

[文章编号] 1000-4718(2009)02-0285-04

# 茶多酚对二氧化硫衍生物引起的心肌细胞钠电流增大效应的抑制作用\*

魏海英, 孟紫强<sup>△</sup>

(山西大学环境医学与毒理学研究所, 山西 太原 030006)

**[摘要]** 目的: 探讨二氧化硫(SO<sub>2</sub>)及其衍生物对心血管系统的作用机制。方法: 采用全细胞膜片钳技术研究了茶多酚(TP)对SO<sub>2</sub>衍生物引起的大鼠心肌细胞钠电流(I<sub>Na</sub>)增大效应的影响。结果: ①加入不同浓度的TP(10、20、50 mg/L)后, SO<sub>2</sub>衍生物引起的增大的I<sub>Na</sub>逐渐减小, TP 50 mg/L时, I<sub>Na</sub>与对照相比无显著差异; ②SO<sub>2</sub>衍生物引起I<sub>Na</sub>激活曲线左移, 但并不显著。而加入50 mg/L TP后, 激活曲线显著恢复; ③TP显著影响钠通道的失活过程。SO<sub>2</sub>衍生物作用前后, 半数失活电压(V<sub>h</sub>)分别为-(71.94 ± 0.23) mV、-(65.79 ± 0.69) mV, n = 8, P < 0.01。加入50 mg/L TP后, V<sub>h</sub>为-(68.64 ± 0.51) mV (n = 8), 与对照相比无显著差异 (P > 0.05), 失活曲线的斜率因子未见改变。结论: TP对SO<sub>2</sub>衍生物引起的心肌细胞I<sub>Na</sub>的增大具有抑制作用, 提示SO<sub>2</sub>衍生物对大鼠心肌细胞的毒性作用主要是通过自由基的氧化损伤实现的。

**[关键词]** 茶多酚; 二氧化硫; 心肌细胞; 钠电流

**[中图分类号]** R363 **[文献标识码]** A

## Tea polyphenols inhibit the incremental effects of sulfur dioxide derivatives on sodium currents in cardiomyocytes

WEI Hai - ying, MENG Zi - qiang

(Institute of Environmental Medicine and Toxicology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China. E-mail: zqmeng@sxu.edu.cn)

**[ABSTRACT]** **AIM:** To probe into the toxicological mechanism of sulfur dioxide (SO<sub>2</sub>) and its derivatives on cardiovascular system. **METHODS:** Effects of tea polyphenols (TP) on the increase in sodium current (I<sub>Na</sub>) induced by SO<sub>2</sub> derivatives in the cardiomyocytes were studied using the whole cell patch-clamp technique. **RESULTS:** ① The increase in I<sub>Na</sub> induced by SO<sub>2</sub> derivatives was inhibited by treating the cells with TP at different concentrations (10, 20 or 50 mg/L) in a dose dependent manner. At concentration of 50 mg/L, TP completely inhibited the increase in I<sub>Na</sub> by SO<sub>2</sub> derivatives. ② SO<sub>2</sub> derivatives led to shift left of the activation curve. After application of TP at dose of 50 mg/L, the curve showed resumed significantly. ③ TP changed the inactivation process significantly. Before and after the application of SO<sub>2</sub> derivatives, the half-inactivation voltage of I<sub>Na</sub> was -(71.94 ± 0.23) mV and -(65.79 ± 0.69) mV (n = 8, P < 0.01). However, after the application of TP, the half-inactivation voltage was -(68.64 ± 0.51) mV (n = 8), without changing the slope factor, but it was not significant compared with the control (P > 0.05). **CONCLUSION:** TP inhibits the incremental effects of SO<sub>2</sub> derivatives on I<sub>Na</sub>, suggesting that the toxicity of SO<sub>2</sub> on cardiomyocytes of rat is induced by free radical.

