

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.04.002

含丹参酮 II A 磺酸钠小鼠血清的制备及其对 PCASMCs 的 BK_{Ca} 作用的初探*

程俊, 曾晓荣, 李鹏云, 李妙龄, 刘智飞, 裴杰, 杨艳[△]
(泸州医学院心肌电生理学研究室, 四川泸州 646000)

摘要:目的 探讨一种将中药血清药理学和电生理学技术结合的方法,并将该方法运用到中药丹参的有效成分丹参酮 II A 磺酸钠(DS-201)的舒血管机制研究。**方法** 采用醇提法提取丹参有效成分,将该提取液给予小鼠灌胃,经眼球采血得到小鼠血清,用高效液相色谱法(HPLC)测定小鼠血清中 DS-201 的含量,并将该含药血清应用于单通道膜片钳实验,研究其对猪冠状动脉平滑肌细胞(PCASMCs)大电导钙激活钾通道(BK_{Ca})的作用。**结果** 含 DS-201 血清浓度线性范围是 0.73~1.91 μg/mL ($r=0.9977$),回收率是 99.85%~101.47%,血药浓度为 $(7.32 \pm 4.25) \mu\text{g/mL}$;单通道膜片钳实验结果显示小鼠含 DS-201 血清对 PCASMCs 的 BK_{Ca} 有激活作用,但差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 该研究建立的提取丹参有效成分丹参酮的醇提法简单、实用、可靠,且测定 DS-201 含量的 HPLC 方法精确;应选取高质量丹参和(或)提高丹参在体内的生物利用度,才能更好地将血清药理学和电生理学技术结合在一起。

关键词:丹参;丹参酮 II A 磺酸钠;高效液相色谱法;血清药理学;膜片钳技术

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2015)04-0436-03

Preparation and measurement of sodium tanshinone II-A sulfonate in mice serum and effects on big conductance calcium-activated potassium channels in porcine coronary artery smooth muscle cells*

Cheng Jun, Zeng Xiaorong, Li Pengyun, Li Miaoling, Liu Zhifei, Pei Jie, Yang Yan[△]

(Institute of Myocardial Electrophysiology, Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: Objective To discuss a method combining serum-pharmacology and electrophysiology technology, and to research the mechanism of dilating porcine coronary artery of sodium tanshinone II-A sulfonate (DS-201). **Methods** To give mice intragastric administration solution and measure DS-201 concentration in mice serum, and apply the serum to single channel patch to research its effect on big conductance calcium-activated potassium channels(BK_{Ca}) in porcine coronary artery smooth muscle cells(PCASMCs).

Results The linear range of concentration containing DS-201 serum was 0.73 to 1.91 μg/mL ($r=0.9977$), the recycle rate was 99.85%~101.47%, and the concentration was $(7.32 \pm 4.25) \mu\text{g/mL}$; the result indicates that serum containing DS-201 has activation effects on BK_{Ca} in PCASMCs, while there was no statistical significance ($P>0.05$). **Conclusion** The establishment method of the alcohol extraction of Danshen is useful and reliable. The HPLC method of measuring DS-201 concentration is precise. Choosing higher quality drugs or raising bioavailability can improve combination of the serum pharmacology and electrophysiological technique.

Key words: salvia miltiorrhiza; sodium tanshinone II-A sulfonate; high efficiency liquid chromatography; serous pharmacology; patch clamp technique

中药血清药理学方法是将中药和(或)中药复方经口灌胃动物一段时间之后,经静脉或眼球等方式采集血液、得到血清,再用该含药物的血清进行其他体外实验,是一种半体内半体外的实验方法^[1]。用含药血清代替中药煎剂或中药粗制提取物进行动物体外实验,是最近 20 年才新兴起来的一种方法学。其优点在于排除了中药煎剂或中药粗制提取物本身的化学物质对体外实验的干扰,还可以反映中药在体内的各种生物化学转化效应,比直接把中药煎剂或中药粗制提取物直接应用于体外实验更科学、更客观^[2]。膜片钳技术在国内国际上都是—种新型的先进技术,它是通过对各种离子通道动力学的观察,从而阐明中药对细胞的作用机制,因此将中药血清药理学和膜片钳技术联合应用研究中药的各种作用机制,将为中药的机制研究和应用开辟广阔的前景。本实验以中药丹参为例,建立提取丹参有效成分的醇提法和丹参提取液灌小鼠胃后小鼠血清中丹参酮 II A 磺酸钠(DS-201)含量的高效液相色谱(high per-

