

• 新技术介绍 •

心肌细胞培养在中医药研究中的应用

中国中医研究院西苑医院基础研究室 李连达 李映欧

心肌细胞培养在中医药研究中的应用是我国近年来发展起来的一个新领域^①，体外培养的心肌细胞为心肌细胞生物学及细胞分子药理学特别是中医中药的研究工作，提供了一种有用的工具。它具有准确、可靠、简便、深入的优点，特别在中医中药的研究中更具有排除神经体液因素的影响及肝肾解毒功能的干扰，观察某些因素及药物对活细胞的直接作用，可解决心肌组织中细胞间隙渗透延缓问题，特别适用于离子流的研究；又具有可利用人的心肌细胞进行实验，排除种属差异等独特的优点。

目前在国内已经建立了乳鼠、成年鼠及人胚心肌细胞培养方法^(2~10)，原代培养心肌细胞连续搏动达106天；建立了形态、生理、生化及培养心肌细胞动作电位测定等观测手段；研制了心肌细胞搏动描记仪；建立了搏动节律失常、心肌细胞缺氧缺糖性损伤、心力衰竭、免疫性损伤、中毒性损伤、病毒性心肌炎等细胞病理模型，可用于心律失常、心肌缺血、免疫性心肌病、克山病、中毒性心肌炎、病毒性心肌炎、心力衰竭等方面的研究。国内已对附子Ⅰ号（消旋去甲乌药碱）、秃毛冬青Ⅰ号、野菊花、人参、山楂叶、丹皮、川芎、苦参、缬草、益母草、毛冬青、冠心Ⅰ号方、生脉散等中药复方、单味药及有效成分，进行了研究。发现上述中草药对培养心肌细胞的搏动、DNA合成及各种损伤有着不同程度的药理作用，使中医药研究进入细胞分子水平^(11~20)。

心肌细胞培养的原理和方法简介

心肌细胞培养是把心肌组织碎块，用胰蛋白酶消化分散成单个心肌细胞，用培养基制成细胞悬液，在体外适宜的条件下使其生长、繁殖并保持其结构及功能特性。一般选用胚鼠或生后2~4天的乳鼠心室肌，近年国外又从成年大鼠、兔、狗及人的心脏，分离及培养出搏动的心肌细胞。这种从动物心脏分离的细胞，进行初次培养叫原代培养，培养出的心肌细胞叫做原代心肌细胞。原代细胞经传代后可称为细胞系，从原代培养或细胞系中进行选择或克隆化的具有某些特性或标记，这些特性或标记在传代培养中能保持下去的叫细胞株。虽然传代细胞仍可见到搏动，但世界上至今尚未建立具有搏动功能的心肌细胞株以供应

用。目前认为搏动心肌细胞的传代培养是有限度的，在传代过程中搏动功能逐渐消失，逐渐变成心脏成纤维细胞或上皮样细胞。Carrel进行长期传代培养达34年的鸡胚心细胞株是不能搏动的成纤维细胞；目前广泛应用的、从成年男性右心耳分离培养的Giradi心细胞株，其细胞类型是上皮样细胞。

在细胞培养中，提高心肌细胞的纯度非常重要，而经胰蛋白酶消化分离所得的细胞悬液，心肌细胞与其他细胞的比例为6:4，利用贴瓶分离法，即利用上皮细胞及其他间质细胞能更早地贴瓶特点，将两类细胞分开，可培养出纯度达95%的心肌细胞和100%的上皮细胞。随着研究的深入，尤其是生物化学及电生理研究的需要，心肌细胞培养方法近年在国外发展较快。如心肌细胞悬浮培养、无血清培养、浦坝野细胞培养、成人心肌细胞培养等，应用组织重组的方法，可培养出为电生理研究需要的细胞聚集团块及心肌细胞束等。

