

四逆汤及不同组方配伍对大鼠心肌缺血影响的对比研究

蒋燕萍, 曹丽梅, 彭伟, 游宇, 刘婷婷, 傅超美*

成都中医药大学药学院 中药资源系统研究与开发利用省部级重点实验室培育基地, 四川 成都 611137

摘要: 目的 研究四逆汤及其不同组方配伍对垂体后叶素(Pit)所致大鼠心肌缺血模型的影响。方法 建立大鼠心肌缺血模型, 观察四逆汤、附子甘草合煎液、附子干姜合煎液、甘草干姜合煎液、附子单煎液、干姜单煎液、甘草单煎液对大鼠心肌梗死范围、乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)、天冬氨酸转氨酶(AST)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、乳酸的影响。结果 四逆汤组、附子甘草组、附子干姜组、附子组能显著减少心肌梗死范围($P < 0.01$)、减少心肌MDA、乳酸释放($P < 0.05, 0.01$)、降低血清LDH、CK、AST水平($P < 0.05, 0.01$); 四逆汤组、附子干姜组能提高心肌SOD活性($P < 0.05$); 四逆汤组能显著提高心肌GSH-Px活性($P < 0.01$); 四逆汤组在心肌LDH水平上低于附子组($P < 0.05$)。结论 对大鼠缺血心肌的保护程度依次为四逆汤组>附子干姜组>附子甘草组>附子组, 从药效的角度揭示了四逆汤配伍的科学性, 体现了四逆汤遣方用药之精准。

关键词: 四逆汤; 组方配伍; 心肌缺血; 乳酸脱氢酶; 超氧化物歧化酶

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2016)04-0630-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.04.017

Comparative study of effects of Sini Decoction before and after compatibilities on experimental myocardial ischemia in rats

JIANG Yan-ping, CAO Li-mei, PENG Wei, YOU Yu, LIU Ting-ting, FU Chao-mei

State Key Laboratory Breeding Base of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources, Pharmacy College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: **Objective** To study the effects of Sini Decoction before and after compatibilities on acute myocardial ischemia rats. **Methods** The model of myocardial ischemia in rats was established by ig Pit. The effects of Sini Decoction, *Aconiti Lateralis Radix Praeparata* (ALRP)-*Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* (GRR) decoction, ALRP-*Zingiberis Rhizoma* (ZR) decoction, ZR-GRR decoction, single ALRP decoction, single ZR decoction and single GRR decoction on the extension of myocardial infarction, lactic dehydrogenase (LDH), creatine kinase (CK), aspartate aminotransferase (AST), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), glutathione peroxidase (GSH-Px), and lactic acid in rats were evaluated. **Results** Sini Decoction, ALRP-GRR decoction, ALRP-ZR decoction, and single ALRP decoction obviously decreased the extension of myocardial infarction ($P < 0.01$), reduced MDA, lactic acid, LDH, CK, and AST ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). Sini Decoction and ALRP-ZR decoction improved SOD activity ($P < 0.05$); Sini Decoction significantly increased GSH-Px activity ($P < 0.01$). The LDH level of Sini Decoction group was lower than that of single ALRP decoction ($P < 0.05$). **Conclusion** Considering various factors, the sequence of the protection of myocardial ischemia in rats is Sini Decoction > ALRP-ZR decoction > ALRP-GRR decoction > single ALRP decoction. It reveals the scientific connotation of the compatibilities of Sini Decoction and accurate action about drug using of Sini Decoction from the perspective of efficacy.

Key words: Sini Decoction; formula compatibilities; myocardial ischemia; lactic dehydrogenase; superoxide dismutase

四逆汤出自张仲景《伤寒论》:“少阴病,脉沉者,急温之,宜四逆汤。”全方由附子、干姜、甘草3味药组成,有温中驱寒、回阳救逆之功,主治阳虚欲脱、冷汗自出、四肢厥逆、下利清谷、脉微欲

绝。现代研究表明,四逆汤对改善心肌缺血-再灌注造成的损伤、治疗心力衰竭、对抗急性缺血性心肌梗死、增强心肌收缩力以及治疗冠心病、心绞痛方面具有良好的疗效^[1-4]。心肌缺血是心脏的血液灌注

