

醋柳黄酮对大鼠心室肌细胞瞬间外向整流钾电流的影响

邝素娟, 邓春玉, 钱卫民, 单志新, 吴书林, 杨敏, 余细勇, 林曙光

(广东省人民医院医学研究中心; 广东省心血管病研究所, 广东 广州 510080)

中国图书分类号: R-332; R 284.1; R 322.11; R 329.24; R 331.38; R 541.705.3; R 972.2

文献标识码: A 文章编号: 1001-1978(2007)09-1237-04

摘要:目的 探讨醋柳黄酮对大鼠心室肌细胞膜瞬间外向钾电流(I_{to})的影响。方法 用急性酶解法获得单个大鼠心室肌细胞, 标准的全细胞膜片钳技术记录瞬间外向钾电流。结果 ①醋柳黄酮呈浓度和电压依赖性抑制 I_{to} , 在 +50 mV 时, 0.06、0.1 和 0.14 $g \cdot L^{-1}$ 醋柳黄酮分别阻断 I_{to} 峰电流 (18.34 ± 0.99)%、(25.32 ± 1.43)% 和 (38.88 ± 1.96)%。②0.14 $g \cdot L^{-1}$ 醋柳黄酮使 I_{to} 失活曲线明显左移, 但对激活和复活曲线无影响。结论 醋柳黄酮呈浓度和电压依赖性抑制心肌细胞 I_{to} , 这可能是其抗心律失常作用的重要机制之一。

关键词:醋柳黄酮; 膜片钳技术; 心肌细胞; 瞬间外向钾通道电流

醋柳黄酮 (total flavones of Hippophae Rhamnoides L, TFH) 系从野生植物沙棘 (别名醋柳) 果实中提取的天然黄酮类药物, 主要有效成分是槲皮素 (quercetin, Que) 和异鼠李素 (isorhamnetin, Iso) 等黄酮类化合物^[1]。它具有多种药理作用, 临床应用广泛, 在心血管疾病方面主要用于治疗缺血性心脏病和高血压等^[2,3]。但迄今为止对 TFH 抗心肌缺血作用和抗心律失常作用的机制了解不多, 尤其是其对心肌细胞电生理影响的研究非常少。本研究拟采用全细胞膜片钳技术, 观察 TFH 对大鼠心室肌细胞瞬间外向钾通道电流 (transient outward potassium current, I_{to}) 的作用, 旨在探讨其抗心律失常作用的部分机制。

1 材料与方

1.1 实验材料

1.1.1 动物 取体重 200~250 g 的 SD 大鼠, ♀♂ 兼用。由中山大学医学部动物中心提供。

收稿日期: 2007-05-05, 修回日期: 2007-07-12

基金项目: 广东省自然科学基金团队 (重大) 项目资助 (No 015015)

作者简介: 邝素娟 (1969-), 女, 主管技师, 研究方向: 离子通道药理学, Tel: 020-83827812-51156, Fax: 020-83769487, E-mail: ksjuang@126.com;

余细勇 (1962-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 心血管药理学, 通讯作者, Tel: 020-83827812-51155, Fax: 020-83769487, E-mail: yuxyn@hotmail.com

1.1.2 药物 醋柳黄酮为黄褐色粉末, 用 DMSO 溶解。

1.1.3 试剂 II 型胶原酶 (Collagenase II)、牛血清白蛋白 (BSA)、乙二醇-双四乙酸 (EGTA)、氯化钡 ($BaCl_2$)、氯化镉 ($CdCl_2$)、N-2 羧基哌嗪-N-2-乙磺酸 (HEPES)、三磷酸腺苷钠盐 (Na_2 -ATP)、牛磺酸 (Taurine) 及谷氨酸钾 (K-glutamate) 均为美国 Sigma 公司产品, 其余的试剂均为国产分析纯。

