

四逆汤体外对大鼠缺血胸主动脉环张力及其释放 NO 水平的影响

刘筱蔼¹, 吴伟康¹, 杨仕云²

(1. 广州中山医科大学, 广州 510080; 2. 广州南方航空公司, 广州 510230)

摘要: 目的: 本研究观察四逆汤(SND)扩张动脉的效应。方法: 通过测定 SD 大鼠胸主动脉环张力及 K-H 液中 NO 的浓度, 并与临床常用药硝酸甘油(NTG)作对照, 探讨四逆汤扩张动脉的效应及机制。结果: SND 和 NTG 均可诱导动脉环的舒张, 促进缺血动脉环 NO 的合成和释放, 但药物洗脱后, SND 仍能促进动脉环合成和释放 NO, 而 NTG 组动脉环合成和释放的 NO 却比单纯缺血组更少。结论: SND 扩张冠脉, 改善心肌供血的机理可能是其促进了内源性 NO 的产生。

关键词: 四逆汤; 扩张动脉; 一氧化氮

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2002)02-0028-03

缺血性心脏病是全球范围内威胁人类健康的主要疾病之一, 而心肌缺血是缺血性心脏病的主要病理生理过程。现阶段对于心肌缺血的治疗仍以药物治疗为主。为研制抗心肌缺血的中药, 本教研室对四逆汤(Sini decoction, SND)进行了系统的研究, 发现四逆汤对缺血心肌具有全面的保护效应, 其最根本的因素是它具有显著的扩张冠脉, 增加心肌营养血流量的作用, 但其扩张冠脉的机制还不清楚, 本研究从一氧化氮(Nitric oxide, NO)角度探讨其作用机制。

1 材料

1.1 动物 SD 大鼠, 280~350g, 雌雄各半, 由中山医科大学实验动物中心提供。

1.2 主要试剂、仪器 对氨基苯磺酸由北京芳草医药化工研制公司提供, 金属镉由上海试剂二厂提供, N-1-萘基乙二胺为 SIGMA 公司产品, 其余试剂购自中山医科大学试剂部。LMS-2B 二导生理记录仪, CJZ 型张力换能器, 721 分光光度计。

1.3 药物 四逆汤各单味药(附子 *Radix Aconiti Lateralis Preparata*: 四川产; 干姜 *Rhizoma Zingiberis*: 内蒙古产; 甘草 *Radix Glycyrrhizae*: 广东产)及硝酸甘油均购自中山医科大学附属第一医院药剂科。将附子、干姜、甘草按重量 5: 3: 2 的比例混合, 搅拌成碎

收稿日期: 2001-09-29

基金项目: 国家自然科学基金(No: 39770936); 广东省自然科学基金(No: 960113)

块,加适量蒸馏水浸泡 30min 后,武火煮沸改用文火,保持沸腾 30min,趁热过滤。药渣再加适量蒸馏水煎煮一次,合并两次滤液,经蒸发浓缩,使其终浓度为 1g 生药/毫升,置 4℃冰箱冷藏备用。

1.4 指标测定 心肌 NO 的测定用亚硝酸盐测定法^[1]。NO 的代谢产物 NO₃⁻ 经镉柱还原为 NO₂⁻ 后,可与对氨基苯磺酸发生重氮化,再与 N-1-萘基乙二胺偶合形成紫红色化合物,在 546nm 波长处存在吸收高峰,通过比色测定可知 NO 的浓度。

2 实验方法与结果

2.1 胸主动脉环张力的测定^[2] SD 大鼠,断头处死后行胸骨正中切口,开胸取出胸主动脉,取长约 4mm 血管环置于盛有 Krebs 液的实验浴槽内,持续通入 95% O₂ ~ 5% CO₂ 混合气,维持 K-H 液中 PO₂ 为 72 ± 2.67kPa,温度为 37 ± 0.5℃,每个环以金属钩一端固定在浴槽底部,另一端通过平衡杆连接张力换能器。预先在平衡杆的另一端加上 1g 砝码,使之承受 1g 的前负荷,并记录收缩幅度,平衡 30min。再调节张力微调器,使其承受 0.5g 的后负荷(使收缩幅度增加以前的一半,即为 0.5g),再平衡 30min。待其稳定后加入试剂,用生理记录仪记录等长张力。

