

药理与临床

冬虫夏草对豚鼠心室肌细胞胞浆钙离子浓度及L-型钙电流的影响

王赫,单宏丽,孙宏丽,陈庆文,张妍,杨宝峰*

(哈尔滨医科大学 药理教研室、黑龙江省生物医药重点实验室,黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:目的 研究冬虫夏草(*Cordyceps sinensis*, CS)水提液对豚鼠单个心室肌细胞胞浆内钙离子浓度($[Ca^{2+}]_i$)及L-型钙电流(I_{CrL})的影响。方法 酶解法分离豚鼠单个心室肌细胞,应用激光扫描共聚焦显微镜联合全细胞膜片钳技术测定豚鼠心室肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 以及 I_{CrL} 的变化。结果 应用0.1 mg/mL(生药浓度)冬虫夏草水提液,在静息状态下对 $[Ca^{2+}]_i$ 无影响;对60 mmol/L KCl诱导的胞浆 $[Ca^{2+}]_i$ 升高有促进作用,峰值荧光强度在120 s时由 $1\ 204.3 \pm 238.4$ 增加至 $1\ 855.2 \pm 321.0$ ($n=6$, $P<0.05$)。膜片钳研究表明,冬虫夏草水提液可明显促进 I_{CrL} ,使 I_{CrL} 从 (-15.1 ± 2.3) pA/pF增加到 (-19.7 ± 3.2) pA/pF(刺激电压为10 mV, $n=8$, $P<0.01$)。结论 冬虫夏草水提液促进心肌细胞钙内流,是该药治疗缓慢型心律失常的机制之一。

关键词:冬虫夏草;L-型钙电流;膜片钳技术

中图分类号:R285.5 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2004)08-0895-04

Effects of *Cordyceps sinensis* on intracellular calcium concentration and L-type calcium current of ventricular myocytes in guinea pig

WANG He, SHAN Hong-li, SUN Hong-li, CHEN Qing-wen, ZHANG Yan, YANG Bao-feng

(Department of Pharmacology, Bio-Pharmaceutical Key Laboratory of Heilongjiang Province, Harbin Medical University, Harbin 150086, China)

Abstract: **Object** To study the effects of *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. (CS) on intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) and L-type calcium current (I_{CrL}) of the single cell from ventricular myocytes in guinea pig. **Methods** Zymolytic method was used to isolate single cell of ventricular myocytes in adult guinea pig, which were loaded with Ca^{2+} -sensitive fluorescent indicator Fluo-3/AM. $[Ca^{2+}]_i$ represented by fluorescent intensity (FI) was measured by laser scanning confocal microscope. Whole cell patch clamp technique was used to record I_{CrL} . **Results** At resting state, CS (0.1 mg/mL) did not affect $[Ca^{2+}]_i$ compared with the control. CS (0.1 mg/mL) enhanced the increase of $[Ca^{2+}]_i$ induced by KCl 60 mmol/L. The peak value of fluorescent intensity was increased from $1\ 204.3 \pm 238.4$ to $1\ 855.1 \pm 321.0$ ($n=6$, $P<0.05$); I_{CrL} was increased by CS (0.1 mg/mL) from (-15.1 ± 2.3) pA/pF to (-19.7 ± 3.2) pA/pF, corresponding to a percent increase of 30.07% ($n=8$, $P<0.05$) in guinea pig ventricular myocytes for the treatment of bradyrhythmia. **Conclusion** Elevation of intracellular calcium concentration by CS may contribute to its positively inotropic effects for the treatment of bradyrhythmia.

Key words: *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. (CS); L-type calcium current (I_{CrL}); patch clamp technique

冬虫夏草 *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. (CS) 为麦角科真菌,是中国传统的名贵药材。研究证明其对人体多个器官、系统具有调节作用。近年来,该药对心血管系统的作用正在日益受到人们的重视^[1]。以冬虫夏草为主要成分的宁心宝胶囊主要用于多种心律失常,房室传导阻滞,难治性缓慢型心律失常、传导阻滞,提示冬虫夏草可能具有类似强

心苷类药物的正性肌力作用。研究表明,冬虫夏草的抗心律失常作用与钙离子有关,然而大多数实验仅停留在大体水平,因此其作用机制仍未被阐明。本实验采用膜片钳技术联合激光扫描共聚焦技术研究冬虫夏草水提液对豚鼠单个心室肌细胞胞浆钙离子浓度($[Ca^{2+}]_i$)及L-型钙电流(I_{CrL})的影响,从而揭示冬虫夏草抗心律失常作用的机制。

