

· 博士之窗 ·

# 生脉散皂苷部位对大鼠培养心肌细胞内游离钙的调节作用\*

汪红仪 余伯阳 严永清

**内容提要** **目的:**研究生脉散皂苷部位对培养的大鼠单个心肌细胞内  $Ca^{2+}$  浓度的影响。**方法:**以 Fluo-3AM 负载心肌细胞,采用激光扫描共聚焦显微镜检测单个细胞内  $Ca^{2+}$  浓度的变化。**结果:**生脉散皂苷部位  $10\mu\text{g/ml}$  可明显增加心肌细胞内  $Ca^{2+}$  浓度,并使其维持在高水平( $P < 0.01$ ),随后加入高  $Ca^{2+}$  和高  $K^+$  对细胞内  $Ca^{2+}$  浓度无明显影响。生脉散皂苷部位  $100\mu\text{g/ml}$  诱导心肌细胞内  $Ca^{2+}$  浓度迅速明显增加后又迅速下降至静息水平( $P < 0.01$ ),外加高  $Ca^{2+}$  和高  $K^+$  不能刺激细胞内  $Ca^{2+}$  浓度明显增加。**结论:**生脉散皂苷部位对心肌细胞内  $Ca^{2+}$  浓度变化的影响与其浓度有关。

**关键词** 生脉散皂苷部位 心肌细胞 钙离子 激光扫描共聚焦显微镜

## Modulation of Saponins Extracted from Shengmai Powder on Free Calcium Ion in Cultured Rat Myocardial Cells WANG Hong-yi, YU Bo-yang, YAN Yong-qing *China Pharmaceutical University, Nanjing (210038)*

**Objective:** To study the effects of saponins extracted from Shengmai Powder (SSMP) on  $Ca^{2+}$  level in cultured single neonatal rat myocardial cells. **Methods:** Myocardial cells were cultured and loaded with Fluo 3-AM. The change of  $Ca^{2+}$  level in each cell was determined with laser scanning confocal microscopy. **Results:** SSMP  $10\mu\text{g/ml}$  caused an obvious elevation of  $Ca^{2+}$  level ( $P < 0.01$ ), which maintained on a level that was higher than the resting level. No obvious change was observed on  $Ca^{2+}$  level, followed by the addition of high concentrated  $Ca^{2+}$  and  $K^+$ . SSMP  $100\mu\text{g/ml}$  induced a rapid and obvious elevation of  $Ca^{2+}$  level ( $P < 0.01$ ), which rapidly dropped down to the resting level. Extracellular high level of  $Ca^{2+}$  and  $K^+$  had no influence on intracellular  $Ca^{2+}$  level. **Conclusion:** The effect of SSMP on  $Ca^{2+}$  in cultured myocardial cells is related to the concentration used.

**Key words** saponins extracted from Shengmai Powder, myocardial cell, calcium ion, laser scanning confocal microscope

生脉散作为著名的中医古方之一,具有益气复脉、养阴生津的功效,临床上广泛用于治疗心血管疾病及抗休克、抗衰老等。目前已经证实生脉散能改善冠状动脉循环,降低心肌耗氧量<sup>(1)</sup>,并明确了皂苷为生脉散作用的有效部位,但尚未见关于生脉散皂苷部位对心肌细胞离子通道作用的报道。本研究通过观测生脉散皂苷部位对培养的大鼠单个心肌细胞内  $Ca^{2+}$  浓度变化的影响,探讨生脉散皂苷部位治疗心血管疾病及抗休克的作用机制。

### 材料和方法

#### 1 材料

1.1 药物与试剂 生脉散皂苷部位(简称生脉散,皂苷含量 18.33%,批号为 990301,由本校中药复方研究室提供),用生理盐水配制成  $100\mu\text{g/ml}$  的溶液;RPMI1640 培养基:GIBCO BRL 产品;新生牛血清:杭州四季青生物工程材料有限公司产品;胰蛋白酶:Sigma 公司产品;Fluo-3AM 和 Pluronic F-127: Molecular Probes, Eugene OR 产品。盐酸维拉帕米注射液:江苏省连云港制药厂生产,批号 971115。其余试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器 激光扫描共聚焦显微镜:MRC-600, BioRad, Glattdbru-gg, Switzerland;洁净层流柜:江苏吴

\* 博士生课题;江苏省自然科学基金资助项目(NK 99102)  
中国药科大学中药复方研究室(南京 210038)