**[KEY WORDS]** Tea polyphenols; Sulfur dioxide; Cardiomyocytes; Sodium currents

近年来研究表明, 二氧化硫(sulfur dioxide, SO<sub>2</sub>)及其代谢衍生物是全身性毒物, 能够引起哺乳动物组织、细胞及生物大分子等的氧化应激<sup>[1,2]</sup>。流行病学研究表明, 大气中的SO<sub>2</sub>污染与多种心血管

疾病的发病率和死亡率密切相关<sup>[3]</sup>。茶多酚(tea polyphenols, TP)是从茶叶中提取的多酚类物质, 是一种天然的抗氧化剂, 能够清除羟基和过氧化自由基<sup>[4]</sup>, 可以抗氧化、抗癌、抗炎症等<sup>[5]</sup>, 具有多种药用

[收稿日期] 2007-12-21 [修回日期] 2008-05-12

\* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30230310; No. 20477023); 山西省自然科学基金资助项目(No. 20031092)

<sup>△</sup>通讯作者 E-mail: zqmeng@sxu.edu.cn

价值<sup>[6]</sup>,在癌症和心血管疾病的预防方面已经受到了广泛的关注<sup>[7]</sup>。研究表明,SO<sub>2</sub> 衍生物可剂量依赖性增大大鼠心肌细胞的钠、钾、钙电流<sup>[8-10]</sup>,但有关机制方面的研究至今未见报道。本研究采用全细胞膜片钳技术,探讨了 TP 对 SO<sub>2</sub> 衍生物引起的大鼠心肌细胞钠电流增大效应的影响,进而揭示 SO<sub>2</sub> 对心肌细胞离子通道的影响机制及其对心血管系统的毒性作用途径,同时为茶多酚在心血管系统疾病预防与治疗方面的应用提供更多的理论依据。

## 材 料 和 方 法

### 1 动物

Wistar 大鼠,体重 200 - 300 g,雌雄不限,由山西省中医药研究院动物房提供。

### 2 试剂

亚硫酸钠(Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>)、亚硫酸氢钠(NaHSO<sub>3</sub>)、牛磺酸(Tau)、L-谷氨酸(L-Glu)、牛血清蛋白(BSA)、Hepes、MgATP、CsCl、EGTA、茶多酚(TP)购自 Sigma,胶原酶 P(Collagenase P)购自 Roche,其它试剂均为国产分析纯。

**2.1 台氏液** (mmol · L<sup>-1</sup>) NaCl 137, KCl 5, MgCl<sub>2</sub> 1, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.33, CaCl<sub>2</sub> 1.8, Hepes 10, glucose 10, pH 7.4。

**2.2 无钙台氏液** 台氏液中去除 CaCl<sub>2</sub>。

**2.3 KB 液** (mmol · L<sup>-1</sup>) L-Glu 50, KCl 30, Tau 20, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 30, MgCl<sub>2</sub> 1, Hepes 10, Glucose 10, EGTA 0.5, pH 7.4。

**2.4 细胞外液** (mmol · L<sup>-1</sup>) NaCl 5, CsCl 135, MgCl<sub>2</sub> 1, CaCl<sub>2</sub> 1.8, glucose 10, Hepes 10, pH 7.4。

**2.5 电极内液** (mmol · L<sup>-1</sup>) CsCl 130, NaCl 5, MgCl<sub>2</sub> 1, MgATP 5, EGTA 5, Hepes 5, pH 7.2。

**2.6 SO<sub>2</sub> 衍生物溶液** 配制 2 mol · L<sup>-1</sup> 的混合液 (NaHSO<sub>3</sub> 和 Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, 两者摩尔比为 1:3), 茶多酚配制成 2 g/L 的母液, 实验前稀释到需要浓度。

### 3 大鼠心肌细胞的分离

Wistar 大鼠,体重 200 - 300 g,雌雄不限,具体分离方法见参照 Nie 等<sup>[8]</sup>。所有实验应在细胞分离后的 12 h 内完成。

