

· 论著 ·

麝香保心丸抗心肌细胞缺氧-复氧损伤活性成分筛选

韩琳¹, 吕超², 李敏², 黄慧梅², 畅婉琳², 彭成成³, 柳润辉¹ (1. 第二军医大学药学院, 上海 200433; 2. 福建中医药大学药学院, 福建 福州 350108; 3. 上海交通大学药学院, 上海 200240)

[摘要] 目的 建立原代心肌细胞缺氧-复氧模型, 并对麝香保心丸及其 20 种血中活性成分进行抗缺氧-复氧损伤的活性筛选。方法 取新生(1~3 d)SD 乳鼠的心脏, 建立原代心肌细胞的缺氧-复氧损伤模型, 并采用四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法进行麝香保心丸及其入血成分的活性筛选。结果 麝香保心丸在 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度下具有较好的保护原代心肌细胞缺氧-复氧损伤的作用; 人参皂苷 Rb1、人参皂苷 Rb2、蟾毒灵和麝香酮具有较好的保护原代心肌细胞缺氧-复氧损伤的作用。结论 麝香保心丸具有抗心肌细胞缺氧-复氧损伤的作用, 人参皂苷 Rb1、人参皂苷 Rb2、蟾毒灵和麝香酮是其主要的有效成分。该研究为麝香保心丸深入的药效和机制研究奠定了基础。

[关键词] 麝香保心丸; 心肌细胞; 缺氧-复氧模型; 活性成分筛选

[中图分类号] R972 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2014)03-0209-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2014.03.012

Screening of main active components against cardiomyocyte hypoxia/reoxygenation injury in shexiang baixin Pill

HAN Lin¹, LV Chao², LI Min², HUANG Huimei², CHANG Wanlin², PENG Chengcheng³, LIU Runhui¹ (1. School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fujian 350108, China; 3. School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

[Abstract] **Objective** To build hypoxia/reoxygenation injury model in cultured neonatal rat cardiomyocyte and screen active components from Shexiang Baixin Pill (SBP) absorbed in blood against hypoxia/reoxygenation injury. **Methods** Cardiomyocytes were isolated and purified from hearts of neonatal Sprague Dawley rats (1~3 days old) and were used to build hypoxia/reoxygenation injury model. The components of SBP absorbed in blood were screened by methyl thiazolil tetrazolium (MTT) colorimetric method. **Results** SBP showed significant protective effect against cardiomyocytes hypoxia/reoxygenation injury at the concentration of 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Ginsenoside Rb1, Rb2, bufalin and muscone of twenty components from SBP absorbed in blood also possessed significant protective effect against cardiomyocytes hypoxia/reoxygenation injury. **Conclusion** SBP have the protective activity against cardiomyocytes hypoxia/reoxygenation injury, and ginsenoside Rb1, Rb2, bufalin, muscone are the main active components of SBP. This experiment offered basis for further pharmacodynamics and mechanism study of SBP.

[Key words] Shexiang Baixin Pill (SBP); cardiomyocyte; hypoxia/reoxygenation model; screening of active components

麝香保心丸是在宋代著名方书《太平惠民和剂局方》所载的苏合香丸的基础上创新开发研制成功的现代中药, 具有芳香温通、益气通心之功效, 主要用于治疗心肌缺血引起的心绞痛、胸闷及心肌梗死, 是目前国内临床上广泛应用于治疗冠心病的特效复方药物^[1]。麝香保心丸由人参提取物、麝香、蟾酥、苏合香酯、冰片、牛黄和肉桂等 7 味药材组成^[2]。现代药理学研究表明麝香保心丸具有抑制血清 Tc 及 LDL-C 的浓度升高, 保护血管内皮细胞和基底膜完整, 抑制血管壁炎症和内膜增生, 抑制动脉粥样硬化

的发展, 同时能改善心肌代谢, 增强心肌能量储备, 促进 DNA、RNA 的合成, 提高机体耐缺氧能力, 增强心肌收缩力, 提高血浆环腺苷酸(cAMP)水平, 抑制血小板的聚集、稳定心肌细胞膜等药理作用^[3]。

