

四逆汤对缺血心肌 NBF, OFR 浓度 SOD 活性及 MDA 含量的影响*

吴伟康 侯 灿 罗汉川

(病理生理学教研室 中医理论研究室)

卢景秀 杨正红

(北京医科大学天然药物与仿生药物国家重点实验室)

提 要 从自由基角度在小鼠垂体后叶素 (pit) 性心肌缺血模型上探讨了四逆汤保护缺血心肌的可能性, 结果表明四逆汤显著降低缺血心肌的 OFR 浓度和 MDA 含量, 显著增加心肌 NBF 和 SOD 活性, 提示四逆汤可显著减少自由基损伤性因子, 改善缺血心肌的灌注, 增强自由基清除能力, 该方剂可能对缺血心肌产生积极的保护作用。

关键词 四逆汤; 心肌缺血; 氧自由基; 超氧化物歧化酶; 丙二醛

中图分类号 R 363.123

近年来, 大量研究材料表明自由基是心肌缺血损伤的主要因素之一^[1], 因此寻找有效的自由基清除剂是保护缺血心肌的一个重要途径。本文从自由基角度探讨了四逆汤保护缺血心肌的可能性。

材 料 与 方 法

动物与分组 昆明种小鼠, 中山医大实验动物中心及北京医大动物部提供, 体重 23 ± 1 克, 完全随机设计, 分单纯缺血组 (简称缺血组), 正常对照组 (简称对照组), 缺血加四逆汤组 (简称四逆汤组), 各组雌雄各半。除 OFR 测定各组 $n=6$ 外, 其它 3 项测定各组 $n=8$ 。

四逆汤煎制 煎制前, 组成四逆汤的各单味药 (附子, 干姜, 甘草) 均经广州中医学院中药鉴定教研室鉴定, 符合国家药典 (1990 年版一部) 的药用规定。煎制过程同前^[2], 四逆汤水煎液终浓度 1g 生药/ 1ml 。

实验过程 四逆汤组用四逆汤水煎液灌

胃, 剂量 $0.1\text{ml}/20\text{g}$ 体重/d, 缺血组和对照组用等量蒸馏水灌胃。各组连续处理 3d 后, 四逆汤组与缺血组腹腔注射垂体后叶素 (pit), 剂量 $20\text{U}/\text{kg}$ 体重, 对照组腹腔注射等量注射用水。注射后分别在 20 min 时测定心肌 NBF (nutritional blood flow) 及 OFR (oxygen free radical) 浓度, 60 min 时测定 SOD (superoxide dismutase) 活性, MDA (malondialdehyde) 含量。心肌 NBF 测定采用 ^{86}Rb 示踪摄取法^[3], 每鼠尾静脉注入生理盐水稀释的 $^{86}\text{RbCl}$, 剂量为 $1 \sim 1.5$ 万 cpm/ 0.15ml , 结果以心肌 ^{86}Rb 摄取率 (%) 表示。OFR 浓度测定采用 ESR (电子自旋共振) 法, 测定参数同前^[4], 结果以 g_{\parallel} 峰高 (mm) 表示。在 $1 \sim 4^{\circ}\text{C}$ 条件下将心肌制成 10% 生理盐水匀浆, 用 TBA 法^[5] 测定心肌 MDA 含量。上述匀浆经离心后 ($4000\text{r}/\text{min} \times 20\text{min}$, $4 \sim 8^{\circ}\text{C}$), 取上清, 用邻苯三酚法^[6] 测心肌 SOD 活性。

统计学处理 实验数据用单因素方差分析及 q 检验进行分析处理。

结 果

* 国家中医药管理局重点课题

四逆汤对缺血心肌 NBF 的影响 结果见表 1。

表 1。

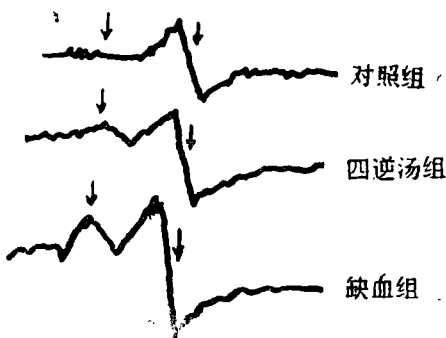
表 1 四逆汤对心肌 NBF 的影响($\bar{x} \pm s$)