### 4 全细胞膜片钳记录

全细胞膜片钳记录参照 Nie 等<sup>[8]</sup>完成。

### 5 给药方法及数据分析

形成全细胞状态后,首先进行正常生理状态下的信号采集,然后将上述配制好的 TP 及 SO<sub>2</sub> 衍生物定量加入到培养皿中,使其达到所需要的终浓度,加

药后 10 min 再次进行相应信号的采集;两种药物处理时,将不同浓度的 TP 和 SO<sub>2</sub> 衍生物加入 10 min 后再进行信号采集。在激活动力学研究中,利用公式  $G = I / (V - V_{Na})$  将  $I_{Na}$  峰值转换为电导值,其中 G 为电导, V 为膜电位,  $V_{Na}$  为翻转电位,以电导值与最大电导值的比值对应膜电位绘制出给药前后  $I_{Na}$  的激活 (G - V) 曲线,所得曲线用 Boltzmann 方程  $G/G_{max} = 1 / \{1 + \exp[(V_h - V)/k]\}$  进行拟合,式中 G 为电导, V 为膜电位,  $V_h$  为半数激活电压, k 为曲线的斜率因子;在失活动力学研究中,将单个心肌细胞置保持电位于 -100 mV,采用双脉冲刺激引发钠电流先给予 -120 mV 至 -20 mV,步幅 10 mV 的阶梯钳制预脉冲刺激,刺激波宽 1 000 ms,然后再给予 -10 mV 的测试脉冲刺激,刺激波宽 12 ms,刺激频率 0.25 Hz,记录到电流图形。以电流峰值与最大电流值的比值 (I/I<sub>max</sub>) 对应预脉冲刺激电压绘制给药前后  $I_{Na}$  的失活曲线,然后将所得曲线用 Boltzmann 方程  $I/I_{max} = 1 / \{1 + \exp[(V - V_h)/k]\}$  进行拟合,式中 I 为电流峰值, V 为膜电位,  $V_h$  为半数失活电压, k 为曲线的斜率因子。结果分析使用 pCLAMP CLAMPFIT 程序 (Axon Instrument) 和 Origin 6.1 软件 (Microcal software) 完成。

### 6 统计学处理

数据用均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,给药前后差异的显著性用 One-way ANOVA 检验

## 结 果

### 1 大鼠心肌细胞钠电流的分离

形成全细胞状态后,心肌细胞置于保持电位 (HP) -80 mV,给予 -70 mV 到 +40 mV 的阶梯去极化刺激,刺激波宽为 30 ms,刺激频率为 0.5 Hz。由此引发的内向电流可由细胞外液中加入的河豚毒素 (TTX) 1 μmol · L<sup>-1</sup> 阻断,证实为钠电流,见图 1。

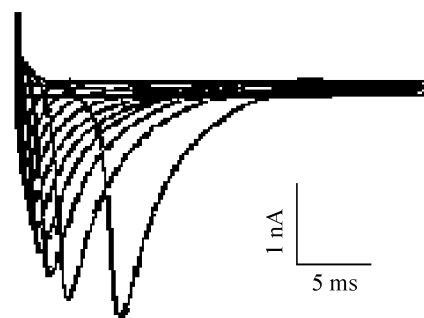


Fig 1 Current traces obtained by depolarizing pulses from -70 mV to +40 mV in 10 mV steps.

图 1 从 -70 mV 去极化到 +40 mV 记录到的钠电流

## 2 TP 对 SO<sub>2</sub> 衍生物引起的钠电流增大效应的影响

按照上述方法形成全细胞状态后,记录初始电流值,然后向培养皿中加入一定量的 SO<sub>2</sub> 衍生物和 TP,使它们达到实验设计的终浓度。SO<sub>2</sub> 衍生物终浓度为 10 μmol/L,TP 浓度分别为 10、20、50 mg/L,加药待细胞稳定 10 min 后记录得到  $I_{Na}$ 。为了保证数据的准确性,同一细胞只用 1 次,每 1 个浓度多次实验后取平均值( $n=8$ )。结果表明,TP 可使 SO<sub>2</sub> 衍生物增大的  $I_{Na}$  部分恢复,加入 50 mg/L TP 后电流增大与对照相比无显著差异,见图 2。

