

# 17-甲氧基-7-羟基-苯并咪喃查尔酮 对心肌细胞内游离钙浓度及 L-型钙电流的影响

李映新<sup>1</sup>, 黄媛恒<sup>2</sup>, 覃斐章<sup>1</sup>, 林兴<sup>3</sup>, 黄仁彬<sup>1\*</sup>

(1. 广西医科大学药学院, 南宁 530021; 2. 广西医科大学实验生理科学实验中心, 南宁 530021;  
3. 广西医科大学医学科学实验中心, 南宁 530021)

**[摘要]** 目的: 研究 17-甲氧基-7-羟基-苯并咪喃查尔酮(YLSC)对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的心肌细胞内钙超载的拮抗作用及对 L 型钙电流(ICa-L)的影响。方法: 采用 SD 大鼠乳鼠进行心肌细胞培养, 实验分为①正常对照组; ②H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组: 上机前加入终浓度为 0.3 mmol·L<sup>-1</sup> 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; ③预先给予低、中、高不同终浓度 YLSC 药物处理组: 分别给予 100, 200, 400 μmol·L<sup>-1</sup> YLSC 的无血清培养基, 孵育 24 h, 上机前加入终浓度为 0.3 mmol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 以 Fluo-3/AM 荧光指示剂负载, 应用激光共聚焦显微镜技术, 分别于加入 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 后 15 min 内检测细胞内 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 的变化; 分离昆明种小鼠单个心室肌细胞, 全细胞膜片钳技术记录 YLSC 对 ICa-L 的影响。结果: ①与正常对照组比较, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的模型组细胞内 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 增加 60.43% ± 7.75%, 而高、中、低 YLSC 预处理组 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 分别增加 38.39% ± 13.87%, 14.49% ± 2.94%, -28.1% ± 1.52%, 与模型组比较显著降低 (P < 0.01)。②YLSC 可使心室肌细胞 ICa-L 的电流-电压(I-V)关系曲线上移, 能改变 ICa-L 的激活和失活特征, 使 ICa-L 的激活曲线和稳态失活曲线左移。结论: YLSC 对心肌细胞钙离子通道有较好的阻断作用, 能显著减轻 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的心肌细胞内 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 超载。

**[关键词]** 17-甲氧基-7-羟基-苯并咪喃查尔酮; 激光扫描共聚焦; 细胞内钙浓度; 全细胞膜片钳; L 型钙电流

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)15-0213-05

**[doi]** 10.11653/syfy2013150213

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130527.1139.004.html>

**[网络出版时间]** 2013-05-27 11:39

**[收稿日期]** 20120220(007)

**[基金项目]** 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科攻 0630002-2A); 广西中医药科技专项课题(GZKZ10-122); 2011 年广西研究生创新计划项目(2011105981002D26)

**[第一作者]** 李映新, 博士生, 讲师, 从事心血管药理学研究, E-mail: marchimoro@yeah.net

**[通讯作者]** \* 黄仁彬, 博士, 教授, 博士生导师, 从事心血管药理学研究, E-mail: huangrenbin518@163.com

- [2] 张金茹. 小柴胡汤治疗抑郁症 40 例[J]. 北京中医, 2003, 22(5):38.
- [3] 高建伟, 倪亚平. 小柴胡汤是治疗抑郁症的良方[J]. 实用中医内科杂志, 2008, 22(4):74.
- [4] 原红霞, 韦采柳, 程遥. 小柴胡汤抗抑郁作用的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(15):181.
- [5] 苏光悦, 王芳, 张菁菁, 等. 小柴胡抗抑郁作用[C]. 济南: 中国药理学第十一次全国学术会议专刊, 2011.
- [6] 陆蕊杭, 王丽娜, 王丽岩, 等. 抑郁平胶囊对小鼠抗抑郁作用研究及有效部位筛选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(14):174.
- [7] 栗俞程, 沈继朵, 刘亚敏, 等. 黄芩主要黄酮成分的抗抑郁活性筛选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 18(11):157.
- [8] 于春泉, 王怡, 高杉, 等. 交泰丸不同配比抗抑郁作用的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(6):225.
- [9] 周中流, 刘永辉. 香附提取物的抗抑郁活性及其作用机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(7):191.
- [10] 王玉露, 贾钊, 林于雄. 解郁散抗抑郁作用的有效部位筛选[J]. 福建中医药大学学报, 2010, 20(5):47.
- [11] 刘明, 闫娟娟, 周小江, 等. 开心散对慢性应激抑郁模型大鼠学习记忆的影响[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(16):2439.
- [12] 蔡莉, 李荣, 吴清清, 等. 橙皮苷对慢性应激抑郁模型大鼠行为学及 HPA 轴的影响[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(2):229.

