

冠心康对大鼠缺血心肌细胞ATP敏感钾通道的影响

张 娜 陈富荣 章怡祎 刘 萍

摘要 **目的** 观察中药复方冠心康对大鼠缺血心肌细胞ATP敏感钾(ATP-sensitive potassium channel, K_{ATP})通道的影响,进一步探讨冠心康保护心血管、抗心肌缺血可能的作用机制。**方法** 随机选取Wistar大鼠分为正常组、模拟缺血再灌注损伤模型组、模型加格列苯脲组、模型加吡那地尔组、模型加冠心康组、模型加冠心康加格列苯脲组,每组8只。用无钙台式液灌流10 min,停灌30 min再灌注45 min模拟心肌缺血再灌注损伤模型。检测各组心肌细胞钙-镁-ATP(Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP)酶、钠-钾-ATP(Na^{+} - K^{+} -ATP)酶活性及全细胞膜片钳技术的电流电压钳模式记录各组心室肌细胞的ATP敏感钾通道(K_{ATP} 通道)电流变化。**结果** 在缺血的基础上,中药复方冠心康可使 K_{ATP} 通道进一步开放,通道电流明显增大,与 K_{ATP} 通道开放剂吡那地尔具有同等开放效应($P>0.05$)。与模型组比较,冠心康组 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP酶、 Na^{+} - K^{+} -ATP酶含量明显增高($P<0.05$)。**结论** 中药复方冠心康对于心肌缺血再灌注损伤具有一定的干预作用,促进 K_{ATP} 通道开放,减轻 Ca^{2+} 内流,抑制 Ca^{2+} 超载可能是冠心康在心肌缺血过程中发挥干预作用的有效途径。

关键词 冠心康; 心肌细胞; 缺血再灌注损伤; ATP敏感钾通道(K_{ATP} 通道)

Effect of Guanxinkang on ATP-sensitive Potassium Channel in Myocardial Cells of Rat with Ischemic/Reperfusion Injury ZHANG Na, CHEN Fu-rong ZHANG Yi-yi, et al *Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai (200032)*

ABSTRACT **Objective** To investigate the effect of Guanxinkang (GXK) on ATP-sensitive potassium channel in myocardial cells of rat with ischemic/reperfusion injury and its possible mechanism for cardiac vascular protection and anti-myocardial ischemia. **Methods** Wistar rats were established into I/R injured models by 10 min perfusion—30 min no-flow ischemia—45 min reperfusion, and divided into 5 groups: the I/R model group and 4 treatment groups treated respectively with glibenclamide, pinacidil, GXK and GXK+glibenclamide. Rats' heart were isolated for detecting Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase, Na^{+} - K^{+} -ATPase activity in myocardial cells, and the changes of current in ATP-sensitive potassium channel (K_{ATP}) was recorded by whole patch clamp technique. Data were controlled by those taken from normal rats in a control group. **Results** K_{ATP} in the GXK treated group were higher than that in the I/R model group; and similar to that in the pinacidil treated group ($P>0.05$). As compared with the model group, activities of Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase and Na^{+} - K^{+} -ATPase in the GXK treated group were increased significantly ($P<0.05$). **Conclusion** GXK shows definite intervention effect on myocardial I/R injury; which is possibly by way of furthering the opening of K_{ATP} channel, decreasing Ca^{2+} influx, and inhibiting Ca^{2+} overload.

KEYWORDS Guanxinkang; myocardial cell; ischemia/reperfusion injury; ATP-sensitive potassium channel

ATP敏感钾(ATP-sensitive potassium channel, K_{ATP})通道在调节心肌细胞缺血、缺氧的病理生理反应中起了重要作用。中药复方冠心康以栝楼薤白半夏汤为基础加减化裁而成,具有健脾益气、活血化瘀、祛痰降浊的功效。前期临床研究表明,本方对于气虚血瘀痰浊型高脂血症及冠心病患者具有明显的调脂、抗心肌缺血和缓解心绞痛作用;离体实验表明,该方能

