

拆方研究降香总萜、降香黄酮、丹参酮在冠心丹参方中抗大鼠心肌细胞缺氧/复氧损伤作用

黄璜¹, 何欢¹, 王丹辉², 王金钱², 黄方威², 何秀菊², 刘丹¹, 范孜孜^{2*}, 何明^{1*}

(1. 南昌大学药学院药理学与分子治疗学教研室, 南昌 330006;

2. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 南昌 330006)

[摘要] **目的:**研究冠心丹参处方中,分别除去降香总萜和降香总黄酮,或是加入丹参酮,研究其对抗心肌细胞缺氧/复氧(A/R)损伤的保护作用,探讨各组相对药效的贡献。**方法:**取培养 4 d 的大鼠乳鼠心肌细胞,随机分为:对照组(Cont 组)、(1)A/R 组、(2)1% 的 DMSO 对照组、(3)冠心丹参组、(4)~(6)降香总萜与/和降香总黄酮阴性组、或是冠心丹参处方中分别加入终浓度为 1,2,4 mg 的丹参酮;检测细胞存活率、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(catalase)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性、丙二醛(MDA)含量及孵育液乳酸脱氢酶(LDH)活性。**结果:**在冠心丹参处方中分别除去降香总萜与/和降香总黄酮后,样品对抗心肌细胞的 A/R 的作用显著减弱,尤其以反映细胞抗脂质氧化状态指标 SOD, catalase, GPx 活性以及 MDA 含量更为明显;而加入丹参酮后,其对抗心肌细胞 A/R 的作用有不同程度的增强,尤其以反映细胞存活状态指标细胞存活率以及 LDH 更为明显,以 2 mg 丹参酮最为理想。**结论:**冠心丹参处方中在对抗心肌细胞 A/R 损伤的作用上,降香总萜和降香总黄酮不可缺如;加入 2 mg 丹参酮可增强其心肌保护作用。

[关键词] 冠心丹参胶囊; 心肌细胞; 缺氧/复氧损伤; 降香总萜; 降香总黄酮; 丹参酮

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)02-0191-04

[DOI] CNKI:11-3495/R.20111017.0942.013 **[网络出版时间]** 2011-10-17 9:42

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20111017.0942.013.html>

Separate Experimental Study of Effect of Lignum Acronylchiae Total Flavonoids, Lignum Acronylchiae Oil, Tanshinone in the Guanxin Danshen Capsule against Cardiomyocyt Anoxia/Reoxygenation Injury

HUANG Huang¹, HE Huan¹, WANG Dan-hui², WANG Jin-qian²,
HUANG Fang-wei², HE Xiu-ju², LIU Dan¹, FAN Mei-mei^{2*}, HE Ming^{1*}

(1. Department of Pharmacology & Molecular Therapeutics, Nanchang University School of Pharmaceutical Science, Nanchang 330006, China; 2. National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine, Nanchang 330006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the protective effect on cardiomyocyt against anoxia/reoxygenation (A/R) injury in Guanxin Danshen compounding of the best ratio, if lignum acronylchiae oil and/or lignum acronylchiae total flavonoids was removed, or tanshinone from salvia miltiorrhiza was added, of the contribution of various components on the efficacy. **Method:** Taken cultured neonatal rat ventricular cardiomyocytes for 4 days were randomly divided into seven groups: Control group; (1) A/R group; (2) 1% DMSO group; (3) the group treated with the best ratio; (4)-(6); these groups respectively treated with lignum acronylchiae oil and/or lignum

[收稿日期] 20110329(006)

[基金项目] 科技部国际科技合作项目(2006DFB33080)

[第一作者] 黄璜, 硕士研究生, 从事心肌急性损伤与保护研究, Tel:0791-6362231, E-mail:262371589@qq.com

[通讯作者] * 何明, 研究员, 博士生导师, 从事心血管药理研究, Tel:0791-7119623, E-mail:jxhm56@163.com

* 范孜孜, 研究员, 硕士生导师, 从事中药新药开发研究, Tel:0791-7117101, E-mail:f_mei@163.com

negative total flavonoids, or salviol of different dose 1, 2, 4 mg added; cell viability, superoxide dismutase (SOD), Catalase, glutathione peroxidase (GSH-Px) activities, malondialdehyde (MDA) contents and lactate dehydrogenase(LDH) activitied were detected. **Result:** In Guanxin Danshen compounding of the best ratio, the protective effect of cardiomyocyte against A/R injury was significantly decreased if lignum acronylchiae oil and/or lignum acronylchiae total flavonoids was removed, these changes of anti-lipid oxidation indexes such as SOD, Catalase, GSH-Px activities and MDA contents were more obvious than other indexes; Once salviol was added, the protective effect on cardiomyocyte against A/R was enchaned with different degree, especially LDH and cell viability was obvious and 2 mg salviol was the best protective effect. **Conclusion:** In the Guanxin Danshen compounding of the best ratio, lignum acronylchiae oil and lignum acronylchiae total flavonoids were necessary; Adding 2 mg salviol could enchaned the protective effect on cardiomyocyte.