收稿日期: 2015-06-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(81373987)

作者简介: 蒋燕萍(1990—),女,硕士在读,研究方向为中药新制剂、新工艺和新技术。Tel: 15828344037 E-mail: jiangyanping0603@126.com

*通信作者 傅超美,男,教授,博士生导师,研究方向为中药新制剂、新工艺和新技术。Tel: (028)61800231 E-mail: chaomeifu@126.com

减少, 导致心脏的供氧减少, 心肌能量代谢异常, 不能支持心脏正常工作的一种病理状态^[5]。本研究基于四逆汤对缺血心肌的保护作用, 以四逆汤及不同组方配伍为研究对象, 对比分析其对大鼠心肌缺血的影响, 以揭示四逆汤组方配伍的科学内涵, 初步探索其作用机制。

1 材料

1.1 仪器

MK3 酶标仪 (Thermo Fisher); MK2 洗板机 (Thermo Fisher); TG16 离心机 (长沙英泰仪器有限公司); DNP-9052 型电热恒温培养箱 (上海精宏实验设备有限公司)。

1.2 试药

复方丹参滴丸 (天津天士力制药股份有限公司, 批号 140513, 每丸 27 mg), 四逆汤 (批号 141222SNT)、附子甘草合煎液 (批号 141222FZGC)、附子干姜合煎液 (批号 141222FZGJ)、甘草干姜合煎液 (批号 141222GCGJ)、附子单煎液 (批号 141222FZ)、干姜单煎液 (批号 141222GJ)、甘草单煎液 (批号 141222GC) 均为实验室自制, 药液质量浓度均为 0.5 g/mL。7 个样品中指标性成分定量测定结果见表 1, 均符合《中国药典》2015 年版规定。

表 1 7 个样品中指标性成分质量分数

Table 1 Contents of index components of seven samples

样品	质量分数/(mg·g ⁻¹)		
	6-姜辣素	甘草酸	单酯型生物碱
四逆汤	4.38	8.52	4.31
附子干姜合煎	2.63	—	0.96
附子甘草合煎	—	11.30	3.41
附子单煎液	—	—	0.54
甘草干姜合煎	4.88	15.58	—
甘草单煎液	—	20.76	—
干姜单煎液	2.44	—	—

1.3 试剂

氯化三苯基四氮唑染料 (TTC), 美国 Sigma 公司; 垂体后叶素 (Pit, 批号 140401), 南京新百药业有限公司; 乳酸脱氢酶 (LDH)、肌酸激酶 (CK)、天冬氨酸转氨酶 (AST)、超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、丙二醛 (MDA)、乳酸试剂盒均由北京雅安达生物技术有限公司提供; 水合氯醛 (成都市科龙化工试剂厂)。

1.4 动物

雄性 SD 大鼠, 体质量 (250±20) g, 雌性 SD

大鼠, 体质量 (230±20) g, 由成都达硕生物科技有限公司提供, 动物合格证号 SCXK (川) 2013-24。

2 方法

2.1 实验分组及给药

适应性饲养后, SD 大鼠随机分为对照组、模型组、阳性组、四逆汤组、附子甘草组、附子干姜组、甘草干姜组、附子组、甘草组、干姜组, 每组 12 只, 雌雄各半。四逆汤组^[6]按 5.0 g/kg ig 给药, 其余各给药组按各药液中药材占四逆汤中药材比例折算给药, 阳性组 ig 给予复方丹参滴丸药液 (0.09 g/kg), 对照组、模型组 ig 蒸馏水。各组给药均 1 次/d, 连续 5 d。期间自由摄食、饮水。

2.2 造模方法^[7]

末次给药后 1 h 各给药组与模型组 ip Pit 15 U/kg, 对照组 ip 等量生理盐水。

2.3 检测指标

2.3.1 心肌梗死范围 造模 1 h 后用 10%水合氯醛 (3.5 mL/kg) ip 麻醉大鼠, 取出心脏, 生理盐水洗净, 剪去心耳, 滤纸吸干, 将心脏切片, 每片厚 1~2 mm。置于 1% TTC 磷酸缓冲液 (pH 7.4) 中, 于 37 °C 恒温培养箱避光染色 10 min。利用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析系统 (美国 Media Cybernetics 公司) 对染色后采集的心肌图像进行两色分割, 计算心肌梗死范围。

