

环维黄杨星 D 返针晶晶体 对豚鼠心室肌细胞动作电位的影响

刘红军^{1*}, 余海滨¹, 高 原¹, 朱明军¹, 王永霞¹, 李思思²

(1. 河南中医学院第一附属医院, 河南 郑州 450000;

2. 河南省康利医药技术开发有限公司, 河南 郑州 450000)

[摘要] 目的: 观察环维黄杨星 D (Cyclovirobuxine D, CVB-D) 返针晶晶体对豚鼠单个心室肌细胞动作电位的影响。方法: 使用 Langendorff 灌流系统离体灌流心脏, 急性酶解法分离获得心肌细胞。全细胞膜片钳技术电流钳模式记录动作电位。Tyrode 氏液和药物溶液交替反复灌流单个心室肌细胞。结果: CVB-D 中浓度组用药后动作电位 0 相除极幅度 (APA) 从 (113.3 ± 6.3) mV 下降至 (110.2 ± 6.4) mV ($n=6, P<0.01$), 复极至 50% 时动作电位时程 (APD_{50}) 从 (616.3 ± 68.0) ms 延长至 (657.4 ± 79.5) ms ($n=6, P<0.01$), 复极至 90% 时动作电位时程 (APD_{90}) 从 (633.5 ± 71.2) ms 延长至 (669.2 ± 74.4) ms ($n=6, P<0.01$), 复极 50% 至 90% 动作电位时程 (APD_{50-90}) 从 (15.9 ± 6.0) ms 延长至 (20.1 ± 5.2) ms ($n=6, P<0.01$), 动作电位 3 相复极速率 (V_3) 从 (-2.6 ± 0.8) V/s 减慢至 (-2.4 ± 0.7) V/s ($n=6, P<0.01$)。Tyrode 氏液和高浓度药物溶液交替反复灌流后 APD_{50-90} 呈递增趋势而 V_3 呈递减趋势, 其他指标的变化趋势与中浓度组一致。CVB-D 低浓度组各项指标的变化趋势缺乏统计学意义。结论: 体外应用 CVB-D 返针晶晶体引起心室肌细胞 APA 减小, APD_{50} , APD_{90} , APD_{50-90} 延长, V_3 减慢。以上影响可能是其在临床上具有增强心肌收缩力和抗心律失常作用的药理机制。

[关键词] 环维黄杨星 D 返针晶晶体; 动作电位; 膜片钳; 心律失常

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)02-0096-05

Effect of Cyclovirobuxine D on the Action Potentials of Ventricular Myocytes in Guinea Pig

LIU Hong-jun^{1*}, YU Hai-bin¹, GAO Yuan¹, ZHU Ming-jun¹, WANG Yong-xia¹, LI Si-si²

(The First Affiliated Hospital, Henan College of TCM, Zhengzhou 450000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Cyclovirobuxine D (CVB-D) on action potentials in isolated guinea pig ventricular myocytes. **Methods:** The single myocytes were enzymatically obtained from the guinea pig hearts and the action potentials were examined by whole-cell patchclamp technique. **Results:** 4×10^{-4} g/L CVB-D decreased action potential amplitude (APA) from 113.3 ± 6.3 mV to 110.2 ± 6.4 mV ($n=6, P<0.01$), prolonged action potential duration of repolarization 50% (APD_{50}) from 616.3 ± 68.0 ms to 657.4 ± 79.5 ms ($n=6, P<0.01$), prolonged action potential duration of repolarization 90% (APD_{90}) from 633.5 ± 71.2 ms to 669.2 ± 74.4 ms ($n=6, P<0.01$), Prolonged action potential duration of repolarization 50% to repolarization 90% (APD_{50-90}) from 15.9 ± 6.0 ms to 20.1 ± 5.2 ms ($n=6, P<0.01$), and decreased decay slope of phase 3 (V_3) from -2.6 ± 0.8 V/s to -2.4 ± 0.7 V/s ($n=6, P<0.01$). Compared with the baseline, 4×10^{-3} g/L CVB-D makes the APD_{50-90} pass to increase trend gradually, but the variety trend of the V_3 decrease gradually, other index sign varieties are

