



甲基原薯蓣皂苷对心肌细胞内钙及 ATP 酶功能的影响及其机制

宁宗^{1*}, 李贻奎², 张荣利³

- (1. 广西医科大学第一附属医院, 广西南宁 530021;
2. 中国中医科学院西苑医院, 北京 100091;
3. 北京大学分子医学研究室, 北京 100871)

[摘要] 目的:研究甲基原薯蓣皂苷(MPD)对大鼠心肌细胞内钙浓度($[Ca^{2+}]_i$)的活动及细胞膜ATP酶功能的影响,并分析其机制。方法:将乳鼠心肌细胞悬液随机分为对照组、MPD组、地尔硫卓(Dil)组,荧光分光光度计法观察心肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的变化。将培养的乳鼠心肌细胞分为对照组和MPD组,分别检测心肌细胞膜ATP酶活性,并观察肌浆网钙ATP酶SERCA2a基因的mRNA表达水平。结果:在静息状态下,各组的心肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 均无显著性差异。但在KCl刺激下,MPD和Dil组与对照组相比,荧光信号峰值和 $[Ca^{2+}]_i$ 浓度均低于对照组($P < 0.001$)。在心肌细胞膜ATP酶的活性中,MPD组的 $Na^+ - K^+ - ATP$ 酶和 $Ca^{2+} - Mg^{2+} - ATP$ 酶的活性显著高于对照组($P < 0.05, P < 0.01$),而 $Mg^{2+} - ATP$ 酶的活性在2组间的比较无差异性。MPD组与对照组2组SERCA2a的mRNA表达量也无差异性。结论:MPD在一定程度上可以抑制细胞膜上电压依赖型钙通道开放,减少钙离子内流。MPD还可以通过提高心肌细胞膜钠泵和钙泵功能,影响心肌细胞钙离子跨膜转运,维持细胞内低钙离子的环境。

[关键词] 甲基原薯蓣皂苷;心肌细胞;钙离子;ATP酶;肌浆网钙ATP酶

薯蓣皂苷(dioscin)属于甾体皂苷元,广泛存在于薯蓣科、百合科和豆科等植物中,水解可以得到薯蓣皂苷元。薯蓣皂苷元应用于心血管疾病治疗并具有抗肿瘤作用等^[1-3],由于化学成分复杂,其作用机制不明确。本研究的甲基原薯蓣皂苷(methyl protodioscin,MPD)是由薯蓣皂苷精制而成的,已去除其溶血和有害成分。本实验旨在研究MPD对体外培养的大鼠心肌细胞钙内流活动、对细胞膜ATP酶活性功能的影响,并对其可能机制进行探讨,为其应用提供理论基础和指导。

1 材料

1.1 药物与动物

试验药物甲基原薯蓣皂苷MPD(纯度 $\geq 98\%$),由深圳中药天然药物研究中心姚新生院士提供。地尔硫卓(Dil,天津田边制药),临用前用无血清的DMEM配制成所需的浓度。 Ca^{2+} 荧光指示剂Fura2/AM为Sigma产品,ATP酶活性功能试剂盒、考马斯亮

蓝(南京建成生物工程研究所)。RT-PCR的引物由上海生物工程有限公司合成。出生2~4d的SD种乳鼠50只(SF级),雌雄各半,由广西医科大学医学动物实验中心提供,许可证号XCXY桂2009-0002。

1.2 仪器设备

RF-5000型荧光分光光度计(日本Shimadzu),Ultrospec 2000紫外-可见光分光光度计(Pharmacia Biotech),PCR仪和凝胶成像分析仪(BIO-RAD)。

2 方法

2.1 心肌细胞钙内流活动试验

2.1.1 细胞悬液制备、分组及处理方法 取2~4d的SD种乳鼠30只,不分雌雄,按文献方法分离心肌细胞^[4],用DMEM培养液(含2%小牛血清)调细胞数为 1×10^5 个/mL置于6孔板培养。共分3组:正常对照组、MPD组、Dil组。正常对照组在培养液中加入等量无血清的DMEM。MPD组在培养液中加入过滤除菌的MPD,终质量浓度为 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。Dil组在培养液中加入过滤除菌的Dil,终浓度为 $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。各组细胞放在37℃的 CO_2 孵箱内进行培养30 min。

