

黄汕梅,李畅,马梓珊,等. 含服硝石雄黄散保护小鼠缺血心肌的实验研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(9): 19-26.
Huang SM, Li C, Ma ZS, et al. Protection of ischemic myocardium in mice by buccal administration of Xiaoshixionghuang San [J].
Chin J Comp Med, 2022, 32(9): 19-26.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.09.003

含服硝石雄黄散保护小鼠缺血心肌的实验研究

黄汕梅^{1,2}, 李 畅^{1,2}, 马梓珊^{1,2}, 郭玉洪², 赵洋洋², 刘 原², 银帮巧²,
刘 鹰^{1*}, 唐耀平^{1,2,3*}

(1. 广西中医药大学, 南宁 530200; 2. 广西中医药大学附属瑞康医院, 南宁 530011;
3. 广西高发传染病中西医结合转化医学重点实验室, 南宁 530200)

【摘要】 目的 探索硝石雄黄散保护小鼠缺血心肌的作用机制。**方法** 将 C57BL/6J 小鼠随机分为空白组 (Blank)、假手术组 (sham)、模型组 (AMI)、雄黄组 (XH)、硝石组 (XS) 和硝石雄黄组 (XSXH)。分别在造模后第 12、24 和 36 h, 采用 ELISA 法检测各组血清肌钙蛋白 I (cardiac troponin I, cTnI)、肌酸激酶同工酶 (creatinase isoenzymes, CK-MB) 和乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 水平; 在造模后第 14 天, 采用一氧化氮 (nitric oxide, NO) 试剂盒检测各组血清中总 NO 的含量; 采用苏木素-伊红染色法检测小鼠梗死心肌的病理损伤, 经 2,3,5-氯化三苯基四氮唑染色后测定心肌梗死面积; 在服用雄黄和硝石雄黄散 12 h 和第 14 天, 采用相关试剂盒检测各组血清中谷丙转氨酶、碱性磷酸酶、谷草转氨酶、肌酐和尿素氮等肝肾功能指标。**结果** 硝石雄黄组小鼠血清中 cTnI、CK-MB 和 LDH 水平较模型组、雄黄组和硝石组显著降低 ($P < 0.05$); 假手术组血清中 NO 水平较高, 发生心肌缺血后, NO 水平显著降低 ($P < 0.05$); 与模型组比, 雄黄组和硝石组能显著提高心肌梗死小鼠的 NO 水平 ($P < 0.01$); 与单味硝石或雄黄相比, 硝石雄黄组 NO 含量显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组相比, 硝石雄黄组小鼠心肌梗死面积显著减小 ($P < 0.05$); 该方具有明显改善小鼠心肌病理损伤的作用。与空白组相比, 雄黄组的肝肾功能各项指标显著升高 ($P < 0.01$), 硝石雄黄组的肝肾功能指标无显著差异 ($P > 0.05$)。**结论** 在心肌缺血时, 当 L-Arginine-eNOS-NO 通路被抑制后, 硝石雄黄散可通过 NO_3^- - NO_2^- -NO 通路调节小鼠体内的 NO 水平, 对小鼠缺血心肌起到显著的保护作用; 且对小鼠的肝肾功能无明显的急性毒性和亚急性毒性影响。

【关键词】 硝酸盐; 亚硝酸盐; 一氧化氮; 硝石雄黄散; 心肌缺血

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 09-0019-08

Protection of ischemic myocardium in mice by buccal administration of Xiaoshixionghuang San

HUANG Shanmei^{1,2}, LI Chang^{1,2}, MA Zishan^{1,2}, GUO Yuhong², ZHAO Yangyang², LIU Yuan²,
YIN Bangqiao², LIU Ying^{1*}, TANG Yaoping^{1,2,3*}

(1. Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530200, China. 2. Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530011. 3. Guangxi Key Laboratory of Translational Medicine of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine with High Infectious Diseases, Nanning 530200)

【基金项目】 国家自然科学基金项目 (81774115, 81460721); 广西中医药大学研究生教育创新计划项目 (YCSY2020025)。

【作者简介】 黄汕梅 (1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 中西医结合心血管疾病防治。E-mail: huangshanmei104@126.com

【通信作者】 唐耀平 (1969—), 男, 博士, 主任医师, 研究方向: 中西医结合心血管疾病防治。E-mail: tangyp2014@gxtcmu.edu.cn