[责任编辑 聂淑琴]

# Effects of 17-methoxyl-7-hydroxy-benzfuranchalcon on Intracellular Calcium Overload in Cultured Cardiac Myocytes of Neonatal Rats Injured by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and L-type Calcium Current in Isolated Ventricular Myocytes of Mice

LI Ying-xin<sup>1</sup>, HUANG Yuan-heng<sup>2</sup>, QIN Fei-zhang<sup>1</sup>, LIN Xing<sup>3</sup>, HUANG Ren-bin<sup>1\*</sup>

(1. Department of Pharmacology of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China;

2. Department of Physiology of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China;

3. Medical Scientific Research Center of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

**[ Abstract ] Objective:** To investigate the effects of 17-methoxyl-7-hydroxy-benzfuranchalcon (YLSC) on intracellular calcium overload in cultured cardiac myocytes of neonatal rats injured by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and L-type calcium current (ICa-L) in isolated ventricular myocytes. **Method:** The cells of primary cultured cardiac myocytes of neonatal rats were divided into groups: ① control group; ② model group: administrated with 0.3 mmol · L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; ③ YLSC treated groups: incubation respectively with 100, 200, 400 μmol · L<sup>-1</sup> YLSC for 24 h, and add 0.3 mmol · L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Laser confocal microscopy was used with Fluo-3/Am as indicator to detect changes of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> immediately and 15 minutes after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intervention. Single ventricular cell was obtained enzymatically by Langendorff perfusion apparatus. The wholecell patch clamp was used to record the ICa-L. **Result:** ① The average fluorescence intensity values of the model group treated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> higher significantly than control group and the fluorescence enhancement ratio was 60.43% ± 7.75%. The YLSC could decline the intensity values in a dose-dependent manner, the fluorescence enhancement ratios of low, middle and high doses respectively were 38.39% ± 13.87%, 14.49% ± 2.94%, -28.1% ± 1.52%, and all of them were much lower compared with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group (P < 0.01). ② YLSC can up-shifted the current-voltage (I-V) curves and markedly shifted the steady state activation and inactivation curve of ICa-L to the left. **Conclusion:** YLSC inhibited the L-type calcium channel, it can significantly reduce the myocardial intracellular Ca<sup>2+</sup> overload induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**[ Key words ]** 17-methoxyl-7-hydroxy-benzfuranchalcon; confocal microscopy; intracellular calcium; whole cell patch clamp; ICa-L

玉郎伞 (YLS) 为蝶形花科植物疏叶崖豆 *Millettia pulchra* Kurz var. *Laxior* (Dunn) Z. Wei 的干燥块根<sup>[1]</sup>, 是广西壮族的特色药材, 习用于治疗原发性高血压、跌打损伤、老年痴呆及产后体虚等, 其主要活性成分为多糖和黄酮, 在对其黄酮成分进行活性筛选中首次分离得到一个单体化合物, 命名为 17-甲氧基-7-羟基-苯并呋喃查尔酮 (17-methoxyl-7-hydroxy-benzfuranchalcon, YLSC)。简洁及覃斐章等研究工作证实<sup>[2-6]</sup>, YLSC 具有较强的抗氧化、耐缺氧、抗凝血能力, 能够减少心肌缺血再灌注 (MIRI) 大鼠模型的心肌梗死面积及肌酸激酶 (CK)、乳酸脱氢酶 (LDH)、天冬氨酸转氨酶 (AST) 的漏出, 作用机制与抗氧化应激损伤有关。氧化应激损伤能引起膜通道蛋白的变构和钙内流的增加, 造成心肌细胞内钙超载, 导致心肌细胞不可逆性损伤。本研究旨在观察 YLSC 对细胞内游离钙的作用