2.1.2 Fura2/AM负载 30 min后,上述细胞悬液

[收稿日期] 2009-07-29

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30472183)

[通信作者] * 宁宗, Tel: (0771) 5356758, E-mail: gxningzong@yahoo.com.cn



加入 Fura2/AM(终浓度为 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 避光恒温振荡 45 min, 离心弃上清液, 以含 0.2% 小牛血清的 HanK 液冲洗 2 次, 将悬液调细胞数为 1×10^5 个/mL 用于荧光测定。取 $10 \mu\text{L}$ 滴悬液作台盼蓝拒染试验, 细胞存活率 $>90\%$ 。

2.1.3 荧光测定及心肌 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 计算 激发狭缝和发射狭缝均为 5 nm, 以 340, 380 nm 双波长激发, 激发波长变换时间为 1 s, 发射波长 500 nm。用荧光度-时间进行细胞扫描, 扫描时间 60 s。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 计算公式为 $[\text{Ca}^{2+}]_i (\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}) = K_d \times (F - F_{\min}) / F_{\max}$, 其中, K_d 为 Fura-2 与 Ca^{2+} 反应的解离常数 $224 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。 F 为基础荧光值, F_{\max} 为加入终浓度 0.09% TritonX100 后的最大荧光值, 再加入 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EGTA 测定最小荧光值 (F_{\min})。

2.2 心肌细胞膜 ATP 酶测定

取出生 2~4 d 的 SD 种乳鼠 20 只, 按文献方法分离和培养心肌细胞^[4]。心肌细胞在孔板中培养 3~4 d 后可进行实验。心肌细胞的分组和处理: 正常对照组在培养液中加入无血清的 DMEM; MPD 组在培养液中加入除菌的 MPD, 终质量浓度为 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。分别在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 的 CO_2 孵箱内进行培养 30 min。心肌细胞 ATP 酶的测试按试剂盒说明书操作, 用反复冻融法破裂心肌细胞, 整个过程要求无磷污染。蛋白含量用考马斯亮蓝法测定。

2.3 肌浆网钙 ATP 酶 (SERCA2a)

肌浆网钙 ATP 酶 (SERCA2a) 引物 (sense: 5'-GAACATCCTGCAGACGGAC-3', antisense: 5'-CAAA GCTATGGGAGTGCTGG-3'), 产物 450 bp^[5]。内参照甘油醛-3-磷酸脱氢酶 GAPDH 引物 (sense: 5'-TC-CCTCAAGATTGTCAGCAA-3', antisense: 5'-AGATC-CACAACGGATACATT-3'), 产物 309 bp。取 $3 \mu\text{L}$ PCR 产物与 $1 \mu\text{L}$ 上样缓冲液混合后上样于 1.5% 琼脂糖凝胶, 80 V, 30 min 电泳, 用凝胶成像自动分析系统分析 SERCA2a 与 GAPDH mRNA 表达量的相对比值。

2.4 统计结果处理

应用 SPSS13.0 统计软件包, 采用 t 检验对实验数据进行统计学分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

3 结果

3.1 心肌细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的测定

3.1.1 MPD 对静息状态下心肌 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的影响

加入 DMEM, MPD $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 Dil $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 后 30 min, 测得静息状态下心肌 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 分别为 (162.62 ± 17.91) , (169.81 ± 13.70) , $(158.78 \pm 16.27) \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 与加入 DMEM 组相比均无显著性差异 (表 1)。

表 1 KCl 刺激负载 Fura-2/AM 的心室肌细胞后细胞的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 水平变化 ($\bar{x} \pm s, n=8$) $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$

组别	静息状态	KCl
对照	162.62 ± 17.91	$610.5 \pm 65.52^{1)}$
MPD	169.81 ± 13.70	$267.65 \pm 51.34^{1)}$
Dil	158.78 ± 16.27	177.44 ± 48.71