2.3.2 心肌 MDA、SOD、GSH-Px、乳酸及血清 LDH、CK、AST 测定 造模 1 h 后对各组大鼠进行股动脉取血并取出心脏。血样进行离心处理, 取上清液, 即为血清样品; 心脏组织在冰浴条件下用玻璃匀浆机制成组织匀浆液, 即为心脏组织样品, 其他具体操作按相关试剂盒说明书进行。

2.4 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 19.0 软件处理, 多组间均数两两比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 对大鼠心肌梗死范围的影响

模型组大鼠心肌梗死范围显著高于对照组 ($P < 0.01$); 四逆汤组、阳性组、附子甘草组、附子干姜组、附子组心肌梗死范围显著低于模型组 ($P < 0.01$); 甘草组、干姜组、甘草干姜组心肌梗死范围与模型组无显著性差异。结果见表 2。

3.2 对大鼠心肌 MDA、SOD、GSH-Px、乳酸的影响

模型组大鼠心肌 MDA、乳酸的量高于对照组 ($P < 0.01$), SOD 活性、GSH-Px 量低于对照组 ($P <$

表2 各组大鼠心肌梗死范围的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)Table 2 Comparison on extension of myocardial infarction of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	心肌梗死范围/%
对照	—	0.00±0.00
模型	—	8.62±1.47 ^{##}
复方丹参滴丸	0.09	3.93±1.03 ^{**}
四逆汤	5.00	3.81±1.62 ^{**▲▲}
附子干姜	3.13	4.74±1.27 ^{**▲▲}
附子甘草	3.75	5.37±1.37 ^{**△}
附子	1.88	6.61±0.50 ^{**△△}
甘草	1.88	8.37±1.00
甘草干姜	3.13	8.21±1.05
干姜	1.25	8.53±1.15

与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{**} $P < 0.01$; 与四逆汤组比较: [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$; 与附子组比较: ^{▲▲} $P < 0.01$, 表4同

^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{**} $P < 0.01$ vs model group; [△] $P < 0.05$

^{△△} $P < 0.01$ vs Sini Decoction group; ^{▲▲} $P < 0.01$ vs Fuzi group, Table 4 is same

0.05); 四逆汤组、阳性组、附子甘草组、附子干姜组、附子组大鼠心肌 MDA、乳酸的量均显著低于模型组 ($P < 0.05$ 、0.01); 四逆汤组、阳性组、附子干姜组能提高模型大鼠心肌 SOD 活性 ($P < 0.05$); 四逆汤组、阳性组能显著提高模型大鼠心肌 GSH-Px 活性 ($P < 0.01$); 甘草组、干姜组、甘草干姜组大鼠心肌 SOD、MDA、GSH-Px 水平与模型组比较无显著性差异。结果见表3。

3.3 对大鼠血清 LDH、CK、AST 水平的影响

模型组大鼠血清 LDH、CK、AST 水平显著高于对照组 ($P < 0.01$); 四逆汤组、阳性组、附子甘草组、附子干姜组、附子组能降低心肌缺血大鼠血清 LDH、CK、AST 水平 ($P < 0.05$ 、0.01); 甘草组、干姜组、甘草干姜组血清 LDH、CK、AST 水平与模型组比较无显著性差异。结果见表4。

