

川芎嗪对复氧后损伤心肌细胞的影响*

陈江斌 唐其柱 孙小梅¹ 李建军 许家俐 黄从新(武汉 430060 湖北医科大学附属第一医院心血管病研究室¹ 传染病研究室)

摘要 目的: 观察川芎嗪对大鼠心室肌细胞缺氧—复氧损伤的作用。方法: 在缺氧—复氧条件下, 测量对照组和不同浓度川芎嗪组对杆形心肌细胞百分比、心肌细胞释放乳酸脱氢酶(LDH)和心肌细胞类脂过氧化产物—丙二醛(MDA)含量。结果: 缺氧—复氧对大鼠心室肌细胞有损伤作用, 浓度为 $4\mu\text{mol/L}$ 的川芎嗪开始对缺氧—复氧损伤细胞有保护作用, 它能抑制损伤细胞挛缩, 提高损伤细胞生存率, 抑制细胞 LDH 的释放, 减少 MDA 的生成, 且剂量越大, 保护作用越好, 即川芎嗪对缺氧—复氧损伤细胞的保护呈剂量依赖性。结论: 川芎嗪对缺氧—复氧损伤的心肌细胞具有保护作用, 它能显著地对抗缺氧—复氧对心肌细胞的损伤。

关键词 川芎嗪; 缺氧—复氧损伤; 心肌细胞

Effects of trtramethylpyrazine to reoxygenation damage of rat ventricular myocytes

Chen Jiangbin(Chen JB), Tang Qizhu(Tang QZ), Sun Xiaomei(Sun XM), *et al*(Department of Cardiology, First Affiliated Hospital, Hubei Medical University, Wuhan 430060, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To observe the effect of trtramethylpyrazine to rat ventricular myocytes with the anoxia-reoxygenation damage. **METHOD:** we investigated the myocytes viability, myocytes releasing Lactate dehydrogenase (LDH) and forming lipids peroxidation products malondialdehyde(MDA) with different trtramethylpyrazine concentration groups and control group in anoxia-reoxygenation damage condition. **RESULTS:** Anoxia-reoxygenation had damage to the rat ventricular myocytes. Trtramethylpyrazine inhibited the myocytes constriction, increased the cell viability and reduce the releasing of LDH from cells. Formation of MDA was reduced from $4\mu\text{mol/L}$ and the more dose of trtramethylpyrazine use, the better salutary effects. It suggest that trtramethylpyrazine reduced anoxia-reoxygenation damage in a dose-dependent manner. **CONCLUSIONS** Trtramethylpyrazine could protect anoxia-reoxygenation damage of rat ventricular myocytes, and the treatment with trtramethylpyrazine has significant resistant to the anoxia-reoxygenation damage.

KEY WORDS trtramethylpyrazine, anoxia-reoxygenation damage, myocyte

川芎嗪(trtramethylpyrazine, TMP)是中药川芎的主要生物碱, 具有抑制血小板聚集和扩张冠状动脉, 抑制心肌细胞膜钙离子内流等作用^[1, 2]。本研究从大鼠分离的、耐钙的心肌细胞模型上观察川芎嗪对缺氧—复氧损伤的保护作用, 旨在为临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 大鼠耐钙心肌细胞的分离

主要根据 Luc Ver Donck 和 Farmer 的方法并作改良^[3, 4]。Wister 大鼠(湖北医科大学实验动物中心提供), 体重 200~250g, 禁食 16h, 术前半小时腹腔注射肝素 5000^u, 抗凝血, 猛击头部致昏, 迅速开胸取出心脏悬挂于 Langendorff 灌流装置上, 灌流液流速 8ml/min 。先用含 $\text{Ca}^{2+} 1.25\text{mmol/L}$ 的 Krebs-Henseleit(K-H)液灌流 15min, 然后换上含 $\text{Ca}^{2+} 20\mu\text{mol/L}$ 的 K-H 液灌流 5min, 加入 0.02% 的 I 型胶原酶(Sigma Co. 产)循环灌流 5min, 将含酶灌流中的 Ca^{2+} 提高至

