

4 种中药成分对犬瘟热模型犬支气管平滑肌细胞 K_v 通道的作用

陈云¹, 白挨泉¹, 李建军¹, 王凯¹, 关莉², 连至诚²

(1. 佛山科学技术学院, 佛山 528200; 2. 广州中医药大学, 广州 510014)

摘要: 应用细胞膜片钳技术, 分别对正常对照组、犬瘟热(CD)组、川芎嗪组、黄芩甙组、黄芪组、黄连素组犬支气管平滑肌细胞(BSMC)电压门控性钾通道(K_v)动力学指标、静息膜电位(E_m)、静息膜电容(C_m)和电流密度(pA/pF)进行了测定。结果表明, CD组 BSMC膜 K_v 活性显著降低。川芎嗪、黄芩甙、黄芪 3 种中药(成分)均能不同程度拮抗 CD 模型犬 BSMC膜 K_v 通道活性的抑制, 促进支气管平滑肌细胞膜 K_v 通道的开放。黄芩甙具有显著提高支气管平滑肌细胞膜 K_v 通道活性, 促进支气管平滑肌舒张作用, 在 4 种中药(成分)中表现突出。

关键词: 中药成分; 膜片钳技术; K_v 通道

中图分类号: S858.2925.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2006)01-0100-05

Effects of Four Chinese Herbal Medicinal Ingredients on Voltage-gated K^+ Channels of Bronchial Smooth Muscle Cells from Canine Distemper Dogs

CHEN Yun¹, BAI Ai-quan¹, LI Jian-jun¹, WANG Kai¹, GUAN Li², LIAN Zhi-cheng²

(1. Foshan College of Science and Technology, Foshan 528200, China;

2. Guangzhou Chinese Traditional Medicine University, Guangzhou 510014, China)

Abstract: The voltage-gated K^+ channels dynamical indices, resting membrane potential and potassium currents of bronchial smooth muscle cells (BSMC) were investigated by cell patch clamp technique. The experimental BSMCs of dogs were divided into control group, CD group, Tetramethylpyzine group, Baicalin group, Astragalus membranaceus group and Berberine group. The results indicated that the activation of K_v channel from CD group was significantly inhibited. This inhibition was counteracted by Tetramethylpyzine, Baicalin and Astragalus membranaceus, which made the K_v channel of BSMC open. The most powerful one of four Chinese herbal medicinal ingredients was Baicalin. Baicalin increased the activation of the K_v channel of BSMC from CD dogs significantly and extended bronchial smooth muscle cells.

Key words: Chinese herbal medicinal ingredients; patch clamp technique; voltage-gated K^+ channel

犬瘟热(Canine Distemper, CD)以高热、呼吸道症状和神经症状为主, 可引起机体重度缺氧, 最后导致动物窒息死亡。临床上, 应用双黄连、黄芩、黄芪等中药治疗 CD 并发症取得稳定疗效^[1,2]。Nelson 等报道^[3], 动脉平滑肌细胞电压门控性钾通道

(Voltage-gated Potassium Channel, K_v 通道)在呼吸功能调节中起重要作用。Pelaia 等^[4]研究报道了钾通道开放在哮喘和慢性阻塞性肺病治疗中的作用。钾通道阻断剂^[5]、NO^[6]、缺氧^[7,8]、cGMP^[9]等对肺动脉平滑肌和支气管平滑肌^[10,11]的作用已有

收稿日期: 2004-11-08

基金项目: 科技部星火计划项目(2005EA780059); 佛山市重点科技攻关项目(0102012B)

作者简介: 陈云(1962-), 男, 四川绵阳人, 副教授, 博士, 主要从事犬病学研究。Tel: 013827728485; E-mail: chenyun37@tom.com

报道。陈云等^[12]研究表明,CD病犬支气管平滑肌细胞(bronchial smooth muscle cells, BSMC)膜K_v通道活性显著降低。NO能够拮抗CD模型犬BSMC膜K_v通道活性的抑制,恢复降低的钾电流,细胞膜复极化,松弛支气管平滑肌,缓解呼吸困难。刘恭鑫等报道了中药成分对心肌、血管平滑肌、结肠平滑肌细胞膜离子通道的调控作用^[13~15]。有关治疗CD并发症的中药筛选及其作用机理研究尚未见报道。本研究旨在探讨治疗CD性呼吸道疾病的中药成分及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物来源与分组

