

丹参酮 II A 对雌性家兔 LQT2 模型心肌 细胞动作电位的影响*

梁 玲¹, 谢 强¹, 李卫华¹, 曾 智², 黄峥嵘¹, 李德龙¹

1. 厦门大学附属第一医院 心内科(厦门 361003); 2. 四川大学华西医院 心内科(成都 610041)

【摘要】 目的 观察丹参酮 II A 对雌性家兔长 QT2(long QT, LQT2)模型跨左室壁不同部位心肌细胞动作电位的影响。**方法** 采用全细胞膜片钳技术记录雌性家兔 LQT2 模型左室壁内、中、外 3 层心肌细胞的动作电位(action potential, AP),观察 10 mg/mL 丹参酮 II A 对 3 层心肌细胞动作电位复极达 90%时程(APD90)和跨室壁复极离散度(transmural dispersion of repolarization, TDR)的影响。**结果** LQT2 模型家兔左室 3 层心肌细胞中,中膜 APD90 最长,其次为内膜,最短为外膜,灌注 10 mg/mL 丹参酮 II A 后能缩短 LQT2 模型的各层心肌细胞的 APD90,同时降低 TDR。**结论** 10 mg/mL 丹参酮 II A 能有效缩短 LQT2 模型的各层心肌细胞动作电位,同时降低各层心肌细胞动作电位复极的差异性。

【关键词】 跨膜动作电位 跨室壁复极离散度 丹参酮 II A LQT2 模型

The Effect of Tanshinone II A on the Transmembrane Action Potential of Myocardial Cells in LQT2 Rabbit Models

LIANG Ling¹, XIE Qiang¹, LI Wei-hua¹, ZENG Zhi², HUANG Zheng-rong¹, LI De-long¹. 1. Department of Cardiovascular, the First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen 361003, China; 2. Department of Cardiovascular, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

【Abstract】 Objective To determine the effect of tanshinone II A on the transmembrane action potential of three layers of myocardial cells in LQT2 rabbit models. **Methods** Whole-cell patch clamp technique was used to record the action potential duration 90 (APD90) and the transmural dispersion of repolarization (TDR) of the epicardium, mid-myocardium and endocardium in the LQT2 rabbits. **Results** Of the three layers of myocardial cells, the mid-myocardium had the longest APD90 and the epicardium had the shortest APD90. The APD90 of all three layers of myocardial cells were shortened with infusion of 10 mg/mL tanshinone II A. Their TDR values also reduced by the infusion. **Conclusion** Tanshinone II A shortens APD90 and reduces TDR values.

【Key words】 Transmembrane action potential Transmural dispersion of repolarization Tanshinone II A LQT2 model

目前长 QT 综合征(long QT syndrome, LQTS)的治疗方法主要包括药物、植入永久起搏器或埋藏式心脏复律除颤器以及外科手术治疗;在我国 LQTS 的传统中药治疗成为近几年的研究重点,并且已有文献证实了其有效性^[1,2]。因此中药用于治疗 LQTS 具有良好的前景,但就中药的具体有效成分对 LQTS 的影响以及其产生效用的电生理机制的研究,目前尚未见报道。本课题旨在探讨我国传统中药的具体有效提取成分丹参酮 II A 对家兔 LQT2 模型的动作电位的影响。

1 材料与方法

1.1 溶液与试剂

参考文献^[3]配制下述溶液:台氏液(mmol/L):

