

(均 $P < 0.05$)。川芎嗪及其衍生物活性大小顺序是川芎嗪衍生物组 \gg TMP 组 $>$ Ver 组。

4 讨论

笔者在本实验中对合成的川芎嗪衍生物(A3-A6)进行了药理活性筛选,以抑制率比较川芎嗪衍生物对细胞胞质内游离钙离子浓度的影响强弱,抑制率越大,表明抑制作用越强。从初筛结果看,目标化合物的药理活性高于对照药 Ver 和 TMP。这初步证明设计思路合理,苯环上含有 F、Cl、OCH₃ 取代的衍生物的活性与川芎嗪相比得到了较大改善,含有苄基的衍生物活性相对较低。这一研究结果将有助于新一轮川芎嗪衍生物的设计与结构优化。

本研究结果表明,川芎嗪衍生物对 NE 诱发的人 PCSCM 内 Ca²⁺ 升高有明显抑制作用,作用机制仍与直接阻滞细胞膜钙通道和抑制细胞内钙库的释放有关,川芎嗪衍生物也具有钙离子拮抗药特性,是其松弛海绵体平滑肌的药理作用基础。川芎嗪衍生物活性高于母药 TMP,水溶性更高,有进一步研究价值。为川芎嗪的结构改造和修饰,改善其药动学参数,研发新一代川芎嗪

类 ED 治疗药物提供了药物临床前研究依据。

[DOI] 10.3870/yydb.2009.02.004

[参考文献]

[1] 北京制药工业研究所. 川芎嗪有效成分的研究-川芎嗪的提取、分离和结构鉴定[J]. 中华医学杂志, 1977, 57(7):420.

[2] 北京制药工业研究所. 川芎 1 号生物碱的结构鉴定及其合成[J]. 中草药通讯,1977,4(1):6.

[3] LIANG C C, HONG C Y, CHEN C F, et al. Measurement and pharmacokinetic study of tetramethylpyrazine in rat blood and its brain tissue by high performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr(B)*, 1999, 724:303.

[4] SAENZ D E, TEJADA I. Molecular mechanisms for the regulation of penile smooth muscle contractility[J]. *Int J Impot Res*, 2002, 14, (Suppl 1) :S6-S10.

[5] 陈智,刘继红,尹春萍,等. 川芎嗪对家兔阴茎海绵体平滑肌细胞游离钙浓度的影响[J]. 中华男科学杂志, 2003, 9(5):331-334.

[6] 陈智,刘继红,陈俊. 家兔阴茎海绵体平滑肌细胞内游离钙检测方法的对比研究[J]. 中国男科学杂志, 2003, 18(3):179-181.

参麦注射液对慢性缺氧大鼠膈肌细胞凋亡的影响

蒋东霞¹, 赵丽敏², 马利军²

(1. 河南省肿瘤医院, 郑州 450000; 2. 河南省人民医院呼吸内科, 郑州 450000)

[摘要] 目的 观察参麦注射液(SMI)对慢性缺氧大鼠膈肌超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、一氧化氮(nitric oxide, NO)水平及膈肌细胞凋亡的影响。方法 将健康雄性 Wistar 大鼠 18 只随机分为 3 组各 6 只,正常对照组正常饲养,以制备慢性缺氧模型;慢性低氧组将大鼠置于有机玻璃低氧箱内饲养;参麦注射液治疗组采用同样方法制作模型,每天缺氧前腹腔注射参麦注射液,2 mL · d⁻¹。7 d 后采用分光光度法测定各组大鼠 SOD、MDA 和 NO, TUNEL 法检测细胞凋亡情况。结果 慢性缺氧大鼠膈肌 SOD 水平下降,MDA 与 NO 水平升高;同时慢性缺氧细胞凋亡百分数(凋亡指数)升高。参麦注射液能显著对抗缺氧时 SOD 水平下降、MDA 和 NO 水平升高;同时可以抑制缺氧引起的凋亡指数增加。结论 参麦注射液可能通过抑制自由基产生而对抗慢性缺氧时的细胞凋亡。

