

呋喃二氢吡啶 I 抗大鼠心肌缺血脂质过氧化作用及对红细胞膜 ATP 酶活性的影响

刘德强、庞仲卿、赵德化、盛宝恒 (第四军医大学药理教研室, 西安 710032, 中国)

Effects of furyl-dihydropyridines I on lipid peroxides of ischemic myocardium and ATPases activity of erythrocyte membranes in rats

LIU De-Qiang, PANG Zhong-Qing, ZHAO De-Hua, SHENG Bao-Heng

(Department of Pharmacology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

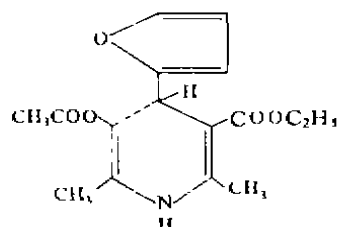
ABSTRACT Acute myocardial ischemia and reperfusion in rats increased glutamic oxalacetic transaminase (GOT), non-esterified fatty acid (FFA), malondialdehyde (MDA) content. Furyl-dihydropyridines I $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ decreased the release of GOT, FFA, MDA of ischemic myocardium, and prevent ischemia-reperfusion arrhythmia. Furyl-dihydropyridines I increased Na, K-ATPase activity and N-acetylneuraminic acid (NANA) content of erythrocyte membranes, inhibited Ca-ATPase activity of erythrocyte membranes in rats. The results suggested that the mechanism of protecting the ischemic-reperfused myocardium might be associated with the inhibition of cellular lipid peroxidation and Ca-ATPase activity of cell membranes.

KEY WORDS calcium channel blockers; furyl-dihydropyridines I; myocardial reperfusion injury; arrhythmia; malondialdehyde; adenosine triphosphatase; lipid peroxides

摘要 大鼠急性心肌缺血 1 h, 再灌注 30 min, 血浆谷草转氨酶(GOT), 丙二醛(MDA), 游离脂肪酸(FFA)含量明显升高。呋喃二氢吡啶 I $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 使 GOT, MDA, FFA 的释放量明显减少, 预防缺血再灌注心律失常的发生。该药也能使麻醉大鼠红细胞膜 Na, K-ATP 酶活性, N-乙酰神经氨酸(NANA)含量增高, Ca-ATP 酶活性下降。提示该药保护心肌的机理与抗缺血心肌脂质过氧化和抑制细胞膜 Ca-ATP 酶活性有关。

关键词 钙通道阻滞剂; 呋喃二氢吡啶 I; 心肌再灌注损伤; 心律失常; 丙二醛; 腺苷三磷酸酶; 脂质过氧化

呋喃二氢吡啶 I 是二氢吡啶类钙通道阻滞剂的衍生物, 前文报道了它的抗心律失常作用⁽¹⁾及对离体兔心缺血损伤的保护作用⁽²⁾。本文则观察其对大鼠心肌缺血再灌注损伤的抗脂质过氧化作用及对红细胞膜 ATP 酶活性的影响, 以探讨该药作用的生化机制。



Furyl-dihydropyridines I

MATERIALS AND METHODS

药品 呋喃二氢吡啶 I (2,6-二甲基-4-呋喃基-1,4-二氢吡啶-3,5-二羧酸甲乙酯, 2,6-dimethyl-4-furyl-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate, furyl-dihydropyridines I) 由陕西师范大学化学系张延红讲师和吴琪教授合成提供, 实验按 200 mg 药品加吐温 $80 \text{ } 0.2 \text{ ml}$ 研磨后, 再加生理盐水溶解配成 0.2% 的溶液(pH 6)备用。硫代巴比妥酸, 上海试剂二厂生产; N-乙酰神经氨酸系美国 Sigma 公司产品; ATP, 上海生化研究所生产。

谷草转氨酶(GOT), 丙二醛(MDA), 游离脂肪酸(FFA)含量测定 大鼠, 体重 $239 \pm \text{SD } 19 \text{ g}$, 戊巴比妥纳 $35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ iv 麻醉, 人工呼吸, 分别 iv 呋喃二氢吡啶 I $10 \text{ mg} \cdot$

Received 1990 May 25

Accepted 1991 Jan 15

kg⁻¹ 或等容积 0.2% 吐温生理盐水 (溶剂对照), 5 min 后, 闭塞大鼠左冠状动脉前降支 1 h, 再灌注 30 min, 肝素 5 mg · kg⁻¹ iv 抗凝, 心脏取血 3 ml, 3000 × g 离心 3 min 分离血浆, 用 Mustistat-III 型全自动生化分析仪 (美国), 测定 GOT 活性, GOT 试剂盒系美国 Instrumentation Laboratory 产品; 用硫代巴比妥酸法 (荧光法) 测定血浆 MDA 的含量; 用上海医疗仪器厂生产的三导心电图、血压图机监测心电图; 仿文献 (3) 测定血清 FFA 含量。

