

· 论著 ·

槟榔碱对大鼠门静脉和钙通道电流的剂量与效应关系

姚伟星¹,夏国瑾¹,李泱¹,傅丽英¹,邓静萍¹,吴世玉¹,王少林²

(1. 同济医科大学基础医学院药理教研室, 湖北武汉 430030; 2. 鄱阳医学院)

【摘要】 目的 探讨槟榔碱 (Arecoline, Are) 对大鼠门静脉和钙通道电流 (I_{Ca}) 的剂量与效应的关系, 阐明 Are 灭螺增效的作用机制。方法 采用离体大鼠门静脉自发性收缩活动的实验方法和全细胞膜片钳记录技术, 研究 Are 的剂量与效应关系, 及其对 Ca^{2+} 和 I_{Ca} 的影响。结果 不同浓度的 Are 对大鼠门静脉的收缩力呈双相反应, $10^{-7} \sim 3 \times 10^{-7}$ mol/L Are 使门静脉的收缩力增强; $10^{-6} \sim 10^{-4}$ mol/L 则使收缩力逐渐抑制, 均呈浓度依赖性。Are $3 \times 10^{-8} \sim 10^{-4}$ mol/L 对单个心室肌细胞钙通道电流的作用与门静脉一致, 亦呈浓度依赖性的双相反应。门静脉收缩活动和全细胞记录钙通道电流的结果证明, 不同浓度的 Are 对 Ca^{2+} 和 I_{Ca} 均显示有剂量与效应关系, 低浓度有促 Ca^{2+} 及增加 I_{Ca} 作用, 高浓度有阻 Ca^{2+} 内流及降低 I_{Ca} 作用。结论 阻钙作用可能是 Are 降低钉螺上爬附壁率、灭螺增效作用的理论依据。

【关键词】 槟榔碱; 门静脉; 膜片钳; 钙通道

【中图分类号】 R383.29

【文献标识码】 A

【文章编号】 1001-6627(2001)02-0139-03

槟榔碱 (Arecoline, Are) 是从棕榈科植物槟榔 (Areca catechu L.) 的干燥成熟种子中提取的生物碱, 60~70 年代曾报道槟榔碱有驱虫和抗病原微生物等作用^[1]。近来发现它具有显著性地降低钉螺上爬附壁率; 与化学灭螺药物合用, 能降低灭螺药的浓度, 增强杀螺效果^[2]; 能降低化学灭螺药对水生动物的毒性^[3]。这是当今世界各国正在寻找的“高效、低毒、价廉”的复方灭螺药。为此, 作者对槟榔碱灭螺增效的作用机制进行了较深入的研究。

材料与方法

1 动物

♂ 性大鼠、豚鼠 (260~340 g) 由同济医科大学实验动物中心提供。

2 药物与试剂

氢溴酸槟榔碱 (Arecoline hydrobromide) 系内蒙古自治区兽药监察所产品。硝苯地平 (Nifedipine, Nif) 为 Sigma chemical co. 产品。Bay K8644 为 Germany Bayer AG 赠送。胶原酶 I (Collagenase I)、蛋白酶 E (Protease E)、牛血清白蛋白、HEPES、 Na_2ATP 、CsCl、CsOH、EGTA 均为 Sigma chemical co. 产品。

3 生理溶液及电极内液

Tyrod 氏液、无 Ca^{2+} Tyrod 氏液和 0.2 mmol/L Ca^{2+} 的 Tyrod 氏液, 记录 Ca^{2+} 电流的电极内液成分, 详见文献 [4]。

4 方法

4.1 离体大鼠门静脉实验 按文献 [5] 方法制备标本, 将长 4 mm 的门静脉环置入含 10 ml Krebs' 液的恒温浴槽 (37℃) 内, 连续通入 95% O_2 + 5% CO_2 混合

气体, 标本上端与张力传感器相接, 负荷 1 g, 平衡 30 min, 平衡期间更换溶液 2 次。门静脉的自发性收缩活动经传感器转变成电信号, 记录在二道生理记录仪 (LMS-2B 型, 成都仪器厂) 上。

4.2 豚鼠心室肌细胞分离 按文献 [6] 方法加以改进, 采用酶解法制备豚鼠心室肌单细胞。腹腔注射戊巴比妥钠 50 mg/kg 麻醉后分离气管行人工呼吸, 颈外静脉注射肝素钠 500 IU/kg 后开胸行主动脉插管。迅速取出心脏在恒温 (37℃) 及通氧下行 Langendorff 灌流, 分别用含 Ca^{2+} 0.2 mmol/L Tyrod 氏液和无 Ca^{2+} Tyrod 氏液冲洗 3 min 和 5 min, 再用含胶原酶 I 0.33 g/L、蛋白酶 E 0.25 g/L 和牛血清白蛋白 0.25 g/L 的无 Ca^{2+} Tyrod 氏液循环灌流 5 min, 然后用无 Ca^{2+} Tyrod 氏液冲洗终止消化反应。取下心脏并剪碎心室肌, 在含 Ca^{2+} 0.2 mmol/L Tyrod 氏液中温孵并稍加振荡, 5 min 后倒出上清液, 即得分离的单个豚鼠心室肌细胞。并用 Tyrod 氏液稀释后在室温下保存。

