

[药 理]

三益丹对大鼠心肌缺血的改善作用

田 欢¹, 支文冰², 李 晔², 张 红², 陈志永², 刘 洋², 胡 静², 岳宝森¹, 赵 锋^{1*}

(1. 西安市中医医院 药剂科, 陕西 西安 710021; 2. 陕西省中医药研究院 中药研究所, 陕西 西安 710003)

摘要: **目的** 观察三益丹对大鼠心肌缺血的改善作用。**方法** 皮下多点注射 ISO (85 mg/kg) 构建 SD 大鼠心肌缺血模型, 随机分为正常组, 模型组 (ISO 85 mg/kg), 复方丹参滴丸组 (85 mg/kg)、三益丹低、中、高剂量组 (37.5、75.0、150.0 mg/kg), 连续灌胃给药 14 d。心电图监测大鼠心电图 ST 段的变化; HE 染色观察心肌病理损伤程度; 检测大鼠血清 CK、LDH、AST 心肌酶水平, cTn-I、MDA、NO、TNF- α 、IL-6 水平。**结果** 与模型组比较, 三益丹抑制心肌缺血大鼠心电图 ST 段抬高 ($P<0.05$), 降低血清中 CK、LDH、AST 水平 ($P<0.05$), 降低 cTn-I、MDA、NO、TNF- α 、IL-6 水平 ($P<0.05$), 减轻心肌病理损伤程度。**结论** 三益丹对 ISO 诱导大鼠心肌缺血模型具有明显的改善作用。

关键词: 三益丹; 盐酸异丙肾上腺素; 心肌缺血

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2020)03-0598-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.03.010

Effects of Sanyidan on myocardial ischemia in rats

TIAN Huan¹, ZHI Wen-bing², LI Ye², ZHANG Hong², CHEN Zhi-yong², LIU Yang², HU Jing², YUE Bao-sen¹, ZHAO Feng^{1*}

(1. Division of Pharmacy, Xi'an Traditional Chinese Medicine Hospital, Xi'an 710021, China; 2. Institute of Chinese Medicine, Shaanxi Academy of Traditional Chinese Medicine, Xi'an 710003, China)

ABSTRACT: **AIM** To observe the effects of Sanyidan on myocardial ischemia in rats. **METHODS** Multiple subcutaneous injections of isoproterenol (ISO, 85 mg/kg) were practiced upon SD rats to construct myocardial ischemia models. The rats were randomly divided into normal group, model group (ISO, 85 mg/kg), and compound Danshen dripping pills group (85 mg/kg), low-dose, medium-dose and high-dose Sanyidan groups (37.5, 75.0, 150.0 mg/kg) for 14-day intragastric administration. The rats had their changes in ST segment monitored by electrocardiogram, their degree of myocardial pathological damage observed by HE staining, and their serum levels of CK, LDH, AST myocardial enzymes, and cTn-I, MDA, NO, TNF- α , and IL-6 detected as well. **RESULTS** Compared with the model group, myocardial ischemic rats of Sanyidan groups shared inhibited ST-segment elevation ($P<0.05$), reduced serum CK, LDH, AST levels ($P<0.05$), and decreased cTn-I, MDA, NO, TNF- α , IL-6 levels ($P<0.05$), and attenuated degree of myocardial pathological damage as well. **CONCLUSION** Sanyidan is significantly effective in improving myocardial ischemia of ISO-induced rat models.

