

定心方对大鼠缺氧及正常心肌细胞内钙、膜电位和线粒体膜电位的影响^{*}

贾钰华 孙学刚 赵晓山

内容提要 目的 探讨定心方(DXR)抗心律失常的分子机理。方法 采用胰蛋白酶法分离培养心肌细胞,用不同荧光染料分别标记细胞,在激光共聚焦显微镜上测定 DXR 血清对心肌细胞内钙(Ca^{2+})、膜电位(MP)和线粒体膜电位(MMP)的变化。结果 缺氧使心肌细胞(Ca^{2+})和 MMP 升高,而使 MP 降低,DXR 血清降低了正常和缺氧心肌细胞(Ca^{2+}),改善了缺氧引起的 MP 降低,使缺氧状态下 MMP 保持在基线水平。结论 DXR 能通过抑制缺氧引起的(Ca^{2+})和 MMP 升高,及拮抗缺氧所致的 MP 降低,从而发挥保护心肌细胞,防治心律失常的作用。

关键词 定心方 心肌细胞 钙 细胞膜电位 线粒体膜电位

Effect of Dingxin Recipe on Intracellular Free Calcium, Membrane Potential and Mitochondria Membrane Potential in Normal and Hypoxia Myocytes of Rats JIA Yu-hua, SUN Xue-gang, ZHAO Xiao-shan *Faculty of TCM, The First Military Medical University, Guangzhou (510515)*

Objective: To elucidate the molecular mechanism on anti-arrhythmic function of Dingxin Recipe (DXR).

Methods: Cardiac myocytes isolated by trypsin method were cultured and labelled with various fluorescence stains. DXR contained serum induced changes of cytosolic calcium concentration (Ca^{2+}), cell membrane potential (MP) and mitochondria membrane potential (MMP) were determined with laser confocal microscopy. **Results:** Hypoxia caused increase of (Ca^{2+}) and MMP, and decrease of MP, while DXR contained serum lowered the (Ca^{2+}) in normal or hypoxian myocytes, improved hypoxia induced MP reduction and maintain MMP at baseline level under hypoxia circumstances. **Conclusion:** Through inhibiting the hypoxia caused (Ca^{2+}) and MMP elevation and MP lowering, DXR displays its action in protecting myocardial cells to prevent and treat arrhythmia.

Key words Dingxin Recipe, myocardial cell, calcium, cell membrane potential, mitochondria membrane potential

80 年代以来,心律失常的非药物治疗法取得了巨大成就,但在医疗实践中,这些非药物治疗手段仍然主要针对药物治疗无效、发作频繁或可导致严重血流动力学不良后果的快速性心律失常,药物治疗仍然是快速性心律失常的治疗主线^[1]。中药定心方(DXR)是我校中医系的经验方,对室性早搏有较好的疗效。本研究通过观测 DXR 含药血清对培养的大鼠心肌细胞(Ca^{2+})、膜电位(MP)和线粒体膜电位(MMP)的影响,以探讨 DXR 抗心律失常的分子机理。

材料与方法

1 动物 Sprague-Dawley 大鼠,雌雄不拘,体重

180~220g,由第一军医大学动物实验中心提供。

2 药品和试剂 DXR 煎剂由苦参、黄连、酸枣仁、三七、赤芍、丹参、茯苓、党参、灵芝、栝蒌 10 味药组成,经水煎浓缩(1.25g 生药/ml)供实验用。荧光探针 Fluo-3-AM(测(Ca^{2+})) DiBAC₄(3) bis-(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol(测 MP) Rhodamine 123(测 MMP)购自美国 Molecular Probe 公司。胰蛋白酶、胎牛血清、DMEM(Dulbecco's modified eagle's medium)培养基购自 Gibco 公司,其他为国产试剂。

3 主要仪器 激光共聚焦显微镜(ACAS570 型,美国 Meridian 公司)。

4 方法

4.1 含药血清的制备 大鼠 12 只,随机分为两组:空白对照组(灌服同体积生理盐水)和 DXR 组(灌服 12.5g/kg)。每日灌药 1 次,连续 10 天,末次灌药

^{*} 国家中医药管理局科研基金重点课题(No. 95B154)

第一军医大学中医系(广州 510515)

后 2h 心脏取血,分离血清,0.45 μ m 微孔滤膜过滤,56 $^{\circ}$ C 灭活 30min,-20 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用⁽²⁾。