NaCl 135、KCl 5.4、CaCl₂ 1.8、MgCl₂ 1.0、NaH₂PO₄ 0.33、HEPES 10、Glucose 10, pH 值用 NaOH 调至 7.30;无钙台氏液即上述溶液中不含 CaCl₂,低钙台氏液为上述溶液中 CaCl₂ 含量 0.2 mmol/L;电极内液成分(mmol/L):NaCl 10、KCl 120、CaCl₂ 1.0、MsATP 5.0、EGTA 10、HEPES 10, pH 值用 KOH 调至 7.30;细胞外液为正常台氏液。胶原酶 II 为 Gibco 产品,BSA、MgATP、HEPES、EGTA 均为 Sigma 产品。其余产品为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 家兔心室肌细胞的分离^[4] 6 只新西兰雌性大白兔(厦门大学医学院动物实验室提供)用 3% 戊巴比妥钠(30 mg/kg)耳缘静脉麻醉,左侧开胸,迅速取出心脏。于无钙台氏液修剪心脏,迅速连接在 Lange-ndoff 心脏灌流装置上。予无钙台氏液主动脉逆行灌流约 5 min,继续用含胶原酶 II 和蛋白

* 福建省青年科研课题(No. 2007-2-44)资助

酶 E 的低钙台氏液持续灌流 8~12 min,待出现灌流液拉丝、心脏发白、膨大、松弛后从灌流装置上取下心脏,分离左室并用眼科剪切取外膜下心肌(<1.5 mm,从外侧面),再从内膜面切取内膜下心肌(<1.5 mm,从内侧面),剩下的为 M 细胞层,分别置于不同的小烧杯中,用剪刀剪碎,予恒温箱中温孵并吹散细胞,最后保存在钙浓度为 0.8 mmol/L 的含有小牛血清的台氏液中,予室温下保存。整个分离过程持续低流量通氧,恒温 37 ℃。

1.2.2 全细胞膜片钳记录 选择横纹清楚、无皱缩迹象、立体感强的细胞进行封接电极,封接阻抗达 Gn 以上,再以较大负压吸破细胞膜,补偿电容、电流及电极串联阻抗,形成全细胞记录。在电流钳制模式下,给予 2.5 Hz、600 pA、15 ms 内向电流刺激,引出并记录左室 3 层心肌动作电位(AP)。

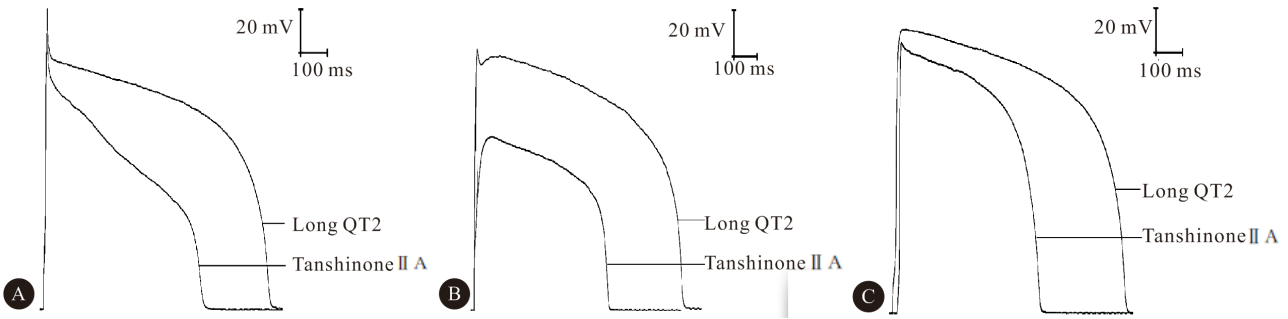
1.2.3 LQT2 模型组和丹参酮Ⅱ A 实验组的制作 在全细胞膜片钳的记录下,采用灌流法给药,用含有 100 μmol/L 浓度 d-sotalol 的 Tyrodes 液灌流 5 min 后,记录动作电位复极达 90% 的时程 (APD90),制

作 LQT2 模型,再用浓度为 10 mg/mL 的丹参酮Ⅱ A^[5](虹源生物科技有限公司提供)灌流 20 min,记录 APD90,同时记录跨室壁复极离散(transmural disper-sion of repolarization, TDR):3 层心肌最长的单相动作电位复极至 100% 的时程 (MAPD100) 和最短的 MAPD100 之间的差异;膜片钳放大器 (AXON700B,USA) 与计算机相连,信号的发放和采集均由 pClamp 10+clampfit 软件完成。

