

## · 实验研究 ·

## 参麦注射液对大鼠膈肌细胞 L 型钙通道的影响\*

赵丽敏 熊盛道 牛汝楫 徐永健 张珍祥

**摘要** 目的 探讨参麦注射液对大鼠膈肌细胞 L 型钙通道电流 ( $I_{Ca-L}$ ) 的影响。方法 采用急性酶消化分离法, 获取单个大鼠膈肌细胞, 用标准的全细胞膜片钳技术, 记录 7 只大鼠膈肌细胞  $I_{Ca-L}$  的峰值及电流-电压关系曲线, 并观察不同浓度的参麦注射液对其影响。结果 当维持电位为  $-80\text{mV}$ , 刺激频率为  $0.5\text{Hz}$ , 钳制时间为  $300\text{ms}$ , 步进电压为  $10\text{mV}$ , 去极到  $+60\text{mV}$  时,  $10\mu\text{l/ml}$  的参麦注射液仅使大鼠膈肌细胞的平均内向峰值  $I_{Ca-L}$  由  $(-6.9 \pm 0.6)\text{pA/pF}$  增加到  $(-7.5 \pm 0.7)\text{pA/pF}$ , 增加的幅度为  $(9.2 \pm 2.8)\%$ , 用药前后差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。  $50\mu\text{l/ml}$ 、 $100\mu\text{l/ml}$  的参麦注射液使大鼠膈肌细胞的平均内向峰值  $I_{Ca-L}$  由  $(-6.9 \pm 0.6)\text{pA/pF}$  分别增加到  $(-8.4 \pm 0.6)\text{pA/pF}$  和  $(-9.2 \pm 0.6)\text{pA/pF}$ , 其增加的幅度分别为  $(22.4 \pm 1.7)\%$  和  $(34.6 \pm 4.6)\%$ , 与用药前比较, 差异均有显著性 (均  $P < 0.05$ )。给药前后  $I_{Ca-L}$  的最大激活电位和翻转电位均不变。结论 参麦注射液可激活大鼠膈肌细胞膜的钙通道, 增加  $\text{Ca}^{2+}$  内流, 而使膈肌细胞的收缩力增强, 该作用可能是参麦注射液在临床上用于治疗膈肌疲劳的离子通道机制之一。

**关键词** 参麦注射液 钙通道 膜片钳技术 膈肌细胞

**Effect of Shenmai Injection on L-type Calcium Channel of Diaphragmatic Muscle Cells in Rats** ZHAO Li-min, XIONG Sheng-dao, NIU Ru-ji, et al *Respiratory Department, Tongji Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan (430030)*

**Objective:** To explore the effect of Shenmai Injection (SMI) on L-type calcium channel of diaphragmatic muscle cells in rats. **Methods:** Single diaphragmatic muscle cell of rats was obtained by the acute enzyme isolation method and the standard whole-cell patch clamp technique was used to record the inward peak L-type calcium current (IPLC) and current-voltage relationship curve of diaphragmatic muscle cells of 7 rats, and to compare the effects of SMI in various concentrations on them. **Results:** When keeping the electric potential at  $-80\text{mV}$ , stimulation frequency  $0.5\text{Hz}$ , clamp time  $300\text{ms}$ , stepped voltage  $10\text{mV}$ , and depolarized to  $+60\text{mV}$ ,  $10\mu\text{l/ml}$  of SMI could only cause the mean IPLC of rat's diaphragmatic muscle cells increased from  $-6.9 \pm 0.6\text{pA/pF}$  to  $-7.5 \pm 0.7\text{pA/pF}$ , the amplification being  $(9.2 \pm 2.8)\%$ , comparison between those of pre-treatment and post-treatment showed insignificant difference. But when the concentration of SMI increased to  $50\mu\text{l/ml}$  and  $100\mu\text{l/ml}$ , the mean IPLC increased to  $-8.4 \pm 0.6\text{pA/pF}$  and  $-9.2 \pm 0.6\text{pA/pF}$ , respectively, and the amplification was  $(22.4 \pm 1.7)\%$  and  $(34.6 \pm 4.6)\%$  respectively, showing significant difference to that of pre-treatment ( $P < 0.05$ ). However, SMI showed no significant effect on maximal activation potential and reversal potential. **Conclusion:** SMI can activate the calcium channel of diaphragmatic muscle cells in rats, increase the influx of  $\text{Ca}^{2+}$ , so as to strengthen the contraction of diaphragmatic muscle, which may be one of the ionic channel mechanisms of SMI in treating diaphragmatic muscle fatigue in clinical practice.