1.1.4 实验溶液 无钙台氏液 ($mmol \cdot L^{-1}$): NaCl 136, KCl 5.4, $CaCl_2$ 1.0, NaH_2PO_4 0.33, Glucose 10.0, HEPES 10.0, 用 NaOH 调 pH 至 7.4。高钾保存液 ($mmol \cdot L^{-1}$): KCl 40, KH_2PO_4 20, K-glutamate 50, taurine 20, Glucose 10, EGTA 0.5, HEPES 10.0, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 3.0, 用 KOH 调 pH 至 7.35。记录 I_{to} 的细胞外液 ($mmol \cdot L^{-1}$): NaCl 136, KCl 5.4, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 1.0, NaH_2PO_4 0.33, HEPES 10.0, Glucose 10.0, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 2.0, $CdCl_2$ 0.3, $BaCl_2$ 0.5, 用 NaOH 调 pH 至 7.35。电极内液 ($mmol \cdot L^{-1}$): KCl 140, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 1.0, HEPES 10.0, EGTA 5.0, Na_2 -ATP 5.0, 用 KOH 调 pH 至 7.2。

1.1.5 电极制备 电极控制前, 采用超声波法对玻璃毛胚进行清洁。先用无水乙醇浸泡玻璃毛胚, 经超声波洗涤处理 15 min, 再用蒸馏水彻底冲洗干净, 最后置于 200℃ 烤箱内烤干备用。于室温分两步垂直式拉制电极毛胚。

1.1.6 实验仪器 倒置显微镜 (OLYMPUS IX 70 型, 日本), 电极控制仪 (Narishige PP830 型, 日本), 膜片钳放大器 (Axopatch 200B) 及附件均为美国 Axon 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 单个大鼠心室肌细胞的制备^[4] 大鼠击昏、颈动脉放血后, 迅速开胸取出心脏, 在 4℃ 无钙台氏液中洗净血液, 去除脂肪及心包膜后, 游离主动脉根部, 插入主动脉套管, 固定在 Langendorff 灌流装置上, 用无钙台氏液经主动脉逆行灌流, 整个灌流过程温度控制在 36℃~37℃, 通以 100% O_2 , 灌流压约 70 cm H_2O 。10 min 后转换成用含胶原酶 II ($0.5 g \cdot L^{-1}$) 和牛血清白蛋白 ($1 g \cdot L^{-1}$) 的无钙

台氏液灌流,约 30 min 后将心室肌剪下,放入高钾保存液中吹打使细胞分散脱落,并于 4℃ 保存,6 h 后进行实验。

1.2.2 膜片钳全细胞记录 室温下将细胞悬液加入平放于倒置显微镜上的细胞池中,待细胞贴壁后,用 I_{to} 细胞外液以 $1.5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ 速度灌流,选取纹理清晰、杆状和大小适中的细胞,进行全细胞膜片钳实验。玻璃电极灌电极液后电阻为 $2 \sim 4 \text{ M}\Omega$,置于推进器上,利用三维操纵器(Narishige)移动电极,并轻压在细胞表面,稍加负压使电极与细胞表面形成高阻封接后破膜,给予电容和串联电阻补偿,形成全细胞记录。电流信号经 Ag/AgCl 电极引导,由膜片钳 AXON 200B 放大器放大通过 AD/DA 转换板,并存储于计算机硬盘中。实验过程由 pCLAMP 7.0 软件程序刺激发放和信号采集。

1.2.3 统计分析 采用 pCLAMP 7.0 软件对单个全细胞记录进行数据和图形转换,Prism 3.0 软件对数据进行曲线拟合及绘制离子通道电流密度-电压、激活、失活和恢复曲线,电流密度 (pA/pF) = 电流强度/电容。实验数据用 SPSS 10.0 统计软件做统计分析,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,药物作用前后差异采用自身配对 t 检验。

2 结果

2.1 醋柳黄酮对 I_{to} 的影响 在形成全细胞状态后,将细胞钳制在 -50 mV ,给予指令电位从 $-40 \sim +50 \text{ mV}$,步阶电压为 10 mV ,波宽为 300 ms ,频率为 0.2 Hz 的刺激,记录 I_{to} 。然后,用灌流法给药,分别以含 0.06 、 0.1 和 $0.14 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋柳黄酮的细胞外液灌流细胞 3 min 。所用药物浓度参考早期的文献报道^[5]。在 $+50 \text{ mV}$ 时,醋柳黄酮分别阻断 I_{to} 峰电流 (18.34 ± 0.99)%、(25.32 ± 1.43)% 和 (38.88 ± 1.96)% ($n=6$, $0.06 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $P>0.05$, 其余浓度 $P<0.05$)。

