

滇黄芩总黄酮对豚鼠心肌细胞 电压依赖性钠通道电流的影响

何晓山^{1*}, 彭林², 林青¹, 代蓉¹, 包照日格图¹, 周宁娜¹

(1. 云南中医学院, 昆明 650500; 2. 解放军 77226 部队卫生队, 昆明 650200)

[摘要] **目的:** 研究滇黄芩总黄酮(totla flavonoid)对豚鼠心肌组织电压门控性钠通道的影响。**方法:** 成年豚鼠, 肝素抗凝后, 腹腔麻醉, 断头处死, 迅速取其心脏, 进行 Langendorff 灌流, 先用无钙台式液灌流 10 min, 再以 I 型胶原酶溶液灌流心脏, 待心脏基本变软后剪取心室部分, 制备单个心室肌细胞。分离出的豚鼠心肌单细胞, 用全细胞电压钳技术记录电压依赖性钠电流进行研究。**结果:** 滇黄芩总黄酮能可逆性抑制钠电流, 其半数抑制浓度(IC₅₀)为 106 mg·L⁻¹ (95% 的可信限是 92 ~ 112 mg·L⁻¹)。滇黄芩总黄酮并不影响钠通道激活开放的刺激电位阈值、最大激活电位值和反转电位值, 但能使可激活开放的钠通道明显减少, 钠离子电流明显衰减, 可引出的钠电流在 -40 mV 处较正常组减少 45.6%。细胞外给予滇黄芩总黄酮不影响钠通道激活曲线: 对照组与 106 mg·L⁻¹ 的滇黄芩总黄酮组的半激活电压(V_{1/2})分别为(-50.4 ± 1.7) mV 和(-50.1 ± 3.1) mV (n = 6 差异无统计学意义)。细胞外给予滇黄芩总黄酮可影响钠通道失活曲线, 106 mg·L⁻¹ 的滇黄芩总黄酮对电压依赖性稳态失活钠电流会引起一个大约 12 mV 的负向漂移, 延缓失活钠通道的恢复: 对照组与 106 mg·L⁻¹ 的滇黄芩总黄酮组的 V_{1/2} 分别为(-69.4 ± 1.6) mV 和(-79.3 ± 3.2) mV (n = 7, P < 0.05), 两者间的差异有显著性意义, 斜率分别为(-8.2 ± 0.9) mV 和(7.1 ± 0.7) mV。细胞外给予滇黄芩总黄酮也可影响失活钠通道的恢复, 使钠通道的复活时间常数显著延长: 对照组和 106 mg·L⁻¹ 的滇黄芩总黄酮组的时间常数分别为(15.6 ± 6.3), (29.8 ± 14.8) ms (n = 6, P < 0.05), 差异有显著性意义。**结论:** 滇黄芩总黄酮可阻滞豚鼠心肌细胞钠通道, 是稳定的豚鼠心肌组织钠通道阻断剂。

[关键词] 心律失常; 钠通道; 滇黄芩总黄酮; 心肌; 膜片钳技术

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)06-0192-04

Effects of Total Flavonoid from *Scutellaria amoena* on Voltage-dependent Na⁺ Current in Guinea-pig Ventricular Myocytes

HE Xiao-shan^{1*}, PENG Lin², LIN Qing¹, DAI Rong¹, BAO Zhao-riget¹, ZHOU Ning-na¹

(1. Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China;

2. 77226 Armed Forces Sanitary Corps, Kunming 650200, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of total flavonoid from *Scutellaria amoena* on voltage-gated Na⁺ channels in cardiac tissues. **Method:** Adult guinea-pigs were heparinized and then sacrificed by decapitation after being anesthetized. The heart was removed immediately, and the aorta of the isolated heart was connected to a Langendorff apparatus and perfused with Ca²⁺-free Tyrode's solution for 10 min, and then with the same solution containing collagenase I. After dissociation and collection, cells were mechanically dispersed and single ventricular myocytes were enzymatically dissociated from adult guinea-pig heart. Voltage-dependent Na⁺ current was recorded using whole cell voltage-clamp technique. **Result:** Total flavonoid reversibly inhibited Na⁺ current with an IC₅₀ value of 106 mg·L⁻¹ (95% confidence range: 92-112 mg·L⁻¹). The inhibitory effects of total flavonoid on Na⁺ current exhibited use-dependence. Total flavonoid at 106 mg·L⁻¹ caused a negative shift (about 12 mV) in the voltage-dependence of steady-state inactivation of Na⁺ current, and retarded its recovery from

[收稿日期] 20120914(012)

[基金项目] 云南省教育厅自然科学研究重点项目(06Z333C)

[通讯作者] * 何晓山, 硕士, 副教授, 从事中药药理学研究, Tel: 0871-5918142, E-mail: kmhexsh@126.com

inactivation, but did not affect its activation curve. **Conclusion:** In addition to blocking other voltage-gated ion channels, total flavonoid can block Na^+ channels in guinea-pig ventricular myocytes. Total flavonoid acts as inactivation stabilizer of Na^+ channels in cardiac tissues.