3.4 含附子4个组方对大鼠各项指标影响的比较

对表2~4中含附子的4个组方进行组间比较,

表3 各组大鼠心肌 MDA、SOD、GSH-Px、乳酸水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)Table 3 Comparison on levels of MDA, SOD, GSH-Px, and lactic acid in myocardium of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	MDA/(nmol·mL ⁻¹)	SOD/(U·mL ⁻¹)	GSH-Px/(nmol·mL ⁻¹)	乳酸/(ng·L ⁻¹)
对照	—	114.57±40.18	285.86±30.93	1 256.74±450.37	345.75±61.54
模型	—	193.38±28.96 ^{##}	199.46±40.47 [‡]	817.96±235.55 [‡]	530.20±107.42 ^{##}
复方丹参滴丸	0.09	122.97±25.17 ^{**}	274.50±68.72 [*]	1 224.17±355.10 [*]	353.73±98.62 ^{**}
四逆汤	5.00	128.36±37.13 ^{**}	282.57±49.20 [*]	1 283.72±271.82 ^{**}	338.00±87.33 ^{**}
附子干姜	3.13	145.93±36.46 [*]	273.27±75.88 [*]	1 229.39±169.98 [*]	373.20±109.51 [*]
附子甘草	3.75	144.26±34.99 [*]	254.40±48.63	1 152.99±355.10	389.51±50.51 [*]
附子	1.88	144.97±39.35 [*]	247.96±92.86	1 127.53±368.64	394.90±63.97 [*]
甘草干姜	1.88	153.34±39.84	207.68±37.99	882.21±183.55	480.33±103.82
甘草	3.13	152.90±19.94	230.03±36.80	848.51±167.47	521.27±207.17
干姜	1.25	167.38±61.85	207.01±78.68	947.56±170.92	479.04±115.55

与对照组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$, 表4同

[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group, Table 4 is same

表4 各组大鼠血清 LDH、CK、AST 水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)Table 4 Comparison on levels of LDH, CK, and AST in serum of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	LDH/(U·mL ⁻¹)	CK/(U·L ⁻¹)	AST/(IU·L ⁻¹)
对照	—	276.12±41.42	518.04±97.71	124.48±25.81
模型	—	385.16±28.69 ^{##}	784.88±68.77 ^{##}	183.12±20.84 ^{##}
复方丹参滴丸	0.09	285.35±45.92 ^{**}	481.80±108.34 ^{**}	115.42±16.45 ^{**}
四逆汤	5.00	272.20±44.78 ^{**}	463.02±97.49 ^{**}	111.45±36.92 ^{**}
附子干姜	3.13	281.09±45.92 ^{**}	594.96±136.55 [*]	118.76±37.75 ^{**}
附子甘草	3.75	301.46±44.09 ^{**}	596.64±136.21 [*]	126.00±21.94 ^{**}
附子	1.88	328.67±29.86 [△]	605.68±105.46 [*]	123.26±27.71 ^{**}
甘草干姜	1.88	378.17±35.31	652.65±126.44	162.58±22.11
甘草	3.13	368.10±108.60	734.45±194.57	168.30±28.18
干姜	1.25	380.07±31.36	718.19±132.17	164.20±37.74

结果附子组及附子甘草组的大鼠心肌梗死范围显著高于四逆汤组 ($P<0.05$ 、 0.01), 附子干姜组大鼠心肌梗死范围低于附子组 ($P<0.01$); 四逆汤组的 LDH 水平低于附子组 ($P<0.05$); 而在 CK、AST、SOD、MDA、GSH-Px、乳酸水平上各组间无明显差异。

4 讨论

四逆汤组、附子干姜组、附子甘草组、附子组能显著减少心肌梗死范围, 说明以上 4 组药物对缺血心肌具有保护作用, 而其他 3 组 (甘草组、干姜组、甘草干姜组) 无抗心肌缺血作用。综合考虑心肌梗死面积及 7 种生化指标的影响, 对大鼠缺血心肌的保护程度依次为四逆汤组>附子干姜组>附子甘草组>附子组, 而甘草干姜组、甘草组、干姜组对其影响不明显。四逆汤组通过减少心肌 MDA、乳酸的量, 降低血清 LDH、CK、AST 水平, 提高心肌 SOD、GSH-Px 活性, 改善心肌缺血大鼠的心脏损伤。这与实验室前期研究四逆汤中 3 味药合煎, 能够促进有效成分姜辣素、单酯型生物碱类成分溶出的实验结果相吻合, 体现了四逆汤中“相须/相使”与“相杀/相畏”的七情配伍。将含附子的 4 个组方组大鼠的 7 种生化指标水平进行组间对比分析, 发现仅在心肌 LDH 水平上附子组与四逆汤组存在差异, 在其他生化指标上无明显差异, 说明四逆汤的回阳救逆之功并非通过单一的抗氧化途径来实现, 而是多成分、多靶点、多环节的共同调控作用。

