

参附汤有效组分配伍对离体大鼠心肌细胞 L 型钙通道的影响

杨 勇¹, 任长虹², 孟红旭³, 吴晓丹^{1*}

1. 北京中医药大学 方药系, 北京 100029

2. 首都医科大学宣武医院 低氧医学研究室, 北京 100053

3. 中国中医科学院西苑医院, 北京 100091

摘要: 目的 观察参附汤有效组分及其配伍对大鼠心室肌细胞 L 型钙通道电流的作用。方法 采用 Langendorff 心脏灌流, 急性酶解法获得单个心室肌细胞, 全细胞膜片钳技术记录并分析参附汤人参有效组分人参皂苷 Re、Rg₁、Rb₁ 和附子有效组分乌头原碱及其配伍对心肌细胞 L 型钙通道电流的影响。结果 人参皂苷 Re 和 Rg₁ 能够可逆性地阻断 L 型钙通道电流, 给予不同浓度人参皂苷 Re (3、10、30、100 μmol/L) 和 Rg₁ (10、100 μmol/L) 后 L 型钙通道电流幅度呈现随药物浓度增加逐渐减小的趋势; 人参皂苷 Rb₁ (10、100 μmol/L) 对 L 型钙通道电流幅度变化无明显影响; 乌头原碱能够不可逆地增强 L 型钙通道电流, 给予不同浓度乌头原碱 (10、100 μmol/L) 后 L 型钙通道电流幅度随药物浓度增加逐渐增大。联合使用人参皂苷 Re (20 μmol/L) 和 Rg₁ (80 μmol/L) 对 L 型钙通道的抑制作用强于单独使用人参皂苷 Re 和 Rg₁; 而人参皂苷 Rg₁ (80 μmol/L)、Re (20 μmol/L) 和乌头原碱 (100 μmol/L) 联合应用对人参皂苷 Rg₁ 和 Re 配伍对 L 型钙通道电流的抑制作用无明显影响。结论 参附汤有效组分人参皂苷 Rg₁、Re 抑制 L 型钙通道电流, 而乌头原碱对 L 型钙通道电流有不可逆的增强作用, 人参皂苷 Rg₁、Re 配伍对 L 型钙通道电流的抑制作用增强, 乌头原碱配伍后对人参皂苷 Rg₁、Re 的 L 型钙通道电流抑制作用无明显影响。

关键词: 参附汤; 人参皂苷; 乌头原碱; 组分配伍; L 型钙离子通道

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)24-3594-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.24.018

Regulation on *in vitro* myocardial cell L type calcium channel of rats with active component compatibility of Shenfu Decoction

YANG Yong¹, REN Chang-hong², MENG Hong-xu³, WU Xiao-dan¹

1. Department of Herbal Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

2. Institute of Hypoxia Research, Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100053, China

3. Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medicine, Beijing 100091, China

Abstract: Objective To investigate the regulation of *in vitro* myocardial cell L type calcium channel of rats with active component of Shenfu Decoction and its combination. **Methods** With Langendorff cardiac infusion, the single ventricular myocardial cell with acute enzymolysis approach was acquired and the voltage current of L type calcium channel was recorded with whole cell patch technique. **Results** The active ginsenosides Re (3, 10, 30, and 100 μmol/L), and Rg₁ (10 and 100 μmol/L) can reversibly reduce L type calcium current in a dose dependant manner, Rb₁ (10 and 100 μmol/L) has no effect on L type calcium current; the active component aconine (10 and 100 μmol/L) of aconite could irreversibly enhance L type calcium current in a dose dependant manner; The combination of ginsenosides Re (20 μmol/L) and Rg₁ (80 μmol/L) also reduced the L type calcium current, which is more significant than either ginsenosides Rg₁ and Re; The inhibitory rate of the combination of ginsenosides Rg₁, Re and aconine (100 μmol/L) has no difference from the combination of ginsenosides Rg₁ and Re. **Conclusion** The active component ginsenosides Rg₁ and Re of Shenfu Decoction can reduce the L type calcium current, while aconine can irreversibly enhance the L type calcium current; The combination of ginsenosides Rg₁ and Re can obviously increase the reduction of L type calcium current, while the combination of ginsenosides Rg₁, Re and aconine can not change the reduction of L type calcium current.

