

甘木通总黄酮抗心肌缺血的作用

聂阳^{1,2}, 陈新颖³, 杨燕军¹, 何盛江¹, 张现涛^{1*}

(1. 广东省中药研究所, 广州 510520; 2. 广东食品药品职业学院, 广州 510520;
3. 中山大学工学院, 广州 510006)

[摘要] 目的:研究甘木通总黄酮抗心肌缺血作用。方法:取 Wistar 大鼠 36 只,随机分为 6 组,每组 6 只,假手术组、模型组、甘木通总黄酮低、中、高剂量组(8,16,32 mg·kg⁻¹)和复方丹参片组(250 mg·kg⁻¹),除假手术组外,其余大鼠采用结扎大鼠冠状动脉前降支制备心肌缺血模型,造模成功后 ig 给药,观察甘木通总黄酮对大鼠心电图 ST 段位移、血清心肌酶活力及心肌梗死范围的影响;昆明种小鼠 30 只,随机分为 5 组,分别为生理盐水组、甘木通总黄酮低、中、高剂量组(12,24,48 mg·kg⁻¹)和复方丹参片组(360 mg·kg⁻¹),采用小鼠密闭缺氧实验,观察甘木通总黄酮对小鼠耐缺氧存活时间的影响。结果:与假手术组比较,模型对照组心电图 ST 段即刻出现显著性抬高($P<0.01$),血清谷草转氨酶(AST),乳酸脱氢酶(LDH),肌酸肌酶同工酶(CK-MB)活力均显著升高($P<0.01$),心肌梗死范围显著升高($P<0.01$);与模型组比较,甘木通总黄酮各剂量组均可不同程度地降低急性心肌缺血大鼠不同时间点心电图 ST 段抬高值($P<0.05$),降低血清 AST,LDH,CK 含量($P<0.05$, $P<0.01$),降低心肌梗死率($P<0.01$),并呈现一定的剂量效应;还可显著延长小鼠常压耐缺氧时间($P<0.05$)。与复方丹参片组比较均无差异。结论:甘木通总黄酮对心肌缺血具有显著的保护作用。

[关键词] 甘木通; 总黄酮; 心肌缺血; 耐缺氧; 心肌酶

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)22-0176-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014220176

Protective Effect of Total Flavones from *Clematis filamentos*
on Myocardial Ischemia

NIE Yang^{1,2}, CHEN Xin-ying³, YANG Yan-jun¹, HE Sheng-jiang¹, ZHANG Xian-tao^{1*}

(1. Traditional Chinese Medical Institute of Guangdong Province, Guangzhou 510520, China;
2. Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou 510520, China;
3. School of Engineering, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] Objective: To determine the protective effect of total flavones from *Clematis filamentos* (TFCF) on myocardial ischemia (MI). Method: Thirty-six rats were randomly divided into the sham operation group, model control group, compound danshen tablet group (250 mg·kg⁻¹), low-, moderate- and high-dose TFCF groups (8, 16, 32 mg·kg⁻¹). MI was induced in rats by ligation of left anterior descending coronary artery except for rats in the sham operation group. Changes of segment ST of electrocardiogram, myocardial enzyme activity, and myocardial infarction area were observed. Thirty mice were randomly divided into the normal saline group, compound danshen tablet group (360 mg·kg⁻¹), low-, moderate- and high-dose TFCF groups (12, 24, 48 mg·kg⁻¹). Hypoxia tolerance test was performed by placing the mice into the closed bottle and their survival time was measured. Result: Compared with the model control group, TFCF could reduce ST segment elevation at different time points ($P<0.05$), decrease the serum levels of aspartate transaminase (AST), lactate

[收稿日期] 20140703(001)

[基金项目] 广东食品药品职业学院自然科学项目(2012YZ007)

[第一作者] 聂阳, 硕士, 讲师, 从事中药新药与新剂型研究, Tel: 020-28854883, E-mail: abcsunshine365@163.com

[通讯作者] * 张现涛, 博士, 研究员, 从事中药活性成分及新药研究, Tel: 020-28854894, E-mail: zhangxt@gdyzy.edu.cn

dehydrogenase (LDH), and creatine kinase-MB (CK-MB) ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and reduce the rate of MI in acute myocardial ischemia rats ($P < 0.01$). A certain dose-effect relationship was observed. TFCF also could remarkably prolong the mouse's survival time in hypoxia test ($P < 0.05$). No significant difference was found between TFCF and compound danshen tablet. **Conclusion:** TFCF is proved to have an obvious protective effect on the experimental MI model.