	n	⁸⁶ Rb摄取率(%)
对照组	8	1.75 ± 0.25
缺血组	8	1.05 ± 0.14
四逆汤组*	8	1.56 ± 0.24

F = 24.79, P < 0.01。*与缺血组相比 q = 6.920, P < 0.01

表 1 结果表明四逆汤显著改善了缺血心肌的灌注。

四逆汤对缺血心肌 OFR 浓度的影响 结果见附图, 表 2。



附图 四逆汤对缺血心肌中 OFR 浓度影响的 ESR 谱

左 g_H = 2.027, 右 g_L = 2.005

表 2 四逆汤对缺血心肌 OFR 浓度的影响 ($\bar{x} \pm s$)

	n	OFR浓度(hg _H , mm)
对照组	6	4.92 ± 1.53
缺血组	6	10.83 ± 1.94
四逆汤组*	6	5.17 ± 1.21

F = 26.61, P < 0.01。*与缺血组相比 q = 8.725, P < 0.01

附图及表 2 的结果表明四逆汤显著降低了

缺血心肌的 OFR 浓度。

四逆汤对缺血心肌 SOD 活性的影响 结果见表 3。

结果见表 3。

表 3 四逆汤对缺血心肌 SOD 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

	n	SOC活性(U/100mg)
对照组	8	114.8 ± 16.6
缺血组	8	95.2 ± 9.7
四逆汤组*	8	110.5 ± 12.2

F = 5.115, P < 0.01。*与缺血组相比 q = 3.280, P < 0.05

表 3 结果表明四逆汤显著提高了缺血心肌 SOD 的活性。

四逆汤对缺血心肌 MDA 含量的影响 结果见表 4。

结果见表 4。

表 4 四逆汤对缺血心肌 MDA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

	n	心肌MDA含量(nmol/100mg)
对照组	8	48.6 ± 5.9
缺血组	8	71.5 ± 12.9
四逆汤组*	8	52.8 ± 10.0

F = 11.86, P < 0.01。*与缺血组相比, q = 5.281 P < 0.01

表 4 结果表明四逆汤显著降低了缺血心肌的 MDA 含量。

讨 论

pit 的急性心肌缺血效应

大量 pit 可引起冠状动脉强烈痉挛, 从而引起急性心肌缺血, 利用 pit 这个作用而复制的急性心肌缺血模型^[7]多年来一直被广泛地用于抗心肌缺血药物的研究。本研究结果表明 pit 的缺血效应是明确的, 缺血组在 pit 注入后 20min 心肌 NBF 下降到对照水平的 60% 左右 (表 1), 差异非常显著 (P < 0.01), 表

明 pit 的模型效应是确立的。

缺血心肌自由基的变化

在心肌缺血的同时心肌内与自由基有关的指标发生显著变化, pit 注入后 20 min, 缺血组 OFR 浓度显著上升, 达到对照组的 2.2 倍, 差异非常显著(表 2)。这与有关文献报道的结果基本一致^[8,9]。OFR 有强烈的毒性生物学效应, 可直接或通过脂质过氧化反应引起细胞的结构破坏和功能障碍。MDA 是脂质过氧化反应的终产物, 是评价自由基损伤的一个重要指标, 同时 MDA 本身还可通过交联作用对机体产生损伤效应。我们曾报道^[4], 在 pit 性心肌缺血过程中 OFR 浓度上升先于 MDA, 两者峰值的时差约 40min, 故本工作测定 MDA 的时点选在 pit 注入后 60 min。结果表明, 缺血组 MDA 含量显著上升, 这是 OFR 攻击心肌不饱和脂酸的结果。与此同时, 缺血组心肌 SOD 活性显著下降, SOD 是机体清除 OFR 的主要防御机制, SOD 活性的下降提示心肌内有大量 OFR 生成, 并造成氧化应激(oxidative stress)。上述结果表明, 在 pit 性心肌缺血过程中自由基损伤性因素增加而防御性因素削弱。

四逆汤对缺血心肌自由基的影响及其可能机制

在四逆汤组心肌内 OFR 浓度和 MDA 含量与缺血组相比有显著下降, 而 SOD 活性有显著增加; 这表明四逆汤可显著削弱缺血心肌中自由基损伤性因素, 而增加自由基防御性因素; 这在减轻心肌缺血性损伤方面可能产生良性的生物学效应。四逆汤对缺血心肌产生上述保护性作用可能与下列因素有关: ①研究表明四逆汤中的附子, 干姜有扩张血管、改善循环的作用, 特别是附子有较强的扩张冠脉的作用^[10,11], 本研究四逆汤组 NBF 比缺血组有显著增加(表 1)可能与此有关。②新近的研究表明甘草提取物(甘草甜素)对 OFR 有显著的淬灭效应, 四逆汤组 OFR 浓度显著低于缺血组可能与此有关。此外, 供血的改善及 SOD 活性的提高可能也起一定的作用。③由于