KEY WORDS: Sanyidan; isoprenaline hydrochloride; myocardial ischemia

收稿日期: 2019-05-16

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (81603264); 陕西省重点研发计划 (2018SF-272)

作者简介: 田 欢 (1992—), 女, 硕士生, 研究方向为中药新制剂与新剂型研究。Tel: 18149412681, E-mail: 18149412681@163.com

* 通信作者: 赵 锋 (1965—), 男, 主任药师, 研究方向为中药新制剂与新剂型研究。Tel: 1389195309, E-mail: zf6369@126.com

冠状动脉粥样硬化性心脏病（coronary atherosclerotic heart disease, CAHD）是指冠状动脉粥样硬化使血管腔狭窄或阻塞，因冠状动脉功能性改变（痉挛）导致心肌缺血、缺氧或坏死而引起的以胸痛、胸闷、短气等主要临床症状的心脏病，是心脑血管疾病里常见的一种。冠心病最主要的病变基础是冠状动脉供血不足导致的心肌缺血，而心肌则因缺血发生各种病理改变，急剧、短暂的缺血可引起心绞痛，持续、严重的心肌缺血则可引起心肌梗死^[1]。现代医学理论中所说的冠心病、心绞痛、心肌梗死，属于中国传统医学理论中的胸痹、心痛和真心痛的范围^[2]。三益丹是西安市中医医院传统制剂，由人工牛黄、血竭、西洋参、延胡索、薄荷冰、冰片、硼砂、生石膏、人工麝香、珍珠粉十味药材组成的成方制剂，临床主要用于心血瘀阻引起的心前区闷痛不适（心绞痛），在临床应用已有四十多年，且疗效显著^[3]。方中人工牛黄、麝香、薄荷冰、冰片开窍化浊^[4-5]；延胡索、血竭活血化瘀，行气止痛；石膏清热泻火；珍珠粉镇心安神；西洋参补益心脾^[5]。诸药合用，共奏“三益”之效，故名三益丹，三益丹具有益气养阴、通痹止痛、开窍化浊的功效。本研究拟用盐酸异丙肾上腺素诱导，复制大鼠心肌缺血模型，进而验证三益丹可缓解心血瘀阻型心前区闷痛不适的临床疗效。

1 材料

1.1 药物和试剂 三益丹（自制）方中人工牛黄2.5 g、血竭1.5 g、西洋参5 g、延胡索6 g、薄荷冰9 g、冰片2 g、硼砂7.5 g、生石膏30 g、人工麝香0.4 g、珍珠粉4 g，上述十味药材，均由陕西兴盛德中药饮片公司提供，陕西省中医药研究所张红研究员鉴定为合格饮片。实验室经过前期的工艺优化，按处方比例取方中各药材，以总处方8%聚维酮（PVP-K30）为黏合剂，6%羧甲基淀粉钠（CMS-Na）为崩解剂，水为润湿剂，一定比例充分混合均匀，制备软材后，采用挤出滚圆法，制备出丸重为41.23 mg，大小均一，工艺稳定，质量可控的三益丹丸剂；复方丹参滴丸（天士力医药集团股份有限公司，批号180320）。盐酸异丙肾上腺素（isoproterenol, ISO；上海阿拉丁生化科技股份有限公司，批号L1708046）；生理盐水注射液（四川科伦药业股份有限公司，批号N18052508-2）；乌来糖（国药集团化学试剂有限公司，批号20180308）；多聚甲醛（国药集团化学试剂有限公司，批号20180308）；MDA（批号S0131）、NO

（批号S0021）、IL-6（批号133141051126）、TNF-α（批号240141131126）检测试剂盒（武汉博士德生物工程有限公司）；CTn-I（批号190123031）、CK（批号190345121）、LDH（批号190840268）、AST（批号190940023）测定试剂盒（宁波普瑞柏生物技术股份有限公司）。

1.2 动物 雄性SD大鼠60只，体质量（220±20）g，购于西安交通大学实验动物中心，动物生产许可证号SCXK（陕）2012-003。在标准实验条件下，温度（25±2）℃、相对湿度（60±5）%适应性饲养1周。

1.3 仪器 ECG-6511十二导心电图机（上海光电医用电子仪器有限公司）；电子天平（赛多利斯科学仪器有限公司）；酶标仪（伯乐医学产品有限公司）；Abbott i2000（雅培制药有限公司）、Series 7600生化仪（日本日立公司）；高速冷冻离心机（长沙英泰仪器有限公司）；RM2235组织切片机（德国徕卡公司）；HD-330型摊片烤片机（湖北慧达仪器有限公司）；E200显微镜（尼康影像仪器有限公司）；雅博包埋机（常州市雅博电子设备有限公司）。