明显改善受损的人血管内皮细胞分泌功能,减少内皮细胞与单核细胞的黏附,从而减少血管内皮损伤,保护心功能^[1];动物实验表明,该方可明显缩短豚鼠模拟缺血早期(5 min)和再灌注早期(1 min)心肌90%动作电位时程^[2]。本实验在以往研究基础上,应用全细胞膜片钳技术及生化法,观察冠心康对缺血心肌细胞 K_{ATP} 通道的作用,进一步探讨冠心康保护心血管、抗心肌缺血、缓解心绞痛可能的作用机制,为冠心康治疗冠心病提供实验依据。

基金项目:上海市教委重点项目(No. 07ZZ56);国家教育部科学技术研究重点项目(No. 208042)

作者单位:上海中医药大学附属龙华医院(上海 200032)

通讯作者:刘 萍, Tel: 021-64385700转6201, E-mail: liuping

23@sina.com

材料与方法

1 动物 Wistar大鼠,雄性,200~300 g,由

上海斯莱克实验动物有限公司提供[SCXK(沪)2007-0005]。

2 中药制剂 复方冠心康由黄芪、薤白、全栝楼、益母草、丹参、葛根、制半夏、山楂组成，为院内制剂，由上海中医药大学附属龙华医院药剂科制为注射剂（生药1 g/mL）。

3 试剂 II型胶原酶(collagenase type II)为Worthington公司制品；格列苯脲(glibenclamide, 5 g/支, 批号58H0570)、吡那地尔(pinacidil, 100mg/支, 批号60K1387)、MgATP均为Sigma公司制品；格列苯脲、吡那地尔先溶解于二甲亚砜(DMSO)分别配制成母液10 mmol/L和50 mmol/L, 冷藏保存；牛血清白蛋白(BAS)为AMRESCO公司制品；HEPES、牛磺酸(taurine)等为国产分析纯。考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒、钙-镁-ATP(Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP)酶测定试剂盒、钠-钾-ATP(Na^{+} - K^{+} -ATP)酶测定试剂盒均由南京建成生物工程研究所提供。

4 实验仪器 超级恒温槽由上海衡平仪器厂生产；pH精密数显酸度计由上海天达仪器厂生产；压力换能器由复旦大学电子工程系研制；Langendorff灌流装置由保定兰格恒流泵有限公司生产；倒置显微镜由德国laica公司生产；微操纵器由美国BURLEIGH公司生产；PM8000加药系统由美国MDI公司生产；膜片钳放大器AXON200B、Pclamp6.0数据采集软件由美国AXON公司生产；垂直拉制仪pp-830由日本Narishige公司生产。

5 溶液 (1) 无钙台式液(mmol/L): NaCl 137.0、KCl 5.0、 MgSO_4 1.2、 NaH_2PO_4 0.5、Glucose 10.0、HEPES 10.0(用NaOH调pH至7.35~7.40)。

(2) 台式液(mmol/L): NaCl 137.0、 CaCl_2 1.8、KCl 5.0、 MgSO_4 1.2、 NaH_2PO_4 0.5、Glucose 10.0、HEPES 10.0(用NaOH调pH至7.35~7.40)。(3) 细胞保护液(KB液, mmol/L): KOH 70.0、KCl 40.0、 KH_2PO_4 20.0、L-谷氨酸 50.0、 MgCl_2 3.0、牛磺酸 20.0、EGTA 0.5、HEPES 10.0、Glucose 10.0(用KOH调pH至7.35~7.40)。(4) 记录 K_{ATP} 通道电流的细胞外液(mmol/L): NaCl 137.0、 CaCl_2 1.2、KCl 5.0、 MgSO_4 1.2、 NaH_2PO_4 0.5、glucose 10.0、HEPES 10.0(用NaOH调pH至7.35~7.40)。(5) 记录 K_{ATP} 通道电流的细胞内液(mmol/L): NaCl 10.0、 CaCl_2 1.0、KCl 125.0、MgATP 1.0、HEPES 10.0、EGTA 14.0(用KOH调pH至7.1)。

6 实验分组 随机选取大鼠分为正常组、模拟缺血再灌注损伤模型组、模型加格列苯脲(Glibenclamide, K_{ATP} 通道的特异性阻断剂)组(格

列苯脲组)、模型加吡那地尔(Pinacidil, K_{ATP} 通道开放剂)组(比那他尔组)、模型加冠心康组(冠心康组)、模型加冠心康加格列苯脲组(冠心康加格列苯脲组)，每组8只。

