



银杏酮酯 GBE50 对正常及模拟缺血豚鼠乳 头肌动作电位的影响

刘爱华, 张志雄*

(上海中医药大学 生理教研室, 上海 201203)

[摘要] 目的:观察银杏酮酯(GBE50)对正常及模拟缺血豚鼠乳头肌动作电位的影响,探讨 GBE50 的抗心肌缺血作用。方法:运用标准微电极细胞内记录技术观察 GBE50 对正常及模拟缺血豚鼠乳头肌动作电位参数(RP, APA, OS, APD₂₀, APD₅₀, APD₉₀)的影响。结果:20, 50, 100 mg · L⁻¹ GBE50 缩短心室乳头肌 APD₅₀和 APD₉₀(*P* < 0.05),且呈剂量依赖性,而对其他参数没有影响;模拟缺血血液灌流使 RP, APA, OS 分别减小, APD₂₀, APD₅₀, APD₉₀分别缩短,而在缺血血液中加入 100 mg · L⁻¹ GBE50, 缺血 20 min 仅 APA 缩短,其他参数无变化。结论:在生理状态下,GBE50 可轻微缩短 APD。在缺血状态下动作电位各项参数均减小,而 GBE50 通过维持缺血期间膜电位的稳定性,对抗缺血对跨膜电位的抑制效应,从而达到抗心肌缺血作用。

[关键词] GBE50; 缺血; 乳头肌; 动作电位

银杏叶作药用在我国民间已有几千年历史。银杏叶提取物(EGb)对防治脑血管疾病有效^[1]。在欧洲,将 EGb761 / GBE30(黄酮苷 flavone glycosides 占 24%、二萜内酯 ginkgolids 占 6%)作为银杏叶提取物的标准制品。大量实验及临床资料表明 EGb761 可用于防治心血管疾病,尤其预防缺血综合征,促进心肺血管搭桥手术的预后^[2-3]。近年来,我国自主开发一种类似 EGb761 的新型银杏叶提取物——银杏酮酯(GBE50),总黄酮成分可高达近 50%。以银杏酮酯(GBE50)为原料的杏灵颗粒,2000 年获国家药品监督管理局批准正式生产并获发明专利授权,已通过临床试验,用于治疗冠心病、心绞痛和脑动脉硬化、眩晕^[4]。现有的实验资料表明银杏酮酯能显著降低冠脉结扎犬的心肌缺血程度,缩小心肌缺血范围,梗塞区域显著减少^[5]。心肌缺血时不仅有心肌组织缺氧,同时有代谢产物的堆积,由此而引发心肌复杂的生化和电生理功能的改变。利用电生理的方法分析细胞电生理学的改变及其离子机制有独特的优越性,本实

验采用标准微电极技术观察 GBE50 对正常及模拟缺血豚鼠乳头肌动作电位的影响。

1 材料和方法

1.1 溶液和试剂 台氏液(mmol · L⁻¹): NaCl 137.0, KCl 5.4, CaCl₂ 1.8, MgCl₂ 1.0, NaHCO₃ 23.8, NaH₂PO₄ 0.4, glucose 10, 95% O₂和 5% CO₂饱和, pH 7.4。模拟缺血液(mmol · L⁻¹): NaCl 134.0, KCl 5.4, CaCl₂ 1.8, MgCl₂ 1.0, NaHCO₃ 3.8, NaH₂PO₄ 0.9, 乳酸钠 20, 95% N₂和 50% CO₂混合气饱和, pH 6.7。

GBE50 为上海杏灵药业公司惠赠(批号 050901)。将 500 mg GBE50 溶于 3 mL 纯 PEG 后,再加 4 mL 去离子水,配制成 GBE50 的母液。地尔硫卓(田边制药株氏会社日本大阪工厂,天津田边分装,批号 0602002)10 mg 溶于 1 mL 水中,配制成 10 g · L⁻¹的母液。丹参注射液(杭州正大青春宝药业公司,批号 0612271)。上述母液冷冻保存,实验时加适量于灌流液中达到所需浓度。各种灌流液中溶剂 PEG 质量浓度均低于 0.1%。其余常规试剂均为国产分析纯。

