

甘附冲剂抗大鼠心动过缓及其作用机制的研究

李 东¹, 陈志武², 岑德意², 王迪生^{3*}

(1. 徐州生物工程高等职业学校, 江苏 徐州 221006; 2. 安徽医科大学, 安徽 合肥 230032;
3. 蚌埠医学院第二附属医院, 安徽 蚌埠 233040)

[摘要] 目的:探讨甘附冲剂抗大鼠心动过缓的可能作用机制。方法:用普萘洛尔(Pro)制备大鼠心率减慢模型;测定大鼠心肌组织中谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)、超氧化物歧化酶(SOD)的活性及丙二醛(MDA)的含量。放射免疫法测定心肌组织中环磷酸腺苷(cAMP)、环磷酸鸟苷(cGMP)及血浆中降钙素基因相关肽(CGRP)、内皮素(ET)的含量。结果:30, 90, 270 mg·kg⁻¹甘附冲剂可显著抑制Pro引起的大鼠心率减慢($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),和心肌组织中MDA含量的升高,提高大鼠血浆CGRP的含量,并可显著降低心肌组织中cGMP的含量,提高cAMP/cGMP比值($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);90, 270 mg·kg⁻¹甘附冲剂可增强大鼠心肌组织中SOD和GSH-PX的活性($P < 0.05$);甘附冲剂各剂量对大鼠心肌组织中cAMP含量及大鼠血浆ET含量并没有明显影响。结论:甘附冲剂抗大鼠心动过缓的作用可能与抗自由基、升高CGRP及调节cAMP和cGMP的平衡有关。

[关键词] 心动过缓;自由基;降钙素基因相关肽;环磷酸腺苷;环磷酸鸟苷

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)01-0068-04

The Study of Anti-bradycardic Effect and Mechanism of Ganfu Granule in Rats

LI Dong¹, CHEN Zhi-wu², CEN De-yi², WANG Di-sheng^{3*}

(1. Xuzhou Higher Vocational School of Bioengineering, Xuzhou 221006, China;

2. Anhui Medical University, Hefei 230032, China;

3. The Second Attached Hospital, Bangbu Medical College, Bangbu 233040, China)

[Abstract] **Objective:** To study the anti-bradycardic mechanism of Ganfu granule in rats. **Methods:** The bradycardic model in rats was induced by propranolol (Pro). the activity of glutathione peroxidase (GSH-PX), superoxide dismutase (SOD) and the content of Malonydialdehyde (MDA) in heart tissue were detected; the content of cyclic adenosine monophosphate (cAMP), cyclic guanosine monophosphate (cGMP) in heart tissue as well as the content of calcitonin gene-related peptide (CGRP), endothelin (ET) in plasma were detected by radioimmunoassay. **Results:** Ganfu granule (30, 90, 270 mg·kg⁻¹) significantly inhibited the Pro-induced decrease of heart rate in rats, reduced the content of MDA, cGMP in heart tissue, markedly increased the content of CGRP in plasma and the ratio of cAMP/cGMP in heart tissue. Gan granule (90, 270 mg·kg⁻¹) markedly increased the activity of SOD and GSH-PX in heart tissue; Compare with model group, the changes of the content of ET in plasma and cAMP in heart tissue were not obvious. **Conclusion:** The anti-bradycardic mechanism of Ganfu granule may be related to anti-free radicals, increasing CGRP, regulating the balance between cAMP and cGMP.

[Key words] bradycardia; free radicals; calcitonin gene-related peptide; cyclic adenosine monophosphate;

[收稿日期] 2009-04-02

[通讯作者] *王迪生, Tel: (0552)3927477; E-mail: wangdish3379@163.com

cyclic guanosine monophosphate

心动过缓是临床常见的心律失常之一,由于心输出量减少,可引起心、脑、肾等重要器官供血不足,产生一系列临床症状。在中国传统医学应属“心悸”、“怔忡”、“胸痹”、“眩晕”和“厥证”范畴^[1]。近年来,中医治疗心动过缓的临床报道较多,但对中药治疗该病机制的研究却不多。

