

- 561-562.
- [6] Muteliefu G, Liu M J, Lu J F. Effect of cistanoside compounds on oxidative stress and immunity [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2001, 10(3): 157-160.
- [7] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [8] Xu S Y, Bian R L, Chen X. *Methodology in Pharmacological Experiment* (药理学实验方法学) [M]. 3rd ed. Beijing, People's Medical Publishing House, 2002.
- [9] Wu F Q. Cerebrovascular dementia [J]. *Adv Cardiovasc Dis* (心血管病学进展), 1993, 14(2): 90-92.
- [10] Skoon I. Status of risk factors for vascular dementia [J]. *Neuroepidemiology*, 1998, 17(1): 2-6.
- [11] Loeb C. Mental deterioration related to lacunar infarctions [J]. *Heart Dis Stroke*, 1994, 23: 75-81.

## 氧化苦参碱对豚鼠心室肌细胞动作电位和单通道钠电流的影响

陈霞<sup>1</sup>, 张文杰<sup>2</sup>, 吕文伟<sup>1</sup>, 李英骥<sup>2</sup>, 钟国赣<sup>2\*</sup>

(1. 吉林大学基础医学院 药理教研室, 吉林 长春 130021; 2. 吉林大学基础医学院 生理教研室, 吉林 长春 130021)

氧化苦参碱 (oxymatrine) 是从豆科植物苦参 *Sophora flavescens* Ait. 中提取的一种生物碱。氧化苦参碱对心血管系统的作用较为显著, 具有强心、抗心律失常、抑制细胞凋亡、清除自由基及抑制豚鼠心室肌全细胞钠电流等多方面的药理作用<sup>[1,2]</sup>。但关于氧化苦参碱对豚鼠心室肌单细胞动作电位及单通道钠电流的影响尚未见报道, 因此本实验拟在细胞和单通道水平观察氧化苦参碱的作用, 为探讨氧化苦参碱抗心律失常作用机制提供理论依据。

### 1 材料

豚鼠, 雌雄兼用, 体重 300~350 g, 由吉林大学实验动物部提供。氧化苦参碱 (质量分数 >99%) 由中国药品生物制品检定所提供。CEZ-2400 型膜片钳放大器为日本产品。

### 2 方法

2.1 单细胞动作电位的记录方法: 应用胶原酶常规分离豚鼠心室肌细胞<sup>[3]</sup>。将尖端直径为 0.8~1.5 μm 的微电极抛光后冲灌电极液, 电阻为 1~3 MΩ。将已加正压的微电极缓缓插入溶液, 直至接触心肌细胞, 去除正压, 用注射器抽吸以形成 0.98~1.96 kPa 的负压。当电极尖端与细胞膜表面形成 1~5 GΩ 封接电阻时, 用力吸破电极尖端上的膜片, 形成全细胞记录。应用电流钳方法, 给予时程 10 ms、每秒 1 次, 幅度为 1~2 nA 的内向电流脉冲, 引导出豚鼠心室肌细胞的动作电位, 并输入计算机分析动作电位的各项指标<sup>[4]</sup>。在细胞外液中加入 1 mmol/L 氧化苦参碱 3 min 后, 同样的方法引导动作电位, 测

量静息膜电位 (RMP)、动作电位幅值 (APA)、动作电位上升最大速率 ( $V_{max}$ )、动作电位复极 50% 时程 (APD<sub>50</sub>) 和动作电位复极 90% 时程 (APD<sub>90</sub>) 等指标。

2.2 单通道钠电流的记录方法: 用记录单通道钠电流的电极液充灌电极后, 在显微镜下进行抛光处理, 一般电极电阻为 1~1.5 MΩ。将玻璃微电极置于细胞的表面, 通过负压吸引作用形成 10 GΩ 以上的高阻封接, 使电极尖端下的细胞膜片在电学上与周围膜片相隔离, 形成细胞贴附式的记录方式。

2.3 记录动作电位及单通道钠电流所需溶液: 记录动作电位所用灌流液 (mmol/L): NaCl 137, KCl 5.4, MgCl<sub>2</sub> 1.0, CaCl<sub>2</sub> 1.8, HEPES 5, 葡萄糖 10, 用 5 mol/L NaOH 将 pH 值调至 7.4; 记录动作电位的电极内液 (mmol/L): KCl 140, MgCl<sub>2</sub> 2, EGTA 2, CaCl<sub>2</sub> 1.8, HEPES 5, Na<sub>2</sub>ATP 10, 用 1 mol/L KOH 将 pH 值调至 7.2。记录单通道钠电流所用的细胞外液 (mmol/L): KCl 140, NaCl 4.5, MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0.5, EGTA 1.0, 葡萄糖 5.5, HEPES 5.0, 用 KOH 将 pH 值调至 7.3。记录单通道钠电流所用的电极液 (mmol/L): NaCl 140.0, KCl 4.0, MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 1.0, CaCl<sub>2</sub> 0.1, 葡萄糖 5.5, 用 NaOH 将 pH 值调至 7.3。

2.4 数据的采集和统计处理: 在实验中应用 Pclamp6.01 程序记录出原始的单通道钠电流图形, 应用 Fetchan 和 Pstat 程序分析单通道钠电流记录中得到的 64 条原始曲线, 用单指数曲线拟和统计

收稿日期: 2005-03-15

基金项目: 吉林省中医药管理局资助项目 (2004-077)

作者简介: 陈霞 (1964—), 女, 吉林省长春市人, 博士, 副教授, 主要从事药物对心脑血管系统的影响及其机制研究。

Tel: (0431) 5619799 E-mail: xiachen616@yahoo.com.cn

\* 通讯作者 钟国赣 Tel: (0431) 5619472

钠通道的开放时间、关闭时间与开放概率。实验中所有数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 各组数据间采用两样本均数  $t$  检验, 用 Microsoft Excel 完成。

