

苦参碱对豚鼠心室肌细胞钠离子通道电流的影响

韦祎¹,唐汉庆^{2*},李晓华²

(1. 海南医学院,海口 571199; 2. 右江民族医学院,广西 百色 533000)

[摘要] 目的:观察苦参碱对豚鼠心室肌细胞钠离子通道电流(I_{Na})的影响,探讨其抗心律失常的作用机制。方法:豚鼠随机分为正常对照组、乌头碱组和苦参碱组。每组 8 只。乌头碱组以 $50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乌头碱灌流 10 min,苦参碱组在乌头碱组基础上,以 $10,50,100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 苦参碱灌流 20 min。采用膜片钳全细胞记录技术记录豚鼠单个心肌细胞钠电流并绘制电流密度电流强度(PA)/细胞膜电容(pF)曲线。结果: $50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乌头碱显著增大 I_{Na} (-92.62 ± 6.5) pA/pF[和对照组比较 (-66.24 ± 4.8) pA/pF, $P<0.05$]。在乌头碱灌流基础上, $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 苦参碱对 I_{Na} 没有明显作用, $50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 可使 I_{Na} 减小至 (-49.21 ± 5.1) pA/pF(和乌头碱组比较 $P<0.05$), $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 又使 I_{Na} 稍微增大(和对照组比较 $P>0.05$)。结论:苦参碱抑制 I_{Na} 电流,呈浓度依赖性,浓度较高时抑制 I_{Na} 电流作用减弱,表现为双向调节的药理作用,可能是苦参碱抗心律失常作用温和持久的机制之一。

[关键词] 苦参碱;心律失常;钠离子通道;膜片钳

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)20-0199-04

[doi] 10.11653/syjf2013200199

Influence of Matrine on Sodium Channel Current of Ventricle Muscle Cells in Guinea Pigs

WEI Yi¹, TANG Han-qing^{2*}, LI Xiao-hua²

(1. Hainan Medical University, Haikou 571199, China;

[收稿日期] 20130201(007)

[通讯作者] *唐汉庆,副教授,中西医结合基础研究,E-mail:iloveyouverymuch0000@yahoo.com.cn

[4] 王靓,侯晓燕,黄金,等. 苓桂术甘汤对急性心肌梗死后心室重构模型大鼠 NF- κ B 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(20):176.

[5] 杨雷,毛秉豫,徐国昌. 黄芪和丹参提取物配伍对大鼠心肌梗死后心肌组织病理变化的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(8):168.

[6] 冷报浪. 《金匱要略》“胸痹”范畴的探讨[J]. 光明中医,2000,1(5):3.

[7] 陈世前,龙维富,吴文超,等. 大鼠急性心肌梗死后心脏血流动力学参数、心肌组织病理学及 c-kit mRNA 表达的变化[J]. 生物医学工程学杂志,2009,23(3):86.

[8] 许波华,许立. 中药抗心肌缺血作用机制的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(15):275.

[9] 地兰,张晴,黄勇攀,等. 血脉通胶囊对大鼠急性心肌缺血 MMP-9 和 NF- κ B 表达的影响[J]. 中国中药杂志,2010,35(23):3203.

[10] Cohn J N, Ferrari R, Sharpe N, et al. Cardiac remodeling-concepts and clinical implications;consensus paper from an international forum on cardiac remodeling[J]. J Am Coll Cardiol, 2000,35(3):569.

[11] Karpas M, Hsu Y M, Wang J H, et al. A crystal structure of an extracellular fragment of human CD40 ligand[J]. Structure,1995,3(10):1031.

[12] Mach F, Schonbeck U, Sukhova G K, et al. Functional ligand is expressed on human vascular endothelial cells, and macrophages; implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1997,94(3):1931.

[13] Habib S S, Kurdi M I, A L Aseri Z, et al. CRP levels are higher in patients with ST elevation than non-ST elevation acute[J]. Arq Bras Cardiol,2011,96(1):13.

[14] Nesar Hossein V, Yosef Nejad K, Abdollahian F. Short-term therapy with high dose atorvastatin in patients with coronary artery disease can reduce inflammatory process[J]. Acta Med Iran,2010,48(4):218.

