

## 荳叶心通软胶囊对小鼠耐缺氧及体外培养心肌细胞的影响

何峰, 黄勇, 郑林, 何迅, 王爱民, 兰燕宇, 王永林\* (贵阳医学院药学院, 贵阳 550004)

**摘要:** 目的 观察荳叶心通软胶囊对小鼠耐缺氧及体外培养心肌细胞的影响。方法 关闭小鼠气管, 以不同剂量的荳叶心通软胶囊与普萘诺尔做对照, 观察给药后小鼠缺氧心跳停止时间; 离体培养大鼠乳鼠原代心肌细胞, 以不同剂量的荳叶心通软胶囊与香丹注射液做对照, 检测给药后心肌细胞 A<sub>570</sub> 和培养上清液中 LDH 活力。结果 荳叶心通软胶囊高、中剂量组能明显延长小鼠气管结扎的心跳时间, 增加小鼠心脏耐缺氧能力。荳叶心通软胶囊高剂量组可明显提高心肌细胞 A<sub>570</sub>, 降低培养上清液 LDH 的活力。结论 荳叶心通软胶囊具有改善小鼠耐缺氧的作用, 对 NaCN 诱导心肌细胞损伤具有一定的保护作用。

**关键词:** 荳叶心通软胶囊; 耐缺氧; 小鼠; 体外培养心肌细胞

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2010)09-0761-03

### Hongyexintong Soft Capsule on Hypoxia Tolerance in Mice and *in Vitro* Cultured Myocardial Cells

HE Feng, HUANG Yong, ZHENG Lin, HE Xun, WANG Aimin, LAN Yanyu, WANG Yonglin\* (School of Pharmacy, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To investigate the effect on hypoxia in mice and myocardial cells *in vitro* changes of Hongyexintong soft capsule. **METHODS** The hypoxic cardiac arrest time, myocyte primary culture A<sub>570</sub> and the LDH activity of mice which were treated by Hongyexintong soft capsule at different doses were observed and compared with that treated by Xiangdan injection. **RESULTS** The high and middle dose group of Hongyexintong soft capsule could significantly prolong the time mice tracheal ligation of the heartbeat and increase cardiac hypoxia tolerance in mice. The high dose group of Hongyexintong soft capsule could obviously improve the NaCN-induced myocardial cell injury induced by primary A<sub>570</sub> due to the decline, reducing the vitality of culture supernatant LDH. **CONCLUSION** Hongyexintong soft capsule has effect of improving the role of hypoxia in mice and protecting myocardial cell, which injured by NaCN-induced.

**KEY WORDS:** Hongyexintong soft capsule; hypoxia; mice; myocardial cells *in vitro*

荳叶心通软胶囊由荳草、三七、山楂叶和川芎 4 味中药组成, 是在贵州民族用药的基础上采用现代制剂提取技术富集有效成分精制而成, 具有活血化痰, 通脉止痛的功效。临床用于冠心病, 心绞痛以及心血瘀阻所致的胸痹心痛证、胸部刺痛、心悸不宁。根据治疗胸痹心痛的中药药理研究技术指导原则, 本实验主要研究荳叶心通软胶囊对小鼠耐缺氧及对体外培养乳鼠心肌细胞的保护作用, 确定其心血管活性, 为深入研究开发和临床应用提供科学理论依据。

### 1 材料与试药

#### 1.1 仪器

金花牌定量加样器(北京青云精密设备有限公

司); 800 型离心机(上海手光器械十厂); HX-300 呼吸机(成都泰盟科技公司); 心电图机(广东科思美医用器械厂); 肌酸激酶(CK)测定试剂盒(长春汇力生物技术有限公司); 乳酸脱氢酶(LDH)测定试剂盒(长春汇力生物技术有限公司); RM-6000 八道生理记录仪及附件(日本 NIHON KOHDEN 公司); OM.MFV3100/3200 电磁流量计(日本 NIHON KOHDEN 公司); 1411 高频小电刀(上海医疗器械高技术公司); YH-4 生理压力传感器(中国北京航天医学工程研究所)。