刘鹰 (1968—), 女, 学士, 副主任医师, 研究方向: 中西医结合心血管疾病防治。E-mail: xdtly001@163.com

* 共同通信作者

【Abstract】 Objective To explore the effect and mechanism of Xiaoshixionghuangsan in regulating NO levels to protect ischemic myocardium in mice. **Methods** C57BL/6J mice were randomly divided into Blank, sham, model (AMI), Xionghuang (XH), Xiaoshi (XS) and Xiaoshixionghuang (XSH) groups. Following establishment of the mouse myocardial infarction model, Blank, sham operation, and model groups were given normal saline, whereas the other groups were given corresponding intervention drugs. Serum levels of cardiac troponin I (cTnI), creatine kinase isoenzyme (CK-MB), and lactate dehydrogenase (LDH) were detected by ELISA at 12, 24 and 36 h after modeling. On the fourteenth day after modeling, total NO contents in serum were detected with an NO kit, pathological damage of the infarcted mouse myocardium was detected by hematoxylin and eosin staining, and the infarcted area was measured by 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride staining. At 12 h and 14 days after Xiaoshixionghuang San administration, serum alanine aminotransferase, alkaline phosphatase, aspartate aminotransferase, creatinine, and urea nitrogen were detected by staining. **Results** Serum levels of cTnI, CK-MB and LDH in the XSH group were significantly lower compared with AMI, XH and XS groups ($P<0.05$). Serum NO levels in the sham group were high, but were significantly decreased in the AMI group ($P<0.05$). Compared with the AMI group, NO levels in mice with myocardial infarction were significantly increased in XH and XS groups ($P<0.01$). Compared with single XS or XH, NO contents in the XSH group were significantly increased ($P<0.001$). Compared with the AMI group, myocardial infarct sizes in the XSH group were significantly reduced ($P<0.05$). In addition, the decoction markedly improved the degree of pathological damage to the myocardium in mice. Compared with the Blank group, indexes of liver and kidney function in the XH group were significantly increased ($P<0.01$), and there was no significant difference in these indexes in the XSH group ($P>0.05$). **Conclusions** When the classical pathway L-Arginine-eNOS-NO pathway is inhibited during myocardial infarction, Xiaoshixionghuang San can regulate the level of NO in mice through the NO_3^- - NO_2^- -NO pathway to elicit a significant protective effect on ischemic mouse myocardium without obvious toxic effects on liver or kidney function.

【Keywords】 nitrate; nitrite; nitric oxide; Xiaoshixionghuang San; myocardial ischemia

冠状动脉粥样硬化性心脏病 (coronary artery diseases, CAD) 严重危害着民众的健康,是导致死亡的主要原因之一^[1-2]。CAD 的发展主要是由于斑块在冠脉内不断的堆积使冠脉逐渐狭窄,从而导致心肌组织缺血缺氧,严重时可出现急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI)^[3]。近年来,越来越多的学者将研究投向中医经典方剂,通过深入探索其中的作用机制,找到防治心肌缺血的新靶点和新策略。

早在公元 8 世纪,《敦煌遗书》中就记载用硝石雄黄散“治中恶,急心痛,手足逆冷者,顷刻可杀人,其人唇舌青紫者,着舌以通心气。硝石五钱匕,雄黄一钱匕。上二味,共为极细末,启病者舌,着散一匕于舌下,少时即定;若有涎出,令病者随涎咽下,必愈”^[4]。其疗效显著,具有很高的临床运用价值和开发前景,是中医药中不可多得的用于临床心血管急症的方药。但遗憾的是,目前在临床上很少使用硝石雄黄散治疗 CAD。究其原因,一方面可能是对硝石雄黄散防治 CAD 的作用机制不明确;另一方面,可能是担心雄黄 (主要成分四硫化四砷, As_4S_4) 的毒性^[5]。从方药的组成及给药途径来看,硝石雄黄散作用途径很可能与临床常用的硝酸酯类药物

完全不一样。本研究从探索硝石雄黄散对小鼠心肌梗死面积、心肌梗死标志物、血清 NO 水平以及肝肾功能的影响,初步揭示硝石雄黄散保护小鼠缺血心肌的作用机制及其生物安全性,为进一步研发提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康 SPF 级雄性未交配的 C57BL/6J 小鼠,8 周龄,体重 (20 ± 5) g,由广西中医药大学动物中心统一购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司 [SCXK (湘) 2019-0004],检疫合格后于广西中医药大学实验动物中心饲养、造模并取材 [SYXK (桂) 2019-0001]。饲养环境温度 (25 ± 2) °C,相对湿度 60%,光照 12 h/12 h 明暗循环,每笼 5 只 C57BL/6J 小鼠,并严格按照 3R 原则给予人道关怀。动物实验过程严格遵守国际实验动物伦理学要求,经过广西中医药大学实验动物伦理委员会批准 (DW20210929-177)。

1.2 主要试剂与仪器

中药硝石 (成都金山化学试剂有限公司,批号: 20200504); 中药雄黄 (湖南淳芝宝药业有限责任公

司)。据参考文献^[6-7]报道,硝石雄黄散中的硝石又名火消,其主要成为硝酸钾(KNO_3),为保证实验的一致性,统一用硝酸钾(货号:GB/T647-2011)代替硝石。每种中药材均为同一批次,由广西中医药大学科学实验中心统一购进。

氧气(广西瑞达化工科技有限公司, Lot: 210028);异氟烷(深圳瑞沃德生命科技有限公司, Lot: 202006);总 NO 检测试剂盒(上海碧云天生物公司, Lot: No. 120820210604);小鼠心肌肌钙蛋白 I (cardiac troponin I, cTnI)、肌酸激酶同工酶(creatine kinase isoenzymes, CK-MB)和乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)ELISA 试剂盒(江苏博深生物科技有限公司, Lot: 20210630044 T、20210630043 T、20210630042 T);2,3,5-三苯基氯化四氮(北京索莱宝科技有限公司, Lot: NO. 520C031);4%多聚甲醛通用型组织固定液(biosharp, 批号: 71040900);谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、肌酐等测试盒(南京建成生物工程研究所; Lot: 20210715、20210714);尿素氮测试盒(苏州科铭生物技术有限公司, Lot: 20210716)。

