

芪丹通脉片对大鼠心肌细胞 Ca^{2+} 及超微结构的影响

马 静^{1,2}, 王宗仁^{1*}, 陈晓莉³, 樊爱琳⁴, 行 利¹, 李晶华¹

(1. 第四军医大学西京医院 中医科, 陕西 西安 710032; 2. 第四军医大学 组织胚胎学教研室, 陕西 西安 710032;
3. 第四军医大学西京医院 药剂科, 陕西 西安 710032; 4. 第四军医大学西京医院 临床检验科, 陕西 西安 710032)

摘要:目的 探讨芪丹通脉片(QDTMT)对急性心肌缺血的防治作用。方法 SD大鼠ig QDTMT (2 g/kg)两周后,sc 异丙肾上腺素(Iso, 5 mg/kg)诱导急性心肌缺血模型。通过透射电镜观察心肌超微结构的变化;用比色法测定心肌组织及心肌细胞线粒体中 Ca^{2+} 水平及心肌细胞线粒体中 Ca^{2+} -ATPase 活力的变化。结果 大鼠ig QDTMT 两周后,sc Iso 所造成的心肌超微结构的损害明显减轻;心肌细胞线粒体中 Ca^{2+} -ATPase 活力增加,而心肌组织及心肌细胞线粒体中 Ca^{2+} 水平显著降低 ($P<0.01$)。结论 QDTMT 可能是通过抑制心肌细胞线粒体中钙超载及保护心肌细胞超微结构,达到防治急性心肌缺血的目的。

关键词: 芪丹通脉片; 急性心肌缺血; Ca^{2+} ; 超微结构

中图分类号: R286.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)05-0718-03

Effect of Qidan Tongmai Tablet on Ca^{2+} and ultrastructure of myocardial cell in rats

MA Jing^{1,2}, WANG Zong-ren¹, CHEN Xiao-li³, FAN Ai-lin⁴, HANG Li¹, LI Jing-hua¹

(1. Department of Traditional Chinese Medicine, Xijing Hospital of Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China; 2. Department of Histology and Embryology of Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China; 3. Department of Pharmaceutics, Xijing Hospital of Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China; 4. Department of Clinical Laboratory, Xijing Hospital of Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China.)

Abstract: Objective To study the protective effect of Qidan Tongmai Tablet (QDTMT) on the injury induced by acute myocardial ischemia. **Methods** Acute myocardial ischemia was induced by sc isoproterenol (Iso, 5 mg/kg) into SD rats pretreated with ig QDTMT (2 g/kg) for two weeks. Activities of Ca^{2+} -ATPase in myocardial mitochondria and content of Ca^{2+} in myocardium and myocardial mitochondria were determined by colorimetric method. The changes of myocardial ultrastructure were investigated by means of transmission electron microscope. **Results** Compared with the controls, activities of Ca^{2+} -ATPase in mitochondrion were strengthened in QDTMT group and the content of Ca^{2+} was decreased ($P<0.01$) in myocardium and myocardial mitochondrion while myocardial ultrastructure damage were significantly reduced in QDTMT group. **Conclusion** QDTMT can relieve calcium overload in cardiac mitochondrion and protect the integrity of the ultrastructure of cardiac, and thus be used in prophylaxis and treatment of acute myocardial ischemia.

Key words: Qidan Tongmai Tablet (QDTMT); acute myocardial ischemia; Ca^{2+} ; ultrastructure

冠心病属于中医学的“胸痹、心痛、胞痛、真心痛、厥心痛等”范畴。主要的病理机制为气虚血瘀^[1]。现代药理研究表明,益气药对心血管系统有较强的调节作用,能增强心肌收缩力,降低心肌耗氧量;活血化瘀药具有改善血液流变及微循环扩张血管、增加冠脉流量的作用,以改善心肌缺血、缺氧状态,防止体内血液凝结及降低血液黏稠度^[2,3]。根据这一理论,并结合临床实验,制定了以黄芪、丹参、当归、桂

枝、红花组成的复方中药制剂芪丹通脉片(QDTMT)。既往研究表明,QDTMT能够改善人及实验动物心肌缺血程度、减少心肌梗死面积,降低血液黏稠度^[4,5]。但其对急性心肌缺血大鼠心肌细胞线粒体内 Ca^{2+} 水平及心肌细胞超微结构的影响,目前尚不清楚。本实验拟在异丙肾上腺素(Iso)所致的心肌缺血损伤模型基础上,观察心肌细胞线粒体内 Ca^{2+} 及心肌细胞超微结构的改变及 QDTMT 对其

