

红花提取物预处理对缺血再灌注心肌的影响

陈锋葆¹ 董六一¹ 方明² 陈志武² 马传庚²

摘要 目的:观察红花提取物预处理对心肌缺血再灌注损伤的影响。方法:采用离体心脏 Langendorff 装置,观测经红花提取物预处理后心功能指标和冠脉流量的改变;同时采用在体心脏结扎左冠状动脉前降支制备心肌缺血再灌注模型,在心肌缺血前各组心脏分别用红花提取物或维拉帕米治疗,并贯穿于实验全过程中。缺血再灌注组实施 20 分钟缺血和 40 分钟再灌注。分别检测心肌组织中的丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)和心肌激酶(CK)活性、心率等变化。结果:红花提取物能减少缺血再灌注心肌中的 MDA 含量,降低 SOD 和 CK 活性,减慢心率,改善心功能指标。结论:红花提取物能改善心功能,保护缺血心肌,其机制可能与其清除自由基,抑制自由基的释放有关。

主题词 再灌注损伤/中医药疗法 @ 红花提取物

Effects of Pretreatment of Extracts of Honghua(Flos Carthami) on Ischemia-Reperfusion Myocardium

Chen Duobao¹, Dong Liuyi¹, Fang Ming², et al.

(1. Medical College, Anhui University of Science and Technology, Anhui 232001; 2. Anhui Medical University)

Objective: To observe effects of pretreatment of extracts of Honghua(Flos Carthami) on ischemia-reperfusion myocardial injury.

Methods: Myocardial ischemia-reperfusion injury was induced by ligation of the anterior descending branch of the left coronary artery. The heart was perfused with the extracts of Honghua or verapamil before ischemia until the end of the experiment. The ischemia-reperfusion group experienced 20-min ischemia and 40-min reperfusion. Malondialdehyde(MDA) content, superoxide dismutase(SOD) and creatine kinase(CK) activities in the rat myocardial tissue were determined, and the heart rate and cardiac function index were observed. **Results:** The extract could reduce MDA content, SOD and CK activities in the ischemia-reperfusion myocardium, decrease the heart rate, and improve the blood pressure, left ventricular systolic pressure(LVSP), and the maximum rates of contraction and relaxation($=dp/dt_{max}$). **Conclusion:** The extract of Honghua can improve the cardiac function, and the mechanism may be related with clearance of free radicals and inhibition of release of free radicals in the ischemic myocardium.

Key Word Reperfusion injury/TCM therapy; @ Extract of safflower

红花是一种常用的传统中草药,常用于治疗高血压和心肌缺血性疾病。红花黄素是红花中一组水溶性成分,具有较强的药理活性^[1],以往的研究表明,红花提取物有一定的抗氧化作用和抑制血小板聚集作用^[2]。有资料研究表明,红花及其提取物对心脏具有不同程度的兴奋作用^[3],但关于红花提取物预处理对心功能、心率的影响及机制探讨等方面的报道较少。本实验研究了红花提取物预处理对离体心脏心功能的影响及其对在体缺血再灌注损伤模型的预防作用,现报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料:红花提取物(由首都医科大学附属北京安贞医院心血管疾病研究所药理室金鸣教授惠赠)经薄层分析法提纯浓缩,用气相色谱仪分析红花黄素含量为 80.42%,用双蒸水溶解,置-18℃冰箱中保存备

用,临用时用 K-H 溶液调配成所需浓度;维拉帕米(上海禾丰制药有限公司,批号:010101)。心肌激酶(CK)、丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)测试盒购于南京建成生物制品有限公司。