比格犬(Beagle dog)8只,2月龄,体重(2.4±0.7)kg,均未注射疫苗,犬瘟热病毒(Canine distemper virus, CDV)ELISA检测阴性,由广东省佛山市南海区科金实验动物科技有限公司提供。试验动物质量合格证号:粤检证字2003A012,环境设施证号:2003B004。试验动物随机分为2组,犬瘟热组(CD group)5只,对照组(control group)3只。

1.2 CD病理模型的建立

CD病理模型的建立同文献^[11]。CD组按2 mL/只剂量气管内注射CDV液接种(病毒株由笔者课题组分离自广东南海、深圳等地,TCID₅₀ = 10^{-3.5658}/0.1 mL)。接种后逐日进行临床检查和测定体温(T)、呼吸(R)、心率(P)。当模型犬出现濒危症状时,采用速眠新进行麻醉,解剖采样,并作常规病理检查。模型判断标准包括临床典型症状、双相热、病理变化和ELISA检测阳性。对照组隔离饲养,同时气管内注射等量生理盐水,试验结束时用速眠新麻醉,解剖采样。

1.3 主要仪器

主要仪器同文献^[12]。

1.4 主要试剂与药物

胶原酶、牛血清白蛋白、胰蛋白酶、HEPES(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethanesulfonic acid)、TEA(tetraethylammonium)等为美国Roche、Sigma产品。

细胞外液、电极内液及PSS配方见文献^[12]。

川芎嗪,化学名为四甲基吡嗪,无锡第七制药厂,批号200208091,终浓度200 μg/L。黄芩甙,北京建昊生物制药有限公司,批号20020808,终浓度200 μg/L。黄芪注射液,终浓度200 μg/L,黄连素,终浓度200 μg/L,购自常州制药有限公司。

1.5 试验犬BSMC的分离与中药成分处理分组

采用急性酶消化分离法^[9]。按文献^[12]方法操作。经α-actin免疫细胞化学染色法鉴定为BSMC(单克隆抗体α-actin购于美国Sigma公司)。

CD组犬分离的BSMC细胞,分别随机分为4组,即川芎嗪组、黄连素组、黄芩甙组和黄芪组,每组测定9例。先记录加药前的K_v通道活动,再分别加入含中药成分的PSS灌流,记录通道活动,其结果为各中药组数据,即CD组和各中药组为加药前后对照。

1.6 细胞膜片钳试验

将BSMC悬液放入细胞池中,平放于倒置显微镜台上,静置15 min使细胞充分贴壁。以PSS灌流,速度为1 mL/min。显微观察细胞形态,随机选取胞体梭形、胞膜完整光滑、胞浆均匀、核清晰的BSMC进行测定。

用电极内液灌满玻璃微电极,调节电极封接细胞,在细胞膜与微电极之间形成高阻(>2G),封接时电击破细胞膜,再分别用PSS和含中药成分的PSS灌流,以-60 mV为钳制电压,阶跃电压为10 mV,间隔时间为10 s,脉冲时间为200 ms,刺激频率0.1 Hz。由计算机系统控制操作程序并采集数据。

测定时加入CdCl₂、AChCl以阻断钙电流和钠电流。测定后均用PSS洗脱1 min。

1.7 数据处理

应用ISO软件包进行分析。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用 t 检验。

2 结果

2.1 中药成分对CD模型犬BSMC之K_v通道动力学指标的影响

从表1可见,正常对照组通道开放时间 t_{o1} 、 t_{o2} 分别为(1.75±0.81)ms和(28.35±6.72)ms,CD组分别为(0.51±0.12)ms和(3.16±0.98)ms,组间比较差异极显著。几种中药成分对K_v通道开放时间的影响力依次为黄芪>川芎嗪>黄芩甙>黄连素。川芎嗪组、黄芩甙组、黄芪组分别与对照组比较,通道开放时间 t_{o1} 、 t_{o2} 差异不显著($P>0.05$),与CD组比较,通道开放时间 t_{o1} 、 t_{o2} 差异极显著($P<0.01$)。黄连素组与对照组比较,通道开放时间 t_{o1} 、 t_{o2} 差异极显著($P<0.01$),与CD组比较,通道开放时间 t_{o1} 、 t_{o2} 差异不显著($P>0.05$)。表明黄连素对