4.2 心肌细胞分离培养 取出生 2~4 日龄的幼鼠(由第一军医大学动物实验中心提供),75% 酒精消毒皮肤,无菌取出心脏,用 D-Hank's 液或无血清培养基洗去血液,去外膜后用眼科剪将其剪碎,然后加入 0.06% 胰蛋白酶,35~37 $^{\circ}$ C 消化 10min,弃上清液,再加胰蛋白酶消化 4 次左右,每次 5min。收集每次消化后的上清液,加血清终止消化。最后 1000r/min 离心 5min,细胞沉淀用含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基悬浮,以 5×10^5 /ml 接种到培养瓶中。置 3% CO_2 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱中培养 1~2h 后再轻轻吸出细胞上清,接种到新的培养瓶中继续培养。隔天换液,待细胞快融合时用 0.25% 胰蛋白酶消化传代。把盛有心肌细胞的小皿放入激光共聚焦显微镜本身携带的密闭透光小盒中,检测时持续通以高流量氮气,造成细胞缺氧模型⁽³⁾。

4.3 荧光染料的配制 Fluo-3-AM、DiBAC₄(3) [bis(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol]、Rhodamine 123 分别用 D-Hank's 液稀释成 10 μ mol/L、5 μ mol/L、20 μ mol/L。

4.4 心肌细胞的荧光染色测定 将急性分离的大鼠心肌细胞滤液滴在测定所需的小皿上,20~30min 后加入荧光染料 2 滴,37 $^{\circ}$ C 避光温育 30~60min,测钙小皿用 D-Hank's 冲洗 3 遍,另两种保留染料,上机检测。

4.5 心肌细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 、MP 和 MMP 的测定 利用特异荧光染料,激光共聚焦显微镜可敏感检测可贴壁粘附的活细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 、MP 和 MMP 的动态变化。荧光探针进入细胞,在 488nm 波长蓝色激光激发下产生荧光,Fluo-3 产生的荧光强度与细胞内游离钙离子的浓度成正比。DiBAC₄(3) 是亲脂性阴离子荧光染料,根据其在细胞内外和线粒体内外的重新分布,判断出 MP 的变化,荧光增强时,表示电位的去极化变化, Rhodamine 123 在生理液中带有负电荷,染色后胞浆和线粒体中均有荧光探针,但由于线粒体基质的电位相对于细胞胞浆的电位低很多,故线粒体内荧光强度比胞浆的强很多,选择荧光强度较高区域的荧光强度变化表示线粒体膜电位的变化,荧光增强时,表示电位的去极化⁽⁴⁾。

4.6 实验设计 实验中设正常细胞组和缺氧细胞组,正常细胞组分别加入空白血清(A)和 DXR 血清(B),缺氧细胞组分别加入 D-Hank's 液(C)空白血清(D)和 DXR 血清(E),然后测定 15min 内心肌细胞

$[\text{Ca}^{2+}]_i$ 、MP 和 MMP 的动态变化。

4.7 数据处理 数据经 ACAS-570 微机系统对图像及时间进行实时测量获得,以未加处理因素前的荧光值为 100(%),以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据以独立样本 t 检验进行分析。

结 果

1 DXR 血清对细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的影响 正常心肌细胞加入空白血清后 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 荧光强度立即出现进行性升高,15min 时上升到起始浓度的 $(109.5 \pm 4.5)\%$,加入 DXR 血清后,先出现短暂、轻度升高,随即出现进行性下降,15min 时下降到起始浓度的 $(92.6 \pm 2.9)\%$ (与 A 组比较, $t = 2.363$, $P < 0.05$, $n = 5$)。缺氧心肌细胞给予 D-Hank's 液或空白血清后, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 荧光强度立即都出现进行性升高,15min 时分别上升到起始浓度的 $(133.5 \pm 6.1)\%$ 和 $(149.3 \pm 4.6)\%$ (与 C 组比较, $t = 1.902$, $P > 0.05$, $n = 3$);加入 DXR 血清后,钙荧光强度先出现升高,峰值达到 $(119.2 \pm 2.9)\%$,然后出现进行性下降,15min 时下降到起始浓度的 $(105.8 \pm 3.7)\%$ (与 C 组比较, $t = 3.096$, $P < 0.05$, $n = 5$)。见图 1。

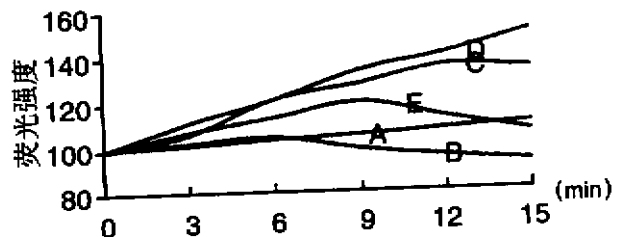


图 1 定心方血清对正常及缺氧心肌细胞内钙的影响

A: 正常心肌细胞加空白血清; B: 正常心肌细胞加定心方血清; C: 缺氧心肌细胞加缓冲液; D: 缺氧心肌细胞加空白血清; E: 缺氧心肌细胞加定心方血清; 下图同