Key words: Shenfu Decoction; ginsenosides; aconine; component compatibility; L type calcium channel

收稿日期: 2014-03-06

基金项目: 教育部中央高校基金项目 (JYBZZ-JS005); 教育部留学回国人员科研启动基金

作者简介: 杨 勇, 博士, 主要研究方向为历代名医组方思路及名方配伍规律的理论与实验研究。Tel: (010)64286992 E-mail: yymark@aliyun.com

*通信作者 吴晓丹, 博士, 主要研究方向为历代名方配伍的理论与实验研究。Tel: (010)64286992 E-mail: wutun3182@163.com

参附汤出自明代《济生续方》，由人参、附子组成，能益气回阳固脱，治疗元气大亏、阳气暴脱证，见四肢厥冷、冷汗淋漓、呼吸微弱、脉微欲绝，《医宗金鉴·删补名医方论·卷一》谓：“补后天之气无如人参，补先天之气无如附子，此参附汤之所由立也，……二药相须，用之得当，则能瞬息化气于乌有之乡，顷刻生阳于命门之内，方之最神捷者也”。此方被历代医家用于各种疾病过程中出现阳气暴脱危候的抢救，挽救垂危。现今临床上对休克^[1]、多种心脏疾病如心肌梗死、心衰及心律失常都有较好的临床疗效^[2]，由参附汤经过现代工艺提取的参附注射液不仅能够治疗各种快速心律失常，也能治疗各种慢性心律失常^[3]，但治疗心律失常的机制还不清楚。心律失常是心脏电活动的异常造成的，而心脏的电活动与心肌细胞的离子通道关系密切^[4]。前期的研究发现参附汤经过现代工艺提取的参附注射液对大鼠心肌细胞 L 型钙通道电流有浓度依赖性阻断作用^[5]，L 型钙通道是参与心肌细胞兴奋、传导功能的重要离子通道，为了进一步分析参附汤有效组分的作用，探讨其治疗心律失常的离子通道机制，本实验分别以参附汤中人参的有效组分人参皂苷 Re、Rg₁ 和 Rb₁ 及附子的有效组分乌头原碱配伍，观察及分析参附汤不同组分配伍对大鼠离体心肌细胞 L 型钙通道的影响，初步探讨参附汤治疗心脏疾病的物质基础及作用机制。

1 材料

1.1 药品与试剂

人参皂苷 Rg₁ (质量分数 98%，批号 20080106)、Rb₁ (质量分数 98%，批号 20081722)，天津一方科技有限公司；人参皂苷 Re (质量分数 88.8%，批号 110754-200822)，中国食品药品检定研究院；乌头原碱 (质量分数 98%，批号 20101372)，四川维克奇生物科技有限公司，配液所需药品除指定外皆由英国 Alfa Aesar 公司购置。

无钙台氏液组成 (mmol/L)：NaCl 140、KCl 5.4、MgCl₂ 1、NaH₂PO₄ 0.33、Hepes 10 (pH 7.4 NaOH)、葡萄糖 10；KB 液组成 (mmol/L)：KOH 70、KCl 40、MgCl₂ 3、KH₂PO₄ 20、牛磺酸 20、谷氨酸 50、EGTA 0.5、葡萄糖 10 (pH 7.4)、Hepes 10；细胞外液组成 (mmol/L)：台氏液 (无钙台氏液 + CaCl₂ 1.8)；电极内液组成 (mmol/L)：CsCl 140、MgCl₂ 2、CaCl₂ 1、Na₂ATP 5、EGTA 11、Hepes 10 (pH 7.2)。

