

· 论 著 ·

参麦注射液 生长激素 硫酸锌 维生素 C 对 心肌细胞存活力的保护作用

马沛然, 王汉森, 李刚

(山东省立医院儿科, 山东 济南 250021)

【摘 要】 目的 氧自由基和血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)过多是造成心肌损害的重要机制,为有效保护心肌,为心肌损害治疗开辟一个新途径,本文研究参麦注射液(SMI)、生长激素(GH)、硫酸锌(ZnSO₄)、维生素C(VitC)对过氧化氢(H₂O₂)或AngⅡ损伤下降的心肌细胞存活力(CMV)的影响。方法 用新生大鼠心肌细胞加入H₂O₂(200 μmol/L, 500 μmol/L)或AngⅡ(10⁻⁶ mol/L, 10⁻⁷ mol/L)使CMV下降作为对照组(共4组);在加入H₂O₂或AngⅡ的同时加入SMI(5 ml/L和10 ml/L), VitC(50 mg/L), ZnSO₄(15 μmol/L和60 μmol/L)或GH(250 μmol/L和500 μmol/L)作为保护组。检测各组在加药24 h后的CMV增高率。结果 SMI, GH, ZnSO₄和VitC均可显著提高因H₂O₂损伤而下降的CMV增高率。以SMI 10 ml/L的效果最好;其次为ZnSO₄ 60 μmol/L;再其次为SMI 5 ml/L, VitC 50 mg/L;最差为GH 500 μmol/L, GH 250 μmol/L和ZnSO₄ 15 μmol/L,其中SMI 5 ml/L和VitC 50 mg/L间差异无显著性,后3者间差异也无显著性。SMI和GH可显著提高AngⅡ所致的CMV下降,以SMI 10 ml/L效果最好;其余依次为SMI 5 ml/L, GH 500 μmol/L和GH 250 μmol/L,但后2者间差异无显著性(P>0.05)。结论 SMI和GH对因H₂O₂或AngⅡ损伤下降的CMV有显著提高作用。

[中国当代儿科杂志, 2003, 5(5): 443-446]

【关 键 词】 心肌细胞存活力;参麦注射液;硫酸锌;过氧化氢;血管紧张素Ⅱ

【中图分类号】 R654.2 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1008-8830(2003)05-0443-04

Protective Effects of Shenmai Injection, Growth Hormone, Zinc Sulfate and Vitamin C on Cardiac Myocytes Viability

Pei-Ran MA, Han-Sen WANG, Gang LI. Department of Pediatrics, Shangdong Provincial Hospital, Jinan 250021, China

Abstract: **Objective** The increase of oxygen-derived free radicals (OFR) or angiotensin Ⅱ (Ang Ⅱ) in blood is one of the important causative agents of myocardium lesions. To develop a remedy for treatment of myocardium lesions induced by OFR or Ang Ⅱ, this study aims at exploring the protective effects of shenmai injection (SMI), growth hormone (GH), zinc sulfate (ZnSO₄) and vitamin C (Vit C) on the cardiac myocytes injured by hydrogen peroxide (H₂O₂) or Ang Ⅱ. **Methods** H₂O₂ with the concentrations of 250 and 500 μmol/L or Ang Ⅱ with the concentrations of 10⁻⁶ and 10⁻⁷ mol/L were added respectively to the cardiac myocytes of neonatal rats so as to reduce the cardiac myocytes viability (CMV). The injured cardica myocytes were administrated respectively with 5 ml/L and 10 ml/L (concentration) of SMI, 50 mg/L of Vit C, 15 μmol/L and 60 μmol/L of ZnSO₄, and 250 μmol/L and 500 μmol/L of GH. The increasing rate of CMV was measured at 24 h after medication. **Results** SMI, GH, ZnSO₄ and VitC could all significantly elevate the increasing rate of CMV which had been decreased by H₂O₂ injury. The best effect was made by the SMI 10 ml/L group, followed in turn the ZnSO₄ 60 μmol/L, SMI 5 ml/L, Vit C 50 mg/L, GH 500 μmol/L, 15 μmol/L ZnSO₄ and 250 μmol/L GH groups. There was no significant difference between the SMI 5 ml/L group and VitC 50 mg/L group. Nor was there among the GH 500 μmol/L, GH 250 μmol/L and ZnSO₄ 15 μmol/L groups. The CMV which had been decreased by Ang Ⅱ injury was significantly increased after administrating SMI and GH. The best effect

[收稿日期] 2003-01-13; [修回日期] 2003-04-28

[基金项目] 山东省科委课题(No. 1999BBIDBAI)