Xiang 等^[4]采用代谢组学方法研究了麝香保心丸对大鼠急性心肌梗死的整体药效及作用机制, 表明麝香保心丸对大鼠急性心肌梗死有治疗作用, 且主要通过改善心肌梗死引起的能量代谢异常、氧化损伤和炎症等途径对心肌梗死大鼠起到治疗作用。本课题组采用血清药物化学理论与 HPLC-ESI-MS/MS 和 GC-MS 方法相结合, 分析了麝香保心丸的血中活性成分变化, 共鉴定了 20 种血中活性成分^[5,6]。本实验采用原代心肌细胞缺氧-复氧模型,

[作者简介] 韩琳, 女, 硕士研究生. Tel: 13817083348, E-mail: hanlinlin2008@aliyun.com.

[通讯作者] 柳润辉. Tel: (021)81871245, E-mail: lyliurh@126.com.

在细胞水平上对麝香保心丸及其20种血中活性成分进行抗缺氧-复氧损伤的活性筛选,进一步明确其保护心肌的药效物质。

1 材料

1.1 仪器 二氧化碳培养箱(MCD-18M,日本);恒温混匀仪(Eppendorf,德国);台式高速离心机(Eppendorf, Centrifuge 5810,德国);十万分之一电子天平(Sartorius, BP 211D,德国);氮气罐(上海天翼气体有限公司);酶标仪(BioTek, ELx800,美国)。

1.2 动物 新生1~3 d的SPF级Sprague Dawley (SD)乳鼠[上海斯莱克实验动物有限公司,许可证号SCXK(沪)2007-0005]。

1.3 试药 麝香保心丸(上海和黄药业有限公司,批号:120716)。肉桂酸、肉桂醛、熊去氧胆酸、鹅去氧胆酸、猪去氧胆酸、去氧胆酸和胆酸7种对照品均购自中国药品生物制品检定所。人参皂苷Rb1、Rb2、Rb3、Rc、Rd、Re、Rg1和麝香酮8种对照品均购自上海鼎瑞化工生物科技有限公司。冰片、蟾毒灵、华蟾酥毒基、酯蟾毒配基和日蟾毒他灵5种对照品均购自江西南昌贝塔生物科技有限公司。

1.4 试剂 高糖DMEM培养基、低糖DMEM培养基、胎牛血清(FBS)、磷酸盐缓冲液(PBS)、胰蛋白酶(GIBCO,美国);双抗(博光生物医药技术有限公司);二甲基亚砜(DMSO)、MTT试剂(Sigma,美国)。

2 方法与结果

2.1 原代心肌细胞的培养 本实验参考了Grynborg等^[7]的细胞培养方案:用75%乙醇给乳鼠消毒后放进超净台,用剪刀在乳鼠胸腔下方2根肋骨之间剪开,轻轻挤压心脏自动蹦出,再剪取心尖并用4℃预冷的PBS将心尖上的残血洗净并将心尖均匀剪碎。加入0.08%的胰蛋白酶置于混匀仪中以37℃、450 r/min震荡消化心脏组织7 min。第1次消化的上清液弃去,从第2次开始到心脏组织消化完全后,将每次收集到的上清液加入到含有20% FBS的高糖DMEM培养基中以终止消化。最终收集总的上清液在离心机中以1 500 r/min离心10 min,并收集心肌细胞将其转移到培养皿中,然后放于二氧化碳培养箱中差速贴壁90 min后再将细胞悬液取出,混匀后计数。在第2~4天换液时在培养基中加入0.1 mmol/L的5-溴尿嘧啶以抑制成纤维细胞的生长,通过倒置显微镜观察细胞形态(图1)。

2.2 缺氧-复氧模型的建立 取长势良好的心肌细胞用于实验,以 10^6 个/ml的密度接种到96孔板中,每孔100 μ l,在37℃、5% CO₂培养箱中培养48 h后