注: 与对照组比较¹⁾ $P < 0.001$ 。

3.1.2 MPD 对 KCl 引起心肌 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 变化的结果

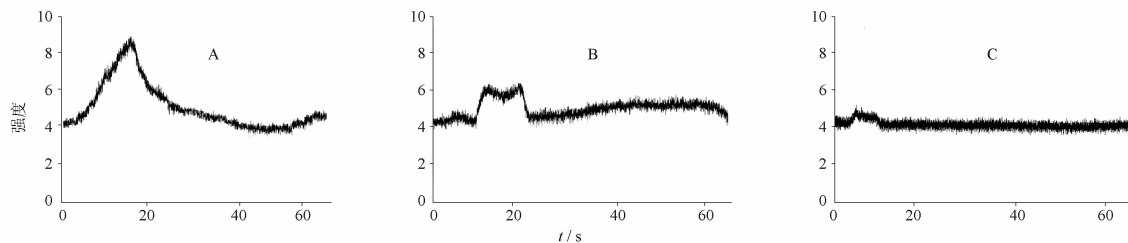
正常对照组加入 $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 KCl 可使大鼠心肌 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 达到 $(610.5 \pm 65.52) \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (与静息状态相比 $P < 0.001$), 心肌细胞预先加入 MPD $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 Dil $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 后 30 min, 再加入相同浓度的 KCl, 心肌 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 分别为 (267.65 ± 51.34) , $(177.44 \pm 48.71) \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (与正常对照组相比, MPD 组与正常对照组相比, Dil 组 $P < 0.001$, 表 1)。KCl 刺激负载 Fura-2/AM 的心肌细胞后, 用荧光度-时间进行细胞扫描 (图 1), 从荧光信号峰值观察, Ca^{2+} 内流到心肌细胞越多, 荧光度的曲峰就越高, Dil 组最小为 (0.31 ± 0.07) , 其次是 MPD 组 (2.17 ± 0.28) , 正常对照组最高为 (4.65 ± 0.87) , 与正常对照组相比 $P < 0.001$ 。结果与荧光计量测定值相符。以上结果提示, MPD 在一定程度上具有抑制 KCl 激发引起的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 增加的作用。

3.2 MPD 对心肌细胞膜的 ATP 酶影响

心肌细胞 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶和 $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATP}$ 酶的活性在 MPD 组显著高于对照组 ($P < 0.05, P < 0.01$), 表明心肌细胞钠泵和钙镁泵功能, 影响心肌细胞离子跨膜转运和内质网功能。同时本研究却发现 MPD 处理的心肌细胞 $\text{Mg}^{2+} - \text{ATP}$ 酶的活性与对照组相比, 没有明显的变化 (表 2)。

3.3 MPD 对肌浆网钙 ATP 酶 SERCA2a 的影响

SERCA2a 的 mRNA 的表达电泳图见图 2。SERCA2a 与 GAPDH mRNA 表达量的相对比值见表 3, 与对照组比较, MPD 没有影响 SERCA2a 的 mRNA 表达。



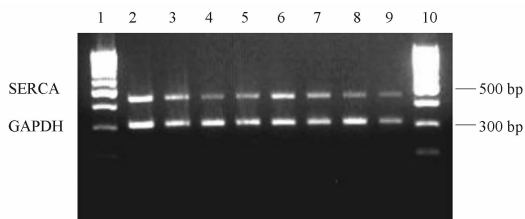
A. 正常对照组; B. MPD 组; C. Dil 组。

图 1 经 KCl 刺激负载 Fura-2/AM 的心室肌细胞荧光度-时间的变化曲线图

表 2 MPD 对细胞膜 ATP 酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

分组	钠钾 ATP 酶	钙镁 ATP 酶	镁 ATP 酶
对照	13.66 ± 2.54	2.82 ± 1.23	1.45 ± 0.20
MPD	16.99 ± 3.58 ²⁾	4.41 ± 1.24 ¹⁾	1.58 ± 1.96