1.2 豚鼠心室乳头肌标本制备和跨膜电位的记录

将豚鼠(220 ~ 250 g, 雄性)随机分为 10 组,正常对照组、溶剂对照组、正常 GBE50 组、缺血模型组、缺血中药丹参注射液对照组、缺血西药地尔硫卓对照组、缺血 GBE50 低、中、高、极高剂量用药组。豚鼠击昏后开胸,迅速取出心脏置于 37 °C, 95% O₂和

[稿件编号] 20091120012

[基金项目] 上海市教委重点学科项目(J50301);上海市教委科研项目(06cz017)

[通信作者] * 张志雄, 教授, 博士生导师, Tel: (021) 51322588, E-mail: zixion@online.sh.cn

[作者简介] 刘爱华, 讲师, 博士研究生, 主要从事中西医结合基础研究



5% CO₂混合气饱和的台氏液中,解剖分离出右心室乳头肌,用 0 号不锈钢针固定于恒温(36 ± 0.5)℃、恒流(5 mL · min⁻¹)的灌流槽中央底部。细胞内记录以尖端裸露、直径 0.5 mm 双极乏极化绝缘铂金丝电极作细胞外刺激,强度为阈值的 1.5 ~ 2 倍,频率为 1 Hz(BCL = 1 000 ms),波宽为 0.1 ms。以尖端裸露、乏极化银丝作为细胞外参考电极,记录电极为玻璃毛细管(直径 1.5 mm,有芯,中国科学院上海生理所,型号 GG-17)经微电极拉制仪(NARISHIGE, PE-21, JAPAN)两步拉制而成,控制好的微电极,其内充以 3 mol · L⁻¹ KCl 的电极内液,电极电阻为 10 ~ 20 MΩ,并以铂金丝电极引导,应用标准微电极技术^[6],用微操纵仪步进马达(NARISHIGE, PF5-1, JAPAN)将玻璃微电极插入已分离的心室乳头肌内引出跨膜电位,信号经微电极放大器(SWF-1W, 成都仪器厂)放大,由 RM6240B/C 信号处理系统显示,记录,处理和分析。跨膜电位所测定的参数包括:静息电位(resting potential, RP),动作电位幅度(action potential amplitude, APA),动作电位超射值

(action potential over shoot, OS)和动作电位复极化至 20%, 50%, 90% 时间(action potential duration, APD₂₀, APD₅₀, APD₉₀)。

1.3 数据处理及统计分析 资料用成都仪器厂生理信号采集系统自带分析软件,微软 Excel 及 SPSS 11.5 进行处理分析、统计作图。所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据处理组内比较用配对样本 *t* 检验,组间比较用单因素方差分析。

2 结果

2.1 GBE50 对正常豚鼠乳头肌动作电位的影响
正常对照组在开始记录稳定后与 1 h 后及 2 h 后记录到的动作电位各参数相比较均无显著性差异。溶剂 PEG40 对照组也没有显著性差异。用含有不同质量浓度(5, 10, 20, 50, 100 mg · L⁻¹) GBE50 的台氏液累积灌流 20 min,结果显示 GBE50 缩短心室乳头肌 APD₅₀和 APD₉₀,呈剂量依赖性效应,而对其他参数如 APA, RP 和 APD₂₀没有影响(表 1,图 1)。上述效应均不能被正常台氏液洗回(*n* = 6, *P* < 0.01)。

表 1 不同浓度的 GBE50 对豚鼠心室乳头肌动作电位的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/mg · L ⁻¹	RP/mV	APA/mV	APD ₅₀ /ms	APD ₉₀ /ms
正常		-90.81 ± 2.64	131.63 ± 10.50	175.69 ± 35.55	214.86 ± 31.96
GBE50	5	-97.39 ± 11.10	138.16 ± 6.62	164.62 ± 35.47 ¹⁾	201.23 ± 32.67 ²⁾
	10	-93.10 ± 1.76	132.89 ± 3.92	166.40 ± 39.99	202.05 ± 36.27 ¹⁾
	20	-92.63 ± 2.16	129.06 ± 10.60 ^{1,3)}	164.14 ± 44.06	202.14 ± 39.74 ¹⁾
	50	-91.52 ± 3.56	125.54 ± 11.59	157.14 ± 46.35 ¹⁾	194.88 ± 40.62 ¹⁾
	100	-92.40 ± 2.58	128.31 ± 8.30	153.27 ± 46.28 ^{1,4,5)}	194.74 ± 40.77 ¹⁾
洗回		-86.23 ± 10.19 ⁵⁾	120.93 ± 16.93	152.30 ± 45.80 ²⁾	188.13 ± 42.52 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾*P* < 0.05, ²⁾*P* < 0.01; 与 GBE50 5 mg · L⁻¹组比较³⁾*P* < 0.05; 与 GBE50 10 mg · L⁻¹组比较⁴⁾*P* < 0.05; 与 GBE50 50 mg · L⁻¹组比较⁵⁾*P* < 0.05。