* 收稿日期:2003-12-24

基金项目:国家自然科学基金委员会生命科学部资助项目(30271599);国家自然科学基金资助项目(30070925);黑龙江省重大攻关项目(20010101001-00)

作者简介:王赫(1977—),女,山东人,硕士在读,研究方向为心血管药理学。E-mail:whwh1978@hotmail.com

*通讯作者 Tel: (0451) 86671354 E-mail: yangbf@ems.hrbmu.edu.cn

1 材料

1.1 药品:天然冬虫夏草,购自哈尔滨市药材总公司鹿茸公司,批号 020312;其水提物提取见文献方法^[2],提取物 pH 为 6.4 (核苷类成分质量分数约为 1.0 mg/g),冷冻储藏。Fluo-3/AM,购于美国分子探针公司,用二甲基亚砷配成保存液,储存于 -20 冰箱中。胶原酶,HEPES,EGTA,牛磺酸均购于 Sigma 公司。

1.2 试剂:台氏液 (mmol/L) 含:NaCl 126, KCl 5.4, MgCl₂ 1, CaCl₂ 1.8, NaH₂PO₄ 0.33, Glucose 10, HEPES 10, NaOH 调 pH 为 7.4; Kraftbrune (KB) 保存液 (mmol/L) 含:Glutamic acid 70, Taurine 15, KCl 30, KH₂PO₄ 10, MgCl₂ 0.5, Egtazic acid (EGTA) 0.5, HEPES 10, glucose 10, Albumin 0.15, KOH 调 pH 为 7.4;电极液 (mmol/L): KCl 20, potassium aspartate 110, MgCl₂ 1, HEPES 5, EGTA 10, Na₂-ATP₅ 5, KOH 调 pH 为 7.2^[3,4]。

1.3 仪器:Insight Plus 激光扫描共聚焦显微镜系统 (Meridian 公司,美国);Axonpatch 200B 膜片钳放大器 (Axon,美国);Digidata 1200 数模转换器 (Axon,美国);OL YMPUS IX-70 相差倒置显微镜 (日本);NARISHIGRE 三维液压微操纵器 (日本);NARISHIGRE PP-830 微电极拉制仪 (日本);NARISHIGRE MF-83 微电极抛光仪 (日本)。

1.4 动物:健康豚鼠,体重 200~250 g,雌雄兼用,哈尔滨医科大学实验动物中心提供。动物为二级,合格证号为 0921。

2 方法

2.1 细胞分离:将实验动物击昏,仰卧位于鼠台上,开胸,迅速取出心脏,将其连于 Langendoff 灌流器 (恒温,37℃) 上,以正常台氏液约 8 mL/min 连续灌流 5 min,使心脏复跳,洗去心脏残血,然后用无钙台氏液灌流至心脏停搏,约 10 min,换胶原酶液 (8 mg/50 mL) 循环灌流分离心脏,当心脏变软变大、色泽变浅,开始取心脏组织,每隔 1 min 取 1 次,约 10 min,将不同时间取下的心室肌组织放于装有 KB 液的试管中,用吸管轻轻吹打,使之分散成单个细胞,然后将大块组织取出弃去,置于 4℃ 冰箱稳定 1 h 待用。

2.2 荧光探针标记:将分离的细胞从 KB 液中换到正常台氏液中,500 r/min 离心 1 min,去除上清液,将心肌细胞置于 20 μmol/L Fluo-3/AM 的负载液

中,于 37℃ 孵育 1 h,500 r/min 离心 1 min 去除负载液,并洗涤 3 次,将细胞稀释至所需浓度 (10 倍物镜视野中 30~40 个细胞),加入浴槽 (100 μL) 中贴壁,在光镜下找到形态完整、横纹清晰的细胞,对其进行激光扫描测定^[5]。

2.3 [Ca²⁺]_i 变化测定:Fluo-3/AM 被动扩散进入细胞后,被酯酶水解释出 Fluo-3, Fluo-3 与 Ca²⁺ 络合,受 488 nm 处的激光激发而产生荧光,其荧光值与 [Ca²⁺]_i 呈正相关,即以荧光值变化表示 [Ca²⁺]_i 变化,在激光扫描共聚焦显微镜 time series 程序下对细胞 XY 平面进行扫描,间隔时间为 20 s,共扫描 30 次。计算细胞 XY 平面内平均荧光强度,以平均荧光强度代表 [Ca²⁺]_i^[6]。

