pharmacology, General Hospital of People's Liberation Army, Beijing 100853, China)

Key words: *Rhodobryum roseum* (Hedw.) Limpr.; myocardial ischemia; arrhythmia

真藓科植物大叶藓 *Rhodobryum roseum* (Hedw.) Limpr. 又名回心草, 是华北、西北、西南多民族共用的传统草药, 民间广泛用于治疗心脏病。回心草用于民间百年甚至几百年, 治疗心痛、心悸、心慌等症状的心脏病, 且未见明显不良反应。对其药理研究显示, 回心草能增强麻醉犬冠脉血流量, 增加急性心肌梗死缺血区侧支循环的血流, 对实验性大鼠心肌缺血具有显著的保护作用^[1,2], 但未见有对其药理作用与其化学成分间关系的研究报道, 其主要的活性成分及其药理作用机制也不清楚。

前期研究表明回心草 95% 乙醇提取液可有效减少急性心肌缺血大鼠心电图 S-T 段的下移, 显著降低其血清 LDH、CK 水平, 提高 SOD 活性, 表现出较好的抗心肌缺血作用。因此, 本研究采用 95% 乙醇提取回心草, 进一步分离各极性部位, 观察它们对氯仿诱发小鼠室颤及耐缺氧的作用, 以确定其有效的活性部位, 为深入研究回心草的有效成分及其药理作用间的关系提供依据。

1 材料与方

1.1 药品及试剂: 回心草, 产于云南省保山地区龙

陵县, 经中国科学院昆明植物研究所鉴定为大叶藓 *R. roseum* (Hedw.) Limpr.。以 95% 乙醇回流提取, 经旋转蒸发制成浸膏, 并将总提液分别用石油醚 (PE)、醋酸乙酯 (EA)、正丁醇 (N-B)、水萃取得到石油醚萃取液 (PE 相)、醋酸乙酯萃取液 (EA 相)、正丁醇萃取液 (N-B 相)、水萃取液 (水相), 4℃ 保存备用。异丙基肾上腺素 (ISO, 上海禾丰制药有限公司, 批号 030601)。盐酸维拉帕米注射液 (每支 5 mL, 上海和丰制药有限公司产品, 批号 030101)、心得安 (每片 10 mg) 由中国人民解放军总医院第一临床药局提供; 10% 水合氯醛、氯仿由解放军总医院药材处制剂室提供。

1.2 仪器: RM6240C 型多道生理信号采集处理系统 (成都仪器厂)。

1.3 方法

1.3.1 分组及给药: 健康昆明种小鼠, 体重 (35±4) g, 雄性 (用于抗心律失常实验)、体重 18~22 g, 雌性 (用于耐缺氧实验), 均由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供, SCX-(军)2002-001。将小鼠随机分为: 正常对照组 (NS 0.2 mL)、

收稿日期: 2006-03-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30271679)

作者简介: 王东晓 (1975-), 女, 山东泰安市人, 助理研究员, 硕士, 主要从事中药化学和中药药理研究。

Tel: (010) 66936678 E-mail: baixiao301@sina.com

* 通讯作者 刘屏 E-mail: liuping126@126.com

模型组 (NS 0.2 mL)、水相低剂量 (0.126 8 g/kg) 组、水相高剂量 (0.507 2 g/kg) 组、EA 相低剂量 (0.040 3 g/kg) 组、EA 相高剂量 (0.161 3 g/kg) 组、N-B 相低剂量 (0.061 2 g/kg) 组、N-B 相高剂量 (0.244 8 g/kg) 组、PE 相低剂量 (0.026 g/kg) 组、PE 相高剂量 (0.104 g/kg) 组 (各组高剂量相当于生药 13.00 g/g, 低剂量相当于生药 3.25 g/g)、维拉帕米组 (1 mg/kg)、心得安组 (30 mg/kg); 每组 10 只, ig 给予各实验药液, 每只 0.2 mL 或等量 NS, 每天 1 次, 共 7 d。

1.3.2 室颤发生率测定: 末次给药后 0.5 h, 用 10% 水合氯醛 (3 mL/kg) 麻醉动物, 仰卧位固定。逐一将小鼠的头部放入含有 3 mL 氯仿棉球 (以后每换一只小鼠追加 1 mL 氯仿) 的 150 mL 锥形瓶中, 通过 RM6240C 型多道生理信号采集处理系统记录 II 导联心电图, 至呼吸停止立即取出, 直接开胸, 肉眼观察心脏活动节律, 记录各组心室纤颤发生的动物数。

