

小檗碱对豚鼠心室乳头状肌慢内向离子电流的作用¹

孙晓东、李金鸣、田丽君、王玉萍、于艳凤、张克义 (中国医科大学药理教研室, 沈阳 110001)

Acta Pharmacologica Sinica 1989 Mar; 10 (2) : 130-134

Effect of berberine on slow inward ionic current in guinea pig ventricular papillary muscle

SUN Xiao-Dong, LI Jin-Ming, TIAN Li-Jun, WANG Yu-Ping, YU Yan-Feng, ZHANG Ke-Yi (Department of Pharmacology, China Medical University, Shenyang 110001)

Abstract Using a single sucrose gap voltage clamp technique, it was found that berberine hydrochloride (Ber-HCl) had a dose-dependent biphasic effect on I_{si} of guinea pig papillary muscle. It was more difficult to wash out the inhibitory effect of Ber-HCl on I_{si} . In the initial stage of the experiment, Ber-HCl 72 $\mu\text{mol/L}$ and 365 $\mu\text{mol/L}$ greatly improved the influx of extracellular Ca^{2+} and increased the amplitude of I_{si} . As the drug perfusion was prolonged, however, Ber-HCl dramatically blocked Ca^{2+} channels and decreased the influx of extracellular Ca^{2+} consequently, I_{si} was reduced in amplitude and later

disappeared. This experiment further revealed the mechanisms of action of Ber on cardiac contractility and for the treatment of arrhythmias.

Key words berberine; papillary muscles; voltage clamp; slow inward current; calcium channel blockers; electrophysiology

提要 应用单蔗糖间隙电压钳制技术, 发现盐酸小檗碱(Ber-HCl)对豚鼠心室乳头状肌 I_{si} 呈先增加后减少的双相作用, 且有明显的剂量依赖关系。对 I_{si} 的抑制作用很难洗脱。Ber 72, 365 $\mu\text{mol/L}$ 于用药初期明显促进心肌细胞外 Ca^{2+} 内流, 使 I_{si} 幅值增大。随作用时间延长, Ber 能阻滞 Ca^{2+} 通道, 使 Ca^{2+} 内流减少, I_{si} 幅值逐渐变小, 甚至消失。

1987年7月27日收稿 1988年10月28日接受

¹ 本文在中国药学会举办的青年药理学工作者最新研究成果学术交流会(1986)上宣读, 并获进步奖。在第三届全国心血管药理学术会议(1986)上宣读, 并获中国药理学会第三届心血管专业委员会青年论文一等奖。

关键词 小檗碱; 乳头状肌; 电压钳制; 慢内向电流; 钙通道阻滞剂; 电生理学

小檗碱(berberine, Ber)在一定的剂量(0.2 mg/(kg·min), 15 min)时具有正性肌力作

用⁽¹⁾，并且使动作电位(AP)平台期延长⁽²⁾，对心肌的收缩力作用具有小剂量增强，大剂量抑制的双相特征⁽³⁾。对人及实验动物也具有抗心律失常作用^(4,5)。然而，尚未见到用电压钳制技术研究 Ber 对心肌细胞膜离子通道作用的报道。本文为进一步从心肌细胞膜离子通道水平阐明 Ber 对心肌收缩力及抗心律失常作用的机理，应用了单蔗糖间隙电压钳制技术(single sucrose gap voltage clamp technique)研究 Ber 对豚鼠心室乳头状肌缓慢内向离子电流(I_{ss})的作用。

Materials and methods

豚鼠体重 $225 \pm SD 25$ g, ♀♂不拘。击头致昏，开胸急取心脏。剪开右心室，选出根部直径 1 mm 以下，尖端直径 0.5 mm 以下，长度 4-6 mm 无分枝的细小乳头状肌作为钳制标本，并将其置入室温(15°C)下的通 O₂ 台氏液中备用。

蔗糖间隙池(sucrose gap chamber, S 池) S 池(Fig 1)是由两片乳胶膜粘在 2 mm 厚带有圆孔的有机玻璃片两侧所形成。两侧乳胶膜上各有一个小孔，直径 0.3-0.5 mm。左侧膜孔略大于右侧。S 池左侧为高 K⁺ 台氏液池(K⁺-T 池)，右侧为正常台氏液池(T 池)。

