

关附甲素对培养心肌细胞“缺氧缺糖”的保护作用

陈清¹, 魏丕敬², 顾培坤², 金正钧², 周中源¹(1. 上海市第四人民医院, 上海 200081; 2. 上海市第二医科大学药理教研组, 上海 200025)

摘要:目的: 研究关附甲素对培养心肌细胞“缺氧缺糖”的保护作用。方法: 以培养心肌细胞的“缺氧缺糖”模拟全体的缺血性损伤, 以传统的钙离子拮抗剂——维拉帕米为对照药, 观察关附甲素对“缺氧缺糖”心肌细胞乳酸脱氢酶(LDH)生成, 脂质过氧化代谢产物丙二醛(MDA)的生成的影响。结果: 关附甲素 30ug/ml 即能减少 LDH 的释放和 MDA 的生成($P < 0.05$), 且和维拉帕米有一定的相似性。结论: 关附甲素对“缺氧缺糖”心肌细胞具有一定的保护作用, 且具有抗脂质过氧化作用, 心肌细胞的保护作用可能和其抗脂质过氧化或抑制外钙内流有关。

关键词: 关附甲素; 乳酸脱氢酶; 丙二醛; 维拉帕米

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1006-0111(2000)05-0331-03

Effects of Guan-fu base A on neonatal rat myocytes in cultures with oxygen and glucose deprivation

CHEN Qin¹, WEI Peiji², GU Peikun², JIN Zhenjun, ZHONG Yuan¹(¹Shanghai Fourth People's Hospital, Shanghai 200081, China; Department of Pharmacology, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE: To investigate the effects of GFA on neonatal rat myocytes in cultures with oxygen and glucose deprivation(CMOGD). **METHODS:** By taking cultured neonatal rat myocytes with oxygen and glucose deprivation as ischemia-mimic condition of body and the Ca^{2+} -antagonist Verapamil as control, the leakage of lactic dehydrogenase(LDH) and the production of malondialdehyde(MDA) were investigated. **RESULT:** GFA 30ug/ml suppressed the lactic dehydrogenase (LDH) leakage and the production of malondialdehyde (MDA) in CMOGD ($P < 0.05$). The effects on LDH and MDA were concentration-dependant. During the experiment GFA was compared with Verapamil, the traditional Ca^{2+} -antagonist. It was found the GFA had similar function with Verapamil. **CONCLUSION:** GFA has a cytoprotection on CMOGD, Possibly acts as an antiperoxidant and/or inhibitor of Ca^{2+} influx.

KEY WORDS: guan-fu base A, lactic dehydrogenase(LDH), malondialdehyde(MDA), Verapamil.

关附甲素是关白附子中的一种新生物碱, 其抗心律失常作用已为动物实验和离体组织的研究证实^[1,2]。本实验以培养心肌细胞的“缺氧缺糖”模拟体内心肌“缺血”, 以传统的 Ca^{2+} 拮抗剂——维拉帕米为对照药, 以培养心肌细胞的 LDH 和 MDA 为指标, 观察关附甲素对上述两项指标的影响, 从而估价关附甲素(GFA)对心肌细胞缺氧缺糖的保护作用, 为 GFA 试用于临床治疗心肌梗塞提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试剂

酮酸钠、硫代巴比妥酸、磷钨酸辅酶 I、维拉帕米、MEM 培养基(美国 GIBCO 公司生产)、小牛血清(二医大科技中心实验室二室, 上海市消化所出品)、胰蛋白酶(Difco 进口分装, 批号 85-04-01)。

1.2 仪器

59Wc 型分光光度计, 930 型荧光光度计: 上海分析仪器三厂生产。

2 心肌细胞的培养^[3]

取 2-3 日龄的 Wistar 大鼠, 75% 乙醇消毒, 取心室肌, 剪成 1.5mm³ 左右的小块, 经 0.1% 胰蛋白酶液分次消化后, 收集消化液, 离心后加入 20% 小牛血清的 MEM Eagle's 培养基制成细胞悬液, 采用贴壁分离技术(differential attachment technique)以纯化心肌细胞, 2 小时后取上清液, 将此上清液稀释至 1×10^6 cells/ml, 接种于 40ml 培养瓶内, 每瓶 3ml, 37℃, 5% CO₂ 温箱放置, 3 天后用于生化测定。