以峰电流 (pA/pF) 对膜电位作图,即得 $I-V$ 曲线。在 $+50 \text{ mV}$ 时, $0.06 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋柳黄酮使峰电流从 (18.99 ± 3.8) pA/pF 减少到 (15.51 ± 3.83) pA/pF ,药物洗脱后恢复到 (16.75 ± 2.87); $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋柳黄酮使峰电流从 (17.05 ± 2.75) pA/pF 减少到 (12.73 ± 2.54) pA/pF ,冲洗后恢复为 (13.71 ± 3.05) pA/pF (Fig 1); $0.14 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋柳黄酮使峰电流从 (11.91 ± 2.81) pA/pF 减少到 (7.28 ± 3.05) pA/pF ,冲洗后无明显恢复。

2.2 醋柳黄酮对 I_{to} 激活和失活动力学的影响 为观察 I_{to} 的激活动力学特征,将 $I-U$ 曲线的结果转换成膜电导,对条件刺激电压作图,然后采用 Boltz-

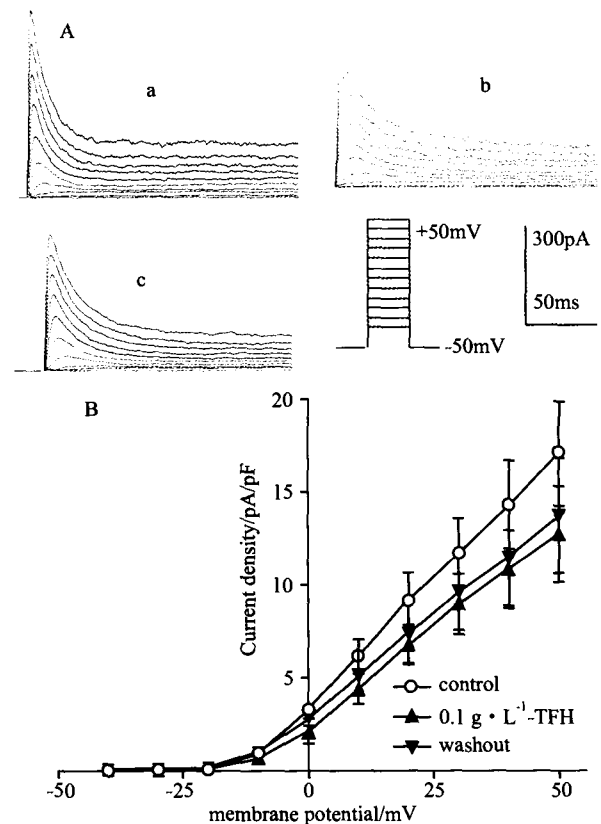


Fig 1 Effects of TFH on the I-V relationship of I_{to} in ventricular myocytes of rats

A. Representative voltage-dependent I_{to} recorded with voltage protocol shown in the inset in a ventricular myocyte (a) under control conditions, (b) in the presence of $0.10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ TFH (5 min exposure), and (c) recovered by drug washout for 5 min; B. I-V relationship of I_{to} under control conditions, in the presence of TFH at $0.10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, and drug washout

mann 方程 $g/g_{\text{max}} = 1 / \{ 1 + \text{EXP}[(V_{1/2} - V)/k] \}$ 进行拟合,式中得到 I_{to} 激活曲线,然后求得 $V_{0.5}$ (半数失活电压) 和 S (斜率因子)。 $0.14 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋柳黄酮对 I_{to} 激活曲线无明显影响。 ($P>0.05$, $n=6$)。 (对照组 $V_{0.5}$ 为: (23.66 ± 3.37) mV , S 为: (13.03 ± 0.55) mV ; 醋柳黄酮组 $V_{0.5}$ 为: (19.00 ± 4.21) mV , S 为: (12.66 ± 1.02) mV , 见 Fig 2。