及对心肌细胞膜 L 型钙电流 (ICa-L) 的影响, 探讨其对钙超载的作用及机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 1~3 d SD 乳鼠; SPF 级昆明种小鼠, 雌雄不限, 体重 (18 ± 2) g, 动物使用许可证 SYKG (桂) 2003-0005, 均由广西医科大学动物中心提供。

**1.2 药品和试剂** YLSC 由本课题组提取<sup>[7-8]</sup>: 将 YLS 总黄酮提取物经乙酸乙酯萃取后, 进行硅胶柱层析, 用石油醚-乙酸乙酯反复梯度洗脱得到, 高效液相显示其纯度为 98%, 在 DMSO 中配成 0.1 mol · L<sup>-1</sup> 母液, 每次实验时, 母液溶于培养液或细胞外液中配成实验所需终浓度进行给药, DMSO 终浓度低于 1% (v/v)。DMEM-F12 培养基 (Gibico), 胎牛血清 (Hyclone), Fluo-3/AM (Sigma), PluronicF-127 (Sigma), 0.25% 胰蛋白酶 (索莱宝), 5-溴脱氧尿嘧啶核苷 (Brdu, Sigma), II 型胶原酶 (Sigma), BSA

(Gibico), EGTA (Sigma),  $\text{Na}_2\text{ATP}$  (Sigma), HEPES (Amresco), *N*-乙酰-*D*-葡萄糖胺 (NMG, FLUK),  $\text{H}_2\text{O}_2$  (AR级, 天津市科密欧化学有限公司, 批号110627), 其余试剂为国产分析纯。

**1.3 溶液** 无钙台式液 ( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ):  $\text{NaCl}$  136,  $\text{KCl}$  5.4,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  1.0,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , HEPES 10, Glucose 10, 用  $\text{NaOH}$  调 pH 7.4。消化液为含 II 型胶原酶 5 mg, BSA 10 mg 的 30 mL 无钙台式液。KB 液 ( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ):  $\text{KOH}$  70,  $\text{KCl}$  40,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  20,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  3.0, HEPES 10, Taurine 20, EGTA 0.5, *L*-glutamic acid 50, Glucose 10, 用  $\text{KOH}$  调 pH 7.4。记录钙电流的电极外液 ( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ): NMG 140, 4-AP 2,  $\text{CsCl}$  5,  $\text{CaCl}_2$  2,  $\text{MgCl}_2$  0.5, HEPES 10, Glucose 10, 用  $\text{HCl}$  调 pH 7.35; 记录钙电流的电极内液 ( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ):  $\text{CsCl}$  125, TEA-Cl 20, EGTA 10,  $\text{Na}_2\text{ATP}$  4, HEPES 10, 用  $\text{CsOH}$  调 pH 7.2。

**1.4 仪器** Langerdorff 灌流装置(自制), DDB-320 智能型蠕动泵(上海之信仪器有限公司), ZC-10 智能型超级恒温水浴槽(上海奥尔科特生物科技有限公司), EPC10 放大器(HEKA Germany), Olympus IX51 倒置相差显微镜(Japan), P-97 电极拉制仪(Sutter instrument company), MP-285 微操纵器(Sutter instrument company), 玻璃电极(武汉微探科学仪器有限公司), 激光扫描共聚焦系统(Olympus, Japan)。

## 2 方法

**2.1 心肌细胞的培养方法** 参照文献[9-10]改进。无菌条件下取出乳鼠心尖部组织, 在 HEPES 液中剪碎, 以 0.1% 的胰酶 37 °C 消化 6~7 次。用含 10% FBS 的 DMED 终止消化, 200 目筛过滤, 4 °C 800  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  5 min 离心, 取下层沉淀细胞。细胞重悬于含 10% 的 DMEM 培养液中 37 °C 培养 1 h (5%  $\text{CO}_2$ -95%  $\text{O}_2$ ), 以差速贴壁培养法纯化细胞。弃去贴壁的成纤维细胞, 悬浮的细胞调整密度为  $2 \times 10^6/\text{L}$ , 培养液中加入终浓度为  $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Brdu (5-bromodeoxyuridine) 继续培养 3~4 d, 待细胞融合成片, 90% 以上细胞有节律同步搏动时用于实验。