**Key words** Shenmai Injection, calcium channel, patch clamp technique, diaphragmatic muscle cell

近 20 年研究发现, 在生理或病理状态下, 自主呼

吸过程中会出现呼吸肌疲劳(泵衰竭)。而呼吸肌疲劳或无力是呼吸衰竭发病中的重要环节。膈肌是主要的呼吸肌, 故呼吸肌疲劳主要是膈肌疲劳。膈肌疲劳在临床上可导致高碳酸血症<sup>[1]</sup>。故近年来膈肌疲劳日益受到人们的重视。膈肌是骨骼肌, 但其生理特性与心肌相似, 均依赖细胞外钙<sup>[2]</sup>。参麦注射液可改善膈肌的

\* 国家自然科学基金资助课题 (No. 39670338)

华中科技大学同济医学院附属同济医院呼吸疾病研究室(武汉 430030)

通讯作者: 赵丽敏; Tel: 027-83662597; E-mail: liminzhao2005@hotmail.com  
万方数据

舒缩功能<sup>[3]</sup>。近年来用于膈肌疲劳的治疗。有研究证实其机制是减少了自由基及脂质过氧化产物的产生<sup>[4]</sup>,但其电生理机制尚有待进一步的研究。本实验采用全细胞膜片钳技术,观察参麦注射液对离体大鼠单个膈肌细胞 L-型钙通道电流( $I_{Ca-L}$ )的影响,以探讨其对膈肌作用的离子通道机制,为临床治疗膈肌疲劳提供用药依据。

### 材料与方 法

1 实验动物 健康 Wistar 大鼠,体重 200~250g,雌雄不拘,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。

2 药物、试剂与溶液 参麦注射液为浙江正大青春宝药业有限公司产品(简称参麦,批号 950618,50ml 中含生药红参 5g,麦冬 5g);I 型胶原酶、牛血清白蛋白(BSA)购于武汉天源技术有限公司;HEPES、 $Na_2ATP$ 、EGTA 为 Gibco 公司产品;TEACl、TEAOH、维拉帕米均为 Sigma 公司产品;其他试剂均为国产分析纯。

Spinner 液(mmol/L): $NaH_2PO_4$  8,  $NaHCO_3$  22.6,  $NaCl$  116,  $KCl$  5.3, glucose 5.6, 用  $NaOH$  将 pH 调至 7.4<sup>[5]</sup>;

Kreb's 液(mmol/L): $NaCl$  136,  $KCl$  5,  $CaCl_2$  2,  $MgCl_2$  1, HEPES 10, 用  $NaOH$  将 pH 调至 7.4<sup>[6]</sup>;

记录  $I_{Ca-L}$  的电极内液(mmol/L): $CsCl$  145,  $MgCl_2$  1,  $CaCl_2$  0.005, glucose 5.6, HEPES 10,  $Na_2ATP$  2, EGTA 1, 用 Tris base 将 pH 调至 7.2<sup>[5]</sup>;

记录  $I_{Ca-L}$  的灌流液(mmol/L):TEACl 135,  $MgCl_2$  0.8, glucose 5.6, HEPES 10,  $CaCl_2$  2.5,  $BaCl_2$  5, 用 TEAOH 将 pH 调至 7.4<sup>[5]</sup>;

含参麦注射液的灌流液:上述  $I_{Ca-L}$  的灌流液中加入参麦注射液,使其终浓度分别为  $10\mu l/ml$ 、 $50\mu l/ml$ 、 $100\mu l/ml$ <sup>[7]</sup>。

3 大鼠单个膈肌细胞的分离 通过急性酶消化分离法得到单个膈肌细胞<sup>[5]</sup>。大鼠以 2% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,快速开胸取膈肌,置于冰浴、充有 95%  $O_2$  和 5%  $CO_2$  混合气体的 Spinner 液中冲洗,剪成  $1mm \times 1mm \times 1mm$  的碎块。然后将肌肉碎块置于含 2mg/ml BSA 及 2mg/ml 的 I 型胶原酶的消化液中消化 37℃ 30min,消化结束后,用 Spinner 液冲洗 3 遍,再加入 Kreb's 液,用尖端抛光的 Pasteur 吸管反复吹打 5min,悬液用 200 目不锈钢筛网过滤,即可得到含有单个膈肌细胞的细胞悬液。台盼蓝染色,细胞着色