4.3 全细胞钙电流记录 采用标准全细胞膜片钳方法记录钙通道电流。玻璃毛胚 GG-17 (上海脑生理所) 经微电极拉制仪 (PP-83, Narishige) 分两步拉制成尖端直径为 1~1.5 μm 的电极, 电极电阻 2~3.5 M Ω 。电极入水后补偿液接电位, 然后再行封接, 封接电阻达 1 G Ω 以上。细胞吸破后调节电容补偿和串联电阻补偿 (50%~80%) 以减少钳位误差和记录信号失真。为消除细胞间误差, 电流值以电流密度 (pA/pF) 表示。

【作者简介】 姚伟星 (1937-), 现为同济医科大学药理学教授, 博士生导师, 主要从事心血管药理研究。

膜片钳放大器 (PC-II型,华中理工大学)通过 12 位 A/D 和 D/A 数据转换器 (DA-I型,华中理工大学)由计算机控制。电流信号经截止频率 1 kHz 的四阶贝塞尔低通滤波器滤波,采样频率为 5 kHz 所有的实验数据贮存在硬盘内,供分析处理。

实验数据采用 t 检验统计处理,以 $\bar{x} \pm s$ 表示

结 果

1 Are 对大鼠门静脉自发性收缩活动的影响

Are 能浓度依赖性地增强大鼠门静脉的自发性收缩活动,在 3×10^{-7} mol/L 时,收缩达峰值,超过此剂量 ($10^{-6} \sim 10^{-4}$ mol/L) 则门静脉的收缩呈剂量依赖性地减弱 (见图 1),可见 Are 对大鼠门静脉的自发性收缩呈双相性影响。且标本自发性收缩的作用,在无钙溶液中被取消,但加钙后又可恢复。

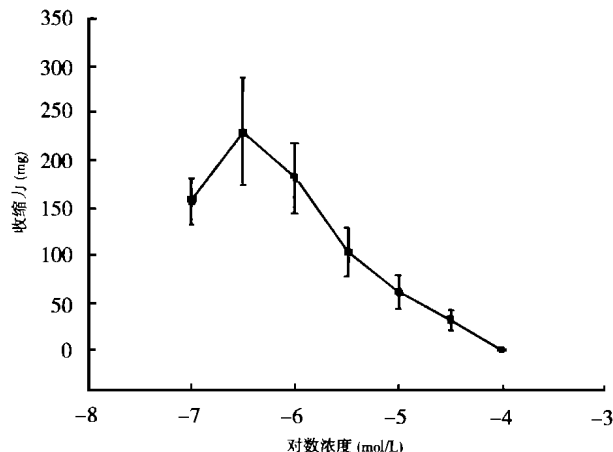


图 1 槟榔碱对大鼠门静脉收缩的作用

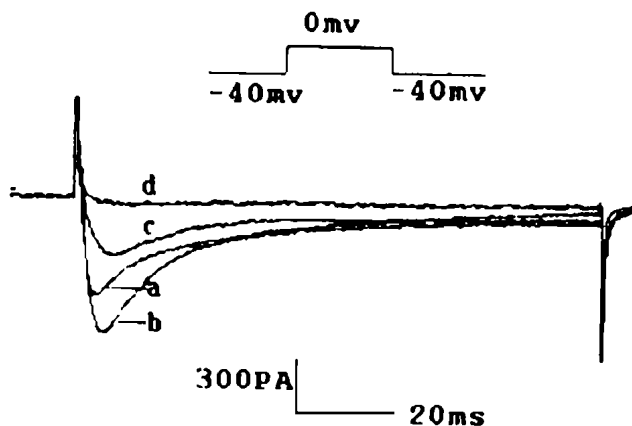


图 2 槟榔碱对豚鼠心室肌细胞钙电流的作用

a 对照 b 300 nmol/L 槟榔碱 c 10 μ mol/L 槟榔碱
d 5 μ mol/L 硝苯地平

2 Are 对豚鼠心室肌细胞钙电流的影响

在电压钳制方式下,当保持电位为 -40 mV,给予时程为 150 ms,0 mV 去极化脉冲,可记录到一缓慢失活的内向电流,该电流能被 5×10^{-6} mol/L Bay K 8644 明显增强,而被 2×10^{-5} mol/L Nifedipine 阻断,故证明此电流即钙通道电流 (I_{Ca})。加入 Are 3×10^{-7} mol/L 后,可使钙电流幅值从 (14.48 ± 0.26) pA/pF 增加到 $(17.83$