[**Key words**] arrhythmia; sodium channels; total flavonoid from *Scutellaria amoena*; myocardium; patch-clamp techniques

滇黄芩 (*Scutellaria amoena* C. H. Wright) 为云南道地中药材,在西南地区也作“黄芩”入药,本实验中的总黄酮是我们从滇黄芩中提取和分离制备的黄酮类有效部位,具有多种药理活性。整体试验表明,滇黄芩总黄酮 (total flavonoid from *Scutellaria amoena*) 具有较强的抗实验性心律失常的作用^[1-2],且具有毒性低,副作用少,安全度高,尚可明显降血脂和抗凝等特点,因此用于治疗老年性心律失常有多方面的优点。滇黄芩总黄酮的抗心律失常机制,尤其是离子通道机制尚不明确,我们当前的研究主要通过测定滇黄芩总黄酮对钠电流、瞬时外向钾电流和 L 型钙电流的影响来说明其可能的抗心律失常作用机制。以酶解法分离出豚鼠心肌细胞后,用全细胞电压钳技术记录电流,我们最近的研究首先测定了滇黄芩总黄酮对豚鼠心肌细胞电压依赖性钠电流的影响,然后进一步深入研究了其阻滞心肌钠通道的作用机制。

1 材料

1.1 药物 滇黄芩总黄酮由课题级自行制备,提取得率为 0.96%,总黄酮含量 56.7%,每 1 g 总黄酮提取物相当于滇黄芩原药材 104.167 g,临时以蒸馏水配成所需各质量浓度。

1.2 动物 雄性和雌性豚鼠,体重 (260 ~ 340) g,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供,动物合格证号为 SCXK(鄂)2004-0007。

1.3 试剂 胶原酶 I (collagenase I,批号 232-582-8)、N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸 (HEPES,批号 111116)、CsCl (氯化铯)、谷氨酸、河豚毒素 (TTX)、腺苷三磷酸镁 (Mg^{2+} ATP,批号 550427)、乙二醇二乙醚二胺四乙酸 (EGTA,批号 101022) 为 Sigma 公司产品。其余为国产分析纯试剂。

1.4 仪器 膜片钳放大器 (EPC-10 系列以及软件包,德国 HEKA 公司),倒置显微镜 (日本 Olympus 公司),液压微电极推进器及微电极拉制仪 (日本 NARISH ICE 公司)。

2 方法

2.1 心室肌细胞的制备 按法尔默等记述的方法^[3-4],以酶解法制备成年豚鼠心室肌细胞。豚鼠

心脏固定到 Langendorff 装置上,从主动脉以无 Ca^{2+} 台氏液逆行灌流 10 min,然后再用含 0.02% 胶原酶 I 和 1% 小牛血清白蛋白的无 Ca^{2+} 台氏液灌流 2 ~ 4 min [所用溶液含溶质 ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) NaCl 135, KCl 5.4, MgCl_2 1, NaH_2PO_4 0.33, HEPES 5, 葡萄糖 5, 用 NaOH 调 pH 7.4, 冲入 100% O_2 , 饱和, 温度保持为 37 °C]。冲去酶液后,心室肌轻轻剪碎,放入 KB (Kraft-Bruhe) 液中孵育 10 min [KB 液含溶质为 ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) L-谷氨酸 50, KOH 80, KCl 40, MgSO_4 3, KH_2PO_4 25, HEPES 10, EGTA 1, 葡萄糖 10, 用 KOH 溶液调 pH 7.4]。分离得到的细胞用 200 μm 的尼龙过滤网过滤后保存在 21 ~ 23 °C 的 KB 液中。只有棒状、横纹清晰的细胞可用于实验。