CD 犬 BSMC 之 K_v 通道开放时间无影响,而川芎嗪、黄芩甙、黄芪能显著延长 K_v 通道开放时间。

通道关闭时间川芎嗪组、黄芩甙组和黄芪组均大于对照组而小于 CD 组 ($P < 0.01$)。黄连素组与 CD 组比较,通道关闭时间相近,均显著大于对照组。通道关闭时间依次为黄连素组 $>$ 川芎嗪组 $>$ 黄芩甙组 $>$ 黄芪组。表明中药川芎嗪、黄芩甙、黄芪引

起 CD 模型犬 BSMC 之 K_v 通道关闭时间缩短。

通道开放率各加中药组均大于 CD 组 ($P < 0.01$),但低于对照组。黄芩甙组通道开放率接近对照组,在加中药组中开放率最大,黄连素组最低。通道开放率大小依次为黄芩甙组 $>$ 黄芪组 $>$ 川芎嗪组 $>$ 黄连素组。表明中药川芎嗪、黄芩甙、黄芪增加 CD 模型犬 BSMC 之 K_v 通道开放频率。

表 1 中药成分对 K_v 通道动力学指标的影响

Table 1 Effect of Chinese herbal medicinal ingredients on K_v channel dynamical indices

组别 Group	通道开放时间 Open time/ms		通道关闭时间 Close time/ms		通道开放率 Open rate/%
	t_{o1}	t_{o2}	t_{c1}	t_{c2}	
对照组 Control	1.75 ± 0.81	28.35 ± 6.72	0.61 ± 0.18	1.83 ± 0.72	1.89 ± 0.09
CD 组 CD model	0.51 ± 0.12 ^{bc}	3.16 ± 0.98 ^d	3.84 ± 1.42 ^d	128.92 ± 52.35 ^h	0.04 ± 0.01 ⁱ
川芎嗪组 Tetramethylpyzine	1.64 ± 0.45 ^{abc}	11.36 ± 3.57 ^{bc}	1.25 ± 0.77 ^{bc}	3.56 ± 0.97 ^a	1.53 ± 0.03 ^a
黄芩甙组 Baicalin	1.57 ± 0.59 ^{abc}	18.47 ± 5.95 ^{ab}	0.95 ± 0.32 ^{ab}	3.68 ± 0.64 ^a	1.74 ± 0.09 ^a
黄连素组 Berberine	0.68 ± 0.21 ^{bc}	5.86 ± 1.24 ^{de}	3.95 ± 2.38 ^d	119.84 ± 40.7 ^h	0.55 ± 0.06 ^{fg}
黄芪组 Astragalus membranaceus	1.73 ± 0.56 ^{abc}	19.53 ± 8.29 ^{ab}	0.81 ± 0.23 ^{ab}	2.32 ± 0.65 ^a	1.55 ± 0.04 ^a

同一列数据标不同字母者差异显著 ($P < 0.05$), 下表同

Data with different letters in same column differentiated significantly ($P < 0.05$), The same below

2.2 中药成分对 CD 模型犬 K_v 通道电流密度的影响

由表 2 可见, K_v 通道电流密度 (pA/pF) 对照组与 CD 组之间比较, 差异极显著。CD 加中药成分各组电流密度均发生改变, 与 CD 组比较, 川芎嗪组差异显著 ($P < 0.05$), 黄芩甙组和黄芪组差异极显著