[收稿日期] 2009-05-12

[通讯作者] * 刘红军, Tel: 13938587048; E-mail: liuhongjun19710607@yahoo.com.cn

consistent. **Conclusion:** CVB-D decreased APA and V_3 , and prolonged APD_{50} , APD_{90} , APD_{50-90} , which may be its mechanism of positive inotropic effect and antiarrhythmic effect.

[**Key words**] cyclovirobuxine D; action potential; patch clamp; arrhythmia

环维黄杨星 D(CVB-D), 又称黄杨宁、环常绿黄杨碱 D、黄杨碱等, 是从黄杨木中提取的生物碱, 属孕甾烷衍生物。《本草纲目》认为其具祛风湿、行气活血、通络止痛的功能, 主要用于治疗气滞血瘀所致的胸痹心痛、脉结代者。临床试验发现黄杨宁对治疗早搏有效^[1-3], 抗心律失常疗效与心律平相似, 安全性优于心律平^[4]; 黄杨宁能改善心功能^[5], 明显改善糖尿病性心肌病的左室收缩功能和舒张功能^[6]。为了探讨其抗心律失常和改善心功能的药理机制, 我们研究了 CVB-D 对豚鼠单个心室肌细胞动作电位的影响。

1 材料

1.1 试剂 环维黄杨星 D 返针晶结晶体纯度 99.9%, 分子量 402.36, 由河南省康利医药技术开发有限公司提供。其他相关样品为环 D 原料(纯度 89.9%)、环 D 一甲醇体(纯度 99.9%)和母液蒸干物(纯度 82.1%), 不同实验样品之间因纯度差异存在药效差异具有统计学意义, 相关研究论文有待发表。氯化钠(NaCl 批号 20070202)、磷酸二氢钠($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 批号 20061008)、氯化钙($CaCl_2$ 批号 20061010)、氢氧化钾(KOH 批号 20060206)、氢氧化钠(NaOH 批号 20061106)由天津市凯通化学试剂有限公司生产。氯化钾(KCl 批号 20050901)、结晶硫酸镁($MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 批号 20051020)、氯化镁($MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 批号 20051103)、磷酸二氢钾(KH_2PO_4 批号 20051012)、葡萄糖(Glucose 批号 20051110)由天津市福晨化学试剂厂生产。N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸(HEPES)、L-谷氨酸(L-Glutamic acid)、胶原酶 II、蛋白酶 E 由博奥生物有限公司分装。乙二醇-双(四乙酸)(EGTA)由 Amresco 生产。牛磺酸(Taurine)、天门冬氨酸钾(KAsp)、磷酸肌酸二钠(Na_2 -phosphocreatin)、三磷酸腺苷二钾($K_2ATP \cdot 2H_2O$)由 SIGMA 公司生产。

1.2 溶液 Tyrode 氏液($mmol \cdot L^{-1}$): NaCl 136, KCl 5.4, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 0.33, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 1.0, Glucose 10, HEPES 10, $CaCl_2$ 1.8。2 mol $\cdot L^{-1}$ NaOH 调 pH 值至 7.4, 25 $^{\circ}C$ 。

无钙 Tyrode 氏液($mmol \cdot L^{-1}$): 从 Tyrode 氏液

中去除 $CaCl_2$ 成份。

酶液: 无钙 Tyrode 氏液 25 mL, 胶原酶 II 10 mg, 蛋白酶 E 1 mg, $0.1 mol \cdot L^{-1} CaCl_2$ 12.5 μL 使钙离子浓度成为 50 $\mu mol \cdot L^{-1}$ 。