[作者简介] 马沛然(1931-),男,大学,教授,博士生导师。主攻方向:小儿心血管疾病临床与基础研究。

[通讯作者] 马沛然,山东省济南市山东省立医院儿科,邮编:250021。

was made by the SMI 10 ml/L group, followed in turn the SMI 5 ml/L, GH 500 $\mu\text{mol/L}$ and GH 250 $\mu\text{mol/L}$ groups. No difference was found among the last two groups. **Conclusions** SMI, GH, ZnSO_4 and VitC could all increase CMV which had been decreased by H_2O_2 injury, and both SMI and GH could increase CMV which had been decreased by Ang II injury. [Chin J Contemp Pediatr, 2003, 5(5): 443-446]

Key words: Cardiac myocytes viability; Shenmai injection; Zinc sulfate; Hydrogen peroxide; Angiotensin II

病毒性心肌炎(VMC)、扩张性心肌病(DCM)、心力衰竭(HF)及其他严重疾病都可以引起心肌损害。氧自由基(OFR)和血管紧张素 II (Ang II) 过多是造成心肌损害发生和发展的重要机制。为有效保护心肌、减少 OFR 和 Ang II 对心肌的损害, 为心肌疾病治疗开辟一个新途径, 本研究用不同浓度的参麦注射液(SMI)、生长激素(GH)、硫酸锌(ZnSO_4)和维生素 C(VitC)研究其对不同浓度过氧化氢(H_2O_2)和 Ang II 所致心肌损害的保护作用。

1 资料与方法

1.1 新生大鼠心肌细胞培养

用 Song 的心肌细胞培养法^[1]。取 1~3 d 龄 Wistar 大鼠, 实验采用培养 72 h 的心肌细胞, 采用免疫细胞化学方法进行心肌细胞鉴定, 心肌细胞纯度达 90% 以上。

1.2 H_2O_2 对心肌细胞损伤及药物保护作用

根据药物种类与浓度共分 16 组。第 1 组(对照 1 组) H_2O_2 200 $\mu\text{mol/L}$, 第 2 组(对照 2 组) H_2O_2 500 $\mu\text{mol/L}$ 。第 3~16 组为保护组, 第 3 组 H_2O_2 200 $\mu\text{mol/L}$ + VitC 50 mg/L, 第 4 组 H_2O_2 500 $\mu\text{mol/L}$ + VitC 50 mg/L, 第 5 组 H_2O_2 200 $\mu\text{mol/L}$ + SMI 5 ml/L, 第 6 组 H_2O_2 500 $\mu\text{mol/L}$ + SMI 5 ml/L, 第 7 组 H_2O_2 200 $\mu\text{mol/L}$ + SMI 10 ml/L, 第 8 组 H_2O_2 500 $\mu\text{mol/L}$ + SMI 10 ml/L, 第 9 组 H_2O_2 200 $\mu\text{mol/L}$ + GH 250 $\mu\text{mol/L}$, 第 10 组 H_2O_2 500 $\mu\text{mol/L}$ + GH 250 $\mu\text{mol/L}$, 第 11 组 H_2O_2 200 $\mu\text{mol/L}$ + GH 500 $\mu\text{mol/L}$, 第 12 组 H_2O_2 500 $\mu\text{mol/L}$ + GH 500 $\mu\text{mol/L}$, 第 13 组 H_2O_2 200 $\mu\text{mol/L}$ + ZnSO_4 15 $\mu\text{mol/L}$, 第 14 组 H_2O_2 500 $\mu\text{mol/L}$ + ZnSO_4 15 $\mu\text{mol/L}$, 第 15 组 H_2O_2 200 $\mu\text{mol/L}$ + ZnSO_4 60 $\mu\text{mol/L}$, 第 16 组 H_2O_2 500 $\mu\text{mol/L}$ + ZnSO_4 60 $\mu\text{mol/L}$ 。

1.3 Ang II 对心肌细胞损伤及药物保护作用

根据药物种类与浓度共分 10 组。第 17 组(对照组) Ang II 10^{-7} mol/L, 第 18 组(对照组) Ang II 10^{-6} mol/L。第 19~26 组为保护组。第 19 组 Ang II 10^{-7} mol/L + SMI 5 ml/L, 第 20 组 Ang II

10^{-6} mol/L + SMI 5 ml/L, 第 21 组 Ang II 10^{-7} mol/L + SMI 10 ml/L, 第 22 组 Ang II 10^{-6} mol/L + SMI 10 ml/L, 第 23 组 Ang II 10^{-7} mol/L + GH 250 $\mu\text{mol/L}$, 第 24 组 Ang II 10^{-6} mol/L + GH 250 $\mu\text{mol/L}$, 第 25 组 Ang II 10^{-7} mol/L + GH 500 $\mu\text{mol/L}$, 第 26 组 Ang II 10^{-6} mol/L + GH 500 $\mu\text{mol/L}$ 。