Tecan Infinite 200Pro 酶标仪(中国上海迪奥生物科技有限公司);HM-325E 病理组织切片机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);BX54 MRF-S 光学显微镜(日本 OLYMPUS 公司);557040 型号小动物呼吸机、Table Top 小动物麻醉机、Germinator500 干式消毒器、小鼠心梗手术器械等(美国 HarvardBioscience 公司);全能型成像分析系统、1658033 型电泳仪、电转仪和电源(美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组及中药含服

将 C57BL/6J 小鼠随机分为空白组(Blank, $n=30$)、假手术组(sham, $n=30$)、模型组(AMI, $n=30$)、雄黄组(XH, $n=30$)、硝石组(XS, $n=30$)和硝石雄黄组(XSXH, $n=30$);按《敦煌遗嘱》记载:“硝石五钱匕,雄黄一钱匕……着散一匕于舌下”^[8]换算成现代单位^[9],成人 1 d 服用的剂量为硝石 10 g 和雄黄 2 g 混合研磨成细粉,取 2 g 于舌下含服(含 1.67 g 硝石和 0.33 g 雄黄)。通过等效剂量公式:人体剂量(mg)/人体体重(kg) $\times 9.1 \times$ 小鼠体重(kg),计算小鼠每天服用硝石雄黄剂量为 6.5 mg(含 5.42 mg

硝石和 1.08 mg 的雄黄)^[10]。在制备模型前 1 周及造模成功之后,每只小鼠以 20 mg/kg 剂量腹腔注射 N-硝基-L-精氨酸甲酯阻滞剂(N-nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride, L-NAME)30 min 后,采用异氟烷麻醉各组小鼠后,按分组将药粉散在小鼠舌下,每日 1 次。在模型建立后,详细记录各组小鼠的存活情况。

1.3.2 心肌缺血模型制备

准备好实验小鼠,放置进麻醉盒内,连接好 Table Top 小动物麻醉机,利用异氟烷麻醉成功后,行气管插管并连接呼吸机(参数:Vt:200 μL ;PIP:30 cmH_2O ;PEEP:2 cmH_2O),于颈胸部脱毛备皮,常规消毒后,将第 3、4 肋间的皮肤与肌肉在胸骨左侧 2 mm 处切开 1 cm 左右,打开胸腔并充分暴露心脏,将心脏表面的心包膜撕开,用 8.0 线按浅近宽出的手法将冠状动脉左前降至结扎(约在左心耳下 1~2 mm 处),见心尖部变白后挤出胸腔的空气,关胸缝合。之后将小鼠放在 37℃ 的恒温板上进行复苏和心电图检查,结果见心电图 ST 段抬高,即为心肌缺血模型建立成功的标志^[11]。

1.3.3 组织取材及检测

在造模后的第 12、24、36 h 和第 14 天取样。将小鼠放入小动物麻醉机中麻醉后取血,在 4℃ 条件下静置 2 h 后以转速 4000 r/min 离心 10 min,取上清备用。取小鼠心脏,在生理盐水中将心包膜等物质洗净,将心室腔内的血挤压干净。造模后第 14 天取下的心脏,清理干净后将部分心脏放入 -20℃ 的冰箱内冷冻 2 h 后进行 TTC 染色,其余部分放入含有 2 mL 4%多聚甲醛通用型组织固定液的 EP 管中,后续用作 HE 染色。剩余的脏器在清理干净后, -80℃ 保存备用。

(1) 血清心肌梗死标志物

采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测造模 12、24 和 36 h 后,小鼠血清中心肌梗死标志物 cTnI、CK-MB 和 LDH 等指标。

(2) NO 水平检测

使用 Griess 法检测造模 14 d 后血清中 NO 水平,实验操作严格按说明书执行。

(3) TTC 染色和 HE 染色检测心肌梗死面积大小

用 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液溶解 TTC 染色剂粉末,配置成 2% TTC 溶液,避光保存。从 -20℃ 的冰箱中取出造模第 14 天取下的心脏,垂直于长轴方向

将心脏切成 2~3 mm 厚的切片。将切片放入含有 2% TTC 溶液的 EP 管中,按说明书操作。染色后放入固定液中过夜,次日拍照。造模第 14 天取下的心脏从固定液中取出脱水后,进行常规的石蜡包埋,切片,HE 染色,脱水封片,显微镜下观察分析。

(4) 肝肾功能检测

使用微板法和微量法检测服用硝石雄黄散后第 12 h 和第 14 天小鼠血清中各项肝肾功能指标(ALT、AST、AKP、肌酐和尿素氮),严格按试剂盒说明书试剂盒操作。

1.4 统计学方法

所有计量资料数据采用 IBM Corporation SPSS 25.0 统计软件进行分析,用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。数据采用独立样本 t 检验和方差分析组间的差异性。以 $P<0.05$ 来表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 建立小鼠心肌梗死模型

各组小鼠在建立心肌梗死模型之前的生命体征正常,心电图结果显示为正常心电图,如图 1A 所示;建立心肌梗死模型后,心电图结果显示:ST 段明显抬高,如图 1B 所示,即表明小鼠心肌缺血模型造模成功。