[责任编辑 聂淑琴]

2. Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, China)

[**Abstract**] **Objective:** To observe influence of matrine on sodium channel current (I_{Na}) of ventricle muscle cells in guinea pigs and to discuss its antiarrhythmic mechanism. **Method:** Guinea pigs were randomly divided into control group, aconitine group and matrine group. Each group included eight cases. Aconitine group was treated with $50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ aconitine perfusion 10 min while matrine group was treated with 10, 50, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ matrine based on aconitine group. The whole-cell patch clamp technique was used to record I_{Na} current of single ventricle muscle cell and then to design figures of I_{Na} current density. **Result:** Aconitine ($50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) could significantly amplify I_{Na} current (-92.62 ± 6.5) pA/pF (compared with control group (-66.24 ± 4.8 , $P<0.05$)). Based on aconitine-induced arrhythmia, matrine ($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) had no significant effects on I_{Na} current, however, matrine ($50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) could significantly reduce I_{Na} current (-49.21 ± 5.1) pA/pF (compared with aconitine group, $P<0.05$), but when the dose of matrine was kept increasing, the effect of reducing I_{Na} current of matrine were getting weak, and at the level of $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, matrine could slightly amplify I_{Na} current (compared with control group, $P>0.05$). **Conclusion:** Matrine could restrict I_{Na} current in dose-dependent manner, and high dose of matrine could make this effect of restriction weak, so matrine has a two-way, modest and lasting regulation effect which probably was one of its antiarrhythmic mechanisms.

[**Key words**] matrine; arrhythmia; sodium channel; patch clamp

生命活动的特征之一是伴随有电流的变化,许多疾病与离子通道(channel)电流异常变化有关,这些疾病的发生机制有望从离子通道的电流改变进行解释,心律失常发生的机制与离子通道电流的改变有关,已经为许多实验研究证实^[1]。开发具有抗心律失常作用的药物要明确药物对心肌细胞离子通道电流的影响。苦参作为应用历史悠久的中药,味苦性寒,作用广泛,尤长于“祛心火”,即具有现代医学描述的抗心律失常作用,苦参碱(matrine)是从苦参中提取出来的生物碱,也是苦参的主要作用成分,对乌头碱(aconitine)诱发的心律失常有良好的拮抗作用。本实验研究以乌头碱为参照药物,采用膜片钳全细胞记录技术记录钠离子通道电流(I_{Na}),观察不同浓度苦参碱对豚鼠乳头肌细胞钠离子通道电流的影响,为苦参碱抗心律失常作用提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 豚鼠,体质量(0.3~0.4) kg,雌雄不限,由本院科学实验中心购买提供,许可证编号SCXK(京)2010-0006。

1.2 试剂 苦参碱(批号110805-200507)、乌头碱(批号107202500390,国家标准物质网,纯度>99%,水溶); Collagenase II(批号096K8618, Worthington company); HEPE(批号050m1266, Sigma, USA)。

试液:100% O_2 饱和和无钙台式液($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$: NaCl 135; KCl 5.4; $MgCl_2$ 1; NaH_2PO_4 0.33; Glucose

10; HEPES 5; NaOH 调 pH 7.4); 酶液(CaCl_2 34 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, Collagenase II 0.4 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 323 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$); KB 液($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$: KOH 80; KCl 40; KH_2PO_4 25; $MgSO_4$ 3; Glutamic acid 50; Taurine 20; EGTA 0.5; HEPES 10; Glucose 10, KOH 调 pH 7.2); 细胞外液($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$: CsCl 107.5, NaCl 30, $MgCl_2$ 1, CaCl_2 1, HEPES 20, Glucose 11, CoCl_2 2, CsOH 调 pH 7.35); 电极内液($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$: CsF 135, NaCl 5, HEPES 5, EGTA 10, Mg-ATP 5, CsOH 调 pH 7.2)。

1.3 仪器 有芯玻璃毛细管(Havard, USA); 拉制仪(P-97, Sutter, USA); CKX31 型倒置相差显微镜(Olympus, Japan); 膜片钳放大器(Axopatch 200B); 模/数(A/D)和数模(D/A)转换器(Digi Data 1200B, Axon company, USA)。

2 方法

2.1 动物分组 豚鼠随机分为正常对照组、乌头碱组、苦参碱组。每组 8 个。

2.2 豚鼠心室肌的细胞分离方法 豚鼠击颅致昏后,迅速分离心脏置于 100% O_2 饱和的 4℃ 无钙台式液中,氧流量 $0.3\sim0.5\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$,轻轻挤压心脏,排出残血。迅速将心脏移至 Langendorff 装置上(恒温 37℃),先用氧饱和的无钙台式液灌流 5 min,流速 $10\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,然后用酶液进行灌流,消化时间约 10 min。最后,将心脏置于 KB 液中剪碎心室,用吸管轻轻吹打,用尼龙网(100 目)过滤得到细胞悬液,

离心 3 min($500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$),去上清,沉淀部分 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ KB 液孵化 1 h, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