者为死细胞,拒染者为活细胞。将细胞悬液分装到涂有多聚赖氨酸的小培养皿中,静置 30min,选用细胞膜完整、有立体感、长圆柱形、横纹较清晰、折光好的细胞作通道记录。

4 全细胞膜片钳实验 采用标准的膜片钳全细胞记录方法<sup>[8]</sup>,在室温(20~22℃)下进行。待细胞沉降贴壁后,用记录 L 型钙通道电流的灌流液灌流,流速为 1.5~2.0ml/min。电极用玻璃毛细管(中国科学院上海生理研究所提供),外径 1.6mm,采用微电极拉制仪(PP-830, Narishige Co, Japan)两步拉制而成。控制后的电极尖端直径为 1~2 $\mu m$ ,入水后电极阻抗为 2~5M $\Omega$ ,通过三维操纵仪(Olympus, ONU-31P)移动电极,并轻压在细胞表面,稍加负压使电极尖端与细胞膜表面形成 G $\Omega$  的高阻封接。继而给电极内施加一负压吸破细胞膜,补偿快、慢电容电流和电极串联电阻,形成全细胞记录。

本实验用  $Cs^+$  抑制内向整流流的  $K^+$ ,以消除其对  $I_{Ca-L}$  的影响。当 Eh(holding potential)大于 -40mV 时,能使钠通道和 T 型钙通道完全失活,排除他们对 L 型钙通道电流的干扰,再将 Ec(command potential)去极钳制到某一电位,即可记录到正常的  $I_{Ca-L}$ <sup>[5]</sup>。然后加入参麦注射液,5min 后,观察不同浓度的参麦注射液对  $I_{Ca-L}$  的影响。

数据的采集和分析使用德国 HEKA 公司的 PULSE+PULSEFIT 软件(8.30 版)。为排除个体之间的差异,钙电流(pA)用其以细胞膜电容(pF)标准化后所得的电流密度(pA/pF)来表示。

5 统计学分析 所有数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,用药前后  $I_{Ca-L}$  峰值差异采用配对资料  $t$  检验。

### 结 果

1  $I_{Ca-L}$  的测定 在电压钳制状态下,以 10mV 步阶使膈肌由 -80mV 的保持电位逐步去极至 +60mV 的膜电位水平,刺激电压持续 300ms,此时可记录到一个缓慢失活的内向电流。在细胞外灌流液中加入特异性  $I_{Ca-L}$  阻断剂维拉帕米( $10\mu mol/L$ ),几乎可完全阻断记录到的内向电流。而且,实验用  $Cs^+$  抑制内向整流流的  $K^+$  电流,由此推断,所记录到的内向电流应为  $I_{Ca-L}$ 。当膜电位为 10mV 时,  $I_{Ca-L}$  达峰值,其翻转电位为 +60mV。

2 参麦注射液对  $I_{Ca-L}$  峰值的影响 在记录的电极外液中加入参麦注射液,使其终浓度为  $10\mu l/ml$ 、 $50\mu l/ml$  和  $100\mu l/ml$ ,分别记录此时的  $I_{Ca-L}$ 。结果显示:参麦注射液可浓度依赖性地增加峰值  $I_{Ca-L}$ 。

10 $\mu$ l/ml 参麦注射液对峰值  $I_{Ca-L}$  无明显影响, 仅由用药前的  $(-6.9 \pm 0.6)$  pA/pF 增加到  $(-7.5 \pm 0.7)$  pA/pF ( $P > 0.05$ ), 增加率仅为  $(9.2 \pm 2.8)\%$ 。50 $\mu$ l/ml、100 $\mu$ l/ml 的参麦注射液可使  $I_{Ca-L}$  的峰值分别增加至  $(-8.4 \pm 0.6)$  pA/pF 和  $(-9.2 \pm 0.6)$  pA/pF, 增加率分别为  $(22.4 \pm 1.7)\%$  和  $(34.6 \pm 4.6)\%$ , 与用药前比较, 差异均有显著性 ( $P < 0.05$ )。