2.2 全细胞电压钳记录 参照文献方法^[5-7],把少量心室肌细胞放入固定在显微镜载物台上的 3 mL 的浴槽中,并且用外液行表面灌流。灌流液含 ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$): 氯化胆碱 100, NaCl 40, KCl 5.4, MgCl_2 1, CaCl_2 1, CdCl_2 0.1, NaH_2PO_4 0.33, HEPES 10, 葡萄糖 10, 用 NaOH 溶液调 pH 7.4, 使用 EPC-10 放大器在 20 ~ 23 °C 进行单心肌全细胞记录,电压指令由 pulse 软件包经生成。膜片用电极 (尖端电阻 1 ~ 3 M Ω) 用 PC-10 微电极拉制仪制备,内灌入电极液,含 ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$): CsCl 120, MgCl_2 5, EGTA 11, HEPES 10, Na_2ATP 5, 用 CsOH 溶液调 pH 7.3。所用细胞外液和电极液可使跨膜 Na^+ 浓度减少到 4:1,能够大大改善钠通道激活期间的电压钳制。形成吉欧姆封接 (封接电阻 > 1 G Ω) 后,轻轻抽吸细胞膜获得全细胞电压钳模式。按常规优化电容补偿,串联电阻补偿 40% ~ 80%。线性漏接联机扣减。信号经 5 kHz 过滤,存储于联想电脑中。细胞平均电容为 (86.0 ± 4.4) pF ($n = 21, 12$ animals)。

滇黄芩总黄酮溶解外液中进行细胞外给药,当膜片吸破后,可转入到记录细胞中。

2.3 数据分析与统计 IC_{50} 浓度-效应曲线由计算机软件求出。激活和失活曲线用 Boltzmann 方程: $Y = 1 / \{1 + \exp[(V_c - V_{1/2})/k]\}$ 进行曲线拟合确定,式中 V_c 为膜电位; $V_{1/2}$ 为半激活电压或半失活电压; k 为斜率因子。钠通道复活时程由指数方程:

$Y = A \cdot \exp(-t/\tau)$, 确定, 式中 A 为强度; t 为时间常数。数据以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示, 以配对和不配对双尾 t 检验统计分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

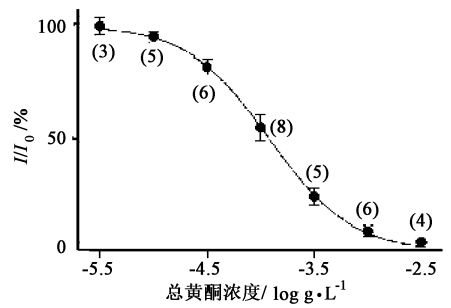
3.1 滇黄芩总黄酮细胞外给药对心室肌细胞 Na^+ 电流抑制作用 电压依从性 Ca^{2+} 电流通过往细胞外液中加 Cd^{2+} (浓度 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 加以阻滞, 而电压依从性 K^+ 电流通过以 Cs^+ 取代电极液中的 K^+ 来消除。在此条件下, 通过阶跃去极引出的瞬时内向电流可代表快钠电流, 能够被 $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的河豚毒素 (TTX) 溶液阻滞。含滇黄芩总黄酮的溶液记录细胞超灌可浓度依赖性降低钠通道电流峰值 (表 1)。在 2 min 内可观察到稳定的抑制作用, 而冲洗 5 min 后电流可部分恢复。由浓度-效应曲线求出其半抑制浓度为 $106 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (95% 的可信限 $92 \sim 112 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) (图 1), Hill 系数为 1.08 (95% 的可信限 $0.97 \sim 1.19$)。滇黄芩总黄酮对钠通道电流-电压关系的响见图 2。在对照组, I_{Na} 的激活阈电压为 $-60 \sim -50 \text{ mV}$, 在 -40 mV 时达到最大激活, 而反转电压为 $(18.0 \pm 2.1) \text{ mV}$ ($n = 9$)。滇黄芩总黄酮不改变钠通道激活开放的刺激电位阈值、最大激活电位值和反转电位值, 但能使 I/V 曲线明显向上漂移; 在 -40 mV 处可引出的最大钠电流较正常组减少 45.6% ($n = 9, P < 0.01$)。冲洗 5 min 后电流可恢复到正常水平的 $79\% \pm 4\%$ ($n = 6$)。