注:与对照组相比¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。



泳道 1, 10 是 marker; 泳道 3, 5, 7 是对照组; 泳道 2, 4, 6, 8, 9 是 MPD 组。

图 2 SERCA 和内参照 GAPDH 的 mRNA 表达

表 3 SERCA 和 NCX 基因与 GAPDH mRNA 表达量的相对比值 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	SERCA	GAPDH	SERCA/GAPDH
对照	450.99 ± 15.09	540.45 ± 17.87	0.834 ± 0.11
MPD	472.19 ± 7.55	551.17 ± 13.22	0.856 ± 0.08

4 讨论

K^+ 可以使心肌细胞膜去极化, 导致细胞膜上电压依赖型钙通道开放, 钙离子内流增加, 从而使 $[Ca^{2+}]_i$ 增加, 缺氧、缺氧再灌注等病理情况下也可引起细胞膜内外的离子浓度改变, 引起 $[Ca^{2+}]_i$ 增加, 甚至产生细胞内钙超载。本结果显示, 在静息状态下 MPD 没有影响心肌细胞的 $[Ca^{2+}]_i$ 浓度, 而在 KCl 引起的 Ca^{2+} 内流过程中, MPD 可以抑制心肌细胞的 $[Ca^{2+}]_i$ 增加。以往研究表明, 薯蓣皂苷具有改善微循环, 增强心脏收缩力, 减慢心率, 抗动脉硬化的作用, 其中在临床上具有抗心绞痛的疗效^[6],

在动物的模型中, 薯蓣皂苷可以明显降低细胞内钙超负荷, 其保护缺氧心肌的作用可能与降低细胞内钙超载有关^[7]。但薯蓣皂苷的成分复杂, 含有多种薯蓣皂苷元, 其机制不肯定, 本研究通过对其单体成分的作用和机制作进一步研究, 结果认为 MPD 可以抑制细胞内钙超载, 具有保护心肌细胞的作用。

另外, 从本研究结果也可以看到, 尽管 MPD 具有抑制 KCl 引起的细胞内钙离子浓度增加, 但作用不如 Dil 明显。已知 KCl 通过激活细胞膜电压依赖型钙通道, 使心肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 增加, 而电压依赖型钙通道有 L, T, N, P, Q, R 等亚型, 使细胞具有不同门控特性和生理药理特性。Dil 是选择性钙阻断剂, 主要是阻断 L-型钙通道, 具有较强的钙阻断作用。而 MPD 的作用位点目前不清楚。

除心肌细胞膜参与维持正常的细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 浓度外, 心肌细胞膜和细胞器的膜 ATP 酶如肌浆网钙 ATP 酶、钙敏感受体等也参与调节细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 。已知 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶 (即钙泵) 和 Na^+ - K^+ -ATP 酶 (即钠泵) 是存在于细胞膜及细胞器膜上的一种蛋白酶, 通过水解 ATP, 释放能量, 促使离子转运。 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶的作用是维持细胞内低钙离子的环境, 每一分子的 ATP 水解可以转运 2 个 Ca^{2+} , 并伴随 1 个 Mg^{2+} 的转运, 使心肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 降低。细胞膜的 Na^+ - K^+ -ATP 酶的作用是减少细胞内的 Na^+ 的水平, 间接降低细胞膜 Na^+ - Ca^{2+} 交换作用, 从而使心肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 降低。心肌细胞内的钙储备主要是在肌浆网中, 细胞内钙离子的摄取是通过肌浆网上的钙泵 SERCA2a 来完成的, 约 88% 钙离子被 SERCA2a 摄入肌浆网, 恢复舒张期胞内钙离子浓度。本研究结果中, MPD 可以使心肌细胞膜上的 Na^+ - K^+ -ATP 酶和 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶的活性功能增强, MPD 干预细胞后, SERCA mRNA 表达量没



有改变,没有上调或下调提示肌浆网的钙 ATP 酶活性。因此 MPD 还可以通过提高心肌细胞膜钠泵和钙泵功能,共同影响心肌细胞 Ca^{2+} 跨膜转运,从而维持细胞内低钙离子的环境。