[**Key words**] *Clematis filamentosa*; total flavones; myocardial ischemia; hypoxia tolerance; myocardial enzymes

甘木通(*Clematis filamentosa*)为毛茛科丝铁线莲属植物,以茎、叶入药,具消肝火、降血压、通脉止痛之功效,以其为原料的单方中成药冠心康片临床用于冠心病、高血压等的治疗^[1-2]。目前,关于甘木通的实验研究和临床应用,均为其粗提取物^[3-5],其确切的有效成分尚不清楚。甘木通含黄酮类、糖类、甾体和酚性化合物等成分,化学反应鉴别提示黄酮类成分为其主要成分^[6],而黄酮类成分是否就为其心血管治疗物质未见报道。近年来,从中药中寻找抗心肌缺血药物成为研究的热点之一,中药黄酮类成分又是中医药治疗心肌缺血的特色^[7-9]。笔者在实验室从甘木通茎叶提取物中,分离出纯化的总黄酮。本实验通过大鼠急性性心肌缺血试验和小鼠密闭耐缺氧试验,观察甘木通总黄酮对心肌缺血的保护作用。

1 材料

1.1 动物 昆明种小鼠,雌雄各半,体重18~22 g; Wistar大鼠,雌雄各半,体重200~230 g,均由广东省医学实验动物中心提供,合格证号SCXK(粤)2011-0015。

1.2 药物与试剂 甘木通总黄酮(广东省中药研究所,批号20130807,以芦丁计总黄酮含量67%),复方丹参片(北京同仁堂科技有限公司制药厂提供,批号1123572)。谷草转氨酶(AST)、乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为130818,130927,130924)。

1.3 仪器 ECG 6511型心电图机(上海光电医用电子仪器有限公司),BP-211D型电子天平(德国赛多利斯公司),80-2型台式低速离心机(上海医疗器械有限公司),SABA-18型全自动生化分析仪(意大利AMS公司)。

2 方法

2.1 大鼠冠状动脉结扎致大鼠急性性心肌缺血

2.1.1 分组、给药与造模 采用文献[10]方法建立大鼠急性性心肌缺血模型。取大鼠36只,随机分为

6组,假手术组(生理盐水20 mg·kg⁻¹)、模型组(生理盐水20 mg·kg⁻¹)、甘木通总黄酮低、中、高剂量组(8,16,32 mg·kg⁻¹)和复方丹参片组(250 mg·kg⁻¹),每组6只。大鼠禁食12 h后,ig给药,每天给药1次,连续7 d。于末次给药后1 h,用12%水合氯醛(360 mg·kg⁻¹)ip麻醉,测定正常II导联心电图后,切开皮肤、肌层,环肌层作荷包缝合,切断第四肋骨,将心脏挤出胸腔,于肺动脉圆锥及左心耳间找出冠状动脉左前降支,除假手术组仅穿线不结扎外,其余各组均以5/0号线立即结扎造成心肌缺血。结扎后缝合伤口,在完全缝合前用注射器抽吸胸腔内气体,动物回笼饲养。以上手术均在无菌条件下操作。

2.1.2 心电图ST段变化 分别记录结扎前和结扎后5,30,60,120 min的II导联心电图,以手术前的II导联心电图做为正常心电图,以给药后大鼠心电图ST段T波的变化值为表示心肌缺血程度。

2.1.3 血清中酶学指标的检测 24 h后于大鼠腹主动脉取血,离心,分离血清,按试剂盒说明测定血清AST,LDH,CK-MB水平。

2.1.4 心肌梗死范围测定 处死大鼠摘取心脏,生理盐水冲洗,称量全心质量。从心尖至心基部横切成1~2 mm的左心室组织切片,生理盐水洗净,置于1% TTC(氯化三苯基四氮唑)溶液中,37℃水浴染色15 min。生理盐水冲洗多余染料,梗死区不染色,非梗死区被染成红色,将未着色的梗死区域切下,称湿重,计算左心室梗死范围(IS)^[11]。

$$IS = \text{梗死心肌质量} / \text{左心室质量} \times 100\%$$

2.2 小鼠密闭耐缺氧试验 小鼠30只,随机等分为5组,分别为生理盐水组、甘木通总黄酮低、中、高剂量组(12,24,48 mg·kg⁻¹)和复方丹参片组(360 mg·kg⁻¹)。小鼠禁食12 h,ig给药,每天给药1次,连续7 d。于末次给药后1 h,将小鼠分别放入250 mL容积的密闭广口瓶内,瓶内放入钠石灰10 g,瓶口涂凡士林。自放入小鼠,将瓶加盖密闭开始计时,记录小鼠的存活时间。