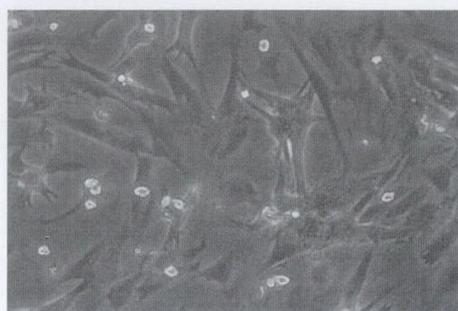


图1 培养5 d后10×20显微镜视野里观察到的心肌原代细胞

换液,换液后72 h用于实验。建立缺氧-复氧模型时模型组的培养液换成不含FBS的低糖培养基,并将二氧化碳培养箱的环境改成95% N₂和5% CO₂。在此环境下缺氧数小时后,再将培养液换回含20% FBS的高糖培养基,并回到正常条件(即95%空气和5% CO₂,37℃)下的二氧化碳培养箱中复氧数小时。参考文献资料,对缺氧-复氧的时间进行了摸索,分别是缺氧3 h复氧2 h(H3/R2)^[8],缺氧5.5 h复氧12 h(H5.5/R12)^[9]以及缺氧4 h复氧12 h(H4/R12)。缺氧-复氧结束后,每孔加5 mg/ml MTT溶液10 μ l,然后在二氧化碳培养箱中培养4 h后终止培养,再将含有MTT的培养基弃去,每孔加入DMSO 150 μ l,避光振摇10 min,使结晶充分溶解后用酶标仪测570 nm下每孔的消光度值(OD值)。数据用SPSS 16.0统计软件进行独立样本 t 检验。细胞存活率(%) = 造模组OD平均值/正常组OD平均值×100%。所得结果如表1所示,最终选择H4/R12作为造模条件。

表1 H3/R2、H5.5/R12和H4/R12造模对比($n=48$)

组别	均值	标准差	存活率(%)
正常组(H3/R2)	1.23	0.08	100
模型组(H3/R2)	1.13	0.11	92.4 ¹⁾
正常组(H4/R12)	1.23	0.12	100
模型组(H4/R12)	0.91	0.09	74.5 ¹⁾
正常组(H5.5/R12)	1.23	0.12	100
模型组(H5.5/R12)	0.95	0.16	77.6 ¹⁾

注:¹⁾ $P < 0.05$,与正常组相比。

2.3 麝香保心丸对缺氧-复氧心肌细胞的保护作用

将麝香保心丸研磨成细粉状,精密称取4 g,用甲醇32 ml加二氯甲烷16 ml再加去离子水4 ml配成的混合溶剂超声提取30 min,抽滤提取液并收集滤液,在55℃下旋转蒸发制得麝香保心丸浸膏并于4℃密封保存。临用前精密称取2 mg,用DMSO 20 μ l助溶,然后加入培养基配制成500 μ g/ml的母液。将母液分别稀释成30、50、100、150 μ g/ml的工作

液。造模前1 h 给药,各组之间平行操作。给药组和模型组缺氧4 h 复氧12 h,造模结束后,每孔加5 mg/ml MTT 溶液10 μ l,在二氧化碳培养箱中培养4 h 后终止培养,然后将含有 MTT 的培养基弃去,并在每孔中加入 DMSO 150 μ l,避光振荡10 min,使结晶充分溶解后用酶标仪测570 nm 下每孔的 OD 值。并用 SPSS 16.0 软件对数据进行单因素方差分析,结果如图2 所示,30、50、100、150 μ g/ml 均为麝香保心丸的有效剂量,其中在50 μ g/ml 的剂量下具有较好的抗心肌细胞缺氧-复氧损伤作用。