浓度为 $50\mu\text{mol/L}$, 再灌流 5min。此时, 可见心脏比原来膨胀 20%~30%, 呈櫻桃色。从灌流架上取下心脏, 剪取心室肌置于硅化的小三角瓶内, 在含 $50\mu\text{mol/LCa}^{2+}$ 的低钙 K-H 液中冲洗二次, 用眼科手术剪剪碎心肌组织, 置于震荡孵化器上, 在含 2% 牛血清白蛋白(Sigma Co. 产)的低钙 K-H 液中孵化 5min, 持续通以 95% O_2 和 5% CO_2 的混合气体, 过滤后剩余的心肌组织继续在含 2% 牛血清白蛋白的低钙 K-H 液中孵化 5min, 共三次。收集滤液, 初次弃去不用。收集的滤液在室温下加入低钙 K-H 液离心洗三次, 分离的心肌细胞置于低钙 K-H 液中, 缓慢复钙至 Ca^{2+} 为 1.25mmol/L , 室温下贮存。

1.2 溶液与药品

K-H 液(mmol/L): NaCl 118, KCl 4.74, $\text{CaCl}_2 1.25$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 0.93$, HEPES 5, Glucose 5, $\text{MgSO}_4 1.2$, 用 NaOH 调至 pH 为 7.3; 低钙 K-H 液除 CaCl_2 浓度改变外, 其余成

* 本课题为湖北省九五攻关项目的组成部分, 编号 962P1101

分为 K-H 液相同, 未注明钙离子浓度的低钙 K-H 液含 Ca^{2+} 50 μ m ol/L。溶液成份除 HEPES 为 Sigma Co. 产品外, 均为国产分析纯。川芎嗪注射液为常州制药厂产品(批号: 0003071, 40 mg/2m l)。

1.3 实验方法

分离出的心肌细胞在室温下稳定 30 min 后, 分别置于硅化试管中, 调节细胞浓度为 $6 \times 10^5/2m l$ 。将实验分为 9 组, 每组两个平行管。①不缺氧组心肌细胞悬液中通以 95% O_2 与 5% CO_2 的混和气体, 于震荡孵化器 37°C 孵化 40 min。②单纯缺氧组: 心肌细胞悬液中通以 95% N_2 与 5% CO_2 的混合气体, 孵化 20 min。③对照组: 缺氧孵化 20 min 后, 复氧(通以 95% O_2 与 5% CO_2 的混合气体)孵化 20 min。④~⑨组: 缺氧—复氧孵化条件同③组, 心肌细胞悬液中分别含川芎嗪 1、2、4、8、16 和 32 μ m ol/L。

观察指标: ①台盘兰排斥试验计算杆形心肌细胞百分比。②心肌细胞释放乳酸脱氢酶(LDH)活性百分比。③心肌细胞类脂过氧化产物-丙二醛(MDA)含量用 Low ry 氏法进行蛋白质定量测定。

2 结果

7 次实验, 分离的大鼠心肌细胞在含钙 1.25 mm ol/L 的 K-H 液中, 大于 80% 的细胞是静止的。不缺氧组细胞孵化 40 min, 心肌细胞的生存率, 释放 LDH 活性百分比, MDA 含量无明显变化。单纯缺氧 20 min, 心肌细胞的生存率下降, 释放 LDH 活性百分比明显增加, MDA 的含量亦增加; 复氧 20 min 对心肌细胞造成更严重的损伤, 心肌细胞的生存率显著下降, LDH 释放更严重, MDA 含量大幅增加(较复氧前); 表 1 川芎嗪对缺氧—复氧心肌细胞生存率、LDH、MDA 的影响($\bar{x} \pm s, n=7$)

组 别	生存率/%	LDH/%	MDA (nm ol/m g ⁻¹ pr)
实验前值	76.5 \pm 1.0	7.9 \pm 0.3	0.60 \pm 0.04
不缺氧组	74.1 \pm 0.9 ¹	8.4 \pm 0.2 ¹	0.62 \pm 0.03 ¹
缺氧组	51.1 \pm 1.2 ²	20.3 \pm 0.6 ²	0.70 \pm 0.03 ²
复氧组/ μ m ol \cdot L ⁻¹			
对照组	35.6 \pm 1.6 ³	31.2 \pm 0.7 ³	0.94 \pm 0.05 ³
川芎嗪 1	36.9 \pm 1.8 ⁴	31.8 \pm 0.7 ⁴	0.93 \pm 0.06 ⁴
川芎嗪 2	38.2 \pm 1.9 ⁴	30.1 \pm 0.6 ⁴	0.89 \pm 0.06 ⁴
川芎嗪 4	44.1 \pm 1.7 ⁵	27.4 \pm 0.7 ⁵	0.84 \pm 0.05 ⁵
川芎嗪 8	47.5 \pm 1.8 ⁵	25.4 \pm 0.6 ⁵	0.72 \pm 0.06 ⁵
川芎嗪 16	49.3 \pm 2.0 ⁵	22.9 \pm 0.9 ⁵	0.61 \pm 0.04 ⁵
川芎嗪 32	50.7 \pm 1.9 ⁵	21.3 \pm 0.7 ⁵	0.53 \pm 0.03 ⁵

