

## • 基础研究 •

## 地黄低聚糖对骨骼肌成肌细胞瞬时外向钾电流的影响

尹明 王士雯 高磊 李泱 王新华 刘鹏

**【摘要】** 目的 从细胞瞬时外向钾电流( $I_{to}$ )角度,探讨地黄低聚糖(RGOs)对骨骼肌成肌细胞(SMs)电生理特性的影响。方法 分离成年大鼠心肌细胞和SMs,运用膜片钳技术研究心肌细胞和SMs以及 $0.625\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  RGOs干预后,SMs与心肌细胞 $I_{to}$ 的差异。结果 两种细胞 $I_{to}$ 均从 $-40\text{mV}$ 时开始激活,RGOs对大鼠SMs $I_{to}$ 有增加作用,从 $-30\text{mV}$ 到 $30\text{mV}$ ,经过 $0.625\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  RGOs预处理的SMs组 $I_{to}$ 密度[( $7.3\pm 0.7$ ) to ( $65.3\pm 2.3$ ) $\text{pA}/\text{pF}$ ( $n=5$ )]显著高于心肌组[( $0.9\pm 0.1$ ) to ( $28.8\pm 0.9$ ) $\text{pA}/\text{pF}$ ( $n=5$ )]和SMs组[( $4.5\pm 0.5$ ) to ( $23.7\pm 2.0$ ) $\text{pA}/\text{pF}$ ( $n=5$ )]的电流密度。结论 RGOs能显著提高SMs的 $I_{to}$ 密度,影响移植的SMs的电生理特性。这为今后在提高干细胞移植有效性同时,增加其安全性提供了一个新的思路。

**【关键词】** 地黄低聚糖;成肌细胞;肌细胞;心脏;膜片钳术

## Effects of *Rehmannia glutinosa* oligosaccharides on outward potassium current of skeletal myoblasts

YIN Ming<sup>1</sup>, WANG Shiwen<sup>2</sup>, GAO Lei<sup>2</sup>, et al

1. Emergency Department of Chinese PLA General Hospital, 2. Institute of Geriatric Cardiology of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

**【Abstract】** Objective To investigate the effects of *Rehmannia glutinosa* oligosaccharides (RGOs) on electrophysiological characteristics of skeletal myoblasts in the light of their outward potassium current ( $I_{to}$ ). Methods Skeletal myoblasts (SMs) and cardiomyocytes were isolated using a modified enzymatic dissociation method from SD rats. Whole cell patch clamp technique was used to record  $I_{to}$  of cardiomyocytes and SMs, and study the difference in  $I_{to}$  between SMs and cardiomyocytes after intervention with  $0.625\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  RGOs. Results  $I_{to}$  of both cardiomyocytes and SMs was activated from  $-40\text{mV}$ .  $I_{to}$  density from  $-30\text{mV}$  to  $30\text{mV}$  in the SMs of RGOs treated group was ( $7.3\pm 0.7$ ) $\text{pA}/\text{pF}$  to ( $65.3\pm 2.3$ ) $\text{pA}/\text{pF}$ ( $n=5$ ), respectively, which were significantly greater than cardiomyocyte group ( $0.9\pm 0.1$ ) $\text{pA}/\text{pF}$  to ( $28.8\pm 0.9$ ) $\text{pA}/\text{pF}$ ( $n=5$ ) and SMs group( $4.5\pm 0.5$ ) $\text{pA}/\text{pF}$  to ( $23.7\pm 2.0$ ) $\text{pA}/\text{pF}$ ( $n=5$ ). Conclusion RGOs could elevate  $I_{to}$  current density of SMs and affect the electrophysiological characteristics in transplanted SMs. It could provide a new strategy for promoting the safety of SMs transplantation.

