

# 干姜对心肌细胞缺氧缺糖性损伤的保护及其抗血小板聚集功能的实验研究

谢 恬 钱宝庆 徐 红(浙江省杭州市中医院 杭州 310006)

干姜为传统温里药之一,具有温中散寒、回阳通脉之功效。本实验运用心肌细胞缺氧缺糖性损伤模型,观察了干姜对其保护作用。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

**1.1.1 干姜制备** 将干姜 60℃烘干,粉碎后过 100 目筛,制成粉末。

**1.1.2 动物** 大耳白兔,雄性,体重 2kg~3kg,浙江省中医药研究院动物中心提供。

**1.1.3 试剂** RPMI-1640 培养基(GIBCO 72N 8462),缺糖 Eagle 培养基(GIBCO 430-1600EB),小牛血清(杭州四季青生物工程公司 940310),LDH 测定盒(宁波慈城生化制剂厂 940810),去甲肾上腺素(5mg/2ml 武汉市药厂 940701),阿斯匹林(0.5g/片 华瑞制药公司 940815),ATV 消化酶(每 100ml 含 0.8g NaCl、0.04g KCl、0.1g 葡萄糖、0.058g NaHCO<sub>3</sub>、0.5g 胰蛋白酶、0.02g EDTA 实验室自制)。

**1.1.4 仪器** CO<sub>2</sub> 培养箱(美国 Forma Scientific 公司),SPA-3 型自动平衡血小板聚集仪(上海科达测试仪器厂生产), $\gamma$ -放射计数仪(FJ-2003/50A 国营二六二厂生产),自动生化分析仪(荷兰 Micro 产品)。

### 1.2 方 法

**1.2.1 心肌细胞培养** 按李映欧<sup>[1]</sup>等所建立的培养方法稍加改进。即:出生 2d~3d 的 Wistar 乳鼠处死后用 75%乙醇浸泡消毒后马上取出,切开胸部取心脏,切取心室部分,1640 培养液洗 3 次,剪成约 1mm<sup>3</sup> 的碎块,加入 ATV 消化酶,37℃水浴消化数次,至细胞块完全分散为止,细胞悬液用 1640 培养液

洗 1 次,以去除 ATV 消化酶,离心后弃上清,加入适量的 1640 培养液(含 10%小牛血清),接种至培养瓶中,置 37℃、5%CO<sub>2</sub> 条件培养,90min 后轻轻振摇培养瓶,倾出尚未贴壁的心肌细胞(先贴壁的为成纤维细胞)<sup>[2]</sup>,将细胞悬液计数后,调整浓度为 1×10<sup>6</sup>/ml,接种于培养瓶中,37℃、5%CO<sub>2</sub> 条件继续培养。

**1.2.2 体外培养心肌细胞缺氧缺糖性损伤模型的建立<sup>[1,3]</sup>** 取培养第 4d 的心肌细胞单层,按以下方法进行缺氧缺糖培养:(1)缺糖:实验采用缺糖无血清培养液(不含葡萄糖的 Eagle 培养液)代替 1640 培养液,(2)缺氧:将缺糖培养液预先用高纯氮气饱和 10min。实验时换用这种缺氧缺糖的培养液,培养瓶内立即充入氮气(1L/min 流量)30s,以更换瓶内空气,然后塞紧瓶塞培养。

**1.2.3 含干姜的大鼠血清的获得** 取若干只 Wistar 大鼠,以大鼠常用剂量的 3 倍(0.8g/kg)5ml,灌胃干姜,连续 3d,于第 3d 灌胃后 2h 取大鼠血清,56℃补体灭活,无菌保存备用。

**1.2.4 不同剂量的含干姜大鼠血清对培养乳鼠心肌细胞缺氧缺糖性损伤的保护作用** 取培养第 4d 的心肌细胞 20 瓶,其中 16 瓶为缺氧缺糖损伤模型细胞,分组如下:①模型细胞 4 瓶,各加入 1%浓度大鼠血清;②模型细胞 4 瓶,各加入 2%浓度大鼠血清;③模型细胞 4 瓶,各加入 4%浓度大鼠血清;④为模型细胞 4 瓶;⑤正常心肌细胞 4 瓶,分别于 6h 后取各瓶培养上清,测定心肌细胞释放入培养液中的 LDH 含量。