7 心肌细胞的分离 将大鼠麻醉后快速开胸取出心脏，置于4℃氧饱和台式液中修剪，经主动脉插管，连于Langendorff灌流装置上，行恒压逆行灌流。灌流液均用95% O_2 +5% CO_2 饱和，灌流系统温度维持在37℃，流速为8~10 mL/min。先用无钙台式液灌流10 min，再用含II型胶原酶0.5 mg/mL和20 $\mu\text{mol/L}$ Ca^{2+} 的低钙台式液灌流30 min，至心脏体积膨大，流出液变黏稠，甚或出现拉丝，取下心脏，将心室肌剪下，置于KB液中剪碎，用开口光滑的吸管轻轻吹打，孵化10 min，得到的细胞悬液用200目细尼龙网过滤。室温下将滤液的 Ca^{2+} 浓度逐步恢复到1.25 mmol/L，即可得到70%~80%呈杆状且横纹清晰的耐钙心室肌细胞。在室温下保存备用，活性可保持8~10 h。

8 心肌细胞缺血再灌注模型制备^[3, 4] 将大鼠麻醉后快速开胸取出心脏，置于4℃氧饱和台式液中修剪，经主动脉插管，连于Langendorff灌流装置上，行恒压逆行灌流。灌流液均用95% O_2 +5% CO_2 饱和，灌流系统温度维持在37℃，流速为8~10 mL/min。先用无钙台式液灌流10 min后停止灌流30 min，再用无钙台式液灌注45 min，然后用含II型胶原酶0.5 mg/mL和20 $\mu\text{mol/L}$ Ca^{2+} 的低钙台式液灌流30 min，至心脏体积膨大，流出液变黏稠，甚或出现拉丝，取下心脏，将心室肌剪下，置于KB液中剪碎，用开口光滑的吸管轻轻吹打。孵化及复钙过程同上。

9 膜片钳全细胞记录 将复钙后的细胞悬液滴入灌流槽中，置于倒置显微镜工作台上，待细胞贴壁后使用细胞外液灌流冲洗，选取贴壁牢固，边缘整齐，形态规整，横纹清晰，无自主收缩的细胞进行实验。采用标准膜片钳全细胞记录方法。玻璃微电极充灌电极内液后，电极电阻为3~5 M Ω ，给予适当负压吸引，使电极与细胞表面形成高阻封接，继续加大负压破膜，给予电容及串联电阻补偿，形成全细胞记录。将各加药组药物分别加入灌流槽中(格列苯脲10 $\mu\text{mol/L}$ 、吡那地尔50 $\mu\text{mol/L}$ 、冠心康1 ml/L)，待反应10~15 min后进行电流记录。电流信号经Ag/AgCl电极引导，由膜片钳AXON 200B放大器放大，电流的记录采用电压钳制方式，数据的采集及分析处理由Pclamp 6.0软件完成。

10 样本保存 将各组大鼠急性分离所得细胞液室温放置1 h，各加药组将药物直接加入细胞液中，4℃放置24 h后将细胞液冻存于-80℃备用。

11 生化法检测各组心肌细胞Ca²⁺-Mg²⁺-ATP酶、Na⁺-K⁺-ATP酶活性 将细胞液解冻、离心，留下层细胞，每管加入1 mL生理盐水制备成10⁶~10⁷个/cm³，即10⁶~10⁷个/mL，再用超声粉碎机进行破碎。取细胞破碎好的样本0.2 mL按样本：生理盐水=1：4稀释，考马斯亮蓝法测定蛋白含量。按Ca²⁺-Mg²⁺-ATP酶测定试剂盒、Na⁺-K⁺-ATP酶测定试剂盒操作说明配液、操作，测定Ca²⁺-Mg²⁺-ATP酶测定试剂盒、Na⁺-K⁺-ATP酶活性。

12 统计学分析 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用SPSS 16.0软件进行统计分析，组间差异比较使用方差分析，以P<0.05为组间差异有统计学意义。

