

粉防己碱对犬心浦氏纤维慢内向电流的作用

王 钢 宗贤刚 方达超 江明性 吕富华

(同济医科大学药理教研室, 武汉)

提要 应用双微电极电压钳技术, 观察粉防己碱(Tet)对犬心脏浦氏纤维细胞的慢内向电流(I_{si})的影响, 发现Tet对 I_{si} 的峰值有明显减弱作用。Tet的这种效应呈剂量及时间依赖性。当Tet浓度为30 $\mu\text{mol/L}$ 和100 $\mu\text{mol/L}$, 给药后10 min时, I_{si} 的峰值分别由给药前的 $47.9 \pm 5.6 \text{ nA}$ 和 $38.4 \pm 21.5 \text{ nA}$ 降至 $21 \pm 7.8 \text{ nA}$ 和 $6.3 \pm 7.7 \text{ nA}$, P值均小于0.01。Tet 100 $\mu\text{mol/L}$ 对由二价阳离子 Sr^{2+} 所介导的 I_{si} 亦有明显的抑制作用。结果提示Tet是一慢通道阻滞剂。

关键词 电压钳技术; 慢内向电流; 心脏浦氏纤维; 粉防己碱; 慢通道阻滞剂

粉防己碱(tetrandrine, 简称Tet)为防己科植物粉防己(*Stephania tetrandra* S.Moore)的主要生物碱, 其降血压作用业经临床证实⁽¹⁾。前曾报道Tet对猫心乳头状肌⁽²⁾, 兔心房⁽³⁾, 及主动脉条⁽⁴⁾等心血管方面的作用, 发现Tet可使心肌收缩力降低, 心动频率减慢, 使兴奋-收缩脱耦联以及松弛血管平滑肌。Tet对豚鼠左心房肌收缩力有频率依赖性 & 膜电位依赖性的抑制作用⁽⁵⁾。Tet可明显缩短豚鼠心乳头状肌细胞动作电位时程, 对慢反应动作电位幅度和时程均有明显抑制作用⁽⁶⁾。Tet的上述作用与慢通道阻滞剂维拉帕米(verapamil, 简称Ver)的效应极相似, 提示Tet可能是慢通道阻滞剂。

为了进一步确定Tet是否为一慢通道阻滞剂, 本文应用双微电极电压钳技术, 引导出犬心脏浦氏纤维(Purkinje fiber, 简称PF)的慢内向电流(slow inward current, 简称 I_{si})并观察Tet对 I_{si} 的影响。

材 料 与 方 法

杂种犬, 雌雄兼用, 体重7~15 kg, 击其头部致死后立即开胸取出心脏, 置入氧饱和的Tyrode液中, 洗去余血后剪开左、右心室, 剪取直径为0.2~0.8 mm的游离PF。

按Aronson报道的方法⁽⁷⁾, 将PF排列在灌流浴槽地板上, 用直径为0.2 mm的不锈钢丝栅将PF压断成为1~1.6 mm长的短段备用。

按Kass报道的方法进行双微电极电压钳⁽⁸⁾。待Tyrode液灌流标本1 h以上后, 受压的PF断端处可恢复愈合, 成为电学上相互不连通的高阻抗区。分别用两根充有3 mol/L KCl液的玻璃微电极插入同段PF的细胞内, 其中一根为注入电流电极(电阻8~12 M Ω)插入PF短段中央处; 另一根为记录电位电极(电阻10~25 M Ω), 插在旁中央0.3~0.5 mm处。参比电极由尖端塞以石棉的玻管电极制成, 也充以3 mol/L KCl液, 要求阻值低且稳定, 与记录电位电极共同监视膜电位。所有引导电极均采用Ag/AgCl细丝。灌流浴槽为浮地式, 灌流容积不超过1 ml, 灌流速度为3.5~5 ml/min。

电压钳放大器是MVC-2型电压钳仪(上海生理研究所生产), 三通道刺激器为BMS-8303刺激器(上海华阳电子仪器厂生产)。细胞的跨膜电位和电流用SBR-1型示波器监视, 并照相记录。