formance liquid chromatography, HPLC)检测法,并监测实验中小鼠血药浓度,再观察含 DS-201 小鼠血清对猪冠状动脉平滑肌细胞(PCASMCs)上大电导钙激活钾通道(BK_{Ca})的作用,希望通过建立中药血清药理学方法和电生理技术联合应用的方法,对丹参舒血管的电生理机制进行更深入的探讨。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂 HPLC 仪 1 套;高速离心机(上海安亭科学仪器厂),电子天平(Sartorius 公司,Swiss);CEZ-2200 型膜片钳系统(Nihon Kohoen 公司,Japan)1 套;PC-10 玻璃微管控制仪(Narishige 公司,Japan),pCLAMP 6.0 和 10.1 分析软件(Axon 公司,USA)各 1 套。丹参药材(泸州市宝光药房);DS-201 对照品(批号:110766-200315)和卡马西平对照品均购自中国药品生物制品检定所,乙腈和甲醇为色谱纯。

1.2 实验动物 小鼠(昆明种属),体质量 25~35 g,均来自泸州医学院实验动物中心,雌雄不拘。猪心取自泸州市屠宰场。

1.3 丹参提取液的制备 称取一定量的丹参原生药,用 5 倍量 70%乙醇浸泡 3 d 后,用 8 层纱布过滤,滤液用 60 ℃ 恒温水浴箱蒸发成 1.1 : 1.0 的浓度,用滤纸过滤后再蒸发;药渣再用 5 倍量 70%乙醇浸泡 2 d,再用 8 层纱布过滤,滤液用 60 ℃ 恒温水浴箱蒸发成 1.1 : 1.0 的浓度,用滤纸过滤后再蒸发,滤渣再水煎 30 min,过滤蒸发,再用滤纸过滤、蒸发,与前 2 次醇提药液混合,蒸发至乙醇全无。

1.4 含药血清的制备 小鼠给药量用以下公式计算,给药量 = 临床用量 × 动物等效面积系数 × 浴槽内血清稀释度^[3]。小鼠按 195 g · kg⁻¹ · d⁻¹,采用“通法”方法给药,即每天 2 次给药,连续给药 3 d 和(或)7 d,最后一次给药 0.5 h 后摘眼球取血^[4]。血液室温静置 5 min 后,以 2 500 r/min 速率离心 25 min,取血清于 56 ℃ 恒温水浴箱中进行 30 min 的灭活处理,保存于 4 ℃ 冰箱中备用。

1.5 标准液和内标液的配备 精确称量 DS-201 对照品,用超纯水溶解,配成一系列 DS-201 标准液,于 4 ℃ 储存。另外称取卡马西平作为内标,用乙醇溶解,终浓度为 2.08 μg/mL,储存于 4 ℃ 冰箱,备用^[5]。

1.6 血清样品制备 将 100 μL 血清样品和 150 μL 内标液吸取至 1.5 mL 离心管中,震荡混匀,再以 15 000 r/min 速率离心 10 min,留取上清液^[5]。

1.7 色谱条件 流动相为甲醇-水,80 : 20,柱温为 30 ℃,流速为 1.00 mL/min,波长 270 nm,进样量 20 μL。

1.8 标准曲线绘制和小鼠血清中 DS-201 含量测定 将“1.5”项配成的一系列的 DS-201 标准溶液 10 μL 和空白血清 90 μL,配成浓度为 40、80 μM DS-201 血清样品各 3 份,按照“1.6”项处理血清样品,按照“1.7”项的色谱条件进行测定。把 DS-201 标准液浓度设成横坐标即 X 轴,把样品的峰高和内标的峰高之比设成纵坐标即 Y 轴,线性回归即可得标准曲线。取以上制备好的含 DS-201 血清样品 100 μL,按照“1.6”项方法处理,进样,测定,按标准曲线精确计算出血清中 DS-201 浓度^[5]。

1.9 含 DS-201 血清对 PCASMCs 上 BK_{Ca} 的作用

1.9.1 溶液 I 成分(mmol/L) NaCl 127.00, KCl 5.90, MgCl₂ 1.20, Glucose 12.00, 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES) 10.00, CaCl₂ 2.40。pH 用 NaOH 调至 7.40^[6]。

