

东亚钳蝎蝎毒成分BmK-9及其次级提取物

对心肌细胞电活动的影响

钟国赓 孙晓霞 张文杰 江岩* 刘伟* 魏俊杰** 张红军**

(白求恩医科大学生理教研室、*生理中心实验室、**有机化学教研室 长春 130021)

心室肌细胞在培养过程中,由快反应非自律细胞转化为慢反应自律细胞^[1]。小鼠心肌细胞的这一转化发生较慢,于培养4—6天仍有60%的快反应非自律细胞^[2]。这些细胞可被驱动,产生快反应心肌细胞动作电位,是研究钠通道活动的理想模型。我们在此模型上观察到东亚钳蝎粗毒可使快反应心肌细胞动作电位的时程与除极有关参数全部减小^[3]。除极有关参数减小,表明其钠通道阻滞作用。而动作电位时程的变化,则提示蝎毒还可能与钾通道^[4]、钙通道^[5]的活动,以及肌质网对钙的摄取^[6]有关。为了探讨蝎毒中是否存在具有单纯钠通道阻滞作用的化学成分,本文用同法观察了蝎毒二级与三级提取物对培养小鼠心肌细胞动作电位的影响。

材料与方 法

一、药品与试剂

东亚钳蝎(BmK, *Buthus martensii* Karasch)蝎毒由本校有机化学教研室提取。将粗毒通过Sephadex G 10柱除盐后,经CM Sephadex C 50离子交换层析得到13个蛋白峰,每个单峰为一种电泳纯的二级提取物。自其第9峰获得的提取物命名为BmK-9。将BmK-9再经Sephadex G 50凝胶过滤又得到5个峰,每个单峰为一种电泳纯的三级提取物,分别命名为BmK-9-(1)、BmK-9-(2)、BmK-9-(3)…。各级提取物均为小分子多肽,冻干后为易溶于水的白色粉末。

人工合成培养基(DMEM, Dubecco's Modified Eagle Medium, Life Technologies Inc, USA)。小牛血清由本实验室自制。尼莫地平(nimodipine, 天津市中央制药厂)。河豚毒(tetrodotoxin, TTX, Sigma Chemical Co, USA)。

二、心肌细胞培养

在无菌条件下取出出生后24—48小时的昆明种小鼠全心室,剪碎,用0.1%胰蛋白酶加机械搅拌的方法分离心肌细胞。将心肌细胞置入含80% DMEM与20%小牛血清的培养基中,于36.5℃、pH 7.2的二氧化碳孵箱中进行培养。

三、动作电位记录

将聚苯乙烯培养瓶的上壁打开,放在倒置显微镜的恒温套内,保持pH 7.2、36.5℃的细胞外环境。自搏动群落的心肌细胞内,用微电极引导动作电位。动作电位可稳定存在2小时以上,经微机连机分析其7项电参数:动作电位幅值(APA)、超射(OS)、阈电位(TP)、最大舒张电位(MDP)、最大除极速度(V_{max})、复极50%水平的动作电位波宽(APD_{50})。

结 果

于培养4—5天时,进行心肌细胞动作电位记录。按 $V_{max} > 80$ V/s的标准判定快反应心肌细胞^[2]。分别向培养基中加入蝎毒二级提取物BmK-9、三级提取物BmK-9-(1)、BmK-9-(2)、BmK-9-(3)、BmK-9-(4)、BmK-9-(5),剂量均为3 μ g/ml。记录加药前后的心肌细胞动作电位。同样条件下应用河豚毒2.5 μ g/ml、尼莫地平3 μ g/ml、氯化钡2 mmol/L,进行对照。

结果如表1所示:

BmK-9使培养小鼠心肌细胞快反应动作电位的五项除极化参数APA, OS, MDP, TP, V_{max} 显著减小;波宽参数 APD_{50} 显著延长。其五种次级提取物也能使 V_{max} 显著减慢,但BmK-9-(1)、BmK-9-(2)对其它四项除极参数无明显影响,而使动作电位波宽显著延长; BmK-9-(3)、BmK-9-(4)、BmK-9-(5)

表1 BmK-9系列对培养小鼠心肌细胞动作电位的影响

	n	APA/mV	OS/mV	MDP/mV	TP/mV	$V_{max}/V_s \cdot s^{-1}$	APD ₅₀ /ms
control	86	76±10	25±3	51±9	39±8	104±28	48±11
BmK-9	22	68±14*	21±4*	47±9*	34±10*	25±27**	59±12*
BmK-9-(1)	32	72±21	23±8	49±13	36±11	75±35**	75±13**
BmK-9-(2)	31	77±16	27±8	50±10	36±10	88±31**	64±2**
BmK-9-(3)	25	59±14**	18±4**	41±11**	33±9**	52±15**	53±25
BmK-9-(4)	35	54±10**	17±5**	37±9**	28±7**	59±26**	52±11
BmK-9-(5)	27	36±7**	7±3**	30±4**	23±3**	35±9**	54±11
Nimodipine	30	73±6	23±8	55±14	37±12	92±16	39±5**
BaCl ₂	30	63±3**	28±2**	35±3**	22±3**	56±9**	188±11**
Tetrodotoxin	30	46±3**	11±5**	34±7**	16±4**	8±3**	45±6**

X±SD, n=penetrations, *P<0.05, **P<0.01 vs control, BmK-9 series, 3.0 μg/mL, Nimodipine, 3.0 μg/mL, BaCl₂, 0.1 mmol/L, Tetrodotoxin, 2.5 μg/mL.