甘附冲剂是由四逆汤加味组成的中药复方制剂,具有补气助阳的功效。本文通过普萘洛尔(Pro)心动过缓模型探讨了其抗心动过缓可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂 甘附冲剂,由蚌埠医学院第二附属医院提供,批号:20061012;普萘洛尔(Pro),汕头金石制药总厂出品,批号:20060815;水合氯醛,中国药集团上海化学试剂公司,批号:20060420;阿托品,金陵药业股份有限公司南京金陵制药厂,批号:20060319;超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘酞过氧化物酶(GSH-PX)、丙二醛(MDA)测试盒、考马斯亮兰蛋白测定试剂盒,均购自南京建成生物工程研究所,批号:20081006;环磷酸腺苷(cAMP)、双磷酸鸟苷(cGMP)放射免疫分析试剂盒,上海中医药大学核医学实验室提供,批号:20081030;内皮素(ET)、降钙素基因相关肽(CGRP)放免试剂盒,北京普尔伟业生物科技有限公司,批号:20081030。

1.2 仪器 TGL216H 高速离心机:珠海黑马医学仪器有限公司;756MC 紫外可见分光光度计,上海精密科学仪器有限公司;可控式恒温水浴锅,上海锦屏仪器仪表有限公司;DIAX900 内切式组织匀浆机,Hei-dolph 公司;LB-420E 生物机能实验系统,成都泰盟科技有限公司;DFM-96 型 16 管放射免疫 γ 计数器,上海中医药大学核医学实验室提供;多功能酶标仪(SPECTRAMax190),美国 MD。

1.3 动物 SD 大鼠,雌雄各半,由安徽医科大学实验动物中心提供,合格证号:皖医实动准第 01 号。

1.4 Pro 致大鼠心动过缓模型制备^[2] SD 大鼠 60 只,雌雄各半,体重 250 ~ 300 g。随机分成 6 组:正常组、模型组、阿托品组、甘附冲剂(30, 90, 270 mg · kg⁻¹) 3 个剂量组,每组 10 只。除正常组外,其余大鼠上午 ig Pro,下午分别 ig 生理盐水、阿托品、甘附冲剂,1 次/d,连续 7 d。10% 水合氯醛(300 mg ·

kg⁻¹)麻醉后,连接心电图机,检测各组大鼠末次给药后 30, 60, 120 min 时的心电图(ECG),比较各组大鼠心率的变化。实验结束后,立即断头取血、取出心脏,制备心肌匀浆,分别采用硫代巴比妥法和黄嘌呤氧化酶法测定心肌匀浆中 MDA 含量和 SOD 活性,二硫代二硝基苯甲酸法测 GSH-PX 活性。放射免疫法检测心肌匀浆中 cAMP、cGMP 和血浆中 ET 和 CGRP 的含量。各项检测均严格按试剂盒说明书操作。

1.5 统计学处理 实验结果用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)来表示,用 SPSS(13.0)软件进行 *t* 检验分析。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 甘附冲剂对 Pro 致心动过缓大鼠心率的影响 如表 1 所示,与正常组比较,模型组大鼠在末次给药后 30, 60, 120 min 时心率均有显著的减慢(*P* < 0.01)。与模型组比较,甘附冲剂 30 mg · kg⁻¹ 对 120 min 时心率减慢有显著的抑制作用(*P* < 0.05), 90 mg · kg⁻¹ 对 60, 120 min 时心率减慢及 270 mg · kg⁻¹ 对 30, 60, 120 min 时心率减慢分别有显著的抑制作用(*P* < 0.05 或 *P* < 0.01), 并呈一定的剂量依赖性。阿托品具有类似的作用。

表 1 甘附冲剂对 Pro 致大鼠心率减慢作用的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 剂量 (mg · kg ⁻¹) | 心率(次 · min ⁻¹) | | |
|-------|--------------------------------|----------------------------|------------------------|------------------------|
| | | 药后 30 min | 药后 60 min | 药后 120 min |
| 正常组 | - | 364 ± 52 ²⁾ | 335 ± 45 ²⁾ | 323 ± 54 ²⁾ |
| 模型组 | - | 234 ± 40 | 224 ± 35 | 203 ± 45 |
| 阿托品组 | 0.3 | 287 ± 22 ²⁾ | 315 ± 27 ²⁾ | 245 ± 35 ¹⁾ |
| 甘附冲剂组 | 270 | 282 ± 21 ²⁾ | 288 ± 37 ²⁾ | 280 ± 50 ²⁾ |
| | 90 | 236 ± 26 | 264 ± 38 ¹⁾ | 271 ± 26 ²⁾ |
| | 30 | 211 ± 42 | 205 ± 25 | 266 ± 53 ¹⁾ |

注:与模型组比较¹⁾ *P* < 0.05, ²⁾ *P* < 0.01(下同)

