

## 三七总皂甙对心肌动作电位及慢钙电流的影响

熊志刚、陈俊秀、孙家钧 (中山医科大学药理教研室, 广州 510089)

*Acta Pharmacologica Sinica* 1989 Mar; 10(2): 122-125Effects of *Panax notoginseng* saponins on cardiac action potentials and slow inward current

XIONG Zhi-Gang, CHEN Jun-Xiu, SUN Jia-Jun

(Department of Pharmacology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089)

**Abstract** The effects of total saponins of *Panax notoginseng* (PNS) on contraction force, normal and slow response action potentials and slow inward current of guinea pig papillary muscles were studied by intracellular microelectrodes and voltage clamp techniques. The contraction force was decreased and the  $APD_{20}$ ,  $APD_{90}$  of normal AP were shortened in the presence of PNS 1 mg/ml, while the RP, APA and  $V_{max}$  remained unchanged. The APA of slow AP induced with high  $K^+$  was decreased to 85% of its normal value after 20 min of perfusion with PNS solution.  $I_{si}$  was decreased from a peak value of  $9.8 \pm 2.0$  to effects of PNS on slow affecting  $I_{Na}$ . The  $6.9 \pm 3.6 \mu A$  without AP and  $I_{si}$  were reversed by increasing calcium concentration. The results indicate that PNS has a selective blocking effect on calcium channels.

**Key words** *Panax notoginseng*; saponins; papillary muscles; action potentials; voltage clamp; calcium channel blockers

**提要** 采用胞内微电极及电压钳制技术, 观察三七总皂甙(PNS)对豚鼠心室乳头状肌 $F_c$ 、快慢反应AP及 $I_{si}$ 的影响。PNS 1 mg/ml抑制 $F_c$ , 缩短快反应AP的2相平台期, 对RP, APA及 $V_{max}$ 无明显影响。PNS降低慢反应AP的APA, 缩短APD而延长ERP。PNS 1 mg/ml显著降低 $I_{si}$ 的幅度, 20 min后

其峰值下降30%, 提高 $Ca^{2+}$ 浓度可逆转此作用。表明PNS具有慢钙通道阻滞作用。

**关键词** 三七; 皂甙; 乳头状肌; 动作电位; 电压钳制; 钙通道阻滞剂

三七总皂甙(total saponins of *Panax notoginseng*, PNS)是从五加科人参属植物三七根中提取的有效成分, 近年发现PNS具有扩张血管降低血压<sup>(1)</sup>、抗实验性心律失常<sup>(2)</sup>及对抗 $Ca^{2+}$ 、去甲肾上腺素(NE)所诱发的离体血管条收缩<sup>(3,4)</sup>等作用, 提示PNS有钙拮抗作用。本文研究PNS对心肌动作电位(AP)、收缩张力( $F_c$ )及慢钙电流( $I_{si}$ )的影响, 进一步探讨其作用机理。

**Materials and methods**

**快反应AP及 $F_c$ 实验** 豚鼠, ♀♂兼用, 体重 $302 \pm SD 53 g$ 。击头致昏, 取心, 浸于 $4^\circ C$ 含 $O_2$ 营养液中。剪开右心室, 取出乳头状肌, 水平固定于2 ml的浴槽内, 循环灌流经 $O_2$ 饱和、恒温 $35^\circ C$ 的修改Locke液<sup>(5)</sup>, 流速 $5-10 ml/min$ , 平衡2 h后开始实验。

标本腱索端连于拉力换能器, 经前置放大器( $F_{ZG-1A}$ )后导入双线示波器(Vc-9)的上线, 显示 $F_c$ 的变化。所用玻璃微电极的尖端直径 $<0.5 \mu m$ , 充满KCl 3 mol/L, 电阻 $10-30 M\Omega$ 。微电极引出的AP, 经Ag-AgCl丝连

接到微电极放大器(MEZ-7101), 其输出端连于双线示波器的下线, 显示 AP 波形变化。微放输出端同时连接至 DAAS-1 生物信号实时分析仪<sup>(6)</sup>, 自动测量 AP 的各项参数。

采用 Ag-AgCl 刺激电极, 由多道电子刺激器(SEN-7103)提供方波, 经隔离器(SS-201 J)后刺激标本, 刺激参数为 1 Hz, 1 ms, 2 倍阈强度。