先使跨膜电位保持在控制电位(holding potential, 简称 E_h) -40 mV, 然后给予宽宽(T_c)为500 ms的指令电位(commande potential, 简称 E_c) -15 mV, 钳制数秒后可记录到一稳态的慢内向电流, 即 I_{si} 。当Tyrode液中的1.8 mmol/L Ca^{2+} 被5.4 mmol/L 铯离子(Sr^{2+})所代替, 用铯离子(Cs^+)抑制外向钾电流(I_{Kout})

时,可获得更纯净、且幅度较大的 I_{si} 。

Tyrode 液的成分如下: NaCl 147 mmol/L, KCl 5.4 mmol/L, CaCl₂ 1.8 mmol/L, MgCl₂ 1.05 mmol/L, glucose 11 mmol/L, HCl-Tris 10 mmol/L, 通以 100% O₂, pH=7.2~7.4, 恒温 36±0.5°C。当采用含 Sr²⁺ 的 Tyrode 液时,成分改变为, NaCl 124 mmol/L, CsCl 20 mmol/L, SrCl₂ 5.4 mmol/L, MgCl₂ 0.5 mmol/L, glucose 11 mmol/L, HCl-Tris 10 mmol/L。

药品: Tet, 粉剂, 浙江金华制药厂生产, Ver, 注射液, 5 mg/2 ml, 天津和平制药厂生产; 异丙肾上腺素(isoproterenol, 简称 Iso), 注射液, 1 mg/2 ml, 北京制药厂生产。

结 果

一. 犬心脏 PF 细胞膜 I_{si} 的测定

使犬心 PF 段 E_H 为 -40 mV, E_C 为 -15 mV, T_C 为 500 ms 时,在钳制起始的 100ms 内,可观察到一缓慢的内向离子流,该电流包括激活和失活两个时相,激活相比较快,失活相则较慢,可被认为是 I_{si} 。

为了证明本文所观察到的这一内向电流确系 I_{si} ,特进行了细胞外液中的不同 Ca²⁺ 浓度以及钙通道阻滞剂和激活剂对该电流影响的实验,表明这一电流可随 Tyrode 液中 Ca²⁺ 浓度的升高和减低而增减(图 1); 儿茶酚胺类药 Iso 2 μmol/L 有增加 I_{si} 峰值的作用(图 1); 而钙通道阻滞剂 Ver 10 μmol/L 和二价阳离子钴(Co²⁺) 则有明显减弱 I_{si} 峰值的作用(图 2)。这与文献^(9,10)报道的结果一致。