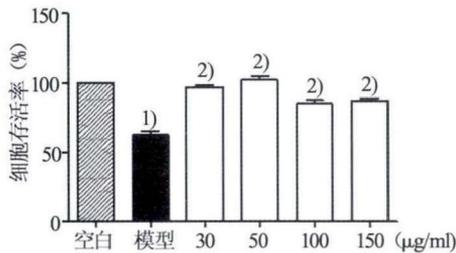


图2 不同浓度的麝香保心丸对缺氧复氧心肌细胞存活率的影响

¹⁾ $P < 0.01$,与空白组比较;²⁾ $P < 0.01$,与模型组比较

2.4 麝香保心丸中入血成分抗心肌细胞缺氧-复氧损伤的活性筛选 将20个人血成分精密称取一定量,并将每个成分配成250 μ mol/L的母液,分别稀释成1、10、50 μ mol/L的工作液。造模前1 h 给药,各组之间平行操作。给药组和模型组缺氧4 h 复氧12 h,空白组在正常条件下培养。造模结束后每孔加5 mg/ml MTT 溶液10 μ l,在碳培养箱中培养4 h 后终止培养,然后将含有 MTT 的培养基弃去,每孔加入 DMSO 150 μ l,避光振荡10 min,使结晶充分溶解后用酶标仪测570 nm 下每孔的 OD 值。数据采用 SPSS 16.0 软件进行单因素方差分析,结果如图3 所示。20种人血活性成分中有4种成分具有显著的保护心肌细胞缺氧-复氧损伤的作用,其中人参皂苷 Rb1 在10、50 μ mol/L 时具有显著的保护作用;人参皂苷 Rb2 在50 μ mol/L 时显示有较强的保护作用;蟾毒灵和麝香酮在3个浓度下都具有保护心肌细胞缺氧-复氧损伤的作用,且在10、50 μ mol/L 时效果最佳。

3 讨论

本研究采用原代心肌细胞建立缺氧-复氧模型,并对麝香保心丸及其20种人血中活性成分进行抗心肌细胞缺氧-复氧损伤保护作用的筛选。研究结果表明,麝香保心丸在50 μ g/ml 的剂量下具有较好的抗心肌细胞缺氧-复氧损伤的作用;20种人血中

活性成分中人参皂苷 Rb1、Rb2、蟾毒灵和麝香酮具有明显的保护心肌细胞缺氧-复氧损伤作用,提示这4种成分是麝香保心丸中保护心肌细胞缺氧-复氧损伤的主要有效物质。其中已有实验研究表明,人参皂苷 Rb1 和麝香酮具有保护心肌细胞损伤的作用^[10-12],与笔者的研究结果一致。本研究初步明确了麝香保心丸在细胞水平具有保护心肌细胞损伤的作用及药效物质,为进一步研究其作用机制提供了依据。

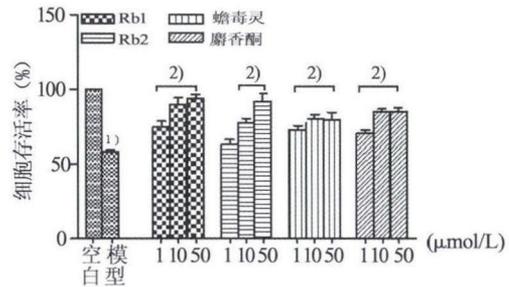


图3 不同浓度的人参皂苷 Rb1、Rb2、蟾毒灵和麝香酮对缺氧复-氧心肌细胞存活率的影响

¹⁾ $P < 0.01$,与空白组比较;²⁾ $P < 0.01$,与模型组比较

【参考文献】

- [1] 车薇,陈红英,张淑珍. 麝香保心丸的临床应用研究进展[J]. 中国急救复苏与灾害医学杂志, 2008, 3(5): 307-309.
- [2] 宋华. 麝香保心丸的药理研究与临床评价[J]. 中成药, 2002, 24(2): 131-133.
- [3] 李修,金胡珂,吴国洪. 麝香保心丸治疗急性心肌梗死疗效观察[J]. 现代中西医结合杂志, 2012, 21(10): 1062-1063.
- [4] Xiang L, Jiang P, Zhan CS, et al. The serum metabolomic study of intervention effects of the traditional Chinese medicine Shexiang Baoxin pill and a multi-component medicine polypill in the treatment of myocardial infarction in rats[J]. Mol Biosyst, 2012, 8(9): 2434-2442.
- [5] Jiang P, Liu RH, Dou SS, et al. Analysis of the constituents in rat plasma after oral administration of Shexiang Baoxin pill by HPLC-ESI-MS/MS[J]. Biomed Chromatogr, 2009, 23(12): 1333-1343.
- [6] 郭黎安,王淑萍,向丽,等. 气相色谱-质谱法定性分析麝香保心丸挥发性入血成分的研究[J]. 药学实践杂志, 2012, 30(3): 207-210.
- [7] Crynberg A, Athias P, Degois M. Effect of change in growth environment on cultured myocardial cells investigated in a standardized medium[J]. In vitro Cell Dev Biol, 1986, 22(1): 44-50.
- [8] 张爽,李红,杨世杰. 蒺藜皂苷单体 B 对心肌细胞缺氧/复氧损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2010, 26(2): 208-212.
- [9] 马青变,高炜,郭艳红,等. 缺氧复氧诱导大鼠心肌细胞内质网应激反应[J]. 北京大学学报(医学版), 2005, 37(4): 386-388.