1.2 离体心脏缺血再灌注模型的制备和心功能的观测:SD 大鼠(安徽医科大学实验动物中心,清洁级,许可证号:皖医动字 01),体重 230~280g,雌雄各半。随机分为 6 组(各组均为 7 只):对照组,缺血再灌注模型组(I/R 组),红花提取物预处理低、中、高浓度组(终浓度分别为 0.5mg/L、1.0mg/L 及 2.0mg/L),维拉帕米组(终浓度为 10 μ g/L)。手术前,各组动物用苯巴比妥(45mg/kg 体重, Sigma 产品)腹腔麻醉,开胸,迅速分离并取出心脏,固定在 Langendorff 装置上,用 K-H 缓冲液灌注冲洗(NaCl 18.0mmol/L、NaHCO₃ 25.5mmol/L、KCl 4.7mmol/L、KH₂PO₄ 1.2mmol/L、MgSO₄ 1.2mmol/L、CaCl₂ 2.5mmol/L、葡萄糖 11.0mmol/L),通入 95%O₂ 和 5%CO₂,灌注溶液保持在 37℃、pH7.4,灌注压 60cmH₂O。

行左心室切口,气囊导管经二尖瓣入左心室,装满水的乳胶球囊连接压力传感器,调节球囊内压力,保持左心舒张末期压力(LVEDP)在 15~20cmH₂O 范围

基金项目:安徽理工大学硕博基金项目(2002DG228)、安徽省教育厅自然科学基金项目(2004kj135)、安徽省重点科研项目资金资助课题(01041183)

1 安徽理工大学医学院药理学教研室,淮南市洞山中路 25 号(232001) (C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2 安徽医科大学药理学教研室

收稿日期:2005-06-15;修回日期:2005-10-20

内,用计算机生物信号记录分析系统分析和记录再灌注后 5 分钟、15 分钟、30 分钟、45 分钟和 60 分钟时左室收缩压(LVSP)、左心室内压最大上升与下降速率($\pm dp/dt_{max}$),用冠脉流量计测量冠脉流量(CF)。对各组动物进行离体心脏保护作用观测,所有心脏实验前均先稳定 20 分钟,用 K-H 溶液灌注;缺血再灌注组实施 20 分钟缺血、40 分钟再灌注;红花提取物预处理低、中、高浓度组和维拉帕米组缺血前 15 分钟分别用红花提取物(0.5mg/L、1.0mg/L 及 2.0mg/L)和维拉帕米(10 μ g/L)灌注,然后行缺血再灌注。

1.3 在体心脏缺血再灌注模型的制备:SD 大鼠用苯巴比妥(45mg/kg 体重)腹腔麻醉,人工呼吸,潮气量 15ml/kg 体重,每分钟 60 次,全过程通过心电Ⅱ导联记录心电变化,于第四肋间切开左胸,暴露心脏,用 4-0 号丝线穿过左冠状动脉前降支,两丝线末段穿过一聚乙烯塑料管,提起丝线环,观测局部缺血、紫绀和心电图等改变。松开丝线环,造成再灌注,此改变通过观测心电变化和心肌血供情况判断。对照组操作步骤同前,但不结扎冠脉。进一步观测红花提取物对在体心脏的保护作用,所有动物进行 30 分钟缺血、60 分钟再

灌注,对红花提取物预处理低、中、高浓度组和维拉帕米组在结扎前用红花提取物(10mg/kg 体重、20mg/kg 体重和 40mg/kg 体重,静脉滴注)和维拉帕米(10mg/kg 体重,静脉滴注)治疗 15 分钟,并贯穿全过程。

1.4 MDA 含量、SOD 和 CK 活性测定:实验结束后,从冠脉中收集血样本,用光电分析仪检测 CK 活性。并迅速取出心脏,用冰生理盐水冲洗,吸干,心尖部取适量心肌组织,切碎,加入 10 倍冷盐水,制备成匀浆,以 2000 转/分钟离心 15 分钟。测定过氧脂质降解产物中 MDA 和硫代巴比妥酸合成的红色产物,在 532nm 处有最大的吸收峰,以 MDA 代表组织中氧自由基水平;同时采用 NBT 法测定血样本的 SOD 活性。

1.5 统计学方法:实验数据以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间数据进行 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 红花提取物对离体心脏血流动力学和冠脉流量的影响:表 1 示,与对照组比较,I/R 组大鼠 LVSP 和 $\pm dp/dt_{max}$ 值明显抑制($P < 0.01$)。各组动物缺血后,心功能指标(LVSP, $\pm dp/dt_{max}$)均有不同程度的减退,