1.2 动物

雄性 SD 大鼠，体质量 (180±10) g，由北京维通利华实验动物养殖场提供，合格证号 SCXK (京) 2006-0009。

1.3 仪器

HEKA EPC10 膜片钳放大器 (德国 Heka 公司)，DMIRB TL LEICA 倒置相差显微镜 (德国 Leica 公司)，SD MX7600 精密位操作器 (美国 SD 公司)，PULL—100 程控控制仪 (美国 Sutter 公司)，PERI—STAR 蠕动泵 (美国 WPI 公司)，WC/0905 超级恒温水浴 (重庆实验仪器厂)，PULL PURELAB PLUS 纯水机 (英国 ELGA 公司)，DELTA 320 pH 计、METTLER AE 240 电子天平 (瑞典梅特勒-托利多公司)。

2 方法

2.1 心肌细胞的分离

取 SD 大鼠，10%乌拉坦腹腔麻醉，立即开胸取出心脏，置于 0 °C 无钙台氏液中剥离出主动脉，悬挂于 Langendorff 心脏灌流装置上，确保管口不超过主动脉的心脏入口，棉线固定，行主动脉逆行灌流，整个过程灌流液维持温度在 (37±1) °C，灌流液中充纯氧气，流量为 7~8 mL/min。心肌细胞的分离采用简易的 Langendorff 灌流装置，采用恒流方式，先以无钙台氏液灌流 5 min，然后用含 0.4 mg/mL 胶原酶 II (worthington)、0.03 mg/mL 蛋白酶 XIV (Sigma)、0.9 mg/mL 牛血清白蛋白 (Sigma) 的低钙台氏液 (CaCl₂ 0.05 mmol/L) 灌流 19~24 min，最后用低钙台氏液 (CaCl₂ 0.4 mmol/L) 灌流 5 min，取心肌组织在 KB 液中剪碎，反复吹打，用 100 目筛网滤过后，令单离的心肌细胞的存活率保持在 70% 以上，耐钙的心肌细胞保持在 30% 以上，满足了膜片钳实验的要求。将分离的心肌细胞保存在 KB 液中，4 °C 低温保存。

2.2 膜片钳实验

使用 PULL—100 电极控制仪控制电极，将玻璃电极充电极内液后阻抗达到 2~4 MΩ。吸数滴细胞悬液加入细胞池中，待细胞贴壁后选择杆状、表面光滑、纹理清晰的心肌细胞，操作三维操纵器移动电极贴近目标细胞，轻压在细胞表面，稍加负压即可形成 1 GΩ 水平以上的高阻抗封接，然后以较大负压吸破细胞膜，形成全细胞记录形式。采用全细胞膜片钳方法，细胞外液使用普通的台氏液，L 型钙通道 15 min 内自发衰减幅度为 (34±23) %

($n=10$); 如果在普通的台氏液中加入 $400\ \mu\text{mol/L}$ Ba^{2+} 后, L 型钙通道 $15\ \text{min}$ 内自发衰减幅度减至 $(5.8\pm 8.6)\%$ ($n=9$); 采用穿孔膜片钳方法衰减幅度减至 $(2.7\pm 3.4)\%$ ($n=9$)。因此加 Ba^{2+} 的全细胞膜片钳和穿孔膜片钳技术可以用来记录心肌细胞的 L 型钙通道电流。实验过程由 Pulse 刺激采集软件控制, 经 EPC10 膜片钳放大器, 通过模数转换采集数据, 并存放于计算机硬盘以供后续分析。

2.3 加药处理

本实验考察人参皂苷 Re、 Rg_1 、 Rb_1 单用, 人参皂苷 Re 与 Rg_1 合用, 人参皂苷 Re、 Rg_1 与乌头原碱合用对心肌细胞 L 型钙通道电流的影响。将相应浓度的药物在台氏液中配制成目标浓度, 经灌流泵直接灌流至细胞槽内, 灌流 $15\ \text{min}$ 后采用台氏液洗脱。采用同一细胞观察给药前后的电流变化,