**【Key words】** *Rehmannia glutinosa* oligosaccharides; skeletal myoblast; myocyte, cardiac; patch clamp technique

自 Marelli 等<sup>[1]</sup>首次进行实验性自体骨骼肌成肌细胞(skeletal myoblasts, SMs)移植治疗心肌梗死后10余年来,自体SMs移植逐步从实验室走向临床应用。其优势在于可直接产生具有收缩功能的肌细胞,从而修复受损心脏泵功能;但也存在其劣势,无论是动物实验还是临床疗效观察,均发现SMs移植后,室

性心律失常的发生率增加<sup>[2]</sup>。地黄是中药方剂中被广泛使用的一味药物。地黄低聚糖(*Rehmannia glutinosa* oligosaccharides, RGOs)是地黄中的主要有效成分之一。本研究在离体水平,从细胞瞬时外向钾电流(outward potassium current,  $I_{to}$ )角度,观察RGOs对SMs电生理特性的影响,为中医药用于细胞移植修复

收稿日期:2008-04-22

基金项目:国家自然科学基金面上项目(30371825)

作者单位:100853 北京市,解放军总医院急诊科(尹明),老年心血管病研究所(王士雯、高磊、李泱、王新华、刘鹏)

作者简介:尹明,男,1973年6月生,吉林省长春市人,医学博士,现为解放军总医院急诊科主治医师

心肌提供治疗新思路。

### 1 材料与方 法

1.1 主要实验材料 成年 SD 大鼠,雌雄不拘,质量 100~150g,解放军总医院实验动物中心提供。RGOs 提纯物由兰州军区兰州总医院张汝学副主任药师馈赠。样品经高效液相色谱检测水苏糖含量为 65.15%<sup>[3]</sup>。干细胞培养专用胎牛血清(fetal calf serum, FBS, 美国 Gibco 公司), DMEM/F12 培养液(美国 Gibco 公司), 胰蛋白酶(1:250, 美国 Gibco 公司), 膜片钳放大器(美国 Axonpatch 700B), 数据采集与分析软件(美国 Clampex8.1, Clamfit8.1); 玻璃毛坏(原中国科学院上海生理学研究所, GG217)。

1.2 SMs 细胞准备 SD 大鼠经戊巴比妥钠(30 mg · kg<sup>-1</sup>) 腹腔麻醉作气管插管后,接人工呼吸机,静脉注射肝素钠 500 U · kg<sup>-1</sup>,开胸分离主动脉并插管,迅速剪下心脏,在 37 °C 恒温 and 通氧条件下行 Langendorff 灌流。用含 I 型胶原酶 0.33g · L<sup>-1</sup>, 蛋白酶 E 0.25g · L<sup>-1</sup> 和牛血清白蛋白 0.25g · L<sup>-1</sup> 的无 Ca<sup>2+</sup> Tyrode 液灌流 15min 以消化心肌,在含 0.2 mmol · L<sup>-1</sup> Ca<sup>2+</sup> 的 Tyrode 液中温孵,取上清液即得单个心室肌细胞。将其存放于含 0.25g · L<sup>-1</sup> 牛血清白蛋白和 200 U · L<sup>-1</sup> 氨苄青霉素的 Tyrode 液中,室温保存 10 h 内使用。取上述细胞液加于 1ml 灌流槽中,待细胞贴壁后,选择边缘整齐,横纹清晰的细胞,在 25 °C 下进行实验。

取 3 代 SMs 消化,以 1 × 10<sup>5</sup>/孔接种于 35mm 培养皿中,加入培养基(15% FBS + DMEM/F12) 进行培养,并加入 RGOs 溶液,使其终浓度为 0.625 g · L<sup>-1</sup>,对照组加入等量生理盐水,培养 24h。每组 3 个样品。膜片钳检测前吸除培养液,用 PBS 洗 3 遍,然后用 Tyrode 液洗 3 遍,加入电极外液孵育 2h。

按照下列步骤分别进行心肌细胞、SMs、SMs + 0.625 g · L<sup>-1</sup> RGOs 的 I<sub>to</sub> 检测。

1.3 采用全细胞膜片钳记录方法,在电压钳制下记

录电流 膜片钳放大器与计算机连接;玻璃毛坏经微电极控制仪控制成电阻为 2.5~3.5Ω 的电极,调节三维操纵器(Narishige, MO2203) 进行封接,使封接电阻达 1GΩ 以上,吸破细胞膜形成全细胞记录模式。