1.3.3 常压耐缺氧: 末次给药后 1 h, 逐一将小鼠置 125 mL 广口瓶中, 内置 10 g 钠石灰, 密封瓶盖, 记录小鼠窒息死亡的时间。

1.3.4 断头小鼠喘息时间测定: 末次给药后 1 h, 用大剪刀在耳下部将小鼠逐只快速断头, 立即用秒表记录小鼠断头后至张口喘气停止时间。

1.3.5 特异性心肌缺血、缺氧: 末次给药后 0.5 h, 除正常对照组外, 其他各组小鼠 sc ISO 15 mg/kg, 15 min 后, 逐一将小鼠置 125 mL 广口瓶中, 内置 10 g 钠石灰, 密封瓶盖, 记录小鼠窒息死亡的时间。

1.4 统计学处理: 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 或百分数表示, 利用 STATA 软件, 各组间数据采用 χ^2 检验、方差分析及成组 t 检验判断其统计学意义。

2 结果

2.1 回心草各部位对氯仿诱发小鼠室颤的影响: 见表 1。维拉帕米、心得安、EA 相高与低剂量及 N-B 相低剂量均可降低氯仿诱发的小鼠室颤发生率, 并可延长小鼠心律失常的出现时间, 其中 N-B 相低剂量及 EA 相低剂量作用与阳性对照药维拉帕米、心得安作用相当, 与对照组相比差异均有显著性 ($P < 0.05$), 表现出较好的抗心律失常的作用; EA 相高剂量组的室颤发生率最低, 而心律失常出现时间略早于心得安组, 但两组之间差异无显著性。

2.2 回心草各部位对小鼠常压耐缺氧的影响: 见表 2。EA 相低剂量和 N-B 相低剂量组小鼠的存活时间分别为 (20.22 ± 2.22)、(20.49 ± 2.49) min, 与

正常对照组 (17.67 ± 2.62) min 比较显著延长 ($P < 0.05$), 而其他各实验组未见显著作用。

表 1 回心草各极性部位对氯仿诱发小鼠室颤的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 Effects of polarity fractions from *R. roseum* on ventricular fibrillation induced by chloroform in mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(g · kg ⁻¹)	心律失常出现时间/s	室颤发生率/%
正常对照	—	34.40 ± 8.61	100
维拉帕米	0.001	43.00 ± 5.79*	40
心得安	0.03	46.20 ± 7.53*	60
水相	0.126 8	33.15 ± 3.25	80
	0.507 2	31.98 ± 9.87	70
EA 相	0.040 3	40.75 ± 2.87*	60
	0.161 3	43.00 ± 5.70*	20
N-B 相	0.061 2	40.37 ± 2.32*	60
	0.244 8	32.65 ± 9.65	70
PE 相	0.026	34.26 ± 5.96	90
	0.104	32.48 ± 3.91	80

与正常对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs normal control group

表 2 回心草各极性部位对常压耐缺氧小鼠存活时间的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Effects of polarity fractions from *R. roseum* on survival time of hypoxia-resistance mice under normal pressure ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(g · kg ⁻¹)	存活时间/min
正常对照	—	17.67 ± 2.62
心得安	0.03	20.90 ± 2.52**
水相	0.126 8	18.37 ± 3.04
	0.507 2	17.54 ± 2.36
EA 相	0.040 3	20.22 ± 2.22*
	0.161 3	18.78 ± 3.12
N-B 相	0.061 2	20.49 ± 2.49*
	0.244 8	18.47 ± 2.06
PE 相	0.026	17.87 ± 2.15
	0.104	17.63 ± 2.56

与正常对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

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

2.3 回心草对小鼠脑缺血、缺氧的影响: 见表 3。给予回心草各萃取相后, 水相、EA 相、N-B 相均可使小鼠断头后张口动作持续时间有所延长, 与对照组比较, EA 相各剂量组差异显著 ($P < 0.05$), 提示回心草 EA 萃取物中的有效成分对脑缺血、缺氧有改善作用。

2.4 回心草各部位对小鼠特异性心肌缺血、缺氧的影响: 结果见表 4。可见模型组小鼠给予 ISO 后, 存活时间较正常对照组明显缩短, 而 ig 给予回心草各极性部位后, EA 相低剂量和 N-B 相低剂量可使其存活时间显著延长 ($P < 0.05$), 与心得安作用相当。

表 3 回心草各极性部位对断头小鼠喘息时间的影响
($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 3 Effects of polarity fractions from *R. roseum* on breathing time of decapitated mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	小鼠张口动作持续时间/s
正常对照	—	19.80±1.14
水相	0.126 8	20.38±1.69
	0.507 2	20.25±1.83
EA 相	0.040 3	20.80±0.98*
	0.161 3	21.20±0.79*
N-B 相	0.061 2	20.78±1.30
	0.244 8	20.80±1.14
PE 相	0.026	19.55±0.21
	0.104	18.50±1.08