综上所述,甲基原薯蓣皂苷可以拮抗 K^+ 导致的细胞膜上电压依赖型钙通道开放,通过提高心肌细胞膜钠泵和钙泵功能,多因素的协同作用下可以抑制细胞内钙超载,维持细胞内的正常钙离子的环境,是其治疗心绞痛和抗心律失常的主要机制。

[参考文献]

- [1] 阳波,李湘. HPLC 测定地奥心血康胶囊中薯蓣皂苷元的含量[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(7):605.
- [2] 王丽娟,王岩,陈声武,等. 薯蓣皂苷元体内、外的抗肿瘤作用

- [J]. 中国中药杂志, 2002, 27(10):777.
- [3] Hu K, Dong A, Yao X, et al. Antineoplastic agents; I. Three spirostanol glycosides from rhizomes of *Dioscorea collettii* var. *hypoglauca*[J]. *Planta Med*, 1996, 62(6): 573.
- [4] 王强,王为进,李庆国,等. 改良的原代心肌细胞培养方法[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2006, 11(6):1168.
- [5] Qiu Ying, Li Yongyu, Li Shuguang, et al. Effect of Qingyitang on activity of intracellular Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase in rats with acute pancreatitis[J]. *World J Gastroenterol*, 2004 10(1):100.
- [6] 王新占. 薯蓣皂苷治疗冠心病心绞痛临床观察[J]. 中国心血管病研究杂志, 2004, 2(4):256.
- [7] 李杨,刘睿智,赵丹,等. 地奥心血康对心肌缺血再灌注犬的心肌细胞膜结构与功能的影响[J]. 新药与临床, 1994, 13(2):77.

Effects of methyl protodioscin on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and ATPase activity in cardiomyocytes and analysis of mechanisms

NING Zong^{1*}, LI Yikui², ZHANG Rongli³

- (1. First Affiliated Hospital of GuangXi Medical University, Nanning 530021, China;
2. Xiyuan Hospital, China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100091, China;
3. Institute of Molecular Medicine, Peking University, Beijing 100871, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of methyl protodioscin on the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and the ATPase activity in cardiomyocytes, as well as their mechanisms. **Method:** The cardiomyocytes were randomly divided into three groups, the control group treated with no serumal DMEM, the MPD group treated with MPD and the diltiazem group treated with diltiazem. Fluorospectrophotometer was used to determined the level of myocardial cell intracellular Ca^{2+} $[\text{Ca}^{2+}]_i$. In the experiment of ATPase activity on cellular membrane, the cardiomyocytes were randomly divided into two groups, the control group treated with no serumal DMEM, the MPD group treated with MPD. The activity of Na^+ - K^+ -ATPase, Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase and Mg^{2+} -ATPase were determined. The quantitative analysis of SERCA2a mRNA expression was studied by RT-PCR that the groups and treatments in cardiomyocytes same as the experiment for ATPase activity assay. **Result:** Under the quiescent condition, compared to the control group, the level of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in cardiomyocytes of the MPD group and diltiazem group was no different. After treatment with 40 mmol \cdot L⁻¹ KCl, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was significantly lower in the MPD group and the diltiazem group, and the intensity of peak value in time course of 60 s, the diltiazem group and the MPD group also were lower than the control group ($P < 0.001$). Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase and Na^+ - K^+ -ATPase in cultured rat were increased after treated with MPD compared to treatment with no serumal DMEM ($P < 0.05$, $P < 0.01$), but Mg^{2+} -ATPase in these groups had no different. The expression of SERCA2a mRNA between the MPD group and the control group was no different. MPD could not up-regulated or down-regulated SERCA2a in endocyttoplasmic reticulum. **Conclusion:** Methyl protodioscin could block the volt dependent form calcium channel in cellular membrane, and up-regulate the function of sodium pump and calcium pump, so that it could remain low calcium in the internal environment in cardiomyocytes.

[Key words] methyl protodioscin; cardiomyocyte; $[\text{Ca}^{2+}]_i$; ATPase activity; SERCA2a

doi: 10.4268/cjcmm20100117

[责任编辑 张宁宁]