

交泰丸浸膏粉溶液对豚鼠心室肌细胞膜电位的影响

王永霞^{1*}, 邹志暖², 刘红军¹, 朱初麟¹, 朱明军¹, 王慧森³

(1. 河南中医学院第一附属医院, 郑州 450000; 2. 河南中医学院 2007 级研究生, 郑州 450008;
3. 河南省中医药研究院, 郑州 450004)

[摘要] 目的: 观察交泰丸(JTW)浸膏粉溶液对豚鼠心室肌细胞膜电位的影响。方法: 使用 Langendorff 灌流系统离体灌流心脏, 急性酶解法分离获得单个心室肌细胞。全细胞膜片钳技术电流钳模式记录膜电位。结果: 0.2% 交泰丸浸膏粉使静息电位(RP)从用药前(-85.91 ± 6.24) mV 下移至(-99.64 ± 6.62) mV ($n=8, P<0.01$), 0 相除极幅度(APA)从用药前(128.91 ± 1.39) mV 上升至(139.74 ± 2.67) mV ($n=8, P<0.01$), 复极至 50% 时动作电位时程(APD_{50})从用药前(505.49 ± 30.97) ms 缩短至(329.94 ± 44.32) ms ($n=8, P<0.01$), 复极至 90% 时动作电位时程(APD_{90})从用药前(524.96 ± 30.99) ms 缩短至(358.41 ± 43.51) ms ($n=8, P<0.01$), 复极至 50% 到复极至 90% 的动作电位时程(APD_{50-90})从用药前(16.56 ± 1.48) ms 延长至(27.31 ± 3.62) ms ($n=8, P<0.01$), 动作电位 3 相复极速率(V_3)从用药前(-2.93 ± 0.33) V/s 减慢至(-1.95 ± 0.28) V/s ($n=8, P<0.01$)。0.1%, 0.4% 交泰丸浸膏粉对各项指标的影响与 0.2% 交泰丸浸膏粉的变化趋势一致。结论: 交泰丸浸膏粉引起心室肌细胞 RP 下移, APA 上升, APD_{50} 缩短, APD_{90} 缩短, APD_{50-90} 延长和 V_3 减慢。以上影响可能是其在临床上具有抗心律失常作用的电生理学机制。

[关键词] 交泰丸; 膜电位; 心律失常; 膜片钳技术

[中图分类号] R 285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)08-0157-04

Effect of Jiaotaiwan on the Membrane Potentials of Ventricular Myocytes in Guinea Pig

WANG Yong-xia^{1*}, ZOU Zhi-nuan², LIU Hong-jun¹, ZHU Chu-lin¹, ZHU Ming-jun¹, WANG Hui-sen³

(1. First Affiliated Hospital, Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China;

2. Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China;

3. Henan Academy of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450004, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Jiaotaiwan on action potentials(AP) of isolated ventricular myocytes in guinea pig. **Method:** The myocytes were enzymatically obtained from the guinea pig hearts and the action potentials were examined by whole-cell patch clamp technique. **Result:** Jiaotaiwan (0.2% solution) decreased the resting potential from (-85.91 ± 6.24) mV to (-99.64 ± 6.62) mV ($n=8, P<0.01$), increased action potential amplitude(APA) from (128.91 ± 1.39) mV to (139.74 ± 2.67) mV ($n=8, P<0.01$), shortened action potential duration of repolarization 50% (APD_{50}) from (505.49 ± 30.97) ms to (329.94 ± 44.32) ms ($n=8, P<0.01$), shortened action potential duration of repolarization 90% (APD_{90}) from (524.96 ± 30.99) ms to (358.41 ± 43.51) ms ($n=8, P<0.01$), extended action potential duration of repolarization 50% to repolarization 90% (APD_{50-90}) from (16.56 ± 1.48) ms to (27.31 ± 3.62) ms ($n=8, P<0.01$), and slowed down the slope of phase 3 (V_3) from (-2.93 ± 0.33) v. s^{-1} to (-1.95 ± 0.28) v. s^{-1} ($n=8, P<0.01$). 0.1% and 0.4% Jiaotaiwan on the various indicators of impact and 0.2% of the change in trend. **Conclusion:** Jiaotaiwan can induce

[收稿日期] 20100105(003)

[基金项目] 河南省教育厅自然科学基金项目(2008A360032)

[通讯作者] 王永霞, 医学博士, 副教授, 从事中西医结合防治心血管疾病的临床与实验研究, Tel: (0371) 66262960, E-mail: wyxch2hq@163.com.

the following influence for ventricular myocytes: decreased RP, increased APA, shortened APD₅₀, shortened APD₉₀, extended APD₅₀₋₉₀ and V₃ slowed down. The influences of Jiataiwan are likely linked with the electrophysiological mechanism of its anti-arrhythmic effect.

