DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.12.010
第23卷第12期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 12
2001年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2001

文章编号:1000-5404(2001)12-1403-03

论著

乌苏里藜芦生物碱对豚鼠心肌细胞动作电位及钙电流的影响

王建民[1],魏 苑[2],钟慈声[2],赵伟杰[3],郭永田[3],梁子钧[2] ([1]第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第六研究室,重庆 400042;[2]上海医科大学基础医学院生物物理学教研室,上海 200032;[3]大连医药科学研究所植化室,大连 116013)

提 要:目的 研究乌苏里藜芦生物碱对豚鼠心肌细胞动作电位及钙通道电流的作用。方法 用全细胞记录技术记录单个心室肌细胞动作电位以及钙通道电流。结果 乌苏里藜芦生物碱可延长动作电位时程,其在0.3~30 μmol·L^{-1}的浓度范围内,可使复极90%动作电位时程(APD_{90})和复极50%动作电位时程(APD_{50})分别延长13%~112%和23%~131%。3~30 μmol·L^{-1}的高浓度可诱发异常节律。乌苏里藜芦生物碱对心肌细胞钙电流有促进作用,此作用呈短暂的浓度依赖性增强。结论 乌苏里藜芦生物碱可通过增加钙通道电流延长心室肌细胞动作电位时程。

关键词:藜芦生物碱类;动作电位;心肌;钙通道;膜片钳技术
中图法分类号:R972.4;R544.1 文献标识码:A

Effects of Vera-U alkaloids on action potential and calcium current of cardiac myocytes in guinea pigs

WANG Jian-Min, WEI Yuan, ZHONG Ci-Sheng, ZHAO Wei-Jie, GUO Yong-Tian, LIANG Zi-Jun (Department 6, Institute of Surgery Research, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To study the effect of alkaloids of Veratrum Nigrum L. Var. Ussuriense Nakai (Vera-U alkaloids) on the action potential and the calcium current in guinea pig's cardiac myocytes. Methods After myocardiocytes were isolated from 23 guinea pigs, Vera-U alkaloid at 0.3, 3 and 30 μmol/L were added respectively in the culture medium. The action potentials and the calcium current in single cardiac myocyte were recorded with whole-cell patch clamp recording techniques. Results Vera-U alkaloids significantly lengthened the action potential duration (APD). The 50% and 90% repolarization (APD_{50} and APD_{90}) were prolonged from 23% to 131% and from 13% to 112% respectively when the concentrations of Vera-U alkaloids ranged from 0.3 to 30 μmol/L. The abnormal rhythm was evoked at higher concentration. Vera-U alkaloids developed an enhancement effect on calcium current (I_{Ca}) in a temporary concentration-dependent manner. Conclusion Vera-U alkaloids prolong APD, especially APD_{50}, and raise the excitability of cardiomyocytes by enhancing of the calcium current.

Key words: veratrum; action potentials; myocardium; calcium channels; patch-clamp techniques; veratrum alkaloids

乌苏里藜芦生物碱,具有显著的降压活性[1]。但迄今为止,由于对乌苏里藜芦生物碱心脏电生理特征缺乏了解,妨碍了乌苏里藜芦生物碱在心血管疾病治疗中的应用。众所周知,动作电位时程(Action Potential Duration, APD)是由通过各种肌纤维膜通道、离子泵和交换剂的电流所控制的,在心室肌细胞平台期的膜电流是极小的,因此,外向钾电流和内向钠、钙、钾电流的微小增加或减少均可导致动作电位时程的延长或缩短[2]。本工作的目的是研究乌苏里藜芦生物碱对心肌细胞动作电位和钙离子通道的影响。

1 材料与方法

1.1 实验准备

体重(290±39)g克的豚鼠23只(由中国科学院上海生理所实验动物中心提供),雌雄不拘。头部敲打致死,快速取出心脏备用。

1.2 实验分组

根据乌苏里藜芦生物碱的不同浓度,将实验分为0.3、3、30 μmol·L^{-1}不同浓度组与正常对照共4组。每组记录心肌细胞数为4~5个。

1.3 细胞制备

离体心脏在37 ℃条件下用充氧无钙液灌注5 min,然后用含3%胶原酶和10%牛血清白蛋白的无钙液灌注5 min。当心脏变软时,将心室在KB缓冲液中吹打,并轻轻搅拌,过滤悬浮在上清液中的心肌细胞。在20~22 ℃室温条件下,贮存于新鲜KB缓冲液中,10 h内备用。