每一数据至少在 4 个细胞上重复。

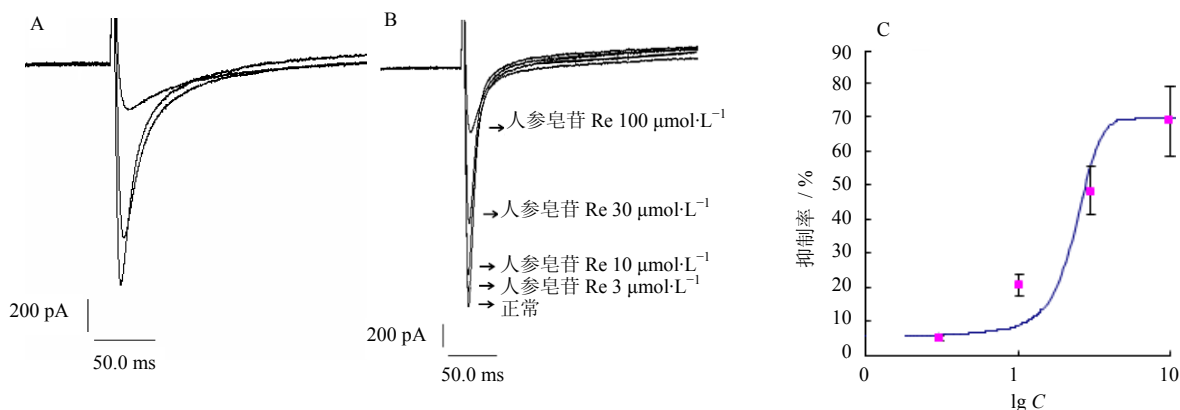
2.4 数据处理

采用同一细胞用药前后钙离子电流数值对照, 以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 SPSS 13.0 软件对获得数据用成对 t 检验进行统计分析。

3 结果

3.1 人参皂苷 Re 对 L 型钙通道电流的作用

人参皂苷 Re 能够可逆性地阻断钙通道电流(图 1-A), 给予不同浓度人参皂苷 Re 后 L 型钙通道电流幅度呈现随药物浓度增加逐渐减小的趋势(图 1-B), 经过统计 3 、 10 、 30 、 $100\ \mu\text{mol/L}$ 人参皂苷 Re 对通道电流幅度的抑制率分别为 $(5.2\pm 4.7)\%$ ($n=3$)、 $(20.4\pm 13.3)\%$ ($n=4$)、 $(48.3\pm 4.7)\%$ ($n=3$)、 $(68.8\pm 9.5)\%$ ($n=6$)。对量效关系进行拟合绘制量效曲线(图 1-C), 求得 IC_{50} 为 $25\ \mu\text{mol/L}$ 。



A- $100\ \mu\text{mol/L}$ 人参皂苷 Re 的抑制作用(洗脱后电流恢复) B-不同浓度的人参皂苷 Re 对同一个细胞的作用 C-人参皂苷 Re 的量效曲线
A-inhibition of ginsenoside Re ($100\ \mu\text{mol/L}$) (current recovery after elution) B-inhibition of ginsenoside Re at different concentration on same cell
C-concentration-response curve of ginsenoside Re

图1 人参皂苷 Re 对心肌细胞 L 型钙通道电流的作用

Fig. 1 Effect of ginsenoside Re on L type calcium channel current of ventricular myocytes

3.2 人参皂苷 Rg_1 对 L 型钙通道电流的影响

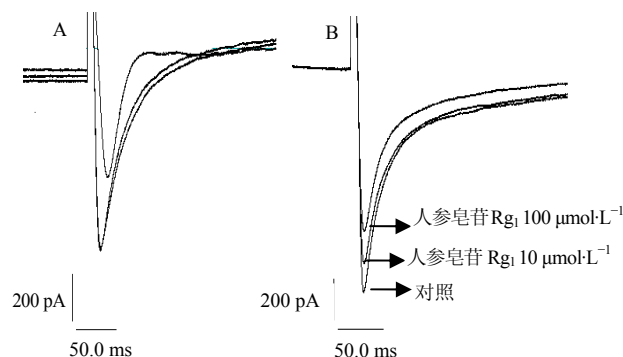
人参皂苷 Rg_1 能够可逆性地阻断 L 型钙通道电流(图 2-A), 给予人参皂苷 Rg_1 高、低浓度(100 、 $10\ \mu\text{mol/L}$)后 L 型钙通道电流幅度随药物浓度增加逐渐减小(图 2-B), 经过统计 10 、 $100\ \mu\text{mol/L}$ 人参皂苷 Rg_1 对 L 型钙通道电流幅度的抑制率分别为 $(11.0\pm 3.2)\%$ ($n=3$)、 $(33.7\pm 15.8)\%$ ($n=3$)。

