

龙血竭总黄酮对 Kv1.3 通道的调节作用

尹世金¹ 张丰¹ 邹艳¹ 王少兵¹ 石书娟¹ 龙思如¹ 何回香¹ 黎莉^{2*}

(1 中南民族大学 药学院, 武汉 430074; 2 武汉大学 医学院, 武汉 430071)

摘要 目的: 探究龙血竭阻断 Kv1.3 通道的主要活性组分.方法: 龙血竭总黄酮经优化工艺提取后, 采用全细胞膜片钳实验检测其对内源性和外源性表达的 Kv1.3 通道调节作用.结果: 龙血竭总黄酮对内源性和外源性表达的 Kv1.3 通道均具有较强的抑制作用, 呈浓度依赖性和通道选择性.结论: 总黄酮介导了龙血竭阻断 Kv1.3 通道, 为进一步发现龙血竭中 Kv1.3 通道阻断剂提供了重要线索.

关键词 龙血竭; 总黄酮; Kv1.3 通道; 自身免疫疾病

中图分类号 Q257; R285.5 文献标识码 A 文章编号 1672-4321(2019)01-0071-05

DOI 10.12130/znmzdk.20190113

引用格式 尹世金, 张丰, 邹艳, 等. 龙血竭总黄酮对 Kv1.3 通道的调节作用[J]. 中南民族大学学报(自然科学版), 2019, 38(1): 71-75.

YIN Shijin, ZHANG Feng, ZOU Yan, et al. Regulation of total flavonoids from *Resina Draconis* on Kv1.3 channel [J]. Journal of South-Central University for Nationalities (Natural Science Edition) 2019, 38(1): 71-75.

Regulation of total flavonoids from *Resina Draconis* on Kv1.3 channel

YIN Shijin¹, ZHANG Feng¹, ZOU Yan¹, WANG Shaobing¹, SHI Shujuan¹, LONG Siru¹, HE Huixiang¹, LI Li²

(1 School of Pharmaceutical Sciences, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China;

2 College of Medicine, Wuhan University, Wuhan 430071, China)

Abstract Objective: To elucidate the main active components of *Resina Draconis* in blocking Kv1.3 channels. Methods: The total flavonoids from *Resina Draconis* (tFRD) were extracted with the optimized extraction process, and their effect on endogenous and exogenous Kv1.3 channels were detected by whole cell patch clamp experiments. Results: The tFRD showed strong inhibitory effect on endogenous and exogenous Kv1.3 channels in a concentration-dependent and channel selective manner. Conclusions: Total flavonoids mediated the blocking effect of *Resina Draconis* in Kv1.3 channels, which provided important clues for discovery of further Kv1.3 channel blockers from *Resina Draconis*.

Keywords *Resina Draconis*; total flavonoids; Kv1.3 channel; autoimmune disease

机体正常的免疫反应能有效抵御外界病原微生物的侵扰, 而当机体免疫功能紊乱出现自身免疫抗原时, 机体免疫系统会产生自身抗体, 通过破坏自身脏器组织引发多种自身免疫性疾病(AID). 研究发现 AID 如类风湿性关节炎^[1]、系统性红斑狼疮^[2]、I 型糖尿病^[3] 等患者体内效应记忆性 T 淋巴细胞(T_{EM}) 异常激活与增殖, 激活的 T_{EM} 细胞膜上电压门控性钾通道 Kv1.3 表达水平显著上升, 提示 Kv1.3 通道在 AID 发生中扮演了重要角色. 而药理学阻断

Kv1.3 通道^[1] 或对其进行基因敲除^[4], 均能对自身免疫性模型动物产生良好的防治作用, 揭示 Kv1.3 通道是开发治疗 AID 先导药物的新靶点^[5].