1.4 心室肌细胞动作电位及钙电流记录

采用Nikon倒置显微镜观察细胞。细胞粘附于平皿底部后,以6~7 ml/min的速率,用细胞外缓冲液冲洗细胞。采用AXON-200A放大器,以全细胞电流钳制模式记录动作电位,以全细胞电压钳制模式记录钙电流。实验采用PCLAMP 6.0软件,玻璃微电极充满细胞内缓冲液以后,尖端阻抗为3~5 MΩ。补偿电容放电和系列阻抗,水池温度维持在(33±1)℃。

基金项目:国家卫生部科学研究基金项目(94065)
作者简介:王建民(1962—),男,江苏省南京市人,博士,副研究员,主要从事心血管细胞生物物理学方面的研究,发表论文23篇。电话:(023)68757564
收稿日期:2001-02-07;修回日期:2001-07-09

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.5 溶液和药物

1.5.1 溶液

1.5.1.1 无钙缓冲液(mmol·L^{-1}) NaCl 132、KCl 4、$MgCl_2$ 1.2、葡萄糖 11，NaOH 调 pH 至 7.3。

1.5.1.2 KB 缓冲液 mmol·L^{-1}) KOH 70、KCl 40、KH_2PO_4 20、$MgCl_2$ 3、L-谷氨酸 50、氨基乙磺酸 20、EGTA 0.5、HEPES 10、葡萄糖 10，KOH 调 pH 至 7.4。

1.5.1.3 记录动作电位的细胞内(电极)缓冲液(mmol·L^{-1}) KCl 140、$MgCl_2$ 1、Na_2-ATP 5、EGTA 5、HEPES 10，用 KOH 调 pH 至 7.3。

1.5.1.4 记录钙电流的细胞内(电极)缓冲液(mmol·L^{-1}) CsCl 80、CsOH 40、$MgCl_2$ 2、EGTA 10、HEPES 10、Mg-ATP 5，CsOH 调 pH 至 7.3。

1.5.1.5 记录动作电位的细胞外缓冲液(mmol·L^{-1}) NaCl 132、KCl 4、$CaCl_2$ 1.8、$MgCl_2$ 1.2、葡萄糖 11，用 NaOH 调 pH 至 7.3。

1.5.1.6 记录钙电流的细胞外缓冲液(mmol·L^{-1}) CsCl 110、$CaCl_2$ 5、$MgCl_2$ 0.5、TEA 40、葡萄糖 10，用 CsOH 调 pH 至 7.4

1.5.2 药物 乌苏里藜芦生物碱(由大连医药科学研究所提供)是一种无色、透明的水溶性物质，分子结构已有报道[3]。四乙基氯化铵(Tetraethylammonium，TEA)和尼索地平(Nisoldipine)购自 Sigma。

1.6 统计学分析

所有数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用配对或分组 t 检验。

2 结果

2.1 乌苏里藜芦生物碱对心室肌细胞动作电位的影响

0.3 μmol·L^{-1}浓度的乌苏里藜芦生物碱能延长单个心室肌细胞动作电位时程见图 1。0.3、3、30 μmol·L^{-1}浓度的乌苏里藜芦生物碱以浓度依赖的方式延长动作电位平台。90% 的动作电位时程与 50% 的动作电位时程分别从(14±9)% 与(23±6)% 延长至(112±7)% 与(131±18)%，见表 1。当乌苏里藜芦生物碱的浓度增加到 3、30 μmol·L^{-1}时，可观察到不规则的异常节律。

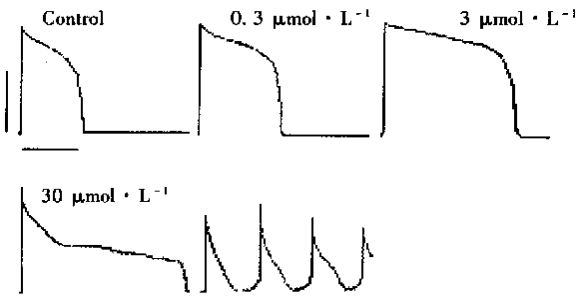


图 1 乌苏里藜芦生物碱在 5 min 以内对心室肌细胞动作电位的作用

Fig 1 Effect of Vera-U alkaloids on action potentials in single ventricular myocyte within 5 min

表 1 乌苏里藜芦生物碱对心肌细胞动作电位时程和幅度的影响

Tab 1 Effect of Vera-U alkaloids on the action potential duration (APD) and action potential amplitude (APA) of myocardiocytes