2.3 统计学分析 采用 SPSS 13.0 软件分析,所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对心电图 ST 段的影响 如表 1 所示,与假手术组比较,模型组大鼠冠脉结扎后,心电图 ST 段即

刻出现显著性抬高 $>0.1 \text{ mV} (P < 0.01)$ 。与模型组比较,甘木通总黄酮各剂量组均可不同程度地对抗冠脉结扎所致的心电图 ST 段的抬高,中、高剂量可显著降低结扎后 30 ~ 120 min 心电图 ST 段的抬高幅度 ($P < 0.05$),高剂量的对抗效果甚至好于复方丹参片。

表 1 甘木通总黄酮对心肌缺血大鼠心电图 ST 段的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	结扎前 /mV	结扎后/mV			
			5 min	30 min	60 min	120 min
假手术	—	0.122 ± 0.051	0.109 ± 0.065	0.107 ± 0.081	0.116 ± 0.069	0.119 ± 0.072
模型	—	0.131 ± 0.059	0.231 ± 0.077 ²⁾	0.243 ± 0.099 ²⁾	0.211 ± 0.101 ²⁾	0.209 ± 0.098 ²⁾
甘木通总黄酮	32	0.121 ± 0.073	0.140 ± 0.090 ³⁾	0.148 ± 0.083 ³⁾	0.145 ± 0.076 ³⁾	0.143 ± 0.081 ³⁾
	16	0.123 ± 0.072	0.184 ± 0.085	0.175 ± 0.092 ³⁾	0.152 ± 0.091 ³⁾	0.153 ± 0.088 ³⁾
	8	0.125 ± 0.056	0.202 ± 0.098	0.187 ± 0.109	0.189 ± 0.102	0.193 ± 0.103
复方丹参片	250	0.127 ± 0.068	0.142 ± 0.086 ³⁾	0.150 ± 0.082 ³⁾	0.157 ± 0.085 ³⁾	0.160 ± 0.082 ³⁾

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 2 ~ 3 同)。

3.2 对血清心肌酶的影响 如表 2 所示,与假手术组比较,模型组大鼠血清 AST,LDH,CK-MB 活力均显著升高 ($P < 0.01$)。甘木通总黄酮各剂量均可降低冠脉结扎所致的血清心肌酶活力的升高,中、高剂

量可显著降低冠脉结扎所致的血清心肌酶活力的升高 ($P < 0.01$)。从数据变化规律看出,随着甘木通总黄酮剂量的增大,其降低心肌酶活力的作用增强,具有明显的剂量-效应关系。

表 2 甘木通总黄酮对心肌缺血大鼠血清心肌酶的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	AST	LDH	CK-MB
		/U·L ⁻¹	/U·L ⁻¹	/U·L ⁻¹
假手术	—	315.18 ± 59.78	388.26 ± 85.07	170.79 ± 37.93
模型	—	556.92 ± 78.40 ²⁾	554.78 ± 159.94 ²⁾	728.82 ± 256.17 ²⁾
甘木通总黄酮	32	384.54 ± 99.76 ⁴⁾	343.78 ± 88.91 ⁴⁾	371.87 ± 131.03 ⁴⁾
	16	410.04 ± 100.94 ³⁾	372.40 ± 95.88 ⁴⁾	415.51 ± 110.94 ⁴⁾
	8	442.68 ± 103.82 ³⁾	463.63 ± 141.56	593.53 ± 197.69
复方丹参片	250	428.41 ± 102.93 ³⁾	371.22 ± 101.23 ⁴⁾	368.04 ± 73.89 ⁴⁾

3.3 对心肌梗死范围的影响 如表 3 所示,与假手术组比较,模型组大鼠心肌梗死范围显著升高 ($P <$

0.01);与模型组比较,甘木通总黄酮中、高剂量组心肌梗死范围显著减少 ($P < 0.01$)。

表 3 甘木通总黄酮对心肌缺血大鼠心肌梗死范围的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	左心室重/mg	梗死区重/mg	梗死范围/%
假手术	—	960.99 ± 126.25	00.00 ± 00.00	00.00 ± 00.00
模型	—	974.38 ± 121.52	163.31 ± 70.96	16.76 ± 8.31 ²⁾
甘木通总黄酮	32	1 004.25 ± 141.78	102.33 ± 93.17	10.19 ± 6.74 ⁴⁾
	16	990.37 ± 123.19	107.55 ± 61.05	10.86 ± 4.58 ⁴⁾
	8	1 005.28 ± 136.50	140.43 ± 82.19	13.97 ± 9.69
复方丹参片	250	1 009.40 ± 140.76	103.97 ± 79.46	10.30 ± 5.60 ⁴⁾