**2.2  $\text{H}_2\text{O}_2$  损伤模型的建立<sup>[11-12]</sup> 及药物干预** 取搏动良好的细胞, 随机分成 5 组, 每组设 3 个平行样本, 药物处理组分别给予含终浓度为 100, 200, 400  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  YLSC 的无血清培养基, 对照组和模型组加入无血清培养基并于培养箱孵育 24 h。Fluo-3/AM 荧光指示剂负载之后除对照组外, 其余各组在上机测定时加入终浓度为  $0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

的  $\text{H}_2\text{O}_2$ 。

**2.3 心肌细胞游离钙浓度的测定** 按试剂盒说明, 细胞给药 24 h 后弃去培养液, 用 PBS 液洗 3 次, 加入终浓度为  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 Fluo-3/AM 和 0.1% PluronicF-127 的 PBS 负载液, 37 °C 避光温育 45 min。用 PBS 漂洗 2~3 次后加入无血清低糖 DMEM 于 37 °C 培养箱孵育 15 min 后上机测定。用装有显微镜的共聚焦激光扫描系统以激发波长 488 nm, 发射波长 526 nm, 每隔 15 s 扫描 1 次, 选定细胞记录并采集图像, 每个实验组 3 个视野动态检测 15 min。以平均荧光强度变化反映细胞内游离钙浓度的相对水平。

$[\text{Ca}^{2+}]_i$  荧光强度增加率 = (各峰值的荧光强度 - 对照组  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  荧光基强度) / 对照组  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  荧光基强度  $\times 100\%$

**2.4 小鼠心室肌细胞分离** 参考文献方法<sup>[13-14]</sup> 改进。行小鼠颈部脱臼, 快速开胸剪取心脏放于含肝素的氧饱和和无钙台式液中修剪, 行主动脉插管并挂于 Langendorff 灌流装置上灌流, 流速为  $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 灌流过程保持 37 °C 恒温, 灌流液持续通氧。先用无钙台式液灌至流出液澄清, 再用酶消化液循环灌流消化约 20~25 min, 用眼科剪剪取心室部分于 KB 液中剪碎并吹打, 取上清液过 200 目的钢筛网, 过筛后得到心肌细胞悬液, 余下组织继续加入 KB 液, 37 °C 水浴 5 min 后吹打, 收集上清液, 将所得上清液合并, -4 °C 冰箱保存备用, 放置 1 h 后可用于进行膜片钳实验。

**2.5 ICa-L 的记录** 取几滴细胞悬液滴入 35 mm 培养皿中, 待贴壁后, 用记录钙电流的细胞外液小心灌流冲洗, 流速  $1.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。电极由 Sutter P-97 拉制仪 3 步拉制而成, 充灌电极内液后电极电阻为 2~5 M $\Omega$ , 用 EPC10 放大器采用全细胞模式记录 ICa-L; 通过微操纵器将电极轻压细胞表面, 至测试脉冲波形下降约 1/3 时给予负压吸引直至形成 G $\Omega$  以上高阻封接, 待稳定后继续给予负压破膜, 补偿后记录电流。整个记录过程在 Pulse 软件控制下进行, Pulsefit 进行数据的转换输出, 作图分析采用 Sigmaplot 软件。

**2.6 统计学处理** 采用 SPSS 13.0 软件进行统计, 所有数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用 *t* 检验,  $P < 0.05$  为有统计学意义。

## 3 结果

**3.1  $\text{H}_2\text{O}_2$  可造成心肌细胞内钙超载** 给细胞以终浓度  $0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理, 立刻动态监测 15

min, 加入即刻荧光强度开始升高, 15 min 内  $[Ca^{2+}]_i$  为  $2\ 446.10 \pm 118.16$ , 正常对照组的  $[Ca^{2+}]_i$  为  $1\ 524.65 \pm 204.95$ , 说明  $H_2O_2$  处理后的峰荧光强度显著升高 ( $P < 0.01$ ), 表明给予终浓度  $0.3\ mmol \cdot L^{-1}$   $H_2O_2$  可造成心肌细胞内钙超载 (表 1)。