用双脉冲刺激法观察 I_{to} 失活动力学: 细胞钳制在 -80 mV , 先给指令电位从 $-100 \sim +30 \text{ mV}$, 步阶电压为 10 mV , 波宽为 1000 ms 的条件刺激, 然后再给予一个固定到 $+50 \text{ mV}$ 的测试刺激。用 I/I_{max} 与条件刺激电压作图, 并对所得数据用 Boltzmann 方程进行拟合, 得到 I_{to} 失活曲线, 然后求得 $V_{0.5}$ (半数失活电压) 和 S (斜率因子)。 $0.14 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋柳黄酮使 I_{to} 失活曲线明显左移。 ($P<0.05$, $n=6$)。 对照组 $V_{0.5}$ 为: (-33.62 ± 1.41) mV , S 为: (-2.99 ± 0.33) mV ; 醋柳黄酮组 $V_{0.5}$ 为: (-39.83 ± 0.53) mV , S 为: (-2.85 ± 0.31) mV , 见 Fig 2。

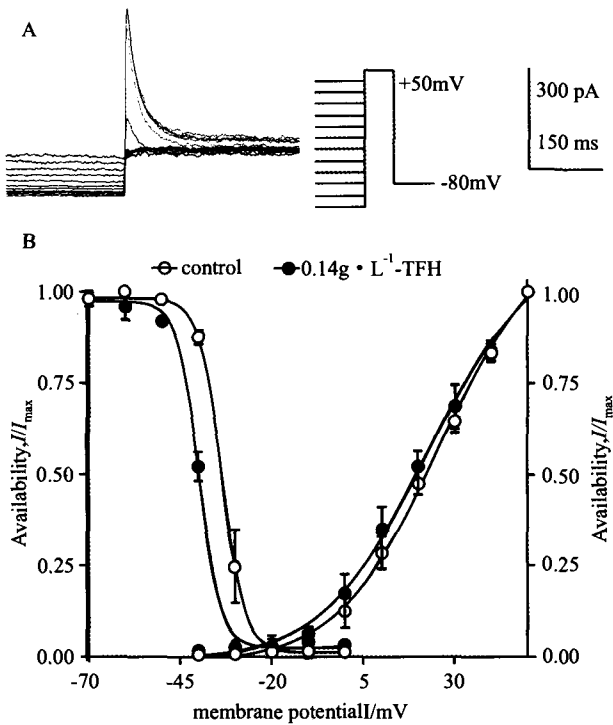


Fig 2 Effects of TFH on I_{to} kinetics

A. Representative current traces and protocol used to evaluate voltage dependence of I_{to} inactivation; B. Mean data for voltage dependence of I_{to} inactivation and activation in the absence (○) and presence (●) of $0.14 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ TFH. The mean of data shown are fitted by Boltzmann distribution function

2.3 醋柳黄酮对 I_{to} 失活后再激活曲线的影响 用双脉冲刺激法观察失活后再激活的恢复过程: 细胞钳制在 -80 mV , 给两个相同的测试刺激 (P_1 和 P_2) 去极至 $+50 \text{ mV}$, P_1 和 P_2 的间隔时间从 2 ms 开始以 10 ms 的步长递增, 以 P_2 峰电流与 P_1 峰电的比值对应 $P_1 \sim P_2$ 的时间间隔作图, 并对所得数据用单指数方程进行拟合, 得到钾电流复活曲线, 然后求得时间常数 (τ)。 $0.14 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋柳黄酮使 I_{to} 复活曲线轻度下移, 但无统计学意义。 对照组 τ 为 $(30.76 \pm 2.05) \text{ ms}$, 醋柳黄酮组 τ 为 $(32.36 \pm 2.43) \text{ ms}$, $n = 6, P > 0.05$, 见 Fig 3。

3 讨论

本实验结果表明醋柳黄酮呈浓度和电压依赖性抑制 I_{to} , 随着浓度增加阻断作用增强, 且使失活曲线明显左移, 但对 I_{to} 激活和复活曲线无明显影响。

醋柳黄酮作为天然植物提取的化合物, 其药理作用较广, 在心血管疾病方面具有抗心律失常、抗心绞痛、增强心功能、对急性心肌缺血具有保护作用等^[3]。 近年的研究还表明, TFH 能降低 TC、TG、LDL-C 及升高 HDL-C^[6], 对高血压靶器官损害具有逆转和保护作用^[7], 通过对电压依赖性钙通道和受

