

丹参复合微乳抗垂体后叶素致大鼠急性心肌缺血的药效学研究

李红磊¹, 王 沐², 张忠义³, 欧阳小方⁴, 胡燕君¹, 薛 阳¹

1. 总后勤部第一门诊部, 北京 100036
2. 总后勤部第三门诊部, 北京 100036
3. 南方医科大学珠江医院药剂科, 广州 510282
4. 解放军 72617 部队卫生所, 枣庄 277013

[摘要] **目的** 探讨丹参复合微乳(Co-ME)抗垂体后叶素致大鼠急性心肌缺血的药效。**方法** 采用舌下静脉注射垂体后叶素造成心肌缺血的方法, 检测丹参复合微乳和空白微乳、丹参酮微乳、丹酚酸微乳、丹参酮混悬液各给药组在注射垂体后叶素 30 min 后血清中磷酸肌酸激酶(PCK)、乳酸脱氢酶(LDH)、超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)的含量。**结果** 丹参复合微乳、丹参酮微乳、丹酚酸微乳和丹参酮混悬液均可在一定程度上改善注射垂体后叶素诱导的急性心肌缺血, 减少 PCK、LDH 活性及 MDA 的生成量、提高心肌组织 SOD 活性, 且以丹参复合微乳疗效最为显著, 具有优于丹参酮微乳、丹酚酸微乳的作用趋势, 并优于丹参酮混悬液。**结论** 微乳载体体系可明显促进丹参酮的吸收, 提高生物利用度, 对急性心肌缺血具有治疗作用, 丹参酮和丹酚酸复合可增加疗效。

[关键词] 丹参复合微乳; 心肌缺血; 丹参酮; 丹酚酸

[中图分类号] R 542.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)09-1006-03

Pharmacodynamics of *Danshen* co-microemulsion in treatment of experimental acute myocardial ischemia induced by pituitrin in rats

LI Hong-lei¹, WANG Shu², ZHANG Zhong-yi³, OUYANG Xiao-fang⁴, HU Yan-jun¹, XUE Yang¹

1. First Clinic Department, General Logistics Department of PLA, Beijing 100036, China
2. Third Clinic Department, General Logistics Department of PLA, Beijing 100036, China
3. Department of Pharmacy, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong, China
4. Medical Care Unit, No. 72617 Troop of PLA, Zaozhuang 277013, Shandong, China

[Abstract] **Objective** To study the effects of *Danshen* co-microemulsion (Co-ME) in treatment of acute myocardial ischemia induced by pituitrin in rats. **Methods** The experimental model of myocardial ischemia was produced by injecting pituitrin into the sublingual vein of rats. The serum level of malonaldehyde(MDA) and the activities of phosphocreatine kinase (PCK), lactate dehydrogenase (LDH), and erythrocyte superoxide dismutase (SOD) were examined in Co-ME, salvianolic acid microemulsion, tanshinone microemulsion, tanshinones suspension and blank microemulsion groups 30 min after injection of pituitrin. **Results** Co-ME, tanshinone microemulsion, salvianolic acid microemulsion and tanshinone suspension all improved myocardial ischemia to some extent; besides, they also decreased PCK, LDH activities and MDA content, and increased SOD activity. The therapeutic effect of Co-ME group was superior to those for the tanshinone microemulsion and salvianolic acid microemulsion groups, and significantly better than that of tanshinone suspension group ($P < 0.05$). **Conclusion** Microemulsion system can greatly promote the absorbance and bioavailability of tanshinone, displaying a therapeutic effect for acute myocardial ischemia. Salvianolic acids combined with tanshinones can promote the therapeutic effect.

[Key words] *Danshen* co-microemulsion; myocardial ischemia; tanshinones; salvianolic acids

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(9):1006-1008]

“一味丹参散, 功同四物汤”。丹参作为活血化瘀药, 已广泛应用于心脑血管疾病的治疗。目前一般认为, 丹参具有活血化瘀活性的有效部位主要为

水溶性酚酸类和脂溶性菲醌类(丹参酮类, tanshinones)。两类活性成分均表现出抗血小板聚集、抗血栓、抗氧化损伤、抗动脉粥样硬化、缩小心肌梗死面

[收稿日期] 2011-03-22 **[接受日期]** 2011-07-11

[基金项目] 广州市科技计划项目(2003Z3-E5151). Supported by Science and Technology Program of Guangzhou(2003Z3-E5151).