3.3 人参皂苷 Rb_1 对 L 型钙通道电流的影响

人参皂苷 Rb_1 (10 、 $100\ \mu\text{mol/L}$) ($n=7$) 对 L 型钙通道电流幅度无明显影响(图 3)。

3.4 乌头原碱对 L 型钙通道电流的影响

乌头原碱能够不可逆地增强 L 型钙通道电流, 给予乌头原碱高、低浓度(100 、 $10\ \mu\text{mol/L}$)后 L



A- $100\ \mu\text{mol/L}$ 人参皂苷 Rg_1 的抑制作用(洗脱后电流恢复)
B-2 个浓度的人参皂苷 Rg_1 对同一个细胞的作用
A-inhibition of ginsenoside Rg_1 ($100\ \mu\text{mol/L}$, current recovery after elution)
B-inhibition of ginsenoside Rg_1 at two different concentration on same cell

图2 人参皂苷 Rg_1 对 L 型钙通道电流的作用

Fig. 2 Effect of ginsenoside Rg_1 on L type calcium channel current

型钙通道电流幅度随药物浓度增加逐渐增大(图4), 经过统计 10、100 $\mu\text{mol/L}$ 乌头原碱对 L 型钙通道电流幅度的增加率分别为 $(6.8 \pm 0.6) \%$ ($n=3$)、 $(21.2 \pm 7.6) \%$ ($n=3$)。

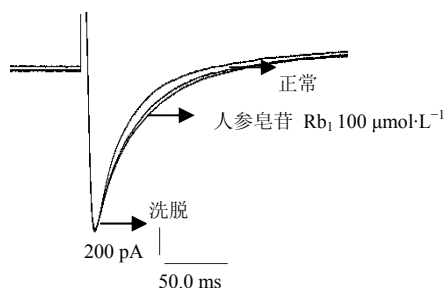


图3 人参皂苷 Rb_1 ($100 \mu\text{mol/L}$) 对 L 型钙通道电流的影响
Fig. 3 Effect of ginsenoside Rb_1 ($100 \mu\text{mol/L}$) on L type calcium channel current

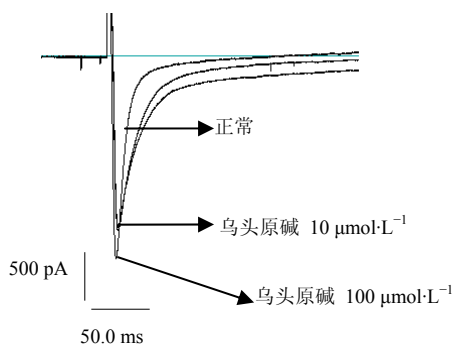


图4 乌头原碱 (10、100 $\mu\text{mol/L}$) 对 L 型钙通道电流的影响
Fig. 4 Effect of aconine (10 and $100 \mu\text{mol/L}$) on L type calcium channel current

3.5 人参皂苷 Re 、 Rg_1 和乌头原碱联合使用对 L 型钙通道电流的影响

3.5.1 人参皂苷 Re 和 Rg_1 联合使用的效果 人参皂苷 Re ($20 \mu\text{mol/L}$) 和 Rg_1 ($80 \mu\text{mol/L}$) 联合使用对 L 型钙通道电流的抑制率为 $(30.2 \pm 8.6) \%$ ($n=6$), 而单独使用人参皂苷 Re ($20 \mu\text{mol/L}$) 和 Rg_1 ($80 \mu\text{mol/L}$) 对 L 型钙通道电流的抑制率分别为 $(20.5 \pm 9.2) \%$ ($n=6$) 和 $(18.2 \pm 3) \%$ ($n=4$), 经 t 检验联合使用组与各单用组差异显著 ($P < 0.05$)。因此, 联合使用的抑制作用要强于单独使用人参皂苷 Re 和 Rg_1 的作用。图 5 显示单独和联合使用人参皂苷 Re 和 Rg_1 时同一细胞 L 型钙通道电流曲线的变化。