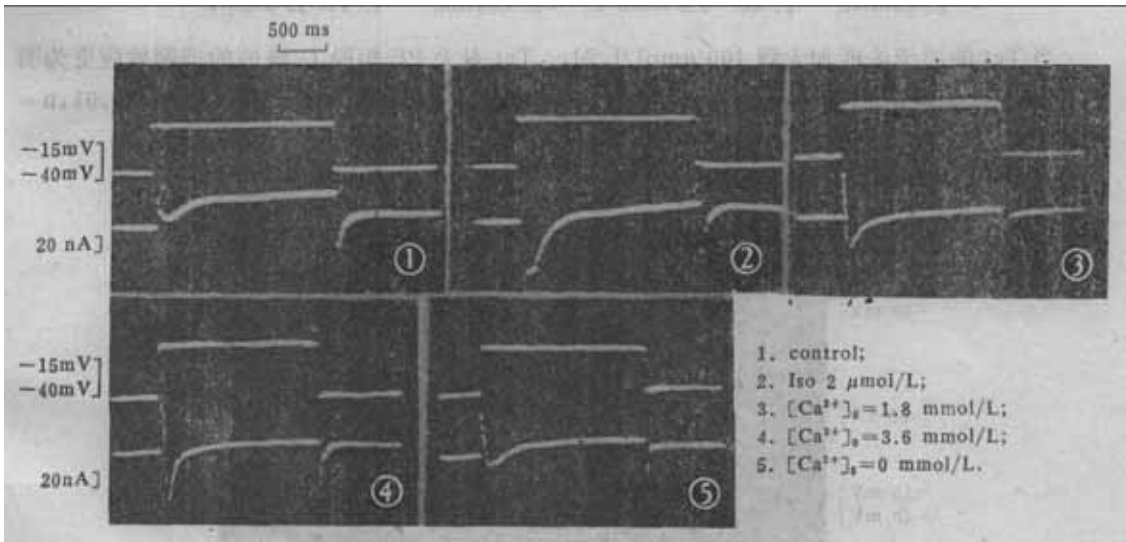


Fig 1. The changes of the peak values of I_{si} in canine cardiac Purkinje fiber bundles with the treatment of Iso and with the increase and decrease of $[Ca^{2+}]_o$.

二. 对犬心脏 PF 短段 I_{si} 的作用

分别用含不同浓度的 Tet(10, 30, 100 μmol/L) 的 Tyrode 液灌流一定时间后,发现 Tet 可呈依剂量和依时间性地抑制犬心 PF 的 I_{si} 峰值。当加入较低浓度的 Tet 10 μmol/L 灌流 10 min 时, I_{si} 峰值无明显的减弱,仅降低了 4.5%, (2.2 ± 2.8 nA), $p > 0.05$, $n = 4$ (图 5)。

当 Tet 浓度增至 $30\mu\text{mol/L}$ ，给药后 5min 时， I_{si} 的峰值明显减小，从给药前的 $47.9 \pm 5.6\text{nA}$ 降到 $39 \pm 8.8\text{nA}$ ， $p < 0.05$ ；给药后 10min 时，降至 $21 \pm 7.8\text{nA}$ ， $p < 0.01$ ， $n = 4$ (图 3,5)。

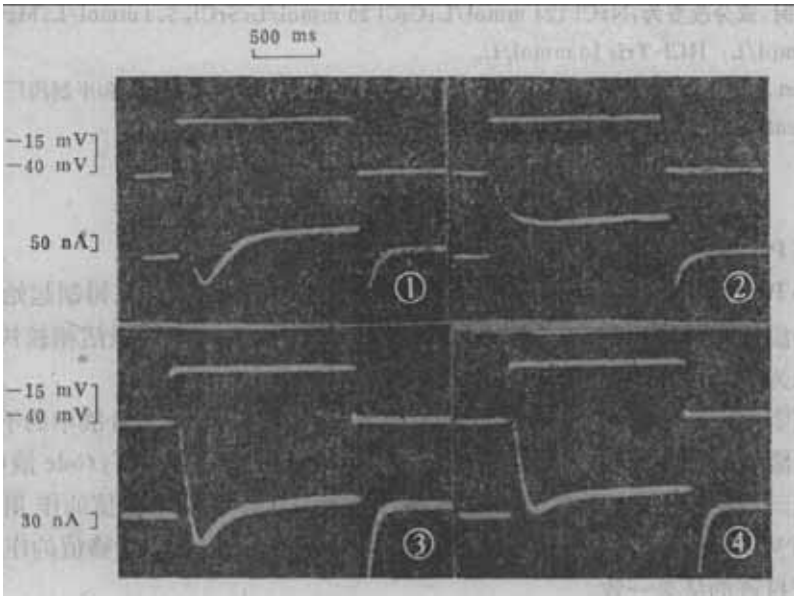


Fig 2. inhibiting actions of slow channel blockers Co^{2+} and Ver on the peak values of I_{si} in canine cardiac Purkinje fibers.