($P < 0.01$), 黄连素组则变化不显著 ($P > 0.05$)。 K_v 通道电流密度升高的强度依次为黄芪组 $>$ 黄芩甙组 $>$ 川芎嗪组, 而黄连素组反有所降低。表明中药成分黄芪、黄芩甙、川芎嗪提高 CD 模型犬 BSMC 之 K_v 通道电流密度, 但未达到对照组水平。黄连素对其影响不大, 无显著性差异 ($P > 0.05$)。

表 2 中药成分对 K_v 通道电流密度及膜电位、膜电容的影响

Table 2 Effect of Chinese herbal medicinal ingredients on current density, C_m and E_m in K_v channel

组别 Group	电流密度 Current density/(pA/pF)	静息膜电位 E_m /mV	静息膜电容 C_m /pF
对照组 Control	7.9 ± 0.8	-69.4 ± 3.7	20.6 ± 5.4
CD 组 CD model	4.8 ± 0.5 ^c	-50.8 ± 4.8 ^{bc}	29.7 ± 4.5 ^{bc}
川芎嗪组 Tetramethylpyzine	5.8 ± 0.7 ^b	-54.6 ± 6.5 ^{bc}	21.4 ± 4.7 ^a
黄芩甙组 Baicalin	6.9 ± 0.5 ^{ab}	-68.7 ± 4.8 ^{ab}	22.8 ± 7.4 ^a
黄连素组 Berberine	4.6 ± 0.4 ^c	-51.4 ± 7.6 ^{bc}	28.5 ± 6.6 ^{bc}
黄芪组 Astragalus membranaceus	7.5 ± 0.9 ^{ab}	-68.6 ± 5.3 ^{ab}	18.9 ± 5.9 ^a

2.3 中药成分对 CD 模型犬 BSMC 静息膜电位 (E_m) 和静息膜电容 (C_m) 的影响

由表 2 可见, CD 组 BSMC 静息膜电位 E_m 为 (-50.8 ± 4.8) mV, 对照组 BSMC 静息膜电位 E_m 为 (-69.4 ± 3.7) mV, 两者相比较差异极显著 ($P < 0.01$)。黄芩甙组和黄芪组静息膜电位绝对值显著高于 CD 组, 川芎嗪组、黄连素组静息膜电位绝对值

略大于 CD 组。表明黄芩甙、黄芪显著增加 CD 模型犬 BSMC 静息膜电位, 川芎嗪、黄连素这种增强作用较弱。CD 组 BSMC 静息膜电容 C_m 为 (29.7 ± 4.5) pF, 对照组为 (20.6 ± 5.4) pF, 两者相比差异极显著 ($P < 0.01$)。与 CD 组比较, 川芎嗪组、黄芩甙组和黄芪组 BSMC 静息膜电容显著降低, 黄连素组略有减少, 差异不显著 ($P > 0.05$)。

3 讨论与结论

3.1 K_v 通道的变化及其在呼吸道疾病发生中的作用

可兴奋性细胞膜上的电压门控钾离子通道(K_v)使静息膜电位与域电位维持一定的水平,是兴奋后复极化的关键位点。抑制 K_v 通道导致支气管平滑肌兴奋性增高并引起自发性动作电位。在豚鼠、大鼠等动物的研究表明,哮喘、慢性缺氧可抑制其支气管平滑肌 K_v 通道活性,细胞兴奋性升高,支气管表现出高反应性收缩^[8~11]。本试验中,CD 模型犬 BSMC 的 K_v 通道开放时间缩短,关闭时间延长,通道开放率降低,静息膜电位(绝对值)和静息膜电容均显著升高,电流密度显著减少。表明 CD 病程中 BSMC 膜 K_v 通道发生了变化,膜去极化程度增大,细胞兴奋性增强,收缩加大,从而形成支气管狭窄性呼吸困难。这与在大鼠和豚鼠等动物的试验结果相吻合。据报道^[9]肺部炎症引起低氧或者缺氧状态可造成 BSMC 膜 K_v 通道的活性抑制,支气管平滑肌出现高反应性收缩,进一步加剧病情。

