维普资讯 http://www.cqvip.com

18-19,3

6

R285.5

文章编号：0253-3626（2000）01-0018-03

汉防己碱对大鼠皮层神经元钙通道的阻滞作用

王中锋[1]、薛春生[2]，周岐新[2]

（1. 中国科学院上海生理研究所　200030　2. 重庆医科大学基础医学院生化药理研究室　400016）

摘　要　在急性分离的大鼠大脑皮层神经元上，用膜片钳单通道记录技术研究汉防己碱（Tet）对电压依赖性钙通道的影响。结果表明，Tet 7.5 μ mol/L、15 μ mol/L和30 μ mol/L可浓度依赖性抑制大鼠皮层神经元膜L-和N-型电压依赖性钙通道，使其开放时间缩短，关闭时间延长，开放概率降低，从而降低钙内流，其对L-型钙通道的作用与钙通道阻滞剂Verapamil相似但较弱。Tet的多种药理作用可能与其阻滞钙通道有关。

关键词　汉防己碱；膜片钳；钙离子通道；皮层神经元；大鼠

中国图书分类法分类号：R285.5　　**文献标识码**：A　　**收稿日期**：1998-08-27

Effects of tetrandrine on calcium channels in rat cortical neurons

WANG Zhong-Feng, et al

Department of Biochemical Pharmacology

Abstract: The effects of tetrandrine (Tet) on calcium channels in acutely isolated rat cortical neurons were studied using the patch clamp single channel recording technique. The results indicated that Tet (7.5 μ mol/L, 15 μ mol/L and 30 μ mol/L) inhibited the L- and N- type calcium channels in a concentration-dependent manner. The open times of L- and N- type calcium channels decreased, the closed times increased, and open-state probability decreased. The effects of Tet on L-type calcium channel were consistent with verapamil, a typical calcium channel antagonist, but were weaker than those of verapamil. On the other hands, the N-type calcium channel blocking effects of Tet were much stronger than those of verapamil. The multifunctions of Tet might be related to its antagonist effect on the calcium channels.

Key Words: Tetrandrine; Patch clamp; Calcium; Ion channel; Cortical neuron; Rat

汉防己碱(Tet）是中药汉防己的主要有效活性成分，有实验证明，Tet对心肌细胞钙通道有阻滞作用，也可抑制垂体前叶细胞、神经垂体末梢细胞的钙通道电流[1~3]，认为Tet是中药来源的钙通道阻滞剂。我室以前的结果也表明，Tet可降低由兴奋性氨基酸所致的大鼠脑突触体内钙浓度增高，对脑缺血有保护作用。但有关Tet对脑细胞钙通道的作用则未见报道。本实验用膜片钳单通道记录技术研究了Tet对大鼠皮层神经元钙通道的影响。

1　材料与方法

1.1　仪器设备

微电极拉制器(PP-83, Narishige公司, 日本)；摄相监控倒置显微镜(XSJ-D，重庆光学仪器厂)；微推进器(NO-202, Narishige公司，日本)；膜片钳放大器(CEZ-2200, 日本电)；AD/DA转换板(Digdata 1200，美国Axon公司)；pClamp 6.02软件(美国Axon公司)；微机(IBM-486DX)。

1.2　药品试剂

Tet(浙江金华制药厂)；胰蛋白酶(Sigma)；多聚赖氨酸(Sigma)；天冬氨酸钾(Sigma)；N-trimethylsilyldiethylamine(Sigma)；Verapamil(Sigma)；其它试剂均为国产分析纯。

1.3　溶液配制

人工脑脊液(mmol/L): NaCl 126；KCl 5；NaH_2PO_4 1.25；$NaHCO_3$ 26；$CaCl_2$ 2；$MgSO_4$ 2；葡萄糖 10；pH 7.2(NaOH调制)，临用时再加$CaCl_2$和糖。

细胞浴液(mmol/L)：天冬氨酸钾130；HEPES 10；EGTA 10；$MgCl_2$ 5；葡萄糖 10；pH 7.3(用KOH调制)。

电极液(mmol/L): $BaCl_2$ 110；HEPES 10；pH 7.3

Tet用1 mmol/L盐酸溶解，调pH至6.5。

1.4　大鼠皮层神经元分离

参照文献[4]分离大鼠大脑皮层神经元。取2～4周龄的Wistar大鼠断头取脑，将皮层切成厚约400 μ m~500 μ m的冠状脑片，在通95%O_2+ 5%CO_2 的人工脑脊液内孵育30min后，用0.1%胰蛋白酶消化30min，将脑片剪碎后用尖端火抛光的Pasteur吸管吹打成细胞悬液，将上清液滴加于事先涂有0.1%多聚赖氨酸的盖玻片上使细胞贴壁。分离过程在室温(