KB 液($mmol \cdot L^{-1}$): KCl 39.97, KH_2PO_4 25, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 3, Glucose 10.09, HEPES 10.7, EGTA 0.53, Taurine 19.98, L-glutamic acid 50.3, KOH 80。2 mol $\cdot L^{-1}$ KOH 调 pH 值至 7.4, 25 $^{\circ}C$ 。

电极内液($mmol \cdot L^{-1}$): KAsp 120, KCl 20, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 1, HEPES 5, EGTA 10, Na_2 -phosphocreatin 2, $K_2ATP \cdot 2H_2O$ 4。2 mol $\cdot L^{-1}$ KOH 调 pH 值至 7.3, 25 $^{\circ}C$ 。

药物溶液: 环维黄杨星 D 返针晶结晶体 20 mg 加入超纯水 1 mL, 26 $^{\circ}C$ 下超声使晶体变碎, 逐滴加入 2% HCl 溶液共 0.45 mL 使其完全溶解, 加入超纯水稀释至 2 mL 母液, 浓度为 10 mg $\cdot mL^{-1}$ 取母液 2 mg (0.2 mL) 加超纯水稀释至 10 mL 溶液 (0.2 g $\cdot L^{-1}$)。实验过程中分别取 0.2 g $\cdot L^{-1}$ 药液 10, 100, 1000 μL 加入 Tyrode 氏液 50 mL 稀释, 配置成浓度为 $4 \times 10^{-3} g \cdot L^{-1}$ (高浓度组), $4 \times 10^{-4} g \cdot L^{-1}$ (中浓度组), $4 \times 10^{-5} g \cdot L^{-1}$ (低浓度组) 的药液。

1.3 实验动物 普通级豚鼠 (189.5 ~ 236) g, 雌雄不限, 由郑州市华兴实验动物养殖场提供, 生产证号: SCXK(鄂)2004-0007。

1.4 实验设备 德国 Sartorius BS110S 电子天平, GL-3250B 磁力搅拌器, pHs-3C 精密酸度计; 保定兰格恒流泵有限公司恒流泵 LEAD-1, 自制 Langendorff 灌流器(蛇形管); 美国 SUTTER INSTRUMENT COMPANY 微电极控制仪 MODEL P-97 和三维操纵仪 MP-225, World Precision Instrument, Inc. 玻璃微电极抛光仪 H602-240, 中国科学院物理研究所外径 1.5 mm 厚壁有芯玻璃微电极毛胚; 美国 Axon 公司 Axopatch 200B 放大器和数模模数转换器 DIGIDATA 1440A, 日本 OLYMPUS IX71 倒置显微镜, 空气压缩泵 OLF550AF, 减震台和金属屏蔽罩, BOYU AIR-PUMP U-9900, 给药系统 ALA-VM4; 惠普计算机 g3038cx。

2 方法

2.1 豚鼠单个心室肌细胞急性分离实验^[7-8] 灌流系统出口温度保持在 37 °C。所有灌流液和 KB 液均以 100% 氧气持续低流量饱和 30 min 以上。恒流泵灌流速度 8 mL · min⁻¹。2% 戊巴比妥 1 mL 加 (1 000 U · mL⁻¹) 肝素 1 mL ip 麻醉豚鼠。5 min 左右固定豚鼠,开胸游离心脏。离体心脏放入 4 °C 无钙 Tyrode 氏液中,游离主动脉。将心脏主动脉连接在灌流器出口处,行 Langendorff 心脏灌流。从游离心脏至结扎固定主动脉的间隔时间越短越好,这是决定本实验成败的关键步骤,一般在 2 min 之内完成。无钙 Tyrode 氏液经主动脉逆向灌流心脏(3~5 min,灌注压 20 cm H₂O),然后 25 mL 酶液循环灌流消化心脏。酶液灌流开始后第 10,15,20,25,30 min 分别剪取心室肌组织,在 KB 液中分离心肌组织,获得单个心室肌细胞。KB 液保存心肌细胞,放入 4 °C 冰箱 1~2 h 后使用。

