

心甙 neriifolin 对紅細胞鉀离子轉运的 影响及其与动物致死作用的关系

江明性 黃明明 趙慧彬*

(武汉医学院药理学教研组)

提要 以冷藏又經温育的人血,观察 neriifolin 对紅細胞鉀离子轉运的影响及其与动物致死作用的关系,以哇巴因(ouabain)和地吉妥辛(digitoxin)作对照,比較三种心甙阻抑鉀內流的作用和对豚鼠的致死作用。发现这两种作用都以哇巴因为最强,neriifolin 次之,地吉妥辛最弱,两种作用强度的順序是相符的。結合文献討論了相符的理論根据。本文提出,是否可以将心甙阻抑紅細胞鉀內流的作用作为心甙生物活性的另一指标。

曾有报告称紅細胞在冷藏时失鉀(鉀外流),經温育后又能摄鉀(鉀內流)^[1,2]。心甙能阻抑温育时鉀离子的內流^[3]。心甙的这种阻鉀內流作用和它的強心作用在化学結構上有相同的要求,都需有一个与甾核在其 17 位碳上相連接的內酯环^[4]。虽某些非心甙的內酯如 angelicalacton 也能阻抑鉀离子內流,但其作用甚为微弱,不够明显,因而认为心甙阻抑紅細胞鉀离子內流的作用是与其对心脏的作用有关的^[5]。Machova 也曾証明某些心甙的阻抑鉀离子內流的作用和它們对猫的致死量(心脏中毒作用)之間有平行关系^[6]。

本工作旨在观察心甙 neriifolin 的阻抑鉀离子內流的作用及其对动物(豚鼠)的致死作用,討論这两种作用間的关系及将心甙阻抑鉀离子內流的作用与其生物活性相联系的可能性。以哇巴因 ouabain 和地吉妥辛 digitoxin 作对照,比較三种心甙的作用。

材 料 和 方 法

用血庫人血,以肝素抗凝(50单位/毫升),先取 5 毫升,离心 15 分钟(3000 轉/分),分离血浆,測所含鉀量。将余血冷藏于冰箱,温度保持在 2—4°C 之間,每天取血样一次,測血浆中鉀量。冷藏五天后,进行心甙阻鉀內流的实验。

实验时,将冷藏血置于冰浴中迅速分装,每 5 毫升一份,每份中加入 10% 的葡萄糖液 0.1 毫升及受試药物的溶液。

取 12 份血样,其中 2 份作对照,各加生理盐水 0.1 毫升,其他 10 份按 5 种不同剂量分別加入受試心甙,每一剂量試驗 2 份,药液以生理盐水配成为 0.1 毫升。加入药液后,装入小瓶中,温育于 Warburg 組織呼吸器之水浴中,保持温度于 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$,分別在 2 及 4 小时后取出样品,測血浆中鉀离子浓度。

血浆中鉀离子浓度都以 Lange-5 型火焰光度計与标准液对比讀数測定之。

本文于 1964 年 1 月 13 日收到。

* 武昌药剂检验专科学校进修教师。

根据所得数值,计算出温育 4 小时后每一心甙阻钾内流达半数(50%)时所需的剂量,折合为克分子浓度,称为半数抑制浓度。

分别试验三种心甙的 5 种不同剂量,它们是: neriifolin, 0.07, 0.22, 0.66, 2.0, 6.0 微克/5.2 毫升; 哇巴因, 0.0375, 0.075, 0.15, 0.3, 0.6 微克/5.2 毫升; 地吉妥辛, 1.25, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0 微克/5.2 毫升。

豚鼠致死作用按中华人民共和国药典中洋地黄生物检定的豚鼠法测定,求其致死量。

实 验 结 果

(一) 冷藏及温育时血浆钾量的变化

根据 18 次人血在冷藏过程中的测定,发现血浆钾逐日增加,以毫当量/升计算,第一天为 4.98 ± 0.269 (标准误),第二天为 9.25 ± 0.626 ,第三天为 12.3 ± 0.843 ,第四天为 16.5 ± 1.084 ,第五天为 17.51 ± 1.136 ,第六天为 19.7 ± 1.4 ,说明冷藏时钾外流。