[作者简介] 李红磊, 硕士, 主管药师. E-mail: lihl003@163.com

积、降低心肌耗氧量以及防治心肌缺血再灌注损伤等作用^[1-2]。新的研究表明在缺氧损伤条件下,水溶性成分丹酚酸 B(Sal B)与脂溶性成分丹参酮 II A(Tan II A)不同配比均可提高心脏微血管内皮细胞的活力,降低乳酸脱氢酶(LDH)水平,降低一氧化氮(NO)的释放和内皮素(ET)的分泌,而且效果优于两者单独给药^[3]。然而,丹参酮类物质具有菲醌类的片状刚性结构,在水中几乎不溶,生物利用度低。微乳作为药物载体具有增大药物的溶解度,延长药物的释放时间,提高药物生物利用度等优点,特别是作为油/水分散体系,油相和水相可以载有不同理化性质特别是不同溶解性的药物,从而可以发挥药物间的协同作用^[4]。我们在制备油相和水相分别载有丹参酮、丹酚酸类活性物质的丹参复合微乳制剂的基础上,观察丹参复合微乳抗垂体后叶素(pituitrin, Pit)致大鼠急性心肌缺血的药效学,为该领域的进一步研究提供实验基础和理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物 SPF级SD大鼠70只,雌雄各半,体质量180~200 g,由南方医科大学实验动物中心提供,动物合格证号:2004A023。

1.2 受试药物 空白微乳、丹参复合微乳(Co-ME)、丹参酮微乳、丹酚酸微乳、丹参酮混悬液由本实验室自制。上述供试药液中1 ml药量以Sal B和Tan II A计分别为:0 mg Sal B和0 mg Tan II A、6.07 mg Sal B和0.56 mg Tan II A、0 mg Sal B和0.56 mg Tan II A、6.07 mg Sal B和0 mg Tan II A、0 mg Sal B和0.56 mg Tan II A;各微乳组间除载药不同外各组分均相同,丹参酮混悬液与丹参酮微乳液中Solutrol HS 15和乙醇的含量相同,但混悬液中不含有油脂。

1.3 药品及试剂 Pit 6 U/ml由上海第一生化药业有限公司生产,批号:041003。临用前以生理盐水配制到所需浓度后使用。磷酸肌酸激酶(PCK)、LDH、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)检测试剂盒由南京建成生物工程研究所提供,生产批号分别是:20051230、20051223、20051228、20051221。

1.4 实验方法 采用大鼠舌下静注Pit造成急性心肌缺血的动物模型。于给药前先进行动物对Pit敏感性筛选实验:舌下静脉注射Pit 0.5 U/kg(浓度为1 U/2 ml),观察心电图变化情况,选取对Pit敏感的大鼠(T波明显抬高,ST段抬高超过0.1 mV)用于实验,不敏感大鼠及心电图不正常大鼠则淘汰。将筛选的敏感大鼠随机分为正常对照组、模型组、空白微乳组、Co-ME组、丹参酮微乳组、丹酚酸微乳组、

丹参酮混悬液组,每组10只。上述受试药物灌胃给药,给药量为15 ml/kg,模型组和正常对照组灌服等量生理盐水,各组每天给药1次,连续给药7 d。于第8日实验前1 h分别再次给药(模型组和正常对照组灌服生理盐水,正常对照组不注射Pit)。3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔注射麻醉后,将动物仰卧位固定在鼠台上,用多道生理记录仪连接,动态描记II导联心电图,心电图正常大鼠舌下静脉注射Pit 0.5 U/kg,于5 s内注完,动态观察心电图变化。30 min后腹主动脉取血,按试剂盒说明书标明的方法测定血清PCK、LDH、SOD活性及MDA含量。

1.5 统计学处理 各组数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用SPSS 1.0软件中one-way ANOVA进行统计分析,运用LSD方法进行组间比较。检验水平(α)为0.05。

