

白藜芦醇对豚鼠心室肌细胞钠电流的影响

杜景霞^{1,2}, 张晓华², 胡燕², 王建刚¹, 李艳¹, 金满文² (1. 河南科技大学医学院药理教研室, 河南 洛阳 471000; 2. 华中科技大学同济医学院药理系, 武汉 430030)

摘要:目的 研究白藜芦醇 (resveratrol, RES) 对豚鼠心室肌细胞钠电流 (I_{Na}) 的影响, 探讨其心肌保护机制。方法 用全细胞膜片钳技术记录 RES 对单个心室肌细胞 I_{Na} 的作用。结果 RES (10, 30, 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 浓度依赖性的抑制豚鼠心室肌细胞 I_{Na} , 其中 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 对 I_{Na} 的抑制率为 $(17.3 \pm 3.1)\%$ ($P < 0.005$), 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 抑制率 $(52.7 \pm 10.2)\%$ ($P < 0.01$), 抑制作用迅速, 用药后 3 min 左右即开始起效, 洗脱后均可以完全恢复; 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 使半数最大失活电压 ($V_{1/2}$) 由 $(-89.3 \pm 2.0) \text{mV}$ 变化到 $(-100.7 \pm 3.3) \text{mV}$ ($P < 0.005$), RES 未改变 S 和半数最大激活电压 ($V_{1/2}$)。结论 RES 浓度依赖性的抑制 I_{Na} , 作用出现快, 并且可逆。

关键词: 白藜芦醇; 心室肌细胞; 钠电流

中图分类号: R285.5; R965.1; R972

文献标识码: A

文章编号: 1007-7693(2008)04-0290-04

作者简介: 杜景霞, 女, 硕士, 讲师

Tel: (0379) 65602819

E-mail: dujingxia2005@163.com

Effects of Resveratrol on Sodium Current in Guinea Pig Ventricular Myocytes

DU Jing-xia^{1,2}, ZHANG Xiao-hua², HU Yan², WANG Jian-gang¹, LI Yan, JIN Man-wen² (1. Pharmacology Department, Medical College of Henan University of Science and Technology, Luoyang 471000, China; 2. Department of Pharmacology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the effects of resveratrol (RES) on sodium current (I_{Na}) in guinea pig ventricular myocytes, and to investigate the mechanism of cardioprotection. **METHODS** Single cardiac myocytes were isolated by enzyme, and the effect was assessed by whole-cell patch clamp technique. **RESULTS** RES (10, 30, 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) was shown to inhibit I_{Na} of guinea pig ventricular myocytes in a concentration dependent manner, and the inhibition ratios of 30, 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ were $17.3\% \pm 3.1\%$ ($P < 0.005$) and $52.7\% \pm 10.2\%$ ($P < 0.01$), respectively. RES acted quickly (about 3 min) and its effects were reversible completely after a 10 min washout. For availability, $V_{1/2}$ was (-89.3 ± 2.0) mV in control and (-100.7 ± 3.3) mV in 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ RES ($P < 0.005$). The maximal activating voltage and S of I_{Na} were not changed. **CONCLUSION** RES can exhibit direct inhibitory effects on I_{Na} rapidly in guinea pig ventricular myocytes, and these effects are reversible.

KEY WORDS: resveratrol; ventricular myocytes; sodium current

RES是一种非黄酮类多酚化合物,化学名为3,5,4'-三羟基反-二苯代乙烯(3,5,4'-trihydroxystilbene)。天然的RES存在于葡萄皮、花生及中药虎杖等植物中,是一种植物抗毒素,在恶劣环境或是在植物受到霉菌感染时产生^[1]。1992年Seimann和Creasy报道在红葡萄酒中发现了RES的存在^[2]。目前学者普遍认为,RES是红葡萄酒中发挥心血管保护作用的主要功能因子。RES能够比红葡萄酒中的其他多酚类物质具有更强的心血管保护作用^[3]。对其保护机制研究较多,包括抗氧化^[3,4]、抑制血小板聚集^[5]、增加eNOS和nNOS的表达并提高其活性^[6]、舒张血管^[7]、抗血管平滑肌细胞增殖^[8]、抑制血管紧张素II引起的心肌细胞肥大^[9]、抗心律失常^[6]等作用。也有报道^[10]RES对豚鼠心室肌细胞钙电流的快速抑制作用,但对心室肌细胞 I_{Na} 的作用未见报道。本研究RES对豚鼠心室肌细胞 I_{Na} 是否有直接的作用,进一步探讨其心肌保护作用机制。研究单个心肌细胞,优点在于确保了药物的直接作用,作用浓度准确可靠。