1.4 心肌细胞存活力(CMV)测定和增高率计算

每次在加入药物后 24 h 测定 CMV。依据 MTT 法^[2]检测 CMV 的 A 值, 按照公式: 药物保护组 A 值 - H_2O_2 组或 Ang II 组 A 值 / H_2O_2 组 A 值 $\times$ 100%, 计算出药物对 CMV 的增高率。每组均检测 10 次, 取平均值。

1.5 药物来源

GH 由金磊制药公司提供。SMI 由四川雅安三九药业公司提供, 含总皂甙以人参皂甙计不少于 0.8 mg/ml。

1.6 统计学方法

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用 t 检验。

2 结果

2.1 SMI, GH, ZnSO_4 和 VitC 对 H_2O_2 损伤心肌细胞的保护作用

对照 1 组和对照 2 组的 CMV 增高率为 0。SMI (5 ml/L 或 10 ml/L)、GH (250 $\mu\text{g/L}$ 或 500 $\mu\text{g/L}$)、 ZnSO_4 (15 $\mu\text{mol/L}$ 或 60 $\mu\text{mol/L}$)、VitC (50 mg/L) 均能显著提高 CMV ($P < 0.01$)。第 7, 8 组 (SMI 10 ml/L) 效果最好, 其次为 15, 16 组 (ZnSO_4 60 $\mu\text{mol/L}$), 再其次为第 5, 6 组 (SMI 5 ml/L) 和第 3, 4 组 (VitC 50 mg/L), 效果最差为第 9~14 组 (GH 500 $\mu\text{mol/L}$, GH 250 $\mu\text{mol/L}$, ZnSO_4 15 $\mu\text{mol/L}$)。见表 1。

2.2 SMI 和 GH 对 Ang II 所致心肌细胞损伤的保护作用

对照 17 组和对照 18 组的 CMV 增高率为 0。SMI (5 ml/L 或 10 ml/L)、GH (250 $\mu\text{g/L}$ 或 500 $\mu\text{g/L}$) 均能显著提高受 Ang II (10^{-6} mol/L 或 10^{-7} mol/L) 损伤而下降的 CMV ($P < 0.01$)。SMI

10 ml/L 的 CMV 增高率显著优于 5 ml/L。SMI 效果优于 GH。GH 500 $\mu\text{g/L}$ 与 GH 250 $\mu\text{g/L}$ 的保护作用差异无显著性 ($P > 0.05$)。见表 2。

表 1 SMI、GH、ZnSO₄、VitC 对 H₂O₂ 损伤心肌细胞的保护作用

Table 1 Protective effect of SMI, GH, ZnSO₄, VitC on myocardium lesions induced by H₂O₂

(n=10, $\bar{x} \pm s$, %)			
组别	CMV 增高率	组别	CMV 增高率
对照 1 组	0	对照 2 组	0
第 3 组	23.7 $\pm$ 3.8 ^{a,b}	第 4 组	31.6 $\pm$ 4.1 ^{a,e}
第 5 组	24.9 $\pm$ 5.7 ^{a,b}	第 6 组	31.5 $\pm$ 4.2 ^{a,e}
第 7 组	43.1 $\pm$ 4.6 ^{a,b,c,d}	第 8 组	52.3 $\pm$ 4.6 ^{a,e,f,g}
第 9 组	17.1 $\pm$ 6.4 ^a	第 10 组	21.1 $\pm$ 4.6 ^a
第 11 组	18.5 $\pm$ 4.2 ^a	第 12 组	23.5 $\pm$ 2.0 ^a
第 13 组	16.2 $\pm$ 4.4 ^a	第 14 组	22.0 $\pm$ 4.5 ^a
第 15 组	32.5 $\pm$ 5.2 ^{a,b,c}	第 16 组	39.5 $\pm$ 7.0 ^{a,e,f}

注: a 与对照 1、2 组比 $P < 0.01$; b 与第 9、11、13 组比 $P < 0.05$; c 与第 3、5 组比 $P < 0.05$; d 与第 15 组比 $P < 0.05$; e 与第 10、12、14 组比 $P < 0.05$; f 与第 4、6 组比 $P < 0.05$; g 与第 16 组比 $P < 0.05$

表 2 SMI 和 GH 对 Ang II 所致心肌细胞损伤的保护作用

Table 2 Protective effect of SMI and GH on the myocardium lesions induced by Ang II