1. Control; 2. Co^{2+} 0.8 mmol/L; 3. Control; 4. Ver 10 $\mu\text{mol/L}$

当 Tet 的灌流浓度加大到 $100\mu\text{mol/L}$ 时，Tet 对犬 PF 短段 I_{si} 峰值的抑制效应更为明显。加入 Tet 10 min 后， I_{si} 的峰值由给药的 $38.4 \pm 21.5\text{nA}$ 减至 $6.3 \pm 7.7\text{nA}$ ， $p < 0.01$ ， $n = 4$ (图 3,5)。

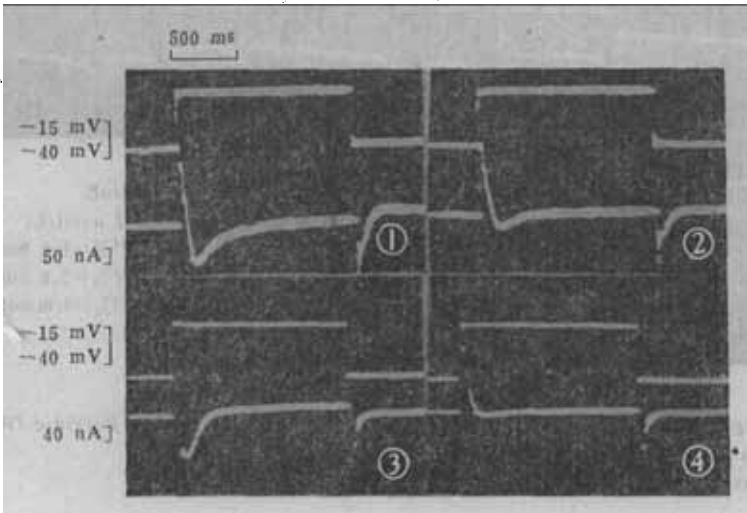


Fig 3. influences of Tet 30 $\mu\text{mol/L}$ and 100 $\mu\text{mol/L}$ on the peak values of I_{si} after treated with Tet for 10 min

1. Control; 2. Tet 30 $\mu\text{mol/L}$; 3. Control; 4. Tet 100 $\mu\text{mol/L}$.

另外，用含有 5.4mmol/L Sr^{2+} 的 Tyrode 液灌流犬心 PF 所记录的 I_{si} ，亦可被 $100\mu\text{mol/L}$ 浓度的 Tet 所抑制。给药后 10 min 时， Sr^{2+} 诱导的 I_{si} 峰值明显减小，在三例样本中，所测的 I_{si} 峰值由给药前的 $188 \pm 33.6\text{nA}$ 降至 $59 \pm 29.7\text{nA}$ ， $p < 0.01$ (图 4) 2

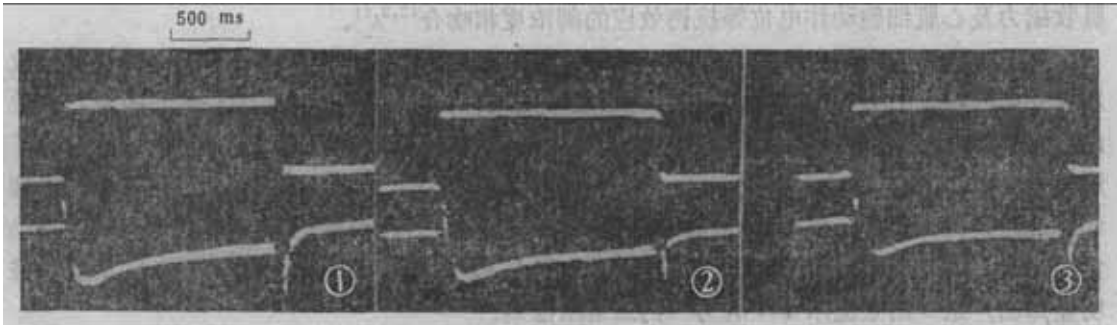


Fig 4. Effect of Tet 100 $\mu\text{mol/L}$ on Sr^{2+} -induced I_n in canine cardiac Purkinje fiber.

