

小红参乙酸乙酯部位抗心肌缺血活性研究

曹东^{1*}, 张国伟², 金风丽¹

(1. 云南中医学院, 昆明 650200; 2. 河北大学中医学院, 河北保定 071002)

[摘要] **目的:** 筛选出小红参抗心肌缺血主要活性部位, 研究其抗心肌缺血活性。**方法:** 通过去甲肾上腺素 (norepinephrine, NE) 诱导大鼠离体主动脉环收缩试验筛选小红参石油醚、乙酸乙酯、正丁醇、水部位, 以主动脉环张力为观测指标, 供试物浓度依次为 1.5×10^{-3} , 5×10^{-3} , 1.5×10^{-2} , 5×10^{-2} , $5 \times 10^{-1} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 确定小红参抗心肌缺血活性部位为乙酸乙酯部位, 进一步进行此部位小鼠常压耐缺氧试验、家兔血小板聚集试验和抗垂体后叶素 (pituiratin, Pit) 致大鼠心肌缺血试验。**结果:** 小红参乙酸乙酯舒张主动脉环效应明显强于其他 3 个部位, 可能是小红参抗心肌缺血主要部位; 小红参乙酸乙酯部位有一定抗小鼠常压耐缺氧作用, 可显著抑制家兔血小板聚集活性, 改善 Pit 致大鼠心肌缺血程度, 明显增强大鼠心肌缺血模型血清 SOD 活性, 降低 MDA 含量; $1.17 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 小红参乙酸乙酯能改善 Pit 致大鼠心肌缺血程度, 缺血后 5 min T 波变化百分率为 $8.6\% \pm 3.6\%$, 明显增强大鼠心肌缺血模型血清 SOD 活性, 降低 MDA 含量。**结论:** 小红参乙酸乙酯部位可能是小红参抗心肌缺血的主要活性部位。

[关键词] 小红参; 乙酸乙酯部位; 心肌缺血

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)09-0209-04

Effects of Ethyl Acetate Extraction of *Rubia yunnanensis* on Anti-myocardial Ischemia in Rats

CAO Dong^{1*}, ZHANG Guo-wei², JIN Feng-li¹

(1. Yunnan College of Chinese Medicine, Kunming 650200, China;

2. College of Chinese Medicine, Hebei University, Baoding 071002, China)

[Abstract] **Objective:** To determine the main active extraction of *Rubia yunnanensis* and verified its anti-myocardial ischemia activity. **Method:** Norepinephrine (NE) induced contraction activity of rat arterial link with different concentration of extract of *R. yunnanensis* (1.5×10^{-3} , 5×10^{-3} , 1.5×10^{-2} , 5×10^{-2} , $5 \times 10^{-1} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) was compared. The main active extraction was ethyl acetate extraction. Then activity of the ethyl acetate extraction was verified by researches, including mouse hypoxia tolerance under normal pressure, platelet aggregation induced by adenosine disphosphate (ADP) and action on rat myocardial ischemia induced by pituitrin (Pit). **Result:** The results showed ethyl acetate extraction had significant anti-myocardial ischemia effects that included prolong mouse living time, inhibited ADP induce platelet aggregation, improved myocardial injury induced by Pit, also strengthened the activeness of SOD and reduced MDA content obviously. **Conclusion:** The ethyl acetate extraction could be the main active extraction of *R. yunnanensis* for anti-myocardial ischemia.