$\pm 0.26)$ pA/pF ($P < 0.01, n = 5$)。而加入 Are 10^{-5} mol/L 后,对 I_{Ca} 有明显的阻滞作用,使其幅值从 (14.48 ± 0.26) pA/pF 降低到 (11.83 ± 0.22) pA/pF ($P < 0.01, n = 5$),见图 2。

Are 对 I_{Ca} 量-效曲线表明 (图 3),低浓度 ($3 \times 10^{-8} \sim 3 \times 10^{-7}$ mol/L) Are 增加 I_{Ca} ,当浓度增大 ($3 \times 10^{-6} \sim 10^{-4}$ mol/L) 时,Are 能浓度依赖性地抑制 I_{Ca} 。所获结果与 Are 对门脉收缩力作用相一致,对 I_{Ca} 的影响也呈双相性。

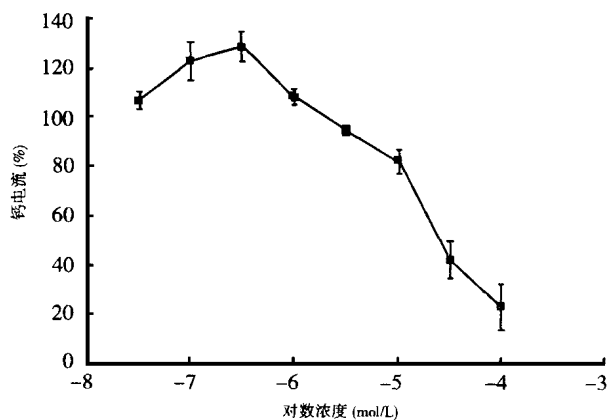


图 3 槟榔碱对钙电流的量效曲线

讨 论

大鼠门静脉是研究钙离子跨膜转运较好的标本^[7]。实验结果表明,Are 在低浓度时能增强门静脉的收缩力,这可能与激动胆碱能受体有关^[8],同时也促进 Ca^{2+} 内流而使收缩张力增加;在高浓度时抑制其门静脉的收缩,可能是通过阻滞钙的作用。

采用全细胞记录方法在豚鼠心室肌细胞上直接观察和记录到低浓度 Are 能依赖性地促使钙通道开放,使 I_{Ca} 幅值增加;当 Are 浓度加大时 ($3 \times 10^{-6} \sim 10^{-4}$ mol/L),却能阻滞单个心室肌细胞的钙通道电流,亦呈浓度依赖性。

从上述两个实验结果可以看出,不同浓度的 Are 对门静脉收缩力和心室肌 I_{Ca} 作用非常相似,都呈双相性。已知在浸泡实验中槟榔碱与灭螺药物合用发挥灭螺增效作用的浓度为 100 mg/L 和 200 mg/L^[2],即相当于 4.2×10^{-4} mol/L 和 8.5×10^{-4} mol/L,此浓度已远远超过本实验的最大阻 I_{Ca} 浓度,Are 通过阻止 I_{Ca} 使钉螺足平滑肌松弛,降低了钉螺上爬附壁率,使钉螺与药物接触的时间延长,而发挥灭螺增效作用。提示槟榔碱阻滞钙的作用可能是钉螺不上爬。灭螺增效的理论依据。

【参考文献】

- [1] 王浴生. 中药药理与应用 [M]. 第 1 版. 北京: 人民卫生出版社, 1983. 1210.
- [2] 何昌浩, 夏国瑾, 李桂玲, 等. 槟榔碱与灭螺药物合用的增效作用

研究[J].中国血吸虫病防治杂志,1999,11(4): 215.

[3] 张爱华,何昌浩,李桂玲,等.增效剂(BI)降低化学灭钉螺药物对水生动物毒性作用研究[J].中国寄生虫病防治杂志,1999,12(2): 130.

[4] 李洪,夏国瑾,姚伟星,等.低浓度槟榔碱对钉螺足平滑肌收缩和对豚鼠心室肌细胞钙内流作用的实验研究[J].中国血吸虫病防治杂志,2000,12(2): 94.

[5] 夏国瑾,姚伟星,宋达,等.苄基四氢巴马汀对大鼠门静脉和豚鼠心肌的作用[J].中国药理学报,1992,13(3): 271.

[6] Mitra R, Morad MA. A uniform enzymatic method for dissociation of myocytes from hearts and stomachs of vertebrates[J]. Am J Physiol, 1985, 249 H 1056.