表 1 红花提取物对各组大鼠心功能的影响($\bar{x} \pm s$)

指标/组别	浓度 (mg/L)	基础值	再灌注时间(分钟)				
			5	15	30	45	60
LVSP(mmHg)							
对照组	—	81±14	82±20	80±19	81±13	80±14	79±18
I/R 组	—	83±18	26±5**	24±8**	25±12**	28±9**	28±6
红花提取物预处理低浓度组	0.5	87±12	26±8**	28±12**	28±15**	31±15**	32±16**
红花提取物预处理中浓度组	1.0	84±13	28±5**	41±16**△	47±15**	56±13*△	56±14△△
红花提取物预处理高浓度组	2.0	86±12	38±7**△	37±17**△	51±17*△△	50±11*△	64±12△△
维拉帕米组	0.01	81±12	48±7**△	38±18**△	67±16△△	62±10△△	62±11△△
+dp/dt _{max} (mmHg/s)							
对照组	—	2103±132	2101±127	2112±119	2117±116	2118±111	2118±117
I/R 组	—	2109±174	768±135**	769±169**	787±156**	776±159**	771±178**
红花提取物预处理低浓度组	0.5	2119±181	1216±132**△△	1104±145**△	1134±167**△	1589±157*△	1599±142**△△
红花提取物预处理中浓度组	1.0	2133±191	1632±130*△△	1713±112*△△	1778±142△△	1843±111△△	2167±144△△
红花提取物预处理高浓度组	2.0	2114±156	1816±137△△	1802±159△△	1858±156△△	2292±165△△	2295±176△△
维拉帕米组	0.01	2105±176	1403±128*△△	1529±187*△△	1725±124△△	1778±113△△	1913±143△△
-dp/dt _{max} (mmHg/s)							
对照组	—	2317±153	2182±122	2016±187	2012±189	1987±167	1923±198
I/R 组	—	2175±165	412±186**	511±123**	623±136**	723±216**	784±118**
红花提取物预处理低浓度组	0.5	2016±187	710±187**△	972±112**△△	1221±176**△△	1216±117**△	1217±159**△
红花提取物预处理中浓度组	1.0	2104±105	782±130**△	983±138**△△	1285±116**△△	1268±177**△	1228±128**△
红花提取物预处理高浓度组	2.0	2118±114	768±154**△	1167±127**△△	1320±157**△△	1322±119*△	1338±118**△△
维拉帕米组	0.01	2150±185	882±101**△△	1181±119**△△	1377±186**△△	1347±119*△△	1336±127**△△
冠脉流量(ml/min)							
对照组	—	54.5±6.7	53.0±6.5	54.0±3.6	54.4±3.6	55.5±6.3	57.0±6.5
I/R 组	—	54.7±5.3	43.2±5.8	42.3±4.9	41.4±3.1	41.7±4.3	41.2±5.4
红花提取物预处理低浓度组	0.5	49.0±6.2	54.2±4.2	62.8±5.8	60.0±5.7	58.0±6.4	58.8±5.2
红花提取物预处理中浓度组	1.0	50.4±4.8	65.5±4.5	64.3±5.5	64.5±5.6	61.4±2.8	66.3±4.8
红花提取物预处理高浓度组	2.0	51.1±5.2	68.4±7.3*	66.2±6.0*	69.6±5.9**△	69.1±6.2*△	67.2±6.1*
维拉帕米组	0.01	51.7±4.3	66.2±4.6*	69.3±4.9*△	67.4±3.1*△	68.7±4.3*△	67.8±5.8*△

与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 I/R 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;各组动物数均为 7 只。以下表同

表 2 红花提取物对各组大鼠心率和血压的影响($\bar{x} \pm s$)

