

# 沙棘总黄酮对培养大鼠心肌细胞和心室肌内 cAMP 及腺苷酸环化酶的影响

刘凤鸣、李增晔、石 山 (包头医学院心血管研究室, 包头 014010)

**提要** 沙棘总黄酮(TFH)可明显对抗培养心肌细胞团自发性搏动节律失常, 并抑制  $\text{CaCl}_2$ 、异丙肾上腺素对培养心肌细胞团的正性频率效应, 使量-效曲线最大反应降低。TFH 还可明显抑制大鼠心室肌组织腺苷酸环化酶(AC)活性, 显著降低离体大鼠心脏缺血和未缺血组织 cAMP 水平, 表明 TFH 可能具有钙拮抗作用, 这可能与抑制 AC、降低 cAMP 水平有关。

**关键词** 沙棘; 黄酮类; 抗心律失常药; 氯化钙; 腺苷环一磷酸; 腺苷酸环化酶; 异丙肾上腺素; 培养的心肌细胞

沙棘总黄酮(total flavones of *Hippophae rhamnoides* L, TFH)系从胡颓子科植物沙棘(*Hippophae rhamnoides* L)果实中提取, 能显著对抗在位和离体心脏的心律失常, 其作用机理可能与钙拮抗和  $\beta$  受体阻滞有关(待发表材料)。上述作用又与环核苷酸系统密切相联<sup>(1)</sup>。因此, 本文观察了 TFH 对培养大鼠心肌细胞团自发性搏动节律失常,  $\text{CaCl}_2$  和异丙肾上腺素量-效曲线, 离体大鼠心室肌 cAMP 水平及 AC 活性的影响, 以探讨 TFH 抗心律失常作用的可能机理。

## 材 料 与 方 法

**药品** TFH 由内蒙古中蒙医研究所药物室提供,  $\text{K}^+$  和  $\text{Mg}^{2+}$  含量分别为 0.95 和 0.11 ppm, pH 6.6。普萘洛尔(propranolol, Pro)及盐酸异丙肾上腺素(isoprenaline, Iso)均为北京制药厂产品。维拉帕米(verapamil, Ver)为天津和平制药厂出品。ATP 和 cAMP 药盒分别由中国科学院上海生化所和中国医学科学院基础所提供。

**心肌细胞培养** 将出生后 1-4 d 大鼠乳鼠心室剪碎, 用 0.06% 胰蛋白酶(Difco, 1:250)液分次消化, 用含 15% 小牛血清的 MEM Eagle 培养基制成  $2 \times 10^6$  cells/ml 心肌细胞悬液, 接种于培养瓶中, 37°C 闭瓶静置培养 2-3 d 后进行实验。每次实验均先置培养瓶于 37°C 的倒置显微镜下, 稳定 15 min, 用微量注射器将药物加入培养液中, 并用吸管轻轻吸吹 3 次, 使药物混匀。药前用 Eagle 培养液对照。

**$\text{CaCl}_2$  量-效曲线** 取搏动频率在 100-130 bpm 且节律规则的细胞团, 于加药 5 min 后, 每隔 3 min 加递增量的  $\text{CaCl}_2$ , 记录 1 min 末的搏动频率, 直至最大反应, 绘制量-效曲线。

**Iso 量-效曲线** 取对 Iso 反应良好且搏动节律规则的细胞团, 清洗、换液、稳定 10 h 后, 加入生理盐水(NS), 5 min 后, 每隔 3 min 加入递增量的 Iso, 记录 1 min 末的搏动频率直至最大反应。选择量-效反应良好的细胞团, 清洗、换液、稳定 3-6 h 后, 以同法于加入试药 5 min 后, 加入递增量的 Iso 直至最大反应, 以 NS 组最大反应的搏动频率与正常值之差作为 100%, 计算各浓度 Iso 引起反应的搏动频率与其正常值差的%, 绘制 Iso 累积量-效曲线。

**离体大鼠心脏 cAMP 含量测定** 大鼠 26 只, 体重  $286 \pm \text{SD } 24$  g,  $\text{♀}$   $\text{♂}$  兼用, 随机分为对照组和 TFH 组, ip 戊巴比妥钠 45 mg/kg 麻醉, iv 肝素 5 mg/kg。制备 Langendorff 心脏, 以纯  $\text{O}_2$  平衡的 Krebs-Henseleits 液灌流, 温度  $37.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ , pH  $7.4 \pm 0.5$ , 灌流压 68.6-78.4 kPa。于冠脉左前降支穿线, 稳定 15 min, 给药或单纯灌流 5 min 后, 结扎左前降支, 再