**慢反应 AP 实验** 提高 Locke 液中 KCl 浓度至 20 mmol/L, 为保持等渗, 相应减少 NaCl 浓度。加入异丙肾上腺素至 40 nmol/L, 适当增加刺激强度, 即可诱发慢反应 AP。

**电压钳制实验** 采用单蔗糖间隙电压钳制方法<sup>(7,8)</sup>。豚鼠右心室乳头状肌, 长 4-6 mm, 直径  $\leq 0.7$  mm, 细丝线结扎两端, 安放于由蔗糖间隙隔开而形成的三池浴槽内。蔗糖间隙由有机玻片及两侧的橡胶膜包围而成, 橡胶膜中央穿孔以便乳头状肌标本通过。浴槽左中右池分别灌流经 O<sub>2</sub> 饱和、恒温 35°C 的高 K<sup>+</sup> Tyrode 液、蔗糖溶液及正常 Tyrode 液。

单蔗糖间隙电压钳制原理见 Fig 1。玻璃微电极 A 插入心肌细胞, 记录膜内电位( $E_m$ ), 经微电极放大器后输送至电压钳制放大器(CEZ-1100), 与指令电位( $E_c$ )不断比较, 两者误差信号经放大后由电极 B 输送至心肌标本, 使膜内电位迅速钳制在指定水平, 此时流过细胞膜的电流由电极 C 记录。电极 D 连于微电极放大器(MEZ-8201), 用于监测蔗糖间隙两侧的电位差即间隙电位( $E_g$ )。

乳头状肌标本放后, 左中右三池均用正常 Tyrode 液灌流 30 min, 待损伤恢复后再换 3

种不同的溶液, 10 min 后间隙电位上升到最大值(约为 -80 mV)并保持稳定才开始膜电位钳制。

将维持电位( $E_h$ )置于静息电位水平, 指令电位( $E_c$ )为 -60 mV, 钳制时间( $T_c$ )为 500 ms, 可观察到一个快速内向电流, 即快钠电流  $I_{Na}$ 。先将维持电位置于 -40 mV, 使快钠通道失活<sup>(8)</sup>, 指令电位为 -20 mV, 只能记录到缓慢的内向电流, 即慢钙电流  $I_{si}$ 。

观察 PNS 对  $F_c$ 、快慢反应 AP 及  $I_{si}$  的影响, 实验结果采用自身前后对比, 各项参数给药前后在同一细胞内测定。

## Results

**PNS 对豚鼠右心室乳头状肌快反应 AP 及  $F_c$  的影响** PNS 0.5 mg/ml 灌流 20 min, 乳头状肌  $F_c$  降低 15%, AP 各项参数均无明显改变。PNS 1 mg/ml 灌流 20 min,  $F_c$  降低 32%, APD<sub>20</sub> 明显缩短, APD<sub>50</sub> 以及 APD<sub>90</sub> 亦相应缩短, 但 RP, APA 及  $V_{max}$  无显著性变化(Tab 1, Fig 2)。

Tab 1. Effects of total saponins of *Panax notoginseng* (PNS) 1 mg/ml on action potential and contraction force of guinea pig papillary muscles. n = 8,  $\bar{x} \pm SD$ . \* $P > 0.05$ , \*\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.01$

	Before	PNS	Washout
RP (mV)	82 ± 2	83 ± 1*	83 ± 1*
APA (mV)	112 ± 5	111 ± 4*	112 ± 4*
$V_{max}$ (V/s)	211 ± 35	213 ± 43*	211 ± 37*
APD <sub>20</sub> (ms)	85 ± 15	77 ± 14***	82 ± 13**
APD <sub>90</sub> (ms)	189 ± 32	180 ± 27**	187 ± 30*
ERP (ms)	186 ± 35	183 ± 33*	182 ± 35*
$F_c$ (mg)	62 ± 16	42 ± 19***	59 ± 16**

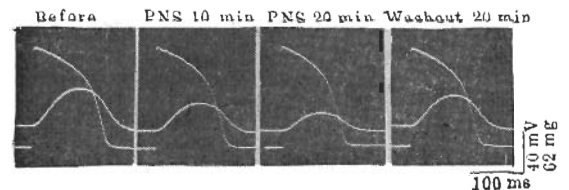


Fig 2. Effects of total saponins of *Panax notoginseng* (PNS) 1 mg/ml on action potential and contraction force of guinea pig papillary muscle.

