

葛根芩连汤对心律失常模型大鼠血管保护作用的研究

穆磊,龙子江*,杨杰,陈明,魏成晨,丁伯春
(安徽中医学院药理教研室,合肥 230038)

[摘要] 目的:观察葛根芩连汤(Gegen Qinlian decoction)对心律失常模型大鼠血管保护的作用。方法:60只SD大鼠随机分成假手术组、模型组、稳心颗粒组($2.43\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、葛根芩连汤低($2.16\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),中($4.32\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),高($8.64\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)剂量组,每组各10只,于手术中结扎大鼠左冠状动脉前降支,在心肌缺血30 min再灌注15 min损伤模型上,监测肢体II导联心电图(ECG)。术后放射免疫分析法测定血浆内皮素(ET)、血管紧张素II(AngII)含量;酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)含量和心肌组织核因子- κ B(NF- κ B)表达量。结果:与假手术组相比,模型组大鼠再灌注后AngII,NF- κ B,TNF- α 和ET水平均升高($P<0.01$);与模型组相比,葛根芩连汤组能降低再灌注心律失常发生数($P<0.05$),并可减少再灌注后AngII,NF- κ B,TNF- α 和ET的水平($P<0.01$)。结论:葛根芩连汤对大鼠再灌注心律失常有一定的保护作用。其作用机制可能通过降低AngII的含量,从而抑制缺血区NF- κ B的激活,减少TNF- α 和ET有关。

[关键词] 葛根芩连汤; 心肌缺血再灌注; 心律失常; 内皮素; 血管紧张素II; 肿瘤坏死因子- α ; 核因子- κ B

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)24-0312-04

Vascular Protection of Gegen Qinlian Decoction in Rats with Arrhythmias

MU Lei, LONG Zi-jiang*, YANG Jie, CHEN Ming, WEI Cheng-chen, DING Bo-chun
(Department of Pharmacology, Anhui College of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230038, China)

[Abstract] **Objective:** To observe vascular protection effect of Gegen Qinlian decoction (GQD) in rats with arrhythmia. **Method:** Sixty rats were randomly divided into six groups: sham group, model group, positive drug group, and three dose groups of GQD ($2.16, 4.32, 8.64\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$). Ligating the left anterior descending artery for 30 min ischemia and then reperused for 15 min, limb II ECG was investigated in the isxhemia/reperfusion model. After the operation, postoperative radioimmunoassay was used to detect the content of plasma endothelin (ET) and angiotensin II (Ang II). The tumor necrosis factor- α (TNF- α) of serum and the nuclear factor- κ B (NF- κ B) in myocardial tissue were measured by using ELISA. **Result:** Compared with the sham operation group, increased AngII, TNF- α and NF- κ B expressions were found in model group rats after reperfusion ($P<0.01$); Compared with the model group, GQD could significantly reduce reperfusion arrhythmia score ($P<0.05$), NF- κ B, TNF- α and ET could be significantly reduced in GQD groups ($P<0.01$). **Conclusion:** GQD has a certain protective effect against reperfusion induced arrhythmia, which is related to reducing the content of AngII and then suppressing the expression of NF- κ B, TNF- α , ET in infarcted reflow.

[Key words] Gegen Qinlian decoction; myocardial ischemia and reperfusion; arrhythmia; ET; Ang II; TNF- α ; NF- κ B

[收稿日期] 20120514(004)
[第一作者] 穆磊,在读硕士研究生,从事心血管药理学方面研究, Tel: 13866135210, E-mail: alvin1022lei@sina.com
[基金项目] 安徽省科技厅皖教秘科[2011]89号 KJ2012Z219
[通讯作者] *龙子江,教授,硕士生导师,从事中药对心血管系统疾病作用及其作用机制研究工作, Tel:0551-5169216, E-mail: lzjyls@163.com

心律失常是引起心脏病死亡的常见心血管疾病之一,目前临床应用的抗心律失常药物大多为化学合成药物,对心律失常具有较好的针对性,但因存在致心律失常作用以及对心功能和其他脏器损害的副作用,限制了其在临床的应用。而中医药从整体调控入手,通过药理作用的多靶点效应治疗心律失常,具有明确的抗心律失常作用,因此对中医药抗心律