(下转第219页)

认为当患者 $Ccr > 110 \text{ ml/min}$ 及在 $90 \sim 110 \text{ ml/min}$ 时,万古霉素日剂量应分别达到 3.0 g 和 2.5 g 。本次调查中的 3 例 $Ccr > 110 \text{ ml/min}$ 的患者,万古霉素给药剂量 $1 \text{ g}, q 12 \text{ h}$,血药谷浓度均 $< 10 \text{ mg/L}$,结果提示给药剂量偏低。Yoshida 等^[10]的研究结果表明,要想使万古霉素谷浓度达到 $10 \sim 15 \text{ mg/L}$,肾功能正常 (Ccr 在 $80 \sim 100 \text{ ml/min}$) 成年人的给药剂量应达到 $20 \text{ mg/kg}, q 12 \text{ h}$;对于肾功能不全患者专家共识^[1]指出:当 $Ccr \geq 50 \text{ ml/min}$ 时,万古霉素给药剂量 $1 \text{ g}, q 12 \text{ h}$;当 Ccr 在 $20 \sim 50 \text{ ml/L}$ 时,万古霉素给药剂量 $0.5 \text{ g}, q 12 \sim 24 \text{ h}$;本次调查中:A 组患者万古霉素 $1 \text{ g}, q 12 \text{ h}$ 和 $0.5 \text{ g}, q 12 \text{ h}$ 两种用药方案,血药谷浓度在 $10 \sim 20 \text{ mg/L}$ 有效范围的比例分别为 72.00% 和 33.33% ,达标比例有明显差异,且用药方案 $0.5 \text{ g}, q 12 \text{ h}$ 的患者有 66.67% 血药谷浓度 $< 10 \text{ mg/L}$,给药剂量偏低。结果提示,当患者 $Ccr \geq 50 \text{ ml/min}$ 时,万古霉素用药剂量应 $1 \text{ g}, q 12 \text{ h}$ 为宜;B 组万古霉素用量 $1 \text{ g}, q 12 \text{ h}$ 和 $0.5 \text{ g}, q 12 \text{ h}$ 两种用药方案,血药谷浓度达 $10 \sim 20 \text{ mg/L}$ 有效范围的比例分别为 20.00% 和 60.00% ,达标比例有明显差异,且万古霉素用量 $1 \text{ g}, q 12 \text{ h}$ 的患者有 73.33% 血药谷浓度超过了 20 mg/L 的安全有效范围,用药剂量偏高,结果提示当患者 $Ccr < 50 \text{ ml/min}$ 时,万古霉素用药剂量 $0.5 \text{ g}, q 12 \text{ h}$ 为宜。该结果与专家共识指出的不同肾功能情况下万古霉素用量一致。

肾毒性是万古霉素的主要不良反应,该药主要经肾排泄,肾功能不全时导致药物清除率降低,药物在体内蓄积,血药浓度升高,增加不良反应的发生。本次调查中,A 组全部患者及 B 组万古霉素用量 $0.5 \text{ g}, q 12 \text{ h}$ 的患者用药前后血清肌酐、尿素氮无明显变化 ($P > 0.05$),且无 1 例肾毒性发生;而 B 组中万古霉素用药剂量 $1 \text{ g}, q 12 \text{ h}$ 的 15 例患者用药前后血清肌酐值有明显上升 ($P < 0.05$),有 5 例出现了肾毒性,其血药谷浓度均 $\geq 30 \text{ mg/L}$ 。肾毒性的出现与用药剂量大,血药浓度高有关。调查结果进一步说明, Ccr 是反应万古霉素体内清除的有效指标,老年人应用万古霉素,应根据患者 Ccr 选择合适的药物剂量,以减少不良反应的发生。