红细胞膜的制备⁽⁴⁾ 戊巴比妥钠 35 mg · kg⁻¹ iv 麻醉大鼠, 分别 iv 呋喃二氢吡啶 I 和等容积 0.2% 的吐温生理盐水, 1.5 h 后, 肝素 5 mg · kg⁻¹ iv 抗凝, 心脏取血 2 ml, 3000 × g 离心 2 min, 弃血浆层, 红细胞用 Tris-HCl 50 mmol · L⁻¹ 和 EDTA 1 mmol · L⁻¹ 等渗生理盐水 (pH 7.4) 洗 3 次, 每次 3000 × g 离心 2 min, 然后按 1:10 比例向洗净的红细胞中加入预冷的 Tris-HCl 10 mmol · L⁻¹ 缓冲液, 轻摇使其溶血, 9 000 × g 离心 20 min, 弃掉含血红蛋白的上清液, 再用 Tris-HCl 10 mmol · L⁻¹ 洗 3 次, 即可得到乳白色的红细胞膜。用 Tris-HCl 50 mmol · L⁻¹ 缓冲液悬浮在塑料管中, -20℃ 保存。

Na, K-ATP 酶活性测定⁽⁴⁾ ATP 酶可使 ATP 分解为 ADP 和无机磷, 故通过反应终了时产生无机磷的多少, 反映 ATP 酶的活性。反应液总体积 200 μl, Na, K, Mg-ATP 酶保温系统含 (mmol · L⁻¹): Tris-HCl 缓冲液 50, NaCl 10, KCl 20, MgCl₂ 5, ATP 0.5 及 80 μl 红细胞膜悬液。Mg-ATP 酶保温系统含 (mmol · L⁻¹): Tris-HCl 缓冲液 50, MgCl₂ 5, ATP 0.5, ouabain 0.1 和 80 μl 红细胞膜悬液, 另设无酶活性对照组。反应从加入 ATP 开始, 37℃ 水浴保温 10 min 后, 用三氯醋酸终止反应, 按文献方法测磷⁽⁵⁾和膜蛋白⁽⁶⁾。Na, K, Mg-ATP 酶活性减去 Mg-ATP 酶活性为

Na, K-ATP 酶活性, 单位以 (μmol P_i) · (mg protein · h)⁻¹ 表示。

Ca-ATP 酶活性测定 基本方法同 Na, K-ATP 酶, 反应液总体积 200 μl, Ca-ATP 酶保温系统含 (mmol · L⁻¹): Tris-HCl 缓冲液 50, CaCl₂ 10, ouabain 0.1, ATP 0.13 及红细胞膜悬液 80 μl, 另设无酶活性对照组。

红细胞膜 N-乙酰神经氨酸 (NANA) 含量的测定 取 200 μl 红细胞膜悬液加 125 μl H₂SO₄ 25 mmol · L⁻¹, 混匀, 盖塞, 置沸水中加热 1 min, 冰水冷却后, 加 125 μl 过碘酸钾, 37℃ 10 min, 再立即加入 200 μl 亚砷酸钠 25 mmol · L⁻¹, 1 ml 硫代巴比妥酸 100 mmol · L⁻¹ 摇匀, 盖塞置沸水中加热 8 min 后, 冰水冷却; 再加入 1.5 ml 乙二醇独甲醚摇匀, 4000 × g 离心 20 min, 取上清, 用 72 型分光光度计比色, 波长为 549 nm。

RESULTS

对 GOT 释放量的影响 对照组大鼠心肌缺血 1 h, 再灌注 30 min, GOT 释放量明显升高 ($n=6$, $P<0.01$, Tab 1); 呋喃二氢吡啶 I 10 mg · kg⁻¹ iv 使 GOT 释放量明显减少 (Tab 1), 提示该药对大鼠缺血再灌注心肌有明显的保护作用。

Tab 1. Effects of furyl-dihydropyridines I (FDP I) on glutamic oxalacetic transaminase (GOT), non-esterified fatty acid (FFA), malondialdehyde (MDA) contents in plasma after acute myocardial ischemic and reperfusion (AMIR) in rats. $n=6$, $\bar{x} \pm SD$. *** $P<0.01$.