[Key words] *Rubia yunnanensis*; ethyl acetate extraction; myocardial ischemia

小红参, 又名云南茜草, 是茜草科茜草属植物滇茜草 *Rubia yunnanensis* (Franch.) Diels 的干燥根及

[收稿日期] 20101112(004)

[基金项目] 云南省科技计划项目(2007C225M)

[通讯作者] *曹东, 副教授, 从事中药药理与应用研究, Tel:13700694219, E-mail:caodong6110@126.com。

根茎,为云南省特有的民族药,分布于云南省丽江、红河、怒江及滇中地区^[1],云南省楚雄州已成功大面积栽培,药源丰富。前期研究表明,小红参对冠心病、心绞痛有一定治疗作用,小红参提取物具有一定的抗心肌缺血作用^[2]。我们对小红参 95% 乙醇提取物用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取,用大鼠离体主动脉环试验和进行筛选,结果表明小红参乙酸乙酯部位活性最强,为进一步明确小红参乙酸乙酯部位抗心肌缺血活性,以此活性部位进行小鼠常压耐缺氧试验、家兔血小板聚集试验和抗 Pit 致大鼠心肌缺血。

1 材料

1.1 药物与试剂 小红参,购于云南鸿翔中草药有限公司,经云南中医学院鉴定教研室鉴定;小红参石油醚、乙酸乙酯、正丁醇及水部位自制;普萘洛尔(propranolol),江苏林海药业有限公司生产(030610);盐酸异丙肾上腺素注射液(isoprenaline hydrochloride),上海禾丰制药有限公司生产(041102);去甲肾上腺素(NE),上海禾丰制药有限公司生产(041006);乙酰胆碱(acetylcholine, Ach),Sigma 公司产品(033k2604);ADP, Sigma 公司产品(A2754);阿司匹林(Aspirin, ASP),昆明友谊制药厂惠赠;垂体后叶素(Pit),上海第一生化药业有限公司(040403);SOD,MDA 试剂盒,南京建成生物工程研究所(20060607)。

1.2 仪器 RM6280C 多道生理信号采集处理系统,成都仪器厂;LBY-NJ 血液凝聚仪,北京普利生仪器有限公司;BL-420E 生物信号采集系统,成都泰盟科技有限公司。

1.3 动物 雄性 SD 大鼠,220 ~ 300 g,SPF 级,合格证号 SCXK(滇)2005-0010;大耳白兔,2.0 ~ 2.5 kg,合格证号滇实动证第 2005-0007;昆明种小鼠 18 ~ 22 g,合格证号 SCXK(滇)2005-0010;以上均购自昆明艾尼莫实验动物养殖中心。

2 方法

2.1 小红参 4 种提取物对 NE 预收缩大鼠主动脉环张力的影响 取雄性大鼠 40 只,随机分为 4 组,参照文献方法^[3],在 K-H 液并通入含 95% O₂ + 5% CO₂ 的混合气体中制作胸主动脉环。用 BL-420E 生物信号采集系统记录血管环张力变化,血管环的初始张力设为 2 g,动脉环舒张反应用舒张幅度占最大收缩幅度百分比表示。采用内皮完整的血管环,加

入 NE (10⁻⁷ mol·L⁻¹),待血管环收缩达到稳定后,以二甲基亚砷溶解供试物,用累积加药方法,逐步增加小红参石油醚、乙酸乙酯、正丁醇及水部位浓度。

2.2 小红参乙酸乙酯部位对 ADP 诱导家兔血小板聚集率的影响 自清醒家兔颈总动脉取血,参照文献方法^[4,5],以 3.8% 枸橼酸钠(血与抗凝剂体积比为 9:1)抗凝后收集于塑料离心管中,以 1 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上层液即为富血小板血浆(platelet rich plasma, PRP),继以 3 000 r·min⁻¹ 离心 20 min,取上层液即为贫血小板血浆(plateletpoor plasma, PPP),PPP 用以调零和稀释 PRP 中的血小板数。用 LBY-NJ2 血液凝聚仪进行血小板聚集功能测定,溶媒(二甲基亚砷)或药物(小红参乙酸乙酯部位和阿司匹林,二甲基亚砷溶解,30 μL)与 PRP(270 μL)在 37 °C 比浊杯内孵育 5 min,加入搅拌子,继加入诱导剂 ADP(终浓度 7 μmol·L⁻¹),测试并记录 5 min 内最大聚集率,以[(溶媒组聚集率 - 样品组聚集率)/溶媒组聚集率] × 100% 计算血小板聚集抑制率。

