

人参皂苷 Re 对大鼠心室肌细胞钠、钾离子通道的影响

孟红旭 姚明江 刘建勋

(中国中医科学院西苑医院基础医学研究所, 中药药理北京市重点实验室, 北京, 100091)

摘要 目的: 观察人参皂苷 Re 对大鼠心室肌细胞电压依赖性的钠、钾离子通道的影响, 揭示其抗心律失常的作用机制。方法: 采用酶分法获得单个大鼠心室肌细胞, 在全细胞膜片钳技术模式下, 记录电压依赖性钠通道、瞬时外向钾通道和内向整流钾通道电流, 并观察不同浓度的人参皂苷 Re 对电流幅度的影响。结果: 给予人参皂苷 Re ($10, 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 后钠通道电流幅度呈现减小的趋势, 对通道电流幅度的抑制率分别为 $(25.5 \pm 5.7)\%$ ($n=3$) 和 $(46.2 \pm 18)\%$ ($n=4$)。给予人参皂苷 Re ($10, 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 对瞬时外向钾电流幅度略有抑制, 洗脱后电流恢复, 其中 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 人参皂苷对电流的抑制率为 $(13 \pm 9)\%$ ($n=3$)。给予人参皂苷 Re ($10, 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 后内向整流钾电流幅度呈现逐渐减小的趋势, 药物洗脱后电流完全恢复, $(10, 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$ 对通道电流幅度的抑制率分别为 $(16.3 \pm 8.7)\%$ ($n=5$) 和 $(35.4 \pm 11.2)\%$ ($n=5$)。结论: 人参皂苷 Re 能够抑制心室肌细胞电压依赖性的钠通道、瞬时外向钾通道和内向整流钾通道电流发挥抗心律失常的作用。

关键词 人参皂苷 Re; 膜片钳; 钠通道电流; 钾通道电流

Effects of Ginsenoside Re on Sodium and Potassium Current in Rat Ventricular Myocytes

Meng Hongxu Yao Mingjiang, Liu Jianxun

(Institute of Basic Medical Sciences of Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing key

Laboratory of pharmacology of Chinese materia medica, Beijing 100091, China)

Abstract Objective: To investigate the effects of Ginsenoside Re on voltage-dependent sodium current and potassium current in rat ventricular myocytes, and to investigate the mechanism of antiarrhythmia. **Methods:** The effect of Ginsenoside Re on sodium current (I_{Na}), transient outward potassium current (I_{to}) and inwardly rectified potassium current (I_{K1}) were assessed by applying whole-cell patch clamp technique in single cardiac myocytes. **Results:** Ginsenoside Re ($10, 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) was shown to inhibit the altitude of I_{Na} and the inhibition ratio was $25.5 \pm 5.7\%$ ($n=3$) and $46.2 \pm 18\%$ ($n=4$). It was shown a little inhibition by Ginsenoside Re ($100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) and its effects were reversible completely after washout. The inhibition ratio of I_{to} was $13 \pm 9\%$ ($n=3$) in $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Ginsenoside Re ($10, 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) inhibited the altitude of I_{K1} and the inhibition ratio was $16.3 \pm 8.7\%$ ($n=5$) and $35.4 \pm 11.2\%$ ($n=5$). **Conclusion:** Ginsenoside Re can inhibit sodium current and potassium currents to produce antiarrhythmic effect.

Key Words Ginsenoside Re; Patch clamp technique; Sodium current; Potassium current

doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2013.10.005

人参皂苷 Re (Ginsenoside Re) 是人参根中的主要人参皂苷类物质, 属三醇类人参皂苷。大量研究证明人参皂苷对离体心肌细胞和多种动物心肌缺血、心肌梗死、再灌注损伤均具有保护作用^[1], 从人参化学成分与抗心律失常构效关系来看, 人参皂苷 Re 抗心律失常活性最强^[2]。最近研究表明人参皂苷 Re 能够通过抑制心肌细胞 L-型钙电流和增强延迟整流钾电流缩短动作电位发挥抗心律失常的作用^[3], 但是人参皂苷 Re 对钠电流及其他类型钾电流的作用还不清楚。我们在通过膜片钳技术观察了人参皂苷 Re 对大鼠心室肌细胞电压依赖性钠通道、瞬时外向钾通道和内向整流钾通道电流的影响。