3.5.2 人参皂苷 Re 、 Rg_1 和乌头原碱联合使用的效果 在人参皂苷 Re 、 Rg_1 的基础上加入乌头原碱

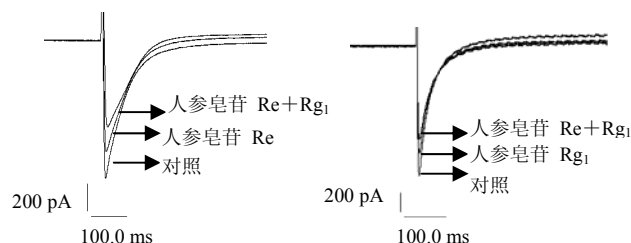
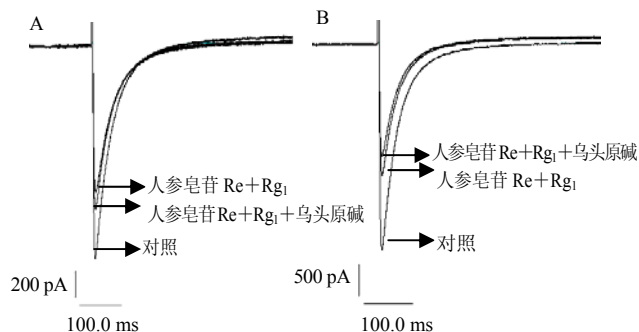


图5 单独及联合使用人参皂苷 Re 和 Rg_1 对 L 型钙通道电流的影响

Fig. 5 Effect of single ginsenoside Re and combination of Re and Rg_1 on L type calcium channel current

($100 \mu\text{mol/L}$) 后, 观察的心肌细胞中其中 3 个细胞表现出乌头原碱对人参皂苷 Re 和 Rg_1 配伍的抑制作用具有轻微的减弱效应, 另外 3 个细胞表现出乌头原碱对人参皂苷 Re 和 Rg_1 配伍的抑制作用具有轻微的增强效应。经统计 3 个成分配伍对 L 型钙通道电流的抑制率为 $(31.7 \pm 4.3) \%$ ($n=6$), 经 t 检验, 3 种成分配伍与 2 种成分配伍之间差异不显著 ($P > 0.05$)。图 6-A 显示 1 例 3 种成分配伍对 2 种成分配伍的减弱效应, 图 6-B 显示 1 例 3 种成分配伍对 2 种成分配伍的增强效应。



A-人参皂苷 Re 、 Rg_1 和乌头原碱配伍略减弱了人参皂苷 Re 和 Rg_1 配伍对 L-型钙通道的抑制作用 B-人参皂苷 Re 、 Rg_1 和乌头原碱配伍略增强了人参皂苷 Re 和 Rg_1 配伍对 L 型钙通道的抑制作用

A-combination of ginsenosides Re , Rg_1 and aconine could slightly reduce the inhibition of L type calcium channel current compared with the combination of ginsenosides Re and Rg_1 B-combination of Rg_1 , Re and aconine could slightly enhance the inhibition on L-type calcium channel current compared with the combination of ginsenosides Re and Rg_1

图6 人参皂苷 Re ($20 \mu\text{mol/L}$)、 Rg_1 ($80 \mu\text{mol/L}$) 和乌头原碱 ($100 \mu\text{mol/L}$) 联合使用对 L 型钙通道电流的影响
Fig. 6 Effect of combination of ginsenosides Re ($20 \mu\text{mol/L}$), Rg_1 ($80 \mu\text{mol/L}$) and aconine ($100 \mu\text{mol/L}$) on L type calcium channel current