2 DXR 血清对 MP 的影响 正常心肌细胞加入空白血清后,心肌 MP 出现去极化变化,细胞内荧光增加了 $(27.6 \pm 3.4)\%$ ($n = 3$),加入 DXR 血清后,MP 先出现去极化最高达到 $(108.6 \pm 5.4)\%$,然后逐步出现超极化,15min 时,荧光强度减少了 $(6.7 \pm 3.2)\%$ ($n = 3$,与 A 组比较, $t = 3.132$, $P < 0.05$)。缺氧心肌细胞给以 D-Hank's 液或空白血清后,MP 均出现超极化,15min 时,分别减少了 $(14.2 \pm 2.1)\%$ ($n = 3$) 和 $(16.1 \pm 4.4)\%$ ($n = 3$,与 C 组比较, $t = 1.803$, $P > 0.05$),给予 DXR 血清后,MP 先出现超极化,最低降低到 $(95.6 \pm 2.6)\%$,然后逐渐升高,升高到基线上方,最高

达到 $(109.7 \pm 1.6)\%$ ($n=3$, 与 C 组比较, $t=3.135$, $P<0.05$)。见图 2。

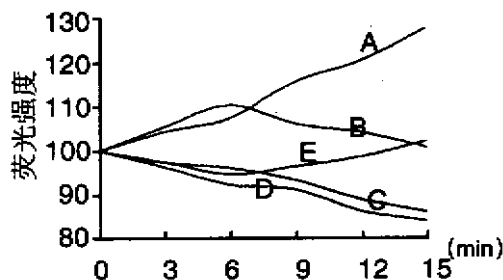


图2 定心方血清对正常及缺氧心肌细胞 MP 的影响

3 DXR 血清对 MMP 的影响 正常细胞加入空白血清出现去极化变化,细胞内荧光增加了 $(25.7 \pm 3.4)\%$ ($n=3$);加入 DXR 血清后,MP 先出现去极化,最高达到 $(103.8 \pm 5.4)\%$,然后逐步出现超极化,15min 时,荧光强度减少了 $(6.7 \pm 3.2)\%$ ($n=3$,与 A 组比较, $t=2.91$, $P<0.05$)。缺氧心肌细胞给以 D-Hank's 液或空白血清后,MP 均出现去极化,15min 时分别减少了 $(35.2 \pm 2.1)\%$ ($n=3$)和 $(44.1 \pm 4.4)\%$ ($n=3$,与 A 组比较, $t=1.614$, $P>0.05$),给予 DXR 血清后,MP 先出现去极化,最高至 $(118.7 \pm 3.4)\%$,最低降低到 $(101.1 \pm 1.6)\%$ ($n=3$,与 C 组比较, $t=3.754$, $P<0.01$)。见图 3。

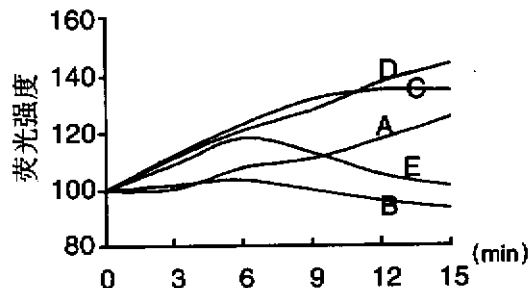


图3 定心方血清对正常及缺氧心肌细胞 MMP 的影响

讨 论

1 细胞内钙超载是引起心律失常的重要因素,钙超载的细胞激活 $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ 交换,引起细胞除极,增加潜在起搏点舒张后期的除极产生期外收缩。细胞内钙超载增加了 3 期和复极后期早期后除极的发生率,细胞内钙超载激活 $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ 交换、钙诱发的 NSC 电流和 Cl^- 电流,在超极化电位时携带内向电流,诱发迟发后除极。缺血时 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高,细胞缝隙连接的传导性降低,细胞耦联障碍,折返的发生率增高^[5]。DXR 血清能阻滞正常细胞和缺氧细胞的钙内流,因而推测 DXR 通过抑制缺氧细胞钙超载,减少触发活动和