2.2 硝石雄黄散对 NO_3^- - NO_2^- -NO 通道的调控

2.2.1 L-精氨酸-NO 途径的阻断

腹腔注射 L-NAME 后,小鼠的心肌组织中内皮一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)蛋白表达明显受抑制,如图 2 所示;即体内依赖 eNOS 蛋白生成 NO 的经典途径 L-精氨酸-NO 途径受到抑制,体内 NO 由补充途径 NO_3^- - NO_2^- -NO 途径生成。

2.2.2 硝石雄黄散对 NO 生物活性的影响

与空白组相比,假手术组 NO 水平无显著变化

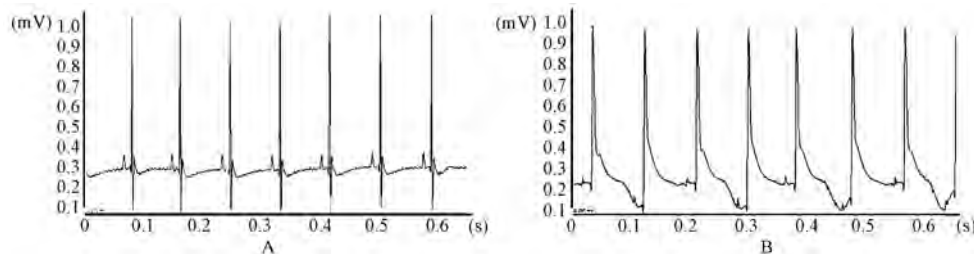
($P>0.05$),两组血清中 NO 水平较高;发生心肌梗死后,NO 水平显著降低($P<0.05$);与模型组相比,雄黄组和硝石组能显著提高心肌梗死小鼠的 NO 水平($P<0.01$);而硝石雄黄组血清 NO 含量最高,为 $19.56 \mu\text{mol/L}$ ($P<0.001$),见图 3。

2.3 硝石雄黄散对小鼠血清心肌梗死标志物的影响

与空白组相比,假手术组中血清梗死标志物 CK-MB、LDH 和 cTnI 水平无显著变化($P>0.05$)。在模型组形成后,血清心肌标记物 CK-MB、LDH 和 cTnI 水平与空白组和假手术组相比显著升高($P<0.05$),硝石雄黄组小鼠血清中 cTnI、CK-MB 和 LDH 水平较雄黄组和硝石组明显降低($P<0.05$),见表 1。

2.4 硝石雄黄散保护小鼠心肌梗死的病理学实验

TTC 染色结果显示:假手术组与空白组相比,心肌染色后呈现鲜红色,无明显差异;发生心肌梗死后,白色梗死区域面积明显增加($P<0.05$);与模型组相比,经雄黄治疗后白色梗死区域大小无明显变化($P>0.05$);经硝石和硝石雄黄散治疗后梗死区域明显减少($P<0.05$),硝石雄黄组与其他组相比,其白色心肌梗死部分显著减小($P<0.01$)。HE 染色结果显示:空白组和假手术组心肌组织正常,心肌细胞结构和轮廓完整分明、紧密有序地排列,胞核清晰可见,与胞质分界清晰;模型组心肌细胞破裂坏死,排列分散紊乱,心肌细胞空泡变性明显,间隙变大内有炎性细胞浸;与模型组相比,硝石组与雄黄组可见部分心肌细胞结构较完整,排列整齐有序,心肌细胞空泡性改变减少,细胞间隙变小,仍有少量地炎性细胞浸润;硝石雄黄组可见心肌细胞着色较浅,细胞结构与轮廓较完整清晰,排列较为整齐紧密,但仍有个别细胞核与胞质分界不清晰。见图 4 和图 5。

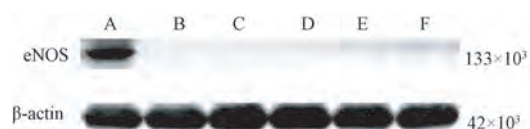


注:A:建立心梗模型之前的心电图;B:建立心梗模型之后的心电图。

图 1 小鼠心肌缺血模型建立前后心电图结果

Note. A, Ecg before myocardial infarction model was established. B, Ecg after myocardial infarction model was established.

Figure 1 Ecg results before and after establishment of myocardial ischemia model in mice

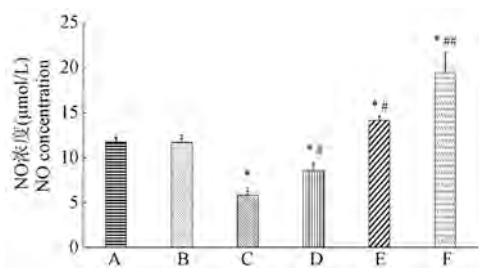


注: A:空白组; B:假手术组; C:模型组; D:雄黄组; E:硝石组; F:硝石雄黄组。

图2 eNOS 蛋白 Western blot 检测结果

Note. A, Blank group. B, Sham group. C, AMI group. D, XH group. E, XS group. F, XSXH group.