3.2 药物对 K_v 通道活性的影响

有报道指出,NO、cGMP 可提高 K_v 通道活性,使血管平滑肌、支气管平滑肌舒张^[5,6,9,10]。黄芪可以拮抗病毒感染的心肌细胞膜钙通道,对感染细胞起保护作用^[14]。黄芩甙、黄连素、川芎嗪等中药对神经细胞、结肠平滑肌细胞的离子通道产生药理效应,黄连素能抑制豚鼠结肠平滑肌细胞膜钾通道,是其治疗运动性腹泻的可能机制^[13,15]。本试验中,CD 犬 BSMC 分别经黄芪、黄芩甙、黄连素、川芎嗪等中药作用后,其细胞膜 K_v 通道发生不同程度的变化。在 K_v 通道动力学指标方面,川芎嗪组、黄芩甙组和黄芪组均表现出显著的改善,通道开放时间和开放率显著提高,通道关闭时间显著缩短,接近对照组水平。在电流密度、静息膜电位和静息膜电容方面,3 组结果也出现显著变化。表明此 3 种中药能拮抗 CD 模型犬 BSMC 膜 K_v 通道活性的抑制,促进支气管平滑肌细胞膜 K_v 通道的开放,增加钾离子外流,并导致膜电位超极化,钙离子内流减少,引起支气管平滑肌舒张。

3.3 不同中药成分作用比较

4 组中药试验中,黄芩甙组在 K_v 通道动力学指标、电流密度、静息膜电位和静息膜电容方面改变强于其余 3 组,多数指标接近正常对照组水平。黄芪、川芎嗪对 CD 模型犬 BSMC 膜 K_v 通道活性也具有

显著影响,能拮抗其抑制,促进支气管平滑肌舒张。黄芪、黄芩甙、川芎嗪 3 种中药成分对犬瘟热模型犬支气管平滑肌均具有松弛作用,有利于改善呼吸状态。黄连素组在 K_v 通道动力学指标、电流密度、静息膜电位和静息膜电容方面,与 CD 组比较,存在一定的差异,但总体分析表明差异不显著。说明黄连素对 CD 模型犬 BSMC 膜 K_v 通道活性的影响微弱,不能拮抗 CD 模型犬 BSMC 膜 K_v 通道活性的抑制。此与陈明铠等人^[15]在豚鼠结肠平滑肌的试验报道不一致。这可能与钾离子通道的类型和平滑肌的类型不同有关。

3.4 黄芩甙 K_v 通道激活的临床意义

根据本研究结果和资料对比分析表明,黄芪、黄芩甙、川芎嗪 3 种中药成分对犬瘟热模型犬支气管平滑肌均具有松弛作用,有利于改善呼吸状态。其中黄芩甙对支气管平滑肌细胞膜 K_v 通道活性影响最显著。黄芩甙是从黄芩中提取的黄酮类化合物,也是双黄连的主要有效成分,具有抗病毒、清热、降压、抗炎等作用,可通过抑制嗜酸性粒细胞趋化因子而具有抗支气管哮喘功能。黄芩甙在浓度依赖情况下可阻断平滑肌细胞膜钙离子通道,显著降低大鼠主动脉静息状态下平滑肌细胞内游离钙浓度。本试验表明,黄芩甙具有显著提高支气管平滑肌细胞膜 K_v 通道活性,促进支气管平滑肌舒张的作用,在 4 种中药成分中表现突出,可作为临床治疗犬瘟热并发症的药物筛选依据。

参考文献:

- [1] 刘润珍,李世雄. 治疗犬病毒病的两种药物研究[J]. 中国林副特产,1997,40(1):7~8.
- [2] 杨庆霞,张滨丽,李梦红. 中药瘟毒泻痢灵配合治疗犬瘟热[J]. 黑龙江畜牧兽医,2002,(6):62.
- [3] Nelson M T, Quayle J M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle[J]. Am J Physiol,1995,268:C799~C822.
- [4] Pelaia G, Gallelli L, Vatrella A, et al. Potential role of potassium channel opener in the treatment of asthma and chronic obstructive pulmonary disease[J]. Life Sci, 2002,70:977~990.
- [5] 姚小鹏,钱卫珠,李强,等. 钾通道阻断剂和一氧化氮对肺动脉平滑肌细胞钾电流的作用[J]. 第二军医大学学报,2003,24(2):192~195.
- [6] Yuan X J, Tod M L, Rubin L J, et al. NO hyperpolarizes pulmonary artery smooth muscle cells and decreases