[7] Shimamura K, Sunano S. Effect of sodium vanadate on the smooth muscle of the rat portal vein[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1988, 337 347.

[8] 耿辉,夏国瑾,何昌浩.槟榔碱对湖北钉螺足肌胆碱能受体的作用[J].中国血吸虫病防治杂志,1999,11(5): 281.

【收稿日期】 2000-03-10 【修回日期】 2000-10-21

CONCENTRATION-EFFECT RELATIONSHIP OF ARECOLINE ON RAT PORTAL VEIN AND CALCIUM CHANNEL CURRENT IN GUINEA PIG VENTRICULAR MYOCYTES

YAO Wei-xing, XIA Guo-jin, LI Yang, FU Li-ying, DENG Jing-ping, WU Shi-yu, WANG Shao-lin
(Department of Pharmacology, Tongji Medical University, Wuhan 430030, China)

【Abstract】 Objective To investigate the concentration-effect relationship of Arecoline (Are) on rat portal vein and calcium current (I_{Ca}), and to elucidate the oncomelania-killing mechanism of Are. **Methods** Spontaneous contractive activities of isolated rat portal vein method and whole-cell patch clamp techniques were used to study the concentration-effect relationship of Are on calcium ion and I_{Ca} . **Results** Are of different concentration showed a biphasic effect on the contractility of rat portal vein. At 10^{-7} – 3×10^{-7} mol/L it increased the contractility of rat portal vein, while at 10^{-6} – 10^{-4} mol/L it inhibited the contractility gradually, both in a concentration-dependent manner. Are 3×10^{-8} – 10^{-4} mol/L showed a concentration-dependent biphasic effect on calcium channel current of single ventricular myocyte, which were consistent with the effect on portal vein. **Conclusion** Results of Are on contractive activities of portal vein and I_{Ca} proved that Are shows concentration-effect relationship on both calcium ion and I_{Ca} . It promoted calcium influx and increased I_{Ca} in low concentration, while inhibited calcium influx and reduced I_{Ca} in high concentration. The inhibition effect of Are on I_{Ca} might be the theoretical basis of climbing adhesion rate decreasing and snail-killing effects.

【Key words】 Arecoline; portal vein; patch clamp; calcium channel

° 病例报告 °

肠滴虫致慢性肠炎 1例

李华信, 陈松涛

(解放军第150中心医院, 河南洛阳 471031)

【中图分类号】 R382.21 【文献标识码】 D 【文章编号】 1001-6627(2001)02-0141-01

患者,女,46岁,随军家属。15年前由山东省惠民县农村(肠滴虫流行区)随军来洛阳市居住。未随军前曾出现腹泻,但未经治疗,病情自行缓解。随军以后发生反复间歇性腹泻,日腹泻2~8次,腹泻持续时间3~7d。在洛阳市几家医院看过数次,做过几次大便细菌培养均无致病菌生长,大便常规阴性,肠镜结果大肠粘膜充血、水肿。先后以肠炎给予黄连素、痢特灵、吡哌酸、诺氟沙星等抗炎治疗,病情每次都有好转,但始终未能痊愈,病人非常痛苦。2000年6月3日,患者又出现无明显诱因的腹胀、腹痛、腹泻、厌食、乏力、发热等症状,来本院就诊。体检: T 37.0℃,心肺无异常,肝脾未触及。血象: Hb 103 g/L, RBC 3.46×10^{12} /L, WBC 9.2×10^9 /L, N 0.61, L 0.30, E 0.07, M 0.02。粪便: 稀糊粥样便,无脓血,涂片镜检查到肠滴虫滋养体。给予甲硝唑 1.2 g/d, 2d症状改善, 5d症状消失,治疗7d,复查粪便正常,病人痊愈。随访病人未再复发。

肠滴虫病常见于热带和亚热带地区,尤以环境卫生较差的地方较为常见,在本地区少见,因此造成患者多年没有确诊治愈。本例患者曾在温带地区且环境卫生条件较差的农村长期居住过,推测可能是在此期间感染肠滴虫。肠滴虫的致病性一直存在争议,有人报道肠滴虫可造成宿主肠粘膜充血、水肿与炎症反应^[1]。本病例曾做过肠镜检查,结果大肠粘膜充血、水肿,经一般抗炎治疗有一定疗效,但不能痊愈,用甲硝唑治疗病人痊愈,证明肠滴虫可以引起慢性肠滴虫性肠炎,应引起临床医务工作者的重视。

【参考文献】

[1] 陈金富,陈文列.人毛滴虫的致病性研究[J].中国人兽共患病杂志,1992,8: 13.

【收稿日期】 2000-12-25 【修回日期】 2001-05-22