收稿日期: 2004-10-27

基金项目: 陕西省攻关课题 (2001, 12K-G7)

作者简介: 马 静(1966—),女,江苏省人,在读博士,主治医师,讲师,研究方向为中西医结合治疗缺血性心脏病。

Tel: (029) 83375351 E-mail: jingma@fmmu.edu.cn

* 通讯作者 Tel: (029) 83375352 E-mail: zongren@fmmu.edu.cn

的影响,以期进一步探讨 QDTMT 防治急性心肌缺血的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料:QDTMT 提取的浸膏干粉(生药中含黄芪甲苷不超过 0.079 9 mg/g),第四军医大学药厂提供;恬尔心(Dilitiazem),浙江亚太制药厂出品;Iso,由上海天丰制药厂出品。 Ca^{2+} -ATPase 试剂盒(南京建成生物工程研究所提供);JEM-2000EX 透射电镜(日本电子光学有限公司出品);752C 紫外分光光度计(上海第二分析仪器厂);GL20A 全自动高速冷冻离心机(湖南仪器仪表总厂离心机厂);WFX-IF 原子吸收分光光度计(北京第二光学仪器厂生产);铜、铁、锌、镁、钙、钾单元素空心阴极灯(河北衡水宁强光源厂生产)。

1.2 动物:SD 大鼠,雌雄兼用,体重 250~280 g,由第四军医大学试验动物中心提供。

1.3 方法:SD 大鼠 32 只,随机分为 4 组:正常对照组、模型组、QDTMT 组(2 g/kg,前期研究表明此剂量为最佳剂量)、阳性对照组(恬尔心,5 g/kg)。用相同的方法,分别 ig 用蒸馏水配成等体积的实验药物生理盐水(3 mL/kg),每日 ig 2 次,连续 14 d。第 15 天正常对照组皮下 3~4 点 sc 生理盐水,其他各组以相同的方法 sc Iso (5 mg/kg),24 h 后相同方法、剂量再 sc 1 次。第 16 天用 1% 戊巴比妥 sc,麻醉大鼠,开胸,左心室取血 6 mL;迅速剪取左心室心尖部心肌 1 mm×1 mm 组织块,放入 3% 戊二醛中,4℃ 冰箱中保存,备用。将剩余的心肌组织制成 10% 的匀浆,离心 20 min,取上清液。用差速离心法提取心肌线粒体,用考马斯亮蓝法测定蛋白水平。按 Ca^{2+} -ATPase 试剂盒提供的方法测定 Ca^{2+} -ATPase 活力。将心肌匀浆液及线粒体按 1:100 用去离子水稀释,用 WFX-IF 原子吸收分光光度计,测定心肌组织和线粒体中 Ca^{2+} 水平。常规制作电镜标本,经半薄片定位后,每组每只动物随机取 1 个包埋块,取 2 网超薄片,电镜下选用反差良好的 1 个同网进行观察,以细胞质为主随机在不同部位拍照 3~5 张,观察心肌细胞超微结构的变化。

1.4 统计学方法:数据采用方差分析,各组间用最小显著差数法进行两两比较。

2 结果

2.1 对心肌细胞 Ca^{2+} 水平及 Ca^{2+} -ATPase 活力的影响:与对照组相比,模型组心肌组织及心肌细胞线粒体中 Ca^{2+} 水平明显增加 ($P<0.01$);QDTMT 组及阳性对照组的心肌组织及心肌细胞线粒体中

Ca^{2+} 水平显著低于模型组 ($P<0.01$);模型组心肌细胞线粒体中 Ca^{2+} -ATPase 活性降低 ($P<0.01$),QDTMT 组及阳性对照组与模型组相比较, Ca^{2+} -ATPase 活性显著增高 ($P<0.01$)。结果见表 1。

表 1 QDTMT 对 Ca^{2+} 水平及 Ca^{2+} -ATPase 活力的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Table 1 Effect of QDTMT on Ca^{2+} level and Ca^{2+} -ATPase activities ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	Ca^{2+} /(mmol·mg ⁻¹)		Ca^{2+} -ATPase/ (mmol·g ⁻¹ ·h ⁻¹)
		心肌组织	心肌细胞线粒体	
正常对照	—	5.55±1.09	24.21±2.46	36.36±7.66
模型	—	12.94±1.28**	73.15±8.9**	23.07±5.66**
QDTMT	2 000	7.61±1.62△△	37.33±5.26△△	40.86±8.13△△
阳性对照	5	6.94±1.30△△	31.85±2.94△△	42.36±7.66△△

