

小是钙通道阻滞的可能性。至于加 Adr 或增高细胞外钙浓度时 AP 的波宽变窄,可能是钙内流增多使  $[Ca^{2+}]_i$  增高,增高的  $[Ca^{2+}]_i$  继之又使钙通道失活<sup>[9]</sup>、使钙依赖性钾通道激活<sup>[10]</sup>的结果。

PTS 组中各单体成对 AP 的平均抑制程度比 PDS 组者大,证明 PTS 比 PDS 组作用强<sup>[4]</sup>,是其各自的单体成分对 AP 抑制程度不同的综合结果。

REFERENCES

1 Xiong ZG, Chen JX, Sun JJ. Effects of *panax notoginseng* saponins on cardiac action potentials and slow inward current. *Acta Pharmacol Sin* 1989; 10 : 122-5.

2 Li HT, Shi L. Effects of total saponins of *panax notoginseng* on  $Ca^{2+}$  influx into myocardial cells. *Acta Pharmacol Sin* 1990; 11 : 213-7.

3 Xiong ZG, Sun JJ. Effects of *panax notoginseng* saponin  $Rb_1$  and  $Rg_1$  on myocardial action potential and slow inward current. *Acta Pharmacol Sin* 1989; 10 : 520-2.

4 Jiang Y, Zhong GG, Shao CJ, Yue G.  $Ca^{2+}$  channel blockade effect of panaxadiol saponins and panaxatriol saponins on cultured cardiac cells. *Chin J Chin Mat Med* 1992; 17 : 172-3.

5 Zhong GG, Li YY, Jiang Y, An G, Shao CJ. The blockade action of  $Rb_1$  on  $Ca^{2+}$  channel and a single channel analysis on its mechanism. *J Norman Bethune Univ Med Sci* 1992; 18 : 129-31.

6 Jiang Y, Zhong GG, Chen L, Ma XY. Influences of ginsenosides  $Rb_1$ ,  $Rb_2$ , and  $Rb_3$  on electric and contractile activities of normal and damaged cultured myocardiocytes. *Acta Pharmacol Sin* 1992; 13 : 403-6.

7 Downar E, Janse MT, Durrer D. The effect of "ischemic" blood on transmembrane potentials of normal porcine ventricular myocardium. *Circulation* 1977; 55 : 455-62.

8 Payet MD, Schanne OF, Ruiz-Ceretti E. Competition for slow channel of  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ , Verapamil, and D-600 in rat Ventricular muscle? *J Mol cell cardiol* 1980; 12 : 635-8.

9 Hagiwara S. Calcium channel. *Annu Rev Neurosci* 1981; 4 : 69-125.

10 McDonald TF. The slow inward calcium current in the heart. *Annu Rev Physiol* 1982; 44 : 425-34.

青藤碱对大鼠离体心脏再灌注损伤的预防作用

谢守霞, 金其泉 (蚌埠医学院药理教研室, 蚌埠233003, 中国)

Prevention of sinomenine on isolated rat myocardial reperfusion injury

XIE Shou-Xia, JIN Qi-Quan (Department of Pharmacology, Bengbu Medical College, Bengbu 233003, China)

ABSTRACT Acute myocardial ischemia and reperfusion injury of rats were produced by ligating the left coronary artery for 15 min and reopening. The myocardial calcium contents were increased from  $3.53 \pm 0.58 \mu\text{mol/g}$  dry wt in sham operation group to  $6.02$

$\pm 1.19 \mu\text{mol/g}$  dry wt with reducing SOD/MDA ratio and showing ventricular extrasystole (VE), ventricular tachycardia (VT), and ventricular fibrillation (VF). Sinomenine (Sin) and verapamil (Ver) infusion 15 min before ischemia attenuated the elevated calcium contents to the level of the sham operation group, increased SOD/MDA ratio, and produced antagonistic effects on VE, VT, VF. These improvements indicated that Sin, similar to Ver, prevented myocardial injury by lowering intracellular  $Ca^{2+}$  accumulation.