2.4 I_{CrL} 的测定:应用全细胞膜片钳技术记录钙电流,在电压钳模式下记录电流。所用微电极用两步法拉制而成,制成的微电极充灌电极液后电阻在 2~4 MΩ。将准备好的微电极连于倒置显微镜的探头上,分离好的单细胞置于浴槽中,用正常台氏液以 3 mL/min 恒速灌流冲洗细胞表面,形成高阻封接 (>10 GΩ) 后,用脉冲式抽吸打破细胞膜,形成全细胞构型,在电压钳模式下记录电流。调节补偿 40%~80% 以减少系统阻抗引起的电压降落。实验过程由计算机软件 pCLAMP8.0 (Axon Instrument) 控制,数模转换器完成刺激信号的产生、反馈信号的采集以及数据分析。信号输入经过 1 kHz 的滤波,数据存于计算机硬盘以便分析^[6-8]。

2.5 统计学处理:计数资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异采用双侧 *t* 检验进行统计学分析。

3 结果

3.1 对静息状态下细胞胞浆 [Ca²⁺]_i 的影响:将 Fluo-3/AM 标记的细胞置于正常台氏液中,于扫描第 2 次和第 3 次之间加入 0.1 mg/mL 冬虫夏草水提液。结果表明,应用冬虫夏草后,荧光强度值在各扫描时间点之间比较均无显著改变 (图 1)。

3.2 对 KCl 去极化致 [Ca²⁺]_i 升高的影响:在盛有正常台氏液的浴槽中加入标记细胞,待细胞附壁后加入冬虫夏草水提液 (0.1 mg/mL),对照组加入相同体积的生理盐水,温浴 5 min 后,开始扫描,并在第 2 次和第 3 次扫描之间加入终浓度为 60 mmol/L 的 KCl,结果见图 2。结果表明冬虫夏草与对照组相比明显促进由 KCl 引起的胞浆 [Ca²⁺]_i 升高,峰值荧光强度在 120 s 时由 1 204 ± 238.4 增加至 1 855.2 ± 321.0 (*P* < 0.05)。

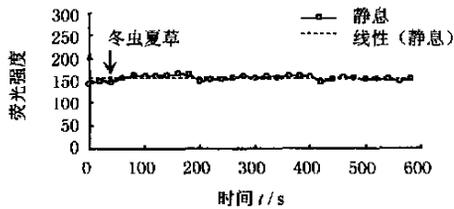


图 1 冬虫夏草对静息状态下的豚鼠心室肌细胞内荧光强度的影响

Fig. 1 Effect of CS on cytosolic FI of guinea pig ventricular myocytes at resting state

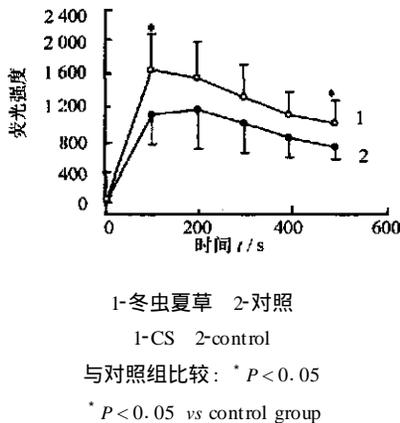


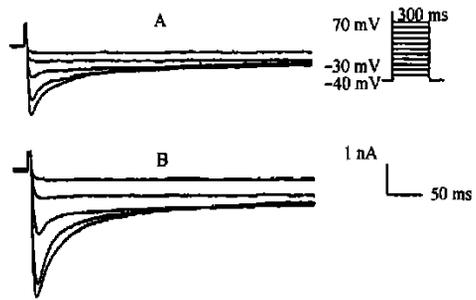
图 2 冬虫夏草对 KCl 引起 $[Ca^{2+}]_i$ 升高的影响 (n = 6)

Fig. 2 Effect of CS on $[Ca^{2+}]_i$ increase of guinea pig ventricular myocytes induced by KCl (n = 6)