1.9.2 溶液 II 成分(mmol/L) NaCl 127.00, KCl 5.90, MgCl₂ 1.20, Glucose 12.00, HEPES 10.00。pH 用 NaOH 调至 7.40^[6]。

1.9.3 电极液成分(mmol/L) K-Asp 40.00, KCl 100.00, HEPES 10.00, CaCl₂, 根据实验要求加入相应剂量。pH 用 KOH 调至 7.20^[5]。

1.9.4 细胞溶液成分(mmol/L) K-Asp 100.00, KCl 40.00, HEPES 10.00, EGTA 1.00, CaCl₂ 0.55。pH 用 KOH 调至 7.20^[5]。

1.9.5 酶液^[7] 酶 I 成分(mg/mL):木瓜蛋白酶 1.0,二硫苏糖醇 0.68,清蛋白 2.00,用溶液 II 溶解;酶 II 成分(mg/mL):F 型胶原酶 1.615,用溶液 II 溶解。

1.9.6 单通道膜片钳实验 取回猪心,在溶液 I 中游离出单根的冠状动脉,用眼科剪将游离出的动脉纵行剖开,将其放入盛有溶液 II 的培养皿中剪成 2 mm × 2 mm × 1 mm 的动脉条块。将该动脉条块放入盛有酶液 I 的玻璃小瓶中,在 37 ℃ 恒温水浴箱中振荡消化约 9 min;再取出组织块放入盛有酶液 II 的玻璃小瓶中继续消化约 6 min,然后取出组织块放入盛有溶液 II 的玻璃小瓶中,用玻璃吸管轻轻吹打,将细胞悬液滴于载

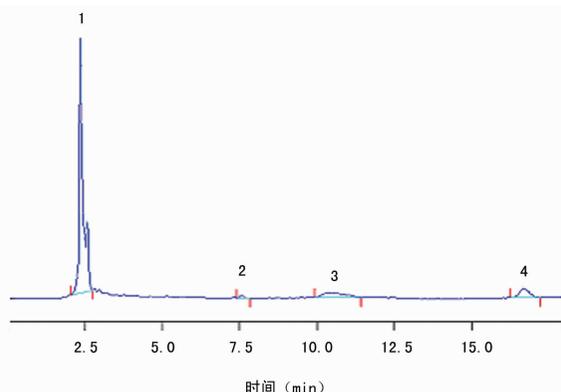
玻片上,在显微镜下进行观察。若在低倍视野(10 × 10)下能找到 8~10 个单个的 PCASMCs 细胞,且细胞膜表面光滑、折光性好、立体感强,即可终止消化^[8]。在室温下,将 PCASMCs 放在浴槽中,溶液灌流 10 min,在倒置显微镜下找到单个贴壁性好的细胞,利用微推进器将电极尖端向细胞靠近,给予负压,形成高阻封接,阻抗达 10~100 GΩ,即成为细胞贴附式膜片,用推进器将电极尖端提出浴液,于空气中暴露 2~3 s,重新放回浴液,即形成内面向外式膜片^[9-10]。以 DS-201 标准品作为阳性对照,比较含 DS-201 小鼠血清对 PCASMCs 的 BK_{Ca} 的作用。在血清中加入 5 mmol/L EGTA 处理,以排除血清中 Ca²⁺ 对实验结果的干扰^[11]。

2 结 果

2.1 灌胃液中 DS-201 的含量 由于提取的灌胃液较黏稠,而且含糖量较高,不易稀释,本研究采用称量的方法计算其含量。灌胃液中 DS-201 的含量为 20.28 μg/g,密度为 1.29 g/mL,浓度为 89.93 μmol/L。此浓度远远大于张洁等^[12]报道的 DS-201 在 PCASMCs 内面向外式膜片上的有效浓度(5~20 μmol/L),也高于 Yang 等^[13]报道的 DS-201 在 PCASMCs 内面向外式膜片上的有效浓度(40~80 μmol/L)。