中草药为挖掘生物活性物质提供了丰富资源, 研究发现龙血竭能够同时抑制经典免疫反应和补体替代免疫反应^[6], 抑制 T 细胞的异常激活与增殖, 表现为较强的免疫抑制作用, 这一作用与其浓度依赖性阻断哺乳动物 Kv1.3 通道功能有关^[7], 也使从龙血竭中分离 Kv1.3 通道阻断剂成为可能. 但龙血

收稿日期 2018-06-29 * 通信作者 黎莉, 研究方向: 组织胚胎发育与神经免疫, E-mail: lili-ok@163.com

作者简介 尹世金(1974-) 男, 教授, 博士, 研究方向: 电生理学与天然药物化学, E-mail: yinshijinyf@163.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目(81641186); 武汉市国际科技合作计划资助项目(2017030209020256); 湖北省对外科技合作类技术创新专项资助项目(2017AHB067)

竭成分复杂,含有黄酮类、萜类、酚类、甾体类等多种组分,前期研究发现龙血竭总黄酮是发现靶向离子通道蛋白生物活性物质的重要组分^[8],因此本文拟提取龙血竭总黄酮,研究其对哺乳动物 Kv1.3 通道功能的调节作用,为进一步深入挖掘龙血竭中 Kv1.3 通道阻断剂指明方向。

1 材料和方法

1.1 试剂与药品

RPMI 1640、高糖型 DMEM(Hyclone);胎牛血清(FBS, Gibco); Jurkat T 细胞、HEK-293T 细胞(武汉大学典藏中心);乙酸乙酯(上海生工); lipofectamine 2000(Invitrogen); 二甲基亚砜(DMSO, Biosharp); 细胞内外液试剂(Sigma); 龙血竭原材料(西双版纳药业,批号 Z20063472),标准品龙血素 B(上海纯优生物科技,批号 119425-90-0);电压门控性钾通道 Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3 的真核表达载体 pIRES₂-EGFP 由武汉大学李文鑫教授实验室提供。

1.2 仪器

紫外分光光度计(UEC1312028,上海美普达); CO₂培养箱(Heal Force, HF160W);膜片钳放大器(EPC9/2, HEKA);显微操作器(MP225, Sutter);程控玻璃电极拉制仪(05-E 型)、玻璃微电极抛光仪(2002-C)、多通道快速微量程控给药系统(MPS-2)均购自武汉仪博公司;微电极玻璃毛细管(武汉微探科学仪器)。

1.3 龙血竭总黄酮的提取和含量测定

龙血竭总黄酮(tFRD)采用课题组优化的工艺进行提取^[9],以乙酸乙酯为提取溶剂,10 倍溶剂 70 °C 下回流提取 30 min,提取 1 次。提取物中总黄酮含量以龙血素 B(LrB)为对照品,于紫外分光光度计 277 nm 处测量对照品及提取物吸光度,以对照品浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标,绘制标准曲线,根据线性回归方程计算提取物中总黄酮的含量。

1.4 细胞培养和通道蛋白的外源性表达

人白血病淋巴细胞系 Jurkat T 细胞和 HEK-293T 细胞分别培养在添加有 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素的 RPMI 1640 和高糖型 DMEM 培养基中,于 37 °C、5%CO₂培养箱中培养。将编码有电压门控性钾通道 Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3 的真核表达载体 pIRES₂-EGFP 用 lipofectamine 2000 转染至 HEK-293T 细胞中,24 h 后选用发绿色荧光的细胞进行电生理测试。

1.5 细胞内外液和龙血竭总黄酮工作液的配制

用于记录电压门控性钾通道电流的细胞外液成分为:140 mmol/L NaCl, 5 mmol/L KCl, 2 mmol/L CaCl₂, 1 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L HEPES, 10 mmol/L D-Glucose, 外液 PH 值用 NaOH 调至 7.4,渗透压用蔗糖调至 310~320 mOsm/L。电极内液成分为:140 mmol/L KCl, 1 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L EGTA, 10 mmol/L HEPES, 3 mmol/L Na₂ATP, 内液渗透压为 280~290 mOsm/L, PH 值以 KOH 调至 7.2。提取的龙血竭总黄酮粉末用 DMSO 溶解后,以不同浓度配制在细胞外液中用于电生理实验。