则使除极有关参数全部显著减小, 而不影响动作电位波宽。用新鲜培养基洗脱蝎毒, 各项指标均立即恢复。钙通道阻滞剂尼莫地平使动作电位波宽显著缩短, 对除极有关参数无影响。钾通道阻滞剂 BaCl₂ 使动作电位除极参数减小、波宽延长。TTX 使 6 项参数全部减小。

讨 论

本实验将各种蝎毒成分加入培养基中均立即生效; 用新鲜培养基洗脱后, 心肌细胞动作电位立即恢复。这一作用特点符合通道激动剂和通道阻滞剂作用的共性。快反应心肌细胞动作电位的 0 期除极化主要靠钠内流。V_{max} 是钠内流的最灵敏指标。因此, BmK-9 及其五种次级提取物均能使 V_{max} 显著减慢表明 BmK-9 系列的六种蝎毒成分均有钠通道阻滞作用。

BmK-9-(3)、BmK-9-(4)、BmK-9-(5) 能使心肌细胞动作电位中与钠内流有关的五项除极化参数全部显著减小, 而对其波宽无明显影响。表明这三种蝎毒成分有单纯阻滞钠通道的作用。钙通道阻滞剂尼莫地平选择性抑制与钙内流密切相关的动作电位波宽, 而不影响与钠内流有关的除极参数。从另一角度支持 BmK-9-(3)、BmK-9-(4)、BmK-9-(5) 只阻滞钠通道, 而与钙通道活动无关。特别是经典钠通道阻滞剂河豚毒对除极参数的影响与蝎毒相同, 有力地支持蝎毒有钠通道阻滞作用。至于应用

河豚毒后, 心肌细胞动作电位波宽呈现缩短, 则显然与钾、钙通道无关, 而是继发于除极参数 APA(复极化的全程)、OS(复极化的起点)、MDP(复极化的终点) 的显著变小。

BmK-9-(1)、BmK-9-(2) 使动作电位波宽显著延长。此作用与钾通道阻滞剂 BaCl₂ 的对照实验结果有共同之处。但 BaCl₂ 使钾通道阻滞剂后, 不仅心肌细胞膜的复极化推迟并减慢, 导致动作电位的波宽延长; 而且使膜对钾离子的通透性降低、钾平衡电位减小, 导致膜的除极化^[7]。进而使电压依赖性钠通道失活、心肌细胞动作电位的 0 期除极速度和幅度下降, 导致与除极有关的所有电参数全部减小。而 BmK-9-(1)、BmK-9-(2) 却对 V_{max} 以外的其它除极有关参数无明显影响, 所以这两种蝎毒组分可能除涉及钾通道外, 还与其它离子转运机制有关。由于本实验旨在自蝎毒二、三级提取物中筛选单纯阻滞钠通道的活性成分, 故未对 BmK-9(1)、BmK-9(2) 的其它作用进一步分析。

BmK-9 既可使快反应心肌细胞动作电位的除极有关参数减小, 又能使其波宽延长。显然 BmK-9 的作用是其 5 种次级提取物作用的总和。

总之, 本实验结果表明蝎毒三级提取物 BmK-9-(3)、BmK-9-(4)、BmK-9-(5) 可能只对钠通道有阻滞作用, 是蝎毒中单纯阻滞钠通

道的活性成分。在此基础上进一步提纯,很可能形成一种新的阻断钠通道的工具药。

摘 要

培养小鼠的心肌细胞,用微电极胞内引导快反应心肌细胞动作电位。以五项除极化参数APA, OS, MDP, TP, V_{max} 和波宽参数APD₅₀为指标,发现东亚钳蝎毒三级提取物BmK-9-(3)、BmK-9-(4)、BmK-9-(5) 3 μ g/ml使除极有关参数全部减小,而不影响动作电位波宽。表明它们可能是蝎毒中单纯阻滞钠通道的活性成分。

关键词: 培养心肌细胞 动作电位
蝎毒 钠通道

参 考 文 献

- [1] Schanne OF et al., 1981, *Can J Physiol.*, 59: 443—67.
- [2] 江岩等, 1991, 细胞生物学杂志, 13: 86—9.
- [3] 齐晖等, 1993, 中国药理学报, 14: 361—4.
- [4] Fermini B et al., 1991, *Cardiovas Res.*, 25: 235—43.
- [5] Schwarz W et al., 1983, *Annu Rev Physiol.*, 45: 359—74.
- [6] Couraud F et al., 1980, *Biochem.*, 19: 457—62.
- [7] Sperelakis N. 1986, *Handbook of Physiology—The Cardiovascular system 1*, printed in USA, p 192.

INFLUENCE OF SCORPION VENOM CONTENT BMK-9 AND ITS NEXT GRADE EXTRACTS FROM *BUTHUS MARTENSII* KARASH ON ELECTRIC ACTIVITY OF MYOCARDIOCYTES

Zhong Guogan, Sun Xiaoxia, Zhang Wenjie, Jiang Yan*, Liu Wei*, Wei Junjie**, Zhang Hongjun**

(Department of Physiology, *Central Laboratory of Physiology, **Department of Organic Chemistry, Norman Bethune University of Medical Sciences, Changchun 130021)

ABSTRACT

Myocardocytes of mice were cultured. Action potentials of fast response myocardocytes were recorded with microelectrode inside the cells. It was found that the third grade extracts of scorpion venom from *Buthus martensii* Karasch, BmK-9-(3), BmK-9-(4), BmK-9-(5) 3 μ g/ml decreased all of the depolarization concerned parameters without influence on the duration of action potential, indicating their simple sodium channel blockade action.

Key words: Cultured myocardocytes Action potentials Scorpion venom
Sodium channels