

# 当归芍药散煎剂对垂体后叶素所致小鼠心肌缺血的影响

于永军<sup>1\*</sup>, 宋晓雨<sup>2</sup>, 蔡景竹<sup>3</sup>, 杨旭杰<sup>2</sup>, 阎艳丽<sup>2</sup>

(1. 沧州医学高等专科学校, 河北 沧州 061001; 2. 河北医科大学, 石家庄 050091;  
3. 河北农业大学农学院, 河北 保定 071000)

**[摘要]** 目的: 观察当归芍药散(DSS)对垂体后叶素(Pit)所致小鼠心肌缺血的影响。方法: 昆明种小鼠 100 只, 分为空白对照组、模型组、DSS 低剂量组(生药 30 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)、DSS 高剂量组(生药 60 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)和阳性对照组(复方丹参滴丸 0.174 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), ig 连续 5 d, 末次药后 1 h, ip Pit(30 U·kg<sup>-1</sup>)进行造模。记录 ip Pit 前 10 min 和注射后 5, 15, 25 min 时点 II 导联心电图; 检测血清一氧化氮(NO)水平、内皮型一氧化氮合酶(eNOS)活性(免疫组化法)以及心肌组织匀浆超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)含量。**结果:** DSS 高、低剂量组与模型组相比, 心率均明显改善, 具有显著差异( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); DSS 高、低剂量血清 NO 水平分别为(79.35 ± 25.18), (26.46 ± 18.24) μmol·L<sup>-1</sup>, 明显高于模型组(13.66 ± 3.83) μmol·L<sup>-1</sup>(均  $P < 0.01$ )。DSS 高、低剂量 eNOS 活性为(0.259 ± 0.037), (0.241 ± 0.029), 均强于模型组(0.176 ± 0.036),  $P < 0.01$ 。DSS 高、低剂量心肌 SOD 活性分别为(269.55 ± 20.65), (263.58 ± 21.04) U·mg<sup>-1</sup>, 明显高于模型组(222.75 ± 23.44) U·mg<sup>-1</sup>( $P < 0.01$ ); DSS 高、低剂量心肌 MDA 含量分别为(3.58 ± 1.01), (4.22 ± 0.75) nmol·mg<sup>-1</sup>, 明显低于模型组(5.25 ± 1.42) nmol·mg<sup>-1</sup>( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。**结论:** 当归芍药散能有效防治由 Pit 所引起的心肌缺血及缺血损伤, 具有保护心肌细胞的作用。

**[关键词]** 当归芍药散; 心肌缺血; 垂体后叶素; 心电图; 自由基; 一氧化氮

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)06-0243-04

**[收稿日期]** 2011-03-29

**[通讯作者]** \* 于永军, 讲师, 硕士, 从事药理学专业教学、中药药理及质量控制研究, Tel: 0317-5308069, E-mail: yyjzlx@163.com

引起骨代谢活动的紊乱导致 OP<sup>[8]</sup>。本试验中, IL-1β 主要表达于去卵巢小鼠骨髓基质的单核细胞及巨噬细胞中, 这与邓廉夫等报道一致<sup>[9-10]</sup>。

综上, EMP 能增加去卵巢小鼠骨密度、降低破骨细胞数和骨组织中 IL-1β 的表达, 为 EPM 的进一步开发利用提供了实验依据。

## [参考文献]

[1] 中国药典. 一部[S]. 2005:229.  
[2] Nakamuta H. The ovariectomized animal model of postmenopausal bone loss[J]. Nippon Rinsho, 2004, 62 (Suppl 2):759.  
[3] 王军. 老年性骨质疏松的危险因素、发病机制及防治[J]. 中国老年学杂志, 2008, 28(18):1869.  
[4] Young R. Cell proliferation and specializatin during endochondral osteogenesis in young rats[J]. J Cell Biol, 1962, 14:357.