3.3 对豚鼠心室肌细胞 I_{CrL} 的影响: 形成稳定的全细胞构型后, 在电压钳模式下记录电流。保持电压固定于 -40 mV , 以排除钠电流和 T-型钙电流的干扰, 细胞外液中恒速灌流 5 mmol/L CsCl 以阻断钾电流, 实验刺激电压从 $-30\sim 10\text{ mV}$ 步阶给予去极化刺激, 阶跃至 70 mV , 脉冲持续 300 ms , 刺激间隔为 5 s , 以保证通道完全复活, 记录到稳定的 I_{CrL} 。测定 I_{CrL} 从 0 时起到 300 ms 稳态之间的内向电流峰值, 稳定 5 min 后, 加入 0.1 mg/mL 冬草夏草水提液, 待出现稳定 I_{CrL} 时, 记录从 0 时起到 300 ms 稳态之间的内向电流峰值。电流用根据细胞膜电容进行标准化处理的电流密度表示。加入冬虫夏草水提液 (0.1 mg/mL) 后, I_{CrL} 的电流密度明显增加, 实验刺激电压为 10 mV 时, I_{CrL} 的电流密度由 $(-15.1 \pm 2.3)\text{ pA/pF}$ 增加至 $(-19.7 \pm 3.2)\text{ pA/pF}$ ($n = 8, P < 0.01$), 见图 3、4。

4 讨论

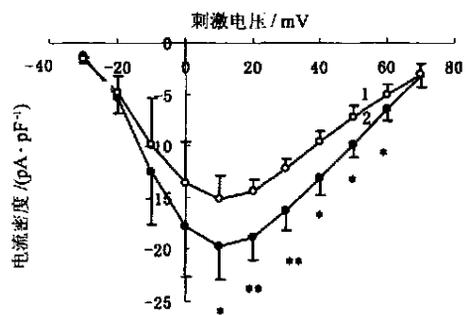
本实验所采用的冬虫夏草水提液的质量浓度是在文献报道的基础上结合大量的预实验后拟定的^[9]。预实验表明, 冬虫夏草水提液 $0.1、0.5、$



A-对照 B-冬虫夏草
A-control B-CS

图 3 冬虫夏草对豚鼠心室肌细胞 I_{CrL} 的影响

Fig. 3 Effect of CS on I_{CrL} of guinea pig ventricular myocytes



1-对照 2-冬虫夏草
1-control 2-CS

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

图 4 豚鼠心室肌细胞 I_{CrL} 的电流-电压曲线

Fig. 4 Current-voltage curve of I_{CrL} of guinea pig ventricular myocytes

1 mg/mL 对细胞离子通道均有作用, 但未呈现明显的剂量依赖性。天然虫草中含有多种活性成分, 其虫草酸证明系 *D*-甘露醇, 被认为是主要成分。后分离鉴定出 3-脱氧腺嘌呤核苷并命名为虫草素, 被视为主要活性成分, 作为质量检验指标^[10]。二者皆为水溶性成分。因此, 冬虫夏草水提液对心肌细胞离子通道的影响, 与这两种有效成分是分不开的。近年来, 对冬虫夏草的化学成分和药理活性进行了广泛的研究, 发现人工虫草菌丝体石油醚、水、醇等多种提取物均有抗心律失常活性, 认为其作用机制与膜对 $Na^+、K^+$ 转运有关, 但确切的机制尚未见报道。

本实验应用膜片钳技术和激光扫描共聚焦技术, 动态、定量地研究了冬虫夏草水提液对豚鼠心室肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响及对 I_{CrL} 的作用。结果发现冬虫夏草水提液对静息状态下的 $[Ca^{2+}]_i$ 无影响, 说明其不参与自发的外钙内流和内钙释放, 不影响

静息状态下的细胞功能。但可明显促进由 KCl 诱导的内钙增多, KCl (60 mmol/L) 可使细胞膜除极, L-型钙通道开放, 引起外钙内流, 以钙介导钙释放的形式使细胞内钙增加。说明冬虫夏草可在细胞兴奋状态下起作用, 并且是激动了 L-型钙通道。

L-型钙通道主要分布于骨骼肌和心肌, 其功能为调控兴奋-收缩耦联。冬虫夏草治疗难治性缓慢型心律失常、传导阻滞作用的重要机制可能就在于冬虫夏草水提液可以促进钙内流, 进而触发心肌兴奋和收缩, 使窦房节和房室节细胞兴奋, 从而发挥其正性肌力作用。

References:

[1] Wen Y X, Mu D P. The pharmacological effects and clinical application of *Cordyceps sinensis* [J]. *Tianjin Pharm* (天津药), 1998, 10(1): 47-50.

[2] Wang G W, Tang S C, Chen X W. Effects of *Cordyceps sinensis* extracts on macrophage phagocytic function in mice [J]. *J Shanxi Med Univ* (山西医科大学学报), 2000, 31(1): 20-21.