## 3 TP 对 SO<sub>2</sub> 衍生物引起的 $I_{Na}$ 激活和失活动力学效应的影响

在  $I_{Na}$  的激活过程中,SO<sub>2</sub> 衍生物给药前后, $I_{Na}$  激活曲线的  $V_h$  分别为  $-(51.78 \pm 0.04)$  mV 和  $-(53.95 \pm 0.18)$  mV ( $n=8, P < 0.05$ ), $k$  分别为  $(2.95 \pm 0.18)$  和  $(3.34 \pm 0.12)$ ,  $n=8, P < 0.05$ ;而加入 50 mg/L 的 TP 后, $I_{Na}$  激活曲线的  $V_h$  为  $-(53.22 \pm 0.14)$  mV ( $n=8$ ), $k$  为  $(3.34 \pm 0.10)$ ,  $n=8, P > 0.05$ ,见图 3A,与对照相比无显著差异 ( $P > 0.05$ ),斜率因子均未改变。在  $I_{Na}$  的失活过程中,SO<sub>2</sub> 衍生物给药前后  $I_{Na}$  失活曲线  $V_h$  分

别为  $-(71.94 \pm 0.23)$  mV、 $-(65.79 \pm 0.69)$  mV ( $n=8, P < 0.01$ ), $k$  分别为  $(6.9 \pm 0.24)$ 、 $(7.58 \pm 0.62)$ ,  $n=8, P > 0.05$ 。50 mg/L 的 TP 给药后, $V_h$  为  $-(68.64 \pm 0.51)$  mV ( $n=8$ ), $k$  为  $7.51 \pm 0.47$  ( $n=8$ ),与对照相比无显著差异 ( $P > 0.05$ ),但斜率因子不变 ( $P > 0.05$ ),见图 3 B。

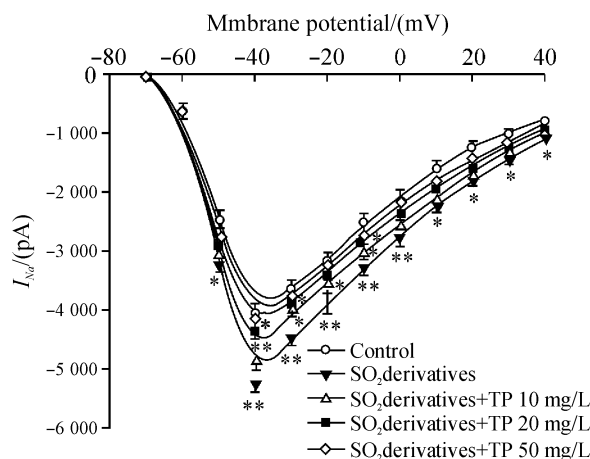


Fig 2 Effects of TP on the increase of  $I_{Na}$  induced by SO<sub>2</sub> derivatives.  $\bar{x} \pm s, n=8, * P < 0.05, ** P < 0.01$  vs control.