[5] Chen J R, Plotkin L I, Agnirre J I, et al. Transient versus sustained phosphorylation and nuclear accumulation of ERKs underlie anti-versus pro-apoptotic effects of estrogens[J]. J Biol Chem, 2005, 280:4632.  
[6] Zheng M H, Wood D J, Papadimitrion J M. What's new in the role of cytokines on osteoblast proliferation and differentiation[J]. Pathol Res Pract, 1992, 188:1104.  
[7] Roodman G D. Advances in bone biology: the osteoclast[J]. Endocr Rev, 1996, 17:308.  
[8] 安贵峰, 屠冠军. 骨质疏松模型骨组织中 IL-6, IL-1β, TNF-α 的表达特征[J]. 中国医科大学学报, 2005, 34(2):97.  
[9] 邓廉夫, 何涛. 骨质疏松症破骨细胞的形成与骨吸收活性的研究[J]. 江苏医药, 2008, 28(8):563.  
[10] 郭世友. 骨质疏松基础与临床[M]. 天津: 天津科技出版社, 2001:129.

[责任编辑 何伟]

## Effects of Danggui Shaoyao San on Experimental Myocardial Ischemia Induced by Pituitary Injection in Mice

YU Yong-jun<sup>1\*</sup>, SONG Xiao-yu<sup>2</sup>, CAI Jing-zhu<sup>3</sup>, YANG Xu-jie<sup>2</sup>, YAN Yan-li<sup>2</sup>

(1. Cangzhou Medical College, Cangzhou 061001, China; 2. Hebei Medical University, Shijiazhuang 060000, China; 3. Hebei Agricultural University, Baoding 071000, China)

**[ Abstract ] Objective:** To observe the effects of Danggui Shaoyao San (DSS) on experimental myocardial ischemia in mice. **Method:** One hundred healthy male Kunming mice were divided into five groups at random: blank control group, model group, DSS low-dose group (raw herb  $30 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ), DSS high-dose group ( $60 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) and positive control group (Fufang Danshen Diwan  $0.174 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ). Each group was fed with according medicine from the first day to the fifth day. On the fifth day injections of Pit ( $30 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) was given to every group intraperitoneally except the blank control group to which injections of saline were given intraperitoneally. The myocardial ischemia model was duplicated by pit. The electrocardiogram at the tenth minute before the Pit injection and the 5, 15, 25 min after the Pit injection was recorded. Thirty minutes after the Pit injections the mice were sacrificed, the blood was obtained and the contents of NO were checked up. The tip of myocardium was made into pathological specimen to observe the activities of eNOS by immunohistochemistry method. The rest myocardium was made into tissue homogenate with saline for checking up the activity of SOD and the content of MDA. **Result:** Compared with the model group, the heart rates in the DSS high-dose and the low-dose groups were recovered significantly ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ). The contents of serum NO in the DSS high-dose group, the low-dose group were increased significantly ( $P < 0.01$ ). The activities of eNOS in the DSS high-dose group and the low-dose group were enhanced. The activities of SOD in the DSS high-dose group and the low-dose group were increased significantly ( $P < 0.01$ ), while the contents of MDA were decreased significantly ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** The classical prescription DSS could prevent and treat myocardial ischemia injure effectively, protect the myocardial cell.

**[ Key words ]** Danggui Shaoyao san; myocardial ischemia; pituitary; electrocardiogram; free radical; nitric oxide

心绞痛是指由于冠状动脉供血不足,心肌急剧的暂时缺血缺氧所引起的临床综合征,是冠心病主要和常见的表现类型,其中冠状动脉痉挛是引起心绞痛的重要原因之一。当归芍药散原为《金匮要略》妇人良方,具有养肝和血、健脾祛湿等功效,依据“谨守病机,异病同治”原则,其主治病症现已拓展到临床各科。该方对血脂异常及冠心病疗效确切,且动物实验研究亦表明该方具有良好的调节血脂和保护心肌作用<sup>[1-2]</sup>。注射大剂量垂体后叶素可诱发动物冠状动脉痉挛而引起急性心肌缺血,与临床冠状动脉供血不足所致心绞痛相似,比较接近人的病理状态<sup>[3]</sup>。本实验采用注射垂体后叶素复制小鼠心肌缺血模型,观察当归芍药散对其影响,并探讨其作用机制。

### 1 材料

**1.1 动物** 昆明种小鼠,雄性,体重(18~22)g,河

北医科大学实验动物中心提供,动物合格证号 DK0406-0014。取心电图检查无异常者 100 只,实验前适应性喂养 1 周。

**1.2 仪器** XDH-B 型心电图机,上海医用电子仪器厂;Humalyzer 2000 型半自动生化分析仪,美国;TDL-5-A 型离心机,上海安亭科学仪器厂;微波仪,浙江临安电子器材厂;BHS 光学显微镜,日本 Olympus 公司。

