

葛根芩连汤抗大鼠心肌缺血再灌注 致心律失常作用及其机制研究

杨杰, 龙子江*, 穆磊, 陈明, 魏成晨, 丁伯春
(安徽中医学院药理教研室, 合肥 230038)

[摘要] **目的:**研究葛根芩连汤对大鼠心肌缺血再灌注所致心律失常的治疗作用及其机制。**方法:**健康 SD 大鼠随机分为 6 组, 每组 10 只, 即假手术组、模型组、稳心颗粒组 ($2.43 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 及葛根芩连汤高、中、低(生药含量) ($8.64, 4.32, 2.16 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 剂量组, 连续给药 7 d 后, 除正常组外, 其余各鼠结扎冠状动脉左前降支(LAD)建立大鼠心肌缺血再灌注致心律失常模型, 监测肢体 II 导联心电图(ECG), $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$, $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$ 及血清超氧化物歧化酶(SOD)活性, 丙二醛(MDA)的含量。**结果:**葛根芩连汤能显著降低再灌注心律失常的发生率($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 也能显著增加心肌组织匀浆 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$, $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$ 活力($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 增加血清 SOD 活性($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 降低 MDA 含量($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。**结论:**葛根芩连汤能够有效的调节心肌缺血再灌注模型大鼠各种酶活性, 清除氧自由基, 从而改善心律失常, 保护缺血心肌。

[关键词] 葛根芩连汤; 心律失常; 心肌缺血再灌注; 超氧化物歧化酶; 丙二醛; $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$; $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$
[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)01-0284-03

Effect and Mechanism of Gegen Qinlian Decoction on Anti-arrhythmia Induced by Myocardial Ischemia Reperfusion in Rats

YANG Jie, LONG Zi-jiang*, MU Lei, CHEN Ming, WEI Cheng-chen, DING Bo-chun
(Pharmacology Department, Anhui College of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230038, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect and mechanism of Gegen Qinlian decoction on myocardial ischemia reperfusion induced arrhythmia in rats, to provide experimental evidence for clinical application. **Method:** Healthy SD rats were randomly divided into six groups ($n = 10$, each), sham operation group (given equal volume distilled water), model group (given equal volume distilled water), Wenxin keli group ($2.43 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), Gegenqinlian decoction high, medium, low dose ($8.64, 4.32, 2.16 \text{ g crude drug} \cdot \text{kg}^{-1}$) groups. Beside the sham operation group, the other groups were performed by liquating anterior interventricular branch of the left descending coronary artery to establish myocardial ischemia reperfusion induced arrhythmia. After different intervention for continuous 7 days, electrocardiogram of lead II was examined, and tissue $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$, $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$ and serum superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) were determined. **Result:** Gegenqinlian decoction could significantly reduce the incidence of arrhythmia, serum MDA and increase serum SOD, also significantly increase $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$, $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$ activity ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). **Conclusion:** Gegenqinlian decoction has good anti-arrhythmia effect in the way of increasing enzymes activity and removing oxygen free radicals, to improve arrhythmia and protect the ischemic myocardium.

[Key words] Gegenqinlian decoction; anti-arrhythmia; myocardial ischemia/reperfusion; serum superoxide dismutase; malondialdehyde; $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$; $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$

[收稿日期] 20120523(004)

[基金项目] 安徽省教育厅·皖教秘科([2011]89号 KJ2012Z219)

[第一作者] 杨杰, 硕士在读, 从事中药药理学研究, Tel:13866769831, E-mail:594308785@qq.com

[通讯作者] * 龙子江, 硕士, 教授, 从事中药药理学研究, Tel:0551-5169216, E-mail:lzjyls@163.com

心律失常是心血管疾病常见的临床表现形式,尤其是室性心动过速、心室颤动等恶性心律失常,不但加重原有心脏疾病,还可诱发心源性猝死。目前临床上普遍使用的几类抗心律失常西药有一定的疗效,但存在致心律失常作用和毒副作用,而限制其临床应用。中药治疗心律失常从中医整体思路出发,辨证施治,产生很好的抗心律失常作用,且毒副作用相对较小^[1]。其应用已逐步为人们所重视。

葛根芩连汤始载于张仲景《伤寒论》,由4味中药组成,葛根为君,黄芩、黄连、甘草为佐,其意专解阳明之肌表,兼清胃中之里热,此清解中兼解表里,是中医药的经典方剂^[2]。临床将该方用于心律失常取得良好效果。本实验通过复制大鼠心肌缺血再灌注致心律失常模型来研究其对有关酶学的影响,为临床应用提供依据。