3.4 对小鼠耐缺氧能力的影响 如表 4 所示,阳性药物复方丹参片能显著延长小鼠的存活时间,验证了本实验系统的可行性。连续给药 7 d 后,低、中、高剂量甘木通总黄酮均有延长小鼠的存活时间的作用趋势,其中以中、高剂量组明显 ($P < 0.05$),高剂量组效果与复方丹参片相当。

表 4 甘木通总黄酮对小鼠常压耐缺氧存活时间的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	存活时间/s
生理盐水	—	905 $\pm$ 120
甘木通总黄酮	48	1 079 $\pm$ 132 ¹⁾
	24	1 017 $\pm$ 106 ¹⁾
	12	982 $\pm$ 92
复方丹参片	360	1 025 $\pm$ 118 ¹⁾

注:与生理盐水组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

结扎大鼠冠状动脉左前降支所致局灶性心肌缺血,复制急性心肌缺血模型与临床冠心病严重心肌缺血、心肌梗死等实际发病过程相符^[11],是目前国内外应用广泛的方法。心肌电生理学、形态学及血清酶学是评价抗心肌缺血药物的常用手段。

心电图 ST 段抬高与心肌梗死范围是反映心肌缺血损伤程度的客观指标。甘木通总黄酮中、高剂量可明显改善心电图 ST 段的异常改变,显著减轻心肌缺血程度;剂量依赖性地缩小缺血心肌梗死范围,心肌损害明显减轻,提示甘木通总黄酮对缺血心肌具有明确的保护作用,可能是通过降低心肌氧耗而发挥作用的。缺血性心肌酶的释放量是心肌损害程度的主要标志,也是判断细胞从可逆到不可逆损伤的重要标志。甘木通总黄酮能显著降低血清中 AST,LDH,CK-MB 的水平与其缩小心肌梗死范围相吻合,提示甘木通总黄酮可通过减轻细胞膜的损伤程度,降低细胞膜通透性,减少心肌酶的外漏,延缓心肌细胞坏死的发生,从而发挥对心脏的保护作用。

缺氧可引起机体产生应激性反应,影响机体代谢机能,最终导致机体的心脑等器官缺氧供能不足

而死亡。本研究显示甘木通总黄酮中、高剂量能显著延长小鼠常压耐缺氧时间,表明甘木通总黄酮能提高小鼠对缺氧的耐受能力。

综上所述,甘木通总黄酮对大鼠急性心肌缺血和小鼠密闭耐缺氧均有较明显效果,表明甘木通总黄酮对缺血心肌有一定的保护作用。改善心肌缺血的途径有多种,本文仅做了初步研究,对甘木通总黄酮在心率、血液学、血流动力学等方面的作用及机制尚需进一步研究。

[参考文献]

[1] 《中华本草》编撰委员会. 中华本草. 第 3 册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:196.

[2] 傅锐斌,邱建,马骏,等. 冠心康片治疗冠心病心绞痛临床疗效研究[J]. 中药材,2005,28(11):1046.

[3] 区淑仪,黄永楷,梁彬. 甘木通水溶性提取物药理研究[J]. 中山医科大学学报,1990,11(4):76.

[4] 胡宗礼,黄晓萍,陈珺霞. 甘木通醇提物对家兔高血脂血症及动脉粥样硬化的预防作用[J]. 中成药,2010,32(9):1600.

[5] 国家药典委员会. 卫生部药品标准中药成方制剂:第 14 册[S]. 北京:人民卫生出版社,1996:128.

[6] 谢仕伟,李国荣,杨乐,等. 基于分光光度法的冠心康片中总黄酮含量测定[J]. 安徽农业科学,2009,37(23):10868.

[7] 陈艳芬,杨超燕,李坤平,等. 布渣叶总黄酮对大鼠急性心肌缺血的保护作用及其机制[J]. 中草药,2013,44(8):475.

[8] 方瑜,孙瑶,简洁. 九龙藤总黄酮对垂体后叶素致大鼠急性心肌缺血的保护作用[J]. 中国药理学通报,2013,29(11):152.

[9] 沈炳香,王桐生,魏庆红,等. 亳菊总黄酮对大鼠急性心肌缺血的保护作用[J]. 安徽中医药大学学报,2014,33(1):56.

[10] 黎菊凤,林少珠,唐少丽,等. 参麦皂苷注射液抗心肌缺血作用研究[J]. 中药材,2013,36(8):1322.

[11] 杨建业,张迎春,王明江,等. 大鼠左冠状动脉不同结扎时间对心肌梗死面积及心功能的影响[J]. 郧阳医学院学报,2006,25(2):75.

[责任编辑 周冰冰]