电压钳制系统(Fig 1) K⁺-T 池中置入两个琼脂盐桥电极。一个为通电流电极(CPE)，用

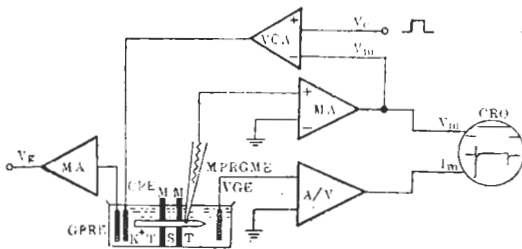


Fig 1. Bath and circuit used in single sucrose gap voltage clamp experiment on cardiac muscles. MA, Microelectrode amplifiers, VCA, Voltage clamp amplifier, A/V, Current-voltage converter, CRO, Oscilloscope, M, Rubber membrane, K⁺-T, S and T, K⁺-T, S and T chambers.

来给标本施加反馈电流。另一个与 MEZ-8201 微电极放大器相连，用来监测跨蔗糖间隙电位(V_g)，为间隙电位记录电极(GPRE)。T 池中也置入两个电极，一个为膜电位记录玻璃微电极(MPRGME)，用来记录跨膜电位(V_m)。另一个是 Ag-AgCl 电极，为浮置接地电极(VGE)，用来引出膜电流(I_m)。膜电位玻璃微电极记录到的 V_m 经 MEZ-7101 微电极放大器后，一路送至 CEZ-1100 电压钳制放大器 V_m 输入端，另一路送至 VC-10 记忆示波器 A 道。SEN-7103 电子刺激器提供刺激方波送至 CEZ-1100 的指令脉冲输入端，与 V_m 比较后，由钳制输出端输出钳制方波，经通电流电极达心肌细胞，构成负反馈电子环路以实现对心肌细胞膜电位的钳制。T 池中浮置接地电极将接受到的 I_m 经 CEZ-1100 中的电流/电压转换器，送至 VC-10 B 道。在 VC-10 示波器荧光屏上显示两条轨迹：一条为 V_m ，另一条为 I_m 。上述全部电子仪器均为 Nihon Kohden Co 产品。

溶液及药品 应用 3 种灌流液体：高 K⁺ 台氏液，等张蔗糖液和正常台氏液。3 种液体组成同文献⁽⁶⁾。全部灌流液体均用 HCl 调 pH 值至 7.4，并用纯 O₂ 饱和。液体温度均维持在 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 。流速为 3-5 ml/min。

Ber-HCl 为东北制药总厂合成的黄色结晶粉末，纯度为 98.62%。实验前，用蒸馏水配制成 0.1% 溶液待用。实验时用台氏液配制成 72 和 365 $\mu\text{mol/L}$ 灌流液。CoCl₂ (沈阳市试剂一厂，AR)。维拉帕米(verapamil, Ver, 天津市和平制药厂)。实验时，用台氏液分别将上述两药配制成 2 mmol/L 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 灌流液。

实验步骤 标本固定前，3 池均用台氏液灌流^(6,7)。然后，将制备好的细小乳头状肌标本置入 K⁺-T 池，使其穿过 K⁺-T 池，S 池并且进入 T 池。突入 T 池部分，长度约 0.5 mm，直径为 0.3-0.5 mm。用微小不锈钢针刺入标本附带的瓣膜组织上，将标本固定在 T 池底部

软硅胶片上。标本固定后，仍用台氏液灌流各池，同时对标本施加 1 Hz, 1 ms 和 150% 阈强度的连续方波刺激。经 1-1.5 h 待标本愈合稳定后，用高 K^+ 台氏液，等张蔗糖液和正常台氏液分别灌流 K^+ -T 池，S 池和 T 池，同时监视 MEZ-8201 微电极放大器上数字表显示的 V_g 值，待其达最大值（通常为 $-60 \sim -90$ mV）并趋于稳定时，即刻启动 PF 5-1 型液压步进式微电极推进器（Narishige Sci 产品），将膜电位玻璃微电极插进突入 T 池的乳头状肌细胞内，记录稳定状态下的静息电位和 AP。随后，开始钳制。频率为 0.2 Hz。每次实验结果通过一次性插入膜电位玻璃微电极所获得。全部实验结果由 PLG-6201 连续记录照像。