与正常对照组比较: * $P<0.05$

* $P<0.05$ vs normal control group

表 4 回心草各极性部位对特异性心肌缺氧小鼠存活时间的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 4 Effects of polarity fractions from *R. roseum* on survival time of specific myocardial hypoxia mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	存活时间/min
正常对照	—	18.38±2.87**
模型	—	14.43±2.25
心得安	0.03	16.54±1.63*
水相	0.126 8	15.25±3.13
	0.507 2	14.98±2.88
EA 相	0.040 3	18.20±5.12*
	0.161 3	14.86±1.92
N-B 相	0.061 2	17.78±3.96*
	0.244 8	14.65±1.59
PE 相	0.026	15.14±3.14
	0.104	14:51±1.20

与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

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

3 讨论

回心草是我国多民族共用的传统草药,常单用或同大枣、胡椒、猪心等配伍,用水煎煮成汤剂服用治疗心脏病(心痛、心慌、心悸、气短等)。有报道认为回心草制剂及回心草复方制剂可减慢心率,明显改善心脏病如冠心病、心绞痛患者的临床症状,其改善心肌缺血、胸闷症状的作用优于其他同类中药制剂,疗效确切^[3]。但目前有关回心草药理作用与其化学成分间关系、其主要的活性成分及其药理作用机制还不清楚。本研究在前期研究的基础上,观察回心草各极性部位对小鼠心律失常、心肌缺血及耐缺氧能力的作用,确定其活性部位,为进一步发现活性单体奠定基础。

氯仿的致室颤机制可能为促进植物神经释放递质或促进肾上腺髓质释放去甲肾上腺素和肾上腺

素,增加机体对肾上腺素的敏感性;还可不规则地延长心室不应期,使复极不均一性增加,从而导致室颤发生^[4,5];另有文献报道氯仿诱发心律失常与 Ca²⁺内流有关^[6],且已知的钙拮抗剂能有效地对抗氯仿诱发的心律失常。本实验中 Ca²⁺拮抗剂——维拉帕米、β-受体阻滞剂——心得安均可有效对抗氯仿诱发小鼠室颤的发生,与上述研究结果相符。回心草 95% 醇提液的 EA 和 N-B 萃取部位也可显著延长小鼠心律失常出现时间、降低室颤发生率($P<0.05$),与维拉帕米、心得安作用相当,提示回心草具有明显的抗心律失常作用,该作用可能与其醋酸乙酯及正丁醇部位的活性成分影响肾上腺素与心肌细胞膜上 β-受体的结合、减少心肌耗氧和减少 Ca²⁺内流有关。

缺氧对机体是一种劣性刺激。小鼠在密闭容器中受缺氧因素损害,主要表现为心和脑缺氧。由于常压耐缺氧为非特异性缺氧,本研究中回心草 EA 相低剂量和 N-B 相低剂量可显著延长小鼠常压耐缺氧存活时间,表明回心草可通过提高心脑的血氧利用率、降低心脑耗氧量,明显改善脑缺氧和/或心肌缺血、缺氧。

ISO 可通过激活心肌 β-受体而增加心肌耗氧,在对抗 ISO 所致的心肌缺血实验中,突出了对心脏的特异性。本实验结果显示 EA 相低剂量和 N-B 相低剂量可使小鼠存活时间明显增加,证实了回心草 EA 和 N-B 部位对心肌缺血确有改善作用。小鼠断头后,脑供血终止,在短时间内脑中原有的血液和营养物质尚能使脑功能维持短暂时间,表现为有规律地张口喘气。以喘气时间为指标,可观察药物对脑缺血、缺氧的保护作用^[7]。回心草 EA 部位能显著延长小鼠的喘息时间,表明 EA 部位能减少脑耗氧,对脑缺血、缺氧亦有一定的保护作用。

综上所述,回心草 95% 乙醇提取物醋酸乙酯部位(EA 相)和正丁醇部位(N-B 相)可拮抗氯仿所致室颤的发生,延缓心律失常出现时间;显著提高小鼠耐缺氧能力,延长特异性心肌缺血、缺氧小鼠的存活时间,具有明显的抗心律失常、心肌缺血作用,提示回心草的主要活性部位可能是醋酸乙酯和正丁醇部位,但未见有剂量依赖性,值得深入研究。本课题组目前已从回心草醋酸乙酯部位中分离得到了胡椒碱、咖啡酸甲酯、尿嘧啶苷、胡椒酸甲酯等 8 个单体化合物^[8],推测醋酸乙酯活性部位的心脏保护作用可能与其所含各成分阻滞心肌 β-受体有关,但它们的心脏保护活性、最佳作用剂量及具体的分子作