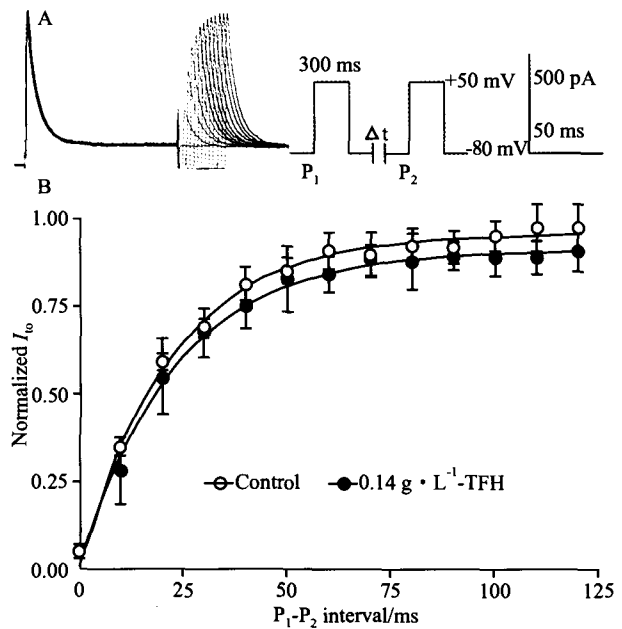


Fig 3 Effects of TFH on I_{to} recovery curve

A: Representative current traces and protocol used to evaluate the recovery of I_{to} from inactivation; B: Mean data for time course of recovery of I_{to} from inactivation in the absence (○) and presence of $0.14 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ TFH (●). Data are best-fit to monoexponential function

体操纵型钙通道双重抑制降低血管平滑肌细胞内游离钙水平^[5]。

心肌的动作电位形成是由多种离子通道共同参与的结果, 决定动作电位平台期的时程通道电流, 主要有 I_{to} 、 I_K 、 I_{K1} 和 I_{Ca} , 其中钾离子通道是目前发现的亚型最多, 作用最复杂的一类离子通道。 钾通道电流是参与心肌细胞动作电位复极的主要电流, 包括 I_{to} 、超快速激活钾电流 (I_{kur})、快激活电压依赖钾电流 (I_{kr})、慢激活电压依赖钾电流 (I_{ks}) 和内向整流钾电流 (I_{ki}) 等。 影响这些电流, 会明显改变复极过程。 如减少外向电流, 使复极延迟, 动作电位时程 (APD) 延长。 其中复极 1 期主要由 I_{to} 产生。 本实验利用膜片钳技术, 直接观察到醋柳黄酮对心肌细胞离子通道 I_{to} 有明显的抑制作用; 还可使 I_{to} 失活曲线明显左移, 提示其能加快钾通道的失活。 这样可能使心肌细胞复极化减慢, 动作电位时程延长, 从而达到抗心律失常作用, 这也许是其抗心律失常的作用机制之一。

实验中没有观察到醋柳黄酮直接对大鼠心肌细胞动作电位时程的影响, 是因为大鼠的动作电位平台期很短, 很难记录到很明显的药物作用效应。 豚鼠的动作电位平台期很长, 比较容易研究药物对动作电位时程的作用, 但是, 豚鼠心肌细胞没有明显的 I_{to} 存在, 很难全面反映醋柳黄酮对人心肌细胞的作用

用。只有直接研究醋柳黄酮对人心肌细胞动作电位的作用,才能准确反映其作用机制。进一步研究拟采用人心房肌细胞,全面观察醋柳黄酮对人肌细胞动作电位时程以及 I_K 、 I_{K1} 和 I_{Ca} 等电流的影响,以便全面阐明其抗心律失常的作用机制,为临床治疗心血管疾病提供实验依据。

总之,本研究结果提示醋柳黄酮的抗心律失常作用机制,与阻断 I_{to} 有关。

参考文献:

