

去甲乌药碱与 6-姜酚对心肌细胞的正性肌力作用

石晓路, 喻晓春, 崔海峰, 武乾, 孙明杰, 黄颖*
(中国中医科学院医学实验中心, 北京 100700)

[摘要] 目的: 研究去甲乌药碱(higenamine)与 6-姜酚(6-gingerol)单体及其配伍在正常心肌细胞的正性肌力作用。方法: 急性分离成年 SD 大鼠左心室肌细胞, 分别使用不同单体和单体间不同浓度的相互配伍作用于心肌细胞, 使用 Ion Optix 单细胞收缩与离子测量系统检测细胞的最大收缩舒张速率($\pm dp/dt$)、收缩幅度(ph/bl)、50% 收缩舒张时间常数(T_{50S}, T_{50D})的变化。结果: $0.03 \sim 1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 去甲乌药碱能够浓度依赖性增强心肌收缩力和最大收缩舒张速率, 起效浓度为 $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 能到最大效应, 其使收缩幅度增加为 234%, 最大收缩速率增加为 219%, 最大舒张速率增加为 272%, 其对 50% 收缩舒张常数无影响, EC_{50} 约为 $0.205 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $> 1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 即产生心肌毒性作用。3 ~ 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-姜酚对心肌细胞收缩功能无显著影响, 大于 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 使心肌细胞产生不节律收缩。相互配伍不能增强去甲乌药碱的强心作用。结论: 去甲乌药碱具有强心作用, 与 6-姜酚配伍不能显著增强去甲乌药碱的强心作用。

[关键词] 去甲乌药碱; 6-姜酚; 配伍; 正性肌力; 细胞收缩

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)14-0208-04

[doi] 10.11653/syfy2013140208

Positive Inotropic Effect of Higenamine and 6-gingerol on Cardiac Myocytes

SHI Xiao-lu, YU Xiao-chun, CUI Hai-feng, WU Qian, SUN Ming-jie, HUANG Ying*

(Experimental Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To study the positive inotropic effect of higenamine and 6-gingerol and their compatibility on normal cardiac myocytes. **Method:** The left ventricular cardiac myocytes were isolated from normal rat by traditional Langendorff method. The cardiac myocytes contraction were detected by using different monomers and their compatibility (Ion Optix cell dimensioning systems). The detections included the maximum velocity of systolic and diastolic ($\pm dp/dt$), contraction amplitude (ph/bl) and the time course constant of 50%

[收稿日期] 20121127(017)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81073089); 中国中医科学院自主选题(ZZ2011005)

[第一作者] 石晓路, 硕士, 研究实习员, 从事心血管药理, 药物筛选研究, Tel: 010-64014411-3330, E-mail: shixiaolu365@163.com

[通讯作者] * 黄颖, 博士, 助理研究员, 从事中药药理及方剂配伍研究, Tel: 010-64014411-3330, E-mail: huangying0518@126.com

[15] Banke N H, Wende A R, Leone T C, et al. Preferential oxidation of triacylglyceride-derived fatty acids in heart is augmented by the nuclear receptor PPARalpha [J]. Circ Res, 2010, 107(2): 233.

[16] Brandt J M, Djouadi F, Kelly D P. Fatty acids activate transcription of the muscle carnitine palmitoyltransferase I gene in cardiac myocytes via the peroxisome proliferator-activated receptor alpha [J]. J Biol Chem, 1998, 273(37): 23786.

[17] 方子龙, 陈敏, 张志文, 等. 耐力训练和注射丙酸睾酮对雄性大鼠肝脏、心脏和腓肠肌 PPAR α 表达的影响[J]. 天津体育学院学报, 2006, 21(3): 197.

[18] Jamshidi Y, Montgomery H E, Hense H W, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene regulates left ven-tricular growth in response to exercise and hypertension [J]. Circulation, 2002, 105(9): 1025.

[19] 高瑞芳, 常芸, 刘云清, 等. 力竭运动后大鼠心肌组织结构改变及不同时相 PPAR α 表达的变化[J]. 中国运动医学杂志, 2009, 28(3): 264.

[20] 姚绩伟, 杨永亮, 唐晖, 等. 罗汉果提取液对训练小鼠运动能力及心肌自由基代谢的影响[J]. 北京体育大学学报, 2009, 32(3): 67.