2.2 动脉环缺血模型的建立 在胸主动脉环张力实验中,先使之承受 1g 的前负荷和 0.5g 的后负荷,平衡 1h 后,将孵育胸主动脉环的正常 K-H 液改为不含葡萄糖的 K-H 液,原先的 95% O₂ ~ 5% CO₂ 混合气体改为 95% N₂ ~ 5% CO₂,模拟缺血环境。

2.3 实验设置及结果

2.3.1 SND 对缺血动脉环合成和释放 NO 的影响 取相同节段、同一长度的胸主动脉环置于盛有 Krebs 液的实验浴槽内,实验分为三组:正常对照组、缺血组和 SND 组,每组 n = 8。缺血组 K-H 液中含有葡萄糖,并以 95% N₂ ~ 5% CO₂ 饱和;SND 组在缺血的基础上,于 K-H 液中加入 SND(0.375g/ml),实验终测 K-H 液中的 NO 浓度。结果见表 1。

表 1 SND 对缺血动脉环合成和释放 NO 的影响

组别	NO ₂ ⁻ /NO ₃ ⁻ 浓度(μmol/L)
对照组	8.33 ± 1.18
缺血组	3.76 ± 0.88 [△]
SND 组	6.50 ± 1.32 [▲]

注:与对照组比较[△] P < 0.01;与缺血组比较[▲] P < 0.01(下同)

实验结果表明,缺血时动脉环合成和释放 NO 减少,而 SND 可在一定程度上促进缺血动脉环 NO 的合成和释放。

2.3.2 SND 及 NTG 对大鼠胸主动脉环张力的影响

实验分 SND 组和 NTG 组,每组 n = 8。胸主动脉环按以上处理后,平衡 90min,预先以肾上腺素(10⁻⁹ ~ 10⁻⁸ mol/L)使其达最大程度收缩,稳定后,SND 组向 K-H 液中加入不同浓度的 SND,NTG 组则加入不同浓度的 NTG,用 LMS-2B 型生理记录仪记录收缩张力的变化并测定 K-H 液中的 NO 浓度,同时对 NO 浓度与动脉舒张程度作相关分析。

结果表明,在一定范围内,向 K-H 液中加入 SND(或 NTG),动脉环逐渐舒张。相关性分析发现,在一定范围内,动脉环舒张程度的百分比和 K-H 液中的 NO 浓度呈显著的正相关(r = 0.95, P < 0.01)。

2.3.3 SND 与 NTG 的最大 NO 生成力比较 实验分为三组:缺血组 SND 组和 NTG 组,每组 n = 8。胸主动脉环及缺血组处理同上,SND 组在缺血组的基础上,向 K-H 液中加入 SND,NTG 组在缺血组的基础上,向 K-H 液中加入 NTG,观察各药物对血管的舒张效应,并比较 SND 与 NTG 的最大 NO 生成力。

向 K-H 液中加入 SND 和 NTG 都可使动脉环舒张及 K-H 液中 NO 浓度升高,且两者的最大 NO 生成力无显著差别。

2.3.4 药物洗脱实验 在以上处理的基础上,用 K-H 液洗脱药物后,重复缺血模型(不含葡萄糖的 K-H 液中充入 95% N₂ ~ 5% CO₂),比较各组动脉环 K-H 液中 NO 浓度的差异。结果见表 2。

由表 b 可见,药物洗脱后重复缺血,SND 组动脉环合成和释放 NO 与缺血组相比仍然升高(P < 0.01),而 NTG 组动脉环合成和释放 NO 却比单纯缺血组更少。

表 2 SND 及 NTG 对药物洗脱后重复缺血的 K-H 液中 NO 浓度的影响($\bar{x} \pm s$; n = 8)

组别	NO ₂ ⁻ /NO ₃ ⁻ 浓度(μmol/L)
缺血组	2.96 ± 0.53
SND 组	5.91 ± 0.69 [△]
NTG 组	1.13 ± 0.36 ^{▲*}