折返,降低心率而防治心律失常。

2 心肌细胞的钙内流一般是由细胞膜去极化后激发的。细胞膜钙电流大小以及 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的升高程度与细胞膜去极化程度有一定的平行关系。提示心肌细胞膜电位变化对 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 水平有显著的影响^[6]。本实验中我们也观察了 DXR 血清对心肌细胞膜电位的影响。我们推测 DXR 可能引起心肌细胞膜电位正值加大,出现超极化的改变,使细胞外钙内流减少,通过防止心肌钙超载、减轻心肌缺血损伤而产生心肌保护作用。但本实验的结果显示,DXR 对细胞膜电位的影响与我们的预期结果不一致。缺氧使细胞膜电位降低,主要考虑与缺氧引起细胞膜对离子的通透性增高,导致离子顺离子浓度梯度透过细胞膜, Na^+ 内流使细胞内 Na^+ 增加, K^+ 外流使胞内 K^+ 减少有关^[7]。因此,DXR 的作用可能在于抑制钙内流,减少钙依赖钾通道的通透性,减少钾外流,或直接抑制 Na^+ 内流,使细胞膜电位维持在正常水平,保护心肌细胞。A 组的膜电位升高可能由空白血清中的钙离子引起, B 组中的 DXR 成分对这种作用有抑制作用。

3 缺氧可损伤线粒体,线粒体受损又可导致缺氧。缺氧抑制了线粒体呼吸功能和氧化磷酸化过程,损伤线粒体的结构和功能。先前的在体研究表明,DXR 对缺血再灌注家兔心脏的线粒体有保护作用,电镜下线粒体脊清楚,无空泡化^[8]。本实验表明,DXR 可降低正常和缺氧心肌细胞的线粒体膜电位,从而减少缺氧引起的线粒体钙内流,进而通过减轻缺氧细胞线粒体的钙超载,保护线粒体,而且这种作用并非是血清本身的作用,因为 MMP 测定中 C 组和 D 组相比差异无显著性。

4 虚实夹杂、寒热错杂是多数快速性心律失常患者的临床特点。DXR 以入心、肝经之苦参、黄连清心泻火为主药,以酸枣仁、茯苓、党参、灵芝益气宁神为辅药,以丹参、三七、赤芍、栝蒌祛瘀化痰为佐使,共同发挥清心安神的作用。本实验表明 DXR 能通过抑制缺氧引起的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 和 MMP 升高,及拮抗缺氧所致的 MP 降低,从而发挥保护心肌细胞,防治心律失常的作用。

参 考 文 献

1. 胡大一. 抗心律失常药物的合理应用. 北京:中国环境科学出版社,1997:1.
2. 崔晓兰,贺玉琢,高英杰,等. 中药药理研究的新思路——中药血清药理学. 中国中医药科技 1997;4(4):239.
3. Feet BA, Yu XQ, Rootwelt T, et al. Effects of hypoxemia and

reoxygenation with 21% or 100% oxygen in newborn piglets : extracellular hypoxanthine in cerebral cortex and femoral muscle. Crit Care Med 1997 ;25(8):1384—1391.

4. 雷国华 , 鲍永耀 , 周俊岭 , 等 . 荧光定量测量方法在共聚焦显微镜上的应用 . 第一军医大学学报 1998 ;18(1):47—51.

5. Carmeliet E. Cardiac ionic currents and acute ischemia : from channels to arrhythmias. Physiol Rew 1999 ;79(3): 917—1017.

6. 金春华 , 赵克森 . 虎杖甙对大鼠血管平滑肌细胞膜电位的影响 . 第一军医大学学报 1998 ;18(3):202—204.

7. 石毓澍 , 陈 新 , 周金台 . 心脏电生理学进展 . 北京 : 中国科学技术出版社 , 1994 : 304—305.

8. 贾钰华 , 余林中 , 陈育尧 , 等 . 定心方对家兔心肌缺血及再灌注损伤的保护作用和抗心律失常作用的研究 . 中国中西医结合杂志 1999 ;19(11):681—684.