结 果

1 冠心康对大鼠心肌细胞K_{ATP}通道电流的影响 (表1) 正常状态下，心肌细胞K_{ATP}通道是不开放的，因此，将细胞膜电位钳置于-40 mV，给予10 s从-120~80 mV的斜坡刺激诱发背景电流。在0 mV测试电压下，模型组电流有明显增高的趋势，与正常组比较差异有统计学意义(P<0.01)，提示模型组的缺血心肌细胞外向电流显著增加；而给予K_{ATP}通道阻断剂格列苯脲干预后，心肌细胞K_{ATP}通道电流显著降低，与模型组比较差异有统计学意义(P<0.01)，提示K_{ATP}通道阻断剂可减弱缺血心肌细胞外向电流；给予K_{ATP}通道开放剂吡那地尔干预后，心肌细胞K_{ATP}通道电流显著增加，与模型组比较差异有统计学意义(P<0.01)，提示K_{ATP}通道开放剂进一步诱发了缺血心肌细胞外向电流；同样，给予中药冠心康干预后，心肌细胞K_{ATP}通道电流明显增加，与模型组比较差异有统计学意义(P<0.01)，提示缺血心肌细胞经中药冠心康干预后，呈现明显增强的外向电流，而在加入格列本脲后，能够阻断这部分电流，推测冠心康可能具有K_{ATP}通道开放剂样作用；但是吡那地尔组与冠心康组两者对心肌细胞K_{ATP}通道电流的影响无统计学意义(P>0.05)，提示两者对于K_{ATP}通道具有同等的开放效应。

以电流对电压作图，可得到IK_{ATP}的电流-电压关系曲线(I-V)。在0~20 mV测试电压范围内，显示明显

增强的外向电流，缺血的心肌细胞（或给予K_{ATP}通道开放剂吡那地尔），电流曲线中后段抬高，与背景电流比较，高出的部分即为开放的K_{ATP}通道电流（图1）。

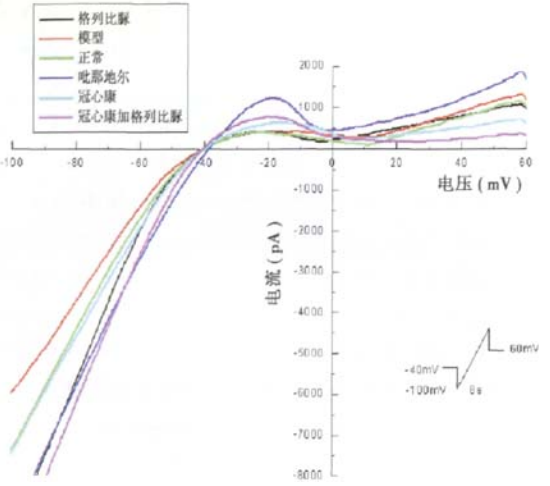


图1 模拟缺血和冠心康对大鼠心室肌细胞IK_{ATP}-V的影响

2 冠心康对大鼠缺血心肌细胞Na⁺-K⁺-ATP酶、Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase酶活性的影响 (表2) 与正常组比较，模型组Ca²⁺-Mg²⁺-ATP酶、Na⁺-K⁺-ATP酶显著降低，具有统计学意义(P<0.05)；与模型组比较，冠心康组及吡那地尔组Ca²⁺-Mg²⁺-ATP酶、Na⁺-K⁺-ATP酶含量明显增高，差异有统计学意义(P<0.05)。而冠心康加格列本脲组与冠心康组无明显统计学差异(P>0.05)，说明格列本脲没有阻断冠心康促进Ca²⁺-Mg²⁺-ATP酶及Na⁺-K⁺-ATP酶含量增高的作用。

表2 各组大鼠缺血心肌细胞Na⁺-K⁺-ATP酶及Ca²⁺-Mg²⁺-ATP酶比较 (U/mg pro, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	Na ⁺ -K ⁺ -ATP酶	Ca ²⁺ -Mg ²⁺ -ATP酶
正常	8	5.22 ± 0.85	1.60 ± 0.26
模型	8	2.45 ± 0.66*	0.96 ± 0.23*
格列苯脲	8	2.74 ± 0.69	0.95 ± 0.28 [▲]
吡那地尔	8	3.86 ± 1.03 ^Δ	1.46 ± 0.29 ^Δ
冠心康	8	3.53 ± 0.72 ^Δ	1.37 ± 0.28 ^Δ
冠心康加格列苯脲	8	3.41 ± 0.76	1.15 ± 0.23

