

野菊花提取物 CI-2 对体外培养乳鼠心肌细胞缺氧缺糖性损伤的保护作用

中医研究院西苑医院基础研究室药理组

李映欧 高凤辉 张金妹 刘志云 张 京 涂新义 刘建勋

导师 李连达

本室在筛选中草药过程中发现野菊花对实验性犬心肌缺血有明显的保护作用⁽¹⁾，并进一步证实野菊花提取物 CI-2 可减小心肌梗塞范围、减轻心肌损伤程度，且具有调整心脏血流动力学等作用⁽²⁾。迄今国内外对野菊花防治冠心病作用的研究尚少报道，我室初步实验结果表明，它有可能成为一种新的防治冠心病有效的药物。因此有必要对野菊花及其有效成分作进一步的研究。

为在活的细胞水平研究药物对心肌细胞的直接保护作用，本实验室于 1978 年建立了心肌细胞培养方法并开展了一些中药细胞药理学的工作^(3,4)。最近又应用细胞缺氧和缺糖的方法，模拟心肌细胞缺血，建立了细胞水平的实验病理模型，观察其超微结构、搏动功能及胞浆酶的变化，并以缺氧缺糖后细胞内及培养基中乳酸脱氢酶(LDH)变化为指标，从细胞水平研究野菊花提取物 CI-2 对体外培养心肌细胞缺氧缺糖性损伤的保护作用，现报告如下：

材料和方法

一、心肌细胞培养：按 Harary^(5,6) 所建立的培养方法，稍加改进，即取生后 2~3 天 Wistar 种乳鼠（中医研究院和平里动物室供应），开胸、切取心室，放入盛有 Eagle 培养基（MEM，中国科学院生物物理研究所生化试剂厂，批号 800919）的平皿中，并用 Eagle 培养基反复冲洗三次，在三角烧瓶中用眼科剪将心室组织剪成 1mm³ 碎块，加入 0.06% 胰旦白酶溶液（Difco 1:250），在磁力搅拌器上 37°C 水浴中消化 10 分钟，自然沉淀后，丢弃上清液，沉淀的组织块中再加入胰旦白酶，按上述条件消化 10 分钟，然后吹打 1 分钟，自然沉淀，上清液移入离心管中，加入等量冷培养基以终止消化，并离心 10 分钟（2,000 转/分），

弃上清，再加入适量培养基于离心管内的细胞沉淀中、混匀，再次离心，弃上清以洗去残存的胰旦白酶，最后加入含 15% 小牛血清（北京大兴县红星农场生化制药厂）的 Eagle 培养基，制成细胞悬液。再按上法将自然沉淀的组织块反复消化数次，直至完全分散为止。将各次消化制备的细胞悬液集中，制成浓度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 的心肌细胞悬液，接种至玻璃培养瓶中，塞紧瓶塞，37°C 下作静置单层培养。

人胚心肌细胞培养：本院妇产科行人工水囊引产所得胎儿（妊娠 20 周以内），按上述乳鼠心肌细胞培养的方法及条件，行单层培养。

二、体外培养心肌细胞缺氧缺糖性损伤模型的建立方法^(7~17)：取培养第三天心肌细胞单层，按下法进行缺氧缺糖：1. 缺糖：实验时采用缺糖 Hanks 液或不含葡萄糖的 Eagle 培养基代替正常培养基，2. 缺氧：将缺糖 Hanks 液或缺糖培养基予先用高纯氮气（99.999%）饱和 15 分钟（ $P_{O_2} = 30 \text{ mmHg}$ ）；实验时换入这种缺氧缺糖的 Hanks 液或培养基，培养瓶内立即充入氮气（1 升/分流量）30 秒，以置换瓶内空气，然后塞紧瓶塞。对照组用正常 Hanks 液或正常培养基，不充氮气。

三、扫描电子显微镜观察⁽¹⁸⁾：培养瓶中放入盖玻片条，使心肌细胞在盖玻片上贴壁生长，经上述实验处理后，取出盖玻片条，以磷酸缓冲液冲洗数次，戊二醛、锇酸固定，乙醇系列脱水，乙酸戊酯处理、临界点干燥，镀金后在 BSM-25 型扫描电子显微镜下观察。

四、培养心肌细胞搏动的观察：心肌细胞培养三天后，选取搏动节律正常的细胞团，在倒置显微镜恒温装置内观察缺氧缺糖前后不同时间的搏动频率、节律及强度等变化。

五、乳酸脱氢酶(LDH)测定方法：1. 心肌细胞释放入培养基的 LDH 定量测定⁽¹⁹⁾。

* 本组研究生

本法以乳酸为基质、加氧化型辅酶 1 (DPN, 上海酵母厂, 批号 790616), 在 pH10 条件下测定丙酮酸生成量, 应用 72 型光电分光光度计 (上海分析仪器厂, 编号 784770) 440nm 滤光板, 测定光密度, 从标准曲线计算培养基中 LDH 含量(单位)。2. 心肌细胞内 LDH 细胞化学定性显示⁽²⁰⁾。