**1.3 试剂** 超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(批号 040218)、丙二醛(MDA)试剂盒(批号 040125)、一氧化氮(NO)试剂盒(批号 040320)等均购自南京建成生物工程研究所;内皮型一氧化氮合酶(eNOS)免疫组化试剂盒(批号 040310)、一抗含辛合素-过氧化酶复合物(SP)试剂盒(批号 40310)、二抗、DAB(二氨基联苯胺)显色剂等均购自北京中山生物技术有限公司。

**1.4 药物** 当归芍药散,组成药物饮片均购自石家庄市乐仁堂中药厂;复方丹参滴丸,天津天士力制药股份有限公司,批号 20031108;垂体后叶素注射液(Pit),上海第一生化制药厂,批号 040301。

## 2 方法

**2.1 用药制备** 当归芍药散(煎剂)守原方比例(当归:芍药:川芎:茯苓:白术:泽泻为3:16:8:4:4:8)进行配方,其中芍药取白芍、赤芍各半。以当归临床常用量 10 g 为基础用量,按比例计算其他各药物用量,作为成人(60 kg 计)一日剂量,再据人与动物用药量体表面积换算法折算小鼠剂量。上述饮片水浸 30 min 后,常规水煎 3 次合并滤液,浓缩成含生药 1.0, 2.0 g·mL<sup>-1</sup>,低温保存备用。复方丹参滴丸药液:据人与动物用药量体表面积换算法计算小鼠用量,临用时以温蒸馏水溶化成 5.8 g·L<sup>-1</sup>。

**2.2 动物分组及模型复制** 100 只小鼠随机分成 5 组,每组 20 只,分别为空白组、模型组、DSS 低、高剂量组(含生药 30, 60 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)和阳性对照组(复方丹参滴丸 0.174 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)。DSS 高、低剂量组及阳性对照组均按 30 mL·kg<sup>-1</sup> ig 给予相应药物,空白组和模型组 ig 同体积蒸馏水,1 次/d,连续 5 d。末次药后 1 h,除空白组 ip 生理盐水外,其余各组均按文献[4] ip Pit 注射液 30 U·kg<sup>-1</sup> 造模。

### 2.3 检测指标及方法

**2.3.1 心电图检查** 每组各取 10 只小鼠,以 20% 乌拉坦溶液按 5 mL·kg<sup>-1</sup> ip 麻醉后,仰卧固定于操作台上,将 4 个针形电极按规定位置分别插入四肢皮下,检查记录注射 Pit 前 10 min 和注射后 5, 15, 25 min 等时间点的肢体 II 导联心电图。测定小鼠心率,比较各组间同一时间点的心率。

**2.3.2 血清 NO 的检测** 取每组另外 10 只小鼠,

在注射垂体后叶素后 30 min 处死,颈动脉取血,离心 10 min(3 000 r·min<sup>-1</sup>),分离血清。按试剂盒提供的方法(硝酸还原酶法)测定血清 NO 含量。

**2.3.3 心肌 eNOS 的检测** 用免疫组织化学法。取心尖同一部位心肌组织,置于 10% 中性福尔马林溶液中固定,常规制备石蜡切片,脱蜡至水;3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温孵育 10~15 min,蒸馏水洗 3 次;室温下用 0.4% 胃蛋白酶消化 15 min;室温下用 1% BSA(小牛血清白蛋白)封闭 10~15 min,倾去血清;滴加一抗,4 ℃ 过夜,PBS 漂洗;滴加生物素标记的二抗,微波 5 档,15 min,PBS 漂洗;滴加 SP 复合物,微波 5 档,15 min,PBS 漂洗;DAB 显色 5 min 左右(以镜下适度为好);蒸馏水洗 5 次;苏木精复染 1 min,水洗,1% 盐酸酒精分化,脱水、透明、封片;光学显微镜下观察 eNOS 阳性细胞分布情况(阳性部位为棕黄色),并采用 Motic Med 6.0 数码医学图像分析系统测定平均吸光度(A),以 A 代表 eNOS 活性。

