

离体心脏灌流技术在抗心绞痛中药 生物活性检测中的应用初探

匡荣, 朱社敏, 倪维芳, 洪利娅*
(浙江省食品药品检验所, 杭州 310004)

[摘要] 目的: 初步研究离体心脏灌流法在抗心绞痛中药生物活性测定中的应用。方法: 用 Langendorff 法进行离体豚鼠心脏灌流, 测定丹参注射液、冠心宁注射液、香丹注射液、注射用丹参、丹红注射液 5 个抗心绞痛中药注射剂在给药前后的心脏冠状动脉流量的变化。结果: 以上 5 个注射剂在一定的浓度下均能扩张冠状动脉, 增加冠脉流量, 同一注射剂的不同批号在相同浓度下冠脉流量不一致。结论: Langendorff 离体心脏灌流法很有可能成为检测抗心绞痛中药的生物活性的理想方法, 值得进行深入研究。

[关键词] 离体心脏灌流; Langendorff 法; 抗心绞痛中药; 生物活性

[中图分类号] R285 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)09-0066-04

Earliest Investigation on Application of Isolated Heart Perfusion Technique to Evaluate Bioactivity of Antianginal Chinese Medicine

KUANG Rong¹, ZHU She-min, NI Wei-fang, HONG Li-ya*
(Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310004, China)

[Abstract] Objective: To investigate the application of isolated heart perfusion technique to evaluate the bioactivity of antianginal Chinese medicine. **Method:** Isolated guinea pig heart perfusion was performed with Langendorff method to measure the change in perfusion volume of coronary pre and after administrating the 5 antianginal Chinese medicines such as Danshen Injection, Guanxinmin Injection, Xiangdan Injection, Danhong Injection and Danshen for Injection. **Result:** All 5 injections above could dilate the coronary and increase the perfusion volume, but there was discrepancy in the increase of perfusion volume at the same dose of different lot number from same injection. **Conclusion:** It may be possible that Langendorff isolated heart perfusion technique would become a good method for evaluating the bioactivity of antianginal Chinese medicine and deserves further probe.

[Key words] isolated heart perfusion; Langendorff method; antianginal Chinese medicine; bioactivity

中药在自然环境条件下生长过程中生物合成各种成分, 是天然条件下产生的生物制品, 是祖国传统医学的宝库, 在治疗一些慢性病和心脑血管急重疾病中发挥越来越大的作用。中药具有活性成分的

不确定性和多变性的特点, 同样的一个品种, 如丹参注射液, 从国家食品药品监督管理局网站数据库可知, 全国有约 50 个厂家 101 个批准文号可以生产, 但由于药材产地、采收季节、处方组成、生产工艺等的不同, 导致不同厂家生产的产品和同一厂家生产的不同批次的产品的质量可能不完全相同。尽管近年来兴起的指纹图谱技术, 对中药的质量控制起到了一定的保障作用, 但也是远远不够的, 传统的质量标准理念对中药的质量控制仅仅是在物理和化学的层面上, 多未进行有效性控制。质量标准中含量测

[收稿日期] 20100320(003)

[第一作者] 匡荣, 副主任药师, 药理学博士, 硕士生导师, 主要从事药理毒理药品检验工作, Tel: 13989899796, E-mail: kuangrongyjs@hotmail.com

[通讯作者] * 洪利娅, 主任药师, 硕士生导师, 国家药典委员会委员, E-mail: hly@zjyj.org.cn

定用指标性物质未必是活性成分,起药效作用又可能不是单一成分。所以,怎样确保中药每一个批次的有效性(生物活性)已经成为我国药检药理工作者目前面临的重要课题,我国已将“中药生物活性测定指导原则”收载于 2010 年版《中国药典》一部附录中^[1]。近年来,广大中药和药检药理工作者对中药的“生物活性”研究进行了大量的工作,写出了很多心得和观点^[2-4],并进行了相关的研究^[5-9],一些思路和经验很值得借鉴,但这些心得和方法中均未提及离体心脏灌流法。

Langendorff 法是离体心脏灌流法的一种,排除了神经和体液的控制,适用于研究药物直接对哺乳类动物兔、豚鼠、大鼠和猫等离体心脏的影响,观察药物对冠脉流量的影响和对心肌功能的直接作用,已广泛用于药物对心脏功能的研究和心血管药物的筛选^[10-11]。有关该法用于药物生物活性的检测还未见报道,本文用 Langendorff 离体心脏灌流法考察了不同厂家生产的丹参注射液、冠心宁注射液、香丹注射液、注射用丹参、丹红注射液 5 种常用抗心绞痛中药注射剂对离体豚鼠心脏灌流的影响,将该法用于抗心绞痛中药“生物活性”的研究进行初步探索。