综上所述,老年重症感染患者应根据 Ccr 情况

决定万古霉素用量, $Ccr \geq 50 \text{ ml/min}$ 时,万古霉素用量 $1 \text{ g}, q 12 \text{ h}$; Ccr 在 $20 \sim 50 \text{ ml/min}$ 时,万古霉素用量 $0.5 \text{ g}, q 12 \text{ h}$ 。由于个体差异,老年患者应重视监测血药谷浓度,并根据血药谷浓度调整用药方案。

【参考文献】

- [1] 黄仲义,肖永红,张菁,等. 万古霉素临床应用中国专家共识(2011)[J]. 中国新药与临床杂志,2011,30(8):561-573.
- [2] Liu C, Bayer A, Cosgrove SE, et al. Clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America for the treatment of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children[J]. Clin Infect Dis, 2011, 52: e18-e55.
- [3] Rybak M, Lomaestro B, Rotschafer JC, et al. Therapeutic monitoring of vancomycin in adult patients: a consensus review of the American Society of Health-System Pharmacists, the Infectious Diseases Society of America, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists[J]. Am J Health Syst Pharm, 2009, 66: 82-98.
- [4] 中华医学会甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌感染治疗策略专家组. 中华医学会感染与抗微生物治疗策略高峰论坛: 甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌感染的治疗策略——专家共识[J]. 中国感染与化疗杂志, 2011, 11(6): 401-416.
- [5] Gilbert DN, Moellering RC, Eliopoulos MG, et al. The Sanford Guide to Antimicrobial Therapy 2010[M]. 40th ed. Sperryville, VA: Antimicrobial Therapy Inc, 2010: 25-27.
- [6] Park KH, Kim ES, Kim HS, et al. Comparison of the clinical features, bacterial genotypes and outcomes of patients with bacteraemia due to heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* and vancomycin-susceptible *S. aureus* [J]. J Antimicrob Chemother, 2012, 67: 1843-1849.
- [7] Kullar R, Davis SL, Taylor TN, et al. Effects of targeting higher vancomycin trough levels on clinical outcomes and costs in a matched patient cohort[J]. Pharmacotherapy, 2012, 32: 195-201.
- [8] Sakoulas G, Gold HS, Cohen RA, et al. Effect of prolonged vancomycin administration on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a patient with recurrent bacteraemia[J]. J Antimicrob Chemother, 2006, 57: 699-704.
- [9] Thomson AH, Staatz CE, Tobin CM, et al. Development and evaluation of vancomycin dosage guidelines designed to achieve new target concentrations[J]. J Antimicrob Chemother 2009, 63(5): 1050-1057.
- [10] Yoshida M, Yasuda N, Nishikata M, et al. New recommendations for vancomycin dosage for patients with MRSA pneumonia with various degrees of renal function impairment[J]. J Infect Chemother, 2005, 11(4): 182-188.

【收稿日期】 2013-04-08 【修回日期】 2013-11-28

【本文编辑】 陈静

(上接第 211 页)

- [10] Kong HL, Wang JP, Li ZQ, et al. Anti-hypoxic effect of ginsenoside Rb1 on neonatal rat cardiomyocytes is mediated through the specific activation of glucose transporter-4 *ex vivo*[J]. Acta Pharmacol Sin, 2009, 30(4): 396-403.
- [11] Kong HL, Li ZQ, Zhao YJ, et al. Ginsenoside Rb1 protects cardiomyocytes against CoCl_2 -induced apoptosis in neonatal rats by

inhibiting mitochondria permeability transition pore opening[J]. Acta Pharmacol Sin, 2010, 31(6): 687-695.

- [12] Wu QB, Li HT, Wu Y, et al. Protective effects of muscone on ischemia-reperfusion injury in cardiac myocytes[J]. J Ethnopharmacol, 2011, 138(1): 34-39.

【收稿日期】 2014-01-15 【修回日期】 2014-04-02

【本文编辑】 陈静