1.4 记录 I<sub>to</sub> 电容测定时施以 0.4 V · s<sup>-1</sup> 的斜坡刺激,测电流并按方程 C<sub>m</sub> = I / (dV · dt<sup>-1</sup>) 计算,其中 C<sub>m</sub> 为膜电容, I 为电流值, dV · dt<sup>-1</sup> 即电压斜率。调节慢电容补偿和串联电阻补偿(50%~80%) 以减少瞬时充放电电流和钳位误差。为消除细胞间误差,电流值以电流密度(pA · pF<sup>-1</sup>) 表示。信号经截止频率为 1 kHz 的四阶贝塞尔低通滤波器,采样率为 5 kHz。采样后数据存贮在计算机内,供测量及分析用。I<sub>to</sub> 记录刺激参数:保持电位 -80mV,施予 -40mV, 3ms 的预刺激失活钠通道,紧接着给予 -40~+50mV, 62.5ms 的脉冲,记录 I<sub>to</sub>。每个样品至少做 5 个细胞。以平均值为该样品的数据。

1.5 以各脉冲下电流密度幅值对相应膜电位作图得电流-电压(I-V) 曲线。

### 2 结 果

2.1 大鼠心肌细胞与 SMs 的 I<sub>to</sub> 密度及 I<sub>to</sub>-V 曲线的比较 两种细胞 I<sub>to</sub> 均从 -40mV 时开始激活,在低于 10mV 时,SMs 的 I<sub>to</sub> 显著大于心肌细胞,而在 >10mV 时,心肌细胞 I<sub>to</sub> 密度反而大于同一刺激电位下 SMs 的 I<sub>to</sub> (表 1, 图 1)。

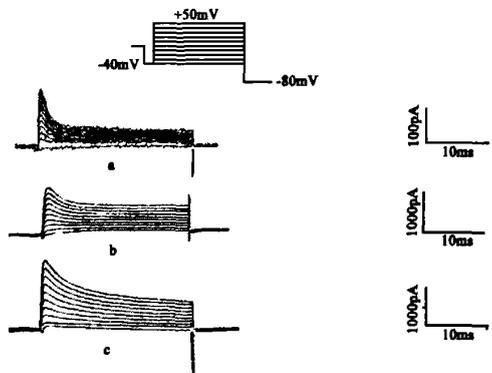


图 1 大鼠心肌细胞(a)、SMs(b)和 RGOs 处理后的 SMs(c) I<sub>to</sub> 比较

表 1 RGOs 对 SMs 不同除极化水平 I<sub>to</sub> 密度的影响(pA / pF)

组别	-30mV	-10mV	0mV	10mV	30mV
心肌细胞	0.9 ± 0.1	7.1 ± 0.2	12.4 ± 1.3	18.1 ± 1.3	28.8 ± 0.9
SMs	4.5 ± 0.5*	11.6 ± 1.6*	15.0 ± 2.0	17.7 ± 1.7*	23.7 ± 2.0*
SMs + RGOs	7.3 ± 0.7#	25.3 ± 1.5#	36.4 ± 0.9#	45.2 ± 1.7#	65.3 ± 2.3#

注:与心肌细胞相比,\* P < 0.01;与 SMs 相比,# P < 0.01

2.2 RGOs 对大鼠 SMs 的  $I_{to}$  及  $I_{to}$ -V 曲线的影响

RGOs 对大鼠 SMs  $I_{to}$  有增加作用,从 -30mV ~ 30mV, RGOs 预处理的 SMs  $I_{to}$  密度均显著增加 ( $P < 0.01$ ; 图 2)。

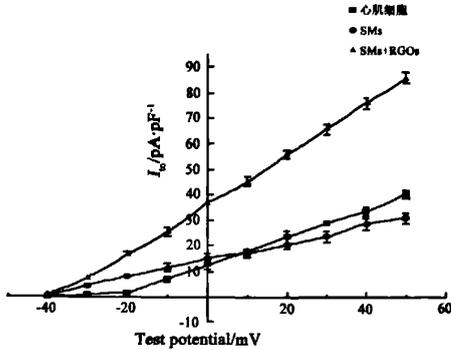


图 2 RGOs 对大鼠 SMs  $I_{to}$ -V 曲线的影响

3 讨论

SMs 移植引起恶性心律失常的发生机制尚不清楚,目前认为 SMs 与心肌细胞间离子通道电流的差异所导致的电生理特性异常是其中的重要原因之一。 $I_{to}$  是心肌细胞动作电位复极重要的决定因素<sup>[4]</sup>,研究证实, $I_{to}$  异常是心律失常发生的重要原因。心力衰竭、心肌肥厚、心肌梗死后  $I_{to}$  密度和 mRNA 水平均有不同程度降低,钾电流下降导致动作电位时程延长,心脏复极过程中电不稳定性增加,容易出现早后除极和室性心律失常<sup>[5]</sup>。本研究通过体外实验对成年大鼠心肌细胞和 SMs 的  $I_{to}$  进行比较,观察 SMs 在离子通道特性上与成熟心肌细胞的差异,进一步寻找 SMs 移植后心律失常的发生机制。同时探讨 RGOs 对体外培养 SMs 的  $I_{to}$  的影响,为从离子通道水平改善 SMs 移植后心脏电稳定性,降低恶性心律失常发生提供理论基础。