Figure 2 eNOS protein Western blot test results



注: A:空白组; B:假手术组; C:模型组; D:雄黄组; E:硝石组; F:硝石雄黄组。与空白组相比, * $P<0.05$; 与模型组相比, # $P<0.01$, ## $P<0.001$ 。

图3 各组小鼠血清 NO 水平

Note. A, Blank group. B, Sham group. C, AMI group. D, XH group. E, XS group. F, XSXH group. Compared with Blank group, * $P<0.05$. Compared with AMI group, # $P<0.01$, ## $P<0.001$.

Figure 3 Serum NO level of mice in each group

表1 硝石雄黄散对小鼠血清心肌梗死标志物的影响($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 1 Effect of Xiaoshixionghuang San on serum myocardial infarction markers in mice

组别 Group	空白组 Blank group	假手术组 Sham group	模型组 AMI group	雄黄组 XH group	硝石组 XS group	硝石雄黄组 XSXH group
cTnI (pg/mL)	5.12±0.40	5.16±0.84	52.11±0.90*	38.62±3.19*#	30.31±1.88*#	20.92±2.07*##
CK-MB (pg/mL)	74.76±1.54	73.88±1.29	431.03±16.16*	303.33±13.65*#	218.77±8.61*#	122.56±4.99*##
LDH (ng/mL)	3.19±0.08	3.13±0.10	13.53±0.63*	10.93±0.26*#	8.48±0.23*#	5.76±0.18*##

注:与空白组相比, * $P<0.05$;与模型组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.001$ 。

Note. Compared with Blank group, * $P<0.05$. Compared with AMI group, # $P<0.05$, ## $P<0.001$.

表2 硝石雄黄散对小鼠肝肾功能的影响($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 2 Effect of Xiaoshixionghuang San on liver and kidney function in mice

	急性毒性 Acute toxicity			亚急性毒性 Subacute toxicity		
	空白组 Blank group	雄黄组 XH group	硝石雄黄组 XSXH group	空白组 Blank group	雄黄组 XH group	硝石雄黄组 XSXH group
AST 活力(卡门氏单位) AST vigour (Carmen's unit)	73.68±6.54	141.14±6.72*	76.90±0.38	74.96±5.58	137.56±5.58**	78.45±3.06
ALT 活力(卡门氏单位) ALT vigour (Carmen's unit)	16.49±0.58	91.46±0.20*	17.07±0.17	24.43±0.52	95.50±0.38**	24.85±0.29
AKP 活力(金氏单位/100 mL) AKP vitality (King unit / 100 mL)	7.76±0.65	15.77±0.81*	8.02±0.10	7.83±0.87	21.20±0.45**	8.08±0.62
肌酐含量(μmol/L) Creatinine content (μmol/L)	19.95±4.18	48.45±7.62*	26.71±7.63	18.95±3.83	54.53±12.48**	20.96±1.52
尿素氮含量(mg/mL) Urea nitrogen content (mg/mL)	0.20±0.01	0.46±0.03*	0.21±0.01	0.21±0.02	0.56±0.02**	0.21±0.01

注:急性毒性,与空白组相比, * $P<0.01$;亚急性毒性,与空白组相比, ** $P<0.01$ 。

Note. Acute toxicity, compared with Blank group, * $P<0.01$. Subacute toxicity, compared with Blank group, ** $P<0.01$.

2.5 硝石雄黄散对小鼠肝肾功能的影响

心肌梗死模型小鼠经雄黄和硝石雄黄散干预后 12 h 和第 14 天,硝石雄黄组小鼠血清中 ALT、AST、AKP、肌酐和尿素氮等含量与空白组相比,无明显差异($P>0.05$),雄黄组各项肝肾功能指标均显著升高($P<0.01$),见表 2。

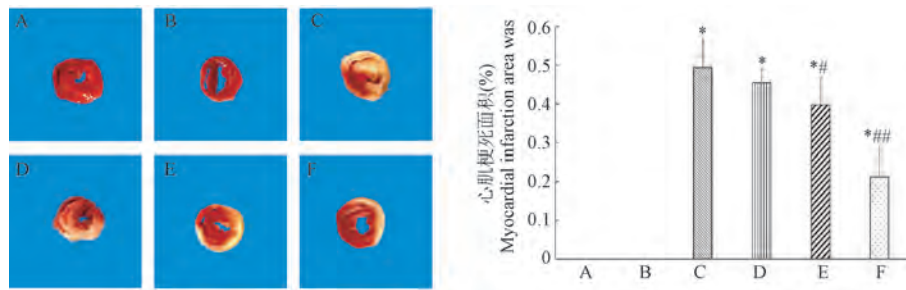
2.6 硝石雄黄散对小鼠存活情况的影响

通过比较整个实验过程各组小鼠的存活情况发现,与模型组相比,硝石雄黄组的小鼠存活情况明显改善(图 6)。

3 讨论

近些年来,对 CAD 的防治无论在技术上还是在策略上,均取得了重大进展,但其发病率和死亡率仍居高不下,许多问题亟待解决。寻找解决 CAD 的新策略、新技术和新药物,仍是临床的迫切需求,对传统方药的研发是近年来的热点。

CAD 属于中医“胸痹”范畴^[12]。早在公元 8 世纪的《敦煌遗书》就记载了治疗 CAD 心绞痛的硝石雄黄散,疗效显著,由于其作用机制和临床安全性不明,使得它在临床中被长期忽视。硝石雄黄散由硝石和雄黄组成,硝石即硝酸盐(NO_3^-)^[6]。目前大