1.6 电生理实验

采用 EPC9/2(HEKA)放大器进行全细胞膜片钳记录,环境温度控制在 22~25 °C,实验参数的设置、数据的采集和电压刺激均通过 Patch Master 软件完成。微电极玻璃毛细管经程控玻璃电极拉制仪两步拉制,经玻璃微电极抛光仪抛光,灌注电极内液后稍加正压,入液电阻为 2~5 MΩ。在全细胞记录模式下将细胞膜电位钳制在 -60 mV,每 20 s 给予 400 ms 步长、+50 mV 的去极化脉冲刺激以激活电压门控性钾通道电流。待电流稳定后,采用多通道快速微量程控给药系统对所记录细胞依次进行浓度梯度给药,同时记录细胞膜上通道电流变化情况。

1.7 数据处理和统计分析

通过 Patch Master 所采集到的电生理数据均用 Igor Pro 4 和 Origin 8 进行处理。所有的实验数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, n 表示独立试验次数。不同的实验组之间的差异采用 t 检验或者 ANOVA 检验统计分布,以 $P < 0.05$ 作为数据差异显著性标准。

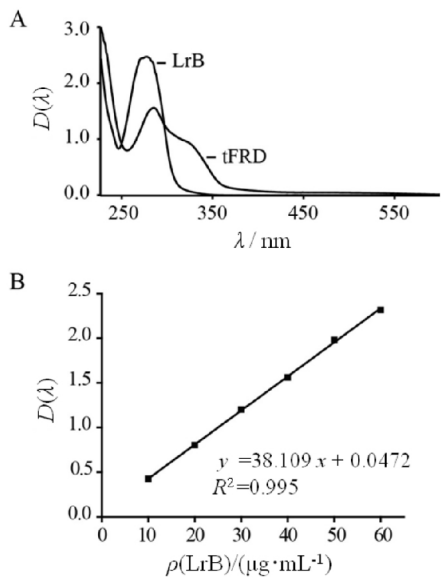
2 结果

2.1 龙血竭提取物中总黄酮的质量鉴定

将龙血素 B 对照品溶液和龙血竭提取物样品溶液于 220~600 nm 处进行连续波长扫描,获得紫外吸收图谱如图 1A 所示,可知龙血竭提取物的紫外吸收曲线与对照品龙血素 B 基本一致,二者均在 277 nm 处有明显的吸收峰,与以往报道一致^[9],表明龙血竭总黄酮提取成功。

将对照品龙血素 B 进行浓度梯度检测,以对照品浓度为横坐标,吸光度 OD₂₇₇ 为纵坐标,绘制标准曲线并拟合直线回归方程(图 1B),算得提取物中总黄酮质量分数为 65.12%,与报道基本一致^[9],满足《药品注册管理办法》之中药 5 类新药的植物药提

取有效部位的含量要求,可用于进一步的药理学活性测定.



A) 龙血竭总黄酮和龙血素 B 的全波长紫外吸收图谱;
B) 龙血素 B 的定量标准曲线

图 1 龙血竭提取物中总黄酮的质量鉴定

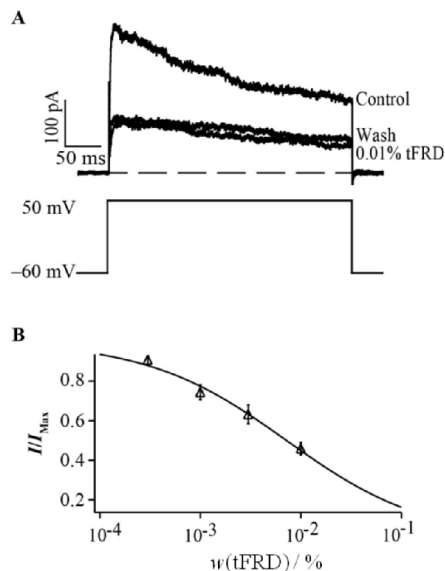
Fig.1 Quality identification of total flavonoids from the extract of *Resina Draconis*