表 1 滇黄芩总黄酮对豚鼠心室肌细胞 I_{Na} 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

总黄酮/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	n	$I_{\text{Na}}/n\text{A}$	
		给药前	给药后
12.5	7	-2.39 ± 0.23	-2.29 ± 0.26
25	6	-2.45 ± 0.23	$-2.11 \pm 0.25^{1)}$
50	6	-2.51 ± 0.34	$-1.87 \pm 0.31^{1)}$
75	6	-2.65 ± 0.37	$-1.72 \pm 0.45^{1)}$
100	6	-2.49 ± 0.22	$-1.26 \pm 0.11^{1)}$
125	6	-2.53 ± 0.36	$-0.43 \pm 0.25^{1)}$
150	6	-2.56 ± 0.29	$-0.31 \pm 0.16^{1)}$
200	6	-2.35 ± 0.31	$-0.15 \pm 0.12^{1)}$
250	6	-2.37 ± 0.28	$-0.029 \pm 0.07^{1)}$

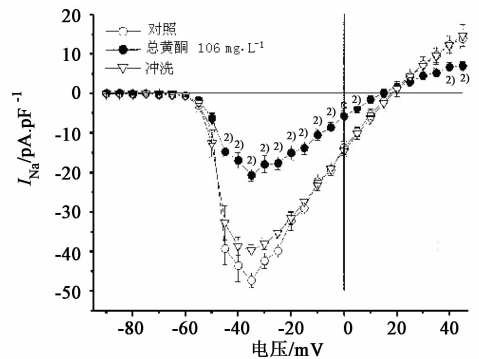
注: 与给药前相比 $^{1)} P < 0.001$ 。

3.2 细胞外给药对心室肌细胞 Na^+ 电动力学特性的影响 细胞外给予滇黄芩总黄酮不影响钠通道激活曲线 (图 3): 对照组与 $106 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的滇黄芩总黄酮组的半激活电压 ($V_{1/2}$) 分别为 (-50.4 ± 1.7) , $(-50.1 \pm 3.1) \text{ mV}$ ($n = 8$), 斜率分别为 (3.0 ± 0.4) , $(4.1 \pm 0.3) \text{ mV}$ 差异无统计学意义。



心室肌细胞取自 8 只豚鼠, 共 37 个细胞; 每个数据点相邻括号内的数字表示检测的心室肌细胞数

图 1 滇黄芩总黄酮对豚鼠心室肌细胞钠电流抑制作用的浓度-效应曲线 ($\bar{x} \pm s$)



与加药前相比, $^{1)} P < 0.05$; $^{2)} P < 0.01$ 。

图 2 滇黄芩总黄酮对 Na^+ 通道电流 I/V 曲线的影响

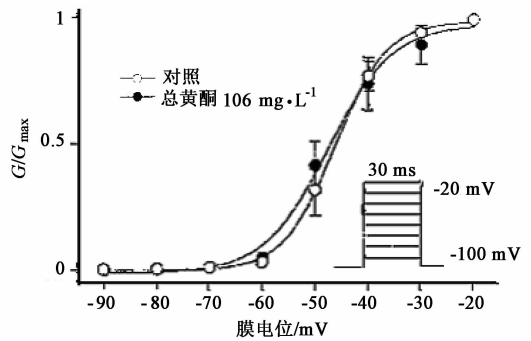


图 3 滇黄芩总黄酮对 Na^+ 通道电流激活曲线的影响

细胞外给予滇黄芩总黄酮可引起电压依从性钠通道稳态活曲线向负向漂移 (图 4): 对照组与 $106 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的滇黄芩总黄酮组的半失活电压分别为 (-69.4 ± 1.6) , $(-79.3 \pm 3.2) \text{ mV}$ ($n = 7, P < 0.05$), 而斜率分别为 (-8.2 ± 0.9) , $(7.1 \pm 0.7) \text{ mV}$, 两者间的斜率差异无显著性意义。

心室肌细胞由失活态激活的时程可用指数函数确定 (图 5)。对照组的时间常数 (τ) 为 $(15.6 \pm 6.3) \text{ ms}$ ($n = 6$), 细胞外给予 $106 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的滇黄芩总黄酮溶液可引起时间常数显著延长 [$\tau = (29.8 \pm 14.8) \text{ ms}, P < 0.05$]。

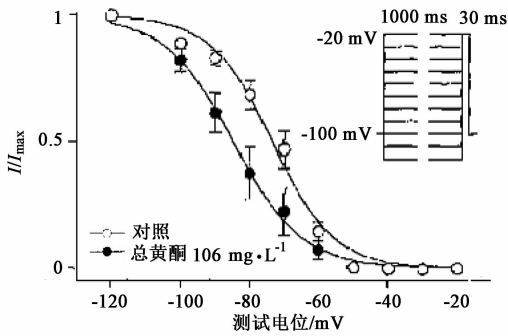


图4 滇黄芩总黄酮对 Na^+ 通道电流稳态失活曲线的影响 ($\bar{x} \pm s$)