常用的研究方法及其观测指标

一、心肌细胞形态学的观察

应用倒置显微镜观察，培养的乳鼠心肌细胞，始为圆形，贴瓶后呈扁平形、梭形，单个细胞开始搏动，有些细胞底部三点贴瓶形成三角形、顶部突出，最后细胞展开，伸出伪足，形成不规则星形，随着细胞分裂、增殖，细胞伸出伪足、相互交织成网，形成细胞单层。HE染色可见心肌细胞的肌原纤维及线粒体染成红色，核呈球形。上皮细胞则胞浆呈浅蓝色，核较大，颜色较浅，有数个核仁，利用细胞化学的糖原染色法可区分心肌细胞和非心肌细胞。在透射电子显微镜下观察，培养的非培养的乳鼠心肌细胞，其超微结构基本相同，但前者的游离核糖微粒、糖原及线粒体更为丰富。细胞间连接形成很快，培养第二天便可认出闰盘，在扫描电子显微镜下，细胞表面有许多细长突起，其功能与细胞间连接有关。

二、心肌细胞搏动的观察

搏动是心肌细胞的主要特征。培养初期，各单个心肌细胞搏动的频率及节律互不相同，当互相接触形成细胞簇或细胞单层后，即变为同步搏动、形成所谓的功能性合体细胞。近年国内已研制成功描记这种体

外培养心肌细胞搏动的装置,即将细胞搏动所引起的光通量变化转变为电信号,经放大加以描记,可准确反映心肌细胞搏动的频率、节律及强度等参数。

三、培养心肌细胞的电生理特点

体外培养心肌细胞的电生理研究,主要采用膜电位(包括静息电位和动作电位)、膜电阻及离子流测定等指标,实验发现,培养10小时的乳鼠心室肌细胞与初生大鼠心室肌细胞电生理特性相似,静息电位约 -80mV ,动作电位可被河豚毒素阻断,不被 Mn^{++} 阻断,表现出快反应细胞的特征。此后,开始去极化,静息电位约达 -40mV 时,起搏活动激活,细胞呈自律性收缩,其动作电位不被河豚毒素阻断。可见在培养开始心肌细胞类似抑制性快反应细胞,而后类似慢反应细胞。利用利多卡因和异搏定等工具药,这种推断得到了药理学实验的证实。心肌细胞培养后电生理特性的改变,有人认为是培养细胞向胚胎状态反分化的结果。

近年应用电压固定技术及离子流知识,从离子水平研究了培养心肌细胞兴奋的离子基础,实验表明,动作电位的上升相是由 Na^+ 和 Ca^{++} 同时内流产生的,起搏电流也是由 Na^+ 和 Ca^{++} 共同携带的,而这两个时相的内向电位是 Na^+ 和 Ca^{++} 通过两个不同的慢离子通道内流形成的。

四、生物化学指标的观察

在培养的心肌细胞中,可应用现代生物化学技术如同位素、放射自显影、仪器分析方法,研究细胞糖、脂肪、核酸、蛋白质及各种酶的代谢变化;研究培养心肌细胞中各种受体的分布及调节情况,为受体分析及分子药理学在中医药研究中的应用提供良好的工具。

细胞病理模型的建立及其应用

一、搏动节律失常

体外培养的心肌细胞,可用哇巴因、乌头碱、地高辛等药物诱发节律失常或改变培养基中 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{++} 、 Mg^{++} 的离子浓度形成不同类型的搏动节律失常,可用于抗心律失常药物的研究。实验发现,附子Ⅰ号、秃毛冬青Ⅰ号等中药有效成分对哇巴因、乌头碱形成的节律失常有明显的药理作用。

二、缺氧缺糖性损伤

利用不含葡萄糖的培养基,在缺氧条件下培养,可模拟心肌缺血条件,形成心肌细胞缺氧缺糖性损伤,这种损伤类似心肌缺血性损伤,又称之为缺血样损伤。缺氧缺糖后,细胞形态及功能有明显的改变,如胞浆空泡形成,胞浆颗粒增加,异形心肌细胞出现,搏动频率下降、节律失常或停搏,动作电位改变,胞浆内乳酸脱氢酶, α -羟丁酸脱氢酶及磷酸肌酸激酶

大量漏出,DNA合成抑制,细胞死亡数增加,可利用这些指标以评定某些因素或药物对这种损伤心肌的保护作用。例如中药野菊花,山楂叶、人参皂甙,冠心Ⅰ号对这种损伤有一定的保护作用。

