

3,4,5-三羟基芪-3-β-单-葡萄糖甙对培养乳鼠心肌细胞搏动频率及损伤的影响¹

骆苏芳、余传林、张佩文 (第一军医大学药理学教研室, 广州 510515, 中国)

Influences of 3,4,5-trihydroxystibene-3-β-mono-D-glucoside on beat rate and injury of cultured newborn rat myocardial cells

LUO Su-Fang, YU Chuan-Lin, ZHANG Pei-Wen

(Department of Pharmacology, First Military Medical College, Guangzhou 510515, China)

ABSTRACT 3,4,5-Trihydroxystibene-3-β-mono-D-glucoside (PD) from *Polygonum cuspidatum* 0.05-0.45 mmol/L increased beat rate of myocardial cells from 100% to 112-220%. This action of PD 0.15 mmol/L was agonized by nisoldipine 0.1, propranolol 10 and phentolamine 1 μmol/L. PD (0.05, 0.15 mmol/L) decreased the lactate dehydrogenase (LDH) amount liberated by myocardial cells, from 98±11 IU/ml of deprivation of oxygen and glucose (DOG) to 55±16, 68±14 IU/ml ($P<0.01$) 6 h after injury of DOG; 77±9, 80±6 IU/ml ($P<0.01$) 9 h after injury of DOG. PD 0.15 mmol/L decreased the LDH amount liberated by myocardial cells, from 311±34 to 231±42 IU/ml ($P<0.05$) 9 h after injury of chlorpromazine (CPZ). It is suggested that PD can protect myocardial cells injured by DOG and CPZ.

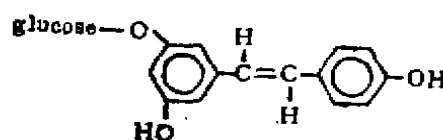
KEY WORDS glucosides; cultured cells; myocardium; heart rate; calcium channel blockers; propranolol; phentolamine; chlorpromazine; mitomycins; lactate dehydrogenase

摘要 3,4,5-三羟基芪-3-β-单-葡萄糖甙 (PD) 0.05, 0.15, 0.45 mmol/L 能明显加快细胞搏动率, 并可被尼索地平、普萘洛尔和酚妥拉明阻断。提示可能与 Ca^{2+} 、肾上腺素 β 和 α 受体有关。PD 0.05 和 0.15 mmol/L 能使缺糖缺氧损伤后 6 和 9 h 及 PD 0.15 mmol/L 能使氯丙嗪损伤后 9 h 心肌细胞 LDH 释放量

显著降低, 提示 PD 对缺糖缺氧及氯丙嗪损伤的心肌细胞有保护作用。

关键词 葡萄糖甙类, 培养的细胞, 心肌, 心率, 钙通道阻滞剂, 普萘洛尔, 酚妥拉明, 氯丙嗪, 丝裂霉素类, 乳酸脱氢酶

虎仗 (*Polygonum cuspidatum* Sieb et Zucc) 系蓼科植物, 药用根茎。本校化学教研室从虎仗中分得 3,4,5-三羟基芪-3-β-单-葡萄糖甙 (3,4,5-trihydroxystibene-3-β-mono-D-glucoside, Pigid) 又称虎仗晶 IV 号 (polydatin, PD), M_r 390。



3,4,5-Trihydroxystibene-3-β-mono-D-glucoside

PD 可改善大鼠重症不可逆失血性休克微循环紊乱⁽¹⁾, 在体内外抑制兔血小板聚集⁽²⁾。本室曾观察到使离体豚鼠心肌收缩力加强。据此设想其对心肌细胞可能有影响。故研究了 PD 对培养乳鼠心肌细胞搏动率与缺糖缺氧、氯丙嗪和丝裂霉素 C 等损伤的影响。就其对搏动率影响的机理进行了分析。

MATERIALS

PD 由本校化学教研室提供; 普萘洛尔 (propranolol, Pro) 注射液系北京制药厂产品; 酚妥拉明 (phentolamine, Phen) 注射液系上海第十三制药厂产品; 尼索地平 (nisoldipine, Nis) 由河北医学院药理学系提供; 氯丙嗪 (chlorpromazine, CPZ) 系上海天丰制药厂产品; 丝裂霉素 C (mytomycins, MMC) 系日本东京共和发酵工业有限公司产品。YSZ-D₂ 型倒置生

Received 1988 Oct 13 Accepted 1989 Sep 06

¹ Project supported by the National Natural Science Foundation of China, No 3880738