[Key words] Jiataiwan; membrane potential; arrhythmia; patch clamp technique

交泰丸一方,首见于明代韩懋《韩氏医通》一书,该书最早记载“黄连……生用为君,佐官桂少许,煎百沸,入蜜,空心服,能使心肾交于顷刻”。目前在临床主要应用于病机为心火亢盛,心肾不交之心悸。早期的临床观察发现交泰丸对室性早搏^[1]及多种原因引起的快速性心律失常^[2]有效。该实验研究交泰丸对心肌细胞膜电位的影响,实验中排除了药物本身离子成份的影响,精确反应药物非离子因素的药理作用^[3],以探讨其抗心律失常的药理机制。

1 材料

1.1 药物 交泰丸浸膏粉(黄连、肉桂)由河南省中医药研究院提供。黄连经鉴定为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch. 的干燥根茎,习称“味连”,产地湖北;肉桂经鉴定为樟科植物肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl 的干燥树皮,产地广西。制备工艺:取肉桂提取挥发油,药渣与黄连合并加水煎煮 2 次,每次 2 h,合并煎液,浓缩至清膏,减压干燥,粉碎,喷入挥发油混匀,即得浸膏粉,得率约 13.6%。

1.2 动物 豚鼠 250 ~300 g,雌雄不限,由郑州华兴实验动物养殖场提供,生产证号 SCXK(鄂)2004-0007。

1.3 试剂 NaCl, KCl, CaCl₂, MgSO₄ · 7H₂O, NaH₂PO₄ · 2H₂O, MgCl₂ · 6H₂O, KH₂PO₄, Glucose, NaOH, KOH 为国产分析纯;乙二醇-双四乙酸(EGTA)由 Amresco 生产;牛磺酸(Taurine)、天门冬氨酸钾(KAsp)、磷酸肌酸二钠(Na₂phosphocreatin)、三磷酸腺苷二钾(K₂ATP·2H₂O)由 SIGMA 公司生产;N-2-羟乙基哌-N-2-乙磺酸(HEPES)、胶原酶、蛋白酶 E、L-谷氨酸(L-glutamica acid)由博奥生物有限公司分装。

1.4 溶液配制 Tyrode 氏液(mmol·L⁻¹): NaCl 136, KCl 5.4, NaH₂PO₄ · 2H₂O 0.33, MgCl₂ · 6H₂O 1.0, Glucose 10, HEPES 10, CaCl₂ 1.8。2 mol·L⁻¹ NaOH 调 pH 至 7.4, 25 °C; pH7.32, 30 °C。

无钙 Tyrode 氏液(mmol·L⁻¹):从 Tyrode 氏液中去除 CaCl₂ 成分。

酶液:无钙 Tyrode 氏液 25 mL, 胶原酶 10 mg,

蛋白酶 E 1 mg, 0.1 mol·L⁻¹ CaCl₂ 12.5 μL 使钙离子浓度成为 50 μmol·L⁻¹。

KB 液(mmol·L⁻¹): KCl 39.97, KH₂PO₄ 25, MgSO₄ · 7H₂O 3, Glucose 10.09, HEPES 10.7, EGTA 0.53, Taurine 19.98, L-glutamica acid 50.3, KOH 80。2 mol·L⁻¹ KOH 调 pH 至 7.4, 25 °C; pH7.32, 30 °C。

电极内液(mmol·L⁻¹): KAsp 120, KCl 20, MgCl₂ · 6H₂O 1, HEPES 5, EGTA 10, Na₂-phosphocreatin 2, K₂ATP·2H₂O 4。2 mol·L⁻¹ KOH 调 pH 至 7.3, 25 °C。