指标/组别	给药剂量 (mg/kg 体重)	基础值	再灌注时间(分钟)				
			5	15	30	45	60
血压(mmHg)							
对照组	—	116±14	107±14	106±12	106±11	104±10	104±10
I/R 组	—	106±11	69±13 *	65±14 *	65±13 *	66±12 *	66±12 *
红花提取物预处理低浓度组	10	115±15	89±11 *△	87±10 *△	87±9 *△	86±9 *△	84±8 *△
红花提取物预处理中浓度组	20	111±12	93±17△	92±9△	92±10△	96±10△	92±9△
红花提取物预处理高浓度组	40	119±13	104±12 * *△	103±11△	103±10△	102±11△	102±12△
维拉帕米组	10	115±21	93±14△	87±12 *△	85±11 *△	83±11 *△	80±12 *△
心率(次/分)							
对照组	—	357±37	359±34	356±32	357±29	358±28	358±33
I/R 组	—	354±36	301±34 * *	295±19 * *	288±21 * *	288±23 * *	286±17 * *
红花提取物预处理低浓度组	10	357±39	284±18 * *	281±17 *	282±18 * *	279±16 * *	276±14 * *
红花提取物预处理中浓度组	20	361±40	274±16 * *	252±11 *	252±23 * *	254±19 * *	258±19 * *
红花提取物预处理高浓度组	40	364±38	267±19 * *△	237±19 * *△	227±25 * *△	222±16 * *△	215±20 * *△
维拉帕米组	10	357±36	277±15 * *	275±16 * *	271±21 * *	270±19 * *	271±22 * *

表 3 红花提取物对心肌缺血再灌注大鼠 SOD、CK 活性和 MDA 含量的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	给药剂量(mg/kg 体重)	SOD(U/g)	MDA(mmol/g)	CK(U/L)
对照组	—	1887±123	103±12	572.8±141.7
I/R 组	—	1123±122 **	179±11 **	1007.9±319.4 **
红花提取物预处理低浓度组	10	1221±102 **	143±16 **	921.5±242.3 **
红花提取物预处理中浓度组	20	1326±210 **	132±17 **	801.5±221.3 **
红花提取物预处理高浓度组	40	1530±211 **△	121±15 *△	685.8±192.4 *△
维拉帕米组	10	1521±127 **△	112±12 **△	743.6±114.6 **△

冠脉流量减少。缺血 5 分钟后,红花提取物预处理低浓度组仅能引起心功能的轻度改善,而红花提取物预处理中、高浓度组心功能指标与 I/R 组比较显著升高。再灌注期间,红花提取物预处理各组冠脉流量显著增加。红花提取物预处理各组治疗后,与 I/R 组比较 $\pm dp/dt_{\max}$ 显著增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$),表明无论是收缩期还是舒张期,缺血再灌注引起的大鼠心功能损伤均得到明显改善;维拉帕米组心功能亦有改善。

2.2 红花提取物对在体心脏心率和血压的影响:表 2 示,缺血后各组心率情况明显不同,I/R 组再灌注 5 分钟后,HR 开始下降,红花提取物预处理各组 and 维拉帕米组再灌注 5 分钟后心率也明显减慢($P<0.01$)。与对照组比较,I/R 组的平均血压(MBP) 降低,红花提取物预处理各组 MBP 则明显高于 I/R 组($P<0.05$)。

2.3 红花提取物对 MDA 含量、SOD 和 CK 活性的影响:表 3 示,心肌缺血再灌注引起血清中 CK 水平显著增加,而红花提取物预处理各组 and 维拉帕米组 CK 水平则降低。心肌缺血再灌注可显著增加 MDA 含量,降低 SOD 活性,而红花提取物和维拉帕米则可显著减少 MDA 含量,提高 SOD 活性。

3 讨论

氧自由基、腺苷和蛋白激酶(PKC) 在药理性预处理中起到重要作用^[4~8],有报道红花提取物和有些中

药一样具有抗氧化特性,并能减少缺血再灌注引起的心肌损害,其对心脏的保护作用与抑制超氧化物的产生有关。有实验发现,红花提取物能显著促进心功能恢复,减少 CK 释放,降低心肌组织中 MDA 和脂质过氧化物的含量^[9,10]。