三、心力衰竭模型

为研究心力衰竭的有关问题,可在培养基中加入戊巴比妥钠(10^{-4}M),使培养心肌细胞搏动力衰竭,可见搏动频率变慢或停搏,搏动强度明显减弱。利用这种模型,可以筛选某些有强心作用的中草药。例如,生脉散对这种衰竭的心肌细胞有明显的治疗作用。

四、中毒性心肌损伤

可利用生物毒素及化学毒素形成中毒性心肌损伤的病理模型,例如抗癌抗菌素阿霉素及丝裂霉素C可造成严重的心肌损伤,对体外培养心肌细胞的形态及功能都有明显影响,使心肌细胞的搏动强度减弱,频率变慢,节律失常,停搏,细胞表面皱缩,足突消失,胞浆LDH漏出,DNA合成抑制。生脉散对这种中毒性心肌细胞损伤有明显的保护作用。

五、免疫性心肌损伤

特异性抗心抗体加上补体后,可使培养心肌细胞搏动停止,把心脏组织匀浆致敏的淋巴细胞加至培养的心肌细胞中后,引起心肌细胞明显损伤,细胞变形,淋巴细胞浸润,反映靶细胞(心肌细胞)损伤程度的 ^{51}Cr 释放率明显增加,并且这种损伤有高度的器官特异性,冠心Ⅰ号方对这种损伤有明显的保护作用。

六、微生物及其毒素的损伤

白喉毒素、链球菌溶血素O、副溶血弧菌毒素、柯萨奇病毒等均可损伤培养的心肌细胞。最近国内报道,以柯萨奇B₂病毒感染培养乳鼠心肌细胞后,心肌乳酸脱氢酶,谷草转氨酶增加,搏动停止,细胞变圆和固缩,以及 ^{51}Cr 释放增加,人白细胞干扰素能使这种损伤程度减轻到接近正常水平,说明这种模型可用于筛选防治病毒性心肌炎的中草药。

心肌细胞培养在中医药研究中的价值及注意事项

体外培养的心肌细胞既可以观察中药及其有效成分对细胞生长、发育、代谢等各种生理功能的影响,也可以造成各种病理模型,用以研究中药的作用,为临床筛选防治各种心血管疾病的有效药物、阐明其作用原理,进而从细胞及分子水平探索中医药有关理论,提供了一个重要的研究途径。

由于心肌细胞培养对于外环境的变化十分敏感,必须严格控制实验条件,避免各种干扰因素的影响,特别是对于所研究的药物有着更高的要求,如药物的纯度、酸碱度、各种离子浓度,特别是复方,成分复

杂,质量不稳定,含有较多的 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{++} 、 Mg^{++} 等。 pH 值也往往偏离中性。这些因素都会影响实验结果。而从中草药提取的纯品,化学结构清楚,成分单一,质量稳定,各种离子及 pH 值可控制在生理范围内,实验前用不含血清的培养基稀释至所需浓度,予热至 36°C ,缓慢加入培养瓶以避免机械刺激,尽量保持外环境的稳定,并设立相同溶液、离子浓度及 pH 值的对照实验,可使研究结果更为准确可靠。

如何进一步利用心肌细胞培养开展更广泛更深入的中医中药研究,还需进一步积累经验,摸索规律,只要严格控制实验条件,合理解决中药及其有效成分的制剂问题,心肌细胞培养对于研究中医中药将是一个很有价值的新领域。