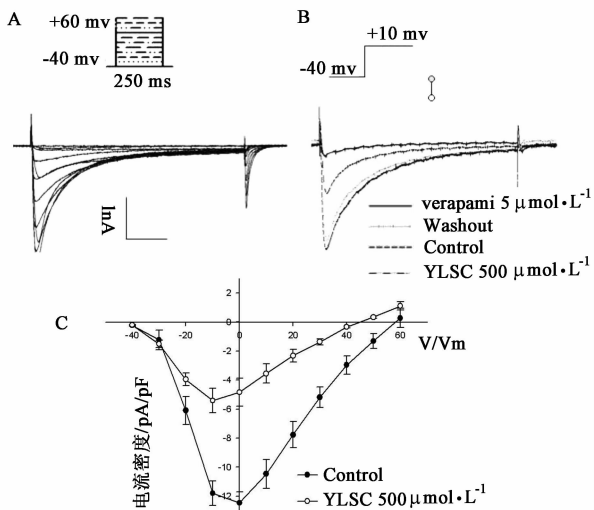
**3.2 YLSC 可抑制  $H_2O_2$  诱导的  $[Ca^{2+}]_i$  升高** 预先给予高、中、低剂量的 YLSC 处理细胞 24 h 后再加入  $H_2O_2$ , 细胞内  $[Ca^{2+}]_i$  与模型组比较均显著降低, 呈剂量依赖性, 其差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。见表 1。

表 1 各组细胞内钙荧光强度的比较 ( $\bar{x} \pm s, n=9$ )

组别	剂量 $/\mu mol \cdot L^{-1}$	$[Ca^{2+}]_i$ 荧光强度	$[Ca^{2+}]_i$ 荧光强度 变化率/%
对照	-	$1\ 524.65 \pm 204.95$	-
模型	-	$2\ 446.10 \pm 118.16$	$60.43 \pm 7.75$
YLSC	100	$2\ 109.93 \pm 211.49$	$38.39 \pm 13.87^{2)}$
	200	$1\ 745.53 \pm 44.77$	$14.49 \pm 2.94^{2)}$
	400	$1\ 003.75 \pm 295.64$	$-28.1 \pm 1.52^{2)}$

注: 与模型组比较 <sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。

**3.3 YLSC 对 ICa-L 的 I-V 曲线的影响** 采用保持电位  $-40\ mV$ , 指令电压  $-40 \sim +60\ mV$ , 时程为  $250\ ms$ , 阶跃  $10\ mV$  的刺激程序引出一内向电流, 该电流能被  $5\ \mu mol \cdot L^{-1}$  的维拉帕米阻断, 证实为 L 型钙电流。等电流稳定后, 给予  $500\ \mu mol \cdot L^{-1}$  YLSC, 发现 YLSC 能阻断 ICa-L, 使 I-V 曲线上移。冲洗后, 电流大部分能恢复 (图 1)。



A. L 型钙电流; B. 维拉帕米的阻断作用及 YLSC 的阻断及洗脱; C. I-V 关系曲线

图 1 YLSC 对小鼠心室肌细胞 L 型钙通道电流的阻断作用

**3.4 YLSC 对 ICa-L 的稳态激活曲线的影响** 稳态激活曲线由 I-V 曲线的的数据计算转换成膜电导获得。用 Boltzmann 方程对激活曲线进行拟合:  $G/G_{max} = 1 / \{1 + \exp[-(V - V_{1/2})/k]\}$ , G 为在各个电压 V 下的膜电导,  $G_{max}$  为最大膜电导,  $V_{1/2}$  为半数激活电压, k 为斜率因子。结果发现  $500\ \mu mol \cdot L^{-1}$  YLSC 加药前后  $V_{1/2}$  分别为  $(-18.23 \pm 0.53)\ mV$  和  $(-24.31 \pm 0.57)\ mV$ , 有显著差别 ( $n = 5, P < 0.05$ ), 半数激活电压往负值方向移动, k 分别为  $4.78 \pm 0.45, 5.36 \pm 0.46$ 。