**2.3.4 心肌 SOD, MDA 的测定** 取剩余近心尖部心肌组织,生理盐水制成 10% 匀浆,检测 SOD 活性和 MDA 含量(SOD 用黄嘌呤氧化酶法,MDA 用硫代巴比妥酸法)。

**2.4 数据处理** 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析,应用 SPSS 11.5 软件进行统计处理, $P < 0.05$  为有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 对小鼠心率的影响** 注射 Pit 前各组心率比较无显著性差异。注射 Pit 后 5, 15, 25 min,模型组比空白组的心率显著减慢( $P < 0.01$ ),表明造模成功。DSS 高、低剂量组及阳性药对照组与模型组比较,心率均有明显改善( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。见表 1。

表 1 当归芍药散对小鼠心率的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

分组	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	造模前 10 min	造模后 5 min	造模后 15 min	造模后 25 min
空白	-	642 ± 55	646 ± 44 <sup>2)</sup>	630 ± 44 <sup>2)</sup>	632 ± 34 <sup>2)</sup>
模型	-	635 ± 81	401 ± 104	394 ± 103	494 ± 110
当归芍药散	60	638 ± 92	488 ± 56 <sup>1)</sup>	516 ± 91 <sup>2)</sup>	587 ± 62 <sup>2)</sup>
	30	639 ± 68	479 ± 92 <sup>1)</sup>	507 ± 59 <sup>2)</sup>	579 ± 59 <sup>1)</sup>
复方丹参滴丸	0.174	642 ± 40	475 ± 70 <sup>1)</sup>	480 ± 103 <sup>1)</sup>	575 ± 79 <sup>1)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ (表 2~3 同)。

**3.2 对小鼠血清 NO 的影响** 模型组与空白对照组相比,血清 NO 水平显著下降( $P < 0.01$ )。DSS 高、低剂量组及阳性对照组与模型组相比,血清 NO 水平均显著升高( $P < 0.01$ )。DSS 高剂量组升高 NO 作用明显优于低剂量组和阳性对照组( $P < 0.01$ )。见表 2。

**3.3 对小鼠心肌 eNOS 活性的影响** 经免疫组织化学方法染色后,光学显微镜下显示,模型组 eNOS 活性弱于空白对照组;DSS 高、低剂量组及阳性对照组 eNOS 活性均强于模型组。图像分析结果显示,模型组与空白对照组相比,平均吸光度显著下降

表 2 当归芍药散对血清 NO 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

分组	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	NO/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
空白对照	-	39.71 ± 9.66 <sup>2,2)</sup>
模型	-	13.66 ± 3.83 <sup>3)</sup>
当归芍药散	60	79.35 ± 25.18 <sup>2)</sup>
	30	56.46 ± 18.24 <sup>2,3)</sup>
复方丹参滴丸	0.174	40.03 ± 15.38 <sup>2,3)</sup>

注:与当归芍药散高剂量组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ 。

( $P < 0.01$ )。DSS 高、低剂量组及阳性对照组与模型组相比,平均吸光度均显著升高 ( $P < 0.01$ )。见表 3。

表 3 当归芍药散对小鼠心肌 eNOS 活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

分组	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	A
空白对照	-	0.206 ± 0.025 <sup>1,2)</sup>
模型	-	0.176 ± 0.036
当归芍药散	60	0.259 ± 0.037 <sup>2)</sup>
	30	0.241 ± 0.029 <sup>2)</sup>
复方丹参滴丸	0.174	0.238 ± 0.025 <sup>2)</sup>

3.4 对小鼠心肌 SOD,MDA 的影响 与空白对照组比,模型组 SOD 活性明显降低 ( $P < 0.01$ ),MDA 含量明显升高 ( $P < 0.01$ )。DSS 高、低剂量组以及阳性对照组与模型组相比,SOD 活性明显升高 ( $P < 0.01$ ),MDA 含量明显降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。DSS 高、低剂量组间 SOD 活性及 MDA 含量均无显著差异。见表 4。