1.2.4 统计学方法 所有计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间数据比较采用方差分析,两组间数据比较采用 *t* 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

3 层心肌细胞 APD90 时间上可见中膜最长,其次为内膜,最短为外膜,在附图中可见 d-sotalol 灌注后此现象仍存在,且差异更加明显,丹参酮Ⅱ A 灌注后的 3 层心肌细胞 APD90 与 d-sotalol 灌注后相比明显缩短,TDR 显著降低 (*P*<0.05),详见附表。



附图 10 mg/mL 丹参酮Ⅱ A 对 LQT2 模型左室 3 层心肌细胞 AP 的影响

Fig The effect of 10 mg/mL tanshinone Ⅱ A to the AP of myocardial cells in the LQT2 model

A: Epicardium; B: Mid-myocardium; C: Endocardium

附表 丹参酮Ⅱ A 对 LQT2 模型 3 层心肌细胞 APD90(ms)和 TDR(ms)的影响

Table The shortened effect of the tanshinone Ⅱ A to the APD90 (ms) and TDR(ms) in the LQT2 model

Group	n	APD90			TDR
		Endocardium	Mid-myocardium	Epicardium	
LQT2	6	868.220 8±6.649 7	911.695 0±8.133 1	855.335 0±10.091 3	57.373 3±7.041 8
Tanshinone Ⅱ A 10 mg/mL	6	567.928 3±7.783 8*	594.186 7±4.946 5*	575.430 0±5.448 0*	25.346 7±2.979 3*

* *P*<0.01, vs. LQT2 group

3 讨论

LQTS 为先天遗传性或后天获得性因素^[6],导致心肌细胞膜离子通道功能异常,使心肌细胞动作电位复极时间延长,从而诱发尖端扭转性室速(torsade de pointes, TDP)的一类疾病。虽然目前对 LQTS 所致的室速或室颤的发生机制尚不完全

明了,但心室 TDR 与恶性心律失常的发生密切相关^[7],TDR 不仅决定了早期后除极(early after depolarization,EAD)是否跨膜传播从而产生心电图的 R-on-T 现象,而且为临床 TDP 的产生提供了折返基础^[8]。为进一步研究先天性 LQTS,国外目前分别用异丙肾上腺素+chromanol 293B 阻滞 Ik s 电流,模拟先天性 LQT1 动物模型;d-sotalol 阻滞

Ik r 电流, 模拟先天性 LQT2 动物模型; ATX-II 阻滞 IN a⁺ 电流, 模拟先天性 LQT3 动物模型, 其有效性已得到肯定^[9,10]。

本课题成功地建立了 LQT2 模型, 并尝试研究中有效提取物丹参酮 II A 对 LQTS 动作电位的影响。从研究结果来看, 10 mg/mL 丹参酮 II A 明显缩短 LQT2 模型的动作电位 APD₉₀, 同时减少心内膜、心外膜以及中膜心肌细胞的复极差异, 降低跨室壁离散度, 从而降低了恶性心律失常的发生。有研究表明丹参酮可能是通过抑制钙离子通道, 防止 Ca 超载, 从而改善心肌复极的不均一性, 缩短 QT 间期^[11]。这与我们的研究结果基本一致, 从动作电位的二相影响来看, 考虑可能也是通过对钙离子通道的抑制作用明显缩短了动作电位时间。本研究为今后进一步研究该药的有效成分对 LQTS 模型的离子通道作用提供了一定的实验依据。

参 考 文 献

- 1 同纯英, 曾 欣, 许端敏等. 葛根素和复方丹参对不稳定型心绞痛临床疗效及 QT 间期离散度影响的对比研究. 中国中西医结合杂志, 2005; 25(1): 87-88.
- 2 龙志斌, 周元潮. 中药复方改善老年人慢性冠脉缺血的心电学研究. 同济大学学报(医学版), 2001; 22(6): 23-24.
- 3 Idriss SF, Wolf PD. Transmural action potential repolarization

heretogeneity develops postnatally in the rabbit. J Cardiovascular Electrophysiol, 2004; 15(7): 795-801.