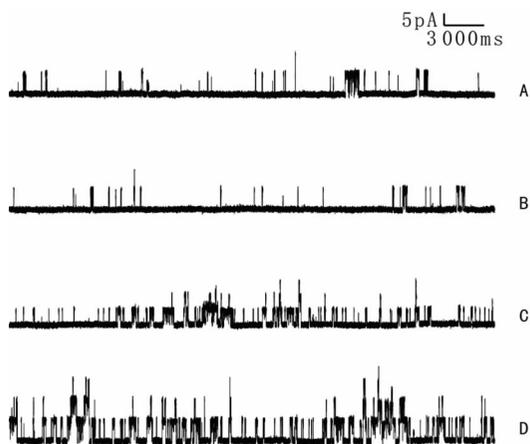
2.2 HPLC 结果

2.2.1 HPLC 色谱 在设定的色谱条件下,小鼠血清样品、小鼠血清对照品和内标液的色谱图见图 1。



1 峰:基线;2 峰:含 DS-201 血清;3 峰:空白血清+标准品;4 峰:内标。

图 1 小鼠血清高效液相色谱图



A:空白对照组(空白血清);B:含 DS-201 血清;C:40 μmol/L DS-201 标准品;D:80 μmol/L DS-201 标准品(溶液中游离 Ca²⁺ 浓度为 10⁻⁷ mol/L,膜电位为 +40 mV)。

图 2 DS-201 对 PCASMCs 的 BK_{Ca} 的作用

2.2.2 丹参提取液灌胃后小鼠血清中 DS-201 浓度 小鼠血

清的标准曲线回归方程为: $Y=0.48+0.38X(r=0.9977)$, 计算得出小鼠血清中 DS-201 浓度范围为 $0.73\sim 1.91\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ^[14], 该浓度不能达到 DS-201 在 PCASMCs 内面向外膜片上的有效浓度, 延长灌胃时间仍然没有升高血清中 DS-201 浓度。

2.3 含 DS-201 小鼠血清对 PCASMCs 的 BK_{Ca} 作用的初步观察 在 PCASMCs 的内面向外膜片上, 阳性对照 DS-201 标准品在 $40\ \mu\text{M}$ 和 $80\ \mu\text{M}$ 浓度下均都显著激活 BK_{Ca} ($n=9$)。用本文所述丹参提取液灌胃小鼠 3 d 或 7 d 后的含 DS-201 血清对 PCASMCs 上 BK_{Ca} 没有显著激活作用 ($n=15$), 如图 2 所示。

3 讨论

1984 年召开的第 1 届汉医药学会上, 日本学者 Iwama 等^[15]首次提出将含药血清替代中药煎剂或中药粗制提取物用在动物体外实验的概念。1988 年, 日本学者田代真一首次提出血清药理学这一概念。经过 20 年的发展, 血清药理学这一新型的方法已经广泛运用到各种科研领域中, 但将中药血清药理学应用于电生理学的研究还很少, 因此本研究尝试建立一种中药血清药理学和膜片钳技术研究离子通道动力学二者联合应用的崭新方法, 用来解决传统中药研究中只能给予中药单体有效成分进行膜片钳实验的局限性, 进一步扩展到复方制剂也可应用于膜片钳实验, 这将大大扩大了中药研究领域。

小动脉与微动脉壁平滑肌细胞的收缩活动产生血管张力, 位于其上的离子通道发挥着重要的作用, 而作为平滑肌细胞主要的负反馈调节器的 BK_{Ca} 则在平滑肌舒张调节中发挥着关键作用。BK_{Ca} 激活后, 可负反馈引起血管舒张, 许多舒血管活性物质都可以通过对该通道的激活而发挥作用。DS-201 具有舒张血管效应, 广泛应用于临床, 因此, 把 BK_{Ca} 作为该实验的观察指标。

本实验将丹参生药以 $195\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 剂量灌胃小鼠 3 d 或 7 d 后, 其含 DS-201 血清都对 PCASMCs 的 BK_{Ca} 无显著激活作用, 而阳性对照 DS-201 标准品在 $40, 80\ \mu\text{M}$ 均可显著激活该通道与 Tan 等^[16]结果一致。结果表明, 含 DS-201 小鼠血清不能有效激活 BK_{Ca}, 与用 HPLC 法测量的小鼠血清中 DS-201 含量低一致。中药血清药理学有这样的观点, 中药煎剂或粗制提取物经口灌胃后, 再经肠道吸收, 肝脏代谢后进入血液, 其有效成分到达各脏器发挥药效, 另外还有其内生成分发挥作用。本研究结果表明, 中药丹参提取液灌胃小鼠后血清中没有可以激活 BK_{Ca} 的内生性有效成分产生, 或用膜片钳方法不能有效检测出能显著激活 PCASMCs 上 BK_{Ca} 的物质。

