

苍葱中含硫化物对培养心肌细胞的作用

赵怀清^{*}, 王学娅¹, 难波恒雄²

(沈阳药科大学基础部, 沈阳 110015; ¹ 辽宁省基础医学研究所, 沈阳 110005;

² 日本富山医科药科大学和汉药研究所, 日本)

摘要 目的: 考察苍葱(*Allium victorialis* L.) 中的 5 种化合物对小鼠培养心肌细胞的作用。方法: 制备小鼠的培养心肌细胞, 利用微机控制的图像分析监视系统, 考察苍葱中分离出的 5 种挥发性成分对培养心肌细胞的心率及振幅的作用。结果: 其中二甲基二硫、甲基烯丙基三硫、甲基烯丙基硫醚和二烯丙基二硫对培养心肌细胞的心率和振幅均有明显的增强作用, 并对 Ca^{2+} -ATP 酶有明显的抑制作用, 而不含硫的 2-戊酮对心率、振幅、 Na^{+} 、 K^{+} -ATP 酶及 Ca^{2+} -ATP 酶均无影响。结论: 含硫化物引起的正性肌力作用可能与它的酶抑制作用有关。

关键词 培养心肌细胞; 自发性心率; 正性肌力作用; 苍葱; 含硫化物

苍葱(*Allium victorialis* L.) 是百合科葱属植物, 主要分布于日本的北海道等地。研究表明, 它不仅具有抗血栓、对过剩的胆固醇有抑制作用, 而且对血小板凝聚也有强烈的抑制作用。这些药理作用主要来自于含硫挥发油成分。为了寻找其新的药理作用, 本文用培养的小鼠心肌细胞, 对其挥发油成分做了研究。

实验部分

材料与动物 Eagle MEM (Minimal essential medium), 日本日水制药株式会社。FBS (Fetal bovine serum), Whittaker M. A. Bioproducts Inc.。HEPES, 日本同仁化学研究所, ATP, Na^{+} , K^{+} -ATP 酶和 A₂₃₁₈₇, Sigma Co. (St. Louis, USA), 其他化学试剂均为优级试剂从和光纯药株式会社, 半井株式会社购入。苍葱新鲜叶是由日本北海道バイオ技术研究所提供。其挥发油提取物中分离的 5 种化合物分别为: 2-戊酮(2-pentanone, 2-PT), 二甲基二硫(dimethyl disulfide, DMDS), 甲基烯丙基三硫(methyl allyl trisulfide, MATS), 甲基烯丙基硫醚(methyl allyl sulfide, MAS), 二烯丙基二硫(diallyl disulfide, DADS)。实验动物为妊娠约 14~16 d 的 ICR 小白鼠, 日本静冈县实验动物农业协同组提供。

心肌细胞培养 根据五岛等^[1]的方法制备了心肌细胞。将妊娠 14~16 d 的 ICR 小白鼠的胎儿心脏取出, 将其放入 0.125% 胰蛋白酶 - 0.025% 胶原酶的混合液中, 切碎, 在 37℃ 的恒温水浴中振荡 10 min, 加入含有 10% 牛胎血清的 Eagle MEM 的培养液, 离心(4℃, 2 000 r·min⁻¹, 10 min)。去除上清液, 按照 Polinger^[2]方法除去纤维芽细胞, 然后将其分散于涂有纤维连接素的载玻片上, 放入 35 mm 塑料培养皿中, 置于 37℃, 95% 空气 - 5% CO₂ 的饱和水蒸汽的培养箱中, 经 48 h 培养, 待测定。

心肌细胞心率和振幅的测定 心肌细胞的心率和振幅的测定是根据黄圣伦等^[3]的方法进行的, 将附着心肌细胞的载玻片, 细胞面向下, 置于带有洞穴的丙烯酸脂板上(洞穴中充满含有 FBS 的 HEPES 溶液)。使其静止 5 min 后开始测定。首先测定空白溶液(含有 1% DMSO 的标准培养基)的心率, 在相同条件下测定对照品及样品的心率。测定时, 在 37℃ 恒温倒立位相差式显微镜(Olympus IMT-2)下, 由内藏摄像机成像后又转变成电信号而检出的, 其数值通过计算机(NEC PC-9801 VM)处理。