- 4 谢 强, 张紫冠, 李卫华等. 胰岛素对家兔右室心肌各层细胞动作电位的影响. 中国心脏起搏与心电生理杂志, 2010; 24(5): 442-445.
- 5 徐长庆, 姜延平, 杨宝峰等. 丹参酮 II A 抑制豚鼠单个心肌细胞 L 型钙电流和缩短动作电位时程效应的相关性分析. 中国药理学通报, 1998; 14(5): 428-431.
- 6 Moss AJ. Long QT syndrome. JAMA, 2003; 289(16): 2041-2044.
- 7 Conrath CE, Ophthof T. Ventricular repolarization: an overview of (patho)physiology, sympathetic effects and genetic aspects. Prog Biophys Mol Biol, 2006; 92(3): 269-307.
- 8 Yan GX, Wu Y, Liu T, *et al.* Phase 2 early after depolarization as a trigger of polymorphic ventricular tachycardia in acquired long-QT syndrome. Circulation, 2001; 103(23): 2851-2856.
- 9 Shimizu W, Antzelevitch C. Differential effects of beta-adrenergic agonists and antagonists in LQT1, LQT2 and LQT3 models of the long QT syndrome. J Am Coll Cardiol, 2000; 35(3): 778-786.
- 10 卢颖如, 胡大一, 李翠兰等. 离体 LQT2 兔心脏模型的研制. 医学研究杂志, 2008; 37(6): 31-35.
- 11 张永慧. 复方丹参滴丸对急性心肌梗死 QT 间期离散度的影响. 心血管康复医学杂志, 2001; 10(4): 371-372.

(2013-03-11 收稿, 2013-06-20 修回)

编辑 汤 洁

(上接第 739 页)

- 4 Rada B, Lekstrom K, Damian S, *et al.* The pseudomonas toxin pyocyanin inhibits the dual oxidase-based antimicrobial system as it imposes oxidative stress on airway epithelial cells. J Immunol, 2008; 181(7): 4883-4893.
- 5 Harper RW, Xu C, Eiserich JP, *et al.* Differential regulation of dual NADPH oxidases/peroxidases, Duox1 and Duox2, by Th1 and Th2 cytokines in respiratory tract epithelium. FEBS Lett, 2005; 579(21): 4911-4917.
- 6 Lambeth JD, Kawahara T, Diebold B. Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression. Free Radic Biol Med, 2007; 43(3): 319-331.
- 7 Wu Y, Antony S, Juhasz A, *et al.* Up-regulation and sustained activation of Stat1 are essential for Interferon- γ (IFN- γ)-induced dual oxidase 2 (Duox2) and dual oxidase A2 (DuoxA2) expression in human pancreatic cancer cell lines. J Biol Chem, 2011; 286(14): 12245-12256.
- 8 Schröder JM. Purification of antimicrobial peptides from human

skin. Method Mol Biol, 2010; 618: 15-30.

- 9 Nomura I, Goleva E, Howell MD, *et al.* Cytokine milieu of atopic dermatitis, as compared to psoriasis, skin prevents induction of innate immune response genes. J Immunol, 2003; 171(6): 3262-3269.
- 10 Geiszt M, Witta J, Baffi J, *et al.* Dual oxidases represent novel hydrogen peroxide sources supporting mucosal surface host defense. FASEB J, 2003; 17(11): 1502-1504.
- 11 Harder J, Dressel S, Wittersheim M, *et al.* Enhanced expression and secretion of antimicrobial peptides in atopic dermatitis and after superficial skin injury. J Invest Dermatol, 2010; 130(5): 1355-1364.
- 12 Ballardini N, Johansson C, Lilja G, *et al.* Enhanced expression of the antimicrobial peptide LL-37 in lesional skin of adults with atopic eczema. Br J Dermatol, 2009; 161(1): 40-47.

(2013-03-25 收稿, 2013-06-17 修回)

编辑 汤 洁