DOI:10.16016/j.1000-5404.1994.03.016

人参皂甙 Rg_1 对培养心肌细胞钙通道阻滞作用的单通道分析

王中峰 江 岩* 钟国赣* 陈 龙* 肖家思 (第三军医大学基础部生理学教研室) 630038

提 要 用细胞吸附(Cell-attached)的膜片钳(Patch clamp)方法,在培养24～48 h的Wistar大鼠乳鼠心室肌细胞上,研究 Rg_1 对心肌细胞钙通道的影响。由－70 mV的保持电位,阶跃至－10 mV诱发T型钙通道的活动,由－50 mV阶跃至＋10 mV诱发L型钙通道的活动,在－60 mV的保持电压下,记录B型钙通道的活动。向浸浴液中分别加入 Rg_1,钙通道阻断剂Verapamil,钙通道激动剂Bay K 8644,使其终浓度分别为50 μg/ml,37.5 μg/ml和5 μmol/L。记录加药前后三型钙通道的电活动。结果发现:Rg_1 可使三型钙通道的平均开放时间缩短,平均关闭时间延长,对三型钙通道的 Ba^{2+} 流幅值无明显影响,其作用与Verapamil相似,与Bay K 8644相反。实验首次证明 Rg_1 对心肌细胞钙通道有阻滞作用,其机制在于使钙通道的平均开放时间缩短,平均关闭时间延长,开放概率减小。

关键词 心肌/细胞学;钙通道阻滞剂;膜片钳;人参皂甙 Rg_1

中图法分类号 R972.3

心肌细胞的离子通道比较复杂,过去由于受研究方法的限制,加之钙离子流比其它离子流要小得多,因而认识的较少。膜片钳(Patch clamp)实验方法的建立[1],使人们对心肌钙通道的认识也越来越多。到目前为止,已在心肌上记录出T,L和B三型钙通道[2～5]。已知三七皂甙 Rb_1,Rg_1 和人参皂甙 Rb_1,Rg_1 的结构完全相同,且有相似的性质。有实验证明[6]:三七皂甙 Rb_1 有钙通道阻断作用,而 Rg_1 则无关。但在培养的心肌细胞上证实人参三醇皂甙(PTS)有钙通道阻断作用[7,9]。本文在培养的心肌细胞上,应用细胞吸附的膜片钳技术,以三型钙通道的单通道电活动为指标,研究人参皂甙 Rg_1 对钙通道的影响,以进一步分析PTS的钙通道阻断作用是否与其代表性单体 Rg_1 有关。

1 材料与方法

1.1 仪器设备

二氧化碳孵箱(QUEUE,香港);超净工作台(苏州净化设备厂);示波器(VC-10,KOHDEN,JAPAN);磁带记录仪(SONY,JAPAN);膜片钳放大器(DAGAN 8800,USA)。

1.2 药品试剂

人参皂甙单体 Rg_1(经高效液相色谱和薄层扫描法测定,其纯度为95%,白求恩医科大学有机化学教研室)。

BAY K8644(Calbiochem CO,USA);Verapamil (Ger);Sylgard (Dowcorning,MI 48640,USA)。

1.3 溶液配制(mmol/L)

浸浴液:天门冬酸钾140,EGTA 10,HEPES 10,pH7.4。

电极充灌液:$BaCl_2$ 110,HEPES 10,pH7.4。

1.4 心肌细胞培养

取生后2～4 d的Wistar大鼠乳鼠心尖部组织,用含有0.1%胰蛋白酶、0.1%牛血清蛋白的无钙、无镁Hank's液消化,反复3次,每次消化后,静置3 min,将后两次的上清液2 000 rpm离心10 min。将分离的单个心肌细胞用含有20%小牛血清的DMEM培养液进行稀释,在37℃、通5%CO_2＋95%空气的二氧化碳孵箱中进行培养,2 h后做贴壁分离,于培养24～48 h期间进行实验记录。

1.5 玻璃微电极的制备

用一次拉制法将GG-17硬质玻璃微电极毛坯(中国科学院上海脑研究所)拉制成微电极。微电极尖端直径1～1.5 μm,充灌后电极电阻2～4 mΩ。用疏水性绝缘材料硅酮树酯(Sylgard)涂于微电极尖端,然后进行热抛光。用直径0.2 μm的微孔滤膜滤过电极充灌液后,充灌微电极。