### 3 结果

#### 3.1 氧化苦参碱对豚鼠心室肌细胞动作电位的影响

表 1 氧化苦参碱对豚鼠心室肌细胞动作电位参数的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Table 1 Effects of oxymatrine on action potential parameters of ventricular myocytes in guinea pig ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	RMP/mV	APA/mV	$V_{max}/(V \cdot s^{-1})$	APD <sub>50</sub> /ms	APD <sub>90</sub> /ms
对照	-79.16±6.43	110.83±10.23	158.63±34.29	298.45±28.73	323.66±37.59
氧化苦参碱	-73.00±4.35	95.67±4.63**	96.50±23.88**	227.67±28.14**	255.22±30.13**

与对照组比较: \*\* $P < 0.01$

\*\* $P < 0.01$  vs control group

的影响: 应用细胞贴附式膜片钳方法观察了 1 mmol/L 氧化苦参碱对单通道钠电流的影响。实验中保持电位为 -100 mV 阶跃至 -40 mV、持续时间为 20 ms, 记录单通道钠电流后, 向溶液中加入 1 mmol/L 氧化苦参碱。通过单指数曲线拟和开放和关闭时间分布直方图, 结果表明 1 mmol/L 氧化苦参碱可使单钠通道的开放时间缩短、关闭时间延长、开放概率降低, 结果见表 2。

表 2 氧化苦参碱对豚鼠心室肌细胞单钠通道的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Table 2 Effects of oxymatrine on single sodium channel of ventricular myocytes in guinea pig ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	开放时间/ms		开放概率	
	0 min	15 min	0 min	15 min
对照	0.300±0.060	0.317±0.068	0.265±0.068	0.249±0.076
氧化苦参碱	0.332±0.065	0.225±0.091*	0.279±0.065	0.199±0.042*

与对照组比较: \* $P < 0.05$

\* $P < 0.05$  vs control group

### 4 讨论

心肌细胞动作电位(AP)是心肌兴奋过程中由  $Na^+$ 、 $K^+$ 、 $Ca^{2+}$  和  $Cl^-$  等跨膜转运而形成的, 因此 AP 的参数能在一定程度上反映跨膜离子流的变化。0 相去极化是由  $Na^+$  的快速内流所形成, 这种细胞膜电位的急剧变化在心室肌可触发兴奋的传导和肌肉的收缩, 是影响心肌兴奋性、传导性最基本的因素之一, 而  $V_{max}$  则是反映 0 相去极化的指标。本实验结果表明, 氧化苦参碱能明显减少 APA, 降低  $V_{max}$ , 提示氧化苦参碱对心肌细胞  $Na^+$  电流具有抑制作用。此外, AP 的另一个参数 APD 反映了心肌细胞的复极化过程。其中 APD<sub>50</sub> 代表复极化前期即平台

响; 见表 1。结果表明, 1 mmol/L 氧化苦参碱可略降低 RMP 水平, 但无统计学意义; 能减小 APA 值, 降低  $V_{max}$ , 并缩短 APD<sub>50</sub> 和 APD<sub>90</sub>, 与对照组相比差异显著。

#### 3.2 氧化苦参碱对豚鼠心室肌细胞单通道钠电流

期, 主要反映有效不应期; 而 APD<sub>90</sub> 中除去 APD<sub>50</sub> 的部分则代表复极化后期的时程, 主要反映相对不应期。  $Na^+$ 、 $K^+$ 、 $Ca^{2+}$  和  $Cl^-$  等多种离子参与了心肌细胞的复极化过程, 本实验中氧化苦参碱缩短 APD<sub>50</sub>、APD<sub>90</sub> 的作用, 可能是氧化苦参碱通过作用于其他离子通道而对 APD 产生影响的<sup>[5,6]</sup>。

本实验还采用单通道膜片钳技术, 观察了氧化苦参碱对心肌细胞单通道钠电流的作用, 发现氧化苦参碱可降低单钠通道的开放时间和开放概率, 而不影响单钠通道的电流幅值, 从分子水平观察了氧化苦参碱对心肌细胞钠通道的作用。表明氧化苦参碱对 AP 的影响部分是由于钠通道的开放概率降低所致。

### References:

- [1] Chen X, Li Y J, Zhang W J, et al. Effects of oxymatrine on sodium current in isolated ventricular cells in guinea pig [J]. *J Norman Bethune Univ Med Sci* (白求恩医科大学学报), 2001, 27(1): 41-43.
- [2] Chen X, Li Y G, Ge J Y, et al. Effects of oxymatrine on action potential of normal rat and arrhythmic rat induced by aconitine [J]. *J Jilin Univ: Med Sci* (吉林大学学报: 医学版), 2004, 30(5): 62-64.
- [3] Xu S Y, Bian R L, Chen X. *Methodology in Pharmacological Experiment* (药理实验方法学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1994.
- [4] Wang J L, Nong Y, Yao W X, et al. Effects of liensinine on action potential and  $I_{Na}$ ,  $I_{Ca-L}$  in guinea pig ventricular myocytes [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31(3): 193-195.
- [5] Satoh H. Cardiac electrophysiological modulation by NS-7, a novel neuroprotective drug, of guinea pig ventricular muscles [J]. *Life Sci*, 2003, 72: 1039-1048.
- [6] Pachera P, Bagia Z, Lako'-Futo' Z, et al. Cardiac electrophysiological effects of citalopram in guinea pig papillary muscle comparison with clomipramine [J]. *Gen Pharmacol*, 2000, 34: 17-23.