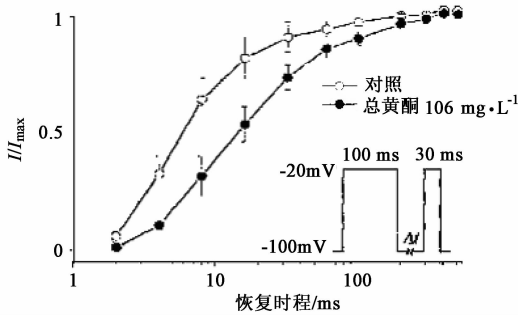


图5 滇黄芩总黄酮对 Na^+ 通道由失活向激活态转变曲线的影响 ($\bar{x} \pm s$)

4 讨论

我们前期在整体动物实验的研究中发现滇黄芩总黄酮对豚鼠心室肌细胞有可逆性阻滞作用。细胞外给予滇黄芩总黄酮如果能够阻滞 I_{Na} , 则说明滇黄芩总黄酮可经细胞膜扩散并结合到通道内部的某一结合位点对钠通道产生阻滞作用。实验中发现了支持这种推测的证据: 滇黄芩总黄酮可引起电压依赖性钠通道稳态失活曲线向负向漂移而不影响激活曲线, 这种漂移意味着滇黄芩总黄酮对失活态心肌细胞钠通道有较高的亲和力, 从而引起强烈的阻滞作用; 滇黄芩总黄酮可明显延缓钠通道从失活态的恢复过程, 作用有使用依赖性。因此滇黄芩总黄酮可作于心室肌细胞钠通道失活稳定剂。

滇黄芩总黄酮阻滞心肌细胞钠通道的 IC_{50} 为 $106 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (95% 的可信限: $92 \sim 112 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。滇黄芩总黄酮对钠通道电流的阻滞作用具有使用依赖性。 $106 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的滇黄芩总黄酮溶液可引起电压依

从性钠通道稳态失活曲线负向漂移, 延缓其从失活态的恢复, 但并不影响钠通道激活曲线。在整体动物上, 滇黄芩总黄酮有显著的心血管活性, 滇黄芩总黄酮的多通道阻滞效应可能有利于室颤的治疗。滇黄芩总黄酮的抗心律失常作用可用缺血再灌注诱发的大鼠心律失常模型研究证实, 滇黄芩总黄酮能有效抑制室颤。临床研究表明, dronedarone 等多通道阻滞剂比现有的药物具有更多的抗心律失常优点^[8]。滇黄芩总黄酮如果能够进一步分离出其有效单体成分, 在抗心律失常药的设计中或许能提供许多有用的结构线索。

[参考文献]

- [1] 何晓山, 代蓉, 陈秀红, 等. 滇黄芩总黄酮急性毒性及抗实验性心律失常作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(10):150.
- [2] 何晓山, 周宁娜, 林青, 等. 滇黄芩总黄酮抗心律失常作用的实验研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(4):508.
- [3] Farmer B B, Mancina M, Williams E S, et al. Isolation of calcium tolerant myocytes from adult rat heart; review of the literature and description of a method[J]. Life Sci, 1983, 33: 1.
- [4] 王志勇, 初文峰, 王玲, 等. 槲寄生黄酮苷对大鼠心室肌细胞钾离子通道的作用[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2005, 39(3):245.
- [5] 龚冬梅, 单宏丽, 周宇宏, 等. 哇巴因和乌头碱诱发豚鼠和大鼠心律失常的离子靶点[J]. 药学学报, 2004, 39(5):32
- [6] Du Y M, Zhang S Y, Wu H J, et al. Glycyrrhetic acid blocks cardiac sodium channels expressed in *Xenopus* oocytes[J]. J Ethnopharmacol, 2009, 125(2):318.
- [7] Remme C A, Bezzina C P. Sodium channel(dys)function and cardiac arrhythmias[J]. Cardiovasc Ther, 2010, 28(5):287.
- [8] Patel P D, Bhuriya R, Patel D D, et al. Dronedarone for atrial fibrillation: a new therapeutic agent[J]. Vasc Health Risk Manag, 2009, 5(18): 635.

[责任编辑 聂淑琴]