1.6 单通道记录

如图1所示,将膜片钳放大器采集的信号经示波器垂直放大后输至磁带记录仪,连续存储信号,以备进一步处理。同时,经A/D卡并联至微型计算机,同步进行采样。微机发出的触发脉冲经D/A卡控制膜片钳放大器发放阶跃命令。膜片钳放大器和示波器的低通滤波器截止频率均设置1 KHz。

取培养24～48 h的心肌细胞,向培养皿中加入经滤过(滤膜孔径0.20 μm)的浸浴液1.5 ml。选择贴壁良好、呈短杆状、表面光滑清洁的心肌细胞,将微电极尖端压向心肌细胞表面,用注射器抽吸,形成约0.98～1.96 kPa的负压,在几秒钟内即可形成GΩ(10^9 Ω)的紧密封接,选用封接电阻大于10 GΩ的膜片进行实验,实验在室温(18～23℃)下进行。每型通道每种药物记录6个膜片。

1.7 数据的采集处理及统计分析

在每次记录中,连续采集50条原始曲线,删除原始曲线中阶跃命令的电容伪迹,并修平基线。计算出加药前后三型钙通道的 Ba^{2+} 流幅值、平均开放时间、平均关闭时间、以及通道的开放概率。实验数据用均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,用配对的 t 检验进行统计学处理。

* 白求恩医科大学生理中心实验室

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

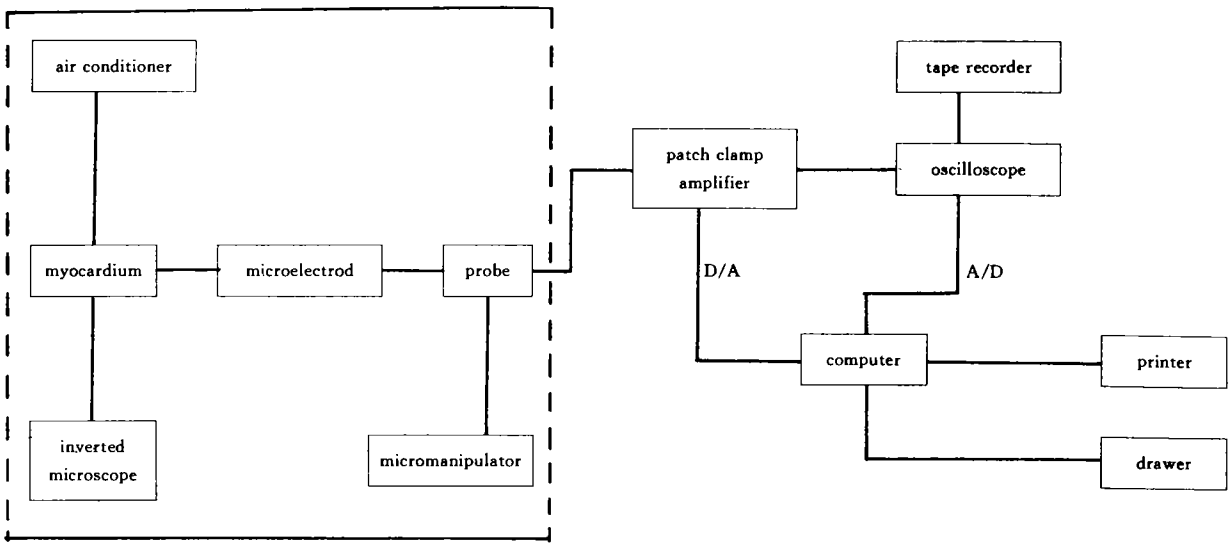


图 1　仪器的线路连接框图　　**Fig 1　Link of experimental apparatus**

2　实验结果

2.1　三型钙通道的单通道电活动记录

由膜片钳放大器给细胞加－70 mv 的保持电位，把心肌细胞的跨膜电位钳制在膜内比膜外低 70 mV 的水平，然后，由微机以每秒 0.8 次的频率发出持续 256 ms 的＋60 mV 的阶跃命令，使膜电位跃变到－10 mV，即可记录到 T 型钙通道的单通道电活动，T 型钙通道的开放主要出现在阶跃命令的早期，表明该通道失活比较快。由－50 mV 阶跃至＋10 mV，可记录到 L 型钙通道的单通道电活动，L 型钙通道开放时，其 Ca^{2+} 流幅值较大，表明 L 型钙通道的单通道电导比 T 型大。由于 B 型钙通道是自发性发放，因此，不加阶跃命令，只给细胞膜加－60 mV 的保持电位，即可记录出 B 型钙通道的单通道电活动。