药物溶液^[3]:先以超纯水稀释交泰丸浸膏粉,生化分析仪测量其中 K⁺, Na⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Cl⁻ 和葡萄糖浓度,与 Tyrode 氏液配方离子浓度和葡萄糖浓度比较。Tyrode 氏液配方离子浓度和葡萄糖浓度减去超纯水稀释药物溶液离子浓度和葡萄糖浓度后计算实验药物溶液配方,配制实验药物溶液。实验药物溶液相关试剂与 Tyrode 氏液相关试剂相同。0.4% 交泰丸浸膏粉溶液 100 mL 含交泰丸浸膏粉 0.4 g, 0.2% 交泰丸浸膏粉溶液 100 mL 含交泰丸浸膏粉 0.2 g, 0.1% 交泰丸浸膏粉溶液 100 mL 含交泰丸浸膏粉 0.1 g。生化分析仪测量同次配制的 Tyrode 氏液和实验药物溶液离子浓度和葡萄糖浓度,如果实验药物溶液离子浓度和葡萄糖浓度与 Tyrode 氏液的实测结果之间出现误差,根据实际误差重新计算实验药物溶液配方,配制实验药物溶液。调整实验药物溶液离子浓度和葡萄糖浓度,使其与 Tyrode 氏液实测离子浓度和葡萄糖浓度相同。2 mol·L⁻¹ NaOH 调 pH 至 7.4, 25 °C。

1.5 设备 自制 Langendorff 灌流器(蛇形管),美国 SUTTER 公司 MODEL P-97 玻璃微电极拉制仪和三维操纵仪 MP-225, World Precision Instrument, Inc; H602-240 玻璃微电极抛光仪,中国科学院物理研究所;外径 1.5 mm 厚壁有芯玻璃微电极毛胚,美国 Axon 公司;Axopatch 200B 放大器和 DIGIDATA 1440A 数模模数转换器;日本 OLYMPUS IX 71 倒置显微镜,自制减震台和金属屏蔽罩。

2 方法

2.1 豚鼠单个心室肌细胞急性分离实验^[3] 灌流

系统温度保持在 37℃。所有灌流液和 KB 液均以 100% O₂ 持续低流量饱和 30 min 以上。恒流泵灌流速度 8 mL·min⁻¹。2% 戊巴比妥 1.5 mL 加肝素 (1 000 U·mL⁻¹) 1 mL ip 麻醉豚鼠。5 min 后固定豚鼠, 开胸游离心脏。离体心脏放入 4℃ 无钙 Tyrode 氏液中, 游离主动脉。将心脏主动脉连接在灌流器出口处, 行 Langendorff 心脏灌流。无钙 Tyrode 氏液经主动脉逆向灌流心脏 (3 ~ 5) min (灌注压 20 cmH₂O), 然后 25 mL 酶液循环灌流消化心脏。酶液灌流开始后第 10, 15, 20, 25, 30 min 分别剪取心室肌组织, 在 KB 液中分离心肌组织, 获得单个心室肌细胞。KB 液中保存心肌细胞, 放入 4℃ 冰箱 1 ~ 2 h 后使用。

2.2 膜片钳实验^[3]

2.2.1 记录模式

实验在 (22 ~ 25)℃ 室温下进行。灌流槽经石蜡油用 24 mm × 50 mm 盖玻片封底后固定于倒置显微镜台板上, 灌流槽底部盖玻片上滴入数滴富含心肌细胞的冷藏 KB 悬液, 静置 5 ~ 10 min 有利于心肌细胞沉淀后贴附于盖玻片上, 然后 Tyrode 氏液灌流 5 min, 流速 2 mL·min⁻¹。将贴壁不好及死亡的细胞冲走, 选择贴壁良好、外形完整、边缘清楚、表面光滑、透光度好、横纹清晰、无收缩的心肌细胞。充灌电极内液后玻璃微电极正压入液, Axopatch 200B 放大器电压钳制模式下补偿液接电位。负压吸引封接心肌细胞, 高阻封接 (giga seal) 形成时 (R < 1 GΩ) 提示封接成功, 脉冲电流信号消失。补偿电极电容电流。继续负压吸引, 出现充放电现象提示全细胞记录模式形成。电压钳制模式转换为电流钳制模式。

2.2.2 给药方法

根据实验要求, 用恒流泵以 2 mL·min⁻¹ 的速度向细胞灌流槽分别灌流浓度为 0.1%, 0.2% 和 0.4% 的交泰丸浸膏粉溶液, 同时使用负压吸引器将废液从灌流槽吸出。Tyrode 氏液与药物溶液重复交替灌流有利于观察药物效应的可逆性变化, 也有利于鉴别细胞本身活性变化对膜电位曲线的影响。每次灌流时间均为 5 min。