[关键词] 参麦注射液;膈肌;慢性缺氧;超氧化物歧化酶;细胞凋亡

[中图分类号] R286;R965 [文献标识码] A [文章编号] 1004-0781(2009)02-0150-03

Effects of Shenmai Injection on Rat Diaphragmatic Muscle Cell Apoptosis, SOD, MDA and NO after Chronic Hypoxia

JIANG Dong-xia¹, ZHAO LI-min², MA Li-jun² (1. Tumor Hospital of Henan Province, Zhengzhou 450000, China; 2. Department of Respiratory, People's Hospital of Henan Province, Zhengzhou 450000, China)

ABSTRACT Objective To study the effects of shenmai injection(SMI) on rat diaphragmatic muscle cell apoptosis, superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) and nitric oxide (NO) after chronic hypoxia. **Methods** Rats were hypoxic for one week. The levels of SOD, MDA and NO were measured by photometry. TUNEL was employed for detecting apoptosis. **Results** The level of SOD was decreased, while MDA and NO were both increased in rats with chronic hypoxia. Theses changes were all blocked by SMI. After chronic hypoxia, cell apoptosis was increased but which was inhibited by administration of SMI. **Conclusion** The apoptosis induced by chronic hypoxia could be blocked by SMI, which might be associated with blocking generation of free radicals.

KEY WORDS Shenmai injection; Diaphragmatic muscle; Chronic hypoxia; Superoxide dismutase; Apoptosis

慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 是严重影响我国人民身体健康的一类疾病,膈肌疲劳是该疾病发生发展的结果,也是导致高碳酸血症呼吸衰竭的常见原因之一。膈肌疲劳在临床上十分常见,与内科各专业疾病都有关系。故近年来,国内外对膈肌疲劳的研究日益受到重视。引起膈肌疲劳的因素很多,缺氧为常见的一种。参麦注射液的主要原料为红参和麦冬,在临床上除具有治疗冠心病、抗休克、提高免疫机能等功能外,还用于慢性肺源性心脏病、膈肌疲劳的治疗^[1]。国内曾有报道认为参麦注射液能通过抑制膈肌自由基及其脂质过氧化物的产生^[2],而用于膈肌疲劳的治疗。但笔者尚未见有关慢性缺氧时膈肌细胞的凋亡与自由基的关系,及参麦注射液如何通过影响氧自由基而影响细胞凋亡的报道。笔者在本实验中采用慢性缺氧大鼠模型,观察参麦注射液对慢性缺氧大鼠膈肌超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)和一氧化氮(NO)变化及细胞凋亡的影响,探讨参麦注射液治疗慢性缺氧膈肌疲劳的作用机制。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 低温冷冻离心机(Universal, USA),分光光度计(上海),参麦注射液(浙江正大青春宝药业有限公司产品,批号:950618),SOD 和 MDA 检测试剂盒(南京建成生物工程研究所提供),NO 试剂盒(购于北京晶美生物工程公司)。末端脱氧核苷酸转移酶介导的三磷酸脱氧尿嘧啶缺口末端标记法(TUNEL)试剂盒(德国 Boehringer Mannheim 公司产品)。

1.2 动物分组与模型制备 健康雄性 Wistar 大鼠(由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供)18 只,体质量 150~200 g,随机分为 3 组各 6 只。正常对照组在正常空气中饲养 7 d;慢性低氧组参照文献^[2]方法复制慢性常压低氧模型并加以改动,大鼠置于有机玻璃低氧箱内饲养,以钠石灰和无水氯化钙分别吸收二氧化碳和水分,以氧分压测定仪监测并维持氧浓度在(10±3)% ,每天缺氧前腹腔注射等量 0.9% 氯化钠溶液,缺氧 7 d,10 h·d⁻¹;参麦注射液治疗组采用同样方法制作模型,每天缺氧前腹腔注射参麦注射液,

2 mL·d⁻¹^[2],共 7 d。

1.3 观察指标与方法 将大鼠放血处死,迅速取膈肌,称取适量湿组织加 0.9% 氯化钠溶液(W/V=1:10)制成 10% 匀浆,于低温冷冻离心机 10 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,分离上清液低温保存备用。SOD 活性采用黄嘌呤氧化酶法,MDA 以改良的硫代巴比妥酸法测定,NO 采用硝酸还原酶的化学比色法测定,实验严格按照试剂盒的说明书操作。