注：与正常组比较，*P<0.05；与模型组比较，^ΔP<0.05；与冠心康组比较，[▲]P<0.05。

讨 论

在心肌缺血情况下，许多生理状态下不开放的离子通道会被激活，其中包括K_{ATP}通道。

由于细胞内的ATP浓度下降，ATP/ADP比率发生改变可致使K_{ATP}通道开放。K_{ATP}通道开放可促进钾外流，使细胞趋于复极化或超极化，使动作电位时程缩短，抑制钠、钙通道激活，减少钙离子内流，减轻心肌细胞内钙超负荷，降低钙超载，使心肌收缩力降低，降低心肌

表1 各组大鼠心室肌细胞K_{ATP}通道电流比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	0mV (pA)
正常	8	83.38 ± 20.02* ^Δ [▲]
模型	8	211.46 ± 28.51 [▲]
格列苯脲	8	129.51 ± 26.22* ^Δ [▲]
吡那地尔	8	317.52 ± 28.59*
冠心康	8	313.44 ± 18.51*
冠心康加格列苯脲	8	202.08 ± 17.82 ^Δ [▲]

注：与模型组比较，*P<0.01；与吡那地尔组比较，^ΔP<0.01；与冠心康组比较，[▲]P<0.05

耗氧量,从而产生心肌保护作用^[5]。因此, K_{ATP} 通道的开放在心肌缺血、缺氧的过程中起了积极的保护作用。

一般认为能被 $<100 \mu\text{mol/L}$ 的格列苯脲半阻断可作为判断一个通道是否是 K_{ATP} 通道的公认标准。 $10 \mu\text{mol/L}$ 格列苯脲对模拟缺血产生的外向电流的阻断率为68.5%^[6]。本实验采用缺血30 min—再灌注45 min模拟心肌缺血再灌注损伤,在此缺血缺氧状态下, K_{ATP} 有增大的趋势,统计学有显著性意义,给予 $10 \mu\text{mol/L}$ 格列苯脲可以阻断大部分增大电流,说明此模拟缺血所造成的缺血程度足以激活 K_{ATP} 通道。在此缺血的基础上,中药复方冠心康可使 K_{ATP} 通道进一步开放, K_{ATP} 明显增大。对于 K_{ATP} 通道,冠心康与 K_{ATP} 通道开放剂吡那地尔具有一致的开放效应,提示在心肌缺血时冠心康是有益于 K_{ATP} 通道开放的。冠心康可明显增加 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP酶、 Na^{+} - K^{+} -ATP酶活性,提示冠心康能够抑制 Ca^{2+} 超载,减轻 Ca^{2+} 内流。

中药复方冠心康方中黄芪健脾益气,薤白、枳椇、制半夏、山楂祛痰降浊,益母草、丹参活血化瘀,全方补虚祛邪、活血化瘀共同发挥疗效。现代药理研究表明,黄芪甲苷、黄芪多糖、黄芪总皂苷均能改善心肌缺血—再灌注时的心功能损伤^[7],丹参能产生类似心肌缺血预适应的病理生理过程,起到ATP敏感性钾通道开放剂效应^[8],葛根素预处理能抑制线粒体渗透性转换孔的开放、促进线粒体ATP敏感性钾通道的开放从而发挥抗心肌缺血—再灌注损伤的作用^[9],益母草对在体或离体心肌缺血—再灌注均有缺血预适应同等的心肌保护作用^[10]。

缺血对心肌细胞的电生理性能改变是多方面的,复杂的。中药是一个多靶点的作用过程,能产生多方面的疗效,其作用的分子机制也是多方面的。本研究结果表明促进 K_{ATP} 通道开放可能是冠心康在心肌缺血过程中发挥保护作用的一个有效途径。冠心康是否干预抗心肌缺血的其他保护机制有待于进一步研究和探讨。