2.2.3 刺激方案

刺激强度 (2 ~ 5) nA, 选择可以诱发动作电位的最小刺激强度; 刺激时间 5 ms, 刺激频率 0.5 Hz (2 s), 重复刺激 15 次。实验过程中同一细胞的刺激方案保持不变。

2.2.4 采样记录

刺激信号及输入信号由美国 Axon 公司 pClampex10.1 采样软件控制。破膜后

Tyrode 氏液灌流 5 min 以上, 有利于电极内液与细胞内液充分混合。电流钳制模式下记录用药前、用药后和洗脱后的动作电位曲线。信号经截止频率为 1 kHz 的四阶贝塞尔低通滤波器滤波, 采样频率为 10 kHz。

2.3 数据测量

使用美国 Axon 公司 Clampfit10.1 分析软件进行测量, 选择每次刺激的最后一个即第 15 个膜电位曲线进行测量。测量指标包括 RP (mV), APA (mV), APD₅₀ (ms), APD₉₀ (ms), APD₅₀₋₉₀ (ms), V₃ (V/s), V₃ 是指动作电位复极至 50% 时与复极至 90% 时两点连线的斜率。其中 APD₅₀₋₉₀ 及 V₃ 对于心肌细胞电生理特性分析和 AP 快速复极末期膜电流分析具有重要意义^[3]。各项参数的变化率为用药后均数减去用药前均数的差值再除以用药前均数。

2.4 统计学分析

统计软件使用 SPSS10.0, 指标数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用药前后比较与洗脱前后比较采用配对 *t* 检验。选择重复性好且具有可逆性变化趋势的数据进行统计分析, 每组用药前后数据均选自同一细胞。P < 0.05 提示数据的变化趋势有差异性, P < 0.01 提示数据的变化趋势有显著差异性。

3 结果

3.1 对膜电位各项指标的影响

3 个浓度组药物溶液对膜电位各项指标影响的变化趋势均一致 (表 1)。JTW 用药后引起 RP 下移, APA 上升, APD₅₀, APD₉₀ 缩短, APD₅₀₋₉₀ 延长, V₃ 减慢。各项指标用药前后的变化趋势均具有统计学意义。

3.2 对膜电位各项指标变化率的影响

比较各浓度组中有统计学意义相关指标用药前后的变化率 (表 1)。0.1% JTW 组 APD₅₀ 和 APD₉₀ 的变化率最大, 其次是 RP 和 APD₅₀₋₉₀, 然后是 APA 和 V₃。0.2% JTW 组 APD₅₀₋₉₀ 的变化率最大, 其后依次是 APD₅₀, V₃, APD₉₀, RP 和 APA。0.4% JTW 组由大到小排列相关指标依次为 APD₅₀₋₉₀, V₃, APD₅₀, APD₉₀, APA 和 RP。

4 讨论

根据膜反应曲线分析, 用药后 APA 上升与 RP 下移 (超极化) 有关, 提示冲动传导加快^[4]。用药后 APD₉₀ 缩短提示不应期缩短; APD₅₀ 缩短提示有效不应期缩短; APD₅₀₋₉₀ 延长提示相对不应期延长。以上影响可能是 JTW 在临床上发挥抗心律失常作用的药理机制。

表 1 交泰丸浸膏粉对豚鼠心室肌细胞膜电位相关指标的影响 (均±s)