2.3 小红参乙酸乙酯部位对小鼠常压耐缺氧的影响 取小鼠 50 只,按表 3 所示随机分为 5 组,除心得安组 ip 外,其余各组均 ig 给药,连续 3 d,末次给药 1 h 后,各小鼠皮下注射异丙肾上腺素(10 mg·kg⁻¹),15 min 后,将各组小鼠分别放入装有 10 g 钠石灰的 250 mL 磨口瓶内,每瓶放 1 只小鼠,瓶口涂凡士林密闭,立即观察各鼠活动情况,直至死亡,记录存活时间,求得各组小鼠平均存活时间。

2.4 小红参乙酸乙酯部位对垂体后叶素致大鼠心肌缺血的影响 参照文献方法^[6]制备 Pit 致大鼠心肌缺血模型。于实验前 1 d,用 Pit(0.35 u/kg)舌下静脉注射,筛选敏感大鼠,观察 II 导联心电图变化情况,以 ST 段抬高和 T 波明显抬高超过 0.1 mV 的大鼠用于实验。24 h 后,选取敏感大鼠 32 只,随机分为 4 组,正常对照组(等体积生理盐水)、模型组(等体积生理盐水)、硝酸异山梨酯组(2.47 mg·kg⁻¹)、小红参乙酸乙酯部位组(1.17 g 生药/kg)。按组别分别 ig 给药,1 h 后用 3% 戊巴比妥(30 mg·kg⁻¹) ip 麻醉,连接 RM6280C 多道生物信号采集系统,描记 II 导联心电图。正常对照组舌下静脉注射生理盐水,其余组别大鼠舌下静脉注射 Pit 0.35 u·kg⁻¹,5 s 内匀速注射,分别描记每只大鼠缺血前 II 导联心电图并连续描记,计算缺血后 15,30 s,1,2,3,4,5 min T 波变化百分率。

T波变化率=(缺血后T波峰值-缺血前T波峰值)/缺血后T波峰值×100%

2.5 小红参乙酸乙酯部位对垂体后叶素致大鼠心肌缺血后血清SOD、MDA的影响 观察小红参乙酸乙酯部位抗Pit致大鼠心肌缺血模型3h后,收集血液,制备血清,测定SOD和MDA。

2.6 统计方法 以SPSS 11.5 统计分析。实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以Dunnett's t test方法评价数据统

计性差异, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 小红参4种提取物对NE预收缩大鼠主动脉环张力影响 试验结果表明,小红参乙酸乙酯部位舒张效应明显强于其他3个部位,并具有一定的浓度相关性(表1),为小红参对NE预收缩大鼠主动脉环张力主要活性部位。

表1 小红参不同提取物不同终质量浓度对NE预收缩主动脉环张力的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

%

组别	不同终质量浓度($g \cdot L^{-1}$)动脉环舒张幅度				
	1.5×10^{-3}	5×10^{-3}	1.5×10^{-2}	5×10^{-2}	5×10^{-1}
生理盐水组	15.8 ± 6.83	58.2 ± 6.98	68.6 ± 15.63	78.9 ± 21.61	98.6 ± 36.21
小红参石油醚部位	17.4 ± 9.90 ²⁾	59.9 ± 19.02 ¹⁾	97.9 ± 15.98 ²⁾	131.8 ± 11.02	193.8 ± 37.76
小红参乙酸乙酯部位	61.1 ± 31.81	95.6 ± 27.72	122.5 ± 9.05	152.7 ± 32.10	253.6 ± 86.83
小红参正丁醇部位	43.5 ± 7.64	8.1 ± 5.44 ¹⁾	74.5 ± 19.87 ²⁾	99.5 ± 10.07 ²⁾	137.1 ± 47.31 ²⁾
小红参水部位	17.2 ± 7.90 ²⁾	71.9 ± 15.04 ²⁾	105.7 ± 25.06	113.7 ± 19.52 ¹⁾	142.7 ± 41.07 ¹⁾