2 结果

2.1 各组大鼠血清PCK、LDH的变化 由表1可知,与正常对照组相比,模型组注射Pit 30 min后,血清中PCK、LDH活性升高($P < 0.001$);与模型组相比,Co-ME、丹参酮微乳、丹酚酸微乳均可降低急性心肌缺血大鼠PCK活性($P < 0.001$, $P = 0.003$, $P < 0.001$),但3组之间差异没有统计学意义;丹参酮混悬液和空白微乳显示出降低PCK活性的趋势,但与模型组相比差异没有统计学意义($P = 0.258$, $P = 0.348$);Co-ME可降低急性心肌缺血大鼠LDH活性($P < 0.001$),丹参酮微乳、丹酚酸微乳显示出降低LDH活性的趋势,但与模型组相比差异没有统计学意义($P = 0.102$, $P = 0.053$)。

2.2 各组大鼠血清SOD、MDA的变化 由表1可知,与正常对照组相比,模型组注射Pit 30 min后,血清SOD活性下降($P < 0.001$),MDA含量升高($P = 0.022$)。Co-ME、丹酚酸微乳均可升高急性心肌缺血大鼠SOD活性($P = 0.001$, $P = 0.017$),但两组之间差异没有统计学意义($P = 0.316$),丹参酮微乳组和丹参酮混悬液组显示出升高SOD活性的趋势,但与模型组相比差异没有统计学意义($P = 0.269$, $P = 0.821$);Co-ME可降低急性心肌缺血大鼠血清MDA含量($P = 0.041$),丹参酮微乳、丹酚酸微乳和丹参酮混悬液显示出降低MDA含量的趋势,但与模型组相比差异没有统计学意义($P = 0.099$, $P = 0.074$, $P = 0.295$)。

3 讨论

丹参具有“祛瘀止痛、活血通络、清心除烦”之功效,其主要化学成分为水溶性酚酸和脂溶性二萜醌。Sal B是丹参的主要水溶性成分,是非常强的抗氧化

剂,不仅对心血管系统具有一定的保护作用,还可体外逆转肝炎肝纤维化。Tan II A是丹参主要脂溶性

成分,为萘醌类衍生物,具有抗炎、抗氧化作用,对心血管系统有较好的保护作用^[1-2]。

表 1 各组大鼠血清中 PCK、LDH、SOD 活性及 MDA 含量的变化

Tab 1 Changes of activities of PCK, LDH and SOD and content of MDA in serum of different groups

(n=10, $\bar{x}\pm s$)

Group	PCK $z_B/(U \cdot ml^{-1})$	LDH $z_B/(U \cdot L^{-1})$	SOD $z_B/(U \cdot ml^{-1})$	MDA $c_B/(nmol \cdot L^{-1})$
Control	123.2±27.9	3 289.5±474.8	15.52±3.85	0.554±0.112
Model	192.3±38.5*▲▲	4 001.8±303.3*▲▲	7.50±2.70*▲▲	0.882±0.456*
Blank microemulsion	176.9±36.1*▲	3 978.5±304.9*▲▲	7.74±3.73*▲▲	0.843±0.481*
Danshen co-microemulsion	121.0±38.9△△	3 344.9±268.9△△	13.33±4.49△△	0.590±0.185△
Tanshinones microemulsion	141.1±37.9△△	3 627.1±361.6*▲	9.38±3.84*▲	0.648±0.281
Salvianolic acids microemulsion	132.2±30.4△△	3 645.7±194.0*	11.62±4.56*△	0.628±0.235
Tanshinones suspension	173.7±42.5*▲	3 954.5±323.3*▲▲	7.88±3.73*▲▲	0.735±0.245

PCK: Phosphocreatine kinase; LDH: Lactate dehydrogenase; SOD: Superoxide dismutase; MDA: Malonaldehyde. *P<0.05, **P<0.01 vs control group; △P<0.05, △△P<0.01 vs model group; ▲P<0.05, ▲▲P<0.01 vs Danshen co-microemulsion group

Pit 是从动物脑垂体中提取的,内含有加压素和催产素,能直接使血管特别是毛细血管和小动脉收缩,包括冠状动脉收缩,从而使血压升高,心肌缺血缺氧;同时收缩全身小血管,导致心脏负荷加重;因为抗利尿素的作用,从而加重心气虚的症状^[5-6]。