冷藏血经温育后,血浆钾不断减少,温育 2 小时,减少 16.48% (自 19.7 降为 16.46 毫当量/升)。温育 4 小时,减少 27.3% (自 19.7 降为 14.33 毫当量/升)。说明温育时发生了钾离子的内流。

(二) 冷藏血温育时 neriifolin 对其钾离子转运的影响

按上述方法,取冷藏血加入不同剂量的心甙 neriifolin 后,温育 2 及 4 小时,测血浆中钾离子浓度,六次实验的结果列于表 1。

表 1 Neriifolin 对温育后血浆钾离子转运的影响

给 药 微克/5.2毫升	温育前冷藏血 浆中钾浓度 毫当量/升	温育 2 小时血 浆中钾浓度 毫当量/升	温 育 4 小 时 后			
			血浆中钾浓度 毫当量/升	钾内流入红细胞, 毫当量/升	钾内流被抑量 毫当量/升	内流被抑 百分率,%
—	17.15	14.64	12.92	4.23	0	0
0.07	17.15	14.91	13.49	3.66	0.57	13.4
0.22	17.15	15.45	14.28	2.87	1.36	32.1
0.66	17.15	16.40	16.04	1.11	3.12	73.7
2.0	17.15	16.97	17.46	-0.31	—	100
6.0	17.15	17.49	19.55	-2.4	—	100

温育血中加入不同剂量的 neriifolin 后,血浆中钾量减少的程度,有所减弱,说明 neriifolin 能阻钾的内流,这种作用与剂量有关,剂量愈大,抑阻愈甚,药物浓度达 2.0 微克/5.2 毫升时,已完全抑制内流,此时钾的外流未被抑制,乃使血浆中钾量反较未给心甙时为高。

计算钾内流被抑制的程度,见剂量为 0.22 微克/5.2 毫升时,抑制内流达 32.1%,剂量为 0.66 微克/5.2 毫升时,抑制达 73.7%。据此并按以下算式,求得 neriifolin 的半数抑制浓度平均为 0.393 ± 0.033 微克/5.0 毫升(标准误),可信限率为 21.6%,此浓度相当于 1.4×10^{-7} 克分子(分子量为 534.67)。

$$\begin{aligned} \text{半数抑制浓度} &= c_1 + (R - R_1) \left(\frac{c_2 - c_1}{R_2 - R_1} \right) \quad \text{或} \\ &= c_2 - (R_2 - R) \left(\frac{c_2 - c_1}{R_2 - R_1} \right) \end{aligned}$$

其中, c_1 为抑制率较 50% 为小的一个最高浓度, 本例中是 0.22; c_2 为抑制率较 50% 为大的一个最低浓度, 本例是 0.66; R_1 为较 50% 为小的一个最大抑制率, 本例是 32.1; R_2 为较 50% 为大的一个最小抑制率, 本例是 73.7; R 为半数抑制率 50.

(三) 冷藏血温育时哇巴因和地吉妥辛对其钾离子转运的影响

不同剂量的哇巴因和地吉妥辛加入温育血液后, 也使血浆钾量下降的程度有所减弱。哇巴因的半数抑制浓度平均为 0.117 ± 0.0056 微克/5.0 毫升 (标准误), 可信限率为 12.3%。此浓度相当于 3.2×10^{-8} 克分子, 与文献^[5]所称的 4.0×10^{-8} 克分子相近。地吉妥辛的半数抑制浓度平均为 3.50 ± 0.367 微克/5.0 毫升 (标准误), 可信限率为 26.9%。此浓度相当于 9.2×10^{-7} 克分子, 也接近文献^[5]所称的 12×10^{-7} 克分子。

(四) 三种心甙对豚鼠的致死量

按我国药典的方法, 测得 neriifolin 的致死量是 0.95 ± 0.045 毫克/公斤 (标准误), 哇巴因为 0.378 ± 0.124 毫克/公斤, 地吉妥辛为 1.786 ± 0.082 毫克/公斤*。