3 参麦注射液对  $I_{Ca-L}$  电流-电压关系曲线的影响  
在保持电位为  $-80$  mV 施以  $300$  ms 阶跃为  $10$  mV, 从

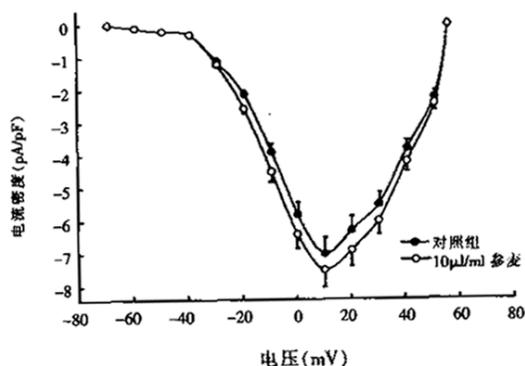


图 1 10 $\mu$ l/ml 参麦对大鼠膈肌细胞电流密度-电压关系曲线的影响

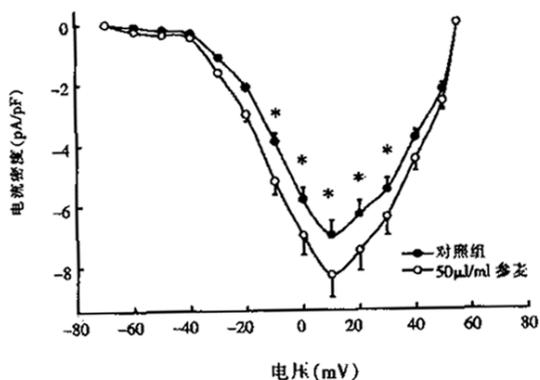


图 2 50 $\mu$ l/ml 参麦对大鼠膈肌细胞电流密度-电压关系曲线的影响  
注: 与对照组比较, \*  $p < 0.05$

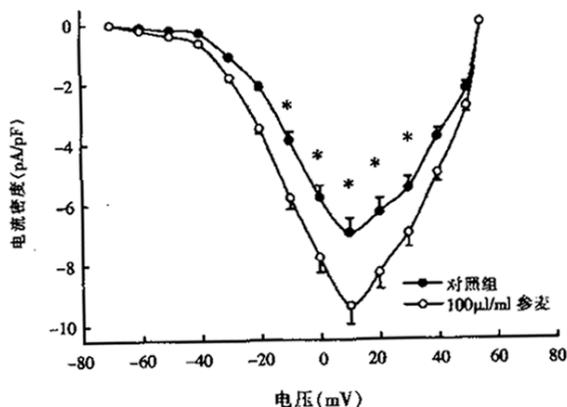


图 3 100 $\mu$ l/ml 参麦对大鼠膈肌细胞电流密度-电压关系曲线的影响  
注: 与对照组比较, \*  $p < 0.05$

$-40$  mV 至  $+60$  mV 的系列去极化脉冲, 频率  $0.1$  Hz, 充分激活  $I_{Ca-L}$ , 得到各个测试电压下的 L 型钙电流值, 电流值以细胞膜电容标准化后可得电流密度, 绘制对照组、不同浓度参麦注射液作用下的电流密度-电压关系曲线 (见图 1~3)。由图可见, 10 $\mu$ l/ml 参麦注射液对电流密度-电压关系曲线无明显影响, 50 $\mu$ l/ml 和 100 $\mu$ l/ml 参麦注射液在膜电位为  $-20$  mV ~  $+40$  mV 时, 可明显增加不同测试电压所激发的  $I_{Ca-L}$  峰值, 差异有显著性 ( $P < 0.05$ ), 但并不影响  $I_{Ca-L}$  的最大激活电位。