2.2 膜片钳实验

2.2.1 记录模式^[9-10] 实验在 22~24 °C 室温下进行。盖玻片封灌流槽后,灌流槽固定于倒置显微镜台板上。灌流槽内滴入数滴富含心肌细胞的冷藏 KB 悬液,静置 5~10 min 有利于心肌细胞沉淀后贴附于盖玻片上。Tyrode 氏液灌流 5 min,流速 2 mL · min⁻¹。选择外形完整、边缘清楚、表面光滑、透光性好、横纹清晰、无收缩的心肌细胞。充灌电极内液后玻璃微电极^[11]正压入水,Axopatch 200B 放大器电压钳制模式下补偿液接电位。入液电极电阻(*R*)不大于 3 MΩ。负压吸引封接心肌细胞,高阻封接(giga seal)时 *R* ≥ 1 GΩ 提示封接成功,脉冲电流信号消失。继续负压吸引,出现充放电现象提示全细胞记录模式的形成。破膜后 Tyrode 氏液灌流 5 min,有利于电极内液与细胞内液充分混合,记录动作电位。信号经截止频率为 1 kHz 的四阶贝塞尔低通滤波器滤波,采样频率为 10 kHz。

2.2.2 给药方法^[9] 恒流蠕动泵灌流速度 2 mL · min⁻¹,药液持续灌流 5 min,记录动作电位。然后 Tyrode 氏液洗脱药液 5 min,记录动作电位。Tyrode 氏液和药液重复交替灌流。

2.2.3 刺激方案 刺激强度 1.1~3 nA,选择可以诱发动作电位的最小刺激强度;刺激时间 5 ms,刺激频率 0.625 Hz(1.6 s),每次持续刺激 1 min。实验过程中同一细胞的刺激方案保持不变。

2.2.4 采样记录 刺激信号及输入信号由美国 Ax-

on 公司 pClampex10.1 采样软件控制。电流钳制模式下记录用药前、用药后和洗脱后的动作电位信号。

2.3 数据测量 使用美国 Axon 公司 Clampfit10.1 分析软件进行测量。测量指标包括动作电位 0 相除极幅度(APA),复极至 50% 时动作电位时程(APD₅₀),复极至 90% 动作电位时程(APD₉₀),复极 50% 至 90% 动作电位时程(APD₅₀₋₉₀)即 APD₉₀ 减 APD₅₀,动作电位 3 相复极速率(*V*₃)是指动作电位复极至 50% 时与复极至 90% 时两点连线的斜率即 $APA \times 2/5 \div APD_{50-90}$ 。其中 APD₅₀₋₉₀ 和 *V*₃ 为新创的两项测量指标,对于心肌细胞电生理特性分析和 AP 快速复极末期膜电流分析具有重要意义。

2.4 统计学方法 统计软件使用 SPSS 10.0,指标数据均以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用药前后比较采用配对 *t* 检验。*P* < 0.05 提示数据的变化趋势有差异性,*P* < 0.01 提示数据的变化趋势有显著差异性。

3 结果

CVB-D 中浓度组用药后 APA 下降、APD₅₀ 延长、APD₉₀ 延长、APD₅₀₋₉₀ 延长和 *V*₃ 减慢。Tyrode 氏液和药物溶液交替反复灌流对各项指标的影响呈可逆性变化趋势。各项指标的变化趋势均具有显著差异性。

CVB-D 高浓度组药物溶液和 Tyrode 氏液交替反复灌流后 APD₅₀₋₉₀ 呈递增趋势而 *V*₃ 呈递减趋势,提示用药后 APD₅₀₋₉₀ 延长和 *V*₃ 减慢呈不可逆变化趋势。其他指标的变化趋势与中浓度组一致。各项指标的变化趋势均具有显著差异性(见表 1)。高浓度组出现一例异常自律性触发活动,呈室性心律失常,频率 96 次/min,停止刺激后持续 20 min 左右消失。该现象在本课题的 CVB-D 一甲醇结晶体高浓度组实验中也发现一例。