2.2　Rg_1 对三型钙通道电活动的影响

记录出三型钙通道的单通道电活动后，向浸浴液中加入 Rg_1，使其终浓度为 50 μg/ml，5 min 后，再次记录同一膜片的三型钙通道的单通道电活动。实验结果表明：加药后，T、L 和 B 三型钙通道的平均开放时间均明显缩短，平均关闭时间明显延长，通道的开放概率明显减小，通道的 Ca^{2+} 流幅值无明显变化（图 2～4，表 1～3）。

2.3　Verapamil 和 Bay K 8644 对三型钙通道的影响

记录到三型钙通道的单通道电活动后，向浸浴液中分别加入钙通道抑制剂 Verapamil 和钙通道激动剂 Bay K 8644，使其终浓度分别为 37.5 μg/ml 和 5 μmol/L，5 min 后，再次记录同一膜片的三型钙通道的单通道电活动。

实验结果表明：加入 Verapamil 后，T、L 和 B 三型钙通道的平均开放时间明显缩短，平均关闭时间明显延长，通道的开放概率明显减小，而 Bay K 8644 的作用刚好相反，通道开放的 Ba^{2+} 流幅值无明显变化，（图 2～4，表 1～3）。

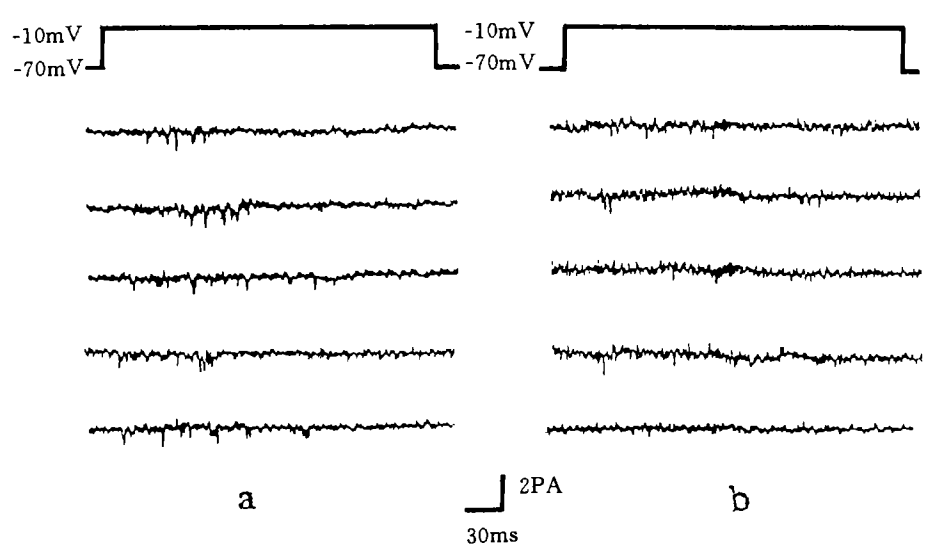


图 2　Rg_1 对 T 型钙通道的影响　a：加药前，b：加药后；保持电位：－70 mV，阶跃命令：－70 mV→－10 mV

Fig 2　The effect of Rg_1 on T-type calcium channel.　a：before administration，b：after administration；Holding potential：－70 mV，Step command：－70 mV→－10 mV