表 4 当归芍药散对心肌 SOD,MDA 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

分组	剂量	SOD	MDA
	/g·kg <sup>-1</sup>	/U·mg <sup>-1</sup>	/nmol·mg <sup>-1</sup>
空白	-	273.95 ± 36.87 <sup>2)</sup>	3.17 ± 0.45 <sup>2)</sup>
模型	-	222.78 ± 23.44	5.25 ± 1.42
当归芍药散	60	269.55 ± 20.65 <sup>2)</sup>	3.58 ± 1.01 <sup>2)</sup>
	30	263.58 ± 21.04 <sup>2)</sup>	4.22 ± 0.75 <sup>1)</sup>
复方丹参滴丸	0.174	264.89 ± 23.71 <sup>2)</sup>	4.06 ± 0.91 <sup>2)</sup>

#### 4 讨论

大剂量注射垂体后叶素,通过诱发动物冠状动脉发生痉挛而引起急性心肌缺血的造模方法简便有效,重复性好,多年来被广泛用于抗心肌缺血药物的筛选研究<sup>[3]</sup>。本实验小鼠造模后心电图表现为心率减慢甚至心律失常等,与文献报道较为一致,实验结果显示模型组心率显著减慢,证实心肌缺血模型复制成功。而 DSS 高、低剂量组小鼠心率减慢情况明显改善,说明当归芍药散能有效减轻心肌缺血。

血管内皮细胞在维持心血管稳态中起着重要作用,而内皮功能不全与冠心病心绞痛、急性心肌梗死、急性冠状动脉综合征等密切相关。NO 作为血

管内皮舒张因子,具有舒张血管平滑肌、维持血管张力、抑制血小板聚集等作用。NOS 作为 NO 合成的关键酶,其活性变化直接调节 NO 的生成量及其生物学效应。其中内皮型 (eNOS) 与冠心病关系较为密切,多项研究表明 eNOS 可改善冠脉内皮功能、舒张冠脉血管,调节对抗血小板积聚等过程,从而保护心肌细胞<sup>[5-7]</sup>。本实验结果显示,模型组血清 NO 含量显著下降,同时 eNOS 活性显著降低,表明造模后血管内皮功能发生障碍。DSS 高、低剂量组及阳性对照组血清 NO 含量显著升高,eNOS 活性增强,表明 DSS 能有效保护和改善内皮功能,提高 eNOS 活性,促进 NO 的产生与释放,舒张冠脉血管而发挥抗心肌缺血作用。

实验结果显示模型组心肌 SOD 活性显著下降,MDA 含量显著上升,表明在 Pit 导致的心肌缺血过程中,机体保护性因素减弱,自由基损伤因素增多。DSS 高、低剂量组 SOD 活性显著升高,同时 MDA 含量显著降低,表明 DSS 能提高机体 SOD 活性,增强机体清除氧自由基能力,从而抑制脂质过氧化损伤,保护心肌细胞。

以上说明当归芍药散能有效防治由 Pit 所致心肌缺血,保护心肌细胞。初步机制探讨表明,当归芍药散可改善内皮功能,通过提高 eNOS 活性,促进 NO 的产生与释放,舒张冠脉血管而发挥抗心肌缺血作用;能显著提高机体 SOD 活性,降低 MDA,通过抗氧化途径,抑制脂质过氧化反应,从而防止或减轻心肌细胞损伤。

#### [参考文献]

- [1] 陈静,叶平,阎艳丽,等. 当归芍药散防治高脂血症的实验研究[J]. 天津中医药,2005,22(6):493.
- [2] 阎艳丽,于永军,宋晓宇,等. 当归芍药散及煎剂对异丙肾上腺素所致大鼠心肌缺血的影响[J]. 辽宁中医杂志,2006,33(9):1023.
- [3] 郭瑶. 人类疾病的动物模型[M]. 北京:人民卫生出版社,1982:367.
- [4] 赵明奇,刘艳,赵丹泽. 通心络改善缺血心肌供血的 NO 机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2003,9(6):43.
- [5] 俞梦越,吴维力,高润霖. 内皮功能不全与冠心病[J]. 心血管病学进展,2002,23(4):391.
- [6] 王燕. 内皮功能障碍与冠心病[J]. 心血管病学进展,2004,25(5):326.
- [7] 魏丹宏,单江. 内皮型一氧化氮合酶与冠心病[J]. 浙江医学,2003,25(4):252.

[责任编辑 何伟]