(n=10, $\bar{x} \pm s$, %)			
组别	CMV 增高率	组别	CMV 增高率
对照 17 组	0	对照 18 组	0
第 19 组	22.3 $\pm$ 2.1 ^a	第 20 组	21.3 $\pm$ 1.6 ^a
第 21 组	37.4 $\pm$ 3.3 ^{a,b}	第 22 组	52.7 $\pm$ 5.1 ^{a,c}
第 23 组	15.7 $\pm$ 1.5 ^{a,b,d}	第 24 组	16.7 $\pm$ 1.3 ^{a,c,e}
第 25 组	16.1 $\pm$ 1.5 ^{a,b,d}	第 26 组	17.4 $\pm$ 1.7 ^{a,c,e}

注: a 与对照 17、18 组比 $P < 0.01$; b 与 19 组比 $P < 0.05$; c 与 20 组比 $P < 0.05$; d 与 21 组比 $P < 0.05$; e 与 22 组比 $P < 0.05$

3 讨论

过氧化物过多是造成心肌损伤发生与发展的一个重要因素。H₂O₂ 对心肌损伤的实验研究大多数学者都采用低浓度 ($< 1\ 000\ \mu\text{mol/L}$), 此时即有显著的心肌细胞损伤性变化^[3,4]。本研究采用 200 $\mu\text{mol/L}$ 和 500 $\mu\text{mol/L}$ 的 H₂O₂ 均造成了 CMV 显著下降。心肌疾病使心肌能量的产生和利用均出现障碍, 肾素-血管紧张素-醛固酮系统 (RAAS) 的激

活特别是心肌局部的 RAAS 激活, 在心肌功能由代偿向失代偿转化过程中发挥重要作用^[5]。Ang II 是 RAAS 中的主要活性物质, 可造成心肌损害^[6]。能否对心肌细胞活力产生影响, 尚无文献报告, 本研究使用 Ang II $10^{-6}\ \text{mol/L}$ 和 $10^{-7}\ \text{mol/L}$ 作用于大鼠心肌细胞 24 h 后均可使 CMV 显著下降。

早在 60 年代即发现大剂量维生素 C 对治疗克山病、心源性休克有非常显著疗效。80 年代发现大剂量维生素 C 可使 VMC 患者的 OFR 下降, SOD 上升, 但疗效不如克山病那么显著。1993 年崔小岱等研究维生素 C 对 CoxB 感染培养心肌细胞的保护作用, 发现维生素 C 浓度在 71~284 $\mu\text{mol/L}$ (12.5~50 mg/L) 时效果最好。1997 年张福明用同样的实验方法证明 50 mg/L 的维生素 C 对体外培养正常心肌细胞促生长作用最好^[6]。由于维生素 C 酸性较强, 剂量过大可损伤心肌细胞, 因此本研究亦采用 50 mg/L 维生素 C 研究其对 H₂O₂ 损伤心肌细胞的保护作用, 并与其他药物对比。

GH 对心肌疾病的确切疗效及机制尚未阐明^[7]。GH 对 OFR 和 Ang II 所致的心肌细胞损伤是否有保护作用, 至今尚缺乏研究。袁国祥等发现 250 $\mu\text{mol/L}$ 和 500 $\mu\text{mol/L}$ 生长激素能诱导心肌细胞外信号调节酶激活^[8], 因此本研究亦采用 250 $\mu\text{mol/L}$ 和 500 $\mu\text{mol/L}$ 两个浓度的 GH。

SMI 由人参、麦冬组成, 有抗氧化、清除自由基的作用。1996 年李亚蕊等报道 SMI 对 VMC 患儿有明显疗效, 能够显著改善患儿的心脏功能, 但缺少实验研究基础。我们经过预试验发现 SMI 5 ml/L 和 10 ml/L 可减轻 H₂O₂ 和 Ang II 所致的 CMV 下降。

锌与体内多种酶的活性有关, 也是生物膜的重要组成部分, 能够有效地改善抗氧化系统的协同作用。苗智慧通过培养液中加入黄嘌呤和黄嘌呤氧化酶系统成分造成心肌细胞损伤, 以电生理的方法显示锌对心肌细胞损伤有保护作用^[9]。该研究用的硫酸锌为 $1.91 \times 10^{-3}\ \text{mmol/L}$, 相近于 20 $\mu\text{mol/L}$ 。因此本研究采用 15 $\mu\text{mol/L}$ 和 60 $\mu\text{mol/L}$ 的硫酸锌。