数据处理 以标本自身给药前为对照，将给药后离子电流变化的%，按配对 t 检验统计显著性。

Results

I_{si} 的确证 将保持电位 (E_h) 设在 $-40 \sim -30$ mV 范围内（充分灭活 Na^+ 通道）^(6,7)，方波步阶电压为 -25 mV，钳制电位 (E_c) 为 $-15 \sim -5$ mV，钳制时间 (T_c) 为 500 ms。于钳制早期可见到一个幅值较小 ($6 \pm 4 \mu A$, $n = 14$) 的缓慢内向离子电流，即 I_{si} 。用 $CoCl_2$ 2 mmol/L 和 Ver 10 $\mu mol/L$ 分别灌流标本，5 min 左右， I_{si} 基本消失。用台氏液冲洗 20 min 时， Co^{2+} 的阻断作用消失， I_{si} 恢复正常水平。Ver 的阻断作用可被部分洗脱。综上提示，本实验钳制条件下引出的 I_{si} 较可靠，是 Ca^{2+} 经 Ca^{2+} 通道跨膜流动为主所致⁽⁸⁻¹⁰⁾(Fig 2)。

Ber-HCl 对 I_{si} 的作用 在前述条件下，引出 I_{si} ，用 Ber-HCl 72 $\mu mol/L$ 灌流标本。发现灌流初期 I_{si} 与用药前相比，有所增加。灌流 15 min 时， I_{si} 增加 $21 \pm 11\%$ ($n = 7$, $P < 0.05$)。随灌流时间延长， I_{si} 不再增加，20 min 以后， I_{si} 增加率不断下降，但未低于用药前水平 (Fig 3-A)。一些标本在用药 20 min 后， I_{si} 增加率下降较快，直至降到对

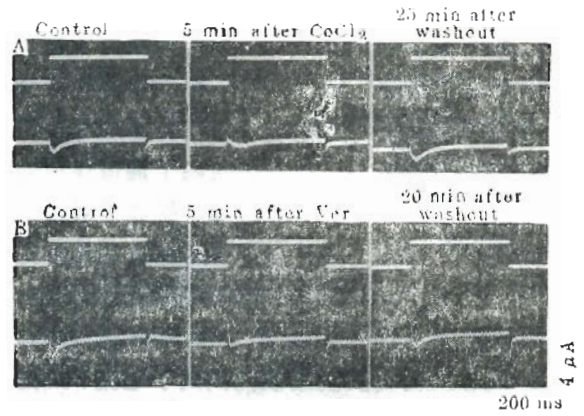


Fig 2. Effect of $CoCl_2$ 2 mmol/L (A) and verapamil 10 $\mu mol/L$ (B) on I_{si} of guinea pig papillary muscle. Upper trace: V_m . Lower trace: I_m . E_h : -40 mV in A and -35 mV in B. E_c : -15 mV in A and -10 mV in B. T_c : 500 ms.

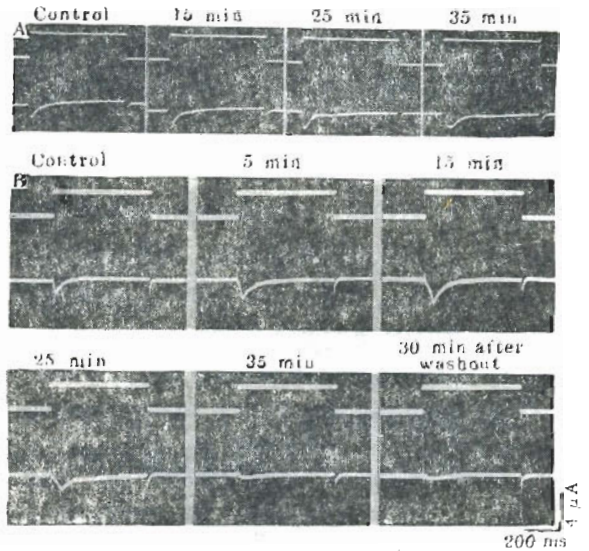


Fig 3. Effect of berberine-HCl 72 $\mu mol/L$ (A) and 365 $\mu mol/L$ (B) on I_{si} of guinea pig papillary muscle. E_h : -35 mV. E_c : -10 mV. T_c : 500 ms.