3 培养心肌细胞“缺氧缺糖”损伤模型的建立及实验分组

3.1 损伤模型的建立

将已生长了3天的培养心肌细胞的培养液倒掉,以预先充过纯氮(99.99%)30分钟的无糖Hanks液($P_{CO_2} < 12\text{mmHg}$)冲洗两次,准确量取无糖无氧Hanks液2ml加入培养液中,同时向瓶内充氮10秒以置换瓶内空气,5% CO_2 , 37°C温箱放置,3小时后备用。

3.2 实验分组

缺氧缺糖组;缺氧缺糖+药物组;正常对照组:将已生长了3天的培养心肌细胞的培养液倒掉,以有糖Hanks液冲洗两次,准确量取有糖Hanks液2ml加入培养瓶内,37°C温箱培养。以上各组均培养3小时,测定LDH和MDA^[4,5]。

4 数据处理

组间比较采用Student's *t* 检验。

5 结果

5.1 关附甲素对培养心肌细胞LDH释放的影响

培养心肌细胞缺氧缺糖或正常Hanks液培养3小时后,分别测定正常对照组,缺氧缺糖对照组,以及缺氧缺糖加药组培养液中心肌细胞释放的LDH的量,结果见表1。

表1 关附甲素对培养心肌细胞LDH释放的影响 ($n=6, x \pm SD$)

分组	剂量(ug/ml)	LDH(u/ml)
A	—	69.27±18.66***
B	—	415.08±89.33
C	30	247.50±39.67**
	100	127.50±40.70***
	300	109.59±14.34***
D	30	285.03±75.96*
	100	200.36±58.54***
	300	142.76±16.70***

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs B group

A: 正常对照组, B: 缺氧缺糖对照组, C: 缺氧缺糖+ verapamil 组, D: 缺氧缺糖+ GFA 组

从表1可以看出,缺氧缺糖对照组心肌细胞的LDH量远远高于正常对照组,两者有极显著的差异($P < 0.001$)。不同剂量组和缺氧缺糖对照组相比,关附甲素在30~300ug/ml浓度范围内,能显著降低降低心肌细胞LDH的释放,且具有一定的量效关系,但不同剂量的Verapamil和GFA均不能使缺氧缺糖细胞LDH的释放恢复至正常值($P < 0.05$)。

5.2 关附甲素对培养心肌细胞MDA生成量的影响

培养心肌细胞缺氧缺糖或正常Hanks液培养3小时,分别测定正常对照组,缺氧缺糖对照组,以及缺氧缺糖加药组培养液中心肌细胞产生的MDA的量,结果见表2。

表2 关附甲素对培养心肌细胞MDA生成的影响 ($n=6, x \pm SD$)

分组	剂量(ug/ml)	MDA(nM/10 cells)
A	—	0.378±0.035
B	—	0.730±0.160
C	30	0.537±0.055
	100	0.517±0.067
	300	0.382±0.111
D	30	0.505±0.111
	100	0.400±0.089
	300	0.382±0.055

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs B group

A: 正常对照组, B: 缺氧缺糖对照组, C: 缺氧缺糖+ verapamil 组, D: 缺氧缺糖+ GFA 组

从表2可见,缺氧缺糖对照组的MDA值高于正常对照组($P < 0.001$), Verapamil不同剂量能明显降低缺氧缺糖培养心肌细胞的MDA生成量(分别为 $P < 0.05$, $P < 0.05$, $P < 0.01$)当剂量达到300ug/ml时,MDA的生成量接近正常对照组($P > 0.05$),而GFA不同剂量能显著降低缺氧缺糖培养心肌细胞的MDA的生成量($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$),且GFA为100ug/ml时即能使MDA生成量接近正常对照组($P > 0.05$)。