本研究结果显示 SMI、GH、ZnSO₄ 和 VitC 都能显著提高 H₂O₂ 损伤所致的 CMV 下降。上述药物效果最好为 SMI 10 ml/L, 其次为 ZnSO₄ 60 $\mu\text{mol/L}$, 其余依次为 SMI 5 ml/L, VitC 50 mg/L 和 GH 500 $\mu\text{mol/L}$, ZnSO₄ 15 $\mu\text{mol/L}$, GH 250 $\mu\text{mol/L}$ 。SMI 5 ml/L 和 VitC 50 mg/L 之间差异无显著性, GH 500 $\mu\text{mol/L}$, ZnSO₄ 15 $\mu\text{mol/L}$ 和 GH 250 $\mu\text{mol/L}$ 之间差异亦无显著性。

SMI 和 GH 能显著提高 Ang II 损伤所致的 CMV 下降,以 SMI 10 ml/L 效果最好;其余依次为 SMI 5 ml/L, GH 500 $\mu\text{mol/L}$ 和 GH 250 $\mu\text{mol/L}$, (但后 2 者间差异无显著性)。

总之 SMI, GH 对 H_2O_2 和 Ang II 所致的心肌细胞损伤有保护作用,其中以 SMI 疗效最好。

[参 考 文 献]

- [1] Song W, Lu Y, Feu Q. Tumor necrosis factor- α induces apoptosis via inducible nitric oxide synthase in neonatal mouse cardiomyocytes [J]. *Cardiovas Res*, 2000, 45(3): 595-599.
- [2] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. *J Immunol Methods*, 1983, 65(1): 55-63.
- [3] Cook SA, Sugden PH, Clerk A. Regulation of bcl-2 family proteins during development and in response to oxidative stress in cardiac myocytes [J]. *Circ Res*, 1999, 85(8): 940-949.
- [4] Harsdorf R, Li PF, Dietz R. Signaling pathway in reactive oxygen species-induced cardiomyocyte apoptosis [J]. *Circulation*, 1999, 99(12): 2934-2941.
- [5] Kim S, Iwao H. Molecular and cellular mechanisms of Ang II-mediated cardiovascular and renal diseases [J]. *Pharmacol Rev*, 2000, 52(1): 11-33.
- [6] 张福明,王相峰,张淑琴. 维生素 C 对柯萨奇 B3 病毒感染的心肌细胞的保护作用 [J]. 白求恩医科大学学报, 1997, 23(4): 379-380.
- [7] Lombardi G, Colao A, Ferone D, Marzullo P, Orzio F, Longobardi S, et al. Effect of growth hormone on cardiac function [J]. *Horm Res*, 1997, 48(suppl 4): 38-42.
- [8] 李耀平,尹新华,柳延春,周令望,刘艺,于维汉. IGF-1 对 ISP 损伤大鼠心肌 MDA、GSH-PX 变化影响的实验研究 [J]. 中国地方病学杂志, 2000, 19(2): 92-93.
- [9] 苗智慧,刘京生,王洪占,江岩,于占文. 在培养细胞中锌的抗氧自由基损伤作用的观察 [J]. 中国病理生理杂志, 1992, 8(1): 64-66.

(本文编辑:俞燕)

· 消息 ·

欢迎订阅 2004 年《实用儿科临床杂志》

《实用儿科临床杂志》是临床医学类核心期刊、中国科技论文统计源期刊,本刊于 2003 年 1 月起改为月刊,大 16 开,80 页,每月 20 日出版,国内外公开发行。国际标准连续出版物编号:ISSN 1003-515X,国内统一刊号:CN 41-1106/R,国外发行:中国国际图书贸易总公司,邮发代号:M1763。本刊的办刊宗旨为贯彻党和国家的卫生工作方针、政策,贯彻理论与实践、普及与提高相结合的方针,反映国内外儿科医疗、科研等方面的新技术、新成果及新进展,促进学术交流。辟有专家论坛、论著、小儿神经基础与临床、实验研究、药物与临床、儿童保健、误诊分析、讲座与综述、小儿外科、病例(理)讨论、病例报告、临床应用研究(基层园地)等栏目。邮发代号:36-102,欢迎广大儿科医务工作者和医学科教研人员、各级图书馆(室)、科技情报研究所订阅。可通过全国各地邮局订购,也可与本刊编辑部联系订购。定价:6.50 元/期,78.00 元/年。联系地址:河南省新乡市新乡医学院《实用儿科临床杂志》编辑部,邮编:453003,联系人:王晓华。电话/传真:0373-3029144, E-mail: syqk@chinajournal.net.cn。

《实用儿科临床杂志》编辑部