1 材料

1.1 药品和试剂 葛根芩连汤水煮液(由葛根,黄芩,黄连,甘草组成,药材购自安徽中医学院第一附属医院中药房,经安徽中医学院中药教研组周建礼教授鉴定为正品,由安徽中医学院药理教研室提取成 $1\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 备用);稳心颗粒,山东步长制药有限公司,批号20110946;乌来糖,中国医药集团上海化学试剂公司生产,批号F20090620; $\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}\text{-ATPase}$ 试剂盒、 $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ 试剂盒、SOD试剂盒、MDA试剂盒及考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒,南京建成生物工程研究所提供,批号20111025。

1.2 动物 SD大鼠60只,180~220 g,雌雄各半,由安徽医科大学动物中心提供,合格证号SCXK(皖)2011-001。

1.3 仪器 XD-7100型单道心电图机(上海高技术有限公司生产),HX-300型动物呼吸机(成都泰盟科技有限公司生产),754型紫外-可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司生产)。

2 方法

2.1 分组及给药 SD大鼠60只,雌雄各半适应性饲养1周后,随机均分为假手术组(等容量蒸馏水)、模型组(等容量蒸馏水)、阳性药组(稳心颗粒, $2.43\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)及葛根芩连汤高、中、低($8.64, 4.32, 2.16\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,按体表面积计算,分别相当于临床人用量的4倍、2倍、1倍。其中低剂量组为人的临床等效剂量)剂量组,每组10只,按 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 体重的给药容积,灌胃给药,每天1次,连续7 d。

2.2 造模方法 按文献方法^[3]适当加以改进,末次给药后1 h,大鼠腹腔注射20%乌来糖麻醉($1\text{ g}\cdot$

kg^{-1}),固定后,行气管切开术,并给予人工机械通气,呼吸频率65~70次/min,潮气量18公升。于胸骨左缘2~4肋间打开胸腔及心包膜,暴露心脏;在肺动脉圆锥右缘,于左心耳下缘1~2 mm处经左冠状动脉下浅层心肌穿5/0号丝线,连同一直径2 mm聚氯乙烯管结扎LAD,造成心肌缺血。结扎LAD 15 min后将眼科剪伸入聚氯乙烯管,剪开管壁的同时剪断丝线,使缺血心肌恢复血流灌注,再灌注30 min。假手术组只穿线不结扎。

2.3 组织取材 手术后,腹主动脉取血,离心, $3\ 500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min,取血清备用。处死大鼠后,取出心脏左心室心肌组织,用冷0.9%氯化钠溶液冲洗血液,加入0.9%氯化钠溶液,制成10%的心肌组织匀浆液备用。

2.4 血清中SOD,MDA的测定 将制备的血清按SOD,MDA试剂盒要求测定。

2.5 心肌组织中 $\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}\text{-ATPase}$, $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ 的测定 将制备好的10%心肌组织匀浆液按 $\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}\text{-ATPase}$, $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ 试剂盒说明书。

2.6 统计学处理 采用SPSS 13.0 for windows软件,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验, $P<0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对心肌缺血再灌注心律失常大鼠室性早搏、室颤以及室速发生率的影响 葛根芩连汤高、中剂量组能显著降低模型动物心肌缺血再灌注后室性早搏、室颤以及室速的发生率,与模型组相比有显著差异($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。详见表1。

表1 葛根芩连汤对大鼠心肌缺血再灌注心律失常大鼠室性早搏、室颤以及室速发生率的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	室性早搏/%	室颤/%	室速/%
对照	-	0	0	0
模型	-	90	70	80
葛根芩连汤	8.64	40	10	0 ¹⁾
	4.32	40 ¹⁾	20 ¹⁾	20 ²⁾
	2.16	40 ¹⁾	30 ¹⁾	10 ²⁾
稳心颗粒	2.43	40 ²⁾	20 ¹⁾	10 ¹⁾

注:与模型组相比¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$ (表2~3同)。

3.2 对再灌后大鼠血清SOD,MDA的影响 模型组大鼠血清中MDA含量显著增加,SOD活性显著降低,与对照组相比有高度显著性差异($P<0.01$);葛根芩连汤低、中、高剂量组大鼠血清中MDA活性降低,SOD增加,与模型组比较具有显著性差异($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。详见表2。

表 2 葛根芩连汤对再灌后大鼠血清 SOD, MDA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	SOD /U·mL ⁻¹	MDA /μmol·mL ⁻¹
对照	-	164.501 ± 11.356 ²⁾	2.86 ± 0.899 ²⁾
模型	-	127.570 ± 12.884	4.871 ± 0.907
葛根芩连汤	8.64	155.716 ± 11.176 ²⁾	3.651 ± 0.768 ²⁾
	4.32	147.995 ± 12.503 ²⁾	3.841 ± 0.782 ¹⁾
	2.16	140.740 ± 8.296 ¹⁾	4.074 ± 0.605 ¹⁾
稳心颗粒	2.43	150.648 ± 13.805 ²⁾	3.816 ± 0.906 ¹⁾