Groups	GOT (IU · L ⁻¹)	FFA (mmol · L ⁻¹)	MDA (nmol · L ⁻¹)
Control	89 ± 22	0.74 ± 0.19	0.71 ± 0.12
AMIR	806 ± 171***	1.42 ± 0.23***	1.14 ± 0.18***
FDPI	201 ± 70***	0.96 ± 0.16***	0.78 ± 0.08***

对 MDA、FFA 含量的影响 溶剂对照组大鼠心肌缺血再灌注时, 血清 FFA、MDA

含量与对照组相比明显升高($n=6$, $P<0.01$, Tab 1); 呋喃二氢吡啶 I $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 可使 FFA、MDA 含量明显下降($n=6$, $P<0.01$, Tab 1)提示该药能抗大鼠心肌缺血的脂质过氧化作用。

预防缺血再灌注性心律失常 溶剂对照组大鼠冠脉闭塞后, ECG 之 S-T-T 迅速抬高, 室早发生率 $5/6$, 室速 $1/6$, 再灌注后, 出现频发早搏, 二联、三联律; 室早、室速、室颤发生率分别为 $6/6$, $5/6$ 和 $2/6$; iv 呋喃二氢吡啶 I $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 后, 再闭塞冠状动脉, 心律失常的发生率则为 $0/6$, 用直接机率法求出 P 值分别为 0.005 和 0.020 (与对照组比较, 室早、室速分别 $P<0.01$ 和 0.05 , $n=6$), 说明该药能预防缺血、再灌注性心律失常的发生。

对红细胞膜 ATP 酶活性的影响 呋喃二氢吡啶 I $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 使麻醉大鼠 Na, K-ATP 酶活性升高($n=6$, $P<0.05$, Tab 2), Ca-ATP 酶活性下降($n=6$, $P<0.05$, Tab 2)。

Tab 2. Effects of furyl-dihydropyridines I (FDP I) on Na, K-ATPase, Ca-ATPase activity and N-acetylneuraminic acid (NANA) contents of erythrocyte membrane in rats. $n=6$, $\bar{x} \pm \text{SD}$, ** $P<0.05$.

Groups	Na, K-ATPase ($\mu\text{mol} \cdot \text{P}_i$) $\cdot (\text{mg} \cdot \text{h})^{-1}$	Ca-ATPase ($\mu\text{mol} \cdot \text{P}_i$) $\cdot (\text{mg} \cdot \text{h})^{-1}$	NANA $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$
Control	0.21 ± 0.08	0.87 ± 0.16	47.5 ± 4.7
FDPI	$0.36 \pm 0.12^{**}$	$0.65 \pm 0.12^{**}$	$56.2 \pm 5.9^{**}$

对红细胞膜 NANA 含量的影响 呋喃二氢吡啶 I $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 能使大鼠红细胞膜 NANA 含量升高($n=6$, $P<0.05$, Tab 2)。

DISCUSSION

红细胞取材方便, 又无细胞器等膜结构, 是观察体内细胞膜钙泵活性变化的较好材

料⁽⁷⁾。呋喃二氢吡啶 I 能使红细胞膜 Na, K-ATP 酶活性升高, Ca-ATP 酶活性下降, 与其它钙通道阻滞剂对心肌细胞膜 ATP 酶活性影响的结果相一致⁽⁸⁾。可能与人、大白鼠等动物心肌细胞与红细胞膜 ATP 酶结构、功能相似有关⁽⁹⁾。

缺血心肌酶的释放量是其损害程度的重要标志⁽¹⁰⁾。呋喃二氢吡啶 I 减少缺血复灌心肌 GOT 的释放量, 预防心律失常的发生, 可能是该药降低了缺血心肌 FFA、MDA 的含量, 减轻了心肌细胞膜的脂质过氧化及 FFA 聚集对细胞膜结构的破坏^(11,12); 使心肌细胞膜 Na, K-ATP 酶、Ca-ATP 酶活性维持在正常水平, 保护了心肌功能。

红细胞膜 NANA 含量下降可使血液凝固性升高或细胞膜结构缺损⁽¹³⁾。呋喃二氢吡啶 I 能防止大鼠红细胞膜 NANA 的丢失, 保护红细胞膜的结构, 而使血液粘度降低, 缺血心肌的血供改善。此作用也可能是保护心肌的原因之一。