1 材料和方法

1.1 药物和试剂

1.1.1 药物 人参皂苷 Re 由中国药品生物制品检定所购置; 配液所需药品除指定外皆由英国 Alfa Aesar 公司购置。

1.1.2 试剂 (mmol/L) 无钙台式液: NaCl 140, KCl 5.4, NaH_2PO_4 0.33, MgCl_2 1, Glucose 10, Hepes 10 (pH7.4 NaOH); KB 液: KOH 70, KCl 40, KH_2PO_4 20, Glutamic acid 50, MgCl_2 3, Taurine 20, EGTA 0.5, Hepes 10, Glucose 10 (pH7.4 KOH); 记录钠电流细胞外液: Choline chloride 130, NaCl 10, MgCl_2 1, NaH_2PO_4 0.33, CsCl 5.4, CaCl_2 0.1, CoCl_2 0.1, Glucose 10, HEPES 10 (pH 7.4 CsOH); 记录钠电流电极内液: NaCl 5, MgATP 5, CsCl 20, CsF110, MgCl_2 1 EGTA 5, HEPES 5 (pH 7.2 CsOH); 记录钾电流细胞外液: Choline chloride 135, KCl 5.4, MgCl_2 1.1, CaCl_2 1.8, CdCl_2 0.5, Glucose 10,

基金项目: 中国中医科学院自助选题项目 (编号: zz070821), 科技部十二五重大新药创制课题 (编号: 2012ZX09301002-004)

作者简介: 孟红旭, 男, 博士, 助理研究员, 研究方向中药药理学, E-mail: amfd003@163.com

通信作者: 刘建勋, 男, 研究员, 博士生导师, 主要从事心脑血管药理学研究, Tel: 010-62835601, E-mail: liujx0324@sina.com

HEPES 10 (pH 7.4 KOH); 记录钾电流电极内液: KCl 140, Na₂ATP 5, MgCl₂ 1, EGTA 5, HEPES 10, Glucose 10, (pH 7.2 KOH)

1.2 心肌细胞的分离^[4] 取 SD 大鼠 (180 ± 10) g, ♂, 10% 乌拉坦腹腔麻醉, 迅速开胸取出心脏, 在零度无钙台式液中剥离出主动脉, 悬挂于 Langendorff 心脏灌流装置上, 确保管口不超过主动脉的心脏入口, 棉线固定, 行主动脉逆行灌流, 流量为 7 ~ 8 mL/min。先用无钙台式液灌流 5 min, 接着用含酶钙台式液 (0.4 mg/mL 胶原酶 II (worthington) + 0.03 mg/mL 蛋白酶 X IV (sigma) + 0.9 mg/mL 牛血清白蛋白 (sigma) + CaCl₂ 0.05 mmol/L) 灌流 19 ~ 24 min, 最后用低钙台式液 (CaCl₂ 0.4 mmol/L) 灌流 5 min, 剪取心室组织在 KB 液中剪碎, 吹打, 用 100 目筛网过滤, 最后将细胞保存在 KB 液中, 4℃ 低温状态下, 细胞可存活 36h。整个过程灌流液维持温度在 (37 ± 1) °C, 灌流液中充纯氧气。

1.3 离子通道电流的记录 通过电极拉制仪 (PULL-100, 美国) 控制电极, 使玻璃电极充电极内液后阻抗达到 2 ~ 4 MΩ。吸取几滴细胞悬液加入细胞池中, 细胞贴壁后选择杆状、表面光滑、纹理清晰的心肌细胞, 利用三维操纵器移动电极贴近目标细胞, 并轻压在细胞表面, 稍加负压即可形成 1 GΩ 水平以上的高阻抗封接, 再用较大负压吸破细胞膜, 形成全细胞记录形式。实验过程由刺激采集软件 Pulse 控制, 经膜片钳放大器 (EPC10, 德国), 通过模数转换采集数据, 存放于计算机硬盘。

记录钠电流: 采用氯化胆碱替代细胞外大部分 Na⁺, 采用 Co²⁺ 抑制电压依赖性钙通道, Cs⁺ 替换 K⁺。给予细胞钳制在 -110 mV, 给予 -30 mV, 25 ms 的除极电压, 可以得到迅速活化, 迅速缓慢失活的内向电流, 这种电流能够被河豚毒素 (TTX) 0.001 mmol · L⁻¹ 阻断。细胞钳制在 -120 mV, 给予细胞一系列从 -90 mV ~ 40 mV, 以 10 mV 步增, 脉宽 25 ms 的测试电压, 可以记录到随不同刺激电压产生的电流轨迹, 测量各个电流轨迹的峰值电流制作给药前后电流电压曲线。记录瞬时外向钾通道电流: 采用氯化胆碱替代细胞外 Na⁺, 采用 Cd²⁺ 抑制电压依赖性钙通道。细胞钳制在 -70 mV, 给予细胞一系列从 -40 mV ~ 50 mV, 以 10 mV 步增, 脉宽 250 ms 的测试电压, 可以得到一组迅速活化, 迅速失活的外内向电流, 这种电流能够被 4-AP (0.5 mmol · L⁻¹) 阻断。记录内向整流钾通道电流: 将细胞钳制在 -40 mV, 给予细胞一系列从 -120 mV ~ 30 mV, 以 10 mV 步增, 脉宽 500 ms 的测试电压, 可以得到一组几乎不失活的稳态电流, 在超极化时