3.3 葛根芩连汤对再灌后大鼠心肌组织中 Na⁺-K⁺-ATPase, Ca²⁺-ATPase 活性的影响 模型组大鼠心肌组织中 Na⁺-K⁺-ATPase, Ca²⁺-ATPase 活性显著降低,与对照组相比有高度显著性差异 ($P < 0.01$)。葛根芩连汤中、高剂量组大鼠心肌组织中 Na⁺-K⁺-ATPase, Ca²⁺-ATPase 活性显著升高,与模型组比较具有显著性差异 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。详见表 3。

表 3 葛根芩连汤对再灌后大鼠血清 Na⁺-K⁺-ATPase, Ca²⁺-ATPase 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	Na ⁺ -K ⁺ -ATPase /U·mgprot ⁻¹	Ca ²⁺ -Mg ²⁺ -ATPase /U·mgprot ⁻¹
对照	-	4.438 ± 1.390 ²⁾	4.4 ± 1.289 ²⁾
模型	-	1.932 ± 1.383	2.174 ± 0.902
葛根芩连汤	8.64	3.499 ± 1.018 ²⁾	3.624 ± 0.992 ²⁾
	4.32	3.796 ± 2.329 ¹⁾	2.768 ± 0.594 ²⁾
	2.16	3.09 ± 0.842	2.229 ± 1.010
稳心颗粒	2.43	3.668 ± 0.858 ²⁾	3.071 ± 0.826 ¹⁾

4 讨论

心肌缺血一定时间后再灌注不仅不能改善心肌的缺血性损伤,反而加重心肌组织的功能障碍和结构损伤,出现各种代谢和功能紊乱,包括严重的室性心律失常^[4-5]。心肌缺血再灌注后清楚氧自由基的主要酶类如 SOD 等活性的失代偿性下降,导致氧自由基爆发性增加^[6],使细胞膜中不饱和脂肪酸引起脂质过氧化反应,并因此形成脂质过氧化产物 MDA。MDA 可破坏细胞膜,引起心肌细胞膜生物电不稳定,使膜内外离子分布异常,导致 Ca²⁺ 的通透性增加,使细胞内 Ca²⁺ 严重超负荷^[7],线粒体合成 ATP 的量明显减少,进而抑制心功能,引起严重的再灌注性心律失常^[8]。Na⁺-K⁺-ATPase 通过细胞内外 Na⁺、K⁺ 离子运输而影响细胞跨膜电位,具有维

持正常细胞内外离子浓度梯度或电化学梯度,以及维持正常细胞能量代谢的作用^[9]。

本实验采用结扎大鼠 LAD 建立再灌注心律失常模型,以进一步探讨葛根芩连汤抗心律失常的作用机制。实验结果显示,葛根芩连汤能显著降低大鼠再灌注心律失常的发生率 ($P < 0.01$),并且能使心律失常模型大鼠血清 MDA 含量明显降低 ($P < 0.01$),SOD 的含量明显升高 ($P < 0.01$),同时葛根芩连汤可以使模型组大鼠心肌组织中 Na⁺-K⁺-ATPase, Ca²⁺-ATPase 活力明显增加。由此可见,葛根芩连汤可抑制氧自由基介导的心肌细胞膜损害,稳定细胞膜的完整性,阻止细胞内外离子分布异常,稳定心肌细胞的自律性,从而保护心肌,稳定心律,有降低再灌注性心律失常的作用。

[参考文献]

[1] 朱明军,张群生,王永. 传统方辨治心律失常概况[J]. 中国实验方剂学杂志,2007,13(7):70.

[2] 赵林华,姬航宇,冀博文,等. 葛根芩连汤治疗糖尿病理论探讨[J]. 中华中医药杂志(原中国医药学报),2012,27(2):280.

[3] 蔡少峰,张新风,冯则一. 参降汤对心肌缺血再灌注模型的影响研究[J]. 陕西中医,2010,31(10):1422.

[4] 芦殿香,吴海英,芦殿荣,等. 心肌缺血再灌注中的棘手问题及对策[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(12):245.

[5] 巩红岩,秦元旭,王更富,等. 葛根素对大鼠体外循环后心肌缺血再灌注损伤的保护作用及抗氧化应激机制的探讨[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(1):165.

[6] 孙立,龙子江,张道福,等. 无患子皂苷对大鼠心肌缺血的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(1):110.

[7] 章建民,李亚平,盛蕊,等. 扶本增脉颗粒对普萘洛尔致缓慢性心律失常大鼠的作用研究[J]. 现代医院,2011,11(7):25.

[8] 李健玲,陈兆宽,吕纪华,等. 玉郎伞皂苷对大鼠离体心脏缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(9):250.

[9] 周亚滨,赵艳茹,徐倩,等. 养心颗粒对家兔冠心病快速心律失常模型心电图时相性及心肌 Na⁺-K⁺-ATPase 酶活性的影响[J]. 辽宁中医杂志,2008,35(7):989.

[责任编辑 李玉洁]