以往的研究表明,腺苷、环氧合酶和 PKC 在心肌缺血再灌注损伤中具有重要作用,这种作用的产生与在缺血心肌中腺苷、环氧合酶和 $Na^{+}-Ca^{2+}$ 转运系统的激活有关。腺苷和环氧合酶增加氧自由基的产生,对心肌发挥直接的毒性作用^[7]。一些资料表明,腺苷、环氧合酶抑制剂和钙通道阻滞剂可以抑制由于缺血再灌注引起的心肌损伤。而红花提取物对心脏保护作用的机制尚需进一步研究。

腺苷、环氧合酶和 PKC 在缺血后心肌功能的改变中起到重要作用,由于心肌缺血再灌注产生的氧自由基在心肌损害中起到重要作用,而红花提取物在一定程度上可维持缺血心肌中 SOD 的活性,从而提示红花提取物保护心肌作用与清除氧自由基有关。以往的研究证实,自由基清除剂能抵抗再灌注引起的心肌损伤作用,红花提取物能提高心肌中 SOD 的活性,改善心功能。本实验观测到红花提取物预处理在离体心脏的缺血心肌中可产生有效的抗氧化作用,发现了红花提取物与氧化机制的相互关系。

综上所述,红花提取物能保护由于缺血再灌注引起的大鼠心肌损伤,该作用与抑制氧自由基和脂质过氧化物有关。

参考文献

- 1 李艳梅,车庆明·红花化学成分的研究·药学学报,1998,33(2):626~628.
- 2 杨志福,文爱东·红花黄色素对急性血瘀大鼠微循环及血液流变学部分指标的影响·中药材,2001,24(4):283~284.
- 3 徐理纳·活血化瘀冠心Ⅱ号方及其组成药对心肌缺血和增强缺氧耐力的实验研究·药学学报,1979,(8):461~462.
- 4 Piriou V, Chiari P, Lhuillier F, et al· Pharmacological preconditioning: comparison of desflurane, sevoflurane, isoflurane and halothane in rabbit myocardium· Br J Anaesth, 2002, 89(3):486~491.
- 5 Opie LH, Sack MN· Metabolic plasticity and the promotion of cardiac

protection in ischemia and ischemic preconditioning· J Mol Cell Cardiol, 2002, 34(9):1077~1089.

- 6 Baxter GF· Role of adenosine in delayed preconditioning of myocardium· Cardiovasc Res, 2002, 55(3):483~494.
- 7 李杏,陈俊秀,孙家钧,等·三七总皂甙对实验性大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护效应·中国药理学报,1990,11(1):26~28.
- 8 梁日欣,廖福龙,韩东·川芎嗪预处理对清醒大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用·中国实验方剂学杂志,2002,8(1):21~23.
- 9 Bolli R, Shinmura K, Tang XL, et al· Discovery of a new function of cyclooxygenase (COX)-2: COX-2 is a cardioprotective protein that alleviates ischemia/reperfusion injury and mediates the late phase of preconditioning· Cardiovasc Res, 2002, 55(3):506~519.
- 10 Ryugo M, Sawa Y, Ono M, et al· Pharmacologic preconditioning of JTE-607, a novel cytokine inhibitor, attenuates ischemia-reperfusion injury in the myocardium· J Thorac Cardiovasc Surg, 2004, 127(6):1723~1727.

参龟培元冲剂治疗重症肌无力 34 例

卜 绿 萍*

重症肌无力是以神经肌肉接头处病变为主的自身免疫性疾病,临床特点为受力骨骼肌的易疲劳和乏力。现代医学主要用胆碱酯酶抑制剂、类固醇、化疗、放疗及胸腺切除等方法治疗,但不能根治。本病属中医学痿证、睑废等范畴。两年来,我们以参龟培元冲剂治疗 34 例重症肌无力患者,取得了较好的临床效果,现总结如下。