1 材料与方法

1.1 溶液和试剂

Tyrod液成分($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$): NaCl 135, KCl 5.4, CaCl_2 1.8, MgCl_2 1, NaH_2PO_4 0.33, Glucose 10, HEPES 10,用NaOH调节pH至7.3。无钙台氏液为Tyrod液中去掉 CaCl_2 。记录 I_{Na} 的电极外液($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$): NaCl 5, choline-Cl 120, CsCl 20, MgCl_2 1, HEPES 5, CaCl_2 1, Glucose 10,用CsOH调节pH至7.3,加入100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CdCl_2 阻断 Ca^{2+} 电流。记录 I_{Na} 的电极内液($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$): NaCl 5, CsCl 110, CsF 20, MgCl_2 2.5, Cs-EGTA 5, HEPES 5, Mg-ATP 5, GTP 0.1,用CsOH调节pH至7.3。保存细胞用的KB液成分($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$): KCl 110, KH_2PO_4 10, Glucose 20, HEPES 10, Taurine 10, MgSO_4 1.8, Potassium glutamate 120, EGTA 0.5,用KOH调节pH至7.2。

RES从湖南洪江华光生物有限责任公司购进,纯度99.11%。用二甲基亚砜(DMSO)溶解,配置成储备液浓度为0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, -20°C 避光保存。临用前稀释至少1 000倍。

胶原酶II型和蛋白酶E购自Worthington公司。HEPES, BSA, EGTA, choline-Cl, Taurine, Mg-ATP, GTP均为Sigma公司产品。其余药品为国产分析纯。

1.2 豚鼠心室肌细胞分离

采用酶解法制备单个心室肌细胞。体质量280~330 g的豚鼠,雌雄不拘,经20%氨基甲酸乙酯($120 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)腹腔麻醉后行气管插管,开胸,下腔静脉给予肝素500 $\text{u} \cdot \text{kg}^{-1}$,分离主动脉并插管,肺动脉减压,迅速取下心脏在 37°C 恒温 and 供氧(100% O_2)条件下行Langendorff灌流(主动脉压6.86 kPa)。先以Tyrod液灌流3 min,再以无钙台氏液冲洗3 min后,用含II型胶原酶10.5 mg,蛋白酶E 1.05 mg,BSA 25 mg的无钙台氏液25 mL循环灌流35~40 min,取下心脏,除去心房,取一小块儿左室心肌,稍剪后置于KB液中轻轻吹打至细胞分离,即得到分离的单个心室肌细胞。细胞放于 4°C 保存,静置1~2 h后用于实验。

1.3 全细胞膜片钳记录

采用全细胞膜片钳记录方法,在电压钳制下记录心室肌细胞 I_{Na} 。吸取细胞保存液数滴,加入1 mL细胞池内,待细胞沉底贴壁后,用细胞外液灌流,直至实验结束停止灌注。在倒置显微镜下选择横纹清晰无颗粒感,膜光滑完整,立体感强的杆状静止细胞为实验对象。实验在 20°C 左右完成。

玻璃毛坏(外径1.5 mm,南京泉水教学实验器材厂),经微电极拉制仪(Sutter, Japan)两步拉制后,尾端注射充灌电极内液。将电极固定于电极把持器上,通过把持器侧面吸管给予电极尖端一定正压并使其进入液面,入水后电阻为1.0 M Ω 左右。补偿液接电位后,调节三维操纵器并用微调将电极尖端移向细胞表面,放掉正压,轻施负压进行封接,使封接电阻达1 G Ω 以上,即形成高阻封接。补偿C_{fast}后,继续施加脉动负压冲破膜片形成全细胞记录模式,钳制电位-100 mV,补偿串联电阻 R_s ($R_s < 2.5 \text{ M}\Omega$)和C_{slow},以减少钳位误差和记录信号的失真。通过膜片钳放大器(HEKA, EPC-10, Germany)发放刺激冲动,激发的电流信号经AgCl-Ag电

板引导、放大器放大,由 A/D 转换器转换为数字信号,存于硬盘中以备分析。电流信号经截止频率 2.9 kHz 的四阶贝塞尔低通滤波,采样频率 5 kHz。

1.4 数据处理

实验资料采用“PULSE+PULSEFIT”软件包测定,资料分析和图表处理采用 Excel 和 Sigma Plot 软件。试验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验进行统计。检验标准 $P < 0.05$ $P < 0.01$ 。