1. Control; 2. Treated with Tet 100 $\mu\text{mol/L}$ for 5 min;
3. Treated with Tet 100 $\mu\text{mol/L}$ for 10 min.

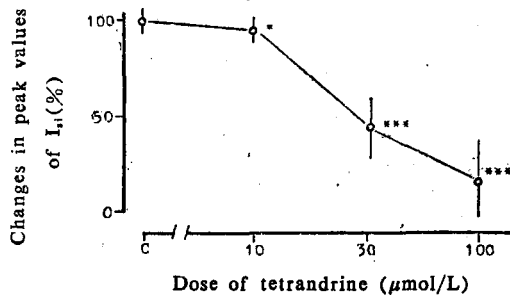


Fig 5. Dose-response curve relating to the effects of Tet on the peak values of I_n in canine cardiac Purkinje fibers, shown in percentage after perfused with Tet at every dose for 10 min. ($\bar{X} \pm \text{SD}$, $n=4$) * $p > 0.05$; ** $p < 0.05$; *** $p < 0.01$

讨 论

Reuter 等认为高 K^+ 或 TTX 处理后的心肌慢反应电位虽是说明 I_n 变化的有效方法, 但还是掺有 g_{Na} 和 g_{K} 等电导的变化, 亦不是精确定量的分析手段。尽管电压钳方法困难, 但它是目前仅次于斑片钳技术而可以常规研究 I_n 的方法⁽¹¹⁾。据此, 本文采用了双微电极电压钳技术, 观察 Tet 对 I_n 的作用。

Weidmann 测定 PF 的空间常数 λ 为 2 mm。 λ 是指跨膜电位从注入电流部位起沿着具有电缆特性的纤维传布, 下降了原电位三分之一值时所需的距离⁽¹²⁾。本文实验所制备的 PF 最长段为 1.6mm, 即注入电流电极距两端最长距离为 0.8 mm, 两端电位最多仅下降了 13.2%, 基本上保证了 PF 钳压的一致性。

当 E_H 为 -40 mV 时, 心肌细胞膜上钠通道失活, 而钙通道处于备活状态, 再当 E_c 达到一定水平 (-30 ~ +10mV), 钳制的时间足够长时, 可记录到 I_n ⁽¹³⁾。本文首先观察了不同的外 Ca^{2+} 浓度、 β -受体激动剂 Iso、慢通道阻滞剂 Ver 以及 Co^{2+} 对犬心 PF 短段 I_n 峰值的影响, 结果均表明在本文实验条件下所记录的 I_n 是一经慢通道的内向离子流。

在给 Tet 后 10 min 时, 30 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 对犬心 PF 的 I_n 峰值均有明显的减弱作用。由于心肌 I_n 峰值的变化决定于流经膜上钙通道的钙离子的多少⁽⁹⁾, 因此, Tet 减弱 I_n 峰值的作用可以归因于该药对心肌钙通道的阻滞效应。文中结果表明, Tet 10 $\mu\text{mol/L}$ 对犬心 PF 的 I_n 无明显影响, 而增至 30 $\mu\text{mol/L}$ 时表现有明显抑制效应, 这与前曾报道的 Tet 明显抑制心

肌收缩力及心肌细胞动作电位等抗钙效应的阈浓度相吻合^(2,3,6)。

由于心肌细胞内钙离子的浓度可正反馈地调节细胞膜的钙电导,亦可影响继钙通道开放后的外向钾电流 $I_{K, out}$, 而 $I_{K, out}$ 的激活可紧随 I_{Ca} 之后, 两者相继出现不易区分, 因此, 仅考虑药物对 Ca^{2+} 所介导的 I_{Ca} 的影响可能会导致对药物效应机理进行错误的判断^(14,15)。为了解决这一问题, 本文用 Sr^{2+} 代替 Tyrode 液中的 Ca^{2+} , 介导犬心 PF 的 I_{Ca} , 同时用 Cs^+ 抑制钾通道, 由此所记录到的 I_{Ca} 可单纯地反映心肌细胞膜上钙通道的开闭, 更有利于直接确定药物对钙通道的作用⁽¹⁴⁾。Tet 100 $\mu\text{mol/L}$ 加入 10 min 后, 由 Sr^{2+} 所介导的 I_{Ca} 的峰值被明显抑制, 这一结果提示 Tet 确为一钙通道阻滞剂。