#### 1.2 试药

荳叶心通软胶囊由贵州益佰制药股份有限公司提供, 批号: 20040525, 内容物为棕褐色的膏

基金项目: 贵州省重大专项项目[黔科合重大专项字(2007)6010 号]; 贵州省科技计划项目[黔科合计工字(2009)4001 号]

作者简介: 何峰, 男, 研究生 Tel: 13765066345 E-mail: hf\_5020539@126.com \*通信作者: 王永林, 男, 教授 Tel: (0851)6908899 E-mail: gywyl@gmc.edu.cn

状物(每 1 g 相当于含 11.11 g 生药),实验前以适量 0.5%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶液超声处理,配制成所需浓度的混悬液;荳叶心通软胶囊提取浸膏(干浸膏加川芎提取物)由贵州益佰制药股份有限公司提供,批号: B20040603,棕褐色的润湿粉末(每 1 g 相当于含 17.20 g 生药),实验前以 1% DMSO 配制所需药物浓度。

乌拉坦(上海润捷化工试剂有限公司);戊巴比妥钠(北京化学试剂有限公司德国进口分装);普萘诺尔(大同市云岗制药有限公司);垂体后叶素(上海第一生化药业有限公司);红四氮唑(TTC)(上海山浦化工有限公司);香丹注射液(吉林省集安益盛药业有限公司)。

### 1.3 动物

KM 小鼠,♀♂兼用,体重 18~22 g;SD 大鼠,♀♂兼用,体重 180~220 g;以上动物均由贵阳医学院实验动物中心提供,动物合格证号: SCXK(黔)2002-0001。

### 1.4 统计方法

实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,所有计量资料采用  $t$  检验。

## 2 方法

### 2.1 荳叶心通软胶囊对小鼠耐缺氧实验

取小鼠 60 只,♀♂各半,随机分为 5 组,即模型组 0.5% CMC-Na 与大豆油 10 mL·kg<sup>-1</sup>、普萘诺尔组 6.6 mg·kg<sup>-1</sup>、以生药计荳叶心通软胶囊高剂量组 12.0 g·kg<sup>-1</sup>、中剂量组 6.0 g·kg<sup>-1</sup>、低剂量组 3.0 g·kg<sup>-1</sup>,每组 12 只。每天灌胃给药 1 次,连续给药 5 d,第 5 天给药后 0.5 h 开始实验。20%乌拉坦 0.05 mL·(10 g)<sup>-1</sup> 麻醉小鼠并固定在鼠板上,分离小鼠气管,四肢插入针状电极,夹闭气管,开始记录心电图,记录心电停止时间<sup>[1-3]</sup>,动物意外死亡者未计入实验结果。

### 2.2 荳叶心通软胶囊对原代心肌细胞培养实验

**2.2.1 离体原代心肌细胞的培养** 取出生 1~2 d 内的 SD 大鼠乳鼠 8~10 只,用 75%的酒精浸泡数秒消毒,迅速取出心脏,去除大血管和心房,用 PBS 反复冲洗 3 次,洗去血凝块和血细胞,将心室肌剪成 1 mm<sup>3</sup> 的小块,加约 5 倍组织体积的 0.1%胰酶(Difco, 1:250, D-Hank's 液溶解),于 37 °C 水浴消化 6~8 次,每次约 10 min。自然沉淀后,收集除第 1 次以外的细胞悬液于离心管中,加入含小牛血清的培养液,终止胰酶的继续消化,先用

D-Hank's 液吹打洗涤细胞 2 次,1 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,离心弃上清,然后用含有 20%小牛血清的 DMEM(pH 7.2)将细胞充分吹打稀释,制成细胞悬液,按上述方法将自然沉淀的组织块反复消化,直至完全消化为止。按差速贴壁离心法纯化心肌细胞。将上述悬液接种于 50 mL 培养瓶中,置 5% CO<sub>2</sub> 培养箱 37 °C 培养 1.5~2 h,以纯化心肌细胞。然后将未贴壁心肌细胞吸出,用细胞培养板计数,调整细胞数以 1×10<sup>5</sup> 密度接种于 24 孔或 96 孔细胞培养板上,置 5% CO<sub>2</sub> 培养箱 37 °C 继续培养<sup>[4-6]</sup>。