失常作用及药物开发研究成为此领域的亮点之一^[1]。葛根芩连汤作为医圣张仲景的名方之一,由葛根、黄芩、黄连和炙甘草组成,功能解表清热,主治外感表证未解,热邪入里^[2],临床应用广泛,具有解肌退热,生津止渴,发表透疹,升阳止泻之功效,现代研究表明,本方有治疗冠心病、抗缺氧、降血糖等药理作用^[3]。但目前对于葛根芩连汤在心律失常的防治作用方面研究尚少。本课题通过复制大鼠心肌缺血再灌注致心律失常的模型,探讨葛根芩连汤改善心肌供血的作用。

1 材料

1.1 药物和试剂 受试药物:葛根芩连汤,组方药材经安徽中医学院中药教研组周建礼教授鉴定葛根为豆科植物野葛 *Puerariaelo batatae* (Willd.) Ohwi 干燥根,黄芩为唇形科植物 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根,黄连为毛茛科植物 *Coptis chinensis* Franch 的干燥根。甘草为豆科植物 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch 的干燥根。均购自安徽中医学院第一附属医院中药房,按葛根:黄芩:黄连:炙甘草 8:3:3:2 配伍,以传统方法水煎 3 次,浓缩至 0.216 g·mL⁻¹ 生药备用;阳性药物:稳心颗粒,由山东步长制药有限公司生产,批号 20110946;ET 放射免疫分析药盒,北京北方生物技术研究所,批号 20111128;AngII 放射免疫分析药盒,北京北方生物技术研究所,批号 20111128;TNF- α 酶联免疫分析药盒,上海森雄生物科技有限公司,批号 APE729R;NF- κ B 酶联免疫分析药盒,上海森雄生物科技有限公司,批号 APE934R。

1.2 动物和仪器 清洁级 SD 大鼠 60 只,200 ~ 250 g,雌雄各半,由安徽医科大学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(皖)2011-001,于通风环境下,室温 26 ℃ 适应性饲养 1 周。XD-7100 型单道心电图机(上海医用电子仪器厂);HX-300 动物呼吸机(成都泰盟科技有限公司);754 紫外-可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司生产);DY89-II 电动玻璃匀浆机(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组和给药 大鼠适应性饲养 1 周后,随机分成假手术组、模型组、稳心颗粒组(2.43 g·kg⁻¹)、葛根芩连汤低(2.16 g·kg⁻¹),中(4.32 g·kg⁻¹),高(8.64 g·kg⁻¹)剂量组,每组 10 只,雌雄各半,各组大鼠分别按上述剂量灌胃给药,假手术组及模型组灌胃给予等容量的蒸馏水,给药容积为 10 mL·kg⁻¹,连续给药 7 d,每天 1 次。

2.2 造模方法^[4] 末次给药 1 h 后,经腹腔注射 20% 乌拉坦(1.2 g·kg⁻¹)麻醉大鼠,行气管插管,连接 HX-300 动物呼吸机,记录 II 导联心电图和心率。在心尖搏动最明显处剪开皮肤,分离肋间肌,打开胸壁。用镊子撕开心包膜,挤出心脏,迅速在左心耳下缘 1 mm 处用医用带线弯针穿过心肌浅表,稳定 5 min 后,在两条线之间穿过一直径为 3 mm×3 mm 的橡皮管,共同结扎于冠状动脉左前降支,引起冠脉闭塞造成心肌缺血,30 min 后剪断结扎线取出橡皮管,恢复冠脉再灌注 15 min。假手术组开胸穿线不结扎。

2.3 观测指标及测定方法

2.3.1 心律失常发生率的变化 监测 II 导联 ECG 时,记录术前、缺血即刻和再灌注 15 min 内各种心律失常的类型及发生时间,并统计室性心动过速(VT),室性早搏(VP)以及心室颤动(VF)的发生数。

