

前胡丙素对培养大鼠心肌细胞内游离 Ca^{2+} 的影响

吴欣 石成璋* 吴晓冬**

(南京中医学院中医药研究所,南京 210029; * 中国医学科学院药物研究所,北京 100050;

** 南京铁道医学院药理教研室,南京 210009)

提要 用 Fura-2/AM 技术直接观察前胡丙素(Pra-C)对培养大鼠心室肌细胞内游离钙的影响。结果显示 Pra-C 浓度为 $0.1 \sim 1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 可明显抑制 CaCl_2 , 高 K^+ 和 Bay K 8644 引起 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 增加, 并且有剂量-效应关系, 对 ouabain 引起的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 增加无明显作用。结果提示 Pra-C 降低心肌细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的作用与抑制电压依赖性钙通道有关。

关键词 前胡丙素; 新型钙离子荧光指示剂 Fura-2; 心肌细胞; 钙离子; 钙拮抗剂

前胡丙素(praeruptorin C, Pra-C)是从中药白花前胡中提取的有效成分⁽¹⁾, 具有扩张血管、抑制心肌收缩力及改善心肌顺应性等作用^(2,3)。初步研究表明它的作用可能与阻钙内流有关。本文用 Fura-2/AM 技术直接观察 Pra-C 对培养大鼠心室肌细胞内游离钙浓度的变化, 并对阻钙内流的机制作了进一步分析。

材 料 和 方 法

药物 Pra-C 用 100% 聚乙二醇配成 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的贮存液, 避光低温保存, 临用前稀释。Fura-2/AM 为中国医学科学院药物研究所产品。Bay K 8644 由德国 Bayer 药厂惠赠。胰蛋白酶, Triton X-100 购自美国 Merck 公司。Ouabain 中国药品生物制品检定所提供。EGTA 购自中国医药公司北京分公司, 进口二级。

仪器 双波长荧光分光光度计, 岛津 F-5000。

心肌细胞培养 按文献^(4,5)处理 Wistar 新生乳鼠心室, 用 0.05% 的胰蛋白酶消化, 分离, 以培养基制备成 10^5 个/ml 细胞悬液, 接种于 50 ml 培养瓶中, 放在 37°C 含 5% CO_2 的培养箱中培养, 每隔 2 d, 换液一次, 一周后用于测定。

细胞内游离钙测定 经一周培养的心肌细胞, 实验前放在倒置显微镜下观察细胞形态, 用吹打法分离贴壁心肌细胞, 细胞悬液离心 (500 r/min) 3 min, 沉淀加入 3 ml Hank' s 液悬浮, 再次离心, 条件同上, 4°C 静置 15 min 去上清液, 加入 5 ml DMEM 培养基, 37°C 预温 5 min 后, 加入 Fura-2/AM (终浓度 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 37°C 振荡 (35 次/min) 50 min 后, 离心 (1500 r/min) 5 min, 弃上清液, 沉淀用 Hank' s 液冲洗两次, 最后加入 Hank' s 液 3 ml 悬浮。

荧光测定条件 EX 340/380 nm, EM 495 nm. 扫描速度 20 nm/min, 扫描范围 300~400 nm, EX 光栅: 5 nm, EM 光栅: 10 nm. 先以 300~400 nm EX 扫描, 观察负载情况, 然后进行光

谱扫描,观察药物对荧光强度的影响,由公式 $(Ca^{2+}) = Kd \left(\frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} \right) \left(\frac{Rf_2}{Fb_2} \right)$ nm 计算细胞内游离钙浓度, $Kd = 224$ 。

结 果

对 $CaCl_2$ 引起 $[Ca^{2+}]_i$ 增加的影响

静息状态下,大鼠心室肌细胞内游离钙浓度为 $129 \pm 10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $[Ca^{2+}]_i$ 随胞外钙浓度增加而升高。加入 $10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} CaCl_2$ 时, $[Ca^{2+}]_i$ 增加到 $348 \pm 4 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 为静息时的 2.7 倍。加入 $1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} Pra-C$ 5 min 后,再加 $CaCl_2 10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 细胞内 Ca^{2+} 增加到 $238 \pm 5 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 为静息时的 1.7 倍。结果表明给药前后 $[Ca^{2+}]_i$ 的变化有明显差异(图 1)。

对高 K^+ 去极化引起的 $[Ca^{2+}]_i$ 增加的影响

图 2 所示,加入 $KCl 25 \sim 75 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $[Ca^{2+}]_i$ 明显增加。预先加入 $Pra-C 0.01 \sim 1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 呈浓度依赖性抑制高 K^+ 去极化引起的 $[Ca^{2+}]_i$ 增加, $Pra-C 1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, $75 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} KCl$ 增加的 $[Ca^{2+}]_i$ 仅为对照组的 50%。相同条件下, $verapamil 1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 也明显拮抗 KCl 引起的 $[Ca^{2+}]_i$ 增加,两者对静息状态下 $[Ca^{2+}]_i$ 均无明显影响。