CVB-D 低浓度组动作电位各项指标的变化趋势缺乏统计学意义。

4 讨论

4.1 豚鼠心室肌细胞动作电位相关电生理特性分析 中浓度组与高浓度组各项指标的变化趋势一致。APA 下降提示药物可能引起冲动传导减慢^[12]。APD₉₀ 延长提示不应期延长,APD₅₀ 延长提示有效不应期延长,APD₅₀₋₉₀ 延长提示相对不应期延长。不应期延长提示药物可能引起冲动在心肌细胞间的传导减慢。以上影响可能是 CVB-D 在临床上对室性心律失常有效的药理机制。

表 1 CVB-D 返针晶结晶体用药前后动作电位指标的比较 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

	CVB-D 浓度($g \cdot L^{-1}$)	APA (mV)	APD ₅₀ (ms)	APD ₉₀ (ms)	APD ₅₀₋₉₀ (ms)	V ₃ (V/s)
用药前	—	114.1 ± 4.2	644.0 ± 177	663.5 ± 178.0	19.4 ± 1.8	-2.4 ± 0.2
用药后	4 × 10 ⁻⁵	116.4 ± 5.2	648.8 ± 139.4	668.5 ± 140.5	19.7 ± 2.1	-2.4 ± 0.2
用药前	—	113.3 ± 6.3	616.3 ± 68.0	633.5 ± 71.2	15.9 ± 6.0	-2.6 ± 0.8
用药后	4 × 10 ⁻⁴	110.2 ± 6.4 ¹⁾	657.4 ± 79.5 ¹⁾	669.2 ± 74.4 ¹⁾	20.1 ± 5.2 ¹⁾	-2.4 ± 0.7 ¹⁾
变化率		2.7%	6.6%	5.6%	26.4%	7.6%
用药前	—	122.6 ± 2.0	865.9 ± 63.9	888.5 ± 64.7	22.5 ± 3.5	-2.2 ± 0.3
用药后	4 × 10 ⁻³	110.3 ± 3.6 ¹⁾	1921.9 ± 233.7 ¹⁾	1954.8 ± 234.1 ¹⁾	32.9 ± 9.3 ¹⁾	-1.4 ± 0.3 ¹⁾
变化率		10.0%	121.9%	120.0%	46.2%	36.3%

注:与用药前相比¹⁾ $P < 0.01$

CVB-D 高浓度组出现一例异常自律性触发活动呈室性自主心律,显微镜下发现细胞出现收缩反应说明 CVB-D 返针晶结晶体具有正性肌力作用致心肌细胞收缩性增强,同时提示 $4 \times 10^{-3} g \cdot L^{-1}$ 浓度下存在 CVB-D 返针晶结晶体致心律失常的毒理效应。

4.2 豚鼠心室肌细胞动作电位相关膜电流分析 APA 下降提示 CVB-D 返针晶结晶体可能对除极阶段内向电流如钠通道离子流 (I_{Na}) 有抑制效应^[13]。

APD₅₀ 延长提示其可能对动作电位平台期内向电流如 L 型钙通道离子流 (I_{L-Ca}) 有激动效应或对外向电流如钾通道离子流有抑制效应。

APD₅₀₋₉₀ 延长和 V₃ 减慢提示其对动作电位快速复极末期外向电流如钾通道离子流 (延迟整流钾电流 I_K 或内向整流钾电流 I_{K1}) 有抑制效应^[14]。用药后 APD₅₀₋₉₀ 延长和 V₃ 减慢呈不可逆变化趋势说明药物对 I_K 或 I_{K1} 有不可逆阻断效应。

CVB-D 返针晶结晶体溶液的钙通道激活效应导致细胞内 Ca²⁺ 水平明显升高诱发异常自律性晚后除极,这可能是高浓度组出现室性自主心律的原因,其涉及的离子通道可能不止一个^[15]。这种现象也支持 CVB-D 返针晶结晶体存在钙通道激动效应, I_{L-Ca} 激活效应可能是其具有正性肌力作用的药理机制。