[3] Lu Z B, Kaichiro K, Tobias O, et al. Density and kinetics of

I_{K_1} and I_{K_2} in guinea pig and rabbit ventricular myocytes explain different efficacy of I_{K_1} blockade at high heart rate in guinea pig and rabbit implications for arrhythmogenesis in humans [J]. *Circulation*, 2001, 104: 951-956.

[4] Li D S, Zhang L M. Potential ionic mechanism for repolarization differences between canine right and left atrium [J]. *Circ Res*, 2001, 88: 1168-1175.

[5] Li G R, Yang B F, Feng J L, et al. Transmembrane I_{Ca} contributes to rate-dependent changes of action potentials in human ventricular myocytes [J]. *Am J Physiol*, 1999, 276: H98-H106.

[6] Yang B F, Xu C Q, Li Y R, et al. Inhibitory effect of artemisinin on cloned inward rectifier potassium channels [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中国药理学与毒理学杂志), 1999, 13(4): 245-248.

[7] Yang B F, Li Y R, Xu C Q, et al. Mechanisms of artemisinin antiarrhythmic action [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中国药理学与毒理学杂志), 1999, 13(3): 169-175.

[8] Yang B F, Li G R, Xu C Q, et al. Effects of RP58866 on transmembrane K^+ currents in mammalian ventricular myocytes [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1999, 20(11): 961-969.

[9] Chen B, Jin O. Analysis of nucleosides in the *Cordyceps sinensis* and its fermental powder by RP-HPLC [J]. *Chin J Biochem Pharm* (中国生化药物杂志), 1998, 19(2): 88-90.

[10] Li S P, Ji H. Advances in studies on antitumor activity of *Cordyceps sinensis* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32(4): 373-375.

芦荟多糖对 S₁₈₀ 小鼠红细胞膜功能的影响

季宇彬, 邹翔, 汲晨锋, 高世勇*

(哈尔滨商业大学药物研究所 博士后科研工作站, 黑龙江 哈尔滨 150076)

摘要:目的 研究芦荟多糖对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠红细胞膜功能的影响。方法 采用荧光分光光度法、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳以及唾液酸试剂盒分别测定 S₁₈₀ 小鼠红细胞膜脂流动性、膜交联蛋白、带 3 蛋白以及膜唾液酸 (SA) 含量。结果 两种芦荟多糖各剂量组均能不同程度地提高 S₁₈₀ 荷瘤小鼠降低的红细胞膜脂流动性、带 3 蛋白和 SA 的含量, 降低红细胞膜交联蛋白的含量, 且中剂量均非常显著 (P < 0.01)。结论 芦荟多糖对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠红细胞膜功能具有促进作用, 这可能是芦荟多糖抗肿瘤作用的主要机制之一。

关键词: 芦荟多糖; 红细胞膜; 膜脂流动性; 唾液酸

中图分类号: R286.91 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2004)08-0898-04

Effect of aloe polysaccharide on erythrocyte membrane function of S₁₈₀ mice

Ji Yu-bin, Zou Xiang, Ji Chen-feng, Gao Shi-yong

(Postdoctoral Programme, Institute of Materia Medica, Harbin Commerce University, Harbin 150076, China)

Abstract: **Object** To study the effect of aloe polysaccharide (AP) on erythrocyte membrane function of S₁₈₀ mice. **Methods** Lipid fluidity, the cross-linking protein content, Band 3 protein and sialic acid (SA) content of erythrocyte membrane in S₁₈₀ mice were measured by spectrofluorimetry, SDS-PAGE, and SA reagent test Kit, respectively. **Results** Different dosage groups of the two kinds of AP raised the lipid fluidity of erythrocyte membrane, increased Band 3 protein and SA contents of erythrocyte membrane, while decreased the cross-linking protein content at different level. The effect of middle dosage groups of AP were very remarkable (P < 0.01). **Conclusion** AP can improve the erythrocyte membrane function of S₁₈₀ mice, which may be one of the most important antitumor mechanisms of AP.

Key words: aloe polysaccharide (AP); erythrocyte membrane; lipid fluidity of membrane; sialic acid

收稿日期: 2003-12-11

基金项目: 黑龙江省科技厅攻关资助项目 (G00C201303); 哈尔滨市科技局攻关项目 (2003AA6CN095)

作者简介: 季宇彬 (1956-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 多年来一直致力于中药药理、肿瘤药理、分子药理学研究。