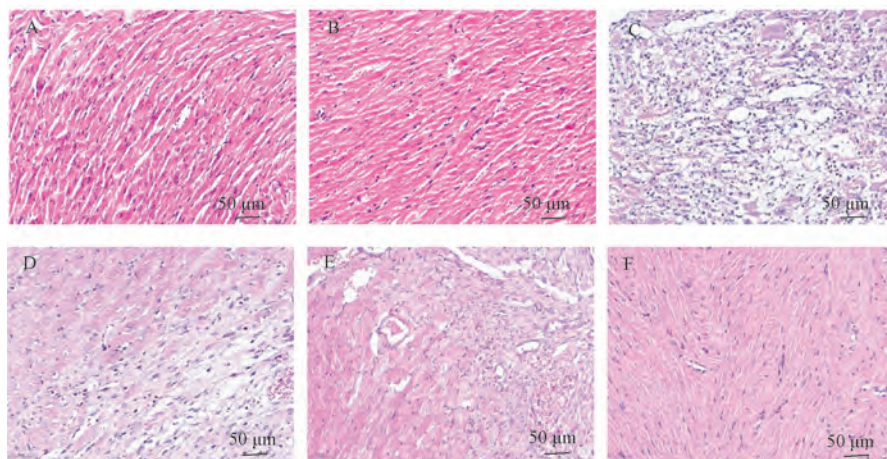


注: A: 空白组; B: 假手术组; C: 模型组; D: 雄黄组; E: 硝石组; F: 硝石雄黄组。与空白组相比, * $P < 0.05$; 与模型组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图 4 各组小鼠梗死面积 TTC 染色结果

Note. A, Blank group. B, Sham group. C, AMI group. D, XH group. E, XS group. F, XSXH group. Compared with Blank group, * $P < 0.05$. Compared with AMI group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

Figure 4 TTC staining results of infarct area of mice in each group

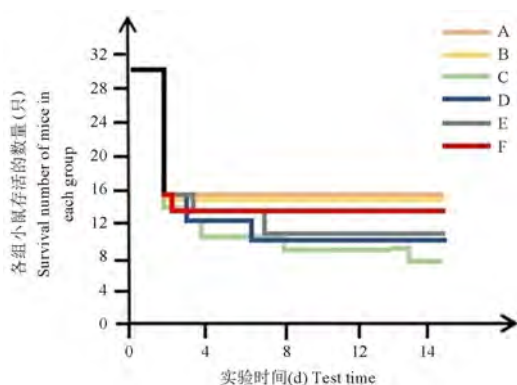


注: A: 空白组; B: 假手术组; C: 模型组; D: 雄黄组; E: 硝石组; F: 硝石雄黄组。

图 5 小鼠心肌组织 HE 染色结果

Note. A, Blank group. B, Sham group. C, AMI group. D, XH group. E, XS group. F, XSXH group.

Figure 5 HE staining results of mouse myocardial tissue



注: A: 空白组; B: 假手术组; C: 模型组; D: 雄黄组; E: 硝石组; F: 硝石雄黄组。

图 6 各组小鼠存活情况

Note. A, Blank group. B, Sham group. C, AMI group. D, XH group. E, XS group. F, XSXH group.

Figure 6 Survival of the mice in each group

部分实验结果表明:硝酸盐在介导肿瘤、炎症、缺氧及酸中毒的病理生理过程中发挥了重要的作用,尤其对心血管系统的有益作用已经通过人体临床实验得到证实;当口服一定量的 NO_3^- 时,可舒张患者的血管,使血压降低,肌肉血流增强,循环耗氧量降低等^[13-15]。动物实验表明: NO_3^- 可以提高大鼠抗氧化能力来预防心脏、肾等某些器官的缺血再灌注损伤^[16-18]。这些实验均证实了 NO_3^- 是心血管健康中的重要分子。人体内 NO_3^- 的水平与 NO 水平密切相关。 NO 分子在体内极其不稳定被氧化成稳定的 NO_3^- 和亚硝酸盐 (NO_2^-) 分子储存在血液与组织中, NO 水平与 $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ 水平在体内维持动态平衡^[19]。早有大量的研究表明 NO 是一种通过调节血管内环境的平衡来抵御心血管疾病的气体信号分子^[20-21]。它主要通过诱导局部血管舒张、抑制白

细胞与内皮细胞黏附、平滑肌细胞迁移和增殖以及血小板聚集来促进局部血管循环系统的多种有益作用,维持血管功能^[22-23]。当发生心肌缺血缺氧时,L-Arginine-NOS-NO 途径受到抑制,体内 NO 水平降低^[24]。人体产生 NO 有两条途径。当抑制 L-Arginine-NOS-NO 通路时,另一条补充途径被激活,即还原型辅酶 I/还原型辅酶 II 被硝酸还原酶作为电子供体催化 NO_3^- 和 NO_2^- 的单电子发生还原反应生成 NO 来保护缺血心肌,即 $\text{NO}_3^- - \text{NO}_2^- - \text{NO}$ 通路^[25-26]。