培养瓶中放入盖玻片条, 心肌细胞在盖玻片上贴壁生长, 经实验处理后, 取出盖玻片, 应用细胞化学甲臌反应显示方法, 显微镜下观察, 以细胞中兰紫色甲臌沉淀代表酶活性。

六、实验药物: 1. 野菊花提取物 CI-2: 由本室制备 40mg/ml 提取方法见前文⁽²⁾。经系统化学定性实验证明其中主要成分为野菊花黄酮及部分内酯类化合物, pH7, Na^+ 207mEq/L, K^+ 0.26mEq/L, Ca^{++} 6mEq/L。2. 心得安注射液, 1mg/ml, 北京制药厂, 批号 770529, pH5, 无 Na^+ 、 K^+ 。3. 硫酸异丙肾上腺素注射液 0.5mg/ml 北京制药厂, 批号 76101227, pH5, Na^+ 153mEq/L, 无 K^+ 。4. 氟美松磷酸钠注射液 2mg/ml, 天津和平制药厂, 批号 800813, pH6.5, Na^+ 96.8mEq/L, 无 K^+ 。

结 果

一、缺氧缺糖对培养心肌细胞表面超微结构的影响: 在扫描电子显微镜下可见培养的乳鼠心肌细胞呈梭形、三角形、圆形或不规则形, 细胞表面有大量微突起, 各心肌细胞之间以足突相连形成桥样结构 (图 1、2, 见插页 3), 缺氧缺糖 6 小时细胞表面及周围的突起变短、数目减少 (图 3, 见插页 3), 24 小时后这种改变更加严重, 并伴有细胞外形的改变 (图 4, 见插页 3)。

二、缺氧缺糖时间对培养乳鼠心肌细胞搏动的影响: 取培养乳鼠心肌细胞 11 瓶, 随机分为 3 组, 正常对照组 3 瓶, 单纯缺氧组 5 瓶, 缺氧缺糖组 3 瓶, 实

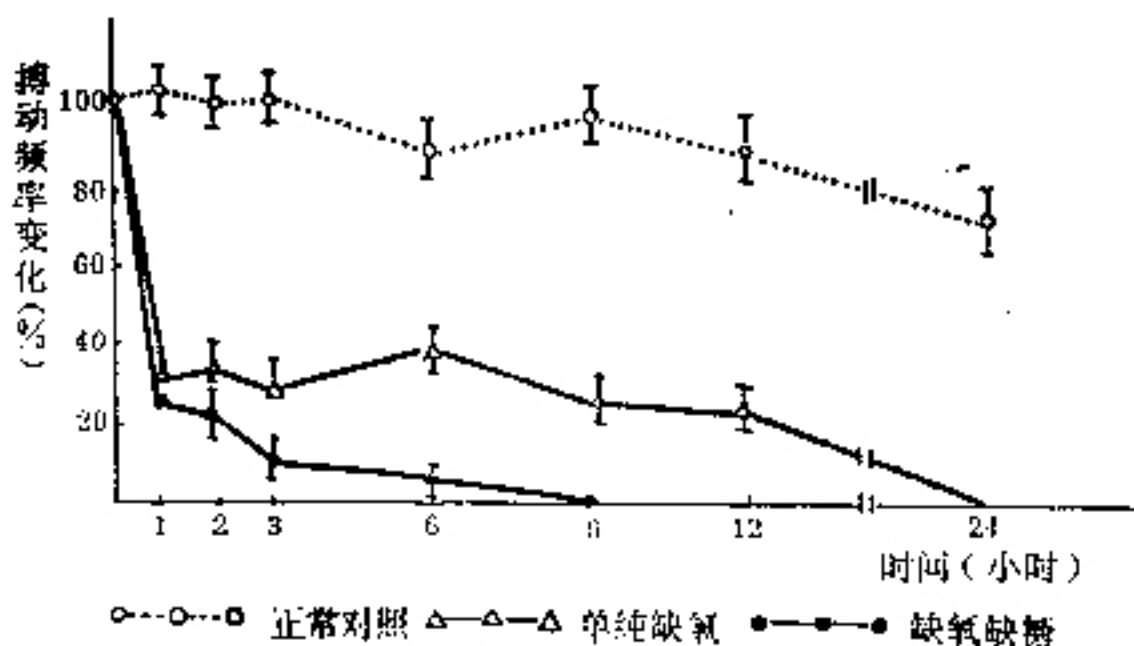


图 5 缺氧缺糖时间对培养乳鼠心肌细胞搏动频率的影响

验前及实验后 1、2、3、6、9、12、24 小时分别观察细胞团搏动频率及节律等, 结果如图 5 所示, 单纯缺氧 1 小时搏动频率下降, 12 小时出现节律失常, 24 小时细胞停搏; 缺氧缺糖对细胞团搏动的影响更加严重, 3~9 小时就停搏; 而对照组搏动频率变化, 在 24 小时内维持在较为稳定水平。