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

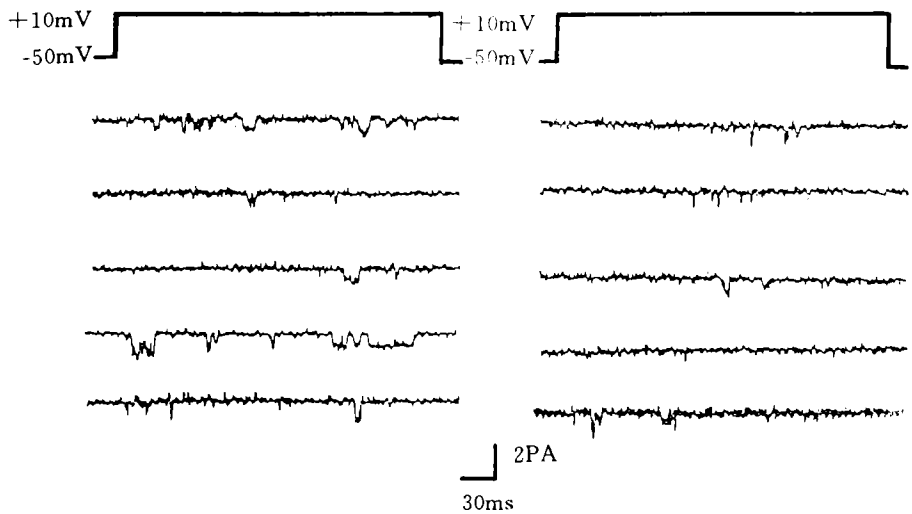


图 3 Rg_1 对 L 型钙通道的影响 a:加药前,b:加药后;保持电位:−50 mV,阶跃命令:−50 mV→+10 mV

Fig 3 The effect of Rg_1 on L-type calcium channel a:before administration, b:after administration; Holding poetntial: −50 mV, Step command: −50 mV→+10 mV

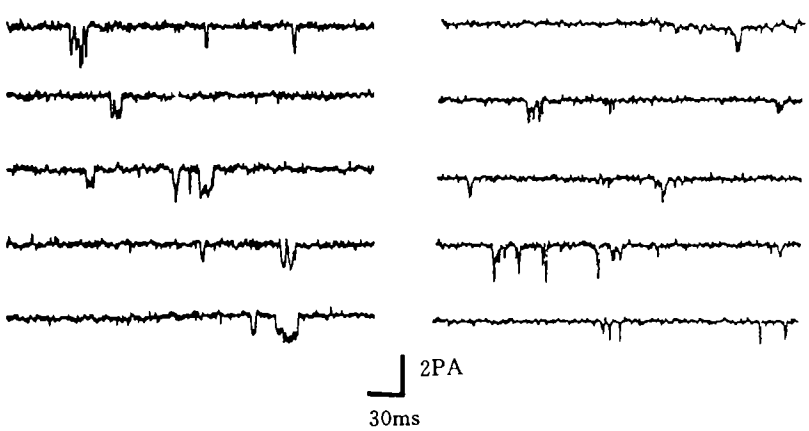


图 4 Rg_1 对 B 型钙通道的影响 a:加药前,b:加药后;保持电位:60 mV

Fig 4 The effect of Rg_1 on B-type calcium channel a:before adminstration, b:after administration; Holding potential: −60 mV

表 1 L 型钙通道的平均开放时间、关闭时间、Ba^{2+}流幅值和开放概率

Tab 1 Open time, close time Ca^{2-} current amplitude and open-state probability of L-type calcium channel

	open time (ms)	Close time (ms)	Ca^{2-} current amplitude(pA)	Open-state probability
Control	3.35±0.34	122.68±25.73	2.00±0.65	0.029±0.006
Rg_1	2.18±0.28※※※	160.39±23.98※	1.87±0.51	0.014±0.004※※※
Control	4.15±0.30	124.88±35.19	1.53±0.49	0.035±0.013
Verapamil	2.42±0.25※※※	190.45±19.31※※	1.62±0.19	0.013±0.002※※
Control	3.34±0.21	152.90±29.99	1.62±0.59	0.021±0.004
Bay K 8644	4.52±0.39※※※	110.72± 9.30※※※	1.55±0.71	0.040±0.005※※※

$\bar{x} \pm s$;※ $P<0.05$,※※ $P<0.01$,※※※ $P<0.001$ *vs* Control

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

表2　T 型钙通道的平均开放时间、关闭时间、Ba^{2+} 流幅值和开放概率

Tab 2　Open time, close time Ca^{2+} current amplitude and Open-state probabiliaty of T-type calcium channel