2 方法

2.1 造模及给药 将60只SD大鼠随机分为正常组，模型组，复方丹参滴丸组（85 mg/kg）、三益丹低、中、高剂量组（37.5、75.0、150.0 mg/kg）。每组大鼠连续灌胃给药14 d，1次/d，正常组和模型组给予等量的生理盐水。第12~14天，灌胃给药30 min后，除正常组外，其他各组大鼠背部皮下多点注射ISO（85 mg/kg），1次/d，连续注射3 d，时间间隔为24 h，正常组注射等量的生理盐水，构建大鼠心肌缺血模型^[7]。三益丹丸临床用药量为成人每日900 mg；本研究依据陈奇主编的《中药药理实验方法学》，大鼠（200 g）体表面积与成人（70 kg）体表面积比为0.018；75 mg/kg作为本研究的中剂量组，并分别减小和增大一倍得低、高剂量组（37.5、150 mg/kg）。

2.2 心肌缺血大鼠心电图监测 末次皮下注射ISO前，20%乌来糖麻醉各组大鼠，行肢体Ⅱ导心电图检查，记录大鼠心电图，观察ST段的变化。

2.3 心肌组织病理学检查 心电图监测完成后，继续观察30 min，经腹部正中线切开，打开腹腔，立即取下心脏，生理盐水中涮洗干净，取左心尖组织，置于装有4%多聚甲醛溶液的离心管中固定48 h，采用HE染色法观察心肌组织的病理学变化

情况。

2.4 大鼠血清因子检测 心电图监测完成后，继续观察 30 min，经腹部正中中线切开，打开腹腔，大鼠腹主动脉采血，至无菌试管中，静置 2 h，3 500 r/min离心 10 min，分离血清。

NO、MDA、TNF- α 、IL-6 检测，按照各试剂盒说明书中描述的方法操作，利用酶标仪检测血清中各指标成分的活；肌钙蛋白（cTn）采用 Abbott i2000 生化分析仪测定，CK、LDH、AST 采用 Series 7 600 分析仪测定。

2.5 统计学分析 实验数据采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析，数据以（ $\bar{x}\pm s$ ）表示，组间比较采用单因素方差分析，以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 心肌缺血大鼠心电图 ISO 诱导前各组大鼠心电图 ST 段比较，差异无统计学意义（ $P>0.05$ ）。

诱导后，正常组大鼠心电图 ST 段较之前无变化，与正常组比较，模型组大鼠 ST 段值升高（ $P<0.01$ ）；与模型组比较，三益丹组大鼠心电图 ST 段值降低（ $P<0.05$ ）。见图 1。