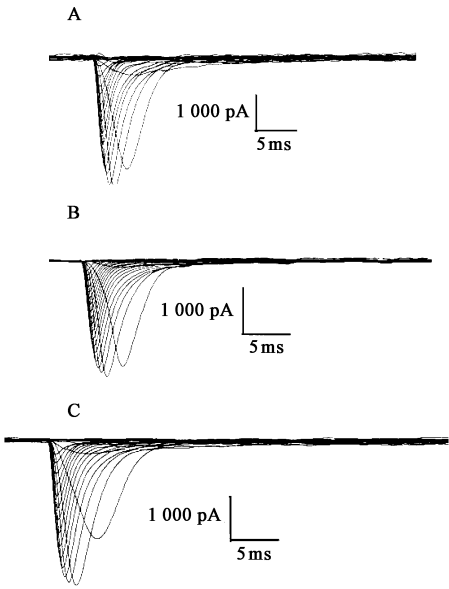
2.3 膜片钳全细胞记录 将分离获得的心室肌细胞置于浴槽中,用细胞外液灌流约 10 min。在倒置相差显微镜下选择呈杆状、横纹清楚、立体感强、无疱疹、无收缩的细胞进行膜片钳全细胞记录。玻璃微管电极经三步拉制而成,充填电极内液后阻抗在 $2\sim4\text{ M}\Omega$ 。通道电流信号经膜片钳放大器放大后经模/数(A/D)和数模(D/A)转换器转换后输入计算机。应用 Clampex 软件采集储存,采样频率 20 KHz,低通滤波 2 KHz,串联阻抗补偿 70%~80%,漏电流用“P/4”补偿。高阻抗封接形成后给予短促负压吸破细胞膜,形成全细胞模式,即可进行钠通道电流的记录。膜片钳实验在室温($20\sim25\text{ }^{\circ}\text{C}$)下进行。为消除细胞间的误差,实验结果均用电流密度表示。

电流密度 = pA(电流强度)/pF(细胞膜电容)

2.4 统计学处理 采用 Clampfit 软件进行数据处理,通道电流幅度以电流密度表示,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,再以 Sigmpilot 软件对数据转化并作图,绘制电流密度曲线图。组间配对 t 检验, $P<0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 钠通道电流密度曲线图 $50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乌头碱显著增大 I_{Na} (-92.62 ± 6.5) pA/pF(与对照组 (-66.24 ± 4.8) pA/pF 比较, $P<0.05$)。在乌头碱灌流基础上, $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 苦参碱对 I_{Na} 没有明显作用, $50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 可使 I_{Na} 减小至 (-49.21 ± 5.1) pA/pF(与乌头碱组比较, $P<0.05$), $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 又使 I_{Na} 稍微增大。见图 1。



A. 正常对照组;B. 乌头碱组($50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$);
C. 苦参碱组($100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)

图 1 苦参碱对豚鼠心室肌细胞膜钠通道电流(I_{Na})密度的影响($n=8$)

3.2 苦参碱对豚鼠心室乳头肌细胞动作电位持续时间(APD)的影响 动作电位稳定后,在台式液中分别加入 $10,50,100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 苦参碱,观察到 APD 随着苦参碱浓度的增加而逐渐增大,但与对照组比较无显著差异。加入 $50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的乌头碱后,观察到 APD 延长,与对照组比较($P<0.05$)。 $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 苦参碱使 $\text{APD}_{50}, \text{APD}_{90}$ 明显延长($P<0.01$),使 APA 降低($P<0.05$)。见表 1。

表 1 苦参碱对豚鼠心室乳头肌细胞动作电位的影响($\bar{x}\pm s,n=8$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	APD/ms	APD ₅₀ /ms	APD ₉₀ /ms	APA/mV
对照	-	312±18	175±15	226±16	122±12
苦参碱	10	320±26	198±18	238±19	116±15
	50	348±28	232±22	264±21	102±11
	100	353±22	253±15 ²⁾	276±22 ²⁾	86±9 ¹⁾
乌头碱	50	403±15 ¹⁾	272±14	304±22	125±18

注:与对照组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$ 。

4 讨论

苦参是药用豆科类植物苦参(*Sophora flavescens* Ait)的干燥根,苦参始见于《神农本草经》,列为中品,以其“主心腹积气、症瘕积聚”,有“安五脏,定志益精”之效。《本草经百种录》则称苦参“此以味治也,苦入心,寒入火,故苦参专治心经之火”,具有抗心律失常作用。