2 结果

2.1 豚鼠心室肌细胞 I_{Na} 随时间变化的特点

形成全细胞模式后,在电压钳模式下,保持电位 -130 mV,给予幅值 -35 mV,时程 40 ms 的去极化刺激引出内向电流 I_{Na} 。连续观察 50 min 内豚鼠心室肌细胞钠电流 ($n = 9$) 的变化。可见从破膜后 13 min 至 50 min 电流处于稳定状态,给药及洗脱均在这段时间内完成。

2.2 DMSO 对豚鼠心室肌细胞 I_{Na} 的影响

DMSO 用钠外液稀释 1 000 倍后持续灌注细胞,实验方法同上,可以看出 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DMSO 对 I_{Na} 没有任何影响。

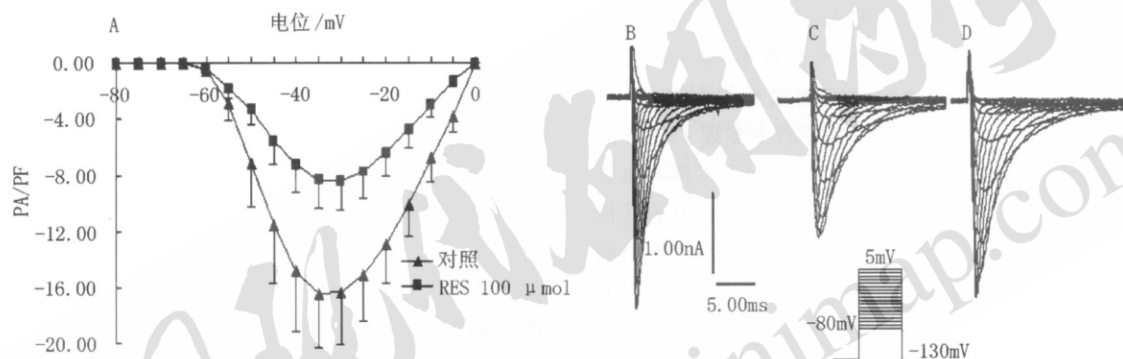


图 1 RES ($100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 抑制豚鼠心室肌细胞 I_{Na} ($n = 5$, $\bar{x} \pm s$), 串刺激从 -130 mV ~ -80 mV, 阶跃 5 mV, 频率 0.1 Hz
A - RES ($100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 用药前后 I-V 曲线的变化; B - 正常对照; C - 给药 RES $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; D - 洗脱后几乎完全恢复

Fig 1 RES ($100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) blocks I_{Na} in guinea pig ventricular myocytes series stimulus from -130 mV to between -80 mV and +5 mV at 0.1 Hz ($n = 5$, $\bar{x} \pm s$)

A - control current-voltage (I-V) relationships and with RES ($100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); B - control C - RES $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; D - washout was almost complete

2.5 RES 对豚鼠心室肌细胞 I_{Na} 稳态激活和失活曲线的影响

采用标准双脉冲刺激法研究 I_{Na} 的失活。保持电位 -130 mV, 预先给以 5 mV 间距, 幅值 -130 ~ -55 mV, 频率 0.1 Hz 时程 1 000 ms 的去极化条件刺激脉冲, 每次条件刺激后将膜电位钳制在 -35 mV 上 25 ms 记录峰电流。以记录的 I_{Na} 与最大激活时的 $I_{Na, \max}$ 之比 (即 availability) 对条件脉冲电压作图得出 I_{Na} 的失活曲线。 I_{Na} 的稳态激活曲线是根据 I-V 计算所得, 电导 g 是各个脉冲电压下的电流与相应的脉冲电压之比, 然后计算出 $g/g_{\max}$ (即 activation) 对条件脉冲电压作图得出 I_{Na} 的激活曲线。根据 Boltzmann 方程 $y = 1/(1 + \exp((V_m - V_{1/2})/S))$ 对上述二曲线进行拟合, 计算得到失活 $V_{1/2}$ 为 -89.3 ± 2.0 mV, S 为 5.2 ± 0.5 mV ($n = 5$ from 3 specimens), $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ RES 分别使失活 $V_{1/2}$ 和 S 变化至 -100.7 ± 3.3 mV ($P < 0.005$) 和 5.6 ± 0.8 mV, 见图 2。得到激活 $V_{1/2}$ 为 -40.4 ± 4.4 mV, S 值为 -6.3 ± 0.4 mV ($n = 5$