**2.2.2 模型复制与给药** 按实验随机分为 6 组,正常对照组(给予等体积的 1%生理盐水)、模型组(给予等体积的 1% DMSO)、香丹注射液组(给予香丹注射液 40 μL)、荳叶心通软胶囊高剂量组(终浓度为 40 mg·L<sup>-1</sup>)、荳叶心通软胶囊中剂量组(终浓度为 20 mg·L<sup>-1</sup>)、荳叶心通软胶囊低剂量组(终浓度为 10 mg·L<sup>-1</sup>),各给药组与心肌细胞作用 30 min 后,以 2 mmol·L<sup>-1</sup> 氰化钠诱导心肌细胞损伤,24 h 后检测各项指标。

### 2.2.3 检测指标

**2.2.3.1 MTT 的检测细胞存活率** 模型复制 24 h,再加入 MTT(终浓度为 0.5 mg·mL<sup>-1</sup>),在 37 °C,5% CO<sub>2</sub> 条件下继续培养 4 h 后吸去培养液,每孔加入 DMSO 100 μL,待培养板孔内的颗粒完全溶解后,用酶联仪于 570 nm 测定吸光度值  $A$ ,并计算抑制率:抑制率=(OD 给药组-OD 模型组)/(OD 对照组-OD 模型组)×100%。

**2.2.3.2 乳酸脱氢酶(LDH)活性的测定** 细胞给药与损伤后,吸出上清液,分别测上清 LDH 活力。

## 3 结果

### 3.1 小鼠耐缺氧实验结果

荳叶心通软胶囊高、中剂量组能明显延长气管结扎小鼠的心跳时间,增加小鼠心脏耐缺氧能力,与模型组比较差异显著( $P<0.01$ ),结果见表 1。

### 3.2 原代心肌细胞培养实验结果

2 mmol·L<sup>-1</sup> NaCN 作用 24 h 后,MTT 检测心肌细胞 A<sub>570</sub> 明显降低,培养上清液中 LDH 活力显著增加,提示心肌细胞损伤;荳叶心通软胶囊高剂量组明显提高 A<sub>570</sub>,降低培养上清液 LDH 的活力。提示荳叶心通软胶囊对 NaCN 诱导心肌细胞损伤具有保护作用,结果见表 2。

## 4 讨论

冠心病、心绞痛的主要病理基础是冠状动脉

**表 1** 荳叶心通软胶囊对夹闭小鼠气管所致缺氧心跳停止时间的影响( $\bar{x} \pm s$ )

**Tab 1** Effects of Hongyexintong soft capsule on hypoxic cardiac arrest time by administration tracheal occlusion in mice( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/(g 生药·kg <sup>-1</sup> )	动物数/只	时间/min
模型组	-	12	8.56±2.22
高剂量组	12.0	11	13.12±3.15 <sup>1)</sup>
中剂量组	6.0	11	12.04±3.55 <sup>1)</sup>
低剂量组	3.0	11	8.96±2.53
普奈诺尔组	6.6 mg·kg <sup>-1</sup>	9	16.98±4.97 <sup>1)</sup>

注: 与模型组比较, <sup>1)</sup>P<0.01

Note: Compared with model group, <sup>1)</sup>P<0.01

**表 2** 荳叶心通软胶囊对 NaCN 诱导原代心肌细胞损伤的影响( $\bar{x} \pm s$ , n=6)

**Tab 2** Effects of Hongyexintong soft capsule on cell injury by NaCN in myocardial cells( $\bar{x} \pm s$ , n=6)

组别	剂量/ mg·L <sup>-1</sup>	LDH/U·mL <sup>-1</sup>	A <sub>570</sub>	抑制率/ %
正常对照组	-	227.71±10.88	1.89±0.26	-
模型组	-	288.75±23.14 <sup>1)</sup>	0.99±0.20 <sup>1)</sup>	-
高剂量组	40	217.29±25.49 <sup>2)</sup>	1.52±0.16 <sup>2)</sup>	58.9
中剂量组	20	222.14±19.76 <sup>3)</sup>	1.21±0.19	24.4
低剂量组	10	238.57±34.02	1.02±0.11	3.0
香丹注射液组	40 μL	234.29±21.74 <sup>2)</sup>	1.66±0.23 <sup>2)</sup>	74.4