2.3.2 AngII,ET,TNF- α 的测定 将制备的血浆按放射免疫分析法试剂盒要求分别测定 AngII 和 ET 的含量;将制备的血清按酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒要求测定 TNF- α 含量。

2.3.3 NF- κ B 的测定 再灌注 30 min 后立即开胸,取出心脏,迅速剪取平行房室沟下 2 mm 处的心室肌,取左室游离壁为缺血区心肌,冷生理盐水冲洗,滤纸吸干水分。电子分析天平精密称取 100 mg 心肌组织,按质量体积比 1:9 加生理盐水进行心肌组织匀浆,离心后取组织匀浆上清液 100 μ L, -80 ℃ 冰箱中保存,按 ELISA 试剂盒要求测定 NF- κ B 的表达量。

2.4 统计学分析 统计处理采用 SPSS 13.0 软件,心律失常发生数组间比较采用卡方检验,其他数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较均采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对再灌注后大鼠心律失常发生数的影响 与假手术组比较,模型组大鼠术后 VT,VP 以及 VF 的发生数明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,葛根芩连汤大量组心肌缺血再灌注后 VT,VP 以及 VF 的发生数均降低($P < 0.05$),结果见表 1。

3.2 对再灌注后大鼠血清中 TNF- α 和血浆中 ET 水平的影响 结果表明,与假手术组相比较,模型组大鼠血清中 TNF- α 和血浆中 ET 水平显著升高($P < 0.01$);与模型组相比,所有药物组 TNF- α 和 ET 的含量均降低($P < 0.01$);与模型组相比,葛根芩连汤

高、中剂量组能血浆中 ET 含量明显降低,血清中 TNF- α 的水平显著降低 ($P < 0.01$),结果见表 2。

表 1 葛根芩连汤对心肌缺血再灌注致心律失常模型大鼠 VT, VF 发生数的影响 ($n = 10$)						
组别	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	发生数/ n				
		VT	VP	VF	发生	未发生
对照	—	0	0	0	0	10
模型	—	6	2	1	8 ¹⁾	2 ¹⁾
葛根芩连汤	8.64	0	0	0	0 ²⁾	10 ²⁾
	4.32	0	0	1	1	9
	2.16	1	0	1	2	8
	2.43	0	0	0	0 ²⁾	10 ²⁾

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ 。
表 2 葛根芩连汤对心肌缺血再灌注致心律失常模型大鼠血清中 TNF- α 和血浆中 ET 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$) $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$

组别	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	TNF- α		ET	
对照	—	200.88 $\pm$ 15.91		15.65 $\pm$ 3.86	
模型	—	264.68 $\pm$ 16.59 ²⁾		42.24 $\pm$ 7.80 ²⁾	
葛根芩连汤	8.64	170.99 $\pm$ 9.84 ⁴⁾		26.36 $\pm$ 3.73 ⁴⁾	
	4.32	185.62 $\pm$ 15.10 ⁴⁾		34.85 $\pm$ 4.03 ³⁾	
	2.16	224.03 $\pm$ 15.54 ⁴⁾		36.85 $\pm$ 3.23	
稳心颗粒	2.43	204.81 $\pm$ 12.74 ⁴⁾		30.29 $\pm$ 3.96 ⁴⁾	

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 3 同)。

3.3 对再灌注后大鼠血浆中 AngII 和心肌组织中 NF- κ B 水平的影响 实验结果表明,与假手术组相比较,模型组 AngII 和 NF- κ B 水平显著升高 ($P < 0.01$);与模型组相比,葛根芩连汤中剂量组和大剂量组 AngII 和 NF- κ B 的水平明显降低 ($P < 0.01$)。结果见表 3。

表 3 葛根芩连汤对心肌缺血再灌注致心律失常模型大鼠血浆 AngII 和心肌组织 NF- κ B 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)				
组别	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	AngII		
对照	—	39.590 $\pm$ 7.845		
模型	—	126.613 $\pm$ 8.263 ²⁾		
葛根芩连汤	8.64	46.692 $\pm$ 7.118 ⁴⁾		
	4.32	62.985 $\pm$ 7.717 ⁴⁾		
	2.16	91.232 $\pm$ 5.550 ⁴⁾		
	2.43	66.374 $\pm$ 8.995 ⁴⁾		