物显微镜系重庆光学仪器厂产品; SJ-III型二道生理记录仪系绵阳涪江机器厂产品。

METHODS AND RESULTS

培养心肌细胞 按文献⁽³⁾处理 Wistar 种大鼠新生乳鼠心室肌, 并用 0.06% 胰蛋白酶消化、分离, 以含 20% 的小牛血清的 Eagle 培养液制成细胞悬液, 取 1 ml 接种于培养瓶中, 在 37°C 温箱中培养。

搏动实验 取培养 3-6 d 的心肌细胞培养瓶, 置于具有 37±0.2°C 恒温装置的 YSZ-D₂ 型倒置显微镜下分别观察 PD 对细胞搏动频率的影响及观察钙拮抗剂 Nis、β 肾上腺素受体拮抗剂 Pro、α 肾上腺素受体拮抗剂 Phen 对 PD 增加细胞搏动作用的影响。细胞搏动经光电换能器、前置放大器后在 SJ-III 型二道生理记录仪上描绘。

损伤实验 取培养 2 d 的心肌细胞进行实验。用 721 分光光度计在 440 nm 波长测定实验液的光密度⁽⁴⁾, 计算缺糖缺氧、CPZ、MMC 3 种不同类型致损伤后丙酮酸生成量, 再换算成 LDH 活力单位。LDH 降低提示损伤减轻。

PD 对心肌细胞搏动频率的影响 取 20 个培养瓶, 正常对照组 5 瓶, 加入三蒸馏水 20 μl, PD 组 15 瓶, 随机分为 3 种剂量组, 分别加入 0.1, 0.3, 0.9% PD 各 20 μl 于 1 ml 培养液中, 使终浓度分别为 0.05, 0.15, 0.45 mmol/L, 记录加药前及加药后 1, 3, 5, 10, 15 min 的心

肌细胞搏动率 (Tab 1)。PD 0.05 mmol/L 组仅在给药后 3 和 5 min 能显著增加细胞搏动频率 ($P < 0.05$); PD 0.15 mmol/L 组在给药后 1, 3, 5, 10 min 均能增加细胞搏动频率 ($P < 0.05, 0.01$), 作用不超过 15 min; PD 0.45 mmol/L 组于给药后 1, 3, 5 min 能增加细胞搏动频率 ($P < 0.05, 0.01$)。

拮抗剂对 PD 增加心肌细胞搏动频率的影响 取 15 个培养瓶, 随机分为 Nis-PD 组, Pro-PD 组和 Phen-PD 组, 各 5 瓶。先记录给药前细胞搏动频率, 然后分别加入 Nis 10 μmol/L, Pro 1 mmol/L, Phen 0.1 mmol/L 各 10 μl 于 1 ml 培养瓶中, 使终浓度分别为 0.1, 10, 1 μmol/L, 5 min 后记录细胞搏动频率, 接着加入 0.3% PD 20 μl 使终浓度为 0.15 mmol/L, 记录加 PD 后 1, 3, 5, 10, 15 min 的细胞搏动频率。结果显示, PD 增加心肌细胞搏动频率的作用不再出现, Nis-PD 组和 Pro-PD 组细胞搏动变化% 与 PD 0.15 mmol/L 组相应时间的搏动变化% 组间比较 P 均 < 0.01 , 而 Phen-PD 组与 PD 0.15 mmol/L 组比较除 1 min 时不显著外, 其余 P 均 $< 0.05, 0.01$ 。提示 Nis、Pro、Phen 均能拮抗 PD 增加心肌细胞搏动频率的作用 (Tab 2)。

PD 对心肌细胞缺糖缺氧损伤的影响 取 32 个培养瓶, 分正常对照组、缺糖缺氧损伤组与缺糖缺氧-PD 组。制作缺糖缺氧损伤模型⁽⁵⁾, 缺糖缺氧-PD 组在缺糖缺氧同时分别加

Tab 1. Influence of polydatin (PD) on beat rate of cultured newborn rat myocardial cells. $n = 5$, $\bar{x} \pm SD$. * $P > 0.05$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$ vs normal control ($n = 4$). % in parentheses.

Drug (mmol/L)	Myocardial cell beat rate (bpm)					
	0	1	3	5	10	15 min
Control	163±29 (100)	163±28 (100±103)	164±28 (100±102)	164±28 (100±102)	162±26 (102±103)	165±27 (104±103)
PD 0.05	50±41 (100)	57±49 (108±112)*	57±48 (112±111)**	58±48 (112±111)**	55±45 (110±112)*	54±44 (106±113)*
0.15	95±68 (100)	129±82 (143±138)**	130±83 (142±129)***	125±80 (136±124)***	111±77 (121±110)***	103±76 (109±106)*
0.45	56±39 (100)	85±32 (185±192)**	98±35 (208±179)***	103±46 (220±205)**	76±34 (159±173)*	69±35 (141±163)*

Tab 2. Influences of blocking agents on beat rate increased by PD of cultured newborn rat myocardial cells, $n=5$, $\bar{x}\pm SD$, * $P>0.05$, ** $P<0.05$, *** $P<0.01$ vs control (PD 0.15 $\mu\text{mol/L}$), % in parentheses.