致谢 比利时 Leuven 大学生理研究室 Edward Carmeliet 教授对本文予以技术支持和帮助。

参 考 文 献

1. Department of Pharmacology, Wuhan Medical College. A clinical study of antihypertensive effect of tetrandrine. *Chin Med J (Eng)* 1979, 92:193.
2. 金满文, 等. 粉防己碱对异丙肾上腺素及氯化钙的正性肌力作用和心肌兴奋-收缩偶联的影响. 中国药理学报 1981, 3:96.
3. 方达超, 等. 粉防己碱对异丙肾上腺素及氯化钙在离体兔心所致正性频率作用的影响. 同上 1982, 3:233.
4. Hu WS, et al. Mode of action of tetrandrine on vascular smooth muscle. *J Tradit Chin Med* 1983, 3:7.
5. 王钢, 等. 粉防己碱对豚鼠左心房正性梯级现象和静息后增强效应的影响. 中国药理学报 1987, 8:522.
6. 宗贤刚, 等. 粉防己碱对豚鼠心乳头肌动作电位和收缩力的影响. 同上 1983, 4:258.
7. Aronson RS, et al. A new method for producing short cardiac Purkinje fibers suitable for voltage clamp. *J Appl Physiol* 1973, 34:527.
8. Kass RS, et al. Three-microelectrode voltage clamp experiments in calf cardiac Purkinje fibers: Is slow inward current adequately measured? *J Physiol (Lond)* 1979, 290:201.
9. 徐有秋, 等. 普罗帕酮对心肌慢反应动作电位和慢内向离子流的作用. 中国药理学报 1986, 7:138.
10. Tsien RW, et al. Mechanisms of calcium channel modulation by adrenergic agents and dihydropyridine calcium agonists. *J Mol Cell Cardiol* 1986, 18:691.
11. Reuter H. Electrophysiology of calcium channels in the heart. In: Opie LH, ed. *Calcium antagonists and cardiovascular disease*. 1st ed. New York: Raven Press, 1984:43.
12. Weidmann S. The electrical constants of Purkinje fibers. *J Physiol (Lond)* 1952, 118:348.
13. Noble D. Calcium current and the initiation of contraction. In: Noble D, ed. *The initiation of the heartbeat*. 2nd. ed. Oxford: Clarendon Press, 1979:53.
14. Thomas G, et al. A dihydropyridine (Bay K 8644) that enhances calcium currents in guinea pig and calf myocardial cells. *Cir Res* 1985, 56:87.
15. Isenberg G. Cardiac Purkinje fibers [Ca^{2+}], controls steady state potassium conductance. *Pflugers Arch* 1977, 371:71.

EFFECTS OF TETRANDRINE ON THE SLOW INWARD CURRENTS IN CANINE CARDIAC PURKINJE FIBERS

G Wang, XG Zong, DC Fang, MX Jiang and FH Lu

(Department of Pharmacology, Tongji Medical University, Wuhan)

ABSTRACT Effects of tetrandrine (Tet) on the slow inward currents in canine cardiac Purkinje fibers were studied by using two-microelectrode voltage clamp technique. Tet was shown to inhibit the peak value of the slow inward current (I_{Ca} , PV) in dose-dependent and time-dependent manners. After pretreatment with Tet 30 and 100 $\mu\text{mol/L}$ for 10 min, respectively, the I_{Ca} , PV decreased from 47.9 ± 5.6 nA and 38.4 ± 21.5 nA to 21 ± 7.8 nA and 6.3 ± 7.7 nA ($p < 0.01$). I_{Ca} , PV induced by strontium instead of calcium ions was also significantly reduced after exposure to Tet 100 $\mu\text{mol/L}$. The results suggest that Tet is a slow channel blocker.

Key words Voltage clamp technique; Slow inward current; Cardiac Purkinje fiber; Tetrandrine; Slow channel blocker