1.4 TUNEL 凋亡的检测 膈肌取材后,固定于 4% 多聚甲醛中,石蜡包埋后制成 4 μm 厚连续切片,常规苏木精-伊红(HE)染色,鉴定为膈肌组织。每例标本选 4 张切片。切片常规脱蜡、复水;3% 过氧化氢(H₂O₂) 阻断内源性辣根过氧化物酶 30 min;20 μg·mL⁻¹ 蛋白酶 K 室温消化 10~15 min;标记缓冲液(含 0.003 μg·mL⁻¹ 末端脱氧核苷酸转移酶)湿盒中 37 °C 孵育 60 min;1:50 稀释的亲合素-辣根过氧化物酶(SABC),37 °C,孵育 30 min;0.004% DAB 显色液显 10 min,苏木精复染;透明,封片镜检。同时做不加末端脱氧核苷酸转移酶而其他条件不变的阴性对照。细胞凋亡数目与膈肌细胞数目的比值即凋亡指数(AI)。

1.5 统计学方法 所得数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用配对 *t* 检验进行分析处理。SPSS13.0 统计软件完成。*P*<0.05 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 参麦注射液对慢性缺氧大鼠膈肌 SOD、MDA 与 NO 水平的影响 缺氧后大鼠膈肌组织中 MDA 和 NO 水平皆显著升高,SOD 含量明显下降(均 *P*<0.01);而参麦注射液干预后,MDA 和 NO 水平明显下降,SOD 含量基本达到正常水平(*P*<0.01),见表 1。

2.2 参麦注射液对慢性缺氧大鼠膈肌细胞凋亡的影响 缺氧后大鼠膈肌细胞凋亡百分率明显增加(*P*<0.01),而参麦注射液可使细胞凋亡指数降低(*P*<0.01),结果见表 1。

3 讨论

膈肌疲劳是呼吸功能障碍的重要原因之一,故近年来越来越受到人们的重视。目前已知缺氧、二氧化碳潴留、中毒、气道阻力增加、营养不良、神经肌肉疾病等因素可能与其有关^[2],其中缺氧是常见的一种。机体在长期缺氧状态下,由于膈肌负荷加重及供氧减少,膈肌易发生疲劳^[3]。本实验参照文献^[2]方法,利用慢性缺氧造成膈肌疲劳,观察参麦注射液对疲劳膈肌

[收稿日期] 2008-03-25

[作者简介] 蒋东霞(1958-),女,河南郑州人,学士,副主任医师,研究方向:临床检验。

[通讯作者] 赵丽敏(1971-),女,河南洛阳人,博士,副主任医师,研究方向:哮喘和 COPD。电话:0371-65580581,(0)13838039805,E-mail:zhaolimin2002@126.com。

表 1 3 组大鼠膈肌细胞 SOD、MDA、NO 与 AI 测定结果

 $\bar{x} \pm s$

组别	大鼠数/只	SOD/ (ng · g ⁻¹)	MDA/ (μmol · g ⁻¹)	NO/ (μmol · L ⁻¹)	凋亡指数(AI)/ %
参麦注射液治疗组	6	77.49±21.75 ^{*1}	1.09±0.82 ^{*1}	13.60±2.83 ^{*1}	9.35±3.14 ^{*1}
慢性低氧组	6	70.55±28.12 ^{*2}	1.76±0.91 ^{*2}	34.73±4.46 ^{*2}	21.54±7.06 ^{*2}
正常对照组	6	76.32±16.78	1.31±0.84	12.56±2.62	0.94±0.27