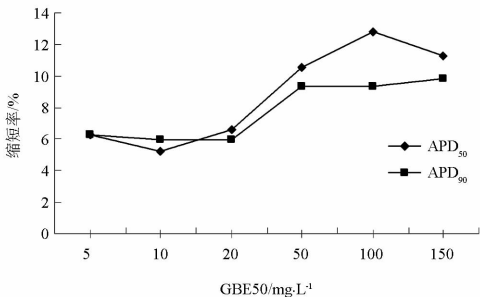


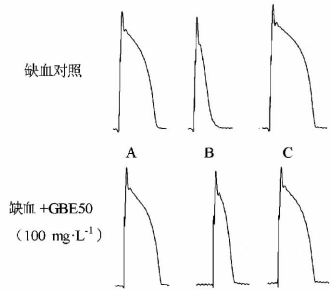
图 1 GBE50 缩短豚鼠心室乳头肌动作电位的量效曲线

2.2 模拟缺血对豚鼠乳头肌动作电位的影响及

GBE50 的效应 在台氏液中记录到豚鼠心室乳头肌细胞动作电位波形稳定 30 min 后,改用模拟缺血血液灌流,5 min 开始表现出缺血效应,动作电位的各项指标均发生了明显的变化,20 min 达到稳态。结果显示 RP, APA 和 OS 分别减小,APD₂₀, APD₅₀和 APD₉₀分别缩短。RP 的除极、APA 和 OS 的减小、APD 的缩短与缺血前正常时相比具有极显著性差异(*n* = 7, *P* < 0.01)。当缺血血液改正常台氏液冲洗 15 min 后动作电位各指标均可恢复正常。在模拟缺血血液中加入不同浓度 GBE50,同样灌流标本 20 min,缺血加药(100 mg · L⁻¹)组缺血 10 min 时 APA,



OS, APD_{20} , APD_{50} , APD_{90} 缩短 ($n=5, P<0.05$) ; 缺血 20 min 各参数无变化 ($n=5$), 可洗回。 $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 丹参对缺血心肌 APD 参数也有改善, 且与缺血组相比有显著性差异。而西药对照组 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 地尔硫卓对缺血心肌 APD 参数没有影响 (图 2, 表 2)。



A. 对照; B. 缺血 20 min; C. 洗回。

图 2 模拟缺血时豚鼠乳头肌动作电位波形的改变及 GBE50 的效应

表 2 GBE50 和丹参预处理缺血时豚鼠乳头肌动作电位各参数的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	RP/mV	APA/mV	OS/mV	APD_{20}/ms	APD_{50}/ms	APD_{90}/ms
缺血对照	缺血前	7	-89.58 ± 4.91	123.57 ± 5.51	33.99 ± 6.60	51.45 ± 19.64	137.09 ± 24.01
	缺血 20 min	7	-77.72 ± 11.26	$102.94 \pm 17.40^{3)}$	$25.23 \pm 11.16^{3)}$	$24.49 \pm 17.43^{4)}$	$69.51 \pm 36.73^{4)}$
缺血 + GBE50	缺血前	5	-88.68 ± 7.30	128.33 ± 12.09	39.64 ± 5.65	54.95 ± 27.82	175.38 ± 36.46
	缺血 20 min	5	-86.07 ± 9.60	120.91 ± 11.46	34.84 ± 11.66	37.03 ± 36.85	121.85 ± 76.25
缺血 + 丹参	缺血前	6	-88.32 ± 4.60	118.38 ± 10.57	30.06 ± 7.01	67.21 ± 17.36	158.85 ± 21.20
	缺血 20 min	6	$-84.88 \pm 6.13^{2)}$	114.93 ± 14.12	30.06 ± 8.89	$39.72 \pm 24.09^{2)}$	$118.21 \pm 44.57^{2)}$