为很大的内向电流, 去极化时变为较小的外向电流, 这种电流可被 TEA 阻断。

1.4 统计学方法 所有数据用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用 excel 软件进行数据分析。

2 结果

2.1 人参皂苷 Re 对钠通道电流的影响 给予人参皂苷 Re (10, 100 μmol · L⁻¹) 后, 单去极化电压刺激后, 钠通道电流幅度呈现逐渐减小的趋势 (图 1A), 对通道电流幅度的抑制率分别为 (25.5 ± 5.7) % (n = 3); (46.2 ± 18) % (n = 4)。给予不同的刺激电压后, 各电流峰值呈减小趋势 (图 1B) 制作电流电压曲线后发现给药后电流电压曲线上移, 峰值电压无明显改变 (图 1C)。

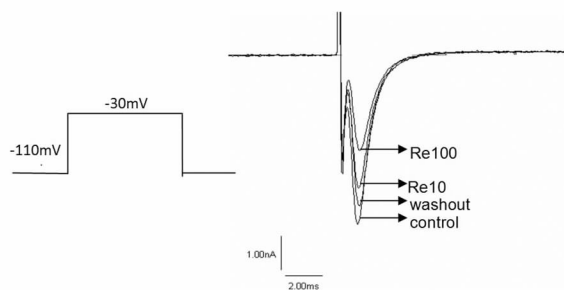


图 1 A

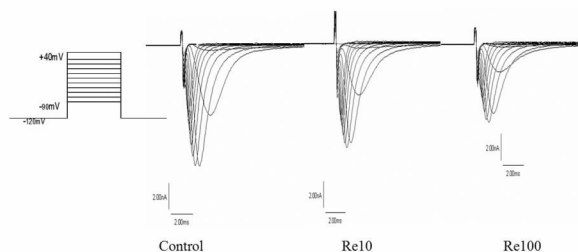


图 1 B

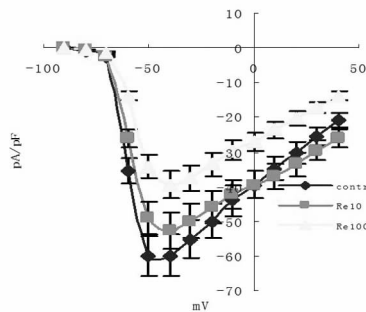


图 1 C

图 1 人参皂苷 Re 对钠电流的抑制作用: A. 人参皂苷 Re (10, 100 μmol · L⁻¹) 对电流峰值的作用, 洗脱后回复明显。

B. 人参皂苷 Re 对一组刺激电压诱导出的钠电流轨迹影响。

c. 取电流峰值制作电流电压曲线。

2.2 人参皂苷 Re 对瞬时外向钾通道电流 (I_{to}) 和内

向整流钾通道电流(I_{kl})的影响 在记录两种钾电流时我们发现在受到组合电压刺激后通道电流会出现随时间经过的自发衰减,对评价药物作用产生影响,因此在观察药物的作用时,采用双刺激电压。给予人参皂苷 Re($10, 100\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)对后 Ito 幅度略有抑制(图 2A),洗脱后电流恢复,其中 $100\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 人参皂苷对电流的抑制率为 $(13 \pm 9)\%$ ($n=3$)。给予人参皂苷 Re($10, 100\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)后 I_{kl} 幅度呈现逐渐减小的趋势,药物洗脱后电流完全恢复(图 2B)。经过统计($10, 100\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)人参皂苷 Re 对通道电流幅度的抑制率分别为 $(16.3 \pm 8.7)\%$ ($n=5$) 和 $(35.4 \pm 11.2)\%$ ($n=5$)。

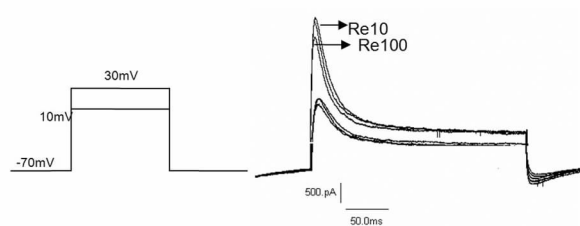


图 2A

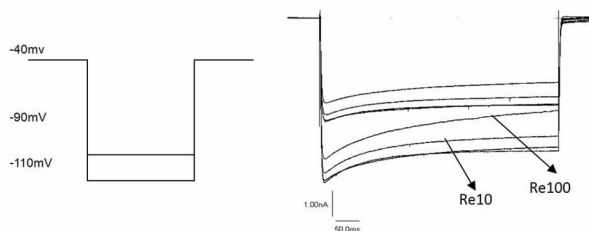


图 2B

图 2 人参皂苷 Re 对钾电流的抑制作用:A. 人参皂苷 Re($10, 100\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)对双刺激电压诱导出的 Ito 轨迹影响;