1 材料

1.1 动物 豚鼠,品系 hartley,浙江省余姚市建飞实验兔养殖场,生产许可证号 SCXK(浙)2006-0026,雄性,体重 300 ~450 g。

1.2 装置 由南京美易科技有限公司提供,如图 1 所示,主要由灌流瓶、恒压管、主动脉套管、心脏保温套管、超级恒温水浴,氧气瓶等组成,恒压管液面高度到心脏距离约为 70 ~75 cm,循环水浴保持(37.0 ± 0.5),调节氧气流量为每分钟约 20 ~25 个。

1.3 受试样品

1.3.1 丹参注射液 生产单位 A,批号 070707; B,批号 070112; C,批号 070204; D,批号 0809112。规格均为 10 mL。

1.3.2 冠心宁注射液 生产单位 E,批号 071027; F,批号 07052042; D,批号 0709303。规格均为 10 mL。

1.3.3 香丹注射液 生产单位 G,批号 080524,080526; D,批号 0904302。规格均为 10 mL。

1.3.4 丹红注射液 生产单位 H,规格 100 ml,批号 070632,070714;规格 10 mL,批号 070806。

1.3.5 注射用丹参 生产单位 I,批号 070705,

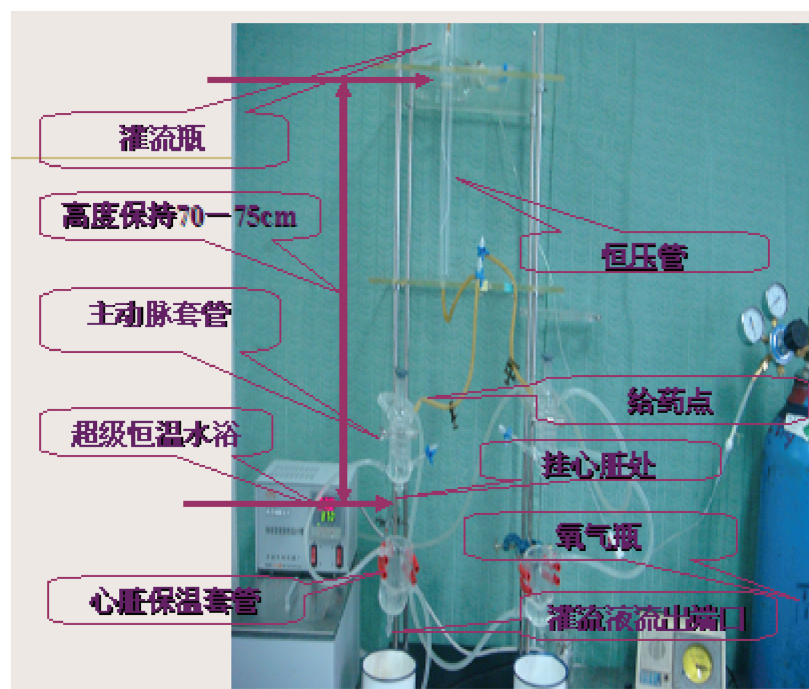


图 1 Langendorff 法离体心脏灌流装置

070704,070504。临用前取本品 1 支,加 0.9% 氯化钠注射液 10 mL。

2 方法

2.1 灌流液的配制 氯化钠 34.480 g,氯化钾 1.752 g,磷酸二氢钾 0.815 g,硫酸镁 1.48 g,碳酸氢钠 10.5 g,葡萄糖 9.91 g,加水 4 000 mL 使溶解,加 1% 氯化钙 70 mL,再加水至 5 000 mL,混匀,临用新配。

2.2 方法 取豚鼠,击昏,迅速打开胸腔取心脏(尽可能留长主动脉)放在冷的灌流液中,轻揉心脏挤出残留血液,修剪分离主动脉,注意勿伤心耳,将心脏的主动脉套在装置的主动脉套管上,用细线固定。打开控制阀让灌流液恒压流入心脏(注意不能让气泡流入心脏)。约 20 min 后,开始用量筒测量每分钟的心脏灌流量,连续测量 3 次的差值不大于 0.5 mL 即为稳定。用 1 mL 注射器从给药点处注入药液 0.3 mL/次,用量筒记录药液开始进入心脏时 1 min 内的冠脉流量(V_t),计算与给药前的冠脉流量(V_0)的差值(V)和冠脉流量增长百分率(P)。