灌流 15 min, 从主动脉导管注入 0.5% patent blue V 区分缺血和未缺血区, 迅速将心脏冰浴并冷冻后, 采用竞争性蛋白结合法, 分别测定缺血和未缺血心肌组织的 cAMP 含量, 本实验 [ $^3\text{H}$ ]cAMP 的回收率为  $82 \pm 4\%$ 。

**AC 活性测定** 用粗酶测定法<sup>(2)</sup> 并加以改进。取大鼠心室肌组织, 在 Tris-HCl 缓冲液 50 mmol/L 中冰浴匀浆, 制成粗酶制剂 100 mg 湿重/ml, 反应液组成 (mmol/L): Tris 25,  $\text{MgCl}_2$  4, ATP 2, 茶碱 5, EGTA 0.5, pH 为 7.5, 测定管粗酶浓度为 6 mg 湿重/ml。对照管先煮沸使酶灭活后再进行温育, 用竞争性蛋白结合法测定 cAMP 含量, 最后用反应管的 cAMP 量减去灭活管的 cAMP 量为 AC 催化所生成的 cAMP 量, 酶活力以 pmol cAMP/(mg 湿重 · 5 min) 表示。

## 结 果

### 对心肌细胞团自发性搏动节律失常的影响

取搏动节律不齐的细胞团, 分为单纯节律不齐型(单纯型)和搏动节律不齐伴有纤颤或扑动型(纤扑型)。TFH 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (终浓度) 对自发性搏动节律失常具有明显的对抗作用。单纯型 12 处中有 10 处于给药后  $1.3 \pm 1.6$  min 转变为规则节律, 持续时间为  $18 \pm 10$  min, 转规率 83%, 纤扑型 7 处中有 4 处于给药后  $1.7 \pm 1.3$

min 转变为规则节律, 持续时间  $13 \pm 8$  min, 转规率 57%。对照组 8 处给等容 NS 后 30 min 内, 自发性节律失常未见明显变化(图 1)。

**对  $\text{CaCl}_2$  量-效反应的影响** 培养 2-3 d 心肌细胞团, 给 NS 后当  $\text{CaCl}_2$  累积剂量为 0.9-5.4 mmol/L, 呈良好的量-效反应关系, 搏动频率从  $120 \pm 5$  增至  $183 \pm 20$  bpm, 平均增加 52.5%。与 NS 组相比, TFH 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  可明显抑制  $\text{CaCl}_2$  正性频率效应, 最大反应频率为  $142 \pm 9$  bpm ( $p < 0.05$ ), 平均降低 22.4%; Ver 0.05  $\mu\text{mol}/\text{L}$  也可产生明显抑制作用, 最大反应频率为  $148 \pm 17$  bpm ( $p < 0.01$ ), 平均降低 19.1%(图 2); TFH 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  抑制作用更明显, 最大反应频率为  $111 \pm 19$  bpm ( $p < 0.01$ ), 平均降低 39.4%。

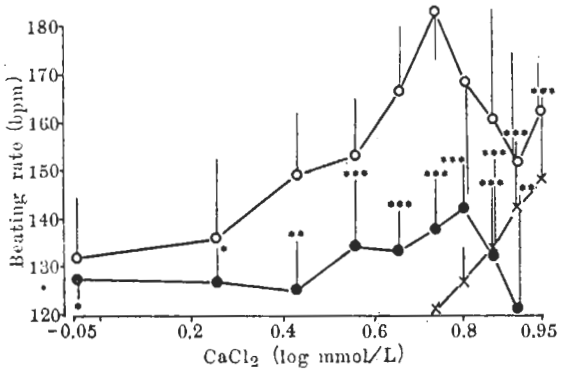


Fig 2. Positive chronotropic effects of  $\text{CaCl}_2$  in the cultured rat heart cells. (○) NS 10  $\mu\text{l}/\text{ml}$ , (●) TFH 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , (×) verapamil 0.05  $\mu\text{mol}/\text{L}$ . n=9,  $\bar{x} \pm \text{SD}$ . \* $p > 0.05$ , \*\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.01$