供血的改善, SOD 活性的提高及 OFR 浓度的下降等因素的综合作用, 因此, 四逆汤组心肌 MDA 含量显著低于缺血组是不难理解的。此外, 我们最近的体外实验发现四逆汤还具有直接的抗脂质过氧化的作用。④四逆汤组心肌 SOD 活性显著高于缺血组, 其机制尚难作出准确解释。因此, 下述有关问题值得进一步研究: 四逆汤能否促进内源性 SOD 的合成或延长其半衰期, 四逆汤是否具有“SOD样”(外源性)作用, 四逆汤提高缺血心肌 SOD 活性是否与供血改善有关等。上述问题的研究将有助于阐明四逆汤提高缺血心肌 SOD 活性的作用机制。

参 考 文 献

1. Anand IS, et al. Pathophysiology and pharmacology of heart diseases. Boston: Kluwer Academic Publisher 1989:91~107
2. 吴伟康, 等。四逆汤方药对注射大剂量氢化考的松大鼠血清 IgG 水平的影响的初步观察。中医杂志 1988;10:559
3. 朱秀媛, 等。用 ⁸⁶Rb 测定小鼠心肌营养血流量的方法。中华医学杂志 1975;8:559
4. 吴伟康, 等。垂体后叶素性心肌缺血模型再探。中国病理生理杂志 1993;9(2):124
5. Ohkawa H, et al. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem 1979;95:351
6. Marklund S, et al. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. Eur J Biochem 1974;47:469
7. 郭 鹤。用垂体后叶素复制实验性急性心肌缺血。人类疾病的动物模型。北京:人民卫生出版社, 1982:367
8. Rao PS, et al. Production of free radicals and lipid peroxides in early experimental myocardial ischemia. J Mol Cell Cardiol 1983;15:713
9. Zweier JL, et al. Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. Pro Natl

Acad Sci USA 1987;84:1404

11. 细野史郎. 漢方薬理が欲しい(七). 漢方の臨床 1977;24:74

10. 刘大培,等. 中国乌头对血管的作用. 药学报 1966;(4):250

(收稿日期1993-01-12 1993-07-11修回)

EXPERIMENTAL STUDY OF THE PROTECTIVE EFFECTS OF SINI DECOCTION ON ISCHEMIC MYOCARDIUM

Wu Weikang Hou Can Lo Hanchuan

(Department of Pathophysiology)

Lu Jingfen Yang Zhenghong

(Natural and Biomimetic Drugs Laboratory, Beijing Medical University)

Protective effects of Sini decoction (SD, 四逆汤) on myocardium from ischemic injury were studied in pituitrin-induced myocardial ischemic mice. Results indicate that SD significantly decreased the concentration of OFR, the content of MDA, and increased NBF and activity of SOD in ischemic myocardium. These results suggest that SD can significantly improve the blood supply of ischemic myocardium, reduce the damaging factors of free radical and strengthen myocardial defense mechanism. We conclude that the decoction may have a protective effect on ischemic myocardium.

Key words sini decoction; myocardial ischemia; oxygen free radical; superoxide dismutase; malondialdehyde

(上接第315页)

少, 肾皮质缺血, 肾小球过滤功能受损而产生肾功能障碍有关。保护和恢复肾功能可能是提高本病治愈率的重要措施之一。

参 考 文 献

1. 彭文伟. 病毒性肝炎的防治. 广州: 广东科技出版社, 1987:151
2. Chu CM, et al. The prevalence and prognostic significance of spontaneous bacterial peritonitis in severe acute hepatitis with ascites. *Hepatology* 1992;15(5):799

3. 高 涛, 等. 慢性活动性肝炎并发细菌性腹膜炎的临床和实验室观察. *上海医学* 1991; (3):164

4. 江圣勇, 等. 重型病毒性肝炎并发自发性细菌性腹膜炎34例分析. *中华传染病杂志* 1985; (3):69

5. 《预防医学指南》编委会. 预防医学指南(卫生统计分册). 西安: 陕西科学技术出版社, 1989:43

(1993-04-15收稿 1993-06-05修回)