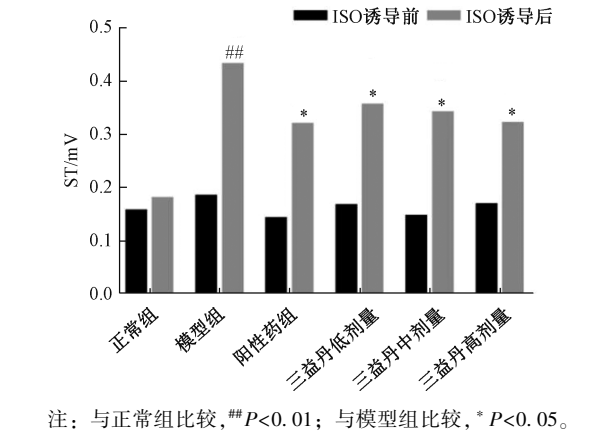
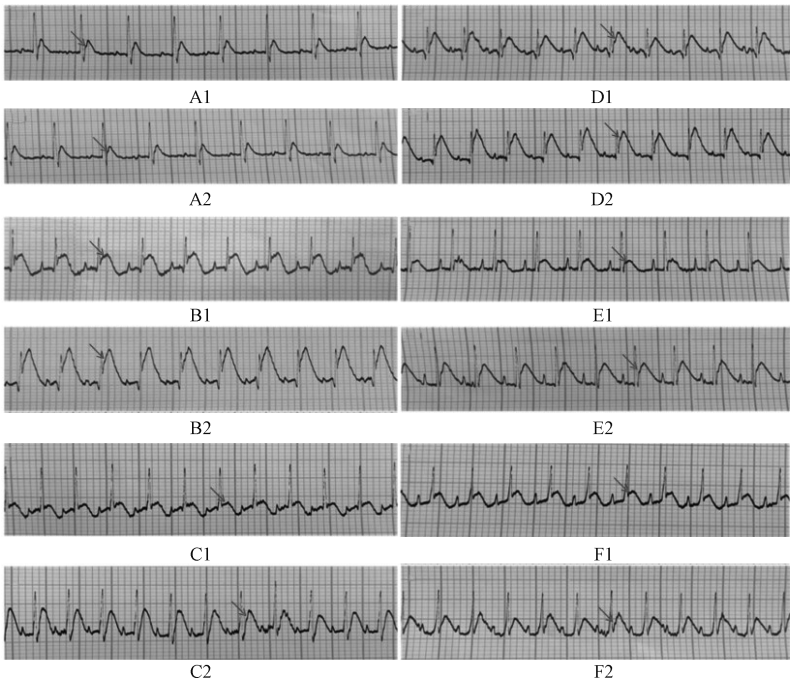


图 1 三益丹对心肌缺血大鼠心电图 ST 段的影响
Fig.1 Effects of Sanyidan on ST segment of myocardial ischemic rats



注：A~F 为正常组、模型组、阳性药组、三益丹低剂量组、三益丹中剂量组、三益丹高剂量组；1 为诱导前，2 为诱导后。
图 2 各组大鼠心电图
Fig.2 Electrocardiogram for rats of each group

3.2 心肌组织病理学 正常组心肌细胞横纹清楚，排列有序，无炎性细胞浸润及细胞坏死等病变；模型组横纹模糊，排列紊乱，大量炎性细胞浸润，细胞核减少，心肌组织损伤严重；复方丹参滴丸组、三益丹低、中、高剂量组均可看到较少量炎性细胞浸润和不同程度细胞坏死现象。见图 3。

3.3 大鼠血清中 cTn-I 水平 与正常组比较，模型组大鼠血清中 cTn-I 水平升高（ $P<0.01$ ）。而给予复方丹参滴丸及不同剂量的三益丹进行预保护，大鼠血清 cTn-I 水平均下降（ $P<0.05$ ， $P<0.01$ ）。见图 4。