与慢性低氧组比较,^{*1} $P < 0.01$;与正常对照组比较,^{*2} $P < 0.01$

SOD、MDA、NO 水平的的影响及细胞凋亡的作用。

近年来,多种实验证明自由基是导致多器官损伤的重要致病因子。自由基产生增加,可使膈肌收缩力下降,其机制可能是产生的自由基直接作用于收缩蛋白,引起收缩蛋白的损伤而影响膈肌的收缩^[4]。MDA 是氧自由基与生物膜多聚不饱和脂肪酸发生脂质过氧化化的产物,其产生量与氧自由基的量相平行^[5],因而测定 MDA 最可反映氧自由基的水平,间接反映出细胞损伤的程度。SOD 对机体的氧化与抗氧化平衡起着至关重要的作用,此酶能清除超氧阴离子自由基,保护细胞免受损伤,它是体内主要的自由基清除酶。测定此酶可反映机体内源性抗氧化能力。慢性缺氧、内毒素中毒都能使大鼠膈肌组织中氧自由基产生增多,清除氧自由基的 SOD 含量下降,细胞脂质过氧化破坏增加,引起细胞各种膜结构的损害,包括细胞膜、内质网、线粒体等,对于膈肌细胞,其细胞膜的损害造成除极化,动作电位传递障碍,线粒体受损造成能量代谢障碍,内质网受损造成兴奋-收缩耦联障碍,所有这些改变可造成膈肌收缩障碍,产生膈肌疲劳^[4,5]。NO 是由 NO 合酶(NOS)催化,由 L-精氨酸转变而来,NO 在组织内具有双重作用,一定量的 NO 对机体有利,但高水平 NO 往往引起细胞和组织损害^[6],因为 NO 与 O₂形成的过氧亚酸盐及其降解产物 OH⁻都是反应性自由基。国外有文献^[7]报道,机体在慢性缺氧、内毒素中毒等各种损伤因子的作用下,可引起膈肌组织中 NO 含量升高,继而造成膈肌损伤,影响其收缩力。

本实验发现,慢性缺氧大鼠膈肌组织 MDA、NO 皆显著增高,SOD 降低。同时,膈肌细胞凋亡增加。细胞凋亡是细胞死亡的一种形式。而参麦注射液治疗组大鼠膈肌组织 MDA、NO 显著降低,SOD 升高,而且细胞凋亡百分率也下降,提示自由基在慢性缺氧膈肌疲劳的发病中起重要作用,与文献^[8]报道一致;而且膈肌组织自由基的含量与细胞凋亡增加呈平行关系。同时

发现,参麦注射液具有抗氧自由基作用,对损伤的膈肌有保护作用,而且能够通过抑制自由基的产生使细胞凋亡减少。本实验为参麦注射液用于临床治疗膈肌疲劳提供了有益的实验依据。

[DOI] 10.3870/yydb.2009.02.005

[参考文献]

- [1] 尹丽慧,沃兴德.参麦注射液的药理和临床研究进展[J].浙江中医学院学报,2001,25(6):65-68.
- [2] 陶清国,赵建平,牛汝楫.膈肌疲劳发病机制与治疗的实验和临床研究[J].内科急危重症杂志,1996,2(2):62-64.
- [3] VOGIATZIS I, GEORGIADOU O, GIANNOPOULOU I, et al. Effects of exercise-induced arterial hypoxaemia and work rate on diaphragmatic fatigue in highly trained endurance athletes [J]. *J Physiol*, 2006, 15:539-549.
- [4] CALLAHAN L A, NETHERY D, STOFAN D, et al. Free radical-induced contraction protein dysfunction in endotoxin-induced sepsis [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001, 24(2): 210-217.
- [5] MIKAMA K, KODAMA S I, NISHINA K, et al. ONO-1714, a new inducible nitric oxide synthase inhibitor, attenuates diaphragmatic dysfunction associated with cerulein-induced pancreatitis in rats [J]. *Crit Care Med*, 2001, 29(6):1215-1221.
- [6] SUPINSKI G S, CALLAHAN L A. Free radical-mediated skeletal muscle dysfunction in inflammatory conditions [J]. *J Appl Physiol*, 2007, 102(5):2056-2063.
- [7] NYSTROM H C, KLINTLAND N, CAIDAHL K, et al. Short-term administration of growth hormone (GH) lowers blood pressure by activating eNOS/nitric oxide (NO)-pathway in male hypophysectomized (Hx) rats [J]. *BMC Physiol*, 2005, 7:5-17.
- [8] ZHU X, HEUNKS L M, ENNEN L, et al. Nitric oxide modulates neuromuscular transmission during hypoxia in rat diaphragm [J]. *Muscle Nerve*, 2006, 33(1):104-112.