《中国药典》中记载了:“雄黄的功用:解毒杀虫、燥湿祛痰、截疟……”。文献研究表明雄黄含有的重金属砷,其可对脏器尤其是肝与肾造成不同程度的毒性损伤^[24];一项雄黄对昆明小鼠的急性毒性研究结果显示:雄黄可造成小鼠部分肝细胞及肾小管个别上皮细胞轻度水肿^[27]。李奕诺等^[28]在纳米雄黄对小鼠的急性毒性研究中发现:其对小鼠的半数致死量为 309.72 mg/kg;因干预致死的小鼠可见双肺、肝弥漫性充血,脾肿大发黑,小肠壁弥漫性充血,小肠胀气,部分肠道肿胀并发黑坏死。张秀娟等^[5]发现采用雄黄干预小鼠 3 周后,药物干预组小鼠血清中的 ALT、AST、ALP 和 γ -谷氨酰转肽酶的水平较空白组均明显升高;实验结果提示雄黄对小鼠肝结构和功能造成损伤以及肾小管轻度浊肿。Huo 等^[29]在采用代谢组学的方法研究雄黄对小鼠肝的亚慢性毒性发现:雄黄的亚慢性毒性机制与亚急性毒性机制相同,均为扰乱能量代谢、胆碱代谢和氨基酸代谢。上述实验研究证实雄黄以及含雄黄制剂的长期大剂量摄入可导致砷蓄积性的肝肾损伤,因此硝石雄黄散的毒副作用备受关注。

本研究在阻断 L-Arginine-NOS-NO 通路后,分别采用硝石、雄黄以及硝石雄黄散整方给药干预。结果发现,与空白组和假手术组相比,当小鼠发生心肌梗死后,血清中 NO 水平明显降低($P < 0.05$),血清心肌标记物 CK-MB、LDH 和 cTnI 水平显著升高($P < 0.05$),心肌梗死面积明显增加($P < 0.05$),心肌细胞破裂坏死,排列分散紊乱,心肌细胞空泡变性明显,间隙变大内有炎性细胞浸;经药物干预后,模型小鼠血清中 NO 水平明显提高($P < 0.01$);其中,经硝石雄黄散整方干预后,模型小鼠血清中 NO 含量最高,为 19.56 $\mu\text{mol/L}$,明显高于其他各组($P < 0.01$);硝石雄黄组小鼠血清中 cTnI、CK-MB 和 LD 水平较雄黄组和硝石组明显降低($P < 0.05$);各组

TTC 染色心肌梗死区均缩小,硝石雄黄组与其他组相比,其白色心肌梗死部分显著减小($P < 0.01$);HE 染色显示各组均有保护小鼠缺血心肌细胞的作用,但以硝石雄黄组最为明显,在显微镜下可见有个别细胞核与胞质分界不清晰,大部分心肌细胞结构与轮廓完整清晰,排列较为整齐紧密,无细胞空泡性改变。实验提示硝石雄黄散具有良好的保护缺血心肌的作用,而雄黄能促进 NO_3^- 经 $\text{NO}_3^- - \text{NO}_2^- - \text{NO}$ 通路还原成 NO,增强整方药效。

为了确定硝石雄黄散是否对肝肾功能存在急性毒性和亚急性毒性的损害,本研究分别检测了小鼠在服用硝石雄黄散后 12 h 和第 14 天血清中肝肾功能的指标。实验结果显示:与空白组相比,服用雄黄和硝石雄黄散后 12 h 和第 14 天,雄黄组血清中肝肾功能指标具有显著的差异($P < 0.01$);硝石雄黄组血清中肝肾功能相关指标差异不具有统计学意义($P > 0.05$),证实了硝石雄黄散对小鼠肝肾功能无急性和亚急性毒性影响($P > 0.05$),整方使用具有安全性。

综上所述,当经典途径 L-Arginine-NOS 途径受到抑制时,舌下含服硝石雄黄散可显著提高体内 NO 水平,降低 cTnI、CK-MB 和 LDH 等心肌梗死标志物的水平,缩小梗死面积,保护缺血缺氧心肌细胞和组织,明显改善小鼠的存活情况。硝石雄黄散通过 $\text{NO}_3^- - \text{NO}_2^- - \text{NO}$ 途径产生大量的 NO 改善心肌缺血,改善心肌组织缺血损伤,这可能是硝石雄黄散治疗 CAD 心绞痛的作用机制之一。同时,实验数据证实了硝石雄黄散对小鼠的肝肾功能没有明显的损伤。这表明了硝石雄黄散是一种治疗 CAD 的安全有效药物,为在临床安全推广使用提供实验依据。但雄黄是如何提供硝石保护缺血心肌的作用机制以及雄黄为什么在本方中的毒副作用明显消失的机制需要进一步的深入探索,提示课题组将硝酸盐作为提升 NO 水平的体外供体药物需要继续进行深入研发。

参考文献:

- [1] 江宜乐,荣媛媛,邢明青,等. 冠状动脉粥样硬化性心脏病患者血浆 Elabela 水平变化及其与冠状动脉狭窄程度的关系[J]. 中国临床医生杂志, 2020, 48(5): 557-560.
- [2] 白延平,陈俊民,刘智娜. 伊伐布雷定通过调控 TIMP-1 表达对冠心病大鼠抗心肌纤维化和心肌保护作用的机制[J]. 西部医学, 2021, 33(8): 1126-1132.
- [3] 崔海玲,林虹. 冠心病心肌缺血后心电图波形变化规律与炎性因子表达关系[J]. 陕西医学杂志, 2022, 51(4): 445-