县市实验动物器材厂生产;二氧化碳培养箱:Heraeus BB-16;倒置显微镜:重庆光学仪器厂生产。

1.3 缓冲液的配制(mmol/L) NaCl 140、KCl 4、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.44、MgCl<sub>2</sub> 1、CaCl<sub>2</sub> 2 加 HEPES/NaOH 10mmol/L 调节 pH 至 7.4, 储存于 4℃ 备用。

2 方法

2.1 心肌细胞培养 按实验方法<sup>[2]</sup>取新生 2~3 天的 Wistar 大鼠乳鼠(江苏省实验动物中心提供, II 级, No:93008)心室肌, 经 0.06% 的胰酶 37℃ 水浴消化 10min 后, 300g/min 离心 10min, 反复数次, 收集沉淀中的细胞。将细胞悬液按 5 × 10<sup>6</sup> 个/ml 密度种植于 24 孔板内(预先放置小飞片), 然后放于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱内培养, 实验用培养 2~5 天的细胞。所有实验均于室温(20~23℃)下进行。

2.2 Fluo-3AM 的负载 室温下将细胞用 5~10 μmol/L 的 Fluo-3AM 孵育, 同时加入 25% pluronic F-127 以增强染料透过细胞, 30min 后换用不含染料的磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗, 并在 PBS 中脱酯化 30min 后, 用激光共聚焦显微镜观察。

2.3 Ca<sup>2+</sup> 的实时检测及图像分析 在所有的实验中, 以 488nm 的波长激发 Ca<sup>2+</sup> 指示剂 Fluo-3, 发射光在 >515nm 波长范围内收集。选择 128 × 128 像素的二维共聚焦图像, 每 2s 扫描一幅图像。Ca<sup>2+</sup> 浓度的变化以荧光强度(FI)表示。正常组在测定的 10min 内不加任何作用物; 高浓度 CaCl<sub>2</sub> 组及 KCl 组在测定细胞自发荧光 2min 后加入 CaCl<sub>2</sub> 及 KCl, 随后不加任何作用物; 生脉散皂苷部位组及维拉帕米组在测定自发荧光 2min 后加入生脉散皂苷部位及维拉帕米, 稳定 2

~3min 后再加入与上组同样浓度的 CaCl<sub>2</sub> 及 KCl, 随后不加任何作用物。

3 统计学方法 扫描图像及数据由计算机自动采集, 数据以 t 检验进行各值之间的比较。

结 果

1 正常心肌细胞 Ca<sup>2+</sup> 释放 在含有 1.4mmol/L Ca<sup>2+</sup> 的缓冲液中, 大多数细胞均表现出自发性的搏动, 观测的 10min 内, 未加任何药物的心肌细胞搏动的频率和幅度无明显变化, 核区和胞浆区的波峰值在整个测定过程中均无明显变化(见表 1)。胞浆区 Ca<sup>2+</sup> 波峰值小于核区 Ca<sup>2+</sup> 波峰值(FI), 差异有显著性(P < 0.01)。

2 细胞外高浓度 Ca<sup>2+</sup> 和 K<sup>+</sup> 诱导的心肌细胞内 Ca<sup>2+</sup> 浓度变化 正常心肌细胞在加入 10mmol/L CaCl<sub>2</sub> 后, 核区与胞浆区的 Ca<sup>2+</sup> 浓度在(12.16 ± 3.56)s 内同时迅速增加(P < 0.05), 然后缓慢降低至静息水平; 加入 6mmol/L KCl 后, 核区与胞浆区 Ca<sup>2+</sup> 浓度在(35.24 ± 2.36)s 内也同时明显增加(P < 0.05, 见表 1), 随后缓慢降低到静息水平。以上结果表明细胞外高浓度 Ca<sup>2+</sup> 和高浓度 K<sup>+</sup> 均可在短时间内诱导心肌细胞内 Ca<sup>2+</sup> 水平迅速明显增加。

3 生脉散皂苷部位对心肌细胞内 Ca<sup>2+</sup> 浓度的影响 见表 1。在细胞内 Ca<sup>2+</sup> 荧光强度稳定后, 加入 10 μg/ml 生脉散皂苷部位, 核区 Ca<sup>2+</sup> 浓度在(10.70 ± 2.53)s 内明显增加(P < 0.01), 胞浆区 Ca<sup>2+</sup> 浓度同时明显增加(P < 0.05), 此后胞内 Ca<sup>2+</sup> 浓度维持在较高水平不下降; 随后再加入 10mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 核区及胞

表 1 生脉散对培养的大鼠单个心肌细胞内 Ca<sup>2+</sup> 浓度的影响 (x̄ ± s)