Drug ($\mu\text{mol/L}$)	Myocardial cell beat rate (bpm)					
	0	1	3	5	10	15 min
Control	95 \pm 68 (100)	129 \pm 82 (143 \pm 138)	130 \pm 83 (142 \pm 129)	125 \pm 80 (136 \pm 124)	111 \pm 77 (121 \pm 112)	103 \pm 76 (109 \pm 106)
Nisoldi- pine 0.1	150 \pm 50 (100)	151 \pm 55 (-100 \pm 106)***	132 \pm 43 (-102 \pm 103)***	145 \pm 56 (-104 \pm 106)***	142 \pm 57 (-107 \pm 108)***	137 \pm 53 (-110 \pm 107)***
Propran- olol 10	73 \pm 53 (100)	78 \pm 59 (-100 \pm 125)***	72 \pm 54 (-107 \pm 125)***	65 \pm 52 (-114 \pm 127)***	63 \pm 48 (-119 \pm 124)***	56 \pm 40 (-126 \pm 123)***
Phentol- amine 1	70 \pm 37 (100)	74 \pm 40 (103 \pm 109)*	76 \pm 46 (104 \pm 114)**	74 \pm 42 (103 \pm 119)**	70 \pm 45 (-104 \pm 117)***	67 \pm 46 (-109 \pm 119)***

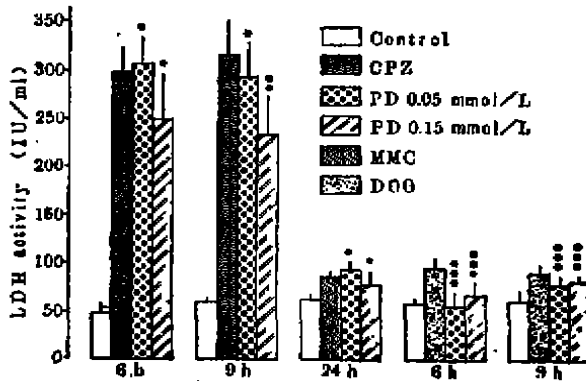


Fig 1. Influences of PD on lactate dehydrogenase (LDH) amount liberated by myocardial cells injured by the deprivation of oxygen and glucose (DOG), chlorpromazine (CPZ) and mitomycins (MMC) at 6, 9 and 24 h after injury. $\bar{x}\pm SD$, * $P>0.05$, ** $P<0.05$, *** $P<0.01$ vs DOG, CPZ and MMC.

入 0.1, 0.3%PD 各 20 μl 于 1 ml 培养液中, 终浓度分别为 0.05 和 0.15 mmol/L。以上 4 组于培养后 6 和 9 h 分别测定培养液中 LDH 的含量。结果表明, 缺糖缺氧损伤组较正常对照组的 LDH 明显升高 ($P<0.01$), 缺糖缺氧-PD 0.05 mmol/L 组和 PD 0.15 mmol/L 组在损伤后 6 和 9 h 的培养液中的 LDH 活力单位均低于缺糖缺氧损伤组。经统计处理 $P<0.01$ (Fig 1)。

PD 对心肌细胞 CPZ 损伤的影响 取 20 个培养瓶, 分正常对照组、CPZ 损伤组、CPZ 损伤-PD 组。制作 CPZ 损伤模型⁽⁶⁾, CPZ 损

伤-PD 组除含有等浓度 (0.16 mmol/L) 的 CPZ 外, 同时加入 PD, 剂量同缺糖缺氧实验。各组于培养后 6 和 9 h 分别测定培养液中的 LDH 含量。结果表明, CPZ 损伤组较正常对照组的 LDH 显著升高 ($P<0.01$), CPZ 损伤-PD 0.05 mmol/L 组无论在损伤后 6 或 9 h 与 CPZ 损伤组 LDH 比较均无显著差异, CPZ 损伤-PD 0.15 mmol/L 组于损伤后 6 h 作用不显著, 损伤后 9 h LDH 活力单位较 CPZ 损伤组明显降低 ($P<0.05$) (Fig 1)。

PD 对心肌细胞 MMC 损伤的影响 取 29 个培养瓶, 分正常对照组、MMC 损伤组、MMC 损伤-PD 组。制作 MMC 心肌细胞损伤模型⁽⁷⁾, MMC 损伤-PD 组除含有等浓度 (5 $\mu\text{g/ml}$) 的 MMC 外, 同时加入 PD, 剂量同以上两实验。各组于培养后 24 h 测定培养液中 LDH 的含量。结果表明, MMC 损伤组的 LDH 较正常对照组显著升高 ($P<0.01$), MMC 损伤-PD 0.05 mmol/L 组和 PD 0.15 mmol/L 组的 LDH 含量与 MMC 损伤组比较均不显著 ($P>0.05$) (Fig 1)。