中医认为冠心病、心肌缺血之病机以心脾肾阳气虚衰为本,瘀血浊邪阻滞脉道为标,本虚标实,因虚致实。因此本实验采用舌下静脉注射 Pit 法造成大鼠急性心肌缺血的模型^[7],观察心电图、心肌酶、过氧化物的变化,该模型广泛用于筛选心肌缺血药物的研究。

近年来随着心肌缺血损伤机制研究的深入,发现大量氧自由基生成及脂质过氧化物反应增强是心肌缺血损伤的主要机制之一^[8]。心肌缺血时,细胞内钙超载致自由基生成过多,自由基作用于细胞膜和血液循环中的脂质,使其发生脂质过氧化并呈链式反应扩展,导致细胞膜结构和功能的损伤,并大量消耗抗氧化剂,使其活力代偿性下降,从而启动自由基连锁反应,进一步破坏血管内皮的结构和功能。PCK 广泛存在于细胞质膜中,尤以心肌细胞最多。当心肌细胞受损伤时,PCK 渗出到血液中,活性增高,故血清中 PCK 活性越高,心肌损伤越严重。LDH 亦是一种心肌酶,当心肌缺血损伤时,心肌酶释放增加,因此心肌酶的释放是缺血心肌损害程度的重要标志。SOD 是机体清除氧自由基的重要酶类,对机体的氧化与氧化平衡起着至关重要的作用。SOD 能清除超氧阴离子,保护细胞免受损伤,其活力的高低常间接地反映机体清除自由基的能力。当心肌受损时,随着心肌缺血程度的不断加深,SOD 活性逐渐下降,而对心肌细胞膜具有毒性作用的脂质过氧化反应的最终代谢产物

MDA 含量则逐渐增加,导致诸如心肌酶释放、心肌变性甚至坏死等结构与功能的病理变化,血清中 MDA 的含量常常可以反映机体内脂质过氧化的程度,间接反映细胞损伤的轻重。

本实验发现,丹参复合微乳、丹参酮微乳、丹酚酸微乳和丹参酮混悬液均可在一定程度上改善注射 Pit 诱导的急性心肌缺血,提高心肌组织 SOD 活性,减少 MDA 的生成,且以丹参复合微乳疗效最为显著,具有优于丹参酮微乳、丹酚酸微乳的作用趋势,并优于丹参酮混悬液。实验表明微乳载药体系可明显促进丹参酮的吸收,提高生物利用度,并且和丹酚酸联合用药可增加疗效,提示丹参复合微乳抗注射 Pit 诱导的急性心肌缺血的作用机制与清除氧自由基、抑制脂质过氧化反应有关。

[参考文献]

- [1] 柳 丽,张洪泉.丹参活性成分的现代中药药理研究进展[J].中国野生植物资源,2003,22:1-3.
- [2] 杨 勤,赵朝伟.丹参的药理作用研究现状[J].中国药业,2003,12:78-81.
- [3] 郭利平,张 萌,杜 嵘,高秀梅.丹酚酸 B/丹参酮 II A 不同配比对缺氧损伤 CMEC 影响[J].中国中医基础医学杂志,2004,10:35-37.
- [4] Agatonovic-Kustrin S, Glass B D, Wisch M H, Alany R G. Prediction of a stable microemulsion formulation for the oral delivery of a combination of antitubercular drugs using ANN methodology[J]. Pharm Res, 2003, 20: 1760-1765.
- [5] 张 页,杨学娟,沈绍功.冠心病心绞痛气虚痰浊动物模型研究[J].中国中医基础医学杂志,2000,6:820.
- [6] 李绍芝,朱文锋,黄献平,李冰星.心气虚症动物模型的研制[J].中国中医基础医学杂志,2000,6:466.
- [7] 陈 奇.中药药理学研究方法学[M].北京:人民卫生出版社,1996:564.
- [8] 潘洪平.复方丹参滴丸治疗心血管的研究进展[J].广西医学,2000,22:758.

[本文编辑] 尹 茶