组别	细胞核区波峰 FI			细胞胞浆区波峰 FI			核区与胞浆区 FI 到达峰值的时间(s)
	静息状态	加入药物后	加入高 Ca <sup>2+</sup> 、K <sup>+</sup> 后	静息状态	加入药物后	加入高 Ca <sup>2+</sup> 、K <sup>+</sup> 后	
正常	54.46 ± 21.37 <sup>△</sup>	—	—	18.96 ± 7.52	—	—	—
CaCl <sub>2</sub>	68.25 ± 13.87	—	96.62 ± 14.10 <sup>*</sup>	27.07 ± 10.29	—	39.60 ± 6.07 <sup>*</sup>	12.16 ± 3.56
KCl	52.89 ± 11.29	—	79.26 ± 14.16 <sup>*</sup>	26.23 ± 13.26	—	38.93 ± 10.09	35.24 ± 2.36
生脉散 10 μg/ml							
加 CaCl <sub>2</sub>	77.84 ± 39.53	162.94 ± 20.52 <sup>**</sup>	146.69 ± 18.15	38.49 ± 25.43	59.67 ± 29.27 <sup>*</sup>	55.87 ± 20.35	10.70 ± 2.53
生脉散 100 μg/ml							
加 KCl	21.13 ± 6.96	33.74 ± 15.92 <sup>*</sup>	29.80 ± 11.12	9.69 ± 3.67	23.63 ± 6.07 <sup>**</sup>	19.30 ± 9.55	18.23 ± 5.29
生脉散 100 μg/ml							
加 CaCl <sub>2</sub>	63.31 ± 50.07	155.80 ± 27.88 <sup>**</sup>	69.37 ± 20.63	33.45 ± 6.58	55.61 ± 117.19 <sup>*</sup>	28.37 ± 4.28	8.15 ± 3.79
生脉散 100 μg/ml							
加 KCl	85.09 ± 16.70	170.78 ± 49.09 <sup>**</sup>	81.10 ± 77.49	30.00 ± 11.24	73.03 ± 33.34 <sup>**</sup>	35.09 ± 17.72	11.65 ± 4.56
维拉帕米 100 μg/ml							
加 CaCl <sub>2</sub>	88.12 ± 11.39	74.95 ± 10.85 <sup>*</sup>	85.62 ± 38.77	34.66 ± 11.73	43.79 ± 13.77 <sup>*</sup>	36.54 ± 15.82	—
维拉帕米 100 μg/ml							
加 KCl	46.04 ± 29.47	22.44 ± 26.51 <sup>**</sup>	24.13 ± 10.57	20.81 ± 12.78	10.83 ± 10.99 <sup>**</sup>	14.48 ± 53.25	—

注:与自身静息状态波峰 FI 比较, \* P < 0.05, \*\* P < 0.01; 与细胞胞浆区静息状态波峰 FI 比较, <sup>△</sup> P < 0.01; 各组均为 6~8 个细胞

浆区  $Ca^{2+}$  浓度仍保持在较高水平。加入同浓度生脉散皂苷部位后再加入 6mmol/L KCl, 细胞核区  $Ca^{2+}$  浓度在  $(18.23 \pm 5.29)s$  内明显增加 ( $P < 0.05$ ), 胞浆区  $Ca^{2+}$  浓度在同样的时间内明显增加 ( $P < 0.01$ )。以上结果表明 10 $\mu$ g/ml 生脉散皂苷部位可明显增强细胞内  $Ca^{2+}$  水平。

细胞在加入 100 $\mu$ g/ml 生脉散皂苷部位后, 核区  $Ca^{2+}$  浓度明显增加 ( $P < 0.01$ ) 后又迅速下降至静息水平 ( $P < 0.01$ ); 随后再加入 10mmol/L  $CaCl_2$ , 核内  $Ca^{2+}$  浓度仍保持在静息水平。胞浆区  $Ca^{2+}$  浓度的变化与核区  $Ca^{2+}$  浓度的变化相似,  $Ca^{2+}$  浓度明显增加 ( $P < 0.05$ ) 后与核区  $Ca^{2+}$  浓度同时下降到静息水平。加入 100 $\mu$ g/ml 生脉散皂苷部位后再加入 6mmol/L KCl, 生脉散皂苷部位导致细胞内  $Ca^{2+}$  浓度明显降低后高  $K^+$  不能刺激其明显增加。由前述结果可以发现, 不同浓度生脉散皂苷部位对离体心肌细胞内  $Ca^{2+}$  浓度变化的影响不同; 较低浓度的生脉散皂苷部位可明显增强细胞内  $Ca^{2+}$  水平; 高浓度的生脉散皂苷部位则可明显抑制静息  $Ca^{2+}$  水平并抑制高  $Ca^{2+}$  和高  $K^+$  诱导的细胞内  $Ca^{2+}$  浓度增加。