1 临床资料

1.1 病例来源:2002~2003 年北京回民医院中医科住院患者 27 例,门诊患者 7 例,共 34 例;其中男性 16 例,女性 18 例;年龄<15 岁 8 例,15~25 岁 3 例,26~35 岁 9 例,36~45 岁 3 例,46~55 岁 3 例,56~65 岁 8 例;病程 1 个月~30 年。

1.2 诊断标准:参照《中药新药治疗重症肌无力的临床研究指导原则》诊断标准。(1)有典型的横纹肌无力及易疲劳表现,休息后减轻或朝轻暮重。(2)新斯的明试验阳性;肌电图检查重复神经电刺激动作电位呈衰减效应。(3)血清抗乙酰胆碱抗体阳性。

1.3 临床分型:参照《中药新药治疗重症肌无力的临床研究指导原则》诊断标准。(1)眼肌型:仅表现眼睑下垂,眼外肌运动麻痹、复视或眼球固定等症。(2)延髓肌型:主要表现为构音困难,进食呛咳,多讲话后声音降低,咀嚼乏力,仅能进食软食,喝水从鼻孔流出,面部表现尴尬,吹气漏风,闭嘴不紧。严重者完全无力咀嚼和吞咽,吐痰不出,甚则呼吸道阻塞而危及生命。(3)脊髓肌型:仅表现为两上肢或下肢无力,多数在四肢带肌受累后逐渐发展成全身肌无力。(4)全身肌无力:可以是急性起病,数月内同时出现眼肌、面肌、延髓肌、颈肌及四肢肌肉无力,也可由眼肌型、延髓肌型等逐步发展而来。

1.4 辨证分型:(1)脾气虚型:眼睑下垂,气短乏力;四肢沉重,纳少,大便溏薄;舌质淡,舌体胖嫩,舌苔薄白或白腻,脉细弱或

细滑。(2)脾肾阳虚:四肢倦怠乏力,不耐疲劳;重则吞咽困难,饮水发呛;腰膝酸软;畏寒肢冷;舌质淡暗,舌体胖,苔薄白,脉沉细弦。(3)肝肾精亏:四肢酸软无力;双目凝视;重则吞咽困难,饮水发呛;心烦少寐,目涩口干,面部烘热;舌质红,苔少,脉细弦数。

2 治疗方法

参龟培元冲剂由北京三联制药厂生产,每袋 6g。成人每次服 2 袋,每日 3 次;小儿每次服 1 袋,每日 3 次。两个月为 1 个疗程,一般 1~6 个疗程。

3 治疗结果

3.1 疗效标准:参照《中药新药治疗重症肌无力临床研究指导原则》。(1)临床痊愈:临床症状和体征全部消失,恢复正常学习和工作,3 个月无复发。(2)显效:临床症状和体征大部分消失,恢复部分工作或可从事轻工作。(3)有效:临床症状和体征有改善,一般生活可自理,但不能恢复工作。(4)无效:临床症状和体征无改善。

3.2 治疗结果:本组 34 例,临床治愈 8 例,显效 8 例,有效 11 例,无效 7 例,总有效率为 79.41%。

4 讨论

重症肌无力是主要累及神经肌肉接头处乙酰胆碱受体的自身免疫性疾病,其主要特征是呈进行性的肌肉收缩无力和易疲劳,休息后可恢复,大部分患者早期表现为眼睑下垂和复视。重症肌无力在临床上的发病率为每百万人 50~125 例,并且发病率与性别和年龄相关,好发于 30 岁左右的年轻女性和 60 岁左右的老年男性。我们根据中医理论和临床实践,确定了补气健脾、益精填髓、化痰通络的治疗大法。临床观察表明,参龟培元冲剂治疗重症肌无力,总显效率 47.06%,总有效率 79.41%,特别是对于眼肌型重症肌无力,有效率为 100%。在临床应用过程中没有发现明显不良反应,初步证实,参龟元冲剂治疗重症肌无力有较为肯定的疗效,值得进一步研究和推广。

* 中国医疗保健国际交流促进会免疫性疾病专业委员会北京市宣武区建功西里一号天缘公寓 A 座 1508(100054)

收稿日期:2005-11-21