作者介绍：王中锋(1968-07月出生)，男，博士生

维普资讯 http://www.cqvip.com

表1 汉防己碱(Tet, μmol/L)和Verapamil(Ver, μmol/L)对大鼠皮层神经元L-钙通道的影响

	开放时间(ms)		关闭时间(ms)		电流幅度	开放概率
	τ1	τ2	τ1	τ2	(PA)	
对照组	0.50±0.20	2.47±0.32	1.69±0.27	50.74±4.66	1.52±0.19	0.061±0.017
Tet(7.5)	0.49±0.16	2.08±0.25*	2.11±0.22**	78.78±1.86***	1.53±0.14	0.048±0.019**
Tet(15)	0.40±0.11*	1.65±0.21**	3.19±0.29***	84.09±1.39***	1.52±0.15	0.035±0.016***
Tet(30)	0.31±0.14**	1.34±0.26**	3.28±0.13***	92.04±1.83**	1.53±0.16	0.016±0.013***
Ver(20)	0.29±0.10***	1.02±0.12***	3.49±0.17***	98.36±1.76***	1.51±0.13	0.012±0.007***

*n=10, $\bar{x}\pm s$, * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001, vs 对照组*

表2 汉防己碱(Tet, μmol/L)对大鼠皮层神经元L-钙通道的影响

	开放时间(ms)		关闭时间(ms)		电流幅度	开放概率
	τ1	τ2	τ1	τ2	(PA)	
对照组	0.44±0.15	1.767±0.23	1.96±0.31	58.17±4.55	1.03±0.16	0.053±0.017
Tet(7.5)	0.40±0.16*	1.35±0.17**	2.29±1.24**	62.09±3.82*	1.03±0.11	0.041±0.011**
Tet(15)	0.35±0.10**	1.10±0.14***	2.68±1.23**	71.14±2.35**	0.95±0.19	0.032±0.018**
Tet(30)	0.31±0.09**	0.78±0.20***	3.33±1.28**	86.19±3.97***	1.02±0.16	0.021±0.014***

*n=10, $\bar{x}\pm s$, * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0 001, vs 对照组*

20~25℃)下进行。

1.5 钙通道单通道记录

采用细胞贴附膜片钳单通道记录技术[5]。由微机发出去极化脉冲，同步采集通道开放电流，一次采集50条曲线并存入硬盘，以备进一步分析，脉冲发放间隔为5s，以便使钙通道从失活状态中恢复。各型钙通道记录的参数设置为：L-型钙通道，钳制电压-40mV，阶跃至0mV；N-型钙通道为-60mV→10mV，持续时间均为150ms。电极电阻2～4MΩ。封接电阻大于5GΩ。先记录正常L-和N-型钙通道，然后在浴液中分别加入Verapamil和Tet，Verapamil的终浓度为20μmol/L，Tet为7.5μmol/L、15μmol/L和30μmol/L。5min后再次记录同一膜片上的通道电活动，每型通道每一药物浓度记录10个膜片。

1.6 结果分析

线性漏电流和电容性脉冲用无通道开放的电流曲线叠加消除。用pClamp软件的Fetchan程序对曲线理想化，忽略水平0.01ms，滤波1KHz。用pStat程序对通道的开放时间、关闭时间进行指数拟合，对通道开放的电流幅度进行高斯拟合，用通道开放的总时间除以记录总时间求出通道开放的概率。用*t*检验分析进行统计学处理，实验结果用$\bar{x}\pm s$表示。

2 结 果

记录到的L-型钙通道如图1所示，该通道在去极化的整个过程均可开放，通道电流-1.5pV左右，电导值约28pS，其开放时间呈双指数分布，其时间常数τ_1和τ_2分别为0.50ms和2.47ms。关闭时间也呈双指数分布，其时间常数τ_1和τ_2分别为1.69ms和50.74ms，开放概率0.061。在浴液中加入Tet7.5、15和30μmol/L 5min后，发现Tet浓度依赖性抑制L-型钙通道的开放，使其开放时间缩短，关闭时间延长，开放概率降低。在浴液中加入钙通道阻滞剂Verapamil20μmol/L也可抑制L-型钙通道的开放。结果见表1。

记录到的N-型钙通道如图2所示，该通道的开放电流比L-型小，约-1.03pV，开放时间短，其开放时间呈双指数分布，时间常数$_1$和$_2$分别为0.44ms和1.76ms，关闭时间常数τ_1和τ_2分别为1.96ms和58.17ms，通道的开放概率0.053。在浴液中加入Tet7.5、15和30μmol/L，Tet可呈浓度依赖性抑制N-型钙通道的开放，而Verapamil对N-型钙通道无明显影响。结果见表2。

3 讨 论

应用膜片钳技术，已成功地在中枢神经系统的海马、纹状体、基底神经节等部位神经元膜上记录了钙通道单通道电流[6~8]。从本实验结果可见，建立的单个皮层神经元分离方法是成功的，细胞成活