三、培养日期对心肌细胞释放 LDH 的影响: 取培养乳鼠心肌细胞单层 6 瓶, 从培养 48 小时开始, 每隔 24 小时更换正常含 15% 小牛血清的培养基, 并分别测定培养基中 LDH 含量, 共七天, 正常培养乳鼠心肌细胞释放 LDH 量, 在培养第 3 天至第 9 天有逐渐下降的趋势, 培养第 3 天培养基 LDH 量为 210 ± 21 (平均值 $\pm$ 标准误, 单位, 下同), 至培养第 6 天为 168 ± 3 , 培养第 9 天为 139 ± 4 (空白对照培养基 (含 15% 小牛血清) LDH 值为 124 ± 3)。我们选定培养第 3 天作为实验日期, 此时细胞生长、分裂及新陈代谢较旺盛, 释放至培养基中的 LDH 量最多。

四、缺氧缺糖时间对培养心肌细胞释放 LDH 的影响: 1. 乳鼠心肌细胞: 取 42 瓶培养第三天的乳鼠心肌细胞, 随机分为 2 组, 每组 21 瓶, 一组按上述方法以无糖 Hanks 液造成缺氧缺糖性损伤, 另一组作对照, 在处理 1、2、3、6、9、12、24 小时, 分别从两组中各取 3 瓶, 测定培养基 LDH 含量, 结果如图 6 所示, 缺氧缺糖 3 小时后, 心肌细胞释放 LDH 量明显增加, 与对照组比较有显著差异: 至 6 小时两组差异更为显著 (缺氧缺糖组 79 ± 10 、对照组 45 ± 4 $p < 0.01$); 至 12 小时 LDH 达到较高水平, 并保持至 24 小时以上, 我们选用缺氧缺糖 6 小时作为药物实验时间。2. 人胚心肌细胞: 取 20 瓶培养第三天的人胚心肌细