注:与小红参乙酸乙酯部位比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 小红参乙酸乙酯对血小板聚集及小鼠常压耐缺氧影响 小红参乙酸乙酯部位浓度超过 $1g \cdot L^{-1}$ 时,有较强的抗血小板聚集作用,并有较好的剂量相关性(表2);小红参乙酸乙酯部位低、中、高剂量组均有一定的抗小鼠常压耐缺氧作用,但量效关系不明显(表3)。

表2 小红参乙酸乙酯提取物对ADP诱导血小板聚集的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	质量浓度/ $g \cdot L^{-1}$	聚集率/%	抑制率/%
对照	-	37.8 ± 3.1	-
ASP	2.5	20.2 ± 4.4 ²⁾	46.6
小红参	0.1	35.2 ± 4.1	6.9
	1	11.1 ± 2.6 ²⁾	70.6
	10	4.0 ± 1.8 ²⁾	89.4

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表3同)。

表3 小红参乙酸乙酯部位对小鼠常压耐缺氧的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	存活时间/min
对照	-	16.3 ± 3.0
异丙肾上腺素	0.020	24.2 ± 3.9 ²⁾
小红参	3.9	25.8 ± 4.6 ²⁾
	11.7	24.4 ± 4.5 ²⁾
	19.5	25.4 ± 2.7 ²⁾

3.3 小红参乙酸乙酯部位对垂体后叶素致大鼠心肌缺血的影响 在小红参乙酸乙酯部位对垂体后叶素致大鼠心肌缺血的影响实验中,模型组大鼠注射Pit后T波即刻明显抬高,30s时达到高峰,即出现第1期心电图变化,于注射Pit30s出现T波低平、双相、倒置,心率减慢,P-R及Q-T间期延长等第2期心电图变化。硝酸异山梨酯组及小红参乙酸乙酯部位组均能对抗Pit引起的大鼠第1期和第2期的心电图变化,与模型组比较差异有非常显著性意义($P < 0.01$)(表4)。硝酸异山梨酯组、小红参乙酸乙酯部位组均能明显增强SOD活性,降低MDA含量(表5)。

4 讨论

心血管疾病是严重危害人类健康的常见病、多发病,随着社会人口的老年化,发病率日渐上升,心肌缺血为心血管常见疾病。从民族药中发现有心血管活性药物部位并以此为基础进一步研究副作用少、生物利用度高的抗心肌缺血药物具有重要的实用价值。小红参为云南特有民族药,前期研究证实其提取物具有一定的心血管活性^[2]。Pit是从动物脑内提取的含加压素和催产素物质。加压素能直接使血管特别是毛细血管和小动脉收缩,包括冠状动脉收缩,从而使血压升高、心肌缺血缺氧,在心电图上表现为心肌缺血的变化,因此Pit致急性心肌缺血

表 4 小红参乙酸乙酯部位对 Pit 性大鼠 II 导联心电图的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	缺血后/%						
		15 s	30 s	1 min	2 min	3 min	4 min	5 min
对照	-	0.2 ± 0.1 ¹⁾	0.1 ± 0.1 ¹⁾	0.0 ± 0.1 ¹⁾	0.2 ± 0.1 ¹⁾	0.2 ± 0.1 ¹⁾	0.1 ± 0.1 ¹⁾	0.2 ± 0.1 ¹⁾
模型	-	27.8 ± 3.6	48.6 ± 4.5	41.0 ± 4.7	40.1 ± 5.4	39.0 ± 4.7	31.2 ± 3.8	36.5 ± 5.6
硝酸异山梨酯	2.47 × 10 ⁻³	8.6 ± 1.6 ¹⁾	9.5 ± 4.3 ¹⁾	9.0 ± 3.7 ¹⁾	7.2 ± 2.3 ¹⁾	7.1 ± 2.5 ¹⁾	8.0 ± 2.8 ¹⁾	9.6 ± 2.6 ¹⁾
小红参乙酸乙酯部位	1.17	8.2 ± 2.6 ¹⁾	6.9 ± 2.5 ¹⁾	8.0 ± 2.0 ¹⁾	7.8 ± 3.4 ¹⁾	8.1 ± 2.7 ¹⁾	8.5 ± 2.8 ¹⁾	8.6 ± 3.6 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ P < 0.01。