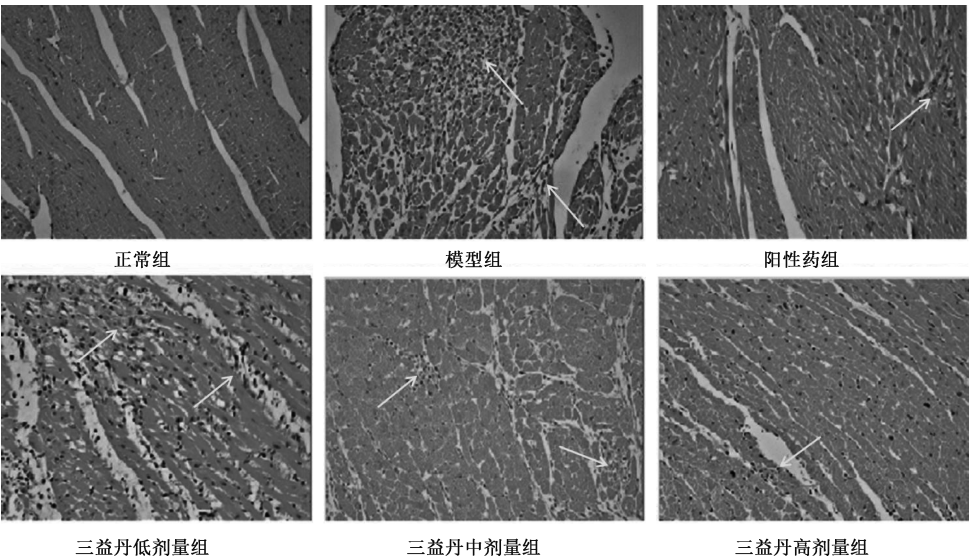
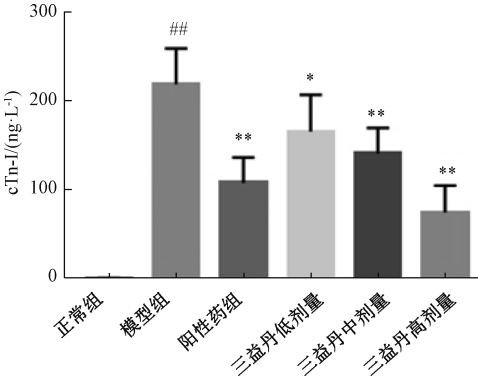
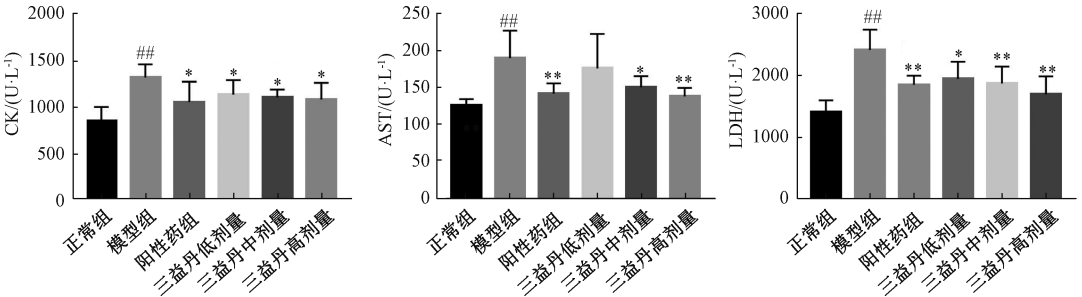


图 3 各组 HE 染色结果 (HE, ×10)
Fig. 3 Resultant HE staining for each group (HE, ×10)



注：与正常组比较，^{###} $P<0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P<0.05$ ，^{**} $P<0.01$ 。

图 4 三益丹对心肌缺血大鼠血清中 cTn-I 水平的影响
Fig. 4 Effects of Sanyidan on serum cTn-I levels of myocardial ischemic rats



注：与正常组比较，^{###} $P<0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P<0.05$ ，^{**} $P<0.01$ 。

图 5 三益丹对心肌缺血大鼠血清中 CK、LDH、AST 水平的影响

Fig. 5 Effects of Sanyidan on serum levels of CK, LDH, and AST in myocardial ischemic rats

益丹进行预保护，除三益丹低剂量组 IL-6 水平差异无统计学意义 ($P<0.05$) 外，各给药组大鼠血清 TNF- α 、IL-6 水平下降 ($P<0.05$, $P<0.01$)。见图 7。