与正常组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: △△ $P<0.01$

** $P<0.01$ vs normal group; △△ $P<0.01$ vs model group

2.2 对心肌细胞超微结构的影响:在透射电镜下,可以观察到对照组心肌肌节清晰,肌原纤维粗、细肌丝肌节和原纤维间线粒体均排列规则有序,线粒体膜完整,嵴密集;模型组心肌纤维排列紊乱,部分肌丝断裂,溶解,Z 线不清或消失,线粒体肿胀,嵴数目明显减少,部分嵴消失或空泡化;QDTMT 组肌节清晰,排列较整齐,肌丝完整,I 带明显加宽。线粒体较丰富,嵴结构清晰,部分嵴模糊,排列尚规则,线粒体肿胀减轻。阳性对照组心肌纤维肌节基本清晰,肌丝略扭曲,线粒体轻度肿胀,嵴结构尚清晰,排列欠规则(图略)。

3 讨论

研究表明,sc Iso 后,大量儿茶酚胺可与 β 受体结合后,激活腺苷酸环化酶产生 cAMP,激活蛋白激酶 A,促使细胞外 Ca^{2+} 内流;同时还可通过 α 受体激活磷脂酶 C,产生磷脂酸肌醇,后者可与肌浆网上的受体结合,造成细胞“钙库”释放 Ca^{2+} [6]。

线粒体可使细胞内的 Ca^{2+} 处于稳定状态,细胞内钙超载,主要发生在线粒体内[7]。心肌缺血状态下,氧自由基通过作用于细胞膜上的不饱和脂肪酸,产生脂质过氧化反应,造成膜结构和功能的改变,形成新的渗透通道,特别是 Ca^{2+} 的特殊通道,使心肌细胞 Ca^{2+} 在心肌细胞线粒体中堆积;线粒体中的摄钙系统因细胞中钙超载而被激活,使线粒体中 Ca^{2+} 水平升高。虽然,线粒体中可储存大量的 Ca^{2+} ,但缺血损伤过于严重或持久时,线粒体的结构和功能因钙超载严重受损,导致心肌细胞损伤。心肌细胞线粒体摄取和释放 Ca^{2+} ,参与胞浆 Ca^{2+} 浓度的调节,主要是通过 Ca^{2+} 泵,消耗 ATP 主动转运来实现的。

Ca^{2+} -ATPase 是维护细胞内 Ca^{2+} 浓度的主要外向转运系统, Ca^{2+} -ATPase 活性下降, 将导致细胞内 Ca^{2+} 浓度升高。所以, 抑制线粒体中 Ca^{2+} -ATPase 的活性, 减轻 Ca^{2+} 超载, 能够防治心肌缺血损伤。本实验结果显示, 在 Iso 所致的急性心肌缺血状态下, 心肌细胞线粒体中 Ca^{2+} -ATPase 活性与 Ca^{2+} 水平呈负相关, 即心肌细胞线粒体中 Ca^{2+} -ATPase 活性减低, 线粒体中 Ca^{2+} 水平升高, 与文献报道一致^[8]。在注射 Iso 前, 给大鼠 ig QDTMT 两周, 心肌细胞线粒体中 Ca^{2+} -ATPase 活性明显增加, 心肌组织及线粒体中 Ca^{2+} 水平降低, 说明 QDTMT 可能是通过增加 Ca^{2+} -ATPase 活性, 减少心肌细胞内及线粒体内 Ca^{2+} 的摄取, 抑制钙超载作用来保护心肌细胞。

线粒体肿胀, 即线粒体体积增大, 嵴减少和基质密度降低是细胞损害最敏感指征。如注射 Iso 4 h 时^[9], 光镜下未见心肌明显损害; 电镜下, 可见线粒体肿胀, 基质出现小电子致密颗粒, 并随时间延长, 线粒体破坏加重。本实验显示, Iso 可使实验大鼠心肌肌丝排列紊乱, 部分肌丝断裂, 溶解, Z 线不清或消失; 嵴数目明显减少, 部分嵴消失或空泡化。QDTMT 可减轻这种损伤, 使心肌肌节变得较清晰, 排列较整齐, 肌丝完整, I 带明显加宽, 线粒体嵴结构清晰, 排列尚规则, 仅部分嵴模糊, 线粒体肿胀亦减轻。但是 QDTMT 抑制心肌细胞线粒体中钙超载与保护心肌细胞超微结构损害之间是否相互关