### 讨 论

膈肌细胞上有两大类的钙离子通道, 即电压依赖性钙通道和受体依赖性钙通道<sup>[6]</sup>。由于对受体依赖性钙通道的本质了解较少, 因此对钙通道的研究主要集中在电压依赖性钙通道上。电压依赖性钙通道的开关主要取决于膜电位的变化, 包括有 L 型钙通道和 T 型钙通道两个主要亚型。L 型钙通道为长时程钙通道, 激活较慢, 激活电压相对较高, 维持时间较长。T 型钙通道为短时程钙通道, 电流激活快, 失活也快, 维持时间较短, 激活电压较低。利用全细胞膜片钳技术, 测得膈肌细胞的 T 型钙通道在  $-40$  mV ~  $-20$  mV 时被快速激活, 快速失活后出现 L 型钙电流, 它可被尼莫地平完全阻滞。两条通道相比, 对二氢吡啶敏感的 L 型钙通道是最为重要的一型。因为这条通道提供了通过 T 管去极化导致快速钙离子内流的主要途径, 介导了膈肌的兴奋收缩耦联过程<sup>[5]</sup>。本实验发现, 大鼠膈肌细胞 L 型钙电流的峰值出现在  $+10$  mV, 反转电位为  $+60$  mV, 与文献报道相一致<sup>[5]</sup>。

参麦注射液是近十年来研究的老药新用。参麦注射液的主要原料为红参和麦冬, 在临床上除具有治疗冠心病、抗休克、提高免疫功能等功能外, 还用于慢性肺心病、膈肌疲劳的治疗<sup>[9]</sup>。尽管参麦注射液已被证实具有改善膈肌舒缩的功能, 其机制可能是通过促进细胞外  $Ca^{2+}$  的内流, 达到增加膈肌收缩力的作用<sup>[10]</sup>。但缺乏有关其电生理作用和离子通道机制的研究。本实验研究利用全细胞膜片钳方法观察参麦注射液对大鼠膈肌细胞 L 型钙通道电流的影响, 发现参麦注射液对膈肌细胞膜的钙通道具有剂量依赖性的促进作用, 增加 L 型钙电流的幅度, 从而增加  $Ca^{2+}$  内流, 增强膈肌收缩。而且该作用不改变  $I_{Ca-L}$  的最大激活电位, 此作用可能是其发挥治疗膈肌疲劳效应的离子通道机制之一。参麦注射液对膈肌的其他更确切的机制尚有待

于进一步的研究。

参 考 文 献

- 1 Vassilakopoulos T, Zakyntinos S, Roussos CH. Respiratory muscles and waning failure. *Eur Respir J* 1996 ;9( 11 ): 2383—2391.
- 2 Kolbeck RC, Speir WA. Theophylline, fatigue, and diaphragm contractility: cellular levels of  $45\text{Ca}^{2+}$  and cAMP. *J Appl Physiol* 1999 ;70( 5 ):1933—1937.
- 3 叶笃筠, 吴 萍, 牛汝楫. 参麦注射液改善疲劳膈肌舒缩功能的实验研究. *中国中西医结合杂志* 2000 ;20( 9 ): 679—681.
- 4 陶清国, 赵建平, 牛汝楫. 膈肌疲劳发病机理与治疗的实验和临床研究. *内科急危重症杂志* 1996 ;2( 2 ):62—64.
- 5 Patterson M, Constantin B, Cognard C, et al. Properties of calcium currents and contraction in cultured rat diaphragmatic muscle. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 1999 ;430:837—845.

- 6 Marie-Dominique Fratacci, Takeshi Shimahara, Roland Bournaud. cAMP-depedent modulation of L-type calcium currents in mouse diaphragmatic cells. *Respir Physiol* 1996 ;104: 1—9.
- 7 牛汝楫, 傅 娟, 刘辉国. 参麦注射液及氨茶碱对肺气肿大鼠小气道平滑肌细胞凋亡及相关基因表达的影响. *中国中西医结合杂志* 2002 ;22( 1 ):40—42.
- 8 Hammill OP, Matry A, Neher E, et al. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recordings from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 1981 ;391:85—100.
- 9 尹丽慧, 沃兴德. 参麦注射液的药理和临床研究进展. *浙江中医学院学报* 2001 ;25( 6 ):65—68.
- 10 Zhao Jianping, Niu Ruji. Experiment study on the effect of Sheng-Mai Injection on the contractivity of diaphragm and its mechanism. *CMJ* 1995 ;108( 2 ):90—94.