2.2 甘附冲剂对大鼠心肌组织中 MDA 含量和 GSH-PX、SOD 活性的影响 如表 2 所示,模型组大鼠心肌组织中 MDA 含量有明显升高(*P* < 0.01)。与模型组比较,0.3 mg · kg⁻¹ 阿托品及 30 ~ 270 mg · kg⁻¹ 甘附冲剂可显著抑制心肌组织中 MDA 含量的升高(*P* < 0.05 或 *P* < 0.01); 90, 270 mg · kg⁻¹ 甘附冲剂可增强大鼠心肌组织中 SOD 和 GSH-PX 的活性(*P* < 0.05)。

表 2 甘附冲剂对大鼠心肌组织中 MDA 含量和 SOD、GSH-PX 活性的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 剂量 (mg · kg ⁻¹) | MDA (nmol · g ⁻¹) | SOD (U · mgprot ⁻¹) | GSH-PX (U · mgprot ⁻¹) |
|-------|--------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|
| 正常组 | - | 76 ± 12 ²⁾ | 80.25 ± 27.22 | 504.34 ± 201.10 |
| 模型组 | - | 131 ± 22 | 89.53 ± 28.12 | 547.61 ± 146.79 |
| 阿托品组 | 0.3 | 66 ± 13 ²⁾ | 108.94 ± 18.35 | 634.72 ± 110.13 |
| 甘附冲剂组 | 270 | 70 ± 20 ²⁾ | 124.31 ± 22.05 ¹⁾ | 795.11 ± 221.21 ¹⁾ |
| | 90 | 67 ± 19 ²⁾ | 118.09 ± 29.62 ¹⁾ | 734.90 ± 185.89 ¹⁾ |
| | 30 | 100 ± 12 ¹⁾ | 105.74 ± 13.52 | 595.77 ± 179.90 |

2.3 甘附冲剂对大鼠血浆 ET、CGRP 含量的影响

如表 3 所示,模型组血浆 CGRP 含量与正常组相比无明显变化,甘附冲剂 3 个剂量组 CGRP 的含量高于模型组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);大鼠血浆 ET 含量,各组与模型组比较差异无统计学意义。

表 3 甘附冲剂对大鼠血浆 ET、CGRP 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 剂量 (mg · kg ⁻¹) | ET (pg · mL ⁻¹) | CGRP (pg · mL ⁻¹) |
|-------|--------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| 正常组 | - | 61.32 ± 17.34 | 80.32 ± 18.41 |
| 模型组 | - | 55.73 ± 14.79 | 84.59 ± 14.06 |
| 阿托品组 | 0.3 | 52.76 ± 10.53 | 69.41 ± 18.24 |
| 甘附冲剂组 | 270 | 58.76 ± 17.65 | 118.07 ± 13.70 ²⁾ |
| | 90 | 63.76 ± 16.45 | 106.10 ± 21.46 ¹⁾ |
| | 30 | 54.06 ± 17.67 | 99.75 ± 13.95 ¹⁾ |

2.4 甘附冲剂对大鼠心肌组织 cAMP、cGMP 含量的影响

如表 4 所示,各组 cAMP 水平,与模型组无明显差异。模型组 cGMP 水平显著高于正常组($P < 0.01$),与模型组比较,甘附冲剂 3 个剂量组及阿托品组 cGMP 水平显著下降($P < 0.01$)。甘附冲剂 3 个剂量组、正常组及阿托品组 cAMP/cGMP 比值均高于模型组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 4 甘附冲剂对大鼠心肌组织中 cAMP、cGMP 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 剂量 (mg · kg ⁻¹) | cAMP (pmol · g ⁻¹) | cGMP (pmol · g ⁻¹) | cAMP/cGMP |
|-------|--------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------|
| 正常组 | - | 33.92 ± 11.45 | 8.17 ± 1.21 ²⁾ | 4.16 ± 1.21 ²⁾ |
| 模型组 | - | 28.69 ± 9.01 | 13.02 ± 1.61 | 2.22 ± 0.65 |
| 阿托品组 | 0.3 | 25.41 ± 9.43 | 6.43 ± 1.65 ²⁾ | 4.24 ± 2.05 ²⁾ |
| 甘附冲剂组 | 270 | 34.63 ± 13.28 | 6.82 ± 2.19 ²⁾ | 4.58 ± 2.71 ¹⁾ |
| | 90 | 31.48 ± 10.79 | 6.80 ± 1.88 ²⁾ | 5.16 ± 2.45 ²⁾ |
| | 30 | 29.10 ± 12.61 | 8.38 ± 2.13 ²⁾ | 4.47 ± 1.95 ²⁾ |