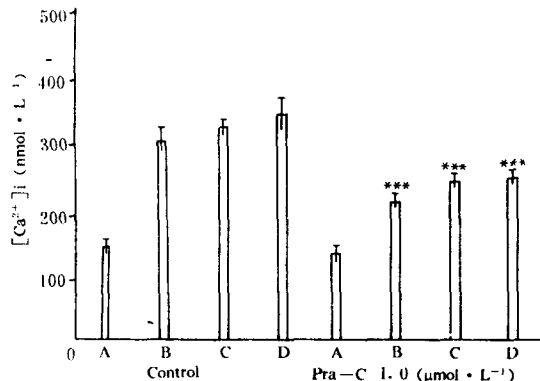


Fig 1 Inhibitory effect of Pra-C on $CaCl_2$ induced increase in myocyte $[Ca^{2+}]_i$. A. Quiescent number; B. $CaCl_2 5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; C. $CaCl_2 7.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; D. $CaCl_2 10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. $\bar{x} \pm s$, $n=5$, $***P < 0.01$ compared with control.

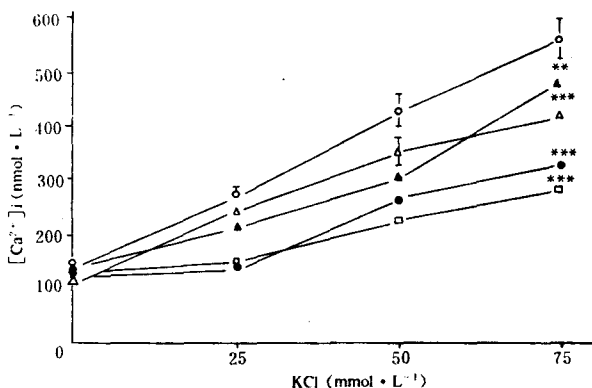


Fig 2 Inhibitory effect of Pra-C on increase in myocyte free calcium induced by KCl . ○—○ Control; ●—● Verapamil $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; △—△ Pra-C $0.01 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; ▲—▲ Pra-C $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; □—□ Pra-C $1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. $\bar{x} \pm s$, $n=5$, $***P < 0.01$, compared with control.

对 Bay K 8644 引起 $[Ca^{2+}]_i$ 增加的影响

加入 $Bay K 8644 3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $[Ca^{2+}]_i$ 增加到 $631 \pm 26 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。预先加入不同浓度的 $Pra-C 5 \text{ min}$ 后, $Bay K 8644$ 增加 $[Ca^{2+}]_i$ 的作用明显减弱, $Pra-C 1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, $[Ca^{2+}]_i$ 仅为对照组的 58% 和 42% (图 3)。

对强心甙引起 $[Ca^{2+}]_i$ 增加的影响

图 4 表示 $ouabain 10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 引起 $[Ca^{2+}]_i$ 明显增加。预先 5 min 加入 $Pra-C 0.1 \sim 1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 仅轻度削弱 $ouabain$ 增加 $[Ca^{2+}]_i$ 的作用, 但与给药前相比无统计学意义, 表明 $Pra-C$

不能阻断 ouabain 引起的细胞内游离钙浓度增加。

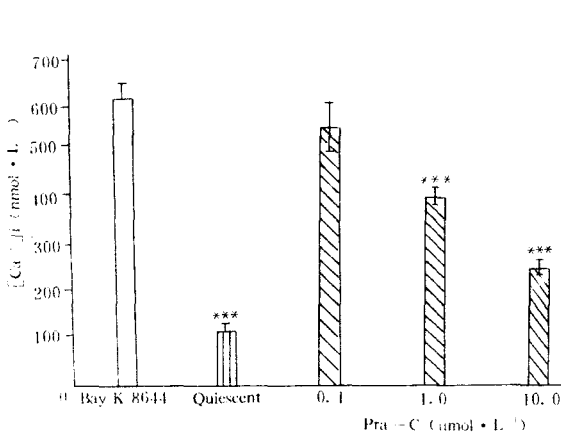


Fig 3 Antagonistic effect of Pra-C on $3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Bay K 8644 induced calcium increase in myocytes. $\bar{x} \pm s$, $n=5$, *** $P < 0.01$ compared with Bay K 8644.

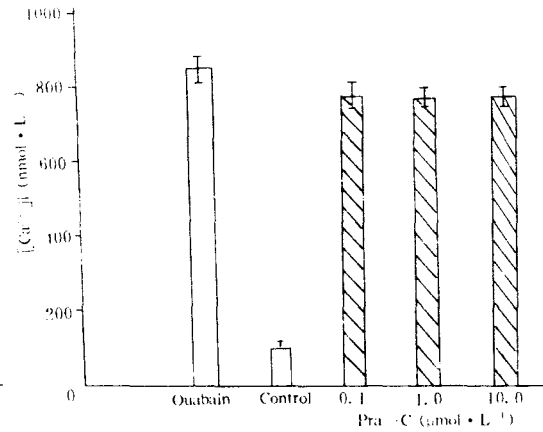


Fig 4 Effect of Pra-C on ouabain induced calcium elevation in heart cells. $\bar{x} \pm s$, $n=5$.