4 讨论

心律失常属中医学“心悸”、“怔忡”范畴。多数医家认为,快速性心律失常的主要病机是心气不能

主血脉,血脉运行失畅,血管发生病变所致^[5]。现代实验发现,血管内皮参与血管有关的多个生理、病理过程,心肌缺血缺氧后,易引起多种炎症因子和肽类物质的大量释放,可加重心肌血管内皮功能的易损性,导致心血管受损而产生相关病症。AngII 是肾素-血管紧张素(RAS)的主要活性物质,参与许多病理生理过程中发挥重要作用的多肽,它是 RAS 的重要效应因子^[6],是主要致心律失常的肽类物质,其对血管的作用主要有:①能量耗竭②损伤内皮功能③细胞内 Ca^{2+} 水平异常。NF- κ B 是具有多向性调节作用的核转录因子,广泛调控与免疫反应、应激反应和炎症反应相关的基因表达^[7]。由于 AngII 可激活 NF- κ B, NF- κ B 又反过来促进 AngII 的激活,形成了正反馈的关系^[8],NF- κ B 被激活后,引起 TNF- α 、黏附分子等促炎因子增加,受 NF- κ B 调控的炎性蛋白会立即覆盖介导心肌缺血再灌注各个发病环节的炎性蛋白,所以被 AngII 激活后的 NF- κ B 是调控多种炎性介质表达的枢纽,这些炎症因子形成瀑布式反应,可引起缺血心肌血管内皮损伤,影响缺血心肌正常电生理,加重心肌易损性而导致心律失常。TNF- α 作为介导多向性炎症反应和免疫调节的一种重要致炎细胞因子,可介导内皮细胞的凋亡,正常心肌组织低水平表达促炎性细胞因子 TNF- α ,被认为对心肌细胞具有一定的保护作用。但心肌受损时 TNF- α 表达增加,可引起心肌细胞死亡、存活心肌细胞肥大、心肌收缩障碍、心肌成纤维细胞增生、心脏纤维化和心室重塑^[9]。内皮素(ET)是日本学者 Yanagisawa 等从培养的猪主动脉内皮细胞中分离纯化出的 1 种由 21 个氨基酸残基组成的活性多肽,内皮素是迄今所知最强的缩血管物质^[10],是 1 种小分子血管活性多肽,其能激活肾素血管紧张素系统和其他多个重要生理系统,并参与着心肌缺血缺氧、再灌注损伤及伴有血管内皮损伤的多个病理过程。

心肌缺血再灌注时,AngII 大量释放,引起心血管生理活动异常,进而激活 NF- κ B,加重内皮损伤,导致炎症因子 TNF- α ,ET 大量释放,这种瀑布式的炎症刺激引起心肌血管严重损伤,最终发生再灌注心律失常。本实验结果表明,葛根芩连汤可以显著降低室性早搏、室性心动过速和心室颤动的发生,药物组的 AngII 与模型组相比表达明显减少,NF- κ B 下降明显,说明 AngII 活性受到抑制,较少激活 NF- κ B,二者正反馈作用降低;与模型组相比,药物组 TNF- α ,ET 释放减少,对血管的损伤减轻,表明葛根芩连汤可能通过抑制 RAS 系统,降低 AngII 的活性,

决明子对糖尿病大鼠肾脏纤维化的抑制作用

朱铁锤*

(河南新乡医学院第一附属医院肾病科,河南 新乡 453100)