联, 尚有待于进一步研究。

References:

- [1] Zhao Y X, Ling J L, Kong L L, *et al.* Clinical observation on effect of method invigorating Qi and activating blood circulation in improving left ventricle diastole function of patients with coronary heart disease [J]. *J Nanjing Univ Tradit Chin Med; Nat Sci* (南京中医药大学学报: 自然科学版), 2001, 17(3): 150-151.
- [2] Yang A D, Guo Y J, Yu X, *et al.* Influence of Qi-benefiting, blood activating an meridian-dredging granules on NO, ET, and bFGF in arteriosclerosis rabbits [J]. *Acta Univ Tradit Chin Med Shanghai* (上海中医药大学学报), 2003, 17(1): 51-53.
- [3] Han L, Chen K J. Reperfusion injury and the protective effect of Yixinkang capsule on myocardium biomembrane of rat [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2001, 23(12): 899-902.
- [4] Wang Z R, Xia T, Ma S P, *et al.* Clinical effect of Jiangnian Kangshuan tablet type I on angina pectoris [J]. *J Fourth Mil Med Univ* (第四军医大学学报), 1998, 19(5): 505-506.
- [5] Wang Z R, Xia T, Ma S P, *et al.* Effect of Jiangnian Kangshuan I on the hemorrhheology of canine with acute myocardial ischemia [J]. *J Fourth Mil Med Univ* (第四军医大学学报), 1997, 18(3): 231-234.
- [6] Buhler F R, Laragh J H, Holzgreve H. Cardiovascular remodeling and its correction toward a comprehensive strategy [J]. *Am J Med Sci*, 1993, 94(S4A): 4A.
- [7] Kusuoka H, Marban B. Cellular mechanisms of myocardial stunning [J]. *Ann Rev Physiol*, 1992, 54: 243.
- [8] Gong P L, Peng S D, Zeng F D, *et al.* Effects of magnesium fructose-1, 6-diphosphate on myocardial lesion induced by isoproterenol in rats [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中国药理学与毒理学杂志), 2000, 14(4): 300-304.
- [9] Xu J, Zhang X, Ge C F, *et al.* Morphometric study on Iso induced myocardial injury [J]. *J Haerbin Med Univ* (哈尔滨医科大学学报), 1995, 29(6): 452-454.

丹参提取物对小鼠吗啡身体依赖性的影响

丘宏强, 陈崇宏*, 余涓

(福建医科大学药学院 药理教研室, 福建 福州 350004)

摘要:目的 观察丹参提取物对小鼠吗啡身体依赖性的影响。方法 反复 sc 吗啡建立小鼠吗啡身体依赖模型, 以 ip 纳洛酮诱发其戒断症状。分别在建立吗啡依赖模型同时或建立后 ip 给予不同剂量的丹参提取物, 观察长期预防性给药和急性给药对小鼠纳洛酮催后戒断反应症状的影响, 并且观察丹参提取物自身潜在的身体依赖性。结果 和吗啡模型组相比, 丹参提取物长期预防性给药 (100~200 mg/kg), 小鼠跳跃数减少 ($P<0.05$), 预防性给药 (200 mg/kg) 组体重下降也显著改善 ($P<0.05$); 急性给药 (500 mg/kg) 能明显减少吗啡依赖小鼠的跳跃数 ($P<0.05$), 急性给药 (200~500 mg/kg) 能一定程度改善体重的下降, 但无统计学意义; 丹参提取物长期给药不存在自身的身体依赖性。结论 丹参提取物在一定程度上抑制小鼠吗啡身体依赖的形成, 可以缓解吗啡依赖小鼠的戒断症状, 且自身无潜在身体依赖性。

关键词: 丹参; 吗啡依赖; 戒断症状

中图分类号: R286.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)05-0720-04

收稿日期: 2004-10-23

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目 (C0410026)

作者简介: 丘宏强 (1978—), 男, 福建汀汀人, 2002 年毕业于中国药科大学, 现为福建医科大学药理学硕士研究生, 主要从事阿片类药物依赖性研究。Tel: (0591) 83574111 E-mail: honjohn@sina.com

* 通讯作者 Tel: (0591) 83569301 Fax: (0591) 83574658 E-mail: cch@mail.fjmu.edu.cn