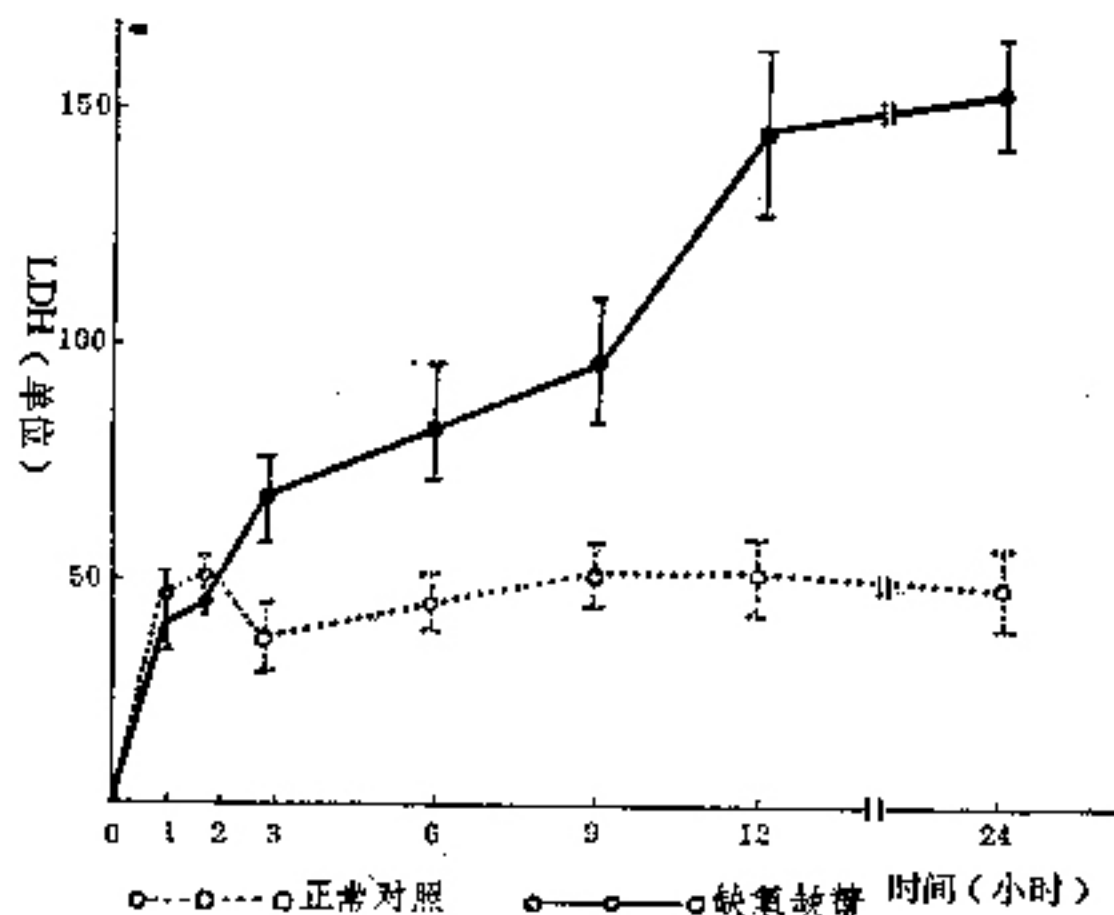


图 6 缺氧缺糖时间对培养的乳鼠心肌细胞释放 LDH 的影响

胞,随机分为4组:缺氧缺糖组、缺糖组、缺氧组及对照组,每组5瓶,在处理第3、6、9、12、15、18、21、24小时,分别测定培养基中LDH含量,结果3小时后,缺氧缺糖组与对照组LDH值有显著差异(分别为 153 ± 12 和 125 ± 4 , $P < 0.05$),随着时间增加,各组细胞释放LDH量增加以缺氧缺糖组最为明显,单独缺氧及缺糖组释放量则次之。

五:不同剂量野菊花提取物CI-2对培养乳鼠心肌细胞缺氧缺糖性损伤的保护作用:取50瓶培养第三天的心肌细胞,随机分为5组,每组10瓶,其中一组为正常对照组,一组为缺氧缺糖对照组,其余三组在缺氧缺糖同时加入野菊花提取物CI-2,使最终浓度分别为 $2.5 \mu\text{g/ml}$, $25 \mu\text{g/ml}$, $250 \mu\text{g/ml}$ 。6小时后取各瓶培养基测定LDH含量,并作细胞化学LDH显示观察。结果见图7,正常对照组与缺氧缺糖对照组之间释放LDH量有显著差异(LDH值分别为 37 ± 3 及 88 ± 9 , $P < 0.01$),三个给药组LDH释放量分别为 83 ± 7 , 72 ± 6 , 56 ± 6 ,可见随着CI-2剂量加大,对心肌细胞损伤的保护作用增加,以 $250 \mu\text{g/ml}$ 的效果最好($P < 0.05$)。细胞化学LDH显示,可见正常对照组细胞内紫兰色颗粒较多,说明LDH含量丰富;缺氧缺糖组心肌细胞受损,胞浆LDH大量漏出至培养基中,故细胞内紫兰色颗粒明显减少;而给药组的心肌