Vera-U(μmol·L^{-1})	n	APD_{90}(ms)	APD_{50}(ms)	APA(mV)
Control	5	346±38	285±45	144±3
0.3	5	349±37[b]	324±14[b]	136±8
3	5	455±36[b]	387±67[b]	146±9
30	5	734±61[c]	659±70[c]	114±8[b]

b: $P<0.05$, c: $P<0.01$ *vs* control

2.2 乌苏里藜芦生物碱对心室肌细胞钙电流的影响

当细胞膜电位被钳制在 −40 mV，给予 40 mV、500 ms、1 Hz 的去极化刺激时，可记录到最大钙电流。图 2 表明，0.3、3 与 30 μmol·L^{-1}的乌苏里藜芦生物碱能分别增加钙电流(31±7)%，(50±3)% 与(102±2)%。

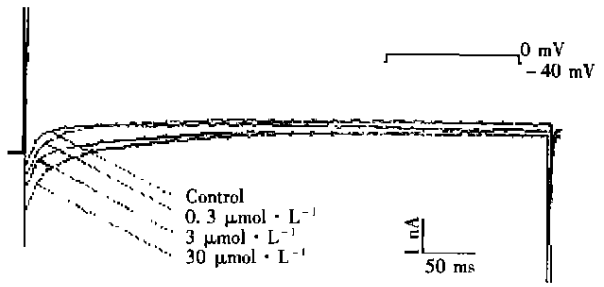
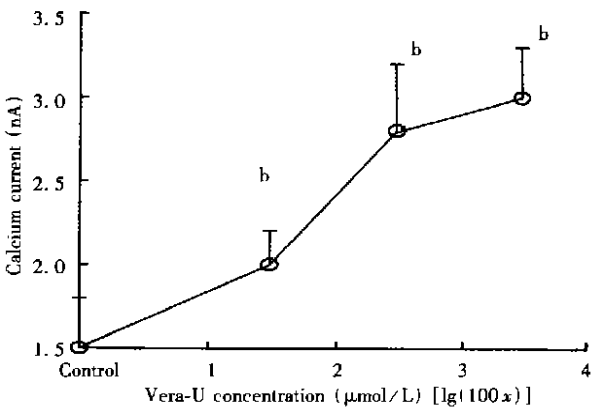


图 2 加乌苏里藜芦生物碱 5 min 后对心肌细胞钙电流的增强作用

Fig 2 Enhancing effect of Vera-U alkaloids on calcium current in ventricular myocytes 5 min after administration

乌苏里藜芦生物碱对钙电流的增强作用表现出浓度依赖方式，浓度愈高，作用愈明显，见图 3。并且，其对钙电流增强作用在给药后 1 min 达最大，尽管该作用能维持 10 min，但衰减很快，见图 4。

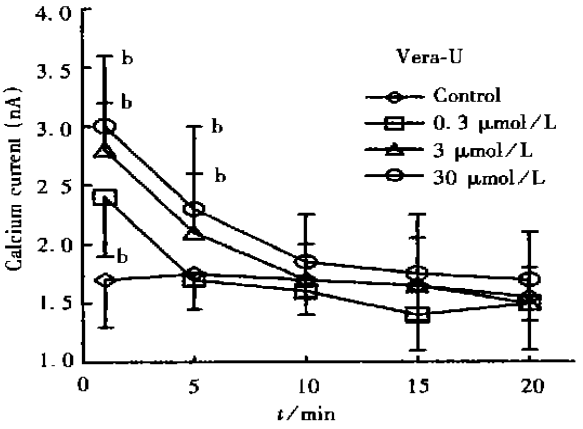


b: $P<0.05$ *vs* control

图 3 加乌苏里藜芦生物碱 1 min 后钙电流的浓度依赖性曲线

Fig 3 Concentration-response curve of calcium current 1 min after Vera-U alkaloids administration

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

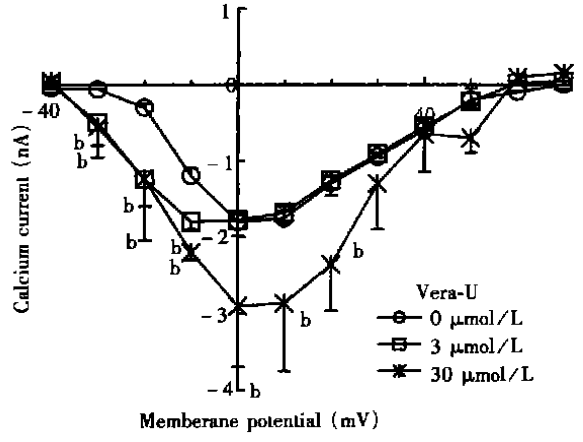


b: $P<0.05$ *vs* control

图 4　加乌苏里藜芦生物碱 1 min 后钙电流的时间依赖性曲线

Fig 4　Time-response curve of calcium current 1 min after Vera-U alkaloids administration