CVB-D 返针晶结晶体对心室肌细胞膜离子通道电流的实际影响有待进一步研究论证。

4.3 豚鼠心室肌细胞动作电位相关指标变化率分析 中浓度组各项指标变化率比较分析后发现 APD₅₀₋₉₀ 延长的变化率最大,提示 CVB-D 返针晶结晶体对豚鼠心室肌细胞电生理特性的主要影响是延长相对不应期;对心室肌细胞膜电流的主要影响是快

速复极末期外向电流抑制效应,提示 CVB-D 返针晶结晶体对 I_K 或 I_{K1} 的抑制效应可能是其主要药理机制。

CVB-D 高浓度组各项指标变化率比较分析后发现 APD₅₀ 延长和 APD₉₀ 延长的变化率最大,提示 CVB-D 返针晶结晶体对豚鼠心室肌细胞电生理特性的主要影响是延长有效不应期;对心室肌细胞膜电流的主要影响是平台期内向电流激动效应,提示 CVB-D 返针晶结晶体对 I_{L-Ca} 的激动效应可能是其主要药理机制。CVB-D 低浓度组各项指标的变化趋势缺乏统计学意义, CVB-D 中浓度组与高浓度组各项指标的变化趋势一致,不同的是高浓度组各项指标的变化率均大于中浓度组,以上表现提示动作电位各项指标的变化趋势具有浓度依赖性,变化率与药物浓度呈正相关。

[参考文献]

[1] 王建明. 黄杨宁片治疗老年性早搏 54 例临床观察 [J]. 中外健康文摘, 2007, 4(6): 667.
 [2] 吴非飞. 口服黄杨宁片剂治疗冠心病频发室性早搏 50 例 [J]. 临床药学, 2003, 12(3): 71.
 [3] 牟乃洲, 牛继华, 高 阳. 黄杨宁治疗老年冠心病室性早搏 52 例 [J]. 山东中医杂志, 1996, 15(7): 301.
 [4] 姚宇玫. 黄杨宁片治疗心律失常 55 例的动态心电图评价 [J]. 浙江中医杂志, 2006, 41(8): 492.
 [5] 袁高辉, 金培圣, 邵 华. 黄杨宁对老年冠心病心功能不全者内源性洋地黄因子浓度影响的初步观察 [J]. 中西医结合实用临床急救, 1995, 2(1): 6.
 [6] 王守利, 孙文菊. 黄杨宁对糖尿病性心脏病左室功能影响 [J]. 临床药学, 1998, 5(12): 17.
 [7] 李 宁, 吴相锋, 马克娟, 等. 参松养心胶囊对心室肌细胞钾通道的影响 [J]. 疑难病杂志, 2007, 6(3): 133.

- [8] Irie H, Gao J, Gaudette GR, *et al.* Both metabolic inhibition and mitochondrial K (ATP) channel opening are myoprotective and initiate a compensatory sarcolemmal outward membrane current [J]. *Circulation*, 2003, 108 (9) :341.
- [9] 丽英, 杨艳敏, 浦介麟, 等. 盐酸关附甲素对豚鼠和大鼠心肌细胞钾通道的阻断作用 [J]. *中国心脏起搏与心电生理杂志*, 2006, 20(3) :256.
- [10] Hamill OP, Marty A, Neher E, *et al.* Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches [J]. *Pflugers Arch*, 1981, 391, 85.
- [11] 刘振伟. 实用膜片钳技术 [M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2006: 12.
- [12] 姚泰. 生理学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 140, 147.
- [13] 刘泰捷. 心肌细胞电生理学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 206.
- [14] 李泱. 离子通道与膜片钳技术 [M]. 兰州: 甘肃文化出版社, 2001: 28.
- [15] 刘泰捷. 心肌细胞离子通道和通道病 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 10.