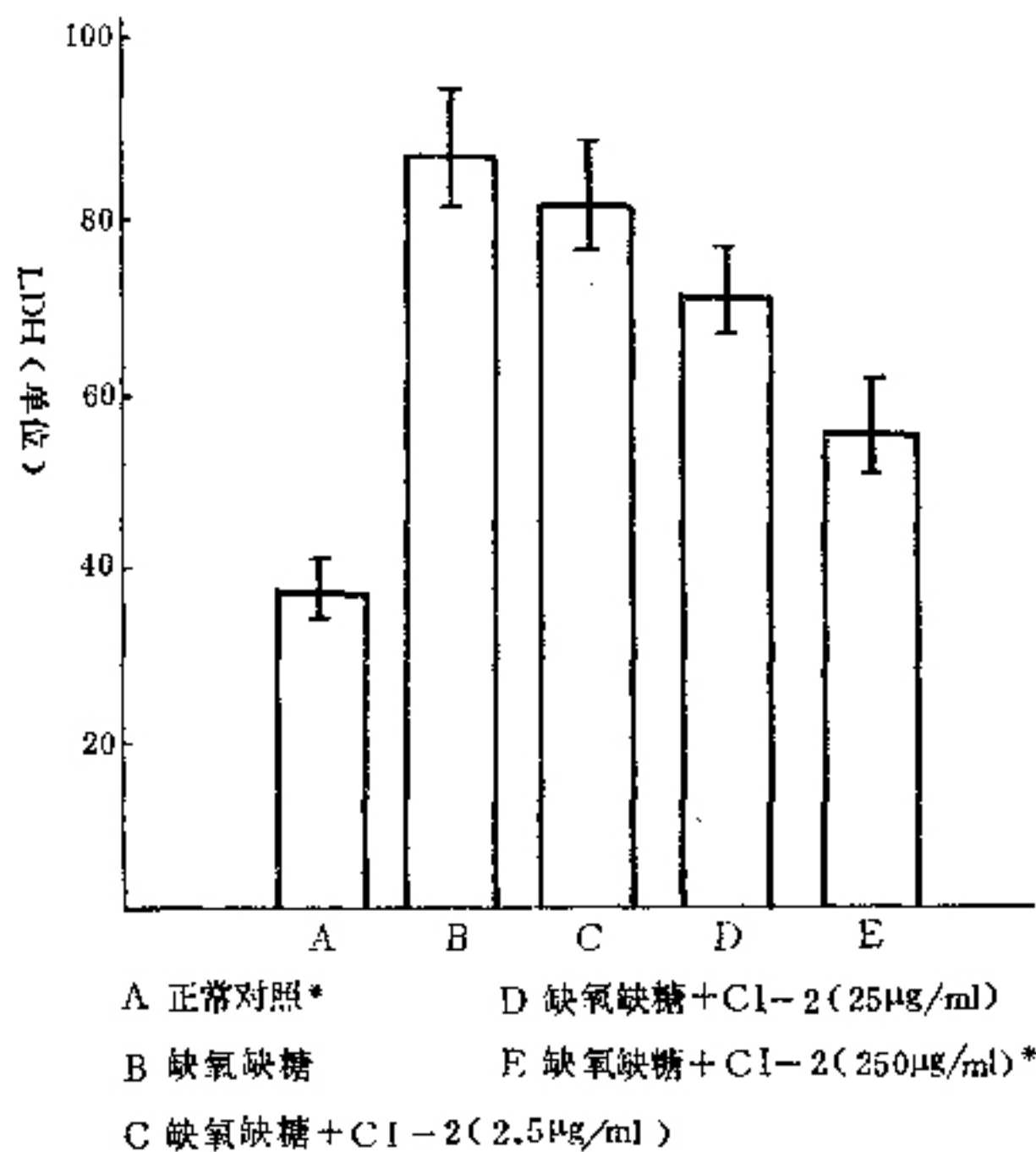


图7 不同剂量野菊花提取物CI-2对培养乳鼠心肌细胞缺氧缺糖性损伤的保护作用

细胞内LDH含量界于两者之间说明细胞损伤减轻,以 $250 \mu\text{g/ml}$ 组效果最好。

六、野菊花提取物CI-2及其他药物对培养心肌细胞缺氧缺糖性损伤保护作用:1.培养基LDH定量测定研究:取42瓶培养第3天的乳鼠心肌细胞,随机分为6组,每组7瓶,其中一组为正常对照组,一组为缺氧缺糖对照组,余4组为缺氧缺糖加药组,分别在缺氧缺糖同时加入CI-2, $250 \mu\text{g/ml}$ (最终浓度)、心得安 10^{-5}M 、氟美松 10^{-4}M 或异丙肾上腺素 10^{-4}M 。缺氧缺糖6小时后测定培养基中LDH含量。实验重复两批,共84瓶,结果见附表及图8(见插页4)。缺氧缺糖组LDH释放与正常对照组有显著差异,说明缺氧缺糖后心肌细胞损伤,LDH漏出至培养基中的量增多;而缺氧缺糖加CI-2组及加心得安组心肌细胞释放的

附表 不同药物对培养乳鼠心肌细胞缺氧缺糖性损伤的保护作用

	正常对照	缺氧缺糖对照	缺氧缺糖加CI-2 250µg/ml	缺氧缺糖加心得安 $1 \times 10^{-5}\text{M}$	缺氧缺糖加氟美松 $1 \times 10^{-4}\text{M}$	缺氧缺糖加异丙肾 $1 \times 10^{-4}\text{M}$
第一批						
n	7	7	7	7	7	7
LDH	45 ± 2	97 ± 5	59 ± 3	67 ± 4	84 ± 5	175 ± 13
P	< 0.01		< 0.01	< 0.01	> 0.05	< 0.01
第二批						
n	7	7	7	7	7	7
LDH	77 ± 3	134 ± 6	108 ± 4	106 ± 8	152 ± 7	151 ± 13
P	< 0.01		< 0.01	< 0.05	> 0.05	> 0.05