KEY WORDS sinomenine; verapamil; myocardial reperfusion injury; free radicals

Received 1990-10-13

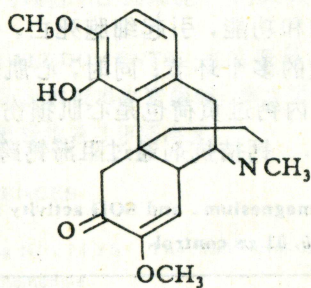
Accepted 1993-04-07



**摘要** 结扎离体鼠心左冠状动脉造成急性心肌缺血, 15 min 后重新开放进行再灌注, 其心肌钙含量由伪结扎组  $3.53 \pm 0.58$  增加到  $6.02 \pm 1.19 \mu\text{mol/g dry wt}$ , 并伴有 SOD/MDA 降低, VE, VT, VF 发生. 缺血前 15 min 灌注青藤碱(Sin)和维拉帕米(Ver)可使心肌钙含量降至伪结扎组水平, SOD/MDA 升高, 并对抗 VE, VT, VF. 推测 Sin 对再灌注损伤的预防作用与 Ver 相似, 可能是通过降低细胞内钙聚集.

**关键词** 青藤碱; 维拉帕米; 心肌再灌注损伤; 自由基

青藤碱(sinomenine, Sin)是我国从青藤(*Sinomenium acutum* (Thunb) Rehd et Wils)根茎中分离提纯的一种生物碱, 具有降压<sup>[1]</sup>, 抗实验性心律失常<sup>[2]</sup>, 阻断  $\alpha$  受体<sup>[3]</sup> 及阻钙内流作用<sup>[4]</sup>, 这些特性均相似于钙拮抗剂维拉帕米(verapamil, Ver), 但 Sin 对心肌再灌注损伤方面的研究未见报道. 本文观察 Sin 对离体大鼠心肌再灌注损伤的预防作用和对心率, 自由基, “细胞钙, 镁”的影响, 并与 Ver 比较, 以探讨其作用机制.



Sinomenine

## MATERIALS AND METHODS

**药品** Sin 由北京医科大学植物化学教研室提供. Ver (天津和平制药厂, 批号 811203). 硫代巴比妥酸 (上海试剂二厂, 批号 881229). 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD, Sigma, s-8254). 蔗糖经离子交换树脂去钙, 其他药品均为 AR 级以上.

**实验标本制备及指标测定** Wistar 大鼠 92 只 (购于中国科学院上海实验动物中心, 体重  $271 \pm 26$  g),

制备 Langendorff's<sup>[5]</sup> 心脏, 通入 95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub> 的 Krebs-Henseleit (K-H) 液持续灌注, pH 7.4, 37°C 灌注压 8.8 kPa, 流量 6-8 ml·min<sup>-1</sup>. 将两电极分别置于左心室壁和主动脉套管上, 记录心表面心电图. 在左心耳根部下方约 2 mm 处进针, 用 5/0 丝线穿过心肌表面, 从肺动脉圆锥旁出针. 稳定 15 min 后结扎左冠状动脉, 15 min 后剪断结扎线进行再灌注 10 min.

实验随机分为 6 组. 伪结扎组 (在左冠状动脉主干下穿线不结扎, K-H 液持续灌注 40 min); 对照组及 4 个给药组是将等容量的 K-H 液或含不同浓度药物的 K-H 液持续灌注结扎再灌注心脏直至实验结束. 各药浓度 Sin 分别为 27, 82, 270  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; Ver 0.1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

实验结束后, 取下心脏, 用稀释的碳素墨水逆行灌注, 再灌注区无色, 正常区出现黑色. 取再灌注区心尖部组织用双蒸水制备 10% 匀浆, 100×g 离心 10 min, 取 0.2 ml 上清液按硫代巴比妥酸法<sup>[6]</sup> 测定丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 含量, 剩余部分上清液用联大茴香胺法<sup>[7]</sup> 测定 SOD 活性.