表 5 小红参乙酸乙酯部位对 Pit 性大鼠血清中 SOD,MDA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	SOD/μU·L ⁻¹	MDA/mol·L ⁻¹
对照	-	200 ± 10.3	12.3 ± 4.3
模型组	-	160.5 ± 18.9 ¹⁾	15.9 ± 3.6 ¹⁾
硝酸异山梨酯	2.47 × 10 ⁻³	190.9 ± 20.3 ²⁾	13.6 ± 5.4 ²⁾
小红参乙酸乙酯部位	1.17	178.5 ± 16.3 ²⁾	10.8 ± 3.2 ²⁾

注:与对照组比较¹⁾ P < 0.01;与模型组比较²⁾ P < 0.01。

模型广泛应用于抗心肌缺血药物的研究^[6]。SOD 是机体清除氧自由基的重要酶类,可作为反映氧自由基清除能力的指标;MDA 为脂质过氧化反应中间产物,常被作为观察氧自由基生成和造成细胞膜损伤的指标^[7];二者可间接反映机体内细胞损伤的轻重。

对小红参进行的抗心肌缺血有效部位筛选的结果表明,小红参乙酸乙酯是活性最强的部位,并有剂量相关性。进一步开展的小红参乙酸乙酯部位小鼠常压耐缺氧试验、家兔血小板聚集试验和抗 Pit 致大鼠心肌缺血在体试验表明,小红参乙酸乙酯萃取部位能抗小鼠常压耐缺氧,显著抑制家兔血小板聚集活性,改善 Pit 致大鼠心肌缺血程度,明显增强大鼠心肌缺血模型血清 SOD 活性,降低 MDA 含量,对心肌细胞有一定保护作用,具有较强的抗心肌缺血活性。由此得出结论,小红参乙酸乙酯部位为小红参抗心肌缺血的主要活性部位,值得进一步深入研究。

[参考文献]

[1] 兰茂.滇南本草整理组.滇南本草(卷2)[M].2版.昆明:云南人民出版社,1975:349.

[2] Wang S X, Liu J X. Extract of *Rubia yunnanensis* (Franch) diels, fraction II-A. Its protective action against experimental myocardial ischemia and effect on cardiac hemodynamics in dogs [J]. J Tradit Chin Med, 1987,7(4):295.

[3] 徐叔云,卞如濂,陈修.药理实验方法学[M].3版.北京:人民卫生出版社,2002:1099.

[4] 李玲,李民,沈月毛,等.华北绣线菊二萜生物碱抗血小板聚集活性研究[J].天然产物研究与开发,2002,14(3):7.

[5] 李家明,赵永海,马逢时,等.川芎嗪芳酸衍生物的合成及抗血小板聚集活性[J].有机化学,2008,28(9):1578.

[6] Adachi Y, Suzuki Y, Hatanaka T, et al. The long-lasting anti-anginal effects of CP-060S in a rat model of arginine vasopressin-induced myocardial ischaemia [J]. J Pharm Pharmacol, 2002,54(3):413.

[7] 王道成,李七一,朱莹莹,等.冠心平对异丙肾上腺素致心肌缺血的试验研究[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(10):143.

[责任编辑 聂淑琴]