讨 论

我们以前的实验表明 Pra-C 有负性肌力作用, 并有频率依赖性, 对静息后加强无明显影响, 提示可能有阻断心肌钙通道的作用, 而对细胞内钙释放无明显影响⁽³⁾, 但一直没有进一步的证据。本实验采用新一代钙离子荧光指示剂 Fura-2/AM 直接观察 Pra-C 对心肌细胞内游离钙的影响, 结果表明, Pra-C 可抑制 Bay K 8644, 高钾除极化和增加外钙引起的细胞内游离钙浓度升高, 但对 ouabain 引起的细胞内钙升高无明显影响。目前普遍认为, Bay K 8644 和 KCl 均可激活电压依赖性钙通道, 促进细胞外钙内流^(8,9), ouabain 主要是通过抑制 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase 促进 $\text{Na} - \text{Ca}$ 正向转运和抑制 $\text{Na} - \text{Ca}$ 逆向转运而升高细胞内钙^(10,11), Pra-C 抑制 Bay K 8644 和 KCl 促钙内流的作用, 而不影响 ouabain 引起的细胞内钙升高, 提示 Pra-C 选择性地阻断通过钙通道的钙内流, 而对增加内钙的另一重要途径 $\text{Na} - \text{Ca}$ 交换无明显影响, 进一步证实了它的钙拮抗作用。

细胞内游离钙浓度的调节除受细胞外钙内流的影响外, 与胞内钙库摄取钙的能力有关⁽¹²⁾。Pra-C 抑制心肌细胞内游离钙升高的作用机理尚需进一步研究。

参 考 文 献

- 1 陈政雄, 等. 中药白花前胡化学成分的研究: 四种新香豆素的结构. 药学报 1979; 14: 486.
- 2 吴欣, 饶曼人. 前胡丙素对豚鼠心房及人体心肌顺应性的影响. 中国药理学报 1990; 11: 235.
- 3 吴欣, 饶曼人. 前胡丙素对豚鼠心房和兔主动脉条的钙拮抗作用. 中国药理学与毒理学杂志 1990; 4: 105.
- 4 Buja LM, et al. Characterization of a reversible increase in adrenergic receptors in isolated neonatal rat ventricular myocytes with impaired energy metabolism. Circ Res 1985; 57: 640.

- 5 Colquhoun D, et al. Inward cation channels activated by intracellular Ca^{2+} in cultured cardiac cells. *Nature* 1981;294 : 752.
- 6 Wier WG, et al. Cellular and subcellular heterogeneity of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in single heart cells revealed by Fura-2. *Science* 1987;235 : 325.
- 7 Thandroyen FT, et al. Intracellular calcium transients and arrhythmia in isolated heart cells. *Circ Res* 1991;69 : 810.
- 8 Powell T, et al. Cytoplasmic free calcium measured by Quin-2 fluorescence in isolated ventricular myocytes at rest and during potassium—depolarization. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;122 : 1012.
- 9 Sen L, et al. Inotropic and calcium kinetic effects of calcium channel agonist and antagonist in isolated cardiac myocytes from cardiomyopathic hamsters. *Circ Res* 1990;67 : 599.
- 10 Besch HR, et al. Correlation between the inotropic action of ouabain and its effects on subcellular enzyme systems from canine myocardium. *J Pharmacol Exp Ther* 1970;171 : 1.
- 11 Philipson KD, et al. Binding of Ca^{2+} and Na^+ to sarcolemmal membranes; Relation to control of myocardial contractility. *Am J Physiol* 1980;238 : H373.
- 12 Kolbeck RC, and Frank J. Nonpolar density gradient ultra-centrifugation in the direct determination of myocardial subcellular calcium. *J Mol Cell Cardiol* 1985;17 : 243.

EFFECTS OF PRAERUPTORIN-C ON CYTOSOLIC FREE CALCIUM IN CULTURED RAT HEART CELLS

X Wu, CZ Shi* and XD Wu* *

(Institute of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, Nanjing College of Traditional Chinese Medicine, Nanjing, 210029; * Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Science, Beijing 100050; ** Department of Pharmacology, Nanjing Railroad Medical College, Nanjing 210009)

ABSTRACT The negative inotropic effect of Pra-C was supposed to be related to the blocking of extracellular calcium influx but direct evidence is not known. We, therefore, examined the effects of PraC on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in isolated rat ventricular myocytes using the fluorescent Ca^{2+} -indicator Fura-2/AM. It was found that Pra-C inhibited the elevation of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induced by potassium-depolarization, high extracellular calcium and calcium agonist Bay K 8644 in a dose-dependent manner. At $1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, it decreased the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ at the presence of $75 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl, $10 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl and $3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Bay K 8644 by 50, 31 and 42% respectively. No significant effect on ouabain evoked $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase was found, showing that it does not affect sarcolemmal $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ exchange. These results further indicate that Pra-C may decrease the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ of myocyte by blocking voltage-dependent calcium channels.

Key words Praeruptorin- C; Fluorescent Ca^{2+} - indicator Fura- 2; Myocyte; Free calcium; Calcium antagonist