由显微镜观察到的心率情况, 经内藏摄像机(Olympus FCD-10)摄像后直接转录到录放机(National AG-6300)上, 将其画面显示于图像监视器(NEC PC-KD 854)。通过连有计算机(NEC PC-9801)的图像分析器(PIAS LA-500)进行画像解析。选择细胞群的录相画面中高亮度的 3 个点, 记录各点的周期性(0.07 s 间隔)跳动情况。一定时间内的振幅是根据测定波形图的峰高度计算的。

投药后相对的心率或振幅按下式计算:

$$\frac{\text{投药后一定时间内心率或振幅}}{\text{投药前的心率或振幅}} \times 100\%$$

结 果

Tab 1 Effect of compounds from *Allium victorialis* extract on the beating of myocardial cell sheet in culture

Compound	5 min		10 min		15 min		20 min	
	BR %	BA %	BR %	BA %	BR %	BA %	BR %	BA %
Control (1 % DMSO)	99.8 ± 2.6	100.2 ± 3.0	98.2 ± 1.8	98.7 ± 2.5	98.5 ± 1.5	99.5 ± 2.7	98.6 ± 2.7	101.3 ± 1.9
2-PT	100.1 ± 1.5	99.2 ± 3.0	97.3 ± 2.6	96.8 ± 3.2	99.2 ± 2.6	98.5 ± 1.5	102.5 ± 3.1	98.9 ± 1.8
DMDS	117.9 ± 1.5**	115.6 ± 2.0**	119.2 ± 3.2**	117.2 ± 1.8*	115.4 ± 2.6*	115.9 ± 3.0*	100.2 ± 2.8	100.2 ± 2.9
MATS	116.5 ± 4.2**	114.3 ± 2.6**	116.6 ± 3.8**	117.5 ± 1.5**	118.5 ± 1.3***	119.2 ± 3.7**	116.6 ± 3.6***	118.8 ± 3.4**
MAS	109.5 ± 5.5*	102.5 ± 3.5	113.8 ± 2.4*	104.8 ± 2.7	117.2 ± 3.7**	118.4 ± 3.2*	115.8 ± 3.5**	114.7 ± 3.6*
DADS	113.8 ± 2.1*	108.5 ± 3.1	115.2 ± 3.9*	110.0 ± 5.2	118.5 ± 1.9**	117.4 ± 3.5*	112.6 ± 2.4	116.0 ± 2.8*

The BR was measured 10 min after replacing the medium with a new medium containing each test sample, and indicated as percentage of an initial BR value that was measured just before replacing the medium. Concentration of each compound was 0.1 mmol·L⁻¹. $\bar{x} \pm s$, n = 5. * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 vs control (1 % DMSO). BR: beating rate; BA: beating amplitude.

2 生药浸膏中的 Na⁺, K⁺, Ca²⁺ 含量测定

1.0 mg 挥发油提取物中加入 2.0 mL 的浓 HNO₃, 湿法灰化, 用原子吸收光谱仪 (Shimadzu AA-640-13) 测得的 Na⁺, K⁺, Ca²⁺ 的含量分别为 14.2 × 10⁻⁵, 85.6 × 10⁻⁵ 和 10.2 × 10⁻⁵ mol·L⁻¹。