- the intracellular Ca^{2+} concentration by activating Kv channels[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(19): 10 489~10 494.
- [7] Archer S L, Souil E, Dink-Xuan A T, *et al.* Molecular identification of the role of Kv channels, Kv1. 5 and Kv2. 1, in hypoxia pulmonary vasoconstriction and control of the resting membrane potential in rat pulmonary artery myocyte[J]. J Clin Invest, 1998, 101(11): 2 319~2 330.
- [8] Platoshyn O, Yu Y, Golovina V A, *et al.* Chronic hypoxia decreases Kv channel expression and function in pulmonary artery myocytes [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2001, 280(4): 801~812.
- [9] 张永昶, 倪望, 甄国华, 等. cGMP对慢性缺氧大鼠肺动脉平滑肌细胞膜电压门控钾通道的作用[J]. 中国病理生理杂志, 2003, 19(8): 1 012~1 015.
- [10] 高亚东, 熊盛道, 徐永健, 等. 一氧化氮对哮喘大鼠支气管平滑肌细胞钾通道的作用[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2003, 26(10): 615~618.
- [11] 蔡绍曦, 邹飞, 佟振清, 等. 哮喘豚鼠气管平滑肌钾离子通道特性的改变[J]. 中华结核和呼吸杂志, 1997, 20(1): 16~18.
- [12] 陈云, 白挨泉, 王凯, 等. 硝普钠对犬瘟热模型犬支气管平滑肌细胞电压门控性钾通道的影响[J]. 中国兽医科技, 2005, 35(4): 294~297.
- [13] 陈铁锋, 任旭爱, 魏向阳. 中药化学成分对血管平滑肌离子通道的调控研究[J]. 中医药学刊, 2002, 20(5): 683~685.
- [14] 刘恭鑫, 杨英珍, 顾全保, 等. 黄芪对感染大鼠心肌细胞钙通道及钠钙交换载体的效应[J]. 中国病理生理杂志, 1999, 17(7): 591~593.
- [15] 陈明铠, 罗和生, 余保平. 黄连素对结肠平滑肌细胞膜钙激活钾通道和延迟整流钾通道的影响[J]. 中国药理学通报, 2004, 20(6): 632~635.

《畜牧兽医学报》诚征广告

《畜牧兽医学报》是由中国科协主管, 中国畜牧兽医学学会主办, 《畜牧兽医学报》编委会、中国农业科学院畜牧研究所编辑出版的畜牧兽医学术性期刊。创刊于1956年7月, 读者对象为大、专院校的师生和各级畜牧兽医生产、科研工作者等。刊登较高水平的学术论文和专业研究报告以及对生产实践具有指导性和启发性的文章。

本刊拟开展畜禽品种、饲料、添加剂、畜牧机械、兽药、诊断试剂、大型仪器、设备、国内外大型学术会议及展览会、农业书籍等广告服务。此外, 面向社会征集教学、科研单位的形象广告; 畜牧兽医领域著名专家人物介绍等。

凡申请在本刊刊登广告的客户, 需提供营业执照、生产经营许可证等证明。刊登兽药、添加剂广告的客户, 请先填写《兽药广告审查表》并经当地行政主管部门审查批准。

《畜牧兽医学报》广告价目表

版位	规格(mm×mm)	收费标准(元)	
		彩色	黑白
封4	大16开整版(285×210)	4000	
封2	大16开整版(285×210)	3500	
封3	大16开整版(285×210)	3500	
内插加页	大16开整版(285×210)	3000	
内页	大16开整版(230×210)		1000
内页	大16开半版(115×210)		500

银行汇款: 北京农行海淀支行营业部 户名: 中国农业科学院畜牧研究所 帐号: 050101040010287

地址: 北京市海淀区圆明园西路2号中国农业科学院畜牧所《畜牧兽医学报》编辑部

邮编: 100094 电话(传真): 010-62815987 E-mail: xmsyxb@263.net