4 讨论

本研究在前期研究的基础上,对参附汤中人参和附子的有效组分人参皂苷 Rg_1 、 Re 、 Rb_1 及乌头原碱影响 L 型钙通道电流的作用进行了研究,并结合方剂学中配伍理论的指导,对人参和附子的有效组分配伍影响 L 型钙通道的作用也进行了研究,结果表明参附汤有效组分人参皂苷 Rg_1 、 Re 抑制 L 型钙通道的电流,而乌头原碱对 L 型钙通道有不可逆的增强作用;人参皂苷 Rg_1 、 Re 配伍对 L 型钙通道电流的抑制作用比各组分单用的抑制作用增强,乌头原碱与人参皂苷 Rg_1 、 Re 配伍后对人参皂苷 Rg_1 和 Re 对 L 型钙通道的抑制作用无明显影响。研究表明能够阻滞钙通道效应的药物参与缩短心肌细胞动作电位平台期的时程,降低心肌细胞内钙离子浓度,进而降低钙超载引起的各种心律失常^[6]。受体调节学说认为 L 型钙通道具有静息、激动和失活 3 种状态,参附注射液具有减慢 L 型钙通道从失活状态恢复正常的特点,而参附注射液中人参皂苷 Rg_1 和 Re 是抑制 L 型钙通道的主要组分,可以使通道恢复到静息态的量减少,有可能是针对快速型心律失常有效的机制之一,而乌头原碱通过增强 L 型钙通道电流,可以增强心肌细胞的兴奋性和传导性,从而对抗缓慢性心律失常。心律失常涉及多个离子通道功能的异常,而越来越多的研究表明:中药治疗心律失常的机制也不仅仅限于调控某一个离子通道,而是对心律失常时多个离子通道功能的综合调控。本研究中,附子的有效组分乌头原碱能够不可逆地增强 L 型钙通道电流,而和人参皂苷 Rg_1 、 Re 配伍应用后,对人参皂苷 Rg_1 、 Re 对 L 型

钙通道电流抑制作用总体上无明显影响,但在不同细胞表现出增强或减弱人参皂苷 Rg_1 、 Re 配伍对 L 型钙通道的抑制,这可能和实验标本数量较少,细胞的个体反应差异有关,有待进一步通过加大样本量进行观察,同时从另一方面表明将具有钙通道兴奋效应的乌头原碱与抑制效应的两个成分配伍后无明显拮抗作用出现,甚至出现加合作用,这样部分组分间的作用不能完全体现整体的配伍作用。有研究表明人参皂苷 Re 除了能够调控 L 型钙通道,对钠、钾通道也有调节作用^[7];因此,参附汤有效组分调控心律失常的离子通道机制是多元和综合的作用,其机制有待进一步探索。

参考文献

- [1] 赵光树,周丽娜. 参附汤源流发展和临床应用 [J]. 中成药, 2000, 22(6): 440-442.
- [2] 曹俊,闵苏. 参附注射液用于心血管系统疾病的研究进展 [J]. 中国医刊, 2005, 40(1): 32-33.
- [3] 杨芳炬,尹华虎,林代平,等. 参附注射液对动物心律失常的影响 [J]. 华西药学杂志, 2001, 16(5): 345-347.
- [4] Lim P B, Robb D, Lambiasi P D. Electrophysiology and ablation of arrhythmias [J]. *Br J Hosp Med*, 2012, 73(6): 312-318.
- [5] 吴晓丹,孟红旭,张林,等. 参附注射液对大鼠心室肌细胞 L 型钙通道的影响 [J]. 中医药信息, 2011, 28(6): 55-58.
- [6] 闫福曼,周乐全,康亚丽. 参附注射液对阿霉素致心肌细胞钙超载的影响 [J]. 广州中医药大学学报, 2008, 25(4): 339-342.
- [7] 孟红旭,姚明江,刘建勋. 人参皂苷 Re 对大鼠心室肌细胞钠、钾离子通道的影响 [J]. 世界中医药, 2013, 8(10): 1147-1149.