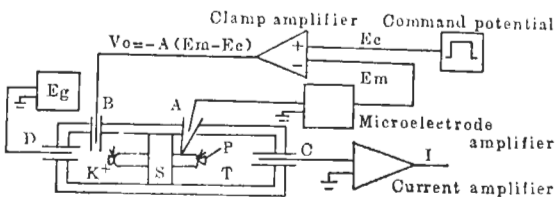


Fig 1. Schematic diagram of circuit for voltage clamp work with single sucrose gap method.

**PNS 对慢反应 AP 的影响** PNS 1 mg/ml 显著降低慢反应动作电位的 APA, 缩短 APD 而延长 ERP。给药 20 min, APA 降低 15%, APD<sub>50</sub> 缩短 18% 而 ERP 延长 17%。提高外钙浓度可逆转 PNS 的作用 (Tab 2, Fig 3)。

Tab 2. Effect of PNS 1 mg/ml on slow response action potential induced with high K<sup>+</sup>. n=8,  $\bar{x} \pm SD$ . \*P>0.05, \*\*P<0.05.

	Before	PNS
RP (mV)	54±2	54±3*
APA (mV)	73±5	62±14**
APD <sub>50</sub> (ms)	74±23	60±26**
APD <sub>90</sub> (ms)	85±30	70±27**
ERP (ms)	145±37	170±48**

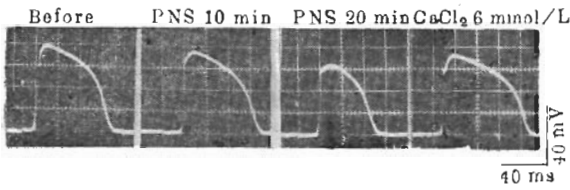


Fig 3. Effect of PNS 1 mg/ml on slow response action potential induced with high K<sup>+</sup> of guinea pig papillary muscle. This effect was reversed by increasing calcium concentration from 2.0 to 6.0 mmol/L.

**PNS 对豚鼠乳头状肌 I<sub>Na</sub> 及 I<sub>si</sub> 的影响** 当维持电位为 -80 mV, 指令电位为 -60 mV 时, 可记录到一个快速内向电流, 改变灌流液 Na<sup>+</sup> 浓度, 此电流的幅度随之改变; 河豚毒素 (TTX) 10 μmol/L 可抑制此电流, 表明为钠内向电流 I<sub>Na</sub>。PNS 1 mg/ml 灌流 20 min, I<sub>Na</sub> 峰值下降 3.8%, 与给药前比较不显著 (n=5) (Fig 4)。

将维持电位置于 -40 mV, 指令电位为 -20 mV 时, 只能记录到缓慢的内向电流, 改变灌流液 Ca<sup>2+</sup> 浓度, 此电流的幅度随之改变; 维拉帕米 (verapamil) 5 μmol/L 可抑制此电流, 表明为慢钙电流 I<sub>si</sub>。PNS 1 mg/ml 灌流 10 min, I<sub>si</sub> 峰值减小 18%, 20 min 后减小 30%。将 Tyrode 氏液中 Ca<sup>2+</sup> 浓度由 1.8 mmol/L 增加至

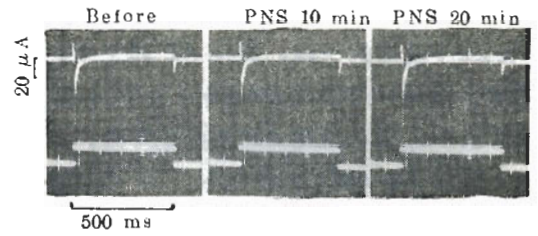


Fig 4. Effect of PNS 1 mg/ml on fast inward current (I<sub>Na</sub>) of guinea pig papillary muscle. Upper trace; transmembrane current; lower trace; transmembrane potential. Holding potential (E<sub>H</sub>) was -80 mV, command potential (E<sub>C</sub>) was -60 mV, clamp time (T<sub>C</sub>) was 500 ms.

Tab 3. Effects of PNS 1 mg/ml (n=10) and verapamil 5 μmol/L (n=8) on amplitude of slow inward current I<sub>si</sub> (μA) of guinea pig papillary muscles.  $\bar{x} \pm SD$ , \*P>0.05, \*\*\*P<0.01.