照水平以下。

为了进一步探讨 Ber 对 I_{si} 作用的量效关系，用 Ber-HCl 365 $\mu mol/L$ 灌流标本。结果表明：高浓度对 I_{si} 的作用更为明显，即用药初期明显增加 I_{si} ，后期减少甚至完全阻滞 I_{si} (Fig 3-B)。当 Ber-HCl 365 $\mu mol/L$ 灌流 15 min 时， I_{si} 增加 $92 \pm 66\%$ ($n = 6$, $P < 0.05$)。

20 min 时, 增加率开始下降。随时间延长, 逐渐减少, 40 min 时, I_{si} 减少 $90 \pm 15\%$ ($n=6, P<0.01$)。多数标本在灌流 30-40min 时, I_{si} 完全消失。用正常台氏液冲洗 30 min 后, 受抑的 I_{si} 很难逆转。

将结果绘制成时-效关系曲线 (Fig 4) 表明: Ber 对 I_{si} 的先增加后减少的双相作用有明显的剂量依赖关系。长时间的药物灌流, Ber 对 I_{si} 基本呈抑制效应。

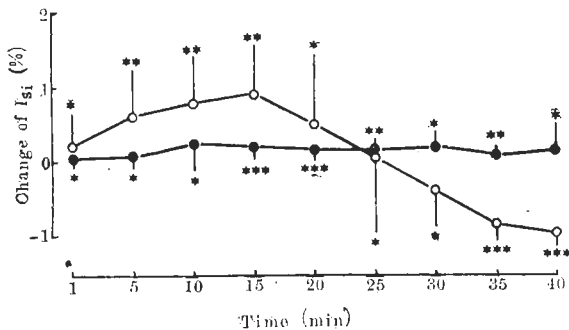


Fig 4. Effect of berberine-HCl on I_{si} of guinea pig papillary muscle. (●) 72 $\mu\text{mol/L}$ (○) 365 $\mu\text{mol/L}$. $\bar{x} \pm \text{SD}$. * $P>0.05$, ** $P<0.05$, *** $P<0.01$ vs control

Discussion

单蔗糖间隙电压钳制技术空间钳制较理想, 适合于 I_{si} 等小电流的准确测定⁽¹¹⁾, 细胞内引出的 V_m 较准确。本实验严格控制了突入 T 池中标本的长度和直径, 并尽可能靠近 S 池将膜电位玻璃微电极插入表面几层心肌细胞内。此外, 使用高 K^+ 台氏液, 减小了膜电阻, 使反馈电流更易进入细胞内。S 池中加入了 CaCl_2 0.05 $\mu\text{mol/L}$, 以促进心肌细胞间电耦合⁽¹²⁾。实验严格控制在 1-1.5 h 内完成⁽⁸⁾。上述措施, 改善了空间钳制的均一性, 明显减小了串联电阻 (R_s) 和漏电流 (leakage current, I_L) 或分流 (shunt current, I_{shunt})⁽¹²⁾ 的影响。这样, 观察到了钳制条件较好情况下的 I_{si} 行为以及药物的作用。但由于实验中未测串联电阻, Ber 对 I_{si} 的作用尚不能完全排除串联电阻可能的变化所致的影响。

通过控制不同水平的膜电位和应用不同类型的 Ca^{2+} 通道阻滞剂 (CoCl_2 , Ver) 以及引出的较小内向电流波形与文献^(6,7,10) 报道的 I_{si} 相符。并观察到两种不同类型 Ca^{2+} 通道阻滞剂的作用特点, 即 Co^{2+} 的阻滞作用远较 Ver 易被洗脱, 可能 Co^{2+} 作用于膜外表面, 而 Ver 作用于膜深处内表面⁽¹³⁾。以上证明: 本实验钳制条件下引出的 I_{si} 确系由 Ca^{2+} 跨膜流动为主而形成的, Na^+ 对其污染的可能性很小。