**3.5 YLSC 对 ICa-L 的稳态失活曲线的影响** 稳态失活曲线由双脉冲刺激参数获得: 保持电位  $-40\ mV$ , 施与时程为  $1\ 000\ ms$ , 阶跃为  $10\ mV$ , 从  $-60\ mV \sim +30\ mV$  的条件脉冲, 然后紧跟一去极化至  $0\ mV$ , 持续时间  $300\ ms$  的测试脉冲。用 Boltzmann 方程对激活曲线进行拟合:  $I/I_{max} = 1 / \{1 + \exp[(V - V_{1/2})/k]\}$ , I 为测试脉冲引出峰电流值,  $V_{1/2}$  为半数失活电压, k 为斜率因子。结果发现  $500\ \mu mol \cdot L^{-1}$  YLSC 加药前后  $V_{1/2}$  分别为  $(-25.05 \pm 1.53)\ mV$  和  $(-38.16 \pm 5.60)\ mV$ , 有显著差别 ( $n = 5, P < 0.05$ ), 半数失活电压往负值方向移动, k 分别为  $-7.40 \pm 1.58, -5.97 \pm 4.45$ 。

#### 4 讨论

现在认为, 心肌缺血再灌注损伤 (MIRI) 的始动环节是能量代谢障碍, 而直接损伤原因则是自由基, 氧化性应激使胞内 GsH/GSsH 比值下降, 引起膜通道蛋白变构, 使钙离子内流增加, 其结果导致细胞内钙超载<sup>[15]</sup>。过氧化氢是一种活性氧, 能在  $Fe^{2+}$  或  $Cu^{2+}$  的作用下生成氧自由基或者通过自身的均裂产生氧自由基, 这是  $H_2O_2$  造成细胞氧化应激并引起细胞内钙超载的主要机制, 可以利用外源性过氧化氢直接处理原代培养的心肌细胞建立心肌细胞氧化损伤模型, 以模拟 MIRI 损伤及一些与氧自由基密切相关的心血管疾病的病理模型<sup>[11]</sup>。本实验通过乳鼠心肌细胞原代培养, 建立  $H_2O_2$  引起的钙超载病理模型, 运用先进的激光扫描共聚焦显微镜 (CLSM) 技术观察细胞内  $[Ca^{2+}]_i$ 。实验结果显示,  $H_2O_2$  作用于心肌细胞后  $[Ca^{2+}]_i$  显著高于正常对照组, 说明用  $H_2O_2$  建立的过氧化损伤的钙超载病理模型是成功的。同时还发现, 用 YLSC 预处理后能够有效降低  $H_2O_2$  诱导的心肌细胞内  $[Ca^{2+}]_i$  升高, 呈一定剂量依赖性, 表明 YLSC 有减轻氧化损伤引起的钙超载的作用。前期研究<sup>[2-4]</sup>已经证实的 YLSC 具有抗氧化应激损伤作用, 抗氧化应激损伤

是减少心肌细胞内钙超载的有效途径之一,这一结果与前期研究结果是一致的。

L型钙通道是细胞兴奋过程中钙离子内流的主要途径,被认为在MIRI早期细胞内钙超载的形成中起作用,是治疗MIRI药物的作用靶点<sup>[16]</sup>,许多药物如人参、三七、丹参、银杏叶等都被证明具有ICa-L阻断作用<sup>[17-18]</sup>。张绪东对玉郎伞总黄酮提取物研究中发现<sup>[19]</sup>,玉郎伞总黄酮提取物对大鼠心脏有负性频率和负性肌力作用,提示玉郎伞总黄酮提取物中可能含有阻滞钙通道的成分。YLSC是玉郎伞总黄酮提取物主要有效成分,为了研究L型钙通道在YLSC对 $[Ca^{2+}]_i$ 的调节中所起的作用,本实验运用全细胞膜片钳技术观察其对小鼠心室肌细胞膜的ICa-L的影响,发现YLSC能明显减少ICa-L的幅值,使I-V曲线上移,改变通道的激活和失活动力学,这表明L型钙通道参与YLSC对 $[Ca^{2+}]_i$ 的调节。