LDH与缺氧缺糖对照组的LDH比较有显著差异,说明野菊花提取物CI-2与心得安(10^{-5}M)对培养心肌细胞

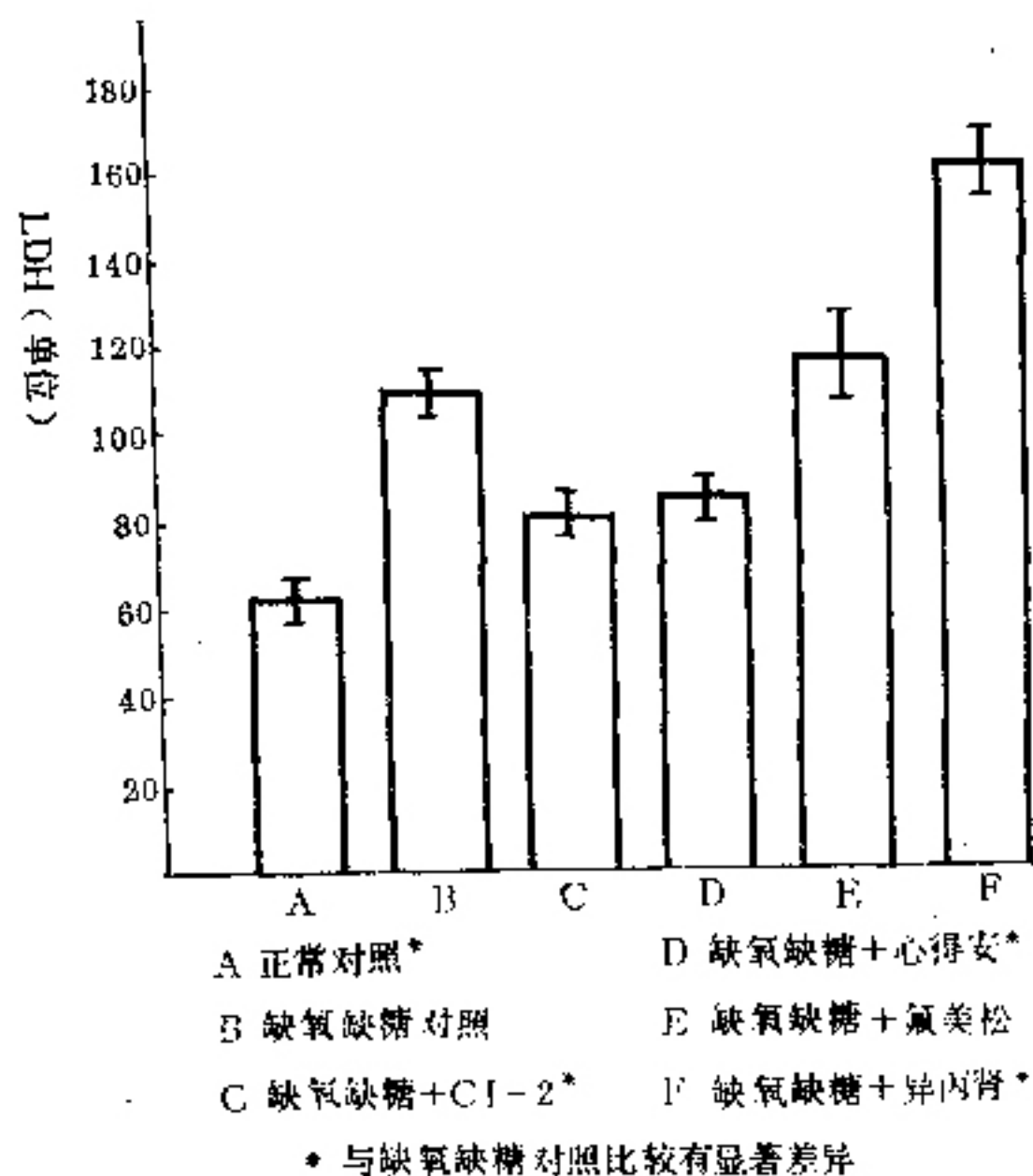


图8 不同药物对培养乳鼠心肌细胞缺氧缺糖性损伤的保护作用

缺氧缺糖性损伤有一定保护作用,使细胞内LDH漏出减少。本实验未观察到 10^{-4} M 氟美松对培养心肌细胞损伤有保护作用;而 10^{-4} M 异丙肾上腺素则有加重损伤的作用。

细胞内LDH的细胞化学定性显示研究:取6瓶在盖玻片条上培养三天、生长情况及细胞密度基本相同的心肌细胞,随机分为3组:正常对照组、缺氧缺糖对照组及缺氧缺糖加CI-2 250 μ g/ml组,每组2瓶。在缺氧缺糖后6小时取出盖玻片条,在同一染色缸内作细胞化学LDH定性显示观察,重复二次实验。结果表明:在6小时,正常对照组LDH染色反应正常,LDH颗粒丰富均匀,核膜清楚;缺氧缺糖组LDH染色较浅,酶颗粒大部消失或不清楚;而缺氧缺糖加CI-2组染色反应比不加药的缺氧缺糖组好,酶颗粒分布尚均匀,说明CI-2有保护LDH的作用(图9、10、11,见插图4)。