[责任编辑] 聂淑琴

systolic and diastolic (T_{50S} , T_{50D}). **Result:** 0.03-1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ higenamine enhances $\pm dp/dt$, ph/bl with a dose-dependent manner, but not influenced the T_{50S} and T_{50D} . The minimum effective concentration was 0.1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, EC_{50} was approximately 0.205 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, and 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ could get the maximum efficacy. The maximum efficacy of ph/bl , $+ dp/dt$, $- dp/dt$ was up to 234%, 219% and 272%. It's could induce the arrhythmia contraction when the dose was higher than 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. 3-30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-gingerol had not any effects of contractility on cardiac myocytes. However, the higher concentrations than 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ also induced the arrhythmia contraction. This research also investigated the 3, 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-gingerol compatibility with 0.1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and 0.3 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ higenamine. Mutual compatibility could not enhance the positive inotropic effect of higenamine. **Conclusion:** Higenamine plays the positive inotropic effect, and 6-gingerol has nether any effects on monomer, nor compatibility with higenamine.

[**Key words**] higenamine; 6-gingerol; compatibility; positive inotropic; cell contractility

心衰是一种进行性心脏功能损害,而心脏泵血功能障碍的主要原因则是心室肌细胞收缩能力的进行性减退。目前治疗心衰的一个重要方面是使用正性肌力药物有效缓解心衰的症状。心肌正性肌力药系指对心肌具有正性变力作用、能增强心肌收缩力,改善心脏泵血功能的一类药物。传统中医典籍中虽未定义心衰,但类似心衰症状的早有记载,诸如呼吸困难,端坐呼吸,紫绀等。中药的方剂和配伍制剂用于缓解心衰症状的治疗由来已久。近期的研究表明,许多中药的提取物或其有效成分配伍具有正性肌力作用^[1]。例如黄芪提取物可以改善阿霉素所致心衰大鼠的心功能^[2],附子与干姜的配伍可以加快心衰大鼠的心率、升高左心室内压、提高左心室内压最大上升和下降速率,改善心衰大鼠血流动力学^[3]。附子的有效成分去甲乌药碱和干姜的有效成分6-姜酚报道有心肌增强作用。但以往的研究尚多基于整体动物和离体心脏,未见在心肌细胞收缩能力的报道。本研究主要考察去甲乌药碱和6-姜酚及其相互配伍对心肌细胞收缩的作用。

1 材料

1.1 药物 去甲乌药碱(上海永恒生物科技有限公司,批号 H1-111859),6-姜酚(成都曼思特生物科技有限公司,批号 MUST-11030401)。

1.2 动物 SD 大鼠 250 ~ 300 g,雄性,清洁级,购于维通利华公司,生产许可证号 SCXK(京)2009-0007。

1.3 试剂 无钙台氏液(Tyrode solution, $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$): NaCl 140.0, KCl 5.4, MgCl_2 1.0, HEPEs 10.0, *D*-Glucose 10.0, NaOH 调至 pH 7.4。有钙台氏液:在无钙台氏液基础上添加 1.2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl_2 。KB 液($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$): KOH 80.0, KCl 40.0, KH_2PO_4 25.0, MgSO_4 3.0, *L*-glutamic 50.0, Taurine

20.0, HEPEs 10.0, EGTA 1.0, *D*-glucose 10.0, KOH 调至 pH 7.2。消化液:含 0.6% collagenase type 2 (Washington), 0.6% BSA (Sigma), 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Ca^{2+} 的无钙台氏液。以上未标注厂商均购自 Alfa。

1.4 仪器 美国 IonOptix 单细胞收缩与离子测量系统进行细胞收缩功能测量

2 方法

2.1 心肌细胞分离 取 250 ~ 300 g SD 雄性大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛溶液($0.35 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)麻醉,开胸,迅速取出带有一段主动脉的心脏,于 4 °C 台氏液清理和冲洗残余血液,并迅速挂于 Langendorff 装置上进行主动脉逆行灌注,在 36.7 °C, 6 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 恒速灌流。有钙台氏液灌流 3 min 后切换无钙台氏液灌流 5 min,之后切换为消化液。灌流中同步检测灌注压,当灌注压恢复到略低于初始灌流压力时终止消化,此时当心脏松软、颜色变浅。用 10 mL 无钙台氏液灌流冲洗残余消化液,然后在 KB 液中剪取左心室,用眼科镊撕碎,以吸管小心吹打,500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 40 s,弃去上清液,更换 KB 液 1 次,间隔 6 min 再次更换 KB 液。室温静置 1 h 后开始复钙,分别用 0.3, 0.6, 1.2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 含 Ca^{2+} 台氏液梯度复钙,间隔 6 min。随即可用于细胞收缩功能的测量。