**对 Iso 量-效反应的影响** 培养心肌细胞团对 Iso 具有良好的反应性, 给 NS 后随 Iso 剂量增加, 搏动频率从  $90 \pm 21$  增至  $150 \pm 13$  bpm, 平均增加 66.7%。Pro 1.69  $\mu\text{mol}/\text{L}$  可明显抑制 Iso 正性频率效应, 最大反应不降低, 给药前后的最大反应频率为  $146 \pm 17$  和  $145 \pm 13$  bpm。TFH 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  也明显抑制 Iso 正性频率效应, 最大反应频率由  $153 \pm 9$  降至  $138 \pm 6$  bpm, 平均降低 9.8%(图 3),

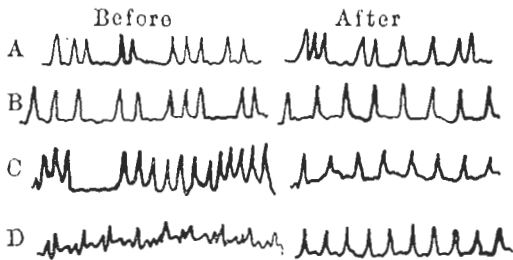


Fig 1. Effects of total flavones of *Hippophae rhamnoides* L (TFH) 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  on the spontaneous arrhythmias in the cultured rat heart cells. A) normal saline (NS) 10  $\mu\text{l}/\text{ml}$ , B) TFH on asynchronous beating, C) TFH on asynchronous beating with flutters, D) TFH on asynchronous beating with fibrillation, n=7-9 cell clusters

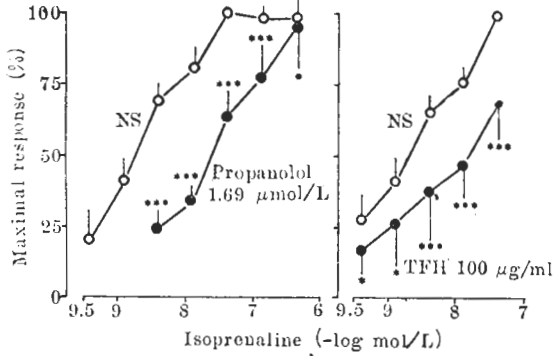


Fig 3. Positive chronotropic effects of isoprenaline in the cultured rat heart cells.  $n=6$ ,  $\bar{x} \pm SD$ . \* $p > 0.05$ , \*\*\* $p < 0.01$  vs NS 10  $\mu\text{l/ml}$ .

### 对离体大鼠心室肌 cAMP 水平的影响

结扎冠脉使缺血心肌 cAMP 水平由未缺血心肌的  $0.36 \pm 0.09$  增至  $0.45 \pm 0.10$  pmol/mg 湿重(下同)( $p < 0.05$ ), 平均提高 25%。TFH 100 mg/L 使缺血心肌 cAMP 水平从  $0.45 \pm 0.10$  降至  $0.28 \pm 0.04$  ( $p < 0.01$ ), 平均降低 37.8%, 同时使未缺血心肌 cAMP 水平从  $0.36 \pm 0.09$  降至  $0.28 \pm 0.07$  ( $p < 0.05$ ), 平均降低 22.2%, 使缺血与未缺血心肌 cAMP 比值从 1.25 降至 1.00。氨茶碱  $2.2 \mu\text{mol/L}$  使未缺血心肌 cAMP 水平从  $0.36 \pm 0.09$  提高至  $1.12 \pm 0.11$ 。

**对大鼠心室肌 AC 活性的影响** 当粗酶浓度为 2.5-10 mg 湿重/反应管时, 5 min 内生成的 cAMP 量基本上呈线性关系, 相关系数为 0.992。AC 激活剂氟化钠 24 mmol/L 使酶活力从  $7.0 \pm 0.7$  增至  $15.5 \pm 0.8$  ( $p < 0.01$ ), 平均增加 119.9%。TFH 100 和 400  $\mu\text{g/ml}$  使 AC 活力从  $7.0 \pm 0.7$  分别降至  $6.0 \pm 0.6$  ( $p < 0.01$ ) 和  $5.2 \pm 1.0$  ( $p < 0.01$ ), 平均降低 14.3% 和 26.6%。

### 讨 论

本文发现 TFH 对培养大鼠心肌细胞团自发性搏动节律失常具有明显的对抗作用, 与苦参总黄酮的结果<sup>(3)</sup>一致。TFH 能明显抑制  $\text{CaCl}_2$  的正性频率效应, 表明可能具有钙拮抗作用, 其抗心律失常作用可能与此有关。此外, TFH