( 收稿 2002-04-15 修回 2003-04-20 )

## 芍药甘草汤治疗高泌乳素血症型女性不孕症临床观察

徐吉祥

芍药甘草汤出自《伤寒论》,由白芍药、炙甘草组成,功效缓急止痛。2000 年 7 月—2002 年 11 月 笔者采用芍药甘草汤颗粒剂治疗高泌乳素血症(HPRL)型女性不孕症,疗效与溴隐亭相当,却无后者头晕头痛、恶心呕吐等不良反应,兹报告如下。

临床资料 60 例患者均符合以下诊断标准(1)婚后同居未避孕 2 年以上不孕者(2)妇科常规体检无异常者(3)月经稀发、基础体温(BBT)单相型或不典型双相体温(4)血清泌乳素(PRL) $>21\text{ng/ml}$ 。按就诊顺序随机分为两组。治疗组 30 例,年龄 23~33 岁,平均(27.8 $\pm$ 4.9)岁;病程 2~8 年,平均(2.89 $\pm$ 1.50)年;原发性不孕 21 例,继发性不孕 9 例。对照组 30 例,年龄 22~32 岁,平均(27.6 $\pm$ 4.4)岁;病程 2~7 年,平均(3.05 $\pm$ 0.80)年;原发性不孕 22 例,继发性不孕 8 例。

治疗方法 治疗组:用芍药甘草汤颗粒剂(生白芍 20g 炙甘草 12g,三九医药股份有限公司生产的单味中药浓缩颗粒,文中所标剂量均是生药剂量)治疗,每天 1 剂,分 2 次水冲服,28 天为 1 个疗程。气血不足者加黄芪 10g,当归 10g,阴虚火旺者加知母 10g,黄柏 6g,气滞血瘀者加香附 10g,川芎 6g,寒凝经脉者加吴茱萸 3g,肾虚腰痛者加川续断 20g,菟丝子 20g,乳汁分泌较多者加炒麦芽 20g。共治疗(3.2 $\pm$ 1.1)个疗程。

对照组用溴隐亭(每片 2.5mg,瑞士山德士药厂产品)治疗,初次剂量每天 1.25mg,餐中服,然后在 3~7 天内加至每天 5~75mg。其中 13 例因胃肠反应严重将口服改为每晚就寝时阴道内放入(月经期仍用口服法),每天 5mg。28 天为 1 个疗程,共治疗(3.2 $\pm$ 1.0)个疗程。

结果 (1)疗效标准:痊愈:PRL $<21\text{ng/ml}$ ,临床症状消失并妊娠(尿 HCG 试验阳性,BBT 高温相持续 21 天以上);显效:PRL $<21\text{ng/ml}$ ,临床症状明显好转,月经周期基本正常,BBT 由单相变为双相;有效:PRL 明显下降,但仍 $>21\text{ng/ml}$ ,临床症状好转,BBT 仍为单相或不典型双相体温;无效:PRL 下降不明显,临床症状有所好转,BBT 仍为单相或不典型双相体温。(2)结果 治疗组痊愈 15 例,显效 9 例,有效 3 例,无效 3 例,总有效率 90%;对照组分别为 13 例,12 例,2 例,3 例,90%。两组总有效率比较差异无显著性。

讨论 HPRL 可引起不孕已被证实。多巴胺受体兴奋剂溴隐亭是治疗 HPRL 及其不孕症的特效药,但具有恶心、呕吐、头晕、头痛等副反应,且价格昂贵。根据患者经前乳胀、月经不调、溢乳闭经、肥胖不育等表现,笔者认为本症以肝气郁结、疏泄失常为主,可兼有痰瘀阻滞、脾虚血亏、肝肾阴虚。芍药甘草汤中白芍药苦酸微寒,入肝脾血分,和血脉,收阴气,敛逆气,散恶血,益气除烦,补劳退热,作为主药。甘草味甘,能补能泻、可升可降、协和诸药,通行十二经脉,炙用性温,补中脏而益三焦元气且能散表寒,作为辅药。两药同用,一泻一补,有升有降,能行能守,可敛可散,温清相宜,有疏肝解郁、安脾缓急之功,及益气养血、散瘀通经之效,然酸甘相合更有补阴血而具益肝肾之妙。临床应用结合辨证加入相应之药物,使之更扣 HPRL 不孕病机,坚持治疗,多有良效。且具有药价低廉,携带、服用方便等优点。

( 收稿 2003-02-08 修回 2003-04-30 )