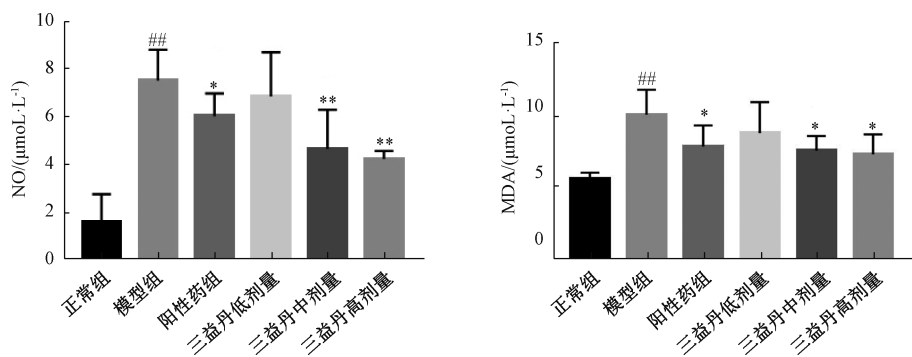
3.4 大鼠血清中 CK、LDH、AST 水平 与正常组比较，模型组大鼠血清中 CK、LDH、AST 水平升高 ($P<0.01$)。而给予复方丹参滴丸及不同剂量的三益丹预保护，大鼠血清 CK、LDH、AST 水平下降 ($P<0.05$, $P<0.01$)。见图 5。

3.5 大鼠血清中 NO、MDA 水平 与正常组比较，模型组大鼠血清中 NO、MDA 水平升高 ($P<0.01$)。而给予复方丹参滴丸及三益丹中、高剂量进行预保护，大鼠血清 NO、MDA 水平下降 ($P<0.05$)。见图 6。

3.6 大鼠血清中 TNF- α 、IL-6 水平 与正常组比较，模型组大鼠血清中 TNF- α 、IL-6 水平升高 ($P<0.01$)。而给予复方丹参滴丸及不同剂量的三

4 讨论

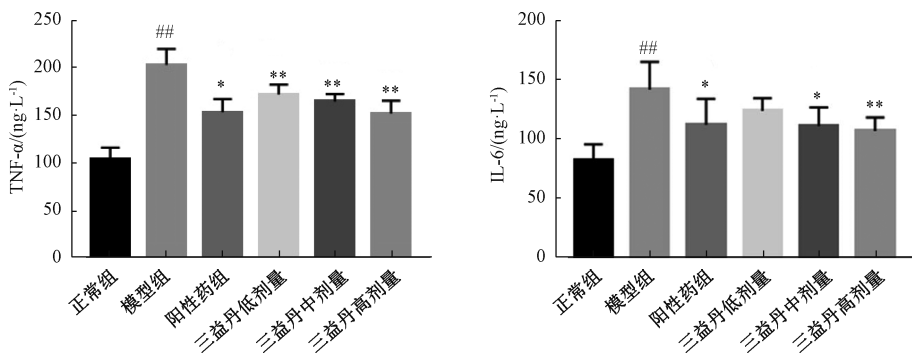
目前诱导心肌缺血模型的方法有冠脉结扎法、药物诱导法。其中冠脉结扎法为经典方法，但对动物造成的手术创伤较大、死亡率和成本较高。而药



注：与正常组比较，^{##}*P*<0.01；与模型组比较，^{*}*P*<0.05，^{**}*P*<0.01。

图 6 三益丹对心肌缺血大鼠血清 NO、MDA 水平的影响

Fig. 6 Effects of Sanyidan on serum levels of NO, MDA in myocardial ischemic rats



注：与正常组比较，^{##}*P*<0.01；与模型组比较，^{*}*P*<0.05，^{**}*P*<0.01。

图 7 三益丹对心肌缺血大鼠血清 TNF-α、IL-6 水平的影响

Fig. 7 Effects of Sanyidan on serum levels of TNF-α and IL-6 in myocardial ischemic rats