注: 与正常对照组比较, <sup>1)</sup>P<0.01; 与模型组比较, <sup>2)</sup>P<0.05, <sup>3)</sup>P<0.01

Note: Compared with control group, <sup>1)</sup>P<0.01; compared with model group, <sup>2)</sup>P<0.05, <sup>3)</sup>P<0.01

痉挛或梗阻, 造成心肌缺血、缺氧、坏死。提高心肌细胞的抗缺血性损伤是防治心肌缺血的重要途径。目前具有抗心肌缺血及治疗冠心病、心绞痛的药物主要通过减少左心室做功、降低耗氧量、增加心肌供血与改善心肌代谢等 3 个环节发挥作用。荳叶心通软胶囊以具有行气止痛作用的贵州地产药材荳草为主药, 并辅以三七、山楂叶、川芎。全方以辛、甘为主, 温、凉并行, 可起到活血化瘀、通脉止痛的功效, 切合冠心病、心肌梗死的发病机制。

缺氧影响机体的氧化供能, 最终导致心、脑等重要器官损伤, 引起氧供应能力不足而死亡。本试验结果提示一定剂量的荳叶心通软胶囊可延

长缺氧小鼠的存活时间, 说明荳叶心通软胶囊对脑缺氧或心肌缺血具有改善作用, 本试验将通过测定血清中 CKMDA、EPO 等的活性, 更深入探讨其耐缺氧机制。

香丹注射液的成分丹参、降香是目前应用较广泛的活血化瘀药, 特别对冠心病血瘀症患者有良好的效果<sup>[7]</sup>。试药荳叶心通软胶囊初步药理实验提示具有祛瘀通脉功能, 与香丹注射液同为活血化瘀类的药物, 因此原代心肌细胞培养实验中采用香丹注射液作为阳性对照, 可以为试药的药理作用提供一定的参比。

LDH 是存在于心肌细胞的脑浆酶, 当细胞受到损伤时, 细胞膜破裂, 通透性增加, 胞内大量 LDH 漏出胞外, 因此 LDH 的释放量与心肌坏死程度呈正相关。荳叶心通软胶囊能显著降低 LDH 值, 减少由于 NaCN 诱导心肌细胞损伤而导致的 LDH 溢出, 提示其对心肌细胞有保护作用, 但其作用机制尚须进一步研究。

## REFERENCES

- [1] XU S Y, BIAN R L, CHEN X. Pharmacological Experimental Methodology(药理实验方法学) [M]. 3rd ed. Beijing: People's Health Publishing House, 2002: 203-205.
- [2] XU S Y, BIAN R L, CHEN X. Pharmacological Experimental Methodology(药理实验方法学) [M]. 2nd ed. Beijing: People's Health Publishing House, 1991: 854-859.
- [3] ZHANG Y, WANG M Z, HUANG Q F, et al. Baixin pill right coronary artery ligation-induced myocardial ischemia in rats [J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med(北京中医药大学学报), 1997, 20(1): 31-33.
- [4] CHEN Q. Chinese Traditional Medicine Pharmacology Research Methodology (中药药理研究方法学) [M]. People's Health Publishing House, 1993: 525-527.
- [5] WANG Q, WANG D J, LI Q G, et al. An improved method for primary culture of cardiac myocytes [J]. J Clin Reha Tiss Engin Res(中国组织工程研究与临床康复), 2007, 11(6): 1168-1170.
- [6] ZHAO J L, LIU B J. Effects of procaine against anoxic damages of myocardial cells [J]. J Shanxi Med Univ(山西医科大学学报), 2001, 32(6): 538-540.
- [7] WU S D, WANG J, CHEN S C, et al. Effect of Xiangdan Injection on mRNA expression of endothelial vasoactive factors of patients with coronary heart disease and blood stasis [J]. J Chin Integ Med(中西医结合学报), 2004, 2(2): 94-96.

收稿日期: 2009-12-23