2.2 龙血竭总黄酮对内源性表达的 Kv1.3 通道调节作用

由于人源性白血病淋巴细胞系 Jurkat T 细胞膜上主要表达电压门控性钾通道 Kv1.3^[10], Jurkat T 细胞是研究生物活性物质调节内源性 Kv1.3 通道的优良细胞模型.将 Jurkat T 细胞膜电位钳制在 -60 mV,予以 400 ms 步长、+50 mV 去极化电压刺激,激发出细胞膜上 Kv1.3 通道电流,记录不同浓度龙血竭总黄酮外液灌流时 Jurkat T 细胞膜上 Kv1.3 通道电流的变化情况(见图 2).当给予质量浓度为 0.01% 的龙血竭总黄酮外液时,可将 Jurkat T 细胞上的 Kv1.3 通道电流抑制 55% 以上,龙血竭总黄酮对 Kv1.3 通道的电流抑制呈现浓度依赖性特点,其抑制效应可部分得以洗脱.通过 Hill 方程对龙血竭总黄酮抑制效应的量效曲线进行拟合,得到龙血竭总黄酮对内源性 Kv1.3 通道的半数抑制浓度为 $(0.007199 \pm 0.000617) \%$.

2.3 龙血竭总黄酮对外源性表达的 Kv1.3 通道调节作用

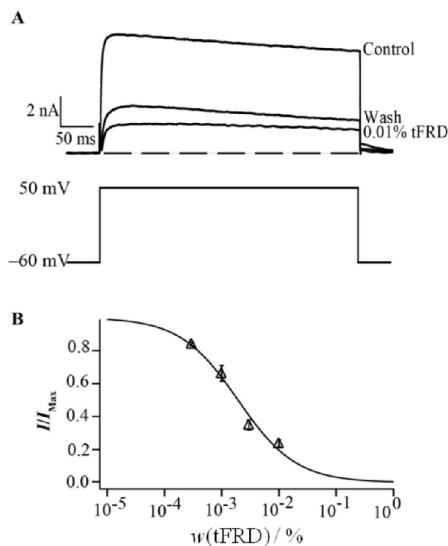
HEK-293T 细胞极少表达细胞外配体所需的内生受体且易转染,是一个常用的表达外源基因的细胞株.本研究将编码 mKv1.3 通道的质粒 pIRES₂-EGFP-mKv1.3 转染至 HEK-293T 细胞 24 h,选用发



A) 龙血竭总黄酮对 Jurkat T 细胞 Kv1.3 通道的电压-电流图;
B) 龙血竭总黄酮抑制 Jurkat T 细胞 Kv1.3 通道电流的量效曲线($n=5$)
图 2 龙血竭总黄酮对 Jurkat T 细胞内源性表达的 Kv1.3 通道浓度依赖性抑制作用

Fig.2 Inhibitory effects of tFRD on endogenous Kv1.3 channels in Jurkat T cells with a concentration-dependent manner

绿色荧光的阳性细胞进行全细胞膜片钳记录,观察不同浓度的龙血竭总黄酮对外源性表达的 Kv1.3 通道电流影响(见图 3).



A) 龙血竭总黄酮对 HEK-293T 细胞 Kv1.3 通道的电压-电流关系图;
B) 龙血竭总黄酮抑制外源性 Kv1.3 通道电流的量效曲线($n=6$)
图 3 龙血竭总黄酮对外源性表达 HEK-293T 细胞上 Kv1.3 通道的浓度依赖性抑制作用

Fig.3 Inhibitory effects of tFRD on exogenous Kv1.3 channels in HEK-293T cells with a concentration dependent manner