物诱导法简单、易行、省时、省力，多用于药理、药效学的研究，既可预防给药亦可治疗给药。药物诱导剂常用 ISO 皮下或腹腔注射，也有少量文献报道采用垂体后叶素舌下静脉或腹腔注射^[6-7]。ISO 为 β 受体激动剂，可引起心肌强烈收缩，使心肌细胞耗氧量急剧增加^[8]。相关文献报道，注射 ISO 的剂量对造模的程度影响较大，60 mg/kg 以下的剂量诱导造成的损伤大部分为可逆性损伤，存在自愈的现象；而 85 mg/kg 及以上的剂量诱导造成的损伤多为不可逆损伤，基本可以排除机体自愈对药理作用机制的影响。其中采用 85 mg/kg 诱导心肌缺血动物模型较多，最为成熟。因此，本实验采用 85 mg/(kg/d) 的 ISO 剂量连续皮下注射 3 d 复制心肌缺血动物模型。

心肌缺血临床表现为，心电图 ST 段抬高，其抬高程度可以反映心肌缺血和心肌损伤的严重程度，为心肌缺血损伤程度最直观的标志之一^[9]。cTn 属于一种心肌收缩的调节蛋白，大量存在于心肌细胞中，包括 cTn-T、cTn-I、cTn-C 3 种不同基因的亚基，其中 cTn-I 在心肌中有 2 种存在形式，

大多数以结合形式在肌原纤维中存在，少量以游离形式存在于细胞质中。在心脏受损早期，cTn-I 会以游离形经过淋巴循环进入血液。在心肌细胞受损后期，肌原纤维被不断破坏，结合形式的 cTn-I 会持续释放，机体中 cTn-I 水平会明显升高，一般在发病 14~24 h，cTn-I 水平达高峰，持续时间较长。且 cTn-I 指标的敏感性、特异性不易受其他因素的影响，是反映心肌损伤的特异性标志物，当心肌组织出现微小区域坏死时，即可检测到肌钙蛋白的升高^[10-12]。因此 cTn-I 可作为评估心肌缺血或梗死中心肌损伤情况的一个重要指标。CK、LDH、AST 是人体 3 种重要的心肌酶，正常人血清中心肌酶水平较少，当心肌组织受到损伤时血管通透性增加，细胞内的酶发生外漏，导致血清中心肌酶含量增加，心肌酶含量的多少亦可反映心肌受损和坏死程度，也常用作心肌损伤的诊断标志物^[11-15]。当心肌受损时，心肌组织会出现病理改变，心脏病理切片最能直观的观察心肌损伤的程度。本实验通过复制 ISO 致大鼠心肌缺血模型，通过观察心肌缺血大鼠心电图 ST 段、心肌组织病理损伤程度，同时测

定 cTn-I、CK、LDH、AST 特异性指标水平变化,发现三益丹能有效的降低心肌缺血大鼠心电图 ST 段抬高程度,减轻心肌组织的病理损伤,明显降低心肌缺血大鼠血清中 cTn-I、CK、LDH、AST 的水平。从而表明三益丹对 ISO 致大鼠心肌缺血有预防性保护作用。

MDA 为 ROS 与细胞膜上不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应的终产物,MDA 的水平可以反应脂质过氧化程度^[13]。TNF- α 是一种单核因子,主要由血液单核细胞和组织巨噬细胞产生,是重要的致炎因子,而且可直接诱导心肌细胞凋亡^[16]。IL-6 主要由活化的中性粒细胞产生,是重要的炎性因子和免疫调节因子^[17]。当心肌缺血发生时,可引起 TNF- α 、IL-6 等炎性因子释放,促使中性粒细胞向损伤区域聚集,组织浸润增加,从而引发炎症反应,同时产生大量自由基,加剧组织损伤。有证据表明,当 NO 处在高浓度状态下时,可以诱导促炎细胞因子 TNF- α 和 IL-6 等的产生和释放,TNF- α 又能进一步激活一氧化氮合酶(iNOS),从而产生更多的 NO,形成正反馈循环调节,使炎性细胞因子以及 NO 持续表达,致使炎症反应更持久、更剧烈^[18]。心肌缺血损伤其发生机制较为复杂,氧化应激和炎症反应对心肌缺血的发生具有重要意义^[19]。本实验通过测定心肌缺血大鼠血清中 MDA、NO、TNF- α 和 IL-6 水平,发现三益丹中高剂量组能显著降低体内炎症因子的释放和脂质过氧化物的含量,表明改善心肌缺血的作用机理可能与抗氧化减少脂质过氧化物、抗炎减少炎性因子释放等因素有关,从而减轻心肌损伤。