本实验使用的 Ber 剂量与文献⁽³⁾ 所用相近。发现 Ber 在早期使 I_{si} 增加, 且有明显的剂量依赖关系, 表明: Ber 在此剂量范围内, 于用药初期促进心肌细胞外 Ca^{2+} 内流, 导致细胞内 Ca^{2+} 浓度增加, 这可能是文献⁽³⁾ 报道的 Ber 使心肌细胞 AP 平台期延长和具有正性肌力作用的离子跨膜流动的机理。随药物灌流时间延长, 较高浓度 Ber 使 I_{si} 由增加变为逐渐减小, 甚至消失, 非常类似文献⁽³⁾ 所观察到的 Ber-HCl 大于 300 $\mu\text{mol/L}$ 使心肌收缩力减弱的现象。说明较大剂量和长时间的药物作用, Ber 阻滞了 Ca^{2+} 通道, 抑制细胞外 Ca^{2+} 内流, 使细胞内 Ca^{2+} 浓度减小, 心肌收缩力下降。这可能是 Ber 超过一定剂量或长时间用药造成心肌收缩力下降的机理。也可能是临床上静滴 Ber 曾引起患者心肌受抑制, 甚至死亡^(14,15) 的主要原因之一。另外, 对人⁽⁴⁾ 及实验动物⁽⁵⁾ 的抗心律失常作用, 很可能是 Ber 类似 Ca^{2+} 通道阻滞剂, 抑制心肌细胞外 Ca^{2+} 内流所致。

References

- 1 Maroko PR, Ruzylo W. Hemodynamic effects of berberine, a new inotropic drug, in patients with congestive heart failure. *Circulation* 1983; 68 (Suppl 3) : 374
- 2 黄伟民、吴子达、徐有秋. 黄连素治疗心律失常的基础电生理学研究. *心电学杂志* 1985; 4 : 2
- 3 Shaffer JE. Inotropic and chronotropic activity of berberine on isolated guinea pig atria. *J Cardiovasc Pharmacol* 1985; 7 : 307

- 4 黄伟民、李素萍、周 绮、蒋西华、梁瑞廉、崔广根。黄连素治疗心动过速 3 例报告。实用内科杂志 1985; 5 : 69
- 5 Ksiezzycka E, Cheung WM, Maroko PR. Antiarrhythmia effects of berberine, a new inotropic agent, on ventricular arrhythmias in dogs. *Clin Res* 1982; 30 : 673 A
- 6 Hino N, Ochi R. Effects of acetylcholine on membrane currents in guinea-pig papillary muscle. *J Physiol* (Lond) 1980; 307 : 183
- 7 Reuter H, Scholz H. A study of the ion selectivity and the kinetic properties of the calcium dependent slow inward current in mammalian cardiac muscle. *Ibid* 1977; 264 : 17
- 8 Coraboeuf E. Ionic basis of electrical activity in cardiac tissues. *Am J Physiol* 1978; 234 : H 101
- 9 Noble D. *The initiation of the heartbeat*. 2nd ed. London : Oxford, 1979 : 53-63
- 10 Beeler GW, Reuter H. Membrane calcium current in ventricular myocardial fibres. *J Physiol* (Lond) 1970; 207 : 191
- 11 Beeler GW, Reuter H. Voltage clamp experiments on ventricular myocardial fibres. *Ibid* 1970; 207 : 165
- 12 Beeler GW, McGuigan JAS. Voltage clamping of multicellular myocardial preparations: capabilities and limitations of existing methods. *Prog Biophys Mol Biol* 1978; 34 : 219
- 13 Triggie DJ, Swamy VC. Calcium antagonists: some chemical-pharmacologic aspects. *Circ Res* 1983; 52 (Suppl 1) : 17
- 14 杨德林。静点黄连素所致心肌损害一例。辽宁医药 1980; 8 : 46
- 15 中华内科杂志编委会。静脉滴注黄连素致循环呼吸骤停三例报告。中华内科杂志 1981; 20 : 44