2.3 RES 浓度依赖性的抑制豚鼠心室肌细胞 I_{Na}

实验方法同上, 观察 RES (10 30 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 对心室肌细胞 I_{Na} 的作用。发现 RES (30 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 浓度依赖性的降低 I_{Na} 峰值, 抑制率分别为 $17.3\% \pm 3.1\%$ ($n = 7$, $P < 0.005$) 和 $52.7\% \pm 10.2\%$ ($n = 6$, $P < 0.01$)。抑制作用快, 发生在给药后的 3 min 左右, 其中 $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 抑制作用在给药后的 7 min 左右达到最大, 而 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 抑制作用在给药后的 10 min 左右达到稳态。洗脱后均可以完全恢复。

2.4 RES 对豚鼠心室肌细胞 I_{Na} 电流-电压曲线 (I-V 曲线) 的影响

保持电位 -130 mV, 以 5 mV 的阶跃, 给予 -80 ~ +15 mV, 时程 40 ms 频率 0.1 Hz 的去极化脉冲, 得到 I_{Na} 的 I-V 曲线。本实验条件下, 豚鼠心室肌细胞的最大激活电压在 -30 mV 左右。加入 RES $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 8 min 后, 不改变激活电位、峰电位和曲线的形状, 但各电压条件下的 I_{Na} 峰值均降低, 在 -30 mV, I_{Na} 从给药前的 $(-16.36 \pm 3.75) \text{ pA/pF}$ 降低到 $(-8.40 \pm 2.04) \text{ pA/pF}$ ($n = 5$), 见图 1。

from 3 specimens), $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ RES 分别使激活 $V_{1/2}$ 和 S 变化至 -41.8 ± 4.1 mV ($P < 0.005$) 和 -5.8 ± 1.2 mV, 见图 2。可见, $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ RES 可显著增大失活 $V_{1/2}$, 未明显改变激活 $V_{1/2}$ 和 S 。

3 讨论

I_{Na} 是影响心肌兴奋性、不应性和传导性的重要离子流。 I_{Na} 异常导致一系列的心律失常, 尤其是心脏传导功能障碍。研究发现其浓度依赖性的抑制豚鼠心室肌细胞 I_{Na} , 使 I_{Na} 的 I-V 曲线上移, 提示 RES 在不同膜电位水平对 I_{Na} 均具有阻滞作用; RES 未明显影响通道的激活, 但可使失活曲线明显左移, 失活电压变大。这些均为 RES 的抗心律失常作用机制奠定了一定的分子基础。

心肌细胞膜上大量的钠-钙交换体, 是维持胞内钙离子浓度的重要机制之一。此交换体对细胞内 Na^+ 浓度的变化十分敏感。心肌细胞内 Na^+ 浓度的升高促使钠-钙交换体反