图 2 TP 对 SO<sub>2</sub> 衍生物引起钠电流增大效应的影响

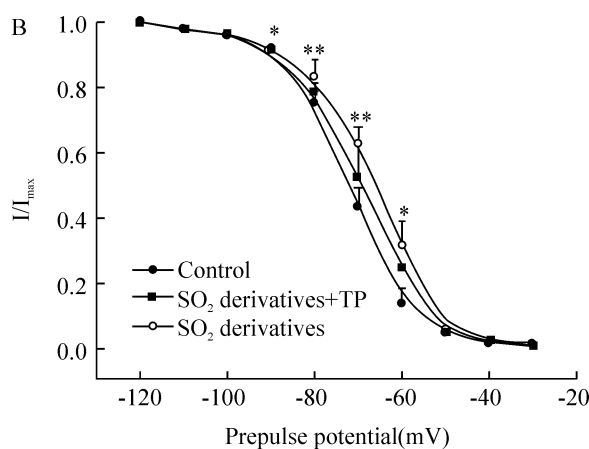
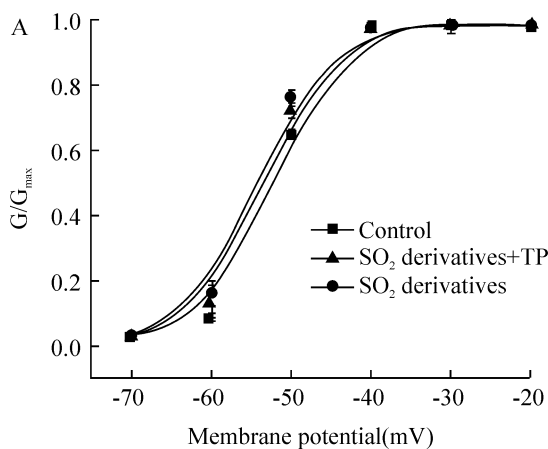


Fig 3 Effects of TP on the steady - state activation and inactivation of  $I_{Na}$ .  $\bar{x} \pm s, n=8, * P < 0.05, ** P < 0.01$  vs control. A: effects of 50 mg/L TP on the steady - state activation of  $I_{Na}$ ; B: effect of 50 mg/L TP on the steady - state inactivation of  $I_{Na}$ .

图 3 TP 对 SO<sub>2</sub> 衍生物引起的钠电流激活和失活动力学效应的影响

## 讨 论

TP 作为一种天然的抗氧化剂,能够清除羟基和过氧化自由基<sup>[4]</sup>,为了进一步揭示 SO<sub>2</sub> 及其衍生物对心肌细胞离子通道的毒性作用机制,本研究探讨了 TP 对 SO<sub>2</sub> 衍生物引起的大鼠心肌细胞  $I_{Na}$  增大效应的影响。实验中采用全细胞膜片钳技术研究了不同浓度 TP 对 SO<sub>2</sub> 衍生物(10 μmol/L)引起的大鼠心肌细胞  $I_{Na}$  增大效应的影响。结果表明,TP 对 SO<sub>2</sub> 衍

生物引起的  $I_{Na}$  增大以及激活、失活动力学效应具有一定的抑制作用。

SO<sub>2</sub> 是一种全身性毒物,不仅能够引起呼吸道损伤和疾病,也可能引起其它组织和系统的氧化损伤<sup>[1,11]</sup>。对于 SO<sub>2</sub> 及其衍生物的毒性机制,本实验室认为 SO<sub>2</sub> 进入体液中,经过代谢产生亚硫酸盐和亚硫酸氢盐,后者极易形成 SO<sub>3</sub><sup>-</sup>,并与 O<sub>2</sub> 迅速反应生成 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 或活性氧自由基,过量的自由基与细胞膜不饱和脂肪酸发生反应,使脂质过氧化水平提高,造成

了细胞或组织的氧化损伤<sup>[11]</sup>。TP 是从茶叶中提取的多酚类物质,是一种天然的抗氧化剂,能够清除羟基和过氧化自由基<sup>[4]</sup>,可以抗氧化、抗癌、抗炎症等等<sup>[5]</sup>,具有多种药用价值<sup>[6]</sup>,在癌症和心血管系统疾病的预防方面已经受到了广泛关注<sup>[7]</sup>。本研究中,TP 的加入减缓了 SO<sub>2</sub> 衍生物对心肌细胞的损伤,其具体机制是 TP 作为一种抗氧化剂,及时清除了 O<sub>2</sub><sup>-</sup>、·OH 等过量自由基,阻止了这些自由基与通道蛋白、氨基酸等发生反应而对通道造成氧化损伤,从而避免了通道的提前打开或关闭的延迟,对心肌细胞起到了一定的保护作用,直接表现为 I<sub>Na</sub> 的部分恢复。这一结论将为 SO<sub>2</sub> 对大鼠心肌细胞离子通道的影响机制提供理论依据,表明了 SO<sub>2</sub> 引起的心肌细胞离子通道的改变主要是通过其引起的 O<sub>2</sub><sup>-</sup>、·OH 等大量自由基对细胞的氧化损伤而实现的。