2.2 心肌细胞收缩测量 将适量细胞置于两侧有铂金丝电极的浴槽内,显微镜下寻找横纹清晰、收缩稳定、边界清楚的长杆状细胞,于 40 × 物镜成像于计算机,使用 IonOptix 单细胞收缩检测系统实时跟踪细胞边缘记录收缩状态。灌流 1.2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Ca^{2+} 的氧饱和台氏液,灌流速度 1.5 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,给予频率 0.5 Hz,波宽 4 ms 的场刺激,细胞收缩幅度恒定 5 min 后分别给与含有不同浓度药物的台氏液。

2.3 统计方法 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计使用

SPSS 16.0 进行分析,独立样本和两组数据间的比较采用双侧 t 检验,以 $P < 0.05$ 为显著性差异。

3 结果

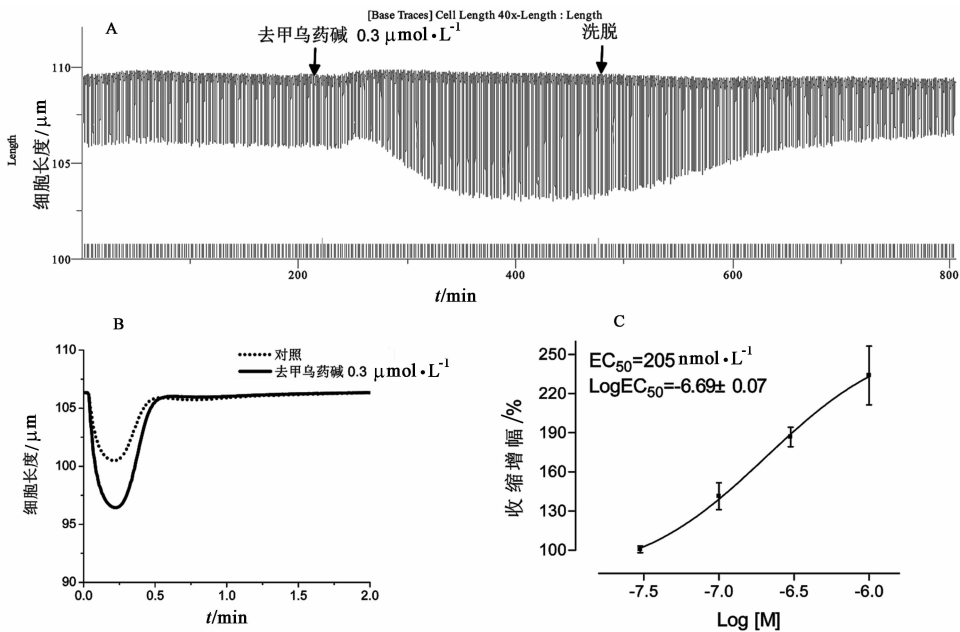
3.1 去甲乌药碱对心肌细胞收缩功能的影响 实验表明,去甲乌药碱能够增强心肌收缩力,起效迅

速,洗脱后能够恢复(图 1A)。0.03 ~ 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 能够浓度依赖性增加心肌细胞的收缩幅度、最大收缩舒张速率(表 1, 图 1)。其 EC_{50} 约为 0.205 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。高于 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 心肌细胞即产生毒性,表现为心肌细胞不节律收缩。

表 1 不同浓度去甲乌药碱对单个心肌细胞收缩动力学的影响 ($\bar{x} \pm s$)

浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	ph/bl	+ dp/dt	- dp/dt	$T_{50}\text{S}$	$T_{50}\text{D}$
0.03 ($n=8$)	1.01 \pm 0.03	0.95 \pm 0.03	0.88 \pm 0.07	1.09 \pm 0.03	1.06 \pm 0.02
0.1 ($n=9$)	1.41 \pm 0.10	1.30 \pm 0.09	1.34 \pm 0.06	1.05 \pm 0.03	1.11 \pm 0.04
0.3 ($n=14$)	1.87 \pm 0.08	1.93 \pm 0.11	2.19 \pm 0.20	0.97 \pm 0.04	0.99 \pm 0.03
1 ($n=10$)	2.34 \pm 0.23	2.19 \pm 0.19	2.72 \pm 0.38	0.99 \pm 0.06	1.04 \pm 0.05