3 结果

结果发现,丹参注射液、冠心宁注射液、香丹注射液、注射用丹参、丹红注射液 5 种常用抗心绞痛中药注射剂在一定程度上均可以增加离体豚鼠心脏冠脉流量,但同一剂量下不同厂家生产的同一个品种冠脉流量的增加不同,同一厂家生产的同一品种的不同批号结果也不一定相同,结果见表 1。

4 讨论

心肌梗死或心绞痛均是由于冠状动脉的某一处或分支堵塞而影响了心肌的血液供应所致,扩张冠状动脉的药物可以有效预防该类疾病的发生和缓解

表 1 5 种抗心绞痛中药注射剂对离体豚鼠心脏灌流的影响

品名	生产单位	批号	V_0 /mL	V_t /mL	V /mL	$P/\%$
丹参注射液	A	070707	7.9	9.2	1.3	16.5
	B	070112	7.9	9.4	1.5	19.0
	C	070204	7.4	8.2	0.8	10.8
	D	0809112	8.0	9.6	1.6	20.0
冠心宁注射液	E	071027	8.3	10.8	2.5	30.1
	F	07052042	7.6	10.8	3.2	42.1
	D	0709303	8.6	15.2	6.6	76.7
香丹注射液	D	0904302	7.4	8.6	1.2	16.2
		080524	7.6	8.4	0.8	10.5
		080526	7.6	8.5	0.9	11.8
丹红注射液	H	070632(100 mL)	7.9	9.0	1.1	13.9
		070714(100 mL)	7.4	8.5	1.1	14.8
		070806(10 mL)	7.4	8.5	1.1	14.8
注射用丹参	I	070704	8.2	9.4	1.2	14.6
		070705	8.0	9.4	1.4	17.5
		070504	8.8	11.0	2.2	25.0

注:冠心宁注射液给药 0.3 mL 有时对离体豚鼠心脏有毒性反应。

症状。左冠状动脉主要供应左心室的前部,右冠状动脉主要供应左心室的后部和右心室。左冠状动脉的血液流经毛细血管和静脉后,主要经由冠脉窦回流入右心房,而右冠状动脉的血液则主要经较细的心前静脉直接回流入右心房。另外还有一小部分冠脉血液可通过心最小静脉直接流入左、右心房和心室腔内。

在本装置中,心脏从体内取出之后挂到装置上,以一定压力、温度及充氧的灌流液经主动脉根部经冠状动脉口进入冠状血管再经过各级分支营养心脏后进入右心房,然后由腔静脉口和肺动脉口流出,也就是说灌流液从主动脉进入心脏,必须要经过冠状动脉和各级分支再流出心脏,其流出量即为冠状血管的流量,简称冠脉流量。

影响冠脉流量的因素有研究表明:

$$Q = \frac{P}{R} \quad R = \frac{8l}{r^4}$$

Q 为冠脉流量; P 为灌注压; R 为冠脉阻力; η 为黏滞系数; l 为血管长度; r 为血管半径。

若 P 恒定, l 不变, 那么 $Q \propto r^4$, 即冠脉流量与血管半径成正比。所以, 扩张冠状动脉, 增加冠状动脉半径的任何因素就可以增加冠脉流量, 这就是本方

法的理论基础。

结果显示, 上述几类临床用于扩张冠状动脉的药物利用本装置试验均具有一定的增加冠脉流量的作用, 说明该装置所检测的生物活性和该类药物的功能主治一致。但同时我们也发现, 同一剂量下不同厂家生产的同一个品种冠脉流量的增加不尽相同, 同一厂家生产的同一品种的不同批号结果也不一定相同, 说明这种方法对本类药物敏感, 可能存在量效关系, 可以用于抗心绞痛中药生物活性的比较。