[**Key words**] Guanxin Danshen capsule; cardiomyocyte; anoxia-reoxygenation injury; lignum acronylchiae oil; lignum acronylchiae total flavonoids; tanshinone

“冠心丹参胶囊”是《中国药典》2010 年版一部^[1] 收录的品种,由丹参、三七、降香油组成,临床上主要用于气滞血瘀所致的胸痹,症见胸闷刺痛、心悸气短。我们前期已经证明该处方中 4 个有效部位(丹参总酚酸、三七总皂苷、降香总萜、降香总黄酮)的不同的配比均有对抗心肌细胞 A/R 损伤的作用,且丹参不仅水溶性部分(丹参总酚酸)在治疗心血管疾病方面具有很好的疗效,丹参的脂溶性成分,尤其是丹参酮除了有抗菌消炎、抗肿瘤、类激素样作用外,还有抗血小板集聚、抗血栓、对缺血心肌的保护作用和钙拮抗作用等心血管方面的作用^[2-3]。本文采用大鼠乳鼠心肌细胞缺氧/复氧(A/R)损伤模型,考察丹参酮(液相法测得丹参酮 II_A、丹参酮 I 和隐丹参酮三者合计含量大于 30%)对处方药效的影响。

药典冠心丹参胶囊处方中降香油的用量(以总萜计)仅为其他 2 味药(以有效部位计)的 1/20 ~ 1/10,降香总黄酮是原药典方工艺中排除的部分,并未入药,因此本文采用大鼠乳鼠心肌细胞缺氧/复氧(A/R)损伤模型,考察丹参酮、降香总萜和降香总黄酮对处方药效的影响。

1 材料

1.1 药物 丹参总酚酸(含量 65%)、丹参酮(含量 51%)、三七总皂苷(含量 72%)、降香总黄酮(含量 55%)、降香总萜(含量 83%);中药固体制剂制造技术国家工程研究中心提供。

1.2 动物 清洁级 SD 新生大鼠(1~3 d),雌雄不拘,由江西中医学院医学实验动物中心提供,动物合格证编号为 SCXK(赣)2006-0001。

1.3 试剂 L-NAME,胰蛋白酶,Brdu,HEPES 均为 Sigma 公司产品;MTT, Ameresco 公司产品;乳酸脱

氢酶(LDH)试剂盒(批号 535-9903),Beckman 公司产品;丙二醛(MDA),超氧化物歧化酶(SOD),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px),过氧化氢酶(catalase)测定试剂盒(批号 637-1203),均为南京建成生物工程研究所产品;胎牛血清、MEM 培养基, Gibco Brl 公司;其余化学试剂均为国产分析纯。

2 方法

2.1 心肌细胞的分离培养 参照 Spector 等方法^[4],取出生 1~3 d 内 SD 乳鼠心脏,分离心室组织,经 0.1% 胰酶消化分离,用含 15% 胎牛血清的 MEM 培养基混悬后置 CO₂ 培养箱(5% CO₂, 37 °C)培养 2 h 去除成纤维细胞,将悬浮的心肌细胞过 200 目不锈钢网,计算细胞悬液中台盼蓝拒染的活细胞数,达 90% 以上。再分别按 5 × 10⁵/孔, 1 × 10⁵/孔接种于 24 孔培养板或 96 孔培养板内,于 CO₂ 培养箱培养,隔天换培养液,前 3 d 加入终浓度为 0.1 mmol·L⁻¹ Brdu 抑制纤维细胞生长。培养 4 d 随机分组进行实验。

2.2 心肌细胞 A/R 模型建立^[5] 心肌细胞生长接近融合状态时,对培养心肌细胞换用模拟缺氧缺糖溶液,置于持续 95% N₂-5% CO₂ 平衡的 A/R 装置(37 °C)中缺氧孵育 3 h 后,再换用模拟再灌注溶液于 95% O₂-5% CO₂ 复氧孵育 2 h。