结果表明, 浸膏中这些离子含量远低于标准培养液中的离子含量 (2.1 mmol·L⁻¹), 所以, 对心肌细胞的心率不会带来影响。

3 Na⁺, K⁺-ATP 酶的活性测定

Na⁺, K⁺-ATP 酶活性的测定是根据 Jones 等^[4]的方法进行的。将混合液 (50 mmol·L⁻¹ histidin, 3 mmol·L⁻¹ MgCl₂, 1 mmol·L⁻¹ Tris/EGTA, 100 mmol·L⁻¹ NaCl, 10 mmol·L⁻¹ KCl, 3 mmol·L⁻¹ Tris/ATP) 和样品溶解在 DMSO 中 (最终浓度为 1%), 在 37 °C 的恒温水浴中培养 60 min, 释放的无机磷通过 Ottolenghi 等^[5]的方法进行测定。结果表明, 苍葱中各化合物在浓度为 0.1 mmol·L⁻¹ 的条件下测定, 对 Na⁺, K⁺-ATP 酶无影响。

4 心肌肌浆网 Ca²⁺-ATP 酶的制备和测定

Ca²⁺-ATP 酶的制备是根据 Chamberlain 等^[6]的方法进行的。首先将 δ兔 (2.5 kg) 的心脏摘出, 用 0.145 mmol·L⁻¹ NaCl 将心脏洗净, 切成碎片, 称重。然后, 加入 2 mL 溶液 A [0.25 mmol·L⁻¹ sucrose, 0.5 mmol·L⁻¹ DTT, 3 mmol·L⁻¹ Na₂S₂O₃, 10 mmol·L⁻¹ imidazole-HCl (pH 6.8)], 用聚四氟乙

1 含硫化合物对培养心肌细胞的作用

对挥发油中的 5 种化合物作用于培养心肌细胞的情况进行了考察。结果含硫化合物均对培养心肌细胞的心率和振幅有不同程度的增强作用, 而不含硫的化合物则对两者均无影响。见表 1。

烯均化器均化 30 min, 离心 (3 000 × g, 15 min), 上清液用 5 ~ 7 层的网状滤器过滤。再离心 (19 000 × g, 20 min), 用含有 0.65 mmol·L⁻¹ KCl 溶液 A 悬浊, 静置 30 min 后, 离心 (4 400 × g, 10 min), 上清液进一步离心 (25 000 × g, 10 min)。得到的沉淀溶解于少量溶液 A 中。置于 -50 °C 保存备用。

将样品或作为空白的 DMSO 1 μL 加入到 0.1 mL 混合液 (50 mmol·L⁻¹ histidin, 3 mmol·L⁻¹ MgCl₂, 50 μmol·L⁻¹ CaCl₂, 100 mmol·L⁻¹ KCl, 3 mmol·L⁻¹ Tris/ATP, 3 μg·mL⁻¹ A₂₃₁₈₇) 中, 再加入 1 μL 上述制备的 Ca²⁺-ATP 酶, 在 37 °C 下反应 30 min 后, 根据 Shoshan 等^[7]的方法测定游离的无机磷。结果见表 2。

Tab 2 Effect of compounds from *Allium victorialis* extract on Ca²⁺-ATPase activity

Compound	Inorganic phosphous release/ μmol·L ⁻¹ /(μg protein·min ⁻¹)
Control (1 % DMSO)	1.25 ± 0.05
2-PT	1.20 ± 0.12
DMDS	1.16 ± 0.32*
MATS	1.07 ± 0.28*
MAS	0.95 ± 0.36*
DADS	1.02 ± 0.25*

Mixtures indicated in 'Ca²⁺-ATPase activity' were incubated for 30 min at 37 °C. The concentration of each compound was 0.1 mmol·L⁻¹, $\bar{x} \pm s$, n = 5. * P < 0.01 vs control (1 % DMSO).