现代生物学和药理学自由基理论认为自由基或活性氧如 O<sub>2</sub><sup>-</sup>、·OH、R<sup>-</sup> 和 <sup>1</sup>O<sub>2</sub>,与细胞的衰老、癌变和心血管疾病密切相关<sup>[13,14]</sup>。目前,TP 由于其具有抑制脂质过氧化、清除自由基等作用,已经广泛地用于心血管疾病的预防和治疗当中,而 SO<sub>2</sub> 衍生物对心肌细胞的自由基氧化损伤机制的研究必将为 SO<sub>2</sub> 对心血管系统的毒理机制提供更多证据。同时,本研究为 TP 在心血管系统疾病预防与治疗方面的应用提供了理论依据。

[参 考 文 献]

[1] 孟紫强. 氧化应激效应与 SO<sub>2</sub> 全身性毒作用研究[J]. 中国公共卫生, 2003, 19(12): 1422 - 1424.

[2] Meng ZQ, Qin GH, Zhang B, et al. DNA damaging effects of sulfur dioxide derivatives in cells from various organs of mice [J]. Mutagenesis, 2004, 19(6): 465 - 468.

[3] Chang CC, Tsai SS, Ho SC, et al. Air pollution and hospital admissions for cardiovascular disease in Taipei, Taiwan [J]. Environ Res, 2005, 98(11): 114 - 119.

[4] Sabu MC, Smitha KR. Anti - diabetic activity of green tea polyphenols and their role in reducing oxidative stress in experimental diabetes [J]. J Ethnopharmacol, 2002, 83 (1 - 2): 109 - 116.

[5] Suzuki J, Oqawa M, Maejima Y, et al. Tea catechins attenuate chronic ventricular remodeling after myocardial ischemia in rats [J]. J Mol Cell Cardiol, 2007, 42 (2): 432 - 440.

[6] Sano M, Takahashi Y, Yoshino K, et al. Effect of tea (Camelliasinensis L.) on lipid peroxidation in rat liver and kidney: a comparison of green and black tea feeding [J]. Biol Pharm Bull, 1995, 18(7): 1006 - 1008.

[7] Stangl V, Dreger H, Stangl K, et al. Molecular targets of tea polyphenols in the cardiovascular system [J]. Cardiovasc Res, 2007, 73(2): 348 - 358.

[8] Nie AF, Meng ZQ. Study of the interaction of sulfur dioxide derivative with cardiac sodium channel [J]. Biochim Biophys Act, 2005, 1718(1 - 2): 67 - 73.

[9] Nie AF, Meng ZQ. Sulfur dioxide derivative modulation of potassium channels in rat ventricular myocytes [J]. Arch Biochem Biophys, 2005, 442(2): 187 - 195.

[10] Nie AF, Meng ZQ. Modulation of L - type calcium current in rat cardiac myocytes by sulfur dioxide derivatives [J]. Food Chem Toxicol, 2006, 44(3): 355 - 363.

[11] 孟紫强,张 波. 二氧化硫吸入对大鼠血红细胞的氧化损伤作用[J]. 环境与健康杂志, 2001, 18(5): 262 - 264.

[12] 邓 红,李海浪,王 凯,等. 高糖时细胞间相互作用对共培养 ECV304 细胞的影响及茶多酚的干预作用[J]. 中国病理生理杂志, 2006, 22(2): 326 - 329.

[13] Halliwell, B, Antonia, MM, Susanna C, et al. Free radicals and antioxidants in food and *in vivo*: What they do and how they work [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 1995, 35 (1 - 2): 7 - 20.

[14] 程 燕,叶文才,石俊敏,等. 23 - 羟基白桦酸诱导 LoVo 细胞凋亡与细胞内活性氧的关系[J]. 中国病理生理杂志, 2007, 23(4): 772 - 775.