	Open Time (ms)	Close Time (ms)	Ca^{2+} current amplitude(pA)	Open-state probability
Control	2.20±0.19	71.29±22.83	0.74±0.09	0.028±0.007
Rg_1	1.56±0.12※※※	139.19±35.03※※	0.70±0.05	0.014±0.002※※
Control	2.07±0.10	65.02± 9.87	0.76±0.04	0.032±0.006
Verapamil	1.51±0.27※※	188.89±21.03※※※	0.66±0.13	0.008±0.002※※
Control	1.89±0.15	116.19±14.34	0.65±0.05	0.016±0.003
Bay K 8644	2.32±0.03※※※	49.96±11.65※※※	0.66±0.05	0.046±0.009※※※

$\bar{x}\pm s$；※ $P<0.05$，※※ $P<0.01$，※※※ $P<0.001$ *vs* Control

表3　B 型钙通道的平均开放时间、关闭时间、Ca^{2+} 流幅值和开放概率

Tab 3　Open time, close time Ca^{2+} current amplitude and open-stste probability of B-type calcium channel

	Open time (ms)	Close time (ms)	Ca^{2+} current amplitude(pA)	Open-state probabilithy
Control	4.11±0.73	52.77±23.84	2.27±0.83	0.081±0.003
Rg_1	2.48±0.25※※※	128.46±44.51※※※	2.04±0.80	0.021±0.010※※※
Control	5.17±0.50	33.26±13.96	1.20±0.09	0.160±0.059
Verapamil	2.40±0.20※※	147.19±45.60※※	1.36±0.02	0.017±0.047※
Control	4.05±0.33	88.40±14.73	1.41±0.22	0.083±0.009
Bay K 8644	4.74±0.42※※	35.30±12.41※※※	1.40±0.18	0.149±0.098※

$\bar{x}\pm s$；※ $P<0.05$，※※ $P<0.01$，※※※ $P<0.001$ *vs* Control

3　讨论

心肌的钙通道在心肌兴奋及收缩活动中具有重要的作用。应用膜片钳技术，在心肌细胞上已经发现有 T、L 和 B 三型钙通道。T 型钙通道的开放时间较短，单通道电导较小，其活动形式为簇状开放，且大多集中在阶跃命令的早期，T 型钙通道的激活电压较负，在膜电位为－50 mV 时几乎完全失活；L 型通道的开放时间较长，单通道电导较大，其开放也呈短簇状，在整个阶跃命令中均可开放，其激活电压要比 T 型正40 mV 左右；B 型钙通道为自发性发放通道，具有明显的电压依赖性。

人参皂甙单体 Rg_1 是三醇组皂甙的一个代表性单体，与三七皂甙单体 Rg_1 的结构完全相同，且有相似的作用。离体心脏灌流观察到，100 μg/ml 的 PTS 可使心肌收缩性能立即减弱，洗脱后，各项指标迅速恢复，Ca^{2+} 或肾上腺素均可使其作用逆转，PTS 的作用与 2.66 μg/ml 的 nimodipine 作用相当，认为 PTS 有钙通道阻滞作用[8]。养的心肌细胞上，以动作电位与自发性搏动为指标，观察到 PTS 可使心肌细胞动作电位呈现钙通道阻滞样变化，即动作电位各参数呈剂量依赖性减小，其作用与钙通道阻断剂 Mn^{2+} 相似，洗脱、肾上腺素、Ca^{2+} 均可使其作用逆转[7]。应用细胞吸附的膜片钳实验也观察到 PTS 有明显的钙通道阻滞作用[9]。

既然 Rg_1 是 PTS 的代表性单体，那么 PTS 的钙通道阻断作用是否与 Rg_1 有关呢？本实验结果表明，50 μg/ml 的 Rg_1 可明显缩短三型钙通道的开放时间，延长其关闭时间，减小其开放概率，而对 Ca^{2+} 流幅值无影响，说明 Rg_1 不影响钙通道的电导状态。此结果与熊志刚等[6]用三七皂甙 Rg_1 的结果不同，他们应用单蔗糖间隙电压钳法测量膜电流，结果发现三七皂甙 Rb_1 有钙通道阻滞作用，Rg_1 不影响钙通道电流，而是影响了细胞内钙的释放。由于人参皂甙 Rg_1 和三七皂甙 Rg_1 的结构完全相同，对钙通道应有相同的作用，但应用不同的研究手段所得的结果不同，我们认为：应用膜片钳技术研究离子通道的结果是可信的，而且，在我们其它的实验中也观察到人参皂甙 Rg_1 对培养心肌细胞动作电位有抑制作用（待整理），说明对钙通道确实有阻滞作用。