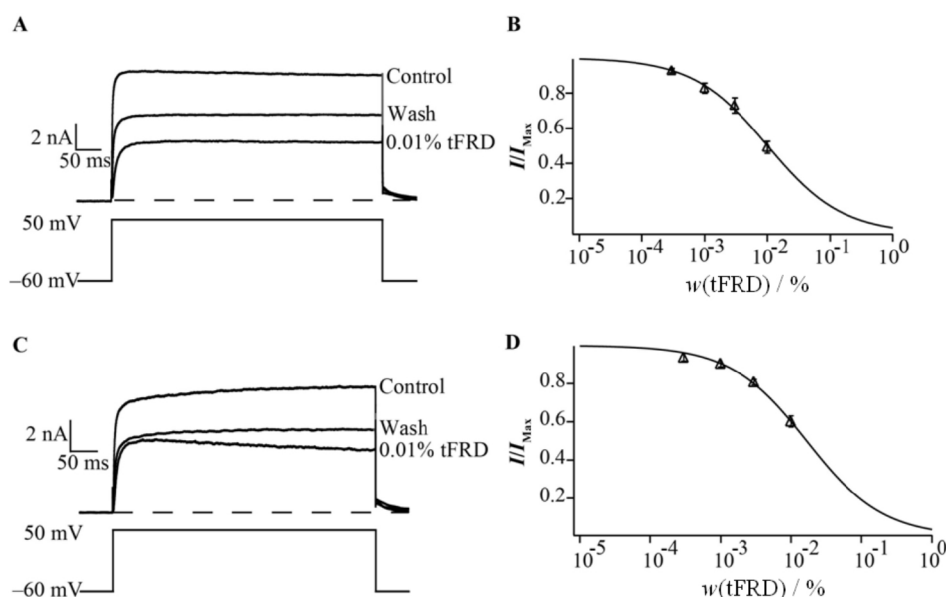
龙血竭总黄酮对外源性表达 Kv1.3 通道抑制作用较强,呈浓度依赖性,当细胞外液中龙血竭总黄酮浓度为 0.01% 时,HEK-293T 细胞膜上 Kv1.3 通道电

流被抑制了 73% ,抑制效应可部分洗脱.通过 Hill 方程对龙血竭总黄酮抑制外源性 Kv1.3 通道电流的量效曲线进行拟合,得到其半数抑制浓度为 $(0.001937 \pm 0.000228) \%$.

2.4 龙血竭总黄酮对其它电压门控性钾通道的影响

电压门控性钾通道具有不同的亚型,不同结构的电压门控性钾通道在生物体具有不同功能.为探究龙血竭总黄酮阻断 Kv1.3 的通道选择性,本研究分别将编码有通道 mKv1.1, hKv1.2 的真核表达载体 pIRES₂-EGFP-mKv1.1, pIRES₂-EGFP-hKv1.2 转染至 HEK-293T 细胞中,24 h 后选用发绿色荧光的阳性

细胞进行全细胞膜片钳测试,记录细胞外液中不同浓度龙血竭总黄酮对外源性表达的 Kv1.1, Kv1.2 通道电流的影响(见图 4).较 Kv1.3 通道的作用,龙血竭总黄酮对 Kv1.1 和 Kv1.2 通道的抑制效果较微弱,0.01% 高浓度的龙血竭总黄酮对 Kv1.1 和 Kv1.2 通道电流的抑制率分别只有 50.8% 和 53.33%; 通过 Hill 方程进行量效曲线拟合,得到 IC₅₀ 分别为 $(0.011818 \pm 0.00132) \%$ 和 $(0.02698 \pm 0.00374) \%$.表明龙血竭总黄酮阻断 Kv1.3 通道效率要高于 Kv1.1 和 Kv1.2,活性差异分别为 6.11 倍和 13.93 倍,提示其对 Kv1.3 通道具有选择性阻断作用.



A, C) 龙血竭总黄酮对 HEK-293T 细胞 Kv1.1 和 Kv1.2 通道的电压-电流关系图;

B, D) 龙血竭总黄酮抑制外源性 Kv1.1 和 Kv1.2 通道电流的量效曲线($n=6$)

图 4 龙血竭总黄酮对外源性表达的 Kv1.1 和 Kv1.2 通道电流的影响

Fig.4 Effects of tFRD on exogenous Kv1.1 and Kv1.2 channels

3 讨论

Kv1.3 通道是治疗 AID 的理想新靶点^[11],开发 Kv1.3 通道阻断剂的先导化合物是治疗 AID 的重要途径.为获得新型 Kv1.3 通道阻断剂,可从有毒动物分泌的毒液中筛选特异性的生物活性多肽^[12,13],或从药用植物中发现靶向阻断通道的有机小分子^[14];前者虽具有较高的通道阻断效率^[15],但多肽的不稳定性和潜在抗原性限制了其成药性,而源于药用植物的有机小分子则受限较少,因此从天然植物中发现新型 Kv1.3 有机小分子阻断剂正成为研究热点^[16].