- [1] 肖卓殷,肖蓉. 醋柳黄酮类的化学研究[J]. 四川大学学报, 1980,11(3):174-6.
- [1] Xiao Z Y, Xiao R. Studies on the flavonoid of Hippophae Rhamnoides L[J]. *J Sichuan Univ*, 1980,11(3):174-6.
- [2] 周丽英,龙明智. 醋柳黄酮治疗高血压的临床观察[J]. 河北医学, 2000,12(6):1077-9.
- [2] Zhou L Y, Long M Z. Clinical observations of acetylcholine on hypertension[J]. *Hebei Med*, 2000,12(6):1077-9.
- [3] 滑莉莎,于新蕊,滑丽宣,等. 沙棘的临床应用进展[J]. 白求恩医学院学报, 2003,1(2):109-11.
- [3] Hua S L, Yu X R, Hua L X, et al. Advances in the clinical application of Seabuckthorn[J]. *J Bethune Mil Med College*, 2003,1

(2):109-11.

- [4] 邓春玉,林曙光,杨敏,等. 卡维地洛对大鼠心室肌细胞钠通道的影响[J]. 中国药理学通报, 2005,21(5):568-72.
- [4] Deng C Y, Lin S G, Yang M, et al. Effect of carvedilol on sodium channel current in isolated ventricular myocytes of rats[J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2005,21(5):568-72.
- [5] 李家富,章茂顺,王家良,等. 醋柳黄酮对血管平滑肌细胞内游离钙浓度的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004,9(3):305-30.
- [5] Li J F, Zhang M S, Wang J L, et al. Effects of flavonoids of Hippophae rhamnoides L on intracellular free calcium concentration in cultured rabbit aortic smooth muscle cells[J]. *Chin J Clin Pharmacol Ther*, 2004,9(3):305-30.
- [6] 乔春萍,朱福,卢振国,等. 醋柳黄酮对高脂血症的疗效观察[J]. 国外医学·心血管疾病分册, 2003,30(3):183-5.
- [6] Qiao C P, Zhu F, Lu Z G, et al. Efficacy of total flavones of Hippophae rhamnoides L. in the treatment of hyperlipemia[J]. *Foreign Med Sci Sect Cardiovasc Dis*, 2003,30(3):183-5.
- [7] 朱福,王美华,胡春燕,等. 醋柳黄酮对高血压病靶器官的影响[J]. 高血压杂志, 2002,10(3):219-23.
- [7] Zhu F, Wang M H, Hu C Y, et al. Effect of total flavones of Hippophae rhamnoides L. (TFH) on the Target organs of patients with essential hypertension[J]. *Chin Hypert*, 2002,10(3):219-23.

Effect of TFH on transient outward potassium currents in isolated ventricular myocytes of rats

KUANG Su-juan, DENG Chun-yu, QIAN Wei-min, SHAN Zhi-xin,
WU Shu-lin, YANG min, YU Xi-yong, LIN Shu-guang
(Research Center of Medical Sciences, Guangdong Provincial People's Hospital;
Guangdong Provincial Cardiovascular Institute, Guangzhou 510080, China)

Abstract: **Aim** The effects of total flavones of Hippophae Rhamnoides L (TFH) on transient outward potassium current (I_{to}) in isolated ventricular myocytes of rats were determined to explore the mechanism of its antiarrhythmic efficacy at the ionic channel level. **Methods** Single ventricular myocytes of rats were isolated by enzymatic dissociation. The whole-cell patch-clamp recording technique was used to record the change of I_{to} influenced by TFH. **Results** TFH decreased I_{to} in a dose-dependent and voltage-dependent manner in ventricular myocytes of rats. The peak of current-voltage curve was significantly decreased, 0.06, 0.10, 0.14 g · L⁻¹ TFH decreased (18.34 ±

0.99)%, (25.32 ± 1.43)% and (38.88 ± 1.96)%, respectively. The steady-state inactivation curve of I_{to} was shifted to more negative potentials, the voltage at half-inactivation changing from (-33.62 ± 1.41) mV in control to (-39.83 ± 0.53) mV in the presence of TFH. The activation and recovery curves of I_{to} were not obviously altered. **Conclusion** TFH concentration- and voltage-dependently decreased I_{to} in ventricular myocytes. Therefore, the effect of inhibitory I_{to} of TFH plays a vital role in its antiarrhythmic efficacy.

Key words: TFH; whole-cell patch clamp technique; ventricular myocytes; transient outward potassium current (I_{to})