注:给药后与给药前比值。ph/bl:收缩幅度百分比; + dp/dt:最大收缩速率;-dp/dt:最大舒张速率; $T_{50}\text{S}$:收缩至 50% 时间; $T_{50}\text{D}$:舒张至 50% 时间(表 2 ~ 3 同)。



A. 给药前后细胞收缩幅度与洗脱效果;B. 单细胞给药前后收缩幅度;C. 量效曲线。

图 1 去甲乌药碱对心肌细胞收缩功能的影响

3.2 6-姜酚对心肌细胞收缩功能影响 3 ~ 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-姜酚对心肌细胞收缩幅度,最大收缩舒张速率,50% 收缩舒张时间常数没有影响,不能增强

细胞收缩功能(表 2)。大于 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 能引起心脏的收缩功能障碍,表现为细胞的不节律收缩。

3.3 去甲乌药碱与 6-姜酚配伍对心肌细胞收缩功

表 2 不同浓度 6-姜酚对单个心肌细胞收缩动力学的影响 ($\bar{x} \pm s$)

浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	ph/bl	+ dp/dt	- dp/dt	$T_{50}\text{S}$	$T_{50}\text{D}$
3 ($n=10$)	0.98 \pm 0.04	1.00 \pm 0.08	1.04 \pm 0.11	1.04 \pm 0.03	0.97 \pm 0.05
10 ($n=9$)	1.00 \pm 0.03	1.03 \pm 0.04	0.94 \pm 0.07	1.01 \pm 0.03	1.00 \pm 0.02
30 ($n=7$)	0.99 \pm 0.07	0.89 \pm 0.11	1.09 \pm 0.21	1.10 \pm 0.02	0.97 \pm 0.08

能影响 选用 3, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-姜酚与 0.1, 0.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 去甲乌药碱进行两两配伍,结果显示,配伍药物依然能够增强心肌细胞的收缩幅度和最大收缩舒张速率,但与单用去甲乌药碱相比较没有显著性差异(表 3)。

4 讨论

以往学者在心肌生化和离体水平进行了中药强心功能的研究,证实中药能够不同程度的改善心力衰竭的症状,并阐述其作用机制^[4-5]。本研究在心肌细胞水平测定了药物对收缩功能的影响,其优势

表3 去甲乌药碱与6-姜酚配伍对单个心肌细胞收缩功能影响($\bar{x} \pm s$)

配伍	ph/bl	+ dp/dt	- dp/dt	T ₅₀ S	T ₅₀ D
0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 去甲乌药碱($n=9$)	1.41 \pm 0.10	1.30 \pm 0.09	1.34 \pm 0.06	1.05 \pm 0.03	1.11 \pm 0.04
0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 去甲乌药碱+3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-姜酚($n=9$)	1.26 \pm 0.04	1.17 \pm 0.06	1.38 \pm 0.07	1.06 \pm 0.02	0.97 \pm 0.01
0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 去甲乌药碱+10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-姜酚($n=9$)	1.41 \pm 0.08	1.30 \pm 0.06	1.34 \pm 0.11	1.05 \pm 0.03	1.11 \pm 0.04
0.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 去甲乌药碱($n=14$)	1.87 \pm 0.08	1.93 \pm 0.11	2.19 \pm 0.20	0.97 \pm 0.04	0.99 \pm 0.03
0.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 去甲乌药碱+3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-姜酚($n=8$)	1.84 \pm 0.14	1.85 \pm 0.15	2.46 \pm 0.37	0.96 \pm 0.02	1.02 \pm 0.02
0.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 去甲乌药碱+10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-姜酚($n=17$)	1.79 \pm 0.12	1.83 \pm 0.20	2.43 \pm 0.28	0.99 \pm 0.03	1.04 \pm 0.03