将测定“细胞钙, 镁”的心脏用 10 ml 4°C 的无钙冲洗液 (含蔗糖 0.35 mol·L<sup>-1</sup> 和组氨酸 5 mmol·L<sup>-1</sup>, pH 7.4) 冲洗心脏冠脉 1 min<sup>[8]</sup>. 剪下再灌注区全层心肌, 干燥至恒重, 用硝酸和过氯酸完全溶解心肌组织至无色液体, 于 PE-703 型火焰原子吸收分光光度计, 以 424.0 nm 波长测定“细胞钙”, 285.2 nm 波长测定“细胞镁”含量.

## RESULTS

**Sin 对再灌注心律失常的影响** 对照组大鼠均发生室早 (VE), 室速 (VT), 室颤 (VF), 与文献<sup>[9]</sup> 一致. Sin 和 Ver 于缺血前 15 min 灌注能明显降低再灌注心律失常发生率. 当 Sin 浓度增至 270  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  可完全拮抗 VE, VT, VF 产生. Ver 0.1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  与 Sin 82  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  均缩短 VF 持续时间和延长 VF 潜伏期. Sin 27  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时对此无影响 (Tab 1).

**Sin 对缺血再灌注心肌自由基的影响** 对照组 SOD 活性显著低于伪结扎组, MDA 含量则显著高于伪结扎组, SOD/MDA 为 0.65, 约为伪结扎组 (1.28) 的 1/2. Sin 组 SOD 活性高



**Tab 1. Effects on sinomenine and verapamil on ischemia-reperfusion induced arrhythmias in isolated rat hearts.**  $\bar{x} \pm s$ . <sup>a</sup> $P > 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.05$ , <sup>c</sup> $P < 0.01$  vs control.

| Drug, $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ | Rats | Incidence (%) of |                 |                 | Onset of VF/s        | Duration of VF/s     |
|---|------|------------------|-----------------|-----------------|----------------------|----------------------|
|   |      | VE               | VT              | VF              |                      |                      |
| Control                                   | 27   | 100              | 100             | 100             | 19±20                | 588±37               |
| Verapamil<br>0.1                          | 6    | 67 <sup>a</sup>  | 50 <sup>a</sup> | 33 <sup>c</sup> | 203±128 <sup>e</sup> | 380±113 <sup>c</sup> |
| Sinomenine                                |      |                  |                 |                 |                      |                      |
| 27  | 11   | 82 <sup>a</sup>  | 64 <sup>b</sup> | 55 <sup>b</sup> | 16±11 <sup>a</sup>   | 540±104 <sup>b</sup> |
| 82  | 9    | 56 <sup>b</sup>  | 33 <sup>c</sup> | 33 <sup>c</sup> | 88±33 <sup>c</sup>   | 447±150 <sup>c</sup> |
| 270                                       | 7    | 0 <sup>c</sup>   | 0 <sup>c</sup>  | 0 <sup>c</sup>  | —                    | —                    |

于对照组, MDA 含量低于对照组, 随着 Sin 浓度由 27, 82 增加到 270  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, SOD/MDA 分别为 0.89, 0.94, 1.14; Ver 组为 1.16. 说明 Sin 有浓度依赖性地抗缺血再灌注时心肌脂质过氧化的作用 (Tab 2).

**Sin 对心肌“细胞钙”和“细胞镁”含量的影响** 对照组心肌“细胞钙”含量由伪结扎组  $3.53 \pm 0.58$  增加到  $6.02 \pm 1.19 \mu\text{mol/g dry wt}$ , 心肌“细胞镁”含量由伪结扎组  $25.7 \pm 4.0$  下降到  $18.9 \pm 3.0 \mu\text{mol/g dry wt}$ . 三种剂量 Sin 和 Ver 可使显著增高的心肌“细胞钙”含量降至伪结扎组水平, 心肌“细胞钙”含量升高至伪结扎

组水平, 可显著降低心肌“细胞钙”聚集和“细胞镁”丢失 (Tab 2).