时间	浓度 /%	n	RP/mV	APA/mv	APD ₅₀ /ms	APD ₉₀ /ms	APD ₅₀₋₉₀ /ms	V ₃ (v/s)
用药前	-	5	- 104.22 ±11.58	122.30 ±4.02	687.38 ±52.88	710.40 ±53.14	27.80 ±2.44	- 1.93 ±0.18
用药后	0.1	5	- 123.66 ±10.37 ¹⁾	135.50 ±2.39 ²⁾	348.52 ±26.56 ¹⁾	375.50 ±28.47 ¹⁾	31.36 ±3.43 ²⁾	- 1.79 ±0.18 ²⁾
洗脱后	-	5	- 107.22 ±11.40 ¹⁾	130.52 ±1.79 ¹⁾	591.14 ±51.38 ¹⁾	618.74 ±52.92 ¹⁾	27.90 ±3.44 ²⁾	- 1.95 ±0.22
变化率	-	5	18.7%	10.8%	49.3%	47.1%	12.8%	7.2%
用药前	-	8	- 85.91 ±6.24	128.91 ±1.39	505.49 ±30.97	524.96 ±30.99	16.56 ±1.47	- 2.93 ±0.33
用药后	0.2	8	- 99.64 ±6.62 ¹⁾	139.74 ±2.67 ¹⁾	329.94 ±44.32 ¹⁾	358.41 ±43.51 ¹⁾	27.31 ±3.62 ¹⁾	- 1.95 ±0.28 ¹⁾
洗脱后	-	8	- 88.65 ±6.55 ¹⁾	131.79 ±1.87 ¹⁾	449.83 ±36.07 ¹⁾	474.38 ±34.56 ¹⁾	20.54 ±1.99 ²⁾	- 2.45 ±0.30 ¹⁾
变化率	-	8	16.0%	8.4%	34.7%	31.7%	64.9%	33.4%
用药前	-	6	- 79.85 ±8.35	114.73 ±4.82	514.77 ±90.77	531.62 ±90.66	16.98 ±3.23	- 3.36 ±0.56
用药后	0.4	6	- 91.13 ±8.18 ¹⁾	132.30 ±2.20 ¹⁾	352.28 ±88.65 ²⁾	381.87 ±92.33 ²⁾	26.90 ±5.43 ²⁾	- 2.15 ±0.33 ²⁾
洗脱后	-	6	- 80.15 ±8.30 ¹⁾	120.62 ±1.47 ¹⁾	477.73 ±77.50	503.93 ±83.20	19.62 ±4.83 ¹⁾	- 2.97 ±0.47 ¹⁾
变化率	-	6	14.1%	15.3%	31.6%	28.2%	58.4%	35.9%

注:与用药前比较¹⁾ P < 0.01, ²⁾ P < 0.05

用药后 APA 上升提示除极阶段内向电流(I_{Na})激动效应。心室肌细胞动作电位复极阶段相关内向电流主要是钙离子流(I_{LCa}),外向电流主要是钾离子流(I_K和I_{K1})。APD₅₀和APD₉₀缩短提示复极阶段内向电流抑制效应或外向电流激动效应。内向整流钾通道(I_{K1})为静息电位阶段主要膜电流成分,ITW引起RP下移(超极化)提示其可能对I_{K1}的内向电流成份有抑制效应^[5];APD₅₀₋₉₀延长和V₃减慢进一步提示其对动作电位3相快速复极末期的外向电流I_{K1}或I_K有抑制作用^[6]。综上所述,APD缩短的主要因素应该是2相内向电流(I_{LCa})的抑制效应。

相同药物浓度下,0.1% ITW 实验中变化率最大的指标是APD₅₀,提示其主要的药理机制可能是缩短有效不应期,主要因素可能是膜电位复极阶段的相关内向电流(主要是钙电流)的抑制效应。0.2%和0.4% ITW 实验中变化率最大的指标是APD₅₀₋₉₀,提示其主要的药理机制可能是延长相对不应期,主要因素可能是膜电位复极阶段相关外向电流(主要是钾电流)的抑制效应。

不同药物浓度下,膜电位各项指标的变化趋势一致,具有浓度依赖性。RP,APD₅₀,APD₉₀变化率与药物浓度呈负相关,V₃变化率与药物浓度呈正相

关。

总之,交泰丸对豚鼠心室肌细胞膜的内向钙电流和外向钾电流的抑制效应可能是其在临床上具有广谱抗心律失常作用的电生理学机制,其对钙离子通道的阻滞作用对临床上心律失常伴高血压和冠心病的治疗意义可能具有重要启示。交泰丸对心肌细胞膜离子通道电流的影响有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] 张文华. 交泰丸加味治疗室性早搏 68 例[J]. 广西中医药, 1994, 17(4): 7.
- [2] 何永田, 边可陶, 袁福茹, 等. 交泰丸加味治疗快速心律失常 68 例[J]. 浙江中医杂志, 1992, 27(9): 386.
- [3] 朱明军, 刘红军, 王永霞, 等. 心悸宁浸膏粉溶液对豚鼠心室肌细胞动作电位的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(8): 45.
- [4] 朱大年. 生理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 92.
- [5] 刘泰熹. 心肌细胞电生理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 105.
- [6] 李泱. 离子通道与膜片钳技术[M]. 兰州: 甘肃文化出版社, 2001: 28.

[责任编辑 聂淑琴]