Pit 可引起冠状动脉痉挛, 血管外周阻力增大, 心肌负荷加重, 从而出现心肌供血不足和心肌损伤。本研究采用 ip Pit 造成大鼠的急性心肌缺血模型, 方法简单有效, 可操作性强^[8]。现代药理研究表明, 四逆汤通过清除氧自由基、提高 SOD 活性、改善能量代谢、抑制细胞凋亡、增强线粒体锰超氧化物歧化酶 (MnSOD) mRNA 转录、抗失血性休克大鼠肠黏膜损伤等作用, 对心肌缺血-再灌注损伤起到保护作用^[9-12]。本实验中所测定的 7 个生化指标中 MDA 水平和 SOD 活性为评定氧自由基生成及膜结构破坏的重要指标; GSH-Px 能清除过氧化物代谢产物, 保护心肌细胞膜结构和功能完整; LDH、CK、AST 可作为判断心肌缺血损伤程度的指标; 乳酸为无氧呼吸的产物^[13]。附子组大鼠血清中 LDH、CK、AST 水平的降低表明附子对心肌缺血大鼠的心肌具有保护作用, 且附子可减少心肌 MDA、乳酸释放, 配伍干姜后可提高心肌 SOD 活性; 再配伍甘草后

可提高心肌 GSH-Px 活性。附子配伍干姜后能够增强其清除自由基的作用从而增强其回阳救逆之功, 全方 3 味药合用能增强其清除过氧化物代谢产物的能力, 使其对缺血心肌作用达到最强, 为阐释四逆汤遣方用药的科学性提供实验基础。

参考文献

- [1] 倪建新, 林跃虹, 陈妙珠. 血清药理学方法研究四逆汤对离体蛙心心肌收缩力的影响 [J]. 中国医药科学, 2012, 2(5): 40-41.
- [2] 党万太, 苗维纳, 杨晓放, 等. 基于钙调磷酸酶-活化 T 细胞核因子 3 信号转导通路探究四逆汤治疗心力衰竭的分子机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(22): 202-204.
- [3] Li L, Yang J S. Analysis on chemical constituents of Chinese materia medica formulation Sini Decoction by HPLC-DAD-MS/MS [J]. *Chin Herb Med*, 2015, 7(1): 62-68.
- [4] 朱晨. 四逆汤治疗冠心病心绞痛对照研究 [J]. 实用中医内科杂志, 2012, 26(12): 15-16.
- [5] 卢志强, 张艳军, 崔广智, 等. 心肌缺血模型的制作方法研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2012, 28(8): 1053-1057.
- [6] 吴伟康, 周琳, 孙惠兰. 四逆汤对心肌缺血大鼠内皮素影响的研究 [J]. 中药药理与临床, 2001, 17(4): 3-4.
- [7] 吴伟康, 周琳, 孙惠兰. 四逆汤对心肌缺血大鼠心肌内皮素影响的实验研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2002, 22(8): 610-612.
- [8] 卢志强, 张艳军, 崔广智, 等. 心肌缺血模型的制作方法研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2012, 28(8): 1053-1057.
- [9] 孙惠兰, 吴伟康. 四逆汤有效成分不同组合抗心肌缺血再灌注损伤的作用研究 [J]. 中草药, 2002, 33(4): 333-336.
- [10] 赵丹洋, 赵明奇, 吴伟康. 四逆汤抗心肌缺血-再灌注线粒体氧化损伤作用及机制的研究 [J]. 中药材, 2008, 31(11): 1681-1685.
- [11] 陈兰英, 吴刚, 陈卓, 等. 四逆汤抗失血性休克大鼠肠黏膜损伤及菌群移位药效研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(23): 121-124.
- [12] 蔺建军, 杨勇, 容蓉, 等. 三种制法的四逆汤抗大鼠急性缺血性心肌梗死的药效学比较研究 [J]. 微循环学杂志, 2012, 22(2): 85-86.
- [13] 张国霞, 武艳, 韩冬梅, 等. 原花青素对大鼠心肌缺血-再灌注损伤的保护作用 [J]. 中国生化药物杂志, 2010, 31(3): 170-172.