6 讨论

采用体外培养的心肌细胞研究心肌缺血性损伤较以往的整体动物, 离体器官研究心肌缺血性损伤具有一定的优点: (1) 在整体动物中评价由缺血引起的早期心肌损伤是极其困难的, 而培养心肌细胞排除了邻近细胞的相互作用, 生理反馈机制和高度的生物学变异, 使结果易于分析。(2) 培养心肌细胞还易于观察和生化测定, 能保持均一的理化环境, 能提供较多的样本进行统计学处理。(3) 原代培养的心肌细胞还可排除细胞在传代过程中的功能变异。

培养心肌细胞在缺氧缺糖条件下出现了一系列的变化, 包括形态学, 活动功能, 细胞代谢改变, 胞浆酶自胞内漏出至培养液中常作为细胞损伤的标志^[6], 其中乳酸脱氢酶(LDH)是较为明显和简便的指标, 本实验使培养心肌细胞缺氧缺糖3小时, 结果发现缺氧缺糖组LDH量远远高于正常对照组($P < 0.001$)。

心肌细胞缺血受损时, 能量代谢发生障碍, ATP减少, PH下降, Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 等离子重新分布, 产生钙超负荷, 其结果(1)过度激活 Ca^{2+} 敏感性ATP酶使ATP更趋减少(2)磷脂酶和蛋白酶的过度激活, 使组织受损。(3)线粒体因 Ca^{2+} 聚积使氧化磷酸化能力受损, 此与Murphy等在培养心肌细胞证实LDH的释放和胞内游离钙的积聚相一致。氧自由基导致生物膜脂质过氧化, 膜的液态性, 流动性以及通透性均发生改变, 进而造成膜功能障碍, 肌浆网, 线粒体膜上存在有 Ca^{2+} 泵及 Ca^{2+} 敏感的ATP酶, 如果这些细胞器膜结构发生改变, 则影响胞内

Ca²⁺ 的平衡^[7,8]。我们的实验通过以 Verapamil 作对照, 制备培养心肌细胞的缺血模型, 发现 GFA 和 Verapamil 一样可减少缺血缺糖心肌细胞 LDH 的释放, 同时减少 MDA 的产生。因此, GFA 对缺血缺糖的培养心肌细胞具有一定的保护作用, 且具有抗心肌脂质过氧化作用, 其保护作用可能和阻止外钙内流, 抗脂质过氧化有关。确切的机理还有待进一步研究。

参考文献:

[1] 陈维洲, 董月, 张月芳. 关附甲素的抗心律失常用[J]. 中国药理学报, 1983b, 4(4): 247.
 [2] 陈红专, 顾培, 章鲁. 关附甲素对豚鼠乳头肌快反应动作电位的作用[J]. 中国药理学报, 1989, 10(5): 399.
 [3] Harary I, Barbara Farley. In Vitro Studies on Single Beating Rat Heart[J]. Cells Exp Cell Res. 1963, 29: 451.

[4] 朱忠勇. 临床医学检验[M]. 上海科学技术出版社, 1978. 340.
 [5] 翁玉青, 王秀平, 卢泳才. 细胞和细胞膜内过氧化脂质的微量定量[J]. 细胞生物杂志, 1985, 7(3): 142.
 [6] Deluca M, Toarne S ingnall and John A B. Biochemical responses of myocardial cells in culture to oxygen and glucose deprivation [J]. Biochem Biophys Res Commun. 1974, 59: 749.
 [7] Masato Taniand, Tames R Neoly. Role of intracellular Na⁺ in Ca²⁺ overload and depressed recovery of ventricular function of reperfused ischemic rat heart: Possible involvement of H⁺ - Na⁺ and Na⁺ - Ca²⁺ exchange [J]. Circ Res, 1989, 65: 1045.
 [8] Rizzuto, R G Pitton, G F Azzone. Effect of Ca²⁺, Peroxides, SH reagents, Phosphate and aging on the permeability of mitochondrial membranes [J]. Eur J Biochem 1987, 162: 239.