参 考 文 献

1. 李连达,等。心肌细胞培养在药理学研究中的应用。见:中国药理学会编,药理学进展(1980)心血管药理分册。北京:人民卫生出版社,1981:208—224。
2. 李连达,等。附子I号对体外培养乳鼠心肌细胞的影响(摘要)。中华心血管病杂志1980; 8(2):144。
3. 李连达,等。秃毛冬青II号对体外培养乳鼠心肌细胞搏动的影响。中医杂志1980; 21(6):468。
4. 李连达,等。原代心肌细胞连续搏动106天的观察。细胞生物学杂志1981; 3(3):30。
5. 李连达,等。人胚心肌细胞培养的初步研究。细胞生物学杂志1982; 4(4):29。
6. 李连达,等。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。中西医结合杂志1981; 1(2):91。
7. 孙福立,等。介绍一种描记培养心肌细胞搏动的简便方法。生理科学进展1981; 12(1):90。
8. 王家珍,等。苦参总黄酮对大鼠培养心肌细胞搏动节律失常的作用。中国药理学报1983; 4(1):32。
9. 屠曾宏,等。培养心肌病仓鼠心肌细胞中肌球蛋白的免疫荧光染色(英文)。中国药理学报1982; 3(1):68。
10. 屠曾宏,等。健康和心肌病仓鼠分离的心肌细胞扫描和透视电镜的研究(英文)。中国药理学报1982; 3(2):117。
11. 李连达,等。冠心II号方及其有效成分对体外培养心肌细胞缺氧缺糖性损伤的保护作用。见:中国中西医结合研究会学术委员会编,中国中西医结合研究会成立大会全国中西医结合学术讨论会 论文摘要汇编 北京,1981:3。
12. 温淑荣,等。人参地上部分总皂甙对缺氧缺氧的乳鼠培养心肌细胞的作用。药学通报1982; 17(8):450。
13. 李连达,等。山楂及其有效成分的研究II对缺氧缺糖培养乳鼠心肌细胞的作用。中医杂志(英文版)1984; 4(4):289。
14. 王道生,等。胰激肽释放酶的药理研究二、胰激肽释放酶对体外培养心肌细胞的影响。中国药理通讯1984; 1(3—4):93。
15. 李连达,等。生脉液对丝裂霉素C心肌细胞毒性作用的影响。中国药理通讯1984; 1(3—4):162。
16. 李连达,等。丝裂霉素C对体外培养乳鼠心肌细胞的影响。中国药理通讯1984; 1(3—4):164。
17. 杨英珍,等。病毒性心肌炎感染模型——大鼠搏动心肌细胞培养的柯萨奇B₂病毒感染研究。上海医学1985; 8(3):163。
18. 杨佩芬,等。人胎心心肌组织原代培养搏动及其生长特点的观察。解剖学报1985; 16(2):178。
19. 王鸿秀,等。乳鼠原代心肌细胞培养的初步观察。细胞生物学杂志1984; 6(2):63。
20. 蔡海江,等。跳动心肌细胞微型培养模型的建立及应用。细胞生物学杂志1985; 7(3):25。

黄柏水湿敷治疗脸部隐翅虫皮炎

安徽中医学院附属医院 刘益群

夏季是隐翅虫的活跃季节,由它而引起的皮炎,常使人感到奇痒灼辣难受,兹将1984年5月至7月所遇脸部隐翅虫皮炎12例及其治疗经过报道如下。

一般资料 男女各6例;14岁1例,20~30岁4例,42~50岁5例,56岁、61岁各1例;右眼3例,左眼4例,双眼5例。

诊断要点 (1)有接触隐翅虫史;(2)夜间发病;(3)有自觉灼热性疼痛及奇痒;(4)局部皮损明显,均呈条状及竹片刮伤后感染样病灶,组合呈斑片状。

治 疗 按上述要点确诊后,给予黄柏3~5g元明粉3g,煎水,待冷,湿敷局部,一日4~6次,

一日一剂,均于三日内恢复。

体 会 此证中医古代文献无明确记载,但与中医眼科学中“风赤疮痍”颇有相似之处。此证乃由隐翅虫虫体崩溃之毒素刺激而起,治疗以局部用药为要。黄柏味苦性寒,清热燥湿,泻火解毒;元明粉咸苦而寒,为清热散结之品,二药合用,故能奏效。

因本病系夏季农村常见病,普及防治知识最为重要,如遇到虫落皮肤上,不可在皮肤上压死它,也不要用手指将虫捏死,最好将虫拨落地上踩死。被虫爬过皮肤,及早用肥皂水洗净,避免溅入眼内。已有皮炎反应,及时处理。重要的还是铲除房屋周围杂草,喷洒杀虫药剂,搞好环境卫生。