注: 与缺血对照组比较¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; 与缺血前比较³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$ 。

常见抗心律失常药物如 I a 和 III 类抗心律失常药都是通过延长有效不应期 (ERP) 来发挥其抗速发性心律失常作用。或绝对延长 ERP, 同时延长 APD 和 ERP, 但对 ERP 的延长比 APD 明显, 或相对延长 APD, 同时缩短 APD 和 ERP, 但对 APD 的缩短比 ERP 明显。GBE50 对 APD 的单纯效应是缩短的, 因此它是否有可能通过相对延长 ERP 而达到抗速发性心律失常效应, 这一推测还需经进一步的实验研究来证实。

在模拟缺血条件下离体豚鼠心脏右心室乳头肌其跨膜电位发生了明显的变化, RP 除极、APA 降低、APD 缩短, 与其他实验室报道的实验结果相一致^[9]。心肌缺血期间膜除极的主要原因是由于细胞外 K^+ 浓度的升高和内向离子流的自发性出现^[10]。APA 的降低是由于 Na^+ 内流减少和外向离子流自发性增多引起的短循环 (short-circuiting) 效

3 讨论

动作电位的产生是可兴奋细胞产生反应的基础, 也是兴奋的标志。心肌细胞动作电位时程 (action potential duration, APD) 的长短, 取决于 AP 复极时内向电流和外向电流的相互作用, 若内向电流加速或外向电流受到抑制, 则 APD 延长。 APD_{50} 代表平台期时程, 它的长短主要由钙内向电流 ($I_{\text{Ca-L}}$) 和外向的延迟整流钾电流 (I_{K}) 的大小决定; 高浓度 GBE50 缩短 APD_{50} , 提示它具有开放钾通道 (或) 和阻断钙通道的作用。 APD_{90} 还受内向整流钾电流 (I_{K1}) 的影响^[7], GBE50 缩短 APD_{90} 提示它还可能影响内向整流钾电流。这样的结果与作者所在课题组以往观察到的银杏苦内酯 B 缩短动作电位时程的作用相符合^[8]。而在实验中未观察到对其他电生理参数如 RP, APA, OS 有明显影响, 这从电生理学方面表明 GBE50 对正常心肌是较为安全的。

APD 的缩短主要是由于平台期外向离子流的增加, 同时伴有内向离子流的减少。增加的外向离子流是 K^+ 和 Cl^- , 其中最重要的是 K^+ , 这个 K^+ 离子流并不是在生理条件下正常激活的 K^+ 离子流, 而是在缺血条件下特异激活的 K^+ 离子流, 主要包括 $I_{\text{K-ATP}}$ ^[10], I_{KNa} ^[11-12] 和 I_{KAA} ^[13]。而正常生理条件下激活的 K^+ 离子流在缺血的情况下则被明显抑制。

在模拟缺血液中加入 GBE50, 显示缺血引起跨膜电位参数的改变明显减轻, 与缺血前相比无显著性差异, 与文献中关于银杏有效成分银杏苦内酯 B 对抗缺血时动作电位时程缩短的作用^[14] 相符合, 提示 GBE50 可以维持缺血期间膜电位及各项电生理参数的稳定, 是 GBE50 抗心肌缺血的电生理学基础。由于心室肌细胞动作电位是多种离子流跨膜移动的综合反映, 由此推测 GBE50 对抗缺血对动作电位的抑制效应是通过影响心肌细胞膜某些离子通道



而实现的。

[参考文献]