作者研究发现,大鼠 SMs 也表达  $I_{to}$ ,但电流本身的电压依赖性特征与大鼠成熟心肌细胞有显著差异,这可能是 SMs 移植增加室性心律失常发生的一个重要原因。 $I_{to}$  大小是心肌细胞动作电位复极的重要影响因素, $I_{to}$  下降可导致动作电位时程延长,心脏复极过程中电不稳定性增加,容易出现早后除极和室性心律失常。研究证实,心力衰竭、心肌肥厚、心肌梗死后  $I_{to}$  密度和 mRNA 水平均有不同程度降低<sup>[5]</sup>,这可能是上述病理条件下容易发生室性心律失常的一个重要机制。另一方面,移植的 SMs 与心肌细胞之间  $I_{to}$  差异必将导致两种细胞复极时间长短的差异增加,复极离散度增加,也有可能增加室性心律失常的发生。Ott 等<sup>[6]</sup> 在对培养大鼠 SMs

离子通道研究中发现, $I_{to}$  在大多数被研究的 SMs 中确实存在,而且刺激电位在 -40mV 左右时最大电流数值趋向于零,这与本研究结果相似。

本研究还发现,RGOs 能显著提高 SMs 的  $I_{to}$  密度,影响移植的 SMs 的电生理特性。目前干细胞抑制治疗心力衰竭或心肌梗死面临的一个重要问题就是干细胞移植后恶性心律失常发生率增高。Ott 等<sup>[6]</sup> 发现,在 SMs 移植入心肌组织中后 2 周内  $I_{to}$  有显著下降,推测与移植部位心肌组织微环境有关,因为这些接受 SMs 的心肌组织往往是心肌缺血或梗死的心肌组织,心肌本身呈冬眠状态,代谢水平低下,影响到被移植的 SMs 的正常生理功能,因此, $I_{to}$  在一段时间内下降明显。当局部心肌组织代谢水平逐渐恢复后, $I_{to}$  也开始逐渐增加。虽然 Ott 等并未指出这种移植的 SMs 的  $I_{to}$  在短时间内显著下降对心脏电生理特性和发生恶性心律失常的影响,但根据  $I_{to}$  自身的作用,有作者推测当  $I_{to}$  下降时,必将影响到细胞复极时间长短,导致动作电位时程延长,复极离散度可能增加,促进室性心律失常的发生<sup>[7]</sup>。

本研究发现,RGOs 能增加  $I_{to}$  密度,进而有可能缩短动作电位时程,降低室性心律失常的发生率,这为今后在提高干细胞移植有效性同时,增加其安全性提供了一个新思路。

参考文献

- [1] Marelli D, Desrosiers C, El-alfy M, et al. Cell transplantation for myocardial repair; an experimental approach. Cell Transplant, 1992, 1:383-390.
- [2] Menasche P, Hagege AA, Vilquin JT, et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. J Am Coll Cardiol, 2003, 41:1078-1083.
- [3] 张汝学,樊俊杰,贾正平,等.地黄中低聚糖的提取分离工艺研究.解放军药学报,2005,21:34-37.
- [4] Schultz JH, Volk T, Bassalay P, et al. Molecular and functional characterization of Kv4.2 and KChIP2 expressed in the porcine left ventricle. Pflugers Arch, 2007, 454:195-207.
- [5] Liu XS, Jiang M, Zhang M, et al. Electrical remodeling in a canine model of ischemic cardiomyopathy. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007, 292:H560-H571.
- [6] Ott HC, Berjukow S, Marksteiner R, et al. On the fate of skeletal myoblasts in a cardiac environment; down-regulation of voltage-gated ion channels. J Physiol, 2004, 558:793-805.
- [7] Bassani RA. Transient outward potassium current and  $Ca^{2+}$  homeostasis in the heart; beyond the action potential. Braz J Med Biol Res, 2006, 39:393-403.