参 考 文 献

- [1] 刘萍,章怡祎,张静生. 中药复方对损伤人血管内皮细胞表达细胞间黏附分子的影响[J]. 中国临床康复, 2006, 10 (27): 54-57.
Liu P, Zhang YY, Zhang JS. Effects of compound prescription on soluble intercellular adhesion molecule-1 expression of injured human vascular endothelial cells[J]. Chin J Clin Rehabil, 2006, 10 (27): 54-57.
- [2] 韩向辉,张娜,刘萍. 冠心康对豚鼠缺血再灌注心室乳头肌电生理特性的影响[J]. 上海中医药杂志, 2009, 43 (3): 58-62.
Han XH, Zhang N, Liu P. Effects of Guanxinkang Decoction on electrophysiological characteristics in isolated papillary muscles

in ischemia-reperfusion guinea pigs[J]. Shanghai J Tradit Chin Med, 2009, 43 (3): 58-62.

- [3] Dajarsi M, Vijay KK, Mahmood K, et al. N-Hydroxy-pyrroline modification of verapamil exhibits antioxidant protection of the heart against ischemia/reperfusion-induced cardiac dysfunction without compromising its calcium antagonistic activity[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2007, 323 (1): 119-127.
- [4] Wan TC, Ge ZD, Tampo A, et al. The A3 adenosine receptor agonist CP-532, 903 [N6-(2,5-dichlorobenzyl)-3'-aminoadenosine-5'-N-methylcarboxamide] protects against myocardial ischemia/reperfusion injury via the sarcolemmal ATP-sensitive potassium channel[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2008, 324 (1): 234-243.
- [5] 杨宝峰. 离子通道药理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 282-287.
Yang BF. Ion channel pharmacology[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2005: 282-287.
- [6] 全识非,宋治远,钟里,等. 模拟缺血对培养乳鼠窦房结细胞膜 K_{ATP} 通道电流的影响[J]. 重庆医学, 2007, 36 (10): 945-946
Tong SF, Song ZY, Zhong L, et al. Effect of simulated ischemia on current of K_{ATP} channel in cultured sinoatrial node cells in neonatal rats[J]. Chongqing Med, 2007, 36 (10): 945-946.
- [7] 周吉燕,樊懿,孔建龙,等. 黄芪中不同提取成分对在体大鼠心肌缺血—再灌注损伤的心功能影响[J]. 中国中药杂志, 2000, 25 (5): 300-302.
Zhou JY, Fan Y, Kong JL, et al. Effects of components isolated from astragalus membranaceus bunge on cardiac function injured by myocardial ischemia reperfusion in rats[J]. Chin J Chin Mater Med, 2000, 25 (5): 300-302.
- [8] 王腾,唐其柱,江洪,等. 丹参注射液对模拟缺血预适应引起兔心室肌细胞动作电位和ATP敏感性钾电流变化的影响[J]. 武汉大学学报(医学版), 2005, 26 (6): 696-699.
Wang T, Tang QZ, Jiang H, et al. Effects of salvia miltiorrhiza on action potential and ATP-sensitive potassium currents interfered by ischemic preconditioning in ventricular myocytes of rabbit[J]. Med J Wuhan Univ, 2005, 26 (6): 696-699.
- [9] 潘红阳,高琴,姚惠,等. 葛根素对离体大鼠缺血/复灌心脏的保护作用及其作用机制[J]. 中国应用生理学杂志, 2006, 22 (4): 455-459.
Pan HY, Gao Q, Yao H, et al. The protective role and the mechanisms of puerarin on isolated rat heart during ischemia/reperfusion[J]. Chin J Appl Physiol, 2006, 22 (4): 455-459.
- [10] 陈少如,陈穗,郑鸿翱,等. 益母草治疗心肌缺血或再灌注损伤及其机制研究[J]. 微循环杂志, 2001, 11 (4): 16-19.
Chen SR, Chen S, Zheng HA, et al. Curative effects of herba leonuri on myocardial ischemia or reperfusion injury and its mechanism[J]. Chin J Microcirc, 2001, 11 (4): 16-19.

(收稿: 2010-03-26 修回: 2010-08-02)