注: 与实验前值相比, ¹ $P > 0.05$; 与不缺氧组相比, ² $P < 0.01$; 与缺

氧组相比, ³ $P < 0.05$; 与对照组相比, ⁴ $P > 0.05$, ⁵ $P < 0.01$

川芎嗪 1、2 μ m ol/L 对缺氧—复氧造成的损伤无明显作用($P > 0.05$), 4、8、16 和 32 μ m ol/L 能明显抑制心肌细胞缺氧—复氧过程中上述指标的变化, 且随着剂量的增加, 抑制作用增强, 提示其对心肌细胞具有直接保护作用, 见表 1。

3 讨论

心肌细胞在急性缺血的状态下会影响心肌细胞的能量代谢, 缺血一定时间后恢复心肌细胞的血供, 细胞损伤由于氧自由基及细胞内钙离子过分聚集等因素反而进行性加重出现缺血心肌细胞的再灌注损伤。心肌细胞的缺氧—复氧损伤与心肌细胞的缺血—再灌注损伤具有相似的病理生理机制^[5]。大鼠心肌细胞缺氧 20 min 后, 生存率显著降低, 这可能与缺氧造成细胞膜的通透性增加和细胞能量缺乏, 细胞膜内外离子转运功能降低有密切关系, 使细胞内 LDH 大量漏出到细胞外。由于缺血所致线粒体功能紊乱, 细胞能量生成不足, 是缺血心肌细胞不可逆损伤的最主要因素^[6]。缺血期细胞类脂质过氧化物含量仅轻度增加, 复氧后细胞出现进行性挛缩, 杆形细胞生存率显著降低, LDH 释放明显增多, MDA 含量较缺氧期显著增加, 这表明缺氧—复氧后造成的损伤较缺氧期进一步加重, 用川芎嗪灌流心肌细胞后, 能抑制 LDH 的释放, 减少 MDA 的生成, 加速 MDA 的清除, 使缺氧—复氧造成的损伤呈剂量依赖性减轻, 从而保护心肌细胞; 另外, 用川芎嗪灌流心肌细胞后, 能减少缺氧—复氧损伤后儿茶酚胺类物质的生成, 使心肌细胞膜的通透性降低, 钾离子漏出细胞、钠离子大量进入细胞内的量减少, 心肌细胞膜容许钙离子通过的慢钙通道开放数量减少, 从而使细胞内的钙离子浓度下降, 减轻细胞内钙离子超负荷, 起到保护缺氧—复氧损伤心肌细胞的作用。

参考文献

- 肖 静. 川芎嗪药理研究的新进展. 华西医学杂志, 1993, 8(3): 170.
- 陈江斌, 黄从新, 唐其柱, 等. 川芎嗪对单个心室肌细胞电生理的影响. 湖北医科大学学报, 1999, 20(2): 111.
- 王 军, 章 鲁, 齐建华, 等. 不同年龄 SHR 心肌细胞内游离钙浓度和心肌组织 NE 含量的变化. 中国高血压杂志, 1995, 3: 104.
- Farmer BB, Mancina M, William ES, et al. Isolation of calcium-tolerant myocytes from adult rat hearts. Life Sci 1983, 33: 1.
- Braunwald E, Kloner RA. Myocardial reperfusion: A double-edged sword. J Clin Invest, 1985, 76: 1713.
- Cheung JY, Leaf A, Bonventre JV, et al. Mitochondrial function and intracellular calcium in anoxic cardiac myocytes. Am J Physiol, 1986, 250: C18.

收稿日期: 1999- 11- 30