DISCUSSION

PD 对心肌细胞搏动频率呈短暂兴奋作用, 且能被 Nis、Pro 和 Phen 所拮抗。提示 PD 增加心肌细胞搏动频率的效应与心肌细胞上钙离子通道及 β 、 α 肾上腺素受体均有关。

培养心肌细胞氧和葡萄糖缺乏时, 能迅速

使能量耗竭, 并产生大量乳酸使细胞内 pH 下降进而改变膜的通透性, 使胞浆酶如 LDH 外漏。这种反应近似在体缺血性心肌细胞损伤反应。实验证明, PD 可能具有对抗缺糖缺氧损伤所致膜损伤的效应, 使 LDH 漏出减少。此种保护作用在浓度增大时未再加强。提示终浓度为 0.05 mmol/L 时已达最大效应。PD 作用的机理值得探讨。

CPZ 是钙调蛋白抑制剂, 心肌细胞肌浆网上的钙泵被其抑制后, 钙就不能进入肌浆网中储存以致胞浆中游离钙增多而损伤心肌细胞, 使 LDH 漏出增加。PD 0.15 mmol/L 对 CPZ 损伤的心肌细胞有保护作用, 提示 PD 除对细胞膜有抗损伤效应外, 肌浆网上的钙泵可能有 PD 的作用点。

PD 不能降低 MMC 损伤的心肌细胞 LDH 释放量。说明 PD 对 MMC 损伤没有保护作用。

PD 对三种不同损伤的保护作用的差异, 除由于各种损伤的机理不同外, 可能与 PD 的作用剂量和时间有关。膜保护效应发生较早。0.05 mmol/L 的较低剂量即可起效且达最大效应; 对钙泵的作用则需 0.15 mmol/L 的较大剂量及药物作用达 9 h 方能起效; MMC 损伤发生晚, 可能与 PD 作用不同步是 PD 无效原因之一。

PD 加强心肌细胞搏动并抗心肌细胞损伤的作用加之其抑制血小板聚集和改善微循环的

作用均提示本品有可能成为一种有广泛临床应用前景的药物。

致谢 杨迎暴同志参加部份工作

REFERENCES

- 1 Zhu ZJ, Zao KS, Wu KY, Huang XL. The improvement of microcirculation in rat with irreversible hemorrhagic shock by crystal No 4 of polygonum cuspidatum. *Acad J First Med Coll PLA* 1987; 7 : 113
- 2 Shan CW. Effects of polydatin on platelet aggregation of rabbits. *Acta Pharm Sin* 1988; 23 : 394
- 3 Xiyuan Hospital, Academy of Traditional Chinese Medicine; Institute of Biophysics, Academia Sinica. Culture of myocardial cells and their morphological features. *Chin J Cardiol* 1981; 9 : 216
- 4 徐世康. 乳酸脱氢酶测定. 见: 上海医学化验所, 主编. 临床生化检验. 上海: 上海科学技术出版社, 1979 : 315-6
- 5 Li LD, Li YO, Gao FH, et al. The protective effect of Chrysanthemum Indicum L extract (CI-2) on myocardial injury in cultured neonatal rat heart cells deprived of oxygen and glucose. *Chin J Integr Trad West Med* 1981; 1 : 93
- 6 Wei DH, Yu CL, Yang SQ, Gu YQ. The effect of ophiopogon (maidong) on cultured ischaemic rat myocardial cells. *Asia Pacific J Pharmacol* 1989; 4 : 5
- 7 李连达、刘志云、高凤辉, 等. 丝裂霉素 C 对体外培养乳鼠心肌细胞的影响. *药学通报* 1985; 20 : 123

中国药理学报 *Acta Pharmacologica Sinica* 1990 Mar; 11 (2) : 150-153

尼卡地平对培养心肌细胞搏动率的作用

杨家粹、余传林 (第一军医大学药理教研室, 广州 510515, 中国)

Effects of nifedipine on beating rates of cultured myocardial cells

YANG Jia-Cui, YU Chuan-Lin
(Department of Pharmacology, First Military

Medical College, Guangzhou 510515, China)

ABSTRACT Nifedipine (Nic) 15 nmol/L had no effects on beating rates of cultured myocardial cells. Nic 75 and 150 nmol/L depressed the beating rates significantly. Rapid standstills occurred earlier and more in 150 nmol/L group than in

Received 1988 Oct 28 Accepted 1989 Sep 04