苦参含有苦参生物碱类,主要成分是苦参碱,苦参碱在心血管系统基础研究方面取得了很大的进展,其中,对于其抗心律失常的机制研究中,已有动物实验研究表明,苦参碱对乌头碱、氯化钡以及肾上腺素等诱发的心律失常有良好的治疗作用,尤其对乌头碱诱发的室性心律失常疗效显著,深入研究提出,苦参碱抗心律失常的机制是多方面的,表现在苦

参碱对动作电位的影响;苦参碱加强电压依赖性钙内流;对钠通道的阻滞作用;明显减低异位节律性等^[2-3]。

苦参碱抗心律失常作用具有作用温和、持续时间长的优点,苦参对心脏具有负性频率、负性自律性及负性传导作用,是一种非特异性“奎尼丁样”作用,推测通过影响心肌细胞膜钾钠离子的传递系统,延长其绝对不应期,降低其应激性,从而抑制异位起搏点,发挥抗心律失常作用^[4]。

上述研究着重从苦参碱对心肌细胞离子通道电流的影响探讨其抗心律失常的机制,苦参碱对钠离子、钙离子和钾离子通道电流均有影响并且可能是其抗心律失常机制之一。在本研究中,观察到苦参碱浓度依赖性对钠离子电流产生影响,具体表现在低浓度产生的效应不明显($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 苦参碱对 I_{Na} 没有明显作用),随着浓度逐渐增加,当达到 $50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 可使 I_{Na} 减小(和乌头碱组比较, $P<0.05$),体现出对乌头碱的拮抗作用。这和有关研究报道结果一致^[5]。同时,在本实验研究中,采用乌头碱作为诱发心律失常的药物,观察到乌头碱能显著增大 I_{Na} ,和文献^[6]报道的结果也一致。

此外,在本实验中,观察到从苦参碱浓度 $50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 开始,持续给药至浓度为 $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 过程中, I_{Na} 有缓慢上升的趋势,但这种上升是温和的,且上升的幅度和正常对照组比较没有统计学意义。这似乎表明苦参碱具有浓度依赖性的双向调节作用。如果此种双向调节作用能够被进一步的研究证实,那么会有助于对“最佳靶点学说”^[7]的理解,该学说认为心肌细胞的各种离子通道正常情况下处于平衡状态,如果外部原因造成离子通道之间或离子通道内部平衡紊乱,使平衡点偏离了调控范围,那么就容易导致各型的心律失常。在失衡中,起主要作用的离子通道便是治疗药物的最佳靶点,因此,一个良好的、副作用少的抗心律失常药物,应该是针对最佳靶点起效,而且,对其他通道的潜在影响应该是最小的,因为许多抗心律失常药物本身也具有致心

律失常作用,药物治疗剂量和致毒副作用剂量之间距离小。

在本实验研究中,观察到苦参碱在 $50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 能明显抑制 I_{Na} 的电流密度,苦参碱浓度在达到 $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 过程中这种抑制作用逐步减退,推测这是苦参碱和浓度有关的双向调节药理作用,提示苦参碱作用温和持久的原因,也说明了苦参相对缓和的药理作用能够保证该药物安全有效、毒副作用小。笔者在以往有关苦参碱对动作电位的影响研究^[8]中观察到苦参碱能维持动作电位在正常范围,结合苦参碱对动作电位和离子通道的影响有可能更好解释其抗心律失常的确切机制。

[参考文献]

[1] 陈霞,李英骥,张文杰,等. 氧化苦参碱对豚鼠心室肌细胞钠电流的影响[J]. 白求恩医科大学学报,2001,27(1):41.

[2] 艾静,王玲,杨宝峰,等. 苦参碱、青蒿素和粉防己碱对豚鼠心肌细胞胞浆的影响[J]. 中国药理学报:英文版,2001,22(6):512.

[3] 黄彩云,黄胜英,谢世荣,等. 氧化苦参碱抗心律失常作用的实验研究[J]. 大连医科大学学报,2001,23(4):262.

[4] 沈映君. 中药药理学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1997:61.

[5] 张文杰,钟国赣,葛敬岩,等. 氧化苦参碱对豚鼠心室肌细胞钠流的影响[J]. 白求恩医科大学学报,2001,27(1):52.

[6] 龚冬梅,邹晓龙,白云龙,等. 哇巴因和乌头碱对豚鼠和大鼠心肌细胞钠电流的作用[J]. 哈尔滨医科大学学报,2006,40(5):347.

[7] 杨宝峰,单宏丽,龚冬梅,等. 抗心律失常药物作用最佳靶点研究[J]. 哈尔滨商业大学学报,2002,18(1):1.

[8] 唐汉庆,李妙玲,王勇,等. 苦参碱影响豚鼠乳头肌细胞动作电位的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(24):241.

[责任编辑 聂淑琴]