	PNS	Verapamil
Before	9.8±2.0	10.0±1.3
10 min	8.9±3.0**	5.8±1.4***
20 min	6.9±3.6***	3.9±1.6***
CaCl <sub>2</sub> 5.4 mmol/L	10.9±3.3*	9.8±2.1*

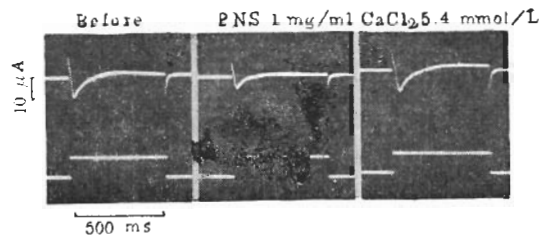


Fig 5. Effect of PNS 1 mg/ml on slow inward current (I<sub>si</sub>) of guinea pig papillary muscle. E<sub>H</sub> was -40 mV, E<sub>C</sub> was -20 mV. The effect of PNS on I<sub>si</sub> can be reversed by increasing calcium concentration from 1.8 to 5.4 mmol/L.

5.4 mmol/L, I<sub>si</sub> 逐渐恢复, 10 min 后达到给药前的 111% (Tab 3, Fig 5)。

## Discussion

心肌动作电位的 2 相平台期长短主要与 Ca<sup>2+</sup> 内流有关, 此期的 Ca<sup>2+</sup> 内流又是诱发心肌收缩的先决条件<sup>(9)</sup>。PNS 使豚鼠心室乳头状肌动作电位的 2 相平台期缩短, 收缩力降低, 初步表明其抑制 Ca<sup>2+</sup> 内流的作用。

与心肌动作电位形成有关的离子移动比较复杂<sup>(10)</sup>，为减少其它离子的影响，可将细胞外液  $K^+$  浓度提高，使心肌细胞膜除极，造成快钠通道失活，此时的动作电位主要由  $Ca^{2+}$  内流产生的慢钙电流形成。PNS 使慢反应动作电位的幅度减小，进一步说明其钙通道阻滞作用。

电压钳制实验可以直接观察不同离子电流的变化。PNS 显著降低  $I_{st}$  的幅度，而且这种降低作用在外  $Ca^{2+}$  浓度增加时可以被逆转，表明 PNS 确实具有慢钙通道阻滞作用。

PNS 对快反应动作电位的 APA 及  $V_{max}$  无明显影响，电压钳制结果亦表明对  $I_{Na}$  无明显作用，可以认为 PNS 不影响  $Na^+$  通道。本实验初步结果还发现 PNS 对非时间依赖性的  $K^+$  外向电流 (time-independent outward current) 亦无明显影响，表明 PNS 是一个选择性的慢钙通道阻滞剂。

**致谢** 加拿大 Alberta 大学药理学教授 W Y Dryden 赠送电压钳制浴槽并给予技术指导；广西梧州第三制药厂赠送三七总皂甙。

## References

1 Wang JD, Chen JX. Cardiac and hemodynamic actions of total saponins of *Panax notoginseng*.

- Acta Pharmacol Sin* 1984; 5 : 181
- 2 Liu S, Chen JX. Anti-arrhythmic effects of total saponins of *Panax notoginseng*. *Ibid* 1981; 5 : 100
- 3 Wu JX, Chen JX. Depressant actions of *Panax notoginseng* saponins on vascular smooth muscles. *Ibid* 1986; 9 : 147
- 4 Guan YY, He H, Chen JX. Effect of the total saponins of *Panax notoginseng* on contraction of rabbit aortic strips. *Ibid* 1985; 6 : 267
- 5 李少如、李之望、曾敬添、王世端。用浮置式细胞内电极 (floating microelectrode) 记录心肌细胞电位。见：周衍椒、赵軼干、王雨若，主编。生理学方法与技术。第 2 集。北京：科学出版社，1984 : 1-23
- 6 Zhang L, Gu PK, Zhao WB, et al. Effect of guan-fu base A on action potential of canine Purkinje fibers. *Acta Pharmacol Sin* 1986; 7 : 234
- 7 Beeler GW, Reuter H. Voltage clamp experiments on ventricular myocardial fibers. *J Physiol (Lond)* 1970; 207 : 165
- 8 Hino N, Ochi R. Effect of acetylcholine on membrane currents in guinea-pig papillary muscle. *Ibid* 1980; 307 : 183
- 9 Beeler GW, Reuter H. Reconstruction of the action potential of ventricular myocardial fibers. *Ibid* 1977; 268 : 177
- 10 Nayler WG, Horowitz JD. Calcium antagonists: a new class of drugs. *Pharmacol Ther* 1983; 20 : 293