从钳制电位－40 mV 到＋60 mV, 以 10 mV 的阶跃使细胞去极化, 可导致钙电流的激活与失活。给乌苏里藜芦生物碱 0.3、3、30 $\mu mol \cdot L^{-1}$ 前后钙电流的变化幅度有一些差异。尽管乌苏里藜芦对钙电流的最大激活电位表现在 0 mV, 但是低浓度(0.3、3 $\mu mol \cdot L^{-1}$)的乌苏里藜芦生物碱只能在－40～0 mV 的膜电位范围增强钙电流, 而高浓度(30 $\mu mol \cdot L^{-1}$)的乌苏里藜芦生物碱几乎能在每一个膜电位水平(－40 mV～＋40 mV)增加钙电流。平均反转电位对照组为 60 mV, 0.3、30 $\mu mol \cdot L^{-1}$ 乌苏里藜芦浓度时分别为 55、50 mV, 见图 5。



b: $P<0.01$ *vs* control

图 5　对照组与加 3、30 $\mu mol \cdot L^{-1}$ 乌苏里藜芦生物碱组钙电流的电流-电压关系曲线

Fig 5　Current-voltage curves of calcium current for the control cells and those treated with Vera-U alkaloids of 3 and 30 $\mu mol/L$

3　讨论

乌苏里藜芦生物碱对心肌细胞最显著的作用是动作电位时程的延长。本研究表明, 3 $\mu mol \cdot L^{-1}$ 乌苏里藜芦浓度时, 异常心肌细胞节律能被记录到。当药物浓度进一步升高时, 将会出现更多的异常动作电位波形。同时, 高浓度的乌苏里藜芦生物碱使动作电位平台期有非常显著的延长。5%动作电位时程的延长较之 90%更加显著。

动作电位的去极化是内向和外向电流之间良好平衡的结果。平台期的延长有可能是由于总的内向电流的增加和外向电流的减少。为了分析动作电位时程延长机制, 我们采用膜片钳技术进一步研究了乌苏里藜芦生物碱对钙电流的影响。结果表明, 乌苏里藜芦生物碱能在给药后最初 5 min 内增加钙电流。为了避免"RUNDOWN"现象[4], 本实验仅记录了给药后 5 min 的动作电位。因此, 本结果证明, 动作电位时程的延长, 与长平台期中钙进入细胞有关。

各种黎芦生物碱的药理学特性有许多差异, 在我们的实验中, 乌苏里藜芦生物碱对动作电位幅度没有明显影响。这意味着乌苏里藜芦生物碱对钠电流没有很强的作用, 但是, 其它种属的黎芦生物碱被证明对钠电流有作用[5]。此外, 也有文献报道其它种属的黎芦生物碱对钾通道电流有明显的影响, 这可能与高浓度乌苏里藜芦生物碱导致心肌细胞异常节律的出现有关。因此, 仍需要对乌苏里藜芦生物碱作进一步的研究。

总之, 乌苏里藜芦生物碱能短暂性地增加钙电流, 延长动作电位时程, 尤其是 50%动作电位时程。心肌细胞动作电位时程的延长, 将增强心肌收缩功能。因此, 应用适量浓度的乌苏里藜芦生物碱, 有助于增强心肌细胞的收缩功能, 从而改善高血压时的心脏超负荷状态。

参考文献:

[1] 李淑媛, 李卫平, 李传勋, 等. 盐酸乌苏里藜芦碱对犬血流动力学的实验观察[J]. 大连医科大学学报, 1996, 18(1): 15－18.

[2] Noble D, Tsien R W. The repolarization process of heart cells[A]. In: de Mello W C. Electrical phenomena in the heart[M]. New York: Academic Press, 1972. 133－161.

[3] Zhao W J, Yasuhiro T, Tohru K, *et al*. Studies on the constituents of veratrum plants[J]. Chem Pharm Bull, 1991, 39(3): 549－554.

[4] Hume J R. A whole-cell patch clamp technique which minimizes cell dialysis[J]. Mol Cell Biochem, 1988, 80(1－2): 49－57.

[5] Nanasi P P, Varro A, Bryant S H, *et al*. Effects of veratrine on ion currents in single rabbit cardiomyocytes[J]. Gen Pharmacol, 1994, 25(8): 1 667－1 672.

(编辑　冷怀明)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net