讨 论

已知红细胞在冷藏时失钾(钾外流), 温育后又摄钾(钾内流)^[1,2]。钾外流是自高浓度处流向低浓度处, 是一种顺浓度梯度的流动, 又称被动转运过程。钾内流是自低浓度处流向高浓度处, 是一种逆浓度梯度的流动, 又称主动转运过程。本实验在冷藏与温育时也都看到这些现象。文献又称心甙能阻抑钾离子进入红细胞^[3](钾内流), 是抑制钾钠离子泵之故^[7]。现已证明细胞膜上有三磷酸腺苷酶^[8-10], 其特性与离子泵有某些类同处, 如两者都被钾钠离子所激活, 都被心甙所抑制, 被抑制的程度也相同, 因而认为心甙能抑制此酶的活性, 从而阻抑钾离子的内流。这种作用也见于心肌细胞膜上^[11,12]。

有学者^[6]曾研究九种心甙阻钾内流的作用, 以半数抑制浓度为指标比较了这一作用的强度, 将这种强度的顺序和这些心甙对猫致死作用的强度顺序相对照, 发现两者是相符的。据此曾设想, 测定各心甙阻红细胞钾内流的作用强度, 可间接了解它们对心脏的作用强度。

我们的实验结果也符合这些规律, 将所试三种心甙阻钾内流的半数抑制浓度和所测得的豚鼠致死量相对比, 并以陈克恢^[13]测定的猫致死量作参照, 如表 2 所列, 就能得知, 三种心甙阻钾内流的作用与其动物致死作用之间, 在强度顺序上都是相符的, 都以哇巴因为最强, neriifolin 次之, 地吉妥辛为最弱。

表 2 三种心甙的三类作用强度

心 甙	作用量	对红细胞钾内流的半数抑制浓度, 克分子	本实验测得的豚鼠致死量, 毫克/公斤	猫致死量 ^[13] , 毫克/公斤
哇 巴 因		0.32×10^{-7}	0.378	0.116
neriifolin		1.4×10^{-7}	0.95	0.196
地吉妥辛		9.2×10^{-7}	1.786	0.325

Machova^[6]曾认为在尚未肯定阻钾内流就是心甙强心作用的机制以前, 还难以从理论

* 此数据引自武汉市药检所何嘉珉先生的材料, 特此致谢。

上說明上述二种作用強度順序的相符关系。我們认为这种关系还是有理論基础的。有学者^[14,15]見中毒量心甙能使心肌中鉀量減少,而治疗量心甙并无此效,认为阻鉀內流仅与毒性有关而非強心作用的机制。但应知,一般生物检定所测的动物致死量,原非治疗量而是中毒量,这正好說明,阻鉀內流与动物致死作用之間,确是相关的。而且,也有学者^[16,17]証明強心量而非中毒量的心甙也能使心肌細胞鉀量減少。可見,心甙的两种作用之間的关系,在理論上也是能够解释的。

既然各心甙阻鉀內流与其动物致死作用的強度順序是相符的,且也能在理論上获得解释,則值得探討,測定心甙阻抑紅細胞鉀內流的作用強度,是否可以和动物致死量一样,作为心甙生物活性的另一指标。