为了进一步分析 Rg_1 的作用机制，我们对比观察

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

了钙通道抑制剂 Verapamil 和钙通道激动剂 Bay K 8644对三型钙通道的作用。结果发现，Verapamil 可使三型钙通道的开放时间明显缩短，关闭时间明显延长，通道的开放概率明显减小；而 Bay K 8644的作用刚好相反。Rg_1的作用与 Verapamil 相似，与 Bay K 8644相反，确切证明了人参皂甙单体 Rg_1的钙通道阻滞作用，其机制在于使钙通道的平均开放时间缩短，平均关闭时间延长，通道的开放概率减小。由此认为，PTS 的钙通道阻断作用与 Rg_1组分密切相关。但 Rg_1如何作用于细胞膜，通过何种细胞内机制影响钙通道还不清楚，有待于进一步地研究。

参考文献

1 Hamill O, Marty A, Neher E, et al. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from celles and cell-free membrane patches. Pflugers Arch, 1981, 391: 85

2 Reter H, Sterens CF, Tsien RW, et al. Properties of single calcium channels in cardiac culture. Nature, 1982, 297: 501

3 Nilius B, Hess P, Lansman JB, et al. A novel type of cardiac calcium channel in ventricular cells. Nature, 1985, 316: 443

4 Rosenberg RL, Hess P, Tsien RW. Cardiac calcium channels in planar lipid bilayers L-type channels and calcium-permeable channels open at negative potentials. J Gen Physiol, 1988, 92: 27

5 Coulombe A, Lefever IA, Baro I, et al. Barium and calcium-permeable changes open at negative membrane potentials in rat ventricular myocytes. Member Biol, 1989, 11: 57

6 熊志刚，孙家钧. 三七皂甙 Rb_1和 Rg_1对心肌动作电位及慢内向电流的影响. 中国药理学报，1989，10：520

7 江 岩，钟国赣，邵春杰，等. 人参二醇组皂甙与人参碱醇组皂甙对培养心肌细胞钙通道的阻滞作用. 中国中药杂志，1992，17：172

8 孙晓霞，战 术，钟国赣，等. 在离体工作心脏上对比观察人参二醇与三醇组皂甙的钙通道阻滞作用. 白求恩医科大学学报，1992，18：409

9 王晓明，江 岩，王中峰，等. 人参三醇组皂甙对大鼠心室肌细胞 L 型、T 型、B 型钙通道的阻滞作用. 白求恩医科大学学报，1993，19：119

（收稿：1993-10-21；修回：1994-04-13）

Single channel analysis of the blockade effect of ginsenoside Rg_1 on calcium channel of cultured myocardiocytes in rats

Wang Zhongfeng, Jiang Yan, Zhong Guogan, Chen Long, Xiao Jiashi (Deparment of Physiology, Third Military Medical College, Chongqing, 630038)

Abstract The calcium current flowing through the calcium channels of 24 to 48-hour cultured myocardiocytes of Wistar rats was recorded with the cell-attached configuration of patch clamp technique. The activity of L-type calcium channel was induced with holding potentials stepping from −50 to +10mV. That of T-type calcium channel with holding potentials stepping from −70 to −10 mV and the spontaneous single channel activty of B-type calcium channel was recorded at a holding potential of −60 mV. Ginsenoside Rg_1 50 μg/ml, verapamil 37.5 μg/ml, a calcium channel blocker and Bay K 8644 5 μmol/L, a calcium chennel activator were added to the bath solution and the electric activity of the 3 calcium channels were recorded before and after the administration of 3 agents. It was found that Rg_1 was able to shorten the open phase and prolong the close phase of the 3 channels but exerted no effect on the magnitude of the calcium current flowing through the 3 channels. The action of Rg_1 was similar to that of verapamil but opposite to that of Bay K 8644. The study confirms that Rg_1 exertes blockade effect on the calcium channel of myocardiocytes with the mechanism to shorten the open phase, prolong the close phase and reduce the open probability.

Key words myocardium/CY; calcium channel blockers; patch clamp ; ginsenosisde Rg_1

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