**Sin 对结扎再灌注期间心率的影响** 心脏稳定期间, 对照组 17 只大鼠心率变化不大, 结扎后心率显著下降, 随着结扎时间的延长, 心率进一步下降, 解除结扎后发生心律失常. 但三个 Sin 剂量组及 Ver 组在心脏稳定期间显著降低心率, 结扎后心率变化规律同对照组, 再灌注后心率进一步下降. Ver  $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  及 Sin 82,  $270 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  与对照组之间存在显著性差异 (Tab 3).

**DISCUSSION**

本实验结果表明, 当灌注液中加入 Sin 或 Ver, 可明显降低再灌注心律失常发生率, 并缩短 VF 持续时间和延长 VF 潜伏期, Sin 与 Ver 对大鼠离体心脏再灌注损伤的预防作用相似.

MDA 含量增加, SOD 活性降低间接反映了氧自由基形成; 氧自由基使膜脂质过氧化, 损伤膜结构和功能, 引起细胞死亡, 钙参与氧自由基形成的多个环节; 同时, 心肌缺血再灌注引起细胞内钙过负荷也是心肌损伤坏死的一个重要原因. 钙拮抗剂通过阻滞钙跨膜内流,

**Tab 2. Effects of Sin and Ver on contents of MDA, cell calcium, cell magnesium, and SOD activity in reperfusion rat hearts.**  $\bar{x} \pm s$ . <sup>f</sup> $P < 0.01$  vs sham operation. <sup>b</sup> $P < 0.05$ , <sup>c</sup> $P < 0.01$  vs control.

| Drug, $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ | Rats | MDA, nmol/g dry wt  | SOD, IU/mg protein     | SOD/MDA, % | Rats | Ca <sup>++</sup> ,       | Mg <sup>++</sup> ,       |
|---|------|---------------------|------------------------|------------|------|--------------------------|--------------------------|
|   |      |                     |                        |            |      | $\mu\text{mol/g dry wt}$ | $\mu\text{mol/g dry wt}$ |
| Sham operation                            | 6    | 169±16              | 2.16±0.36              | 1.28       | 12   | 3.53±0.58                | 25.7±4.0                 |
| Control                                   | 8    | 218±17 <sup>f</sup> | 1.41±0.44 <sup>f</sup> | 0.65       | 11   | 6.02±1.19 <sup>f</sup>   | 18.9±3.0 <sup>f</sup>    |
| Verapamil<br>0.1                          | 6    | 180±12 <sup>c</sup> | 2.08±0.21 <sup>c</sup> | 1.16       | 6    | 3.56±0.58 <sup>c</sup>   | 25.44±2.2 <sup>c</sup>   |
| Sinomenine                                |      |                     |                        |            |      |                          |                          |
| 27  | 6    | 204±22 <sup>b</sup> | 1.82±0.29 <sup>b</sup> | 0.89       | 11   | 3.88±0.74 <sup>c</sup>   | 23.7±4.2 <sup>b</sup>    |
| 82  | 6    | 198±17 <sup>b</sup> | 1.85±0.22 <sup>b</sup> | 0.94       | 9    | 3.78±0.43 <sup>c</sup>   | 24.1±7.5 <sup>c</sup>    |
| 270                                       | 6    | 180±12 <sup>c</sup> | 2.06±0.34 <sup>c</sup> | 1.14       | 7    | 3.62±0.67 <sup>c</sup>   | 23.8±3.6 <sup>c</sup>    |



Tab 3. Heart rates before and during coronary artery ligation and reperfusion.  $\bar{x} \pm s$ . <sup>a</sup> $P > 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.05$ , <sup>c</sup> $P < 0.01$  vs pre-ligation. <sup>d</sup> $P > 0.05$ , <sup>e</sup> $P < 0.05$ , <sup>f</sup> $P < 0.01$  vs control.