- 448, 453.
- [4] 刘新, 马鸿斌, 李朝平, 等. 敦煌医方——硝石雄黄散贴敷至阳穴防治冠心病心绞痛 61 例临床研究 [J]. 中医杂志, 2001, 42(3): 153-155.
- [5] 张秀娟, 白雪莹, 陆童, 等. 雄黄对小鼠肝脏功能损伤的初步研究 [J]. 中药药理与临床, 2014, 30(1): 56-58.
- [6] 邵江娟, 吕翔, 路长珍, 等. 硝石化学成分研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2010, 26(4): 306-307.
- [7] 宋亚东, 周曼曼, 谢明, 等. 芒硝、朴硝与硝石的本草考证 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2020, 18(8): 57-60.
- [8] 刘新, 崔庆荣, 李朝平, 等. 硝石雄黄散贴敷至阳穴防治冠心病心绞痛的临床研究 [J]. 甘肃中医学院学报, 2000, 17(2): 43-46.
- [9] 曾小鹏, 武晓丽. 《敦煌中医药全书》中的量词(一) [J]. 名作欣赏, 2013, 23: 106-107.
- [10] 陈汉斌. 醇式黄连碱的合成与抗炎、抗胃溃疡作用研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2018.
- [11] 黄汕梅, 郭玉洪, 赵洋洋, 等. 基于 NO_3^- - NO_2^- -NO 通道探索白酒在瓜蒌薤白白酒汤保护小鼠缺血心肌中的佐使作用 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2021, 23(4): 23-27.
- [12] 郑丽莉. 芎归六君子汤对实验性大鼠冠心病的治疗作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(1): 23-27, 55.
- [13] Coggan AR, Peterson LR. Dietary nitrate enhances the contractile properties of human skeletal muscle [J]. Exerc Sport Sci Rev, 2018, 46(4): 254-261.
- [14] Pawlak-Chaouch M, Boissiere J, Gamelin FX, et al. Effect of dietary nitrate supplementation on metabolic rate during rest and exercise in human; a systematic review and a meta-analysis [J]. Nitric Oxide, 2016, 53: 65-76.
- [15] Weitzberg E, Lundberg JO. Novel aspects of dietary nitrate and human health [J]. Annu Rev Nutr, 2013, 33(1): 129-159.
- [16] Lee JW, Lee DH, Park JK, et al. Sodium nitrite-derived nitric oxide protects rat testes against ischemia/reperfusion injury [J]. Asian J Androl, 2018, 21(1): 92-97.
- [17] Carlstrom M, Persson AE, Larsson E, et al. Dietary nitrate attenuates oxidative stress, prevents cardiac and renal injuries, and reduces blood pressure in salt-induced hypertension [J]. Cardiovasc Res, 2011, 89(3): 574-585.
- [18] Tian R, Peng R, Yang Z, et al. Supplementation of dietary nitrate attenuated oxidative stress and endothelial dysfunction in diabetic vasculature through inhibition of NADPH oxidase [J]. Nitric Oxide, 2020, 96: 54-63.
- [19] Piknova B, Park JW, Kwan Jeff Lam K, et al. Nitrate as a source of nitrite and nitric oxide during exercise hyperemia in rat skeletal muscle [J]. Nitric Oxide, 2016, 1: 55-56.
- [20] Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine [J]. Nature, 1980, 288(5789): 373-376.
- [21] Kevil CG, Kolluru GK, Pattillo CB, et al. Inorganic nitrite therapy: historical perspective and future directions [J]. Free Radic Biol Med, 2011, 51(3): 576-593.
- [22] Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology [J]. Pharmacol Rev, 1991, 43(2): 109-142.
- [23] Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium [J]. Lancet, 1987, 2(8567): 1057-1058.
- [24] Morris SM Jr. Arginine metabolism in vascular biology and disease [J]. Vasc Med, 2005, 10(1): S83-S87.
- [25] Pinheiro LC, Montenegro MF, Amaral JH, et al. Increase in gastric pH reduces hypotensive effect of oral sodium nitrite in rats [J]. Free Radic Biol Med, 2012, 53(4): 701-709.
- [26] Huang Z, Shiva S, Kim-Shapiro DB, et al. Enzymatic function of hemoglobin as a nitrite reductase that produces NO under allosteric control [J]. J Clin Invest, 2005, 115(8): 2099-2107.
- [27] 苗加伟, 刘晓丽, 梁世霞, 等. 牛黄解毒片、雄黄与其他砷化物急性毒性的比较研究 [J]. 毒理学杂志, 2011, 25(3): 217-221.
- [28] 李奕诺, 田野, 赵宇, 等. 纳米雄黄的急性毒性实验 [J]. 解放军药学报, 2015, 31(1): 13-16.
- [29] Huo T, Fang Y, Zhao L, et al. ^1H NMR-based metabolomic study of sub-chronic hepatotoxicity induced by realgar [J]. J Ethnopharmacol, 2016, 192: 1-9.

[收稿日期]2022-04-06