本法的优点有 该法的原理符合《中国药典》2010 年版附录中中药生物活性测定指导原则所要求的测定指标需与该品种的功能主治相一致的原则^[1]; 本法所用的载体为离体心脏, 可以存活 2 ~ 3 h 或更长时间, 以后根据所订标准要求, 一个理想的心脏可以检测数批产品, 节省了动物, 符合实验动物的“3R”要求^[12]; 装置简单, 价廉, 操作方便, 试验在基层单位也能开展而且试验所用动物为豚鼠或大鼠, 易得; 试验结果以给药前后的灌流量的变化为指标, 可以准确量化; 本法如果研究成熟, 不仅可以用于该类中药注射剂的研究, 也可以用于对该类药物其它剂型如复方丹参片, 甚至于中药材的生物活性研究。

本法有生物检定方法存在变异大, 难重复的缺点。“生物活性”用于中药的质量控制是具有中国特色的检验理念和技术创新, 是我国药检药理人智慧的结晶, 肯定也会受实验动物、操作手法等等因素的影响面临很多困难和问题, 如方法的重复性、量效关系、最低检出浓度的确定(各个厂家产品有效性不一致)无法和化学检验相比等等, 本法肯定也不例外, 所以, “标准化”和“规范化”研究将是以后研究的重心, 需要进行大量的工作。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中国药典[S]. 一部. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 附录 132.

[2] 唐元泰, 芮菁. 关于中药标准采用“生物活性测定”项目的建议[J]. 中国药品标准, 2007, 8(6): 39.

[3] 肖小河, 金诚, 赵中振, 等. 论中药质量控制与评价模式的创新与发展[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(14): 1377.

[4] 邓文龙. 创建中药质量的药理学评价体系[J]. 中药药理与临床, 2001, 17(1): 1.

[5] 董培智, 朴晋华. 重组人脑钠肽生物活性质量控制方法及改进[J]. 基层医学论坛, 2007, 11(10): 898.

[6] 马莉, 金城, 李祖伦, 等. 生物检定与板蓝根质量控制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(2): 134.

[7] 欧阳杰湖, 潘善庆, 陈子渊. 注射用肌氨肽苷的生物活性测定[J]. 中国药品标准, 2009, 10(1): 32.

[8] 肖渊, 李娜, 李海芳, 等. 观察 12 种活血祛瘀类中药对鸡胚绒毛尿囊膜新生血管生成的影响[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(7): 1079.

[9] 芮菁, 韩晶, 唐元泰. 不同来源灯盏花素注射液“生物活性”质量的比较研究[J]. 中国药品标准, 2007, 8(4): 21.

[10] 孙燕, 金红芳, 魏红玲, 等. 巯基修饰剂对硫化氢的离体心脏灌流效应的影响[J]. 中国药理学通报, 2009, 25(4): 469.

[11] 李冰冰, 成希明, 陈君, 等. Langendorff 逆灌流制备特非那丁诱发尖端扭转室性心动过速模型[J]. 中国心血管杂志, 2006, 11(2): 92.

[12] 孙靖. 实验动物学基础[M]. 北京: 北京科学技术出版社, 2005, 7.

[责任编辑 顾雪竹]

《中国中药杂志》2010 年征订启事

《中国中药杂志》系中国科协主管, 中国药学会主办, 中国中医科学院中药研究所承办的综合性中药学术期刊。创刊于 1995 年 7 月, 是创早最早、发行量最大的中药学术刊物。《中国中药杂志》全面反映我国中医科研最高学术水平, 主要报道该领域新成果、新技术、新方法与新思路, 内容包括栽培、资源与鉴定、炮制、药剂、化学、药理、不良反应、临床等。设有专论、综述、研究论文、研究报告、临床、学术探讨、药事管理、经验交流、信息等栏目。主要读者对象为医药领域各级管理部门、科研院所、大专院校、企业以及医院等从事医药科研、管理、生产、医院制剂及临床研究等方面的专业人员。

《中国中药杂志》现为半月刊, 128 页, 2010 年定价每期 30 元, 全年 24 期定价为 720 元。国内刊号 11 - 2272/R, 国际刊号 1101 - 5302。

本刊现已全面实现网络编辑办公, 如欲投稿或联系本刊、获取本刊各种信息动态请登录中国中药杂志网站 www.cjcm.com.cn 或 www.中国中药杂志.com。

联系电话: 稿件查询 010 - 64045830 转 602; 主任电话 010 - 64058556; 资源与栽培栏编辑: 010 - 64048925; 制剂栏编辑: 010 - 64040392; 化学栏编辑: 010 - 64040113; 药理栏编辑: 010 - 84022522; 临床栏编辑: 010 - 64059766; 电子杂志制作发行及网上维护: 010 - 64030625。