2.3 降香总萜、降香黄酮在冠心丹参方中抗大鼠心肌细胞缺氧/复氧损伤药效影响研究 实验用培养 4 d 的心肌细胞,随机分为以下 7 组(n = 8)进行实验,实验分组为:正常对照组(Control);(1) A/R 组;(2) 1% 的 DMSO 对照组;在 A/R 组的基础上加入含有终浓度为 1% 的 DMSO;(3) 冠心丹参处方组;(4) 降香总萜阴性组;(5) 降香总黄酮阴性组;(6) 缺降香总萜和降香总黄酮阴性组;在(4)~(7)组中各孔

分别加入含有终浓度为1%的DSMO以及相应受试品处理的同时,进行A/R操作。

2.4 丹参酮在冠心丹参方中抗大鼠心肌细胞缺氧/复氧损伤药效影响 在冠心丹参处方中,分别加入丹参酮0,1,2,4 mg,另取心肌细胞分组进行实验($n=8$):实验分组为:正常对照组(Control),A/R组,1%的DSMO对照组,以及相应处理组。

2.5 观察指标及方法

2.5.1 细胞存活率 采用MTT比色法检测;96孔板每孔加入MTT($5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) $20\ \mu\text{L}$,继续培养4 h,再加入 $150\ \mu\text{L}$ DMSO,振荡10 min,用酶联免疫检测仪测定各孔细胞的490 nm吸光度(A)。设不含细胞只加孵育液的空白对照,记录结果。

$$\text{细胞存活率} = (\text{各试验组 } A / \text{对照组 } A) \times 100\%$$

2.5.2 生化检测 实验结束后各组分别取孵育液 $200\ \mu\text{L}$,Beckman生化自动分析仪测定LDH活性。用试剂盒测量心肌细胞SOD,catalase,GSH-Px活性以及MDA含量。

2.6 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用系统统计软件SPSS 11.5进行方差齐性检验、单因素方差分析,组间比较用LSD法; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 降香总萜、降香黄酮在冠心丹参方中抗大鼠心肌细胞缺氧/复氧损伤药效影响 当在冠心丹参处方中,分别除去降香总萜和降香总黄酮后,样品对抗心肌细胞的A/R的作用显著减弱,尤其以反映细胞抗脂质氧化状态指标SOD,catalase,GSH-Px活性以及MDA含量更为明显。见表1~2。

3.2 丹参酮在冠心丹参方中对心肌细胞缺氧/复氧损伤药效的影响 丹参酮在冠心丹参中的加入量及给药方案见表3。当在冠心丹参处方中,分别加入0,1,2,4 mg的丹参酮后,样品对抗心肌细胞的A/R的作用有不同程度的增强,尤其以反映细胞存活状态指标细胞存活率以及LDH更为明显,以2 mg丹参酮最为理想。结果见表4。

表1 降香总萜、降香黄酮在冠心丹参方中抗大鼠心肌细胞缺氧/复氧损伤药效影响实验方案

实验号	处方					
	A/R	DSMO/%	丹参总酚酸 /mg	三七总皂苷 /mg	降香总萜 /mg	降香总黄酮 /mg
1	+	-	-	-	-	-
2	+	1	-	-	-	-
3	+	1	27	48	2.625	13.26
4	+	1	27	48	0	13.26
5	+	1	27	48	2.625	0
6	+	1	27	48	0	0
Control	-	-	-	-	-	-

表2 降香总萜、降香黄酮在冠心丹参方中抗大鼠心肌细胞缺氧/复氧损伤药效影响

实验号	细胞存活率/%	LDH/ $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$	SOD/ $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$	catalase/ $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$	GPX/ $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$	MDA/ $\text{nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$
1	43.0 ¹⁾	53.0 ¹⁾	0.9 ¹⁾	4.8 ¹⁾	23.0 ¹⁾	11.0 ¹⁾
2	41.0 ¹⁾	54.0 ¹⁾	2.8 ¹⁾	4.6 ¹⁾	24.0 ¹⁾	10.9 ¹⁾
3	69.0 ²⁾	23.0 ²⁾	10.0 ²⁾	13.8 ²⁾	70.0 ²⁾	2.9 ²⁾
4	52.0 ³⁾	42.0 ³⁾	4.4 ⁴⁾	6.8 ⁴⁾	42.0 ⁴⁾	6.1 ⁴⁾
5	53.0 ³⁾	40.0 ³⁾	4.0 ⁴⁾	6.7 ⁴⁾	41.0 ⁴⁾	6.3 ⁴⁾
6	51.0 ³⁾	43.0 ³⁾	4.2 ⁴⁾	6.9 ⁴⁾	40.0 ⁴⁾	6.9 ⁴⁾
Control	90.0 ³⁾	5.0 ³⁾	8.5 ⁴⁾	11.8 ⁴⁾	52.0 ⁴⁾	3.8 ⁴⁾