致謝 本文承中国科学院有机化学研究所黃鳴龙教授供給 neriifolin 样品,呂富華教授审閱,工作中又承我院血庫李栓文同志供应血样,一并致謝。

参 考 文 献

- [1] Harris, J. E.: The Influence of the Metabolism of Human Erythrocytes on Their Potassium Content, *J. Biol. Chem.*, 1941, **141**, 579—595.
- [2] Danowski, T. S.: The Transfer of Potassium Across the Human Blood Cell Membrane, *J. Biol. Chem.*, 1941, **139**, 693—705.
- [3] Schatzmann, H. J.: Herzglykoside als Hemmstoffe fuer den aktiven Kalium- und Natriumtransport durch die Erythrocytenmembran, *Helv. Physiol. Acta*, 1953, **11**, 346—354.
- [4] Glynn, I. M.: Action of Cardiac Glycosides on the Red Cells, *J. Physiol.*, 1955, **128**, 56.
- [5] Kahn, Jr. J. B. and Acheson, G. H.: Effect of Cardiac Glycosides and Other Lactones and of Certain Other Compounds on the Cation Transfer in Human Erythrocytes, *J. Pharmacol. Exper. Therap.*, 1955, **115**, 305—318.
- [6] Machova, J.: Relationship Between the Effectiveness of Cardiac Glycosides in Cats and Their Interference with Red Cell Potassium Transport. *Experientia*, 1960, **16**, 553.
- [7] Post, R. L., Merrsett, C. R., Kinsolving, C. R. and Albright, C. D.: Membrane Adenosine Triphosphatase as a Participant in the Active Transport of Sodium and Potassium in the Human Erythrocyte, *J. Biol. Chem.*, 1960, **235**, 1796—1802.
- [8] Skou, J. C.: Preparation from Mamallian Brain and Kidney of the Enzyme System Involved in Active Transport of Na⁺ and K⁺, *Biochim. Biophys. Acta*, 1962, **58**, 314—325.
- [9] Bonting, S. L. and Varavaggio: Sodium Potassium Activated Adenosine-triphosphatase in the Squid Giant Axon, *Nature* (London), 1962, **194**, 1180.
- [10] Glynn, I. M.: Activation of Adenosinetriphosphatase Activity in a Cell Membrane by External Potassium and Internal Sodium, *J. Physiol.*, 1962, **160**, 18.
- [11] Schreiber, S. S., Oratz, M., Rothschild, M. A.: Effect of Ouabain on Potassium Exchange in the Mammalian Heart, *Amer. J. Physiol.*, 1961, **200**, 1055—1062.
- [12] Portius, H. S. and Repke, K.: Versuche zum Charakterisierung einer Transport-ATPase für Na⁺ und K⁺ in der Zellmembran des Herzmuskels, *Arch. exp. Path. u. Pharmak.*, 1963, **245**, 62—63.
- [13] a. Chen, K. K.: Pharmacology., *Ann. Rev. Physiol.*, 1945, **7**, 677—706;
b. Fieser, L. F. and Fieser, M.: *Steroids*, Reinhold Publishing Corporation, New York, 1959.
- [14] Lee, K. S., Yu, D. H., Lee, D. I. and Burnstein, R.: The Influence of Potassium and Calcium on the Effect of Ouabain on the Cat Papillary Muscles, *J. Pharmacol. exper. Therap.*, 1961, **132**, 139—148.
- [15] Klaus, W., Kuschinsky, G. u. Lüllmann, H.: Ueber den Zusammenhang zwischen positiv inotroper Wirkung von Digitoxigenin, Kalium-flux und intracellulären Ionenkonzentration in Herzmuskel, *Arch. exp. Path. u. Pharmak.*, 1962, **242**, 480—496.
- [16] Meng, K., Greef, K. u. Moog, E.: Ueber den Einfluß herzwirksamer Glykoside auf den Kalium Austausch isoliert durchstromter Meerschweinchenherzen, *Arch. exp. Path. u. Pharmak.*, 1962, **243**, 337—338.
- [17] Greef, K., Meng, K. u. Moog, E.: Der Einfluß nichttoxischer und toxischer Konzentrationen herz-

wirksamer Glykoside auf die Kaliumbilanz isolierter Herzpräparate, *Arch. exp. Path. u. Pharmak.*, 1962, 244, 270—282.

RELATIONSHIP BETWEEN THE INFLUENCE OF NERIIFOLIN, OUABAIN AND DIGITOXIN ON THE POTASSIUM TRANSPORT IN HUMAN ERYTHROCYTES AND THEIR LETHAL EFFECTS ON GUINEA PIGS

KIANG MIN-SHING, HUANG MIN-MIN AND CHAO HUI-BIN

(*Department of Pharmacology, Wuhan Medical College, Hangkow*)

ABSTRACT

An experiment was made to compare the inhibiting action of neriifolin on the potassium influx into erythrocytes with those of ouabain and digitoxin in incubated cold-stored human blood and to determine the lethal dose of these three cardiac glycosides to guinea pigs. It was found that the inhibiting action on the potassium influx and the lethal effect exhibited by ouabain are the strongest, those by neriifolin are less strong, and the weakest are those by digitoxin. There seems to be a correlation between the potency sequence of these two actions. The theoretical basis of this correlation and the possibility that the determination of the inhibiting actions of cardiac glycosides on the potassium influx into incubated erythrocytes may be used for evaluating the biological activity of the cardiac glycosides, were discussed.