收稿日期: 2000- 08- 28

中药恒春奇圣胶囊动物实验及临床应用观察总结

朱春杰, 冷静, 薛慈民, 王益鑫, 刘同根(上海恒春奇圣胶囊协作组, 上海 200001)

摘要:本文在介绍恒春奇圣胶囊临床前研究成果的基础上, 着重介绍了由上海二医大附属仁济医院、上海中医药大学附属曙光医院组成的协作组, 最近对该药在治疗男子性功能障碍方面的临床验证结果。本项研究首次采用了中西药多中心研究模式。西药枸橼酸西地那非(万艾可)中药汇仁肾宝合剂为对照组。临床总病例数 160 例, 治疗组 90 例; 对照组各 35 例。观察结果显示: 恒春奇圣胶囊有确切的疗效, 总有效率 76.25%, 起效时间快, 却无西药的禁忌症。具有明显的标本兼治功能, 同国内同类药物及进口相关药物相对照, 恒春奇圣胶囊具有更显著的疗效。

恒春奇圣胶囊是金马集团安徽芜湖张恒春药业有限公司, 根据传统验方, 采用现代工艺, 结合临床药理学研究方法, 开发生产的中成药。经安徽中医学院天然药物研究所药理、毒理及药效学试验证实, 安徽中医学院附院、省立人民医院及安医大附院临床验证表明, 该药具有滋肾填精、补心养血、益气健脾的功效。恒春奇圣胶囊临床协作组(上海第二医科大学附属仁济医院, 上海中医药大学附属曙光医院), 最新研究报告显示, 该药治疗男子性功能障碍具有独特的优势和效果, 现将研究成果归纳总结报告。

中图分类号: R285.6 文献标识码: A 文章编号: 1006- 0111(2000)05- 0333- 03

1 临床前研究总结

1.1 恒春奇圣胶囊有延缓衰老的作用, 其 0.5% 和 1% 浓度使果蝇的平均寿命延长。2.5% 和 5% 浓度能延长家蚕生长(上簇)的时间, 而且随剂量的增加而作用增强。

1.2 恒春奇圣胶囊能改善自由基代谢, 以增加抗氧化功能, 能提高大鼠红细胞超氧化物歧化酶(SOD)的活力, 以及降低血浆中过氧化脂质的含量, 每日 ig 给予 1.5g/Kg 的作用优于 0.6g/Kg 抗氧化能力的增强有助于延缓衰老的进程。

1.3 恒春奇圣胶囊有提高性功能的作用, 每日灌服 0.8g/Kg 和 9g/Kg, 可明显增加去势雄性小鼠的爬背率和爬背次数; 高剂量组还能减轻去势雄性小鼠的会阴复合体和前列腺器官的萎缩。1.5g/Kg 灌服, 可改善悬吊应激致雄性小鼠的性功能降低; 能升高大鼠血中睾酮的含量, 而对雌二醇无明显影响, 由此可使睾酮/雌二醇比例

升高, 表明有一定的壮阳作用。

1.4 恒春奇圣胶囊能提高大鼠的免疫力, 每日 ig 给予 0.6g/Kg 和 1.5g/Kg, 对 IgG 以及红细胞 C3b 受体花环率和淋巴细胞转化率有明显改善的促进作用。

1.5 恒春奇圣胶囊有一定的益智能力, 对乙醇引起的小鼠记忆障碍有明显的改善作用。

1.6 恒春奇圣胶囊有抗应激作用, 每日 ig 给予小鼠 0.6g/Kg 和 1.5g/Kg 能明显延长小鼠的常压耐缺氧存活时间, 以及延长小鼠的游泳持续时间, 以高剂量组作用更好。此外, 还有一定的补血作用, 能明显升高失血性小鼠的 RBC 和 HB。

1.7 长期毒性试验表明, 恒春奇圣胶囊按每天 3.1g、1.5g、0.6g/Kg 剂量(分别相当于临床人用剂量的 40 倍、20 倍、8 倍) 喂饲 16 周, 对大鼠的生长、发育、心电图、肝肾功能、血脂和血糖等无明显影响; 尸检及镜检各脏器未