综上所述,三益丹对 ISO 致大鼠心肌缺血有预防性的保护作用,为临床用于心血瘀阻引起的心前区闷痛不适(心绞痛)提供依据,也证明了其疗效的可靠性,为后期的进一步开发应用提供依据。同时证明其作用机理可能与抗氧化、抗炎等因素相关,详细机理有待进一步研究。

参考文献:

[1] 葛均波,徐永健.内科学[M].4版.北京:人民卫生出版社,2013,227.

[2] 周晟芳.名老中医刘志明滋肾活血方对大鼠缺血心肌蛋白质组学及分子机理研究[D].北京:中国中医科学院,2016.

[3] 刘麦娥,高海琪,岳宝森.三益丹滴丸的成型工艺研究[J].现代中医药,2011,31(2):65-66.

[4] 张博.冰片等开窍药对实验动物的睡眠时间与睡眠时相的影响[D].哈尔滨:黑龙江中医药大学,2013.

[5] 国家药典委员会编.中华人民共和国药典[S].北京:中国医药科技出版社,2015.

[6] 吴广均,张云.Langendorff法、冠脉结扎法及ISO诱导心肌缺血模型的比较[J].现代中西医结合杂志,2011,20(22):2849-2851.

[7] 刘振,刘玲玲,杨延桐.两种大鼠心肌梗死模型的比较研究[J].动物医学进展.2010,31(4):19-25.

[8] 严蓓,阿基业,郝海平,等.基于血浆和心肌内小分子的代谢组学方法评价心肌缺血大鼠模型[J].药学报,2013,48(1):104-112.

[9] Cinca J, Noriega F J, Jorge E, *et al*. ST-segment deviation behavior during acute myocardial ischemia in opposite ventricular regions: Observations in the intact and perfused heart[J]. *Heart Rhythm*, 2014, 11(11): 2084-2091.

[10] 黄漠然.营心丹对冠心病动物模型的作用及作用机理研究[D].北京:北京中医药大学,2018.

[11] 邵小燕.探讨心肌酶谱与肌钙蛋白I(cTnI)联合检测在急性心肌梗死早期诊断中的应用[J].世界最新医学信息文摘,2018,18(94):129+139.

[12] 黄华翠,陈华根.心肌肌钙蛋白的理解和应用[J].基层医学论坛,2015,19(19):2665-2667.

[13] 王秀珍.稳心丹对MIRI大鼠心肌保护作用及机制研究[D].哈尔滨:黑龙江中医药大学,2016.

[14] 王道成,李七一,朱萱萱,等.冠心平对异丙肾上腺素致心肌缺血的试验研究[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(10):143-146.

[15] 周丹,田天,舒庆,等.丹酚酸B对大鼠缺血心肌血管再生的促进作用[J].中草药,2018,49(21):5166-5169.

[16] Chen J W, Chen Y H, Lin S J. Long-term exposure to oxidized low-density lipoprotein enhances tumor necrosis factor- α -stimulated endothelial adhesiveness of monocytes by activating superoxide generation and redox-sensitive pathways[J]. *Free Radic Biol Med*, 2006, 40(5): 817-826.

[17] 林丽艳,张慧云,何韶衡.IL-6及其受体与炎症性疾病关系的新进展[J].中国热带医学,2008,8(4):680-682.

[18] 范精华,刘康,刘保林.NO在炎症及免疫应答中的调节作用[J].中外医疗,2009,28(25):163-164.

[19] 张天艺.开心散对抑郁症合并心肌缺血模型大鼠的保护作用研究[D].北京中医药大学,2018.