- [1] 陈修. 银杏叶提出物的心脑血管药理研究进展与启示[J]. 中国中西医结合杂志, 1996, 16(7): 387.
- [2] Pietri S, Seguin J R, D' Arbigny P, et al. Ginkgo biloba extract (EGb 761) pretreatment limits free radical-induced oxidative stress in patients undergoing coronary bypass surgery[J]. Cardiovasc Drugs Ther, 1997, 11(2): 121.
- [3] Vagra E, Bodi A, Ferdinandy P, et al. The protective effect of EGB761 in isolated ischemic/reperfused rat hearts: a link between cardiac function and nitric oxide production[J]. J cardiovasc Pharmacol, 1999, 34(5): 711.
- [4] 高益民. 对二类新药杏灵颗粒上市后的初步评价[J]. 中药研究与信息, 2002, 4(9): 21.
- [5] 闵暘, 刘恺, 陆晴, 等. 银杏酮酯抗心肌梗塞药效学研究[J]. 中成药, 1998, 20(10): 32.
- [6] McGuire M A, De Bakker J M, Vermeulen J T, et al. Atrioventricular junctional tissue. Discrepancy between histological and electrophysiological characteristics [J]. Circulation, 1996, 94(3): 571.
- [7] J R Balsler, P B Bennett, D M Roden. Time-dependent outward current in guinea pig ventricular myocytes[J]. G Jgen Physiol, 1990, 96(4): 835.
- [8] Qi Xiaoyan, Zhang Zhixiong, Xu Youqiu. Effects of Ginkgolide B on action potential and calcium, potassium current in guinea pig ventricular myocytes[J]. Acta Pharm Sinica, 2004, 25(2): 204.
- [9] Wilensky R L, Tranum-Jensen J, Coronel R, et al. The subendocardial border zone during acute ischemia of the rabbit heart: an electrophysiologic, metabolic, and morphologic correlative study [J]. Circulation, 1986, 74(5): 1137.
- [10] Carmeliet E. Cardiac ionic currents and acute ischemia: from channels to arrhythmias[J]. Physiol Rev, 1999, 79(3): 917.
- [11] Kameyama M, Kakei M, Sato R, et al. Intracellular Na⁺ activates a K⁺ channel in mammalian cardiac cells[J]. Nature, 1984, 309(5966): 354.
- [12] Luk H N, Carmeliet E. Na⁺-activated K⁺ current in cardiac cells: rectification, open probability, block and role in digitalis toxicity[J]. Pflügers Arch, 1990, 416(6): 766.
- [13] Wallert M A, Ackerman M J, Kim D, et al. Two novel cardiac atrial K⁺ channels, IK_{AA} and IK_{PC}[J]. J Gen Physiol, 1991, 98(5): 921.
- [14] 祁小燕, 张志雄, 崔启启, 等. 银杏苦内酯 B 对缺血豚鼠心室肌细胞动作电位, L-型钙电流和延迟整流钾电流的作用[J]. 中国应用生理学杂志, 2004, 20(1): 24.

Effect of GBE50 on action potentials in normal and simulated ischemic guinea pig papillary muscles

LIU Aihua, ZHANG Zhixiong*

(Department of Physiology, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of *Ginkgo biloba* extract 50 (GBE50), a new multicomponent drug with a polyvalent action extracted from the leave of *Ginkgo biloba*, on the action potentials in normal and simulated ischemic guinea pig papillary muscles. **Method:** Standard intracellular microelectrode technique was used to examine the effects of GBE50 on the action potential parameters [action potential amplitude (APA), overshoot, rest potential, action potential amplitude at 20%, 50%, 90% of repolarization (APD₂₀, APD₅₀, APD₉₀)]. **Result:** In normal guinea pig cardiac papillary muscles, GBE50 (20, 50, 100 mg · L⁻¹) shortened APD₅₀ and APD₉₀, and did not affect the rest potential parameters. In simulated ischemic guinea pig cardiac papillary cells, action potential duration was significantly shortened, resting potential and action potential amplitude were reduced. 100 mg · L⁻¹ GBE50 partly attenuated the change induced by ischemia. **Conclusion:** GBE50 shortened APD of normal guinea pig cardiac papillary cells in a concentration-dependent manner. Under ischemia, all action potential parameters were reduced. GBE50 could alleviate the electrophysiological heterogeneity of ischemic myocardium, which may attenuate myocardial ischemia and block the onset of arrhythmia.

[Key words] GBE50; ischemia; papillary muscles; action potential

doi: 10.4268/cjcm20101728

[责任编辑 张宁宁]