B. 人参皂苷 Re($10, 100\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)对双刺激电压诱导出的 I_{kl} 轨迹影响。

3 讨论

钠通道一般是 I 类抗心律失常药物的靶点。近些年心肌细胞的电生理研究表明:缺血后细胞内的无氧代谢导致细胞内 pH 值的降低及由此引发的细胞内 Na^+ 超载,过多的 Na^+ 进入导致 $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ 交换作用的反转,即细胞外的 Ca^{2+} 流入细胞内,排出细胞内过多的 Na^+ ,细胞内的游离 Ca^{2+} 增加,此时,由于缺氧使心肌细胞内质网、线粒体等细胞器摄取 Ca^{2+} 能力下降,从而导致了 Ca^{2+} 超载的发生。细胞内的 Ca^{2+} 超载会引起磷脂酶、蛋白水解酶等的激活,导致肌原纤维挛缩断裂,生物膜机械损伤,细胞骨架破坏,心肌细胞发生不可逆损伤^[5-6]。因此,通过抑制钠通道来抑制 Na^+ 超载,从而阻断 Ca^{2+} 超载的发生对心肌细胞的缺

氧保护作用具有重要意义。本实验发现,人参皂苷 Re 能够浓度依赖性的抑制心肌细胞钠电流,表明人参皂苷 Re 抗心律失常的作用,可能与此有关。

传统 III 类抗心律失常药通过阻滞心肌的钾通道发挥作用,心肌细胞膜上的钾通道亚型多,性质复杂。 I_{kl} 主要作用在于维持心肌细胞的静息膜电位,在膜超极化状态下,钾离子具有内流趋势,使膜恢复静息期电位;在去极化状态下,钾离子具有外流趋势,恢复膜原有的极化状态^[7]。人参皂苷 Re 抑制 I_{kl} 的内向成分,可能在静息期使膜电位向超极化方向变化,膜兴奋性降低,对于阈下刺激或“额外”刺激反应性降低,发挥其抗心律失常的作用。

心肌细胞的钠通道密度大且通道电动力过程相当快,所以由串联电阻的电压引起钳制水平的漂移和对膜电容充放电速度的影响对所测 I_{Na} 干扰非常严重,因此对串联电阻和膜电容补偿要求很高。为减少上述干扰,本实验在测定 I_{Na} 时,用氯化胆碱代替部分氯化钠,使细胞内外钠离子浓度差降至 30mmol/L ,并在室温下($20 \sim 22^\circ\text{C}$),而不采取通常的 37°C 进行实验,这样可明显减少 I_{Na} 幅度,保证了实验结果的准确性。

我们的研究首次发现人参皂苷 Re 能够抑制心肌细胞钠电流和内向整流的钾电流,这个结果表明人参皂苷 Re 不仅通过抑制 L-型钙电流和增强延迟整流钾电流,而且通过抑制钠电流和内向整流的钾电流发挥抗心律失常的作用。

参考文献

- [1] 赵立波,佟力,赵洪序,等. 人参皂甙对心肌缺血再灌注损伤的保护作用实验研究[J]. 中华胸心血管外科杂志,1994,10(4):353-354.
- [2] 陈英杰,王红燕,徐绥绪,等. 人参化学成分及其抗癌抗心律失常构效关系的研究[J]. 中国科学基金,1995,46:46.
- [3] Bai CX, Sunami A, Namiki T, et al. Electrophysiological effects of ginseng and ginsenoside Re in guinea pig ventricular myocytes[J]. Eur J Pharmacol, 2003, 476(1-2):35-44.
- [4] 孟红旭,王宝,刘建勋. 丹酚酸 B 和延胡索乙素对大鼠心室肌细胞 L-型钙通道的影响[J]. 中国中西医结合杂志,2011,31(11):1514-1517.
- [5] Laustein MP, Lederer W. Sodium/calcium exchange; its physiological implications [J]. Physiol Rev, 1999, 79(5):763-854.
- [6] Baetz D, Bernard M, Pinet C. Different pathways for sodium entry in cardiac cells during ischemia and early reperfusion [J]. Mol Cell Biochem, 2003, 242(1-2):115-120.
- [7] Miale J, Marban E, Nuss HB. Functional role of inward rectifier current in heart p robed by Kir22 overexpression and dominant negative suppression [J]. J Clin Invest, 2003, 111(10):1529-1536.

(2013-09-12 收稿)