| Drug,<br>$\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ | Rats | Pre-drug               | Pre-ligation          | Heart Rate, bpm        |                         |                        |                       |                       |
|--|------|------------------------|-----------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|
|  |      |                        |                       | 5 min                  | Post-ligation<br>10 min | 15 min                 | Reperfusion<br>5 min  | 10 min                |
| Control                                      | 17   | 232 ± 25               | 229 ± 18              | 189 ± 29               | 168 ± 34                | 162 ± 34               | VF                    | VF                    |
| Verapamil<br>0.1                             | 6    | 230 ± 39 <sup>cd</sup> | 171 ± 38 <sup>e</sup> | 155 ± 36 <sup>bd</sup> | 116 ± 26 <sup>ce</sup>  | 97 ± 24 <sup>ce</sup>  | 126 ± 24 <sup>e</sup> | 121 ± 37 <sup>e</sup> |
| Sinomenine<br>27                             | 11   | 236 ± 35 <sup>cd</sup> | 197 ± 34 <sup>d</sup> | 179 ± 31 <sup>bd</sup> | 176 ± 32 <sup>bd</sup>  | 150 ± 36 <sup>cd</sup> | 131 ± 39 <sup>e</sup> | 143 ± 35 <sup>e</sup> |
| 82   | 9    | 229 ± 33 <sup>cd</sup> | 179 ± 34 <sup>e</sup> | 158 ± 34 <sup>bd</sup> | 147 ± 35 <sup>cd</sup>  | 142 ± 35 <sup>cd</sup> | 130 ± 43 <sup>e</sup> | 133 ± 44 <sup>e</sup> |
| 270  | 7    | 249 ± 38 <sup>cd</sup> | 196 ± 22 <sup>e</sup> | 154 ± 24 <sup>bd</sup> | 139 ± 22 <sup>cd</sup>  | 131 ± 29 <sup>cd</sup> | 126 ± 24 <sup>e</sup> | 121 ± 37 <sup>e</sup> |

对心肌缺血再灌注损伤产生保护作用。Sin 与 Ver 相似, 可减少缺血再灌注心肌钙聚集, 并产生抗脂质过氧化作用, 减慢心率, 减少氧耗。Sin 27  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  具有抗再灌注心律失常作用, 而减慢心率作用微弱。推测 Sin 对缺血再灌注损伤的预防作用可能主要是通过降低缺血再灌注损伤引起的心肌细胞内钙聚集。

**ACKNOWLEDGMENTS** 北京医科大学植物化学教研室陈雅研教授提供青藤碱; 南京医学院药理教研室刘天培教授指导并审阅本文。

#### REFERENCES

- 1 Wang NC, Li YS. The mechanism of hypotensive action of sinomenine. *Acta Pharm Sin* 1965; 12 : 86-91.
- 2 Zhao DH, Yang XM, Li ZB, Sheng BH. Antiarrhythmic effects of sinomenine hydrochloride. *Acta Pharm Sin* 1985; 20 : 856-8.
- 3 Wang X, Han GQ, Li RZ, Pan JX, Chen YY, He YQ, et al. The screening of Chinese traditional drugs by biological assay. *J Beijing Med Univ* 1986; 18 : 31-6.
- 4 Li CX, Zhao GS, Li XG. Effects of sinomenine on slow response action potential in guinea pig papillary muscle. *Acta Pharm Sin* 1987; 22 : 566-9.
- 5 Lubb WF, Daries PS, Opie LH. Ventricular arrhythmias associated with coronary artery occlusion and reperfusion in the isolated perfused rat heart: a model for assessment of antifibrillatory action of antiarrhythmic agents. *Cardiovasc Res* 1978; 12 : 212-20.
- 6 Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1978; 52 : 302-10.
- 7 Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972; 247 : 3170-5.
- 8 Tomlinson CW, Dhalla NS, Naranjan S. Myocardial contractility II Effect of changes in cardiac function on the subcellular distribution of calcium in the isolated perfused rat heart. *Can J Physiol Pharmacol* 1972; 50 : 853-9.
- 9 Manning AS, Hearse DJ. Reperfusion-induced arrhythmias: mechanism and prevention. *J Mol Cell Cardiol* 1984; 16 : 497-518.