七、野菊花提取物CI-2对LDH直接破坏作用的观察

为了解CI-2在培养基中对心肌细胞释放的LDH有无直接破坏作用,取培养第三天经缺氧缺糖处理后的培养基,测定LDH含量作为前对照,然后分为两组,各5瓶,一组加入CI-2 250 μ g/ml,另一组不加CI-2均在37 $^{\circ}$ C作用6小时,再分别测定培养基中LDH含量,与加药前进行比较。实验前LDH含量为 199 ± 6 ,作用6小时后,加CI-2组LDH值为 202 ± 3 , $P > 0.5$;不加CI-2组LDH值为 206 ± 7 , $P > 0.2$,两组之间差异不显著,说明在六小时之内,野菊花提取物CI-2(250 μ g/ml)对培养基中LDH没有直接破坏作用。

讨 论

1974年以来DeLuca等报告了培养心肌细胞“缺血性”损伤的实验病理模型,从细胞水平研究了缺血性心肌细胞损伤的各种表现及保护缺血性损伤的因素和药物^(7~17)。培养的心肌细胞氧及葡萄糖缺乏,则迅速形成能量耗竭、培养基中乳酸盐积聚和pH改变,造成细胞损伤,这种培养心肌细胞缺氧和缺糖所引起的反应与活体内缺血性心肌细胞损伤的反应极为相似^(9,10),因此利用培养心肌细胞缺氧缺糖可模拟整体动物的心肌缺血,国外文献称之为培养心肌细胞的缺血性损伤^(7~15)。我们在实验中观察到培养心肌细胞缺氧缺糖后,细胞表面超微结构发生改变,表面微突起减少或消失,而这些突起与心肌细胞间连结有关、特别与冲动传导、搏动同步化的形成有关,这种改变加

上心肌细胞能量缺乏,致使细胞搏动功能下降,同时也影响到心肌细胞膜的功能,使胞浆酶如LDH漏出至培养基中。体外培养乳鼠心肌细胞在缺氧缺糖三小时开始,细胞释放至培养基中的LDH量明显增加,在培养的人胚心肌细胞中也观察到同样结果,说明缺氧缺糖时不同种属的心肌细胞所造成的损伤结果基本相同。

我们在这种模型上观察到 β -受体拮抗剂心得安(10^{-5} M)有保护作用;而 β -受体激动剂异丙肾上腺素可加重这种损伤,此结果与Kamimoto等⁽²¹⁾应用异丙肾上腺素造成培养乳鼠心肌细胞损伤的结果是一致的。

以上说明,体外培养心肌细胞缺血样损伤模型的建立是有一定理论基础,经实验证实模型可靠,重复性较好。

野菊花是常用清热解毒药,具有清热解毒、平肝疏肝、活血化瘀作用,临床多用于各种感染化脓性疾病、高血压等,我们过去的研究工作曾证明,野菊花及其提取物CI-2对麻醉开胸犬结扎冠状动脉左前降支形成的实验性心肌梗塞有保护作用,对心脏血流动力学有很好的调节作用,可增加冠状动脉血流量、改善心肌供血,减慢心率,降低血压,减轻左心室后负荷,降低心肌的能量消耗,有利于维持氧的供求平衡,进而减轻心肌的损伤程度,减少梗塞范围^(1,2)。本实验进一步从细胞水平观察到野菊花提取物CI-2对培养的乳鼠心肌细胞缺氧缺糖性损伤有直接保护作用,使细胞释放至培养基中的LDH减少。培养心肌细胞“缺血”早期,酶从胞浆中漏出,与细胞膜的功能受损有关,但这种损伤是可逆的,如再恢复给氧及葡萄糖,心肌细胞的各种功能又可恢复^(9~14)。在细胞水平对这种损伤的保护作用,是通过稳定细胞膜或通过增加能量供应(无氧性ATP产生)及降低能量消耗等作用达到的。有人观察到在细胞水平具有保护缺血心肌细胞损伤作用的甲基强的松龙进入心肌细胞后,大部分集中在肌膜,少部分集中在溶酶体膜上,其作用机制主要是稳定缺血心肌细胞膜的功能,从而减少酶(如LDH)从胞浆中漏出。我们在实验中还观察到心得安的保护作用,这可能与心得安具有稳定细胞膜,改善心肌细胞线粒体的功能,减轻线粒体水肿等作用机制有关⁽²²⁾。野菊花提取物CI-2在细胞水平是否有稳定细胞膜、保护线粒体与溶酶体,增加耐缺氧能力等功能,从而保护心肌细胞,减轻损伤程度,这些问题有待进一步研究。