结果表明,化合物 DMDS, MATS, MAS 和 DADS,在 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度下测定,对 Ca^{2+} -ATP 酶有抑制作用,而 2-戊酮,在相同浓度下没有影响。

讨 论

本实验利用微机控制的图像分析监视系统考察了苍葱中挥发油成分对小鼠胎儿培养心肌细胞的心率和振幅的作用。结果表明,不含硫的化合物 2-戊酮对心率和振幅均无显著性影响,而含硫的 4 种化合物即 DMDS, MATS, MAS 和 DADS 对培养心肌细胞的心率和振幅均有不同程度的增强作用。其中 MATS 作用最强,其次是 DMDS,提示对心肌细胞的心率和振幅的增强作用可能与化合物中的硫及其数目有关。

强心苷正性肌力作用的机制是通过抑制心肌细胞膜上的 Na^+ , K^+ -ATP 酶。本研究结果,苍葱中的 5 种化合物在浓度为 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的条件下测定,对 Na^+ , K^+ -ATP 酶活性没有抑制作用,而含硫的 4 种化合物对 Ca^{2+} -ATP 酶有抑制作用,结果表明,含硫化合物的强心作用方式与强心苷不同。

含硫化合物的强心作用机制可能与抑制心肌肌浆网 Ca^{2+} 再摄取或增加心肌肌浆网 Ca^{2+} 的释放有关,其作用的确切机制有待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 五岛喜与太,培养心肌细胞の搏动. 科学,1974,44: 475
- 2 Polinger IS. Separation of cell types in embryonic heart cell culture. *Exp Cell Res*, 1970, 63: 78
- 3 Huang SL, Kakiuchi N, Hattori M, *et al.* A new monitoring system of cultured myocardial cell motion: Effect of pilose another extract and cardioactive agents on spontaneous beating of myocardial cell sheets. *Chem Pharm Bull*, 1991, 39: 384
- 4 Jones LR, Besch HR Jr, Fleming JW, *et al.* Separation of vesicles of cardiac sarcolemma from vesicle of cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 1979, 254: 530
- 5 Ottolenghi P. The reversible delipidation of a solubilized sodium plus potassium ion-dependent adenosine triphosphatase from the salt gland of the spiny dogfish. *J Biol Chem*, 1975, 151: 61
- 6 Chamberlain BK, Levitsky DC, Fleischer S. Isolation and characterization of canine cardiac sarcoplasmic reticulum with improved Ca^{2+} transport properties. *J Biol Chem*, 1983, 259: 6602
- 7 Shoshan V, MacLennan DH. Quercetin interaction with the (Ca^{2+} - Mg^{2+})-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 1981, 256: 887
- 8 Kakiuchi N, Senaratne LRE, Huang SL, *et al.* Effects of constituents of *Beli* (*Aegle marmelos*) on spontaneous beating and calcium-paradox of myocardial cell. *Planta Med*, 1991, 57: 43
- 9 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, *et al.* Protein measurements with the Folin Phenol reagent. *J Biol Chem*, 1950, 193: 265

EFFECTS OF SULFUR COMPOUNDS FROM CAUCAS (*ALLIUM VICTORIALIS* L.) ON THE SPONTANEOUS BEATING OF MYOCARDIAL CELL SHEETS IN VITRO

Zhao Huaqing, Wang Xueya¹ and Namba Tsuneo²

(Basic Courses of Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110015; ¹Institute of Basic Medical Science of Liaoning Province, Shenyang 110005; ²Toyouma Medical and Pharmaceutical University, Japan)

ABSTRACT **AIM:** To study the effects of volatile sulfur compounds isolated from caucas (*Allium victorialis* L.) on spontaneous beating of cultured mouse myocardial cells. **METHODS:** Cultured mouse myocardial cells were prepared. The effects of five compounds from caucas on the rate and amplitude of beating of cultured myocardial cells were examined by using microcomputer driven image analyzing system. **RESULTS:** Of these compounds, dimethyl disulfide (DMDS), methyl allyl trisulfide (MATS), methyl allyl sulfide (MAS) and diallyl disulfide (DADS) appreciably increased the beating rate and beating amplitude, and significantly inhibited Ca^{2+} ATPase activity, but non-sulfur 2-pentanone did not affect them. **CONCLUSION:** The positive inotropic effect on cultured myocardial cell sheets induced by sulfur compounds may be correlated with its inhibition on enzyme.

KEY WORDS cultured myocardial cell; spontaneous beating; positive inotropic effect; *Allium victorialis* L.; sulfur compounds