能够直接判定药物的作用部位,排除整体动物的个体差异和神经体液影响,利于更深入的机制研究。本研究使用附子、干姜的有效成分去甲乌药碱、6-姜酚,并绘制其量效曲线,选择合适浓度进行更精准的配伍研究。该研究方法所使用药品成分单一,较少干扰。细胞实验结果表明:0.1~1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 去甲乌药碱能够增强正常大鼠心肌细胞收缩力,但高于1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 能够引起心肌细胞的不节律收缩,表现其毒性作用。以往分子生物学结果显示,3~10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-姜酚能够升高心肌细胞 SEARCA2a 活性。但3~30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-姜酚急性灌流心肌细胞不能改变心肌细胞收缩力,并且30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的6-姜酚能够引起细胞的不节律收缩。所以配伍研究选用3,10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-姜酚与0.1,0.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 去甲乌药碱进行两两配伍。结果显示,配伍与单用去甲乌药碱无显著性差异。

国内外在去甲乌药碱的强心作用和机制上做了大量的工作^[6-7]。去甲乌药碱是非选择性 β 受体激动剂^[8],其在血管,支气管和心脏上广泛发挥作用。但以往的研究尚缺乏在心肌细胞水平的研究,也没有关于其量效曲线的报道。本研究首次报道在细胞水平起效浓度为0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,产生毒性的浓度为1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,EC₅₀约为0.205 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,治疗窗较窄。这为去甲乌药碱在整体动物和临床用药提供重要的理论参考。

分子生物学数据显示6-姜酚在心肌细胞能够提高Ca-ATPase活性^[9-11],增强肌浆网的钙回摄功能,理论上能够提高胞浆钙的消除速率,增强舒张速率。但在心肌细胞的实验表明急性灌流6-姜酚不能增强心肌收缩力和舒张功能。

展海霞等发现附子能够增强急性心衰大鼠的心脏功能,附子与干姜的合煎剂较单用附子作用增强^[3]。中药的作用机制复杂,在体或离体环境下可能会对药物作用产生较大影响。在正常动物和疾病动物的不同状态下药物成分代谢也会存在较大差异,急性的给药方式有时难以观察药物作用,其可能发挥作用可能需要长时间的蛋白调节从而达到增强

心脏功能。因此进一步研究需要在心衰模型动物或长期给药实验去探索去甲乌药碱、6-姜酚及其配伍治疗心衰的作用机制。

[参考文献]

- [1] 王强,程胜军. 中医药防治慢性心力衰竭临床研究概况[J]. 中医杂志, 2008, 49(7):656.
- [2] 王玉敏,马琰岩,高俊虹,等. 黄芪总提取物及其有效成分改善阿霉素致心衰的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(7):208.
- [3] 展海霞,彭成. 附子与干姜配伍对心衰大鼠血流动力学的影响[J]. 中药药理与临床, 2006, 22(1):42.
- [4] 于春泉,李欣桐,史芳,等. 芪苈强心胶囊对心气虚型慢性心力衰竭大鼠心肌腺苷酸含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(3):174.
- [5] 李欣志,刘建勋,尚晓泓. 参附强心胶囊对犬急性心力衰竭的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(4):29.
- [6] Kontani H, Koshiura R. Effects of local anesthetics, tetrodotoxin, aconitine and verapamil on the mechanoreceptors of isolated frog heart [J]. Jpn J Pharmacol, 1983, 33(3):503.
- [7] 向荣,徐江涛,易宁育,等. 去甲乌药碱的药理作用与心脏 β -AR关系的初步研究[J]. 中国药理学通报, 1995, 11(2):133.
- [8] Ueki T, Akaishi T, Okumura H, et al. Biphasic tracheal relaxation induced by higenamine and nantenine from *Nandina domestica* Thunberg [J]. J Pharmacol Sci, 2011, 115(2):254.
- [9] Ohizumi Y, Sasaki S, Shibusawa K, et al. Stimulation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase by gingerol analysis[J]. Biol Pharm Bull, 1996, 19(10):1377.
- [10] Antipenko A Y, Spielman A I, Kirchberger M A. Interactions of 6-gingerol and ellagic acid with the cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase [J]. J Pharmacol Exp Ther, 1999, 290(1):227.
- [11] Jiang S Z, Wang N S, Mi S Q. Plasma pharmacokinetics and tissue distribution of [6]-gingerol in rats[J]. Biopharm Drug Dispos, 2008, 29(9):529.

[责任编辑 聂淑琴]