注:与Control组比¹⁾ $P < 0.01$;与A/R组比²⁾ $P < 0.01$;与最佳配比方案组(实验号3)比³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表4同)。

表 3 丹参酮在冠心丹参方中抗大鼠心肌细胞缺氧/复氧损伤药效影响实验方案

实验号	处方						
	A/R	DSMO /%	丹参总酚酸 /mg	三七总皂苷 /mg	降香总萜 /mg	降香总黄酮 /mg	丹参酮 /mg
1	+	-	-	-	-	-	-
2	+	1	-	-	-	-	-
3	+	1	27	48	2.625	13.26	0
4	+	1	27	48	0	13.26	1
5	+	1	27	48	2.625	0	2
6	+	1	27	48	0	0	4
Control	-	-	-	-	-	-	-

表 4 丹参酮在冠心丹参方中抗大鼠心肌细胞缺氧/复氧损伤药效的影响

实验号	细胞存活率/%	LDH/U·mL ⁻¹	SOD/U·mL ⁻¹	Catalase/U·mL ⁻¹	GSH-Px/U·mL ⁻¹	MDA/nmol·mL ⁻¹
1	43.0 ¹⁾	55.0 ¹⁾	3.0 ¹⁾	5.1 ¹⁾	25.0 ¹⁾	10.8 ¹⁾
2	44.0 ¹⁾	54.0 ¹⁾	2.9 ¹⁾	5.0 ¹⁾	26.0 ¹⁾	11.2 ¹⁾
3	67.0 ²⁾	24.0 ²⁾	10.8 ²⁾	13.9 ²⁾	70.0 ²⁾	2.9 ²⁾
4	71.0 ³⁾	22.0 ³⁾	9.6	13.8	69.0	4.1 ³⁾
5	74.0 ³⁾	18.0 ³⁾	10.9	12.6	70.0	4.0 ³⁾
6	73.0 ³⁾	18.0 ³⁾	9.5	12.5	71.0	3.5 ³⁾
Control	91.0	4.0	8.8	11.5	53.0	3.4

4 讨论

心血管病是中老年人易患的常见病和多发病。随着我国人口老龄化趋势的加剧,心血管病日益突出,成为致残致死的首要原因,日益严重地威胁着人类的健康和生命。

“冠心丹参胶囊”是临床治疗冠心病心绞痛的药典方,方中丹参活血化瘀为君药;降香活血化瘀,增强君臣药活血化瘀的作用,为佐使。现代药理学研究发现:降香有效部位降香总萜和降香总黄酮,具有提高血小板 cAMP 水平,对血浆纤溶酶活性有显著促进作用,并具有抑制血栓、抗凝、抗心肌缺血和增加冠脉流量^[6];丹参脂溶性部位丹参酮具有降低心肌耗氧量,减慢心率和增加心肌收缩力的作用^[7]。本研究也发现在冠心丹参处方中,分别除去降香油或/和降香总黄酮后,对抗心肌细胞 A/R 的作用显著减弱,尤其以反映细胞抗脂质氧化状态指标尤为明显,由此可见,降香总萜尽管处方用量极低、降香总黄酮在原药典方中经加工并未入药,却均是不可缺如重要组分;冠心丹参中加入丹参酮后,其对抗心肌细胞 A/R 的作用增强,尤其以反映细胞存活状态指标更为明显,而最为理想的 2 mg 丹参酮配比比例,说明尽管丹参酮用量不到丹参总酚的 1/

10,含量也只有 30%,但对处方的药效作用是积极的。

[参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S]. 2010:966.
- [2] 杨艺.丹参酮药理作用近识[J].湖北中医杂志,1999,21(6):284.
- [3] 高秀梅,张伯礼.丹参及提取物对心血管系统药理作用研究进展[J].天津中医药,2002,19(1):74.
- [4] D Liu, H He, G L Li, et al. Mechanisms of chloride in cardiomyocyte anoxia-reoxygenation injury: the involvement of oxidative stress and NF-kappa B activation [J]. Mol Cell Biochem, 2011,355:201.
- [5] Chen H P, Liao Z P, Huang Q R, et al. Sodium ferulate attenuates anoxia/reoxygenation induced calcium overload in neonatal rat cardiomyocytes by NO/cGMP/PKG pathway[J]. Eur J Pharmacol, 2009, 603: 85.
- [6] 晔慧,沙明.中药降香研究进展[J].辽宁中医学院学报,2003,5(2):90.
- [7] 高枫,孙桂波,马博,等.丹参活性成分作用机制研究的新进展[J].中药药理与临床,2009,25(4):90.

[责任编辑 聂淑琴]