(下转第3页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

IL-4基因修饰K_{562}细胞促进CTL杀伤活性的机制尚不十分清楚。由于IL-4基因修饰K_{562}诱导的CTL杀伤活性增强伴有T细胞增殖活性增强；另已证实IL-4基因修饰可促进K_{562}细胞死亡，此过程可能伴有肿瘤抗原暴露增多。故我们推测IL-4基因修饰K_{562}细胞后所诱导的瘤细胞死亡及T细胞功能的增强可能是IL-4基因修饰促进K_{562}诱导CTL杀伤活性的主要原因，但其细节尚需进一步研究。

参 考 文 献

[1] Bosco MC, Giovarelli M, Forni G, et al. Low doses of IL-4 injected perilymphatically in tumor-bearing mice inhibit the growth of poorly and apparently nonimmunogenic tumors and induce a tumor-specific immune memory [J].J Immunol,1990; 145:3136~3142

[2] Manabe A, Coustan-Smith E, Kumagai M, et al. Interleikin-4 induces programmed cell death (apoptosis) in cases of high-risk acute lymphoblastic leukemia [J]. Blood , 1994;83:1731~1737

[3] Musiani P, Modesti A, Giovareli G, et al. Cytokines, tumor-cell death and immunogenicity: a question of choice [J]. Immunol Today , 1997;18:32~36

[4] 赵晓东，李成荣，杨锡强，等. 人IL-4重组逆转录病毒载体的构建及在人肿瘤细胞中的表达 [J]. 重庆医科大学学报 , 1998; 23(1): 1~4

[5] Thomas FG, Renauld JC, Van pel A, et al. Costimulation of antitumor immunity by the B_7, IL-6 and IL-12 is sufficient for primary generation of murine antitumor cytolytic T lymphocytes in vitro [J]. J Immunol, 1995;154:5637~5643

[6] Colombo MP, Modesti A, Parmiani G, etal. Local cytokine availability elicits tumor rejection and systemic immunity through granulocyte-T-lymphocyte cross talk [J]. Cancer Res, 1992;52:4853~4857

[7] 黄贵清，李成荣，杨锡强，等. 重组B_7逆转录病毒载体的构建及其对T细胞功能的影响 [J]. 重庆医科大学学报. 1998;23(2): 14~17

(上接第19页)

较好，因消化用酶量较小，减少了胰蛋白酶对细胞的损伤，保证了通道电活动的记录。实验记录到的钙通道，其开关特征与在海马、纹状体 等神经元膜上记录到的结果基本一致，说明记录到的是典型的L-和N-型钙通道。

Tet是中药来源的钙通道阻滞剂，这已在心肌细胞、垂体前叶细胞、神经垂体末梢细胞上证实[1~3]。本室以前的工作表明，Tet对脑缺血有较好的保护作用，其机制可能与其阻滞钙通道有关[10]。本实验结果发现，Tet可浓度依赖性阻滞大鼠皮层神经元L-和N-型电压依赖性钙通道，缩短其开放时间，延长关闭时间，降低开放概率，从而减少钙内流。其对L-型钙通道的作用与经典的钙通道阻滞剂Verapamil相似，但稍弱，而Verapamil对N-型钙通道则无明显影响，此点与Tet不同。结果表明，Tet对L-和N-型钙通道的阻滞作用可能是其对缺血所致脑细胞损伤保护作用的机制之一。

参 考 文 献

[1] 曾 涛，牛小伟，瞿安连，等. 粉防己碱对分离的豚鼠心室肌单细胞动作电位及钙通道电流的影响[J]. 中国药理学与毒理学杂志， 1995; 9(3):196~198

[2] King VF, Garcia ML, Himmel P, et al. Interaction of tetrandrine with slowly inactivating calcium channels. Characterization of calcium channel modulation by an alkloid chinese medicinal herb origin[J]. J Bio Chem, 1988; 263(5): 2238~2244

[3] Wang G, Lemos JR. Tetrandrine blocks a slow,large-conductance, Ca^{2+}-activating potassium channel besides inhibiting non-inactivating Ca^{2+} current in isolated nerve terminals of the rat neurohypophysis[J]. Pflugers Arch, 1992; 421(6):558~565

[5] 王中锋，薛春生，肖家思，等. 大鼠皮层神经元膜片钳单通道记录模型[J]. 第三军医大学学报，1997; 19(3):271~274

[6] Hamill O, Marty A, Neher E, et al. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell free membrane patches[J]. Pflugers Arch, 1981; 391: 85~100

[7] Mogul DL, Fox AP. Evidence for multiple types of Ca2+ channels in acutely isolated hippocampal CA3 neurons of the guinea-pig[J]. J Physiol. 1991; 433(1):259~281

[8] Hoehn K, Watson TWJ, MacVicar BA, et al. Multiple types of calcium channels in acutely isolated rat neostriatal neurons[J]. J Neurosci. 1993; 13(3):1244~1255

[9] Umemiya M, Berger AJ., ibid . 1995; 15(3):2218~2230

[10].Dong Z . Xue CS, Zhou QX. Protective effects of tetrandrine and FDP on the model of focal cerebral ischemia in rat[J]. J Chin Pharmac, 1997; 6(1):45~48