[摘要] **目的:**探讨决明子对糖尿病大鼠肾脏纤维化的保护作用及其可能机制。**方法:**将 70 只 SD 大鼠随机分为模型组(60 只)和正常对照组(10 只)。禁食 12 h 后大鼠 1 次性左下腹腔注射 55 mg·kg⁻¹链脲佐菌素(STZ)制备糖尿病模型,对照组给予等容量生理盐水。造模成功的大鼠随机分为模型组(生理盐水,4 mL·kg⁻¹)、卡托普利组(10 mg·kg⁻¹)和决明子低、中、高剂量组(1,5,10 g·kg⁻¹),连续灌胃给药 8 周。检测空腹血糖、24 h 尿白蛋白量、血肌酐及肌酐清除率,采用 HE 染色观察肾脏组织病理学变化,采用 RT-PCR 检测肾脏组织中转化生长因子(TGF-β₁)及结缔组织生长因子(CTGF)的 mRNA 表达,采用 Western blot 检测肾脏 Smad3 和 Smad6 的蛋白表达。**结果:**与对照组相比,糖尿病模型组大鼠空腹血糖、血肌酐、24 h 尿白蛋白量均显著升高($P<0.05$),肌酐清除率显著下降($P<0.05$),肾脏组织中 TGF-β₁ 和 CTGF 的 mRNA 表达均明显升高($P<0.05$),Smad3 蛋白表达亦显著升高($P<0.05$),而 Smad6 蛋白表达则显著下降($P<0.05$);与糖尿病模型组相比,决明子治疗组中的上述各指标均显著改善($P<0.05$),肾脏病理学变化也明显减轻。**结论:**决明子可显著减轻糖尿病大鼠肾脏纤维化程度,其机制可能与抑制肾脏组织中 TGF-β₁、CTGF 和 Smad3,并促进 Smad6 的表达有关。

[关键词] 决明子; 糖尿病肾病; 转化生长因子; 结缔组织生长因子; Smad

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)24-0315-05

Inhibitory Effects of Cassia Seed on the Renal Fibrosis in Diabetic Rats

ZHU Tie-chui*

(Department of Nephrology, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, Xinxiang 453100, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the anti-fibrosis effects of Cassia seed on the renal fibrosis in diabetic

[收稿日期] 20120410(006)
[通讯作者] * 朱铁锤,硕士,主治医师,从事肾炎,风湿病的治疗, Tel:13183095077, E-mail: zhutiechui123789@163.com

减轻多种炎症因子的正相关作用,而起到保护血管内皮,降低心肌易损性来达到防治再灌注心律失常发生的作用。

[参考文献]

[1] 朱明军,张群生,王永. 传统方辨治心律失常概况[J]. 中国实验方剂学杂志,2007,13(7):70.

[2] 陈丽红,范慧佳,唐于平,等. 葛根芩连配方颗粒在大鼠体内的药物代谢产物研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(24):101.

[3] 张启云,徐良辉,李冰涛,等. 复方葛根芩连汤多效应成分分类整合药代动力学研究[J]. 定量药理学,2011,16(1):51.

[4] 卫培峰,王杰. 参龙宁心胶囊对大鼠心肌缺血再灌注心律失常的影响[J]. 现代中西医杂志,2010,19(34):4399.

[5] 解欣然,易京红,王军,等. 调脉饮拆方抗心律失常作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17

(2):109.

[6] 侯伟,刘海燕,杨旭东,等. 氧化苦参碱对哮喘小鼠肺组织中 TGF-β₁ 及 AngII 表达的影响[J]. 中国儿童保健杂志,2010,18(2):135.

[7] 严亮亮. NF-κB 与心肌缺血/再灌注损伤的相关性[J]. 海南医学,2008,19(6):146.

[8] Michael Browatzki, Dina Larsen, Carolein A H Pfeiffer, et al. Angiotensin II stimulates matrix metalloproteinase secretion in human vascular smooth muscle cells via nuclear Factor-κB and activator protein 1 in a redox-sensitive manner[J]. JVR,2005,42(4):415.

[9] 苏兴利,张鸿,王爽,等. TNF-α 对培养乳鼠心肌成纤维细胞的作用[J]. 陕西医学杂志,2011,40(12):1587.

[10] 孙琳,张文静. G-CSF 对脑挫伤大鼠血浆及脑组织中 AngII 和 ET 含量的影响[J]. 河北北方学院学报,2011,27(6):76.

[责任编辑 李玉洁]