**1.2.5 LDH 含量测定** 采用速率法 LDH 测定盒说明书所述步骤测定每瓶培养液中的 LDH 含量,结果以 LDH 单位表示。

**1.2.6 干姜对人血小板聚集功能的抑制作用** 用生理盐水溶解研磨干姜粉末,3000rpm 离心 15min,无菌过滤制备成 0.1g/ml 溶液备用。参照药理实验方法<sup>[4]</sup>取健康助血员静脉血 10ml,用 3.8%枸橼酸钠溶液抗凝,以 1000rpm 离心 10min,取上清液即得多血小板血浆 (PRP),取 PRP 0.2ml 加入测量杯中,再加入磁性小棒一枚,之后加入所观察药物及致聚剂去甲肾上腺素,在 1100rpm 的机械搅拌下,记录血小板聚集率并记录聚集曲线。

**2 实验结果**

**2.1 含干姜大鼠血清对培养乳鼠心肌细胞缺氧缺糖性损伤的保护作用** 结果 3 个剂量血清组的 LDH 含量与模型组比较均明显下降,说明给药后细胞 LDH 释放减少,细胞损伤有所减轻。结果见表 1。

表 1 含干姜血清对心肌细胞释放 LDH 的影响

| 组 别      | 瓶 数 | LDH 含量(单位) |
|----------|-----|------------|
| 模型+1%鼠血清 | 4   | 59±11*     |
| 模型+2%鼠血清 | 4   | 62±9*      |
| 模型+4%鼠血清 | 4   | 51±12**    |
| 模型对照     | 4   | 87±13      |
| 正常对照     | 4   | 32±4***    |

注:与模型组比较 \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.01

**2.2 不同浓度干姜对人血小板聚集率的影响** 在 0.2mlPRP 中加入 10ml 不同浓度的干姜溶液,阳性对照孔加入 10ml 4%阿斯匹林,阴性对照孔加入 10ml 生理盐水,然后分别加入 10ml 50%去甲肾上腺素,记录血小板聚集率,绘制聚集曲线。从结果可以看出,干姜浓度在 2mg/ml 时,血小板聚集率降至 0,而浓度在 1.6mg/ml 和 0.8mg/ml 时,其血小板聚集率也明显低于生理盐水对照组。结果见图 1。

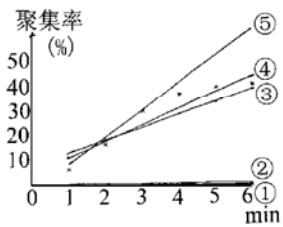


图 1 不同浓度干姜对人血小板聚集率的影响

注:①干姜 2mg/ml;②阿斯匹林 2mg/ml;  
③干姜 1.6mg/ml;④干姜 0.8mg/ml;⑤NS

**3 讨论**

在正常情况下,细胞 LDH 存在于细胞内,当心肌细胞缺氧缺糖而受到损伤后,胞内大量 LDH 漏出,从上清的 LDH 含量可以反映出细胞的损伤程度。本实验运用心肌细胞缺氧缺糖性损伤模型初步观察到实验组 LDH 释放明显下降,细胞损伤减轻,表明干姜确有保护心肌细胞的功效。去甲肾上腺素作为血小板致聚剂可快速使血小板聚集,人血浆在加入一定浓度的干姜后可明显抑制去甲肾上腺素对血小板的致聚作用,且抑制强度随浓度增加而增强,当干姜浓度为 2mg/ml 时可达 100%的抑制率,其效果可以同阿斯匹林相比。本实验为进一步临床研究干姜的回阳通脉作用提供了实验依据。

参考文献

- 1 李映欧,高凤辉,张金妹,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):92
- 2 李连达. 李映欧. 心肌细胞培养研究的进展. 细胞生物学杂志,1982,4(3):6
- 3 陈 红,章同华,尉挺,等. 水飞蓟宾对培养心肌细胞缺氧缺糖的保护作用. 第二军医大学学报, 1990,11(2):147
- 4 徐叔云. 药理实验方法学. 北京:人民卫生出版社,1985. 841

(收稿:1998-04-09)