参 考 文 献

1. 李连达等: 野菊花对犬实验性心肌缺血保护作用的初步观察. 中医杂志 21:868, 1980
2. 李连达等: 野菊花提取物 GI-2 对犬血流动力学及实验性心肌梗塞的影响. 中医杂志 22:66, 1981
3. 李连达等: 附子 I 号对体外培养心肌细胞的影响(摘要). 中华心血管病杂志 8 (2):144, 1980
4. 李连达等: 无毛冬青 II 号对体外培养乳鼠心肌细胞搏动的影响. 中医杂志 21:468, 1980
5. Harary L, et al: In vitro studies of single isolated beating heart cells, Science 131:1674, 1960
6. Harary L, et al: In vitro studies on single beating rat heart cells. I. Growth and organization. Exp Cell Res 29:451, 1963
7. De Luca MA, et al: Biochemical responses of myocardial cells in culture to oxygen and glucose deprivation Biochem Biophys Res Commun 59:749, 1974
8. Ingwall J S, et al: Fetal mouse hearts, a model for studying ischemia. Proc Natl Acad Sci USA 72:2809, 1975
9. Acosta D, et al: Ischemic myocardial injury in cultured heart cells, preliminary observations on morphology and beating activity. In Vitro 13:818, 1977
10. Acosta D, et al: Ischemic myocardial injury in cultured heart cells, Leakage of cytoplasmic enzymes from injured cells. In Vitro 14:728, 1978
11. Acosta D, et al: Ischemic myocardial injury in cultured heart cells, in situ lysosomal damage. Experientia 34:1388, 1978
12. Acosta D, et al: Injury to primary cultures of rat heart endothelial cells by Hypoxia and glucose deprivation. In Vitro 15:929, 1979
13. Acosta D, et al: Actions of extracellular acidosis on primary cultures of rat myocardial cell deprived of oxygen and glucose. J Mol Cell Cardiol 12:1459, 1980
14. Laarse AVD, et al: Release of alpha hydroxybutyrate from neonatal rat heart cell cultures exposed to anoxia and reoxygenation: comparison with impairment of structure and function of damaged myocardial cells. Cardiovasc Res 13:345, 1979
15. Laarse AVD, et al: Metabolic control of membrane permeability for cellular proteins studied in heart cell cultures during severe hypoxia. Am J Cardiol 41:395, 1978
16. Acosta D, et al: Reduction of cell injury in hypoxia cultures of rat myocardial cells by methylprednisolone. In Vitro 16:93, 1980
17. Higgins T J C, et al: The effect of extracellular calcium concentration and Ca-Antagonist drugs on enzyme release and lactate production by anoxic heart cell cultures. J Mol Cell Cardiol 12:909, 1980
18. 洪涛等: 生物医学超微结构与电子显微镜技术, p183, 科学出版社, 1980
19. 朱忠勇等: 临床医学检验, p340, 上海科学技术出版社, 1978
20. 北京医学院组织胚胎教研组: 组织化学讲义, p75, 1979
21. Kamimoto S, et al: Effects of coenzyme Q₁₀ on the injury of cultured myocardial cell induced by isoproterenol in the rat. Jap Circ J 44:652, 1980
22. Kloner R A, et al: Observations on experimental myocardial ischemia. Cardiovasc Res 14:371, 1980

消息

全国精神科中医及中西医结合座谈会在广西召开

——摘自中国中西医结合研究会筹委会办公室编《工作简讯》(3)

中华医学会神经精神科学会、全国精神科中医及中西医结合座谈会, 于1981年5月5日在广西贵县解放军第191医院召开。代表回顾了建国三十年来精神科中医及中西医结合研究工作取得的成绩, 交流了经验; 如湖南医学院精神病学教研组及四平、绵羊等精神病院, 对祖国医学中有关精神病的文献资料进行了初步整理, 北京、上海、哈尔滨、天津、广州等地在辨病与辨证分型结合方面进行了一些尝试。在治法上, 华

北地区对涤痰开窍法、江苏对攻下法、上海、河南、哈尔滨、甘肃等地对活血化瘀法做了进一步探索。在中草药单方方面, 四川对马桑寄生、江苏对洋金花等研究获得一定效果。浙江等地还报告了针刺疗法对精神病的治疗效果。此外, 上海等地用温阳兴奋法治疗单纯型及慢性精神分裂症、用活血化瘀法治疗周期性精神病, 也取得了一定疗效。北京、上海及191医院等还开展了激光穴位治疗的尝试。