注:与 SND 组比较* P < 0.01

3 讨论

心肌缺血的防治从根本上讲是必须有效恢复对缺血心肌的灌流,而一氧化氮是一种强大的血管舒张因子和内源性心肌保护物质。给缺血心肌输入 NO 能使其耐受缺血的能力增强,心律失常的发生率下降,心肌梗死的范围也比正常对照组减小^[3]。经典的抗心肌缺血药物如硝酸甘油、硝普钠、硝苯吡啶等主要是通过提供外源性 NO 而舒张血管,缓解心

肌缺血,但其作用短暂,易产生耐受^[4]。

本实验预先用肾上腺素使胸主动脉环达到最大程度的收缩,再加入SND或NTG,动脉环逐渐舒张,K-H液中NO浓度升高,且K-H液中NO的浓度与动脉环舒张程度的百分比呈显著正相关,表明SND和NTG确有舒张动脉的作用。药物洗脱实验表明,SND组除去药物后,动脉环NO的合成和释放基本不受影响,可能是因为SND促进了内源性NO的合成和释放,即使药物去除,药物的后效应仍可持续一段时间;而硝酸甘油是外源性硝基血管舒张剂,它在体内起作用的最终有效产物是NO,外源性NO可能反馈抑制内源性NO的合成和释放,因此应用硝酸甘油后,机体内源性NO的合成和释放受到抑制,导致去除NTG后重复缺血,胸主动脉环NO的合成和释放不仅低于应用药物时,而且低于缺血组。

我们以往的研究表明,四逆汤能在形态、机能、代谢三方面对缺血心肌产生全面的保护效应,其根本原因是四逆汤具有显著的扩张冠脉、增加心肌营养血流量的作用^[5-7]。四逆汤的这种保护作用不仅见于动物实验,且临床研究中亦得到证实^[8]。综合上述研究结果,我们认为四逆汤扩张冠脉、增加心肌营养血流,可能是通过促进内源性NO的合成和释放而起作用。因为①四逆汤具有清除自由基的作用,一方面解除了氧自由基对一氧化氮合酶(NOS)的抑制,使NO合成增加;另一方面可减少NO的氧化^[9];②据文献报导,超氧化物歧化酶(SOD)可增加NO的稳定性,使其不易失活,而四逆汤可显著提高缺血心肌SOD活性^[10];③四逆汤可改善缺血心肌的

能量代谢,提高缺血心肌ATP的含量,可为NO的合成提供能量支持^[7]。

参考文献:

- [1] Green LC, Wagner DA, Glogowski J, et al. Analysis of nitrate, nitrite, [¹⁵N] nitrate in biological fluids[J]. *Anal Biochem*, 1982, 126(1): 131-138.
- [2] 黄岚, 陈思聪, 张亚霏, 等. 缺氧-再给氧对大鼠胸主动脉环内皮依赖血管舒张反应的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 1995, 11(2): 148-151.
- [3] Parratt J. Endogenous myocardial protective anti-arrhythmic substances[J]. *Cardiovasc Res*, 1993, 27(5): 693-702.
- [4] 万梅, 于占久. 内皮衍生舒张因子对缺血(缺氧)、再灌注(复氧)心肌的保护作用[J]. *生理学报*, 1995, 47(3): 231-237.
- [5] 吴伟康, 杨昆, 吴金浪, 等. 四逆汤保护小鼠缺血心肌的超微结构观察[J]. *中国中西医结合杂志*, 1995, 15(特辑): 22-24.
- [6] 吴伟康, 尧宏斌, 侯灿, 等. 四逆汤保护缺血心肌功能的实验研究[J]. *中国中医基础医学杂志*, 1995, 1(3): 24-26.
- [7] 吴伟康, 何光耀, 罗汉川, 等. 四逆汤与缺血心肌的能量代谢[J]. *中国中医基础医学杂志*, 1996, 2(2): 26-29.
- [8] 王景峰, 吴伟康, 罗汉川, 等. 四逆汤与硝酸异山梨酯抗心肌缺血效应的观察[J]. *新医学*, 1997, 28(1): 14-16.
- [9] 吴伟康, 侯灿, 罗汉川, 等. 四逆汤的心肌保护作用机制[J]. *中西医结合杂志*, 1995, 6(3): 68-70(日文).
- [10] 吴伟康, 侯灿, 罗汉川, 等. 四逆汤的保护缺血心肌作用的实验研究[J]. *中国中西医结合杂志*, 1994, 14(9): 549-550.