ACKNOWLEDGMENT 王 蓓同志协助游离脂肪酸的测定。

REFERENCES

- 1 Liu DQ, Zhao DH, Sheng BH. Antiarrhythmic effects of furyl-dihydropyridines I. *J Fourth Milit Med Univ* 1990; 11 (Suppl): S12
- 2 Liu DQ, Zhao DH, Sheng BH. Protective effects of furyl-dihydropyridines I on ischemic myocardium in isolated rabbit hearts. *Acta Pharm Sin* 1991; 26: (in press)
- 3 上海市医学化验所. 血清中游离脂肪酸的测定. 临床生化检验, 上册. 第一版. 上海: 上海科技出版社, 1979: 168-172
- 4 Dong W, Shen DG. Studies of Na, K-ATPase in human erythrocyte membranes *Prog Biochem Biophys* 1983; 10 (3): 31
- 5 Muszbek L, Szabó T, Fésős L. A highly sensitive method for the measurement of ATPase activity. *Anal Biochem* 1977; 77: 286
- 6 Read SM, Northcote DH. Minimization of variation in the response to different proteins of the

- coomassie blue G dye-binding assay for protein. *Anal Biochem* 1981; 116: 53
- 7 Yang Y, Shen WT, Liao LT, Wu Z. Changes of RBC Ca^{2+} -ATPase activity and red-cell calcium concentration during dialysis in patients with uremia. *Natl Med J China* 1990; 70: 23
 - 8 Zhang HL, Fu SX, Li YS. Protective effects of *m*-nisoldipine and nisoldipine on myocardial damage in working rabbit hearts after ischemia-reperfusion. *Acta Pharmacol Sin* 1989; 10: 49
 - 9 Song LX, Wang RX. The structure and function of the ion motive ATPases. *Prog Physiol Sci* 1989; 20: 334
 - 10 Lewis BS, Ganz W, Laramie P, et al. Usefulness of a rapid initial increase in plasma creatine kinase activity as a marker of reperfusion during thrombolytic therapy for acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1988; 62: 20
 - 11 Hess ML, Manson NH. Molecular oxygen: friend and foe. The role of the oxygen free radical system in the calcium paradox, the oxygen paradox and ischemia/reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 1984; 16: 969
 - 12 Thomas G, Groß R, Schramm M. Calcium channel modulation: ability to inhibit or promote calcium influx resides in the same dihydropyridine molecule. *J Cardiovasc Pharmacol* 1984; 6: 1170
 - 13 Chien BS, Cooper GW, Jan KM, et al. N-acetylneuraminic acid deficiency in erythrocyte membranes: biophysical and biochemical correlates. *Blood* 1974; 43: 445

中国药理学报 *Acta Pharmacologica Sinica* 1991 May; 12 (3): 256-260

人参二醇与三醇组皂甙对正常与黄嘌呤—黄嘌呤氧化酶致损的培养心肌细胞动作电位的影响

钟国赣¹, 江 岩¹, 王雪清¹, 岳 刚 (白求恩医科大学生理教研室, 长春 130021, 中国)

Effects of panaxadiol and panaxatriol saponins on action potentials of normal and xanthine-xanthine oxidase damaged cultured myocardial cells

ZHONG Guo-Gan, JIANG Yan¹, WANG Xue-Qing¹, YUE Gang (Department of Physiology, Norman Bethune University of Medical Sciences, Changchun 130021, China)

ABSTRACT Wistar rat myocardial cells were cultured. PDS 20–80 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$; PTS 1.25–20 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ dose-dependently decreased their action potential parameters, indicating the possibility of being concerned in the blockage of Ca channel. After the free radical damage was induced by xanthine 0.42 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ — xanthine oxidase 5.3 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (X-XO). All the action potential parameters of the

cardiac cells decreased without exception. Both PDA and PTS antagonized the electrical appearance of membrane damage induced by X-XO, suggesting that both PDS and PTS protect the myocardial cells from oxidative damage.

KEY WORDS ginseng; saponins; myocardium; cultured cells; action potentials; xanthines; xanthine oxidase

提要 培养 Wistar 大鼠乳鼠的心肌细胞。PDS 20–80 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$; PTS 1.25–20 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 使其动作电位各参数呈剂量依赖性减小, 提示可能与钙通道阻滞有关。用黄嘌呤 0.42 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ —黄嘌呤氧化酶 5.3 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (X-XO) 诱发自由基损伤后, 心肌细胞动作电位各参数一致减小, PDS, PTS 均能抵消 X-XO 所致的膜损伤性电位表现, 提示 PDS, PTS 对心肌细胞的氧化损伤均具有保护作用。

Received 1990 Apr 27 Accepted 1991 Mar 14
¹ Department of Pathophysiology, Hebei Academy of Medical Sciences, Shijiazhuang 050021, China

关键词 人参; 皂甙类; 心肌; 培养的细胞; 动作电位; 黄嘌呤类; 黄嘌呤氧化酶