100 $\mu$ g/ml 维拉帕米对静息  $Ca^{2+}$  水平无明显影响, 对细胞外高  $Ca^{2+}$  诱导的  $Ca^{2+}$  浓度增加具有显著性抑制作用 ( $P < 0.05$ ), 对细胞外高  $K^+$  引起的细胞内  $Ca^{2+}$  浓度增加具有显著的抑制作用 ( $P < 0.01$ )。

### 讨 论

$Ca^{2+}$  在心肌细胞的兴奋和收缩活动中起着至关重要的作用。心肌细胞内  $Ca^{2+}$  的分布和跨膜转运不仅是心肌细胞生理学的重要研究内容, 同时也是缺血再灌注及高血压等心血管疾病病理机制的研究热点。一方面  $Ca^{2+}$  测定技术的迅速发展有利于细胞内  $Ca^{2+}$  的准确定量; 另一方面, 治疗心血管疾病的药物与其对心肌  $Ca^{2+}$ 、 $K^+$  等离子作用的机制研究也愈加深入。中药对  $Ca^{2+}$  调节作用的研究已有较多的报道<sup>[3]</sup>, 但尚未见生脉散皂苷部位在此方面的研究。

本研究利用激光扫描共聚焦显微镜研究不同浓度的生脉散皂苷部位对心肌细胞内  $Ca^{2+}$  浓度变化的影响, 发现生脉散皂苷部位对心肌细胞内  $Ca^{2+}$  水平的变化并不表现为单一的阻滞或激活。低浓度的生脉散皂苷部位主要是增加细胞内  $Ca^{2+}$  浓度, 并不受外加高

$Ca^{2+}$  和高  $K^+$  的影响。高浓度的生脉散皂苷部位在诱导细胞内  $Ca^{2+}$  浓度一过性的增加后转而抑制了静息  $Ca^{2+}$  水平及高  $Ca^{2+}$  和高  $K^+$  诱导的  $Ca^{2+}$  增加。这与以往发现的钙通道阻滞剂维拉帕米的钙阻滞作用以及与离子载体 A23187 的钙增强作用不同, 其具体机制有待进一步的探索。本实验的结果也提示生脉散皂苷部位对心肌细胞内  $Ca^{2+}$  复杂的调节作用可能是其多种心血管效应的原因之一。

生脉散皂苷部位主要含有人参皂苷及麦冬皂苷, 已知人参总皂苷及人参皂苷单体  $Rb_1$ 、 $Rb_2$ 、 $Rb_3$ 、 $R_c$ 、 $R_d$  等具有钙通道阻滞作用<sup>[4]</sup>; 麦冬皂苷对细胞内  $Ca^{2+}$  变化的影响较为复杂, 其主要调节  $Ca^{2+}$  波动的频率与幅度趋于稳定(结果待发表)。生脉散皂苷部位并非两种皂苷作用简单的相加, 而是其所含多种组分的综合作用, 其药理活性也与单独应用人参总皂苷和麦冬总皂苷不完全相同。

生脉散皂苷部位的一部分药理活性可能与其钙增强作用有关, 如抗休克、抗多器官循环衰竭等。已经知道生脉散皂苷部位中所含皂苷成分与洋地黄类药物不相同, 其作用也不同。生脉散皂苷部位钙增强的作用机制和作用特点以及不同组方生脉散皂苷部位对心肌细胞离子通道的作用值得待进一步深入研究。另外生脉散皂苷部位在抗心律失常、抗心肌缺血、调节免疫等多方面都有较好的效果, 这与高浓度时生脉散皂苷部位具有钙拮抗作用是否相关? 以上问题的解决将为生脉散皂苷部位在临床上更广泛的应用和中药复方的现代化研究提供线索。

### 参 考 文 献

1. 严永清主编. 生脉散皂苷部位口服液的综合研究. 北京: 中国医药科技出版社, 1989: 317—323.
2. 徐叔云主编. 药理实验方法学. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1991: 531—535.
3. 杨纯瑜. 抗心律失常中草药成分在植物科属中的存在及药理作用分类研究新进展. 中草药 1992; 23(12): 653—655.
4. Zhong Guo-Gan, Sun Cheng-Wen, Li Yun-Yi, et al. Calcium channel blockade and anti-free-radical actions of pan-axadiol saponin  $Rb_1$ ,  $Rb_2$ ,  $Rb_3$ ,  $R_c$  and  $R_d$ . Acta Pharmacol Sin 1995; 16(3): 255—260.

(收稿: 2001-07-25 修回: 2002-04-30)