对 Iso 量-效曲线的作用与 Ver 在离体兔右心房 Iso 量-效曲线<sup>(4)</sup>相似, 但与 Pro 不同, 这是否与 TFH 拮抗  $\text{Ca}^{2+}$  内流和  $\beta$  受体阻滞作用有关, 值得研究。

环核苷酸系统与缺血性心律失常的产生密切相关, 而 cAMP 又是影响  $\text{Ca}^{2+}$  功能的因素之一, 心肌 cAMP 水平升高可增加细胞膜钙通道开放数目, 促进  $\text{Ca}^{2+}$  内流<sup>(1,5)</sup>。本文证明 TFH 能抑制 AC, 使 cAMP 水平降低, 可能是其钙拮抗和抗心律失常作用的生化基础之一。但这一作用与已报道的某些黄酮类化合物抑制磷酸二酯酶(PDE)、使 cAMP 水平增加<sup>(6,7)</sup>不一致。黄酮类化合物是多种酶的抑制剂。不同的黄酮类化合物对 cAMP-PDE 抑制作用的强度差异很大, 甚至可达几十倍<sup>(8)</sup>。因此, 本文所见 TFH 降低 cAMP 水平的作用, 可能与其对 AC 的抑制作用大于 PDE 有关。

**致谢** 内蒙古中蒙医研究所顾维彰主任药师、周长风同志提供沙棘总黄酮。

### 参 考 文 献

- 1 Sperclakis N. Cyclic AMP and phosphorylation in regulation of  $\text{Ca}^{2+}$  influx into myocardial cells and blockade by calcium antagonistic drugs. *Am Heart J* 1984; 107 : 347
- 2 凌义和、俞伟娟、胥彬. 羟基喜树碱对小鼠肝癌细胞腺苷酸环化酶活力的影响. *中国药理学报* 1982; 3 : 264
- 3 王家珍、孙福立、韩慧婉、张宝恒、袁韶华、马丽. 苦参总黄酮对大鼠培养心肌细胞搏动节律失常的作用. 同上 1983; 4 : 32
- 4 方达超、姚伟星、夏国瑾、江明性. 粉防己碱对异丙肾上腺素及氯化钙在离体兔心房所致正性频率作用的影响. 同上 1982; 3 : 233
- 5 Rabkin SW, Ohmae M, Klass DJ. Antiarrhythmic effects of cyclic guanosine 3':5'-monophosphate and sodium nitroprusside on barium chloride arrhythmias in rabbits. *Arch Int Pharmacodyn* 1982; 257 : 225
- 6 贺师鹏、魏莫愁、李荣芷, 等. 某些中药的黄酮类化合物对磷酸二酯酶抑制作用的研究. *北京医学院学报* 1982; 14 : 253
- 7 王福云、余腊梅、彭淑珍. 黄酮类化合物对心肌环核苷酸含量的影响. *核技术* 1984; (2) : 71

## Effects of total flavones of *Hippophae rhamnoides* L on cultured rat heart cells and on cAMP level and adenylate cyclase in myocardium

LIU Feng-Ming, LI Zeng-Xi, SHI Shan

(Laboratory of Cardiovascular Research, Baotou Medical College, Baotou 014010)

**ABSTRACT** When total flavones of *Hippophae rhamnoides* L (TFH) 100  $\mu\text{g/ml}$  were added to the medium, the spontaneous arrhythmias of the cell clusters disappeared in 14/19 experiments. TFH 100  $\mu\text{g/ml}$  significantly counteracted the positive chronotropic effects of  $\text{CaCl}_2$  and isoproterenol, with the maximal response being markedly decreased in the cultured rat heart cells. TFH 100  $\mu\text{g/ml}$  reduced the level of cAMP in both ischemic and nonischemic myocardium in the isolated perfused rat heart. TFH 100 and 400  $\mu\text{g/ml}$  inhibited adenylate cyclase of the rat ventricular

myocardium. These results suggest that the antiarrhythmic effects of TFH are exerted on the heart cells directly, and that the calcium antagonizing action and inhibition of adenylate cyclase with a reduction in the cAMP level may be an important mechanism related to the antiarrhythmic effects.

**KEY WORDS** *Hippophae rhamnoides* L; flavones; anti-arrhythmia agents; calcium chloride; adenosine cyclic monophosphate; adenylyl cyclase; isoproterenol; cultured myocardial cells