(收稿 2000—07—10 修回 2001—01—31)

清开灵注射液辅助治疗美尼尔综合征 56 例

李黔宇 崔 英 剡兵县

1995 年 6 月~2001 年 3 月 , 我们应用清开灵注射液辅助山莨菪碱注射液治疗美尼尔综合征 56 例 , 并与同期对照组 40 例比较 , 取得了较好的疗效 , 现报道如下。

临床资料 96 例患者均为门诊患者 , 均有不同程度一侧或双侧耳鸣、耳聋 , 伴突然性眩晕发作 , 均无明显诱因 , 发病前后血压无明显变化。96 例患者随机分为两组。治疗组 56 例 , 男 32 例 , 女 24 例 , 年龄 27~51 岁 , 平均 40.1 岁 ; 初次发病 9 例 , 反复发作 47 例 ; 伴恶心、呕吐 42 例 , 伴耳内胀满、压迫感 27 例。对照组 40 例 , 男 24 例 , 女 16 例 ; 年龄 29~50 岁 , 平均 38.9 岁 , 初次发病 3 例 , 反复发作 37 例 ; 伴恶心、呕吐 34 例 , 伴耳内胀满、压迫感 19 例。听阈检查以左侧耳或自觉症状较重侧为主 , 使用丹麦产 AS-72 型听力计 , 测定 500Hz、1kHz、2kHz、3kHz、4kHz 处纯音听力 , 以语频听阈进行分析。

治疗组与对照组年龄、症状、体征、实验室检查比较差异无显著性 ($P>0.05$)。

治疗方法 治疗组用清开灵注射液 (山西太行制药生产 , 主要成分 : 胆酸、珍珠母、猪去氧胆酸、栀子、水牛角、板蓝根、黄芩甙、金银花) 20ml 加入 10% 葡萄糖注射液 200ml 联合应用山莨菪碱注射液 (山西晋城制药总厂生产) 30ml 加入 5% 葡萄糖注射液 300ml 静脉滴注 , 1 天 1 次。对照组单用山莨菪碱注射液 30ml 加入 5% 葡萄糖注射液 300ml 静脉滴注 , 1 天 1 次。均 5 天为 1 个疗程。观察两组症状变化。5 天后复查听力。

统计学方法 采用 χ^2 检验。

结 果

1 疗效评定标准 治愈 : 眩晕、耳鸣消失。有效 : 眩晕消失 , 耳鸣减轻。无效 : 临床症状无改变。

2 临床疗效 治疗组 56 例 , 治愈 35 例 (62.5%) , 有效 14 例 (25.0%) , 无效 7 例 (12.5%) , 总有效率 87.5% ; 对照组 40 例 , 治愈 22 例 (55.0%) , 有效 5 例 (12.5%) , 无效 13 例

(32.5%) , 治愈率 55.0% , 总有效率 67.5%。治疗组总有效率高于对照组 ($\chi^2=5.57$, $P<0.05$)。

3 两组患者听力检查比较 见表 1。治疗组患者治疗后平均听力提高 17.4dB (治疗前为 47.20dB , 治疗后为 29.80dB) , 对照组患者平均听力提高 12.67dB (治疗前为 51.77dB , 治疗后为 39.10dB)。治疗组听力较对照组明显提高 ($\chi^2=17.49$, $P<0.01$)。

表 1 两组美尼尔综合征患者治疗前后听力检查比较 (例)

组别	例数	听力损失程度					
		正常 (<25dB)	轻度 (25~40dB)	中度 (41~55dB)	重度 (56~70dB)	严重度 (70~90dB)	全聋 (>90dB)
治疗	56	治疗前	2	26	13	9	5
		治疗后	32	13	4	3	1
对照	40	治疗前	1	14	11	12	2
		治疗后	7	19	7	5	2

讨 论 临床上常将不明原因的具有眩晕、耳鸣和耳聋三征者称为美尼尔综合征或复杂征 , 并认为迷路的神经血管功能紊乱是本征发病的基础。临床上常以镇静药及血管扩张药等药物治疗。本研究结果显示 , 清开灵注射液辅助山莨菪碱注射液治疗美尼尔综合征 56 例取得了显著协同作用 , 总有效率较对照组有明显提高 ($P<0.05$)。中医学认为美尼尔综合征属风痰所致的眩晕。清开灵注射液是中药安宫牛黄丸的改型制剂 , 具有清热解毒、化痰通络、醒神开窍的功能。故清开灵注射液治疗美尼尔综合征符合中医学的辨证论治规律。清开灵注射液所含的主要成分为胆酸类、氨基酸类、黄芩甙、绿原酸及藏红花素等 , 对中枢神经有镇静作用 , 并能直接扩张外周血管 , 对抗血管痉挛 , 增加血流量 , 改善缺血组织的血液供应 , 同时能够改善血小板功能 , 抑制血小板聚集 , 降低血液粘稠度 , 这些药理作用可有效改善内耳微循环。通过以上观察 , 清开灵注射辅助治疗美尼尔综合征 , 明显提高总有效率 , 并能有效改善患者的听力 , 值得临床推广应用。

(收稿 2001—04—04 修回 2001—06—02)

宁夏灵州集团公司磁窑堡医院 宁夏灵武 751409)