用机制也还有待进一步研究。

References:

[1] Yu Y M. Effect of *Rhodobryum roseum* Limpr on hemorhelology of AMI in dogs [J]. *Chin J Integr Tradit Chin West Med* (中国中西医结合杂志), 1993, 13(11): 672.
 [2] Lei X L, Zhang R P, Dong X F, et al. Protective effect of Yunnan folk medicine *Rhodobryum roseum* on experimental myocardial ischemia of rat [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32(12): 1103-1106.
 [3] Ma Y. The curative effect of *Rhodobryum roseum* on 101 CHD patients [J]. *Shaanxi J Tradit Chin Med* (陕西中医), 1989, 10(6): 256.
 [4] He J C, Liu X, An Y R, et al. Studies on the anti-arrhythmia effect of Xinjiang [J]. *Chin J Tradit Med Sci Technol* (中国中医药科技), 2003, 10(1): 40.
 [5] Pan K Y, Hu J Y, Zhang M. Protective effect of Fried

Glycyrrhizae Decoction on mice arrhythmia caused by chloroform [J]. *Forum Tradit Chin Med* (国医论坛), 2000, 15(4): 42.
 [6] Chen T J, Yang J Y, Zhu L, et al. The effect of Renqing Mangjue capsule against anoxia and arrhythmia [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中药药理学与临床), 2003, 19(2): 40-41.
 [7] Pan Y, Zhang X, Shang W B. Effect of Julyoction of *Fructus Corni Officinalis* and extraction at different locations on breathing time of mice after Julyollation [J]. *J Nanjing Univ Tradit Chin Med: Nat Sci* (南京中医药大学学报:自然科学版), 2002, 18(4): 226-227.
 [8] Wang B, Liu P, Shen Y M, et al. Studies on the chemical constituents from *Rhodobryum roseum* (Hedw) Limpr [J]. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2005, 30(12): 895-897.

葶苈子黄酮对血小板激活因子的拮抗作用

吴伟, 金鸣, 李金荣, 董宁宁

(北京市心肺血管疾病研究所-首都医科大学附属北京安贞医院, 北京 100029)

摘要:目的 研究葶苈子黄酮对血小板激活因子(PAF)诱导的家兔中性粒细胞(PMN)和洗涤家兔血小板(WRP)的聚集及黏附作用的影响。方法 比浊法观察PAF诱导的PMN(或WRP)聚集;PAF诱导已着色PMN(或WRP)黏附,比色法测定此PMN(或WRP)破膜后溶液吸光度,表示其黏附活性。结果 葶苈子黄酮可明显抑制PAF诱导的PMN和WRP聚集及黏附活性的升高($P < 0.05$)。结论 葶苈子黄酮具有拮抗PAF的作用。
关键词:葶苈子黄酮;血小板激活因子(PAF);中性粒细胞

中图分类号:R285.5 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2006)10-1539-03

Antagonistic effect of flavone from *Lepidium apetalum* against platelet activating factor

WU Wei, JIN Ming, LI Jin-rong, DONG Ning-ning

(Beijing Institute of Heart Lung and Blood Vessel Diseases-Beijing Anzhen Hospital
 Affiliated to Capital University of Medical Science, Beijing 100029, China)

Key words: the flavone from *Lepidium apetalum* Willd.; platelet activating factor (PAF); neutrocyte

葶苈子作为常用的止咳平喘药已经使用了上千年,其主要功效为泻肺、平喘、利水、消肿。血小板激活因子(platelet activating factor, PAF)是一活性很强的炎症介质,它由多种细胞合成,并作用于多种细胞膜的受体。据文献报道^[1],PAF可诱导血小板、嗜中性粒细胞活化,增进嗜酸性粒细胞的游走活性,使血管通透性增加,支气管收缩,在迟发型和即发型哮喘的呼吸道炎症反应等病理生理过程中起了重要的介导作用。为了探讨葶苈子止咳平喘的作用机制,本实验观察了葶苈子黄酮影响PAF诱导的家兔中

性粒细胞(PMN)及洗涤的家兔血小板(WRP)聚集和黏附的作用。

1 材料

1.1 动物:新西兰家兔,雄性,体重2.0~3.0 kg,北京富豪实验动物养殖中心,为一级合格动物,合格证号:SCXK(京2000-0019)。

1.2 药品与试剂:葶苈子黄酮(质量分数为72.80%)为北京中医药大学中药生药系赵海誉将北葶苈子(独行菜, *Lepidium apetalum* Willd.)药材研碎后,以70%乙醇热回流提取,大孔树脂除杂

收稿日期:2006-03-02

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30371776)

作者简介:吴伟(1972-),男,助理研究员。Tel: (010) 64456481 E-mail: tailless@tom.com