3 讨论

自由基造成的脂质过氧化使膜脂质之间形成交联和聚合,这可间接抑制膜蛋白如钙泵、钠泵及 Na⁺/Ca²⁺ 交换蛋白等功能^[3]。细胞膜的这些改变对窦房结细胞电生理活动是不利的。MDA 是反映氧自由基产生及脂质过氧化程度的指标^[4]。SOD 和 GSH-PX 是体内重要的防御自由基毒害的抗氧化酶。本实验结果显示,模型组 MDA 水平增高,说明心动过缓病理模型大鼠体内脂质过氧化反应较强烈。灌胃给予甘附冲剂,可使大鼠心肌组织中 SOD 和 GSH-PX 活性升高,MDA 含量降低。研究提示了甘附冲剂可通过促进 SOD 和 GSH-PX 活性清除心肌自由基,这对改善心动过缓是非常有益的。

降钙素基因相关肽(CGRP)具有强大的扩张血管作用,可改善冠脉血流,对损伤心肌有保护作用^[5]。采用 Langendorff 法灌流心脏,CGRP 能使自主心率增加^[6]。中等浓度 CGRP(10 nmol · L⁻¹)可提高窦房结细胞的自律性^[7]。本实验结果显示,3 个剂量的甘附冲剂均可明显提高 CGRP 水平,这对心脏的供血、供氧,提高窦房结细胞的自律性发挥了一定的作用。

cAMP 和 cGMP 是机体内一对既相互拮抗又相互依存的生物活性物质——第二信使。在心脏,当 β1 受体激动时,使细胞内 cAMP 增加,心率增快,房室传导时间缩短,心肌收缩力增加。而当 M 受体激动时,使 K⁺ 外流增加,抑制腺苷酸环化酶,并可通过 cGMP 的增加,加速 cAMP 的代谢和抑制 L 型 Ca²⁺ 通道的活性,而产生与 cAMP 相反的作用,使心脏抑制^[8-9]。因此,维持二者的平衡与稳定在心动过缓的治疗中具有重要意义。在本实验中,与模型组比较,甘附冲剂及阿托品可显著降低模型组大鼠 cGMP 水平,显著提高模型组大鼠 cAMP/cGMP 比值,使其接近于正常水平。这表明,甘附冲剂可调节 cAMP 和 cGMP 平衡,维持 cAMP/cGMP 比值稳定。

内皮素对窦房结起搏细胞有明显的负性频率作用^[10]。在本实验中,甘附冲剂对 ET 含量并没有明显的影响,提示甘附冲剂的抗心动过缓作用可能与 ET 无关。

综上所述,甘附冲剂抗大鼠心动过缓的作用可能与抗自由基,升高 CGRP,调节 cAMP 和 cGMP 的平衡有关。

[参考文献]

- [1] 邢亚群,王迪生,陈国良. 中药治疗心动过缓初探及其药理分析[J]. 淮海医药,2003,21(3):239-240.
- [2] 王迪生. 心得快胶囊治疗药物诱发大鼠心动过缓的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2006,12(2):59-61.
- [3] 金惠铭. 病理生理学[M]. 北京:人民卫生出版社,2004:202-213.
- [4] Paradies G, Petrosillo G, Pistolese M, *et al.* Lipid peroxidation and alterations to oxidative metabolism in mitochondria isolated from rat heart subjected to ischemia and reperfusion[J]. *Free Radic Biol Med*,1999,27(1-2):42-50.
- [5] 谭建新,李岩松,黄宇戈,等. 降钙素基因相关肽对大鼠心肌缺血损伤的影响[J]. 中国病理生理杂志,2000,16(3):226-228.
- [6] NIU Wei-Zhen, GAO Yan-Li, LIU Ping, *et al.* A comparison of calcitonin gene-related peptide effects on coronary flow and cardiac conduction system in the guinea pig[J]. *Acta Physiologica Sinica*,2000,52(3):259-262.
- [7] 郭连峰,钮伟真,焦晓慧,等. 降钙素基因相关肽对家兔离体窦房结电生理活动的影响[J]. 生理学报,2000,52(2):163-166.
- [8] 姚泰. 生理学[M]. 北京:人民卫生出版社,2003:9-166.
- [9] Jean-Luc Balligand. Regulation of cardiac β -adrenergic response by nitric oxide[J]. *Cardiovascular Research*,1999(43):607-620.
- [10] Ono K, Masumiya H, Sakamoto A J, *et al.* Electrophysiological analysis of the negative chronotropic effect of endothelin-1 in rabbit sinoatrial node cells[J]. *J Physiol*,2001,537(Pt2):467-488.