HPLC 结果显示, 经 3 d 或 7 d 灌胃后小鼠血清中含 DS-201 有效浓度太低, 无法达到激活 PCASMCs 上 BK_{Ca} 的 DS-201 最低浓度 ($5\ \mu\text{mol}/\text{L}$)。为了进一步提高小鼠血清中有效药物浓度, 作者采取给予小鼠最大药物剂量灌胃, 使其达到小鼠最大耐受量, 并延长灌胃时间, 最长达到 15 d, 增加灌胃次数, 仍然不能达到小鼠血清中有效药物浓度。因此, 为了能使膜片钳技术和中药血清药理学方法有效地结合起来, 今后的研究中需要进一步提高小鼠血清中有效药物浓度。因此, 需要选用高质量的中药材, 促进药物在机体内的吸收、提高药物在机体内的生物利用率^[15]。这将为以后研究中药单体及复方制剂提供一个新思路。

参考文献:

[1] 赵万红, 曹永孝, 袁泽飞, 等. 中药血清药理学的方法学探

讨[J]. 中药新药与临床药理, 2002, 13(2): 122-124.

- [2] 程珠炉, 洪浩. 中药血清药理学研究方法几点思考[J]. 安徽中医学院学报, 2001, 20(2): 53-55.
- [3] 王力倩, 余上才, 李仪奎, 等. 用血清药理学方法研究中药苦参仙鹤草的抗肿瘤作用[J]. 中国中医药科技, 1995, 2(5): 19-22.
- [4] 李仪奎, 吴健宇. 血清药理实验中采血时间的通法方案[J]. 中国药理学通报, 1999, 15(6): 569-570.
- [5] 叶云, 杨艳, 冯碧敏, 等. 川芎提取液动物血药浓度测定及其对钙激活钾通道作用初探[J]. 中国药房, 2005, 16(1): 19-22.
- [6] 程俊, 杨艳, 曾晓荣, 等. 大鼠血清对猪冠状动脉平滑肌细胞钙激活钾通道的作用[J]. 泸州医学院学报, 2005, 28(6): 489-491.
- [7] Cai F, Li PY, Yang Y, et al. Characteristic of spontaneous transient outward Potassium currents in vascular smooth muscle cells of porcine coronary artery[J]. Sheng Li Xue Bao, 2007, 59(1): 27-34.
- [7] 程俊, 曾晓荣, 李鹏云, 等. 三种实用而简单的急性酶分离动脉平滑肌细胞的方法[J]. 四川生理科学杂志, 2010, 32(4): 148-151.
- [9] Hamill OP, Marty A, Neher E, et al. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches[J]. Pflugers Arch, 1981, 391(2): 85-100.
- [10] 杨艳, 税青林, 曾晓荣, 等. 甲基莲心碱对豚鼠心肌及猪冠状动脉平滑肌细胞钾通道的作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2000, 14(6): 405-410.
- [11] 程俊, 杨艳, 曾晓荣, 等. 大鼠血清对猪冠状动脉平滑肌细胞钙激活钾通道的作用[J]. 泸州医学院学报, 2005, 28(6): 489-492.
- [12] 张洁, 曾晓荣, 杨艳, 等. 丹参酮 II A 磺酸钠磺酸钠对原代培养猪冠脉平滑肌钙激活钾通道的影响[J]. 泸州医学院学报, 2000, 23(5): 380-383.
- [13] Yang Y, Cai F, Li PY, et al. Activation of high conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels by Sodium tanshinone II-A sulfonate (DS-201) in porcine coronary artery smooth muscle cells[J]. Eur J Pharmacol, 2008, 598(1/3): 9-15.
- [14] 吴芳, 张志荣. RP-HPLC 测定犬血浆中磷酸川芎嗪的浓度[J]. 华西药学杂志, 2003, 18(1): 48-52.
- [15] Iwama H, Amagaya S, Ogihara Y. Effect of shosaikoto, a Japanese and Chinese traditional herbal medicinal mixture, on the mitogenic activity of lipopolysaccharide: a new pharmacological testing method[J]. J Ethnopharmacol, 1988, 21(1): 45-53.
- [16] Tan X, Yang Y, Cheng J, et al. Unique action of sodium tanshinone II-A sulfonate (DS-201) on the Ca(2+) dependent BK (Ca) activation in mouse cerebral arterial smooth muscle cells[J]. Eur J Pharmacol, 2011, 656(1/3): 27-32.

(收稿日期: 2014-09-03 修回日期: 2014-10-25)