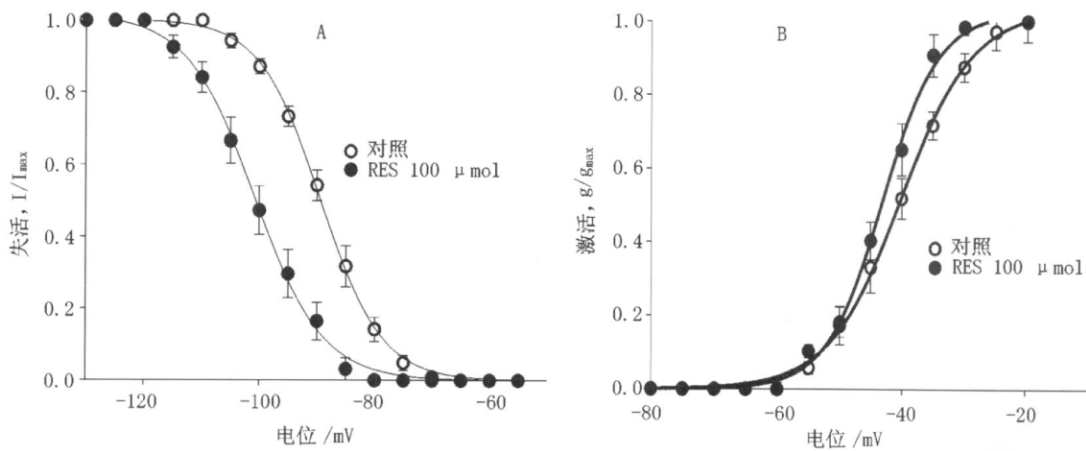


图 2 激活和失活曲线均左移,符合 Boltzmann 分布

A-电压依赖性失活曲线,对照组 $V_{1/2}$ 和 S 分别为 (-89.3 ± 2.0) mV 和 (5.2 ± 0.5) mV,而 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ RES 组分别为 (-100.7 ± 3.3) mV ($P < 0.005$) 和 (5.6 ± 0.8) mV; B-电压依赖性激活曲线,对照组 $V_{1/2}$ 和 S 分别为 (-40.4 ± 4.4) mV, (-6.3 ± 0.4) mV,而 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ RES 组分别为 (-41.8 ± 4.1) mV, (-5.8 ± 1.2) mV

Fig 2 Negative shift of activation and availability. They fitted to Boltzmann distribution

A- Voltage dependence of availability: $V_{1/2}$ and S were (-89.3 ± 2.0) mV and (5.2 ± 0.5) mV in control and (-100.7 ± 3.3) mV ($P < 0.005$) and (5.6 ± 0.8) mV in $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ RES. B- Voltage dependence of activation: $V_{1/2}$ and S were (-40.4 ± 4.4) mV and (-6.3 ± 0.4) mV in control and (-41.8 ± 4.1) mV and (-5.8 ± 1.2) mV in $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ RES

向转运,导致 Ca^{2+} 内流,并由此诱发肌浆网释放 Ca^{2+} ,最终使得胞内 Ca^{2+} 超载^[11]。钙超载在多种疾病所致心肌损伤的发展中起重要作用。已有报道^[10] RES对豚鼠心室肌细胞钙电流具有快速抑制作用,本实验结果显示 RES对 I_A 的抑制作用,二者相辅相成保护心肌免受胞内钙超载的损伤。

在今后的研究中,如果对 RES的安全性、临床有效性进行深入研究,有望将其开发成为防治心脑血管疾病的新药。

REFERENCES

- [1] JANG M, CAI L, UDEANIG O, *et al*. Cancer chemopreventive activity of resveratrol: a natural product derived from grapes [J]. Science 1997; 275: 218-220
- [2] SEMANN E H, CREAMY L L. Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine [J]. Am J Enol Vitic 1992; 43: 49-52
- [3] PARTHA S R, GAUTAM M, GERALD A C, *et al*. The red wine antioxidant resveratrol protects isolated rat hearts from ischemia reperfusion injury [J]. Free Radic Biol Med 1999; 27(1/2): 160-169
- [4] CAO Z, LI Y. Potent induction of cellular antioxidants and phase 2 enzymes by resveratrol in cardiomyocytes: protection against oxidative and electrophilic injury [J]. Eur J Pharmacol 2004; 489: 39-48
- [5] PENDURTHI U R, WILLIAMS J T, RAO L V. Resveratrol: a polyphenolic compound found in wine inhibits tissue factor expression in vascular cells: A possible mechanism for the cardiovascular benefits associated with moderate consumption of wine [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999; 19(2): 419-426
- [6] HUNG L M, SU M J, CHEN J K, *et al*. Resveratrol protects myocardial ischemia-reperfusion injury through both NO-dependent and NO-independent mechanisms [J]. Free Radic Biol Med 2004; 36(6): 774-781
- [7] ABDALLA M, EL M. Resveratrol Activates Membrane-Bound Guanylyl Cyclase in Coronary Arterial Smooth Muscle: A Novel Signaling Mechanism in Support of Coronary Protection [J]. Biochem Biophys Res Commun 2002; 291: 1218-1224
- [8] POUSSIER B, CORDOVA A C, BECQUEM N JP, *et al*. Resveratrol inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and induces apoptosis [J]. J Vasc Surg 2005; 42(6): 1190-1197
- [9] CHENG T H, LIU J C, LIN H, *et al*. Inhibitory effect of resveratrol on angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy [J]. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 2004; 369(2): 239-244
- [10] REGINALD L, MARK A S, KENNETH T M, *et al*. The red wine polyphenol resveratrol exerts acute direct actions on guinea-pig ventricular myocytes [J]. Eur J Pharmacol 2005; 519: 1-8
- [11] LEVIA J, SPITZER K W, KOHMOTO O, *et al*. Depolarization-induced Ca^{2+} entry via Na-Ca exchange triggers SR release in guinea-pig cardiac myocytes [J]. Am J Physiol 1994; 266: 1422-1433

收稿日期: 2007-05-12