实验证明,YLSC通过抗氧化应激损伤及抑制电压门控性钙通道的外钙内流,减少心肌细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ ,但对于内质网及线粒体内钙的释放是否有影响还有待于进一步深入研究。

#### [参考文献]

- [1] 广西壮族自治区卫生厅. 广西中药材标准[S]. 南宁: 广西科学技术出版社, 1992: 35.
- [2] 简洁, 刘曦, 黄仁彬, 等. 玉郎伞两种黄酮单体对心肌细胞缺氧/复氧损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2009, 25(7): 942.
- [3] 简洁, 李勇文, 蒋伟哲, 等. 玉郎伞黄酮单体对自由基清除作用的实验研究[J]. 中国老年学杂志, 2009, 18(29): 2353.
- [4] Jian Jie, Qing Feizhang, Zhang Shijun, et al. The effect of 17-methoxyl-7-hydroxy-benzene-furanalcone isolated from *Millettia pulchra* on myocardial ischemia *in vitro* and *in vivo*[J]. *Planta Medica*, 2012, 78(12): 1324.
- [5] 覃斐章, 简洁, 焦杨, 等. 17-甲氧基-7-羟基-苯并呋喃查尔酮对垂体后叶素致心肌缺血大鼠的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(1): 123.
- [6] 覃斐章, 简洁, 焦杨, 等. 17-甲氧基-7-羟基-苯并呋喃

查尔酮通过内质网应激途径减轻大鼠缺血再灌注损伤[J]. 中国生化药物杂志, 2012, 33(1): 12.

- [7] 简洁, 黄建春, 黄仁彬, 等. 制备液相色谱分离制备玉郎伞查尔酮类化合物[J]. 中草药, 2011, 42(7): 1313.
- [8] 简洁, 黄仁彬. 17-甲氧基-7-羟基-苯并呋喃查尔酮的分离及晶体结构[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(15): 8920.
- [9] 杨萍, 贾钰华. 丹参酮II<sub>A</sub>抗心肌细胞氧化应激作用及抗增殖蛋白功能研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(6): 145.
- [10] 贺海波, 徐媛青, 魏娜. 竹节参总皂苷对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>致乳鼠心肌细胞氧化应激损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(17): 187.
- [11] 马丽娟, 张雨薇, 张文杰. 大豆异黄酮对过氧化氢诱导大鼠心肌细胞内钙超载的影响[J]. 中国老年学杂志, 2010, 16(30): 2313.
- [12] 程何祥, 贾国良, 张荣庆. 过氧化氢对乳鼠心肌细胞内游离钙浓度的影响及牛磺酸的拮抗作用[J]. 中国病理生理杂志, 2004, 20(3): 395.
- [13] 常翠仙, 谷世奎, 周欣, 等. 昆明小鼠心室肌细胞分离及钙电流观察[J]. 天津医科大学学报, 2011, 17(1): 117.
- [14] 方舟, 卢人义, 李泱. 小鼠心室肌细胞分离方法的改良及钾电流的记录[J]. 中国心脏起搏与心电生理杂志, 2011, 26(6): 532.
- [15] Das D K, Neogi A. Effects of super oxide anions on the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP system in rat lung[J]. *Clin Physiol Biochem*, 1984, 2(1): 32.
- [16] Hassan Talukder M A, Zweier J L, Periasamy M. Targeting calcium transport in ischaemic heart disease[J]. *Car Res*, 2009, 84(3): 345.
- [17] 王宝, 刘建勋. 中药对心肌细胞钙离子通道作用的研究与展望[J]. 中国中医药信息杂志, 2009, 16(5): 104.
- [18] 徐志鑫. 中药对心肌细胞钙通道作用研究现状[J]. 中国心血管杂志, 2003, 8(6): 452.
- [19] 张绪东. 玉郎伞黄酮对心肌缺血再灌注损伤的保护作用及机制研究[D]. 中国博士论文全文数据库, 2006.

[责任编辑 聂淑琴]