龙血竭是传统名贵中药,具有活血化瘀、消炎止痛等广泛的药理作用,它还具有独特的免疫调节作用,可浓度依赖性阻断 Jurkat T 淋巴细胞膜上 Kv1.3 通道^[7],是发现新型 Kv1.3 通道阻断剂的天然药物资源.但龙血竭组成复杂,包含黄酮类、萜类、酚类、甾体类等,为确定龙血竭阻断 Kv1.3 通道的活性部位,缩小从龙血竭中筛选挖掘 Kv1.3 通道阻断剂的范围,本文在前期证实龙血竭总黄酮具有良好的离子通道蛋白阻断作用的基础上^[8],采用组优化工艺^[9]提取总黄酮,运用电生理学技术检测其对 Kv1.3 通道的调节作用.结果表明:龙血竭总黄酮对内源性和外源性 Kv1.3 通道均表现出较强的抑制作用,呈现浓度依赖性.较 Kv1.3 通道的同源蛋白,具有一定

的通道选择性,说明龙血竭总黄酮部分介导了龙血竭对 Kv1.3 通道的阻断作用,或能对自身免疫性疾病的防治研究提供思路。

龙血竭总黄酮中包括龙血素 B、剑叶龙血素 A、剑叶龙血素 B 等多种类型的查尔酮类化合物^[18],结构类似但又有微小差别。研究发现龙血素 B 能高效率、高选择性阻断哺乳动物 Kv1.3 通道^[17],引起通道的快速失活,表现出深部孔区阻断特性,部分解释了龙血竭总黄酮能够选择性阻断 Kv1.3 通道的药理学活性。但本文中龙血竭总黄酮并未体现这一深部孔区阻断 Kv1.3 通道特性,提示龙血竭总黄酮中可能还存在其它调节 Kv1.3 通道的活性单体,其阻断通道作用正是这些包括龙血素 B 在内的多种活性单体共同作用的结果,深入研究它们调节 Kv1.3 通道的共性差异和构效关系,将有助于阐明龙血竭总黄酮中查尔酮类等化合物调节 Kv1.3 通道的作用机理。

参 考 文 献

- [1] TANNER M R ,TAJHYA R B ,HUQ R ,et al. Prolonged immunomodulation in inflammatory arthritis using the selective Kv1.3 channel blocker HsTX1 [R14A] and its PEGylated analog[J]. Clin Immunol 2017 ,180: 45-57.
- [2] NICOLAOU S A ,SZIGLIGETI P ,NEUMEIER L ,et al. Altered dynamics of Kv1.3 channel compartmentalization in the immunological synapse in systemic lupus erythematosus[J]. J Immunol 2007 ,179(1) : 346-356.
- [3] TOLDI G ,VÁÁÁRHELYI B ,KAPOSI A ,et al. Lymphocyte activation in type 1 diabetes mellitus: the increased significance of Kv1.3 potassium channels [J]. Immunol Lett 2010 ,133(1) : 35-41.
- [4] GOCKE A R ,LEBSON L A ,GRISHKAN I V ,et al. Kv1.3 deletion biases T cells toward an immunoregulatory phenotype and renders mice resistant to autoimmune encephalomyelitis [J]. J Immunol 2012 ,188 (12) : 5877-5886.
- [5] WANG R E ,WANG Y ,ZHANG Y ,et al. Rational design of a Kv1.3 channel-blocking antibody as a selective immunosuppressant[J]. Proc Natl Acad Sci USA 2016 ,113(41) : 11501-11506.
- [6] RISCO E I ,GHIA F ,VILA R ,et al. Immunomodulatory activity and chemical characterisation of sangre de drago (dragon's blood) from *Croton lechleri* [J]. Planta Med 2003 ,69(9) : 785-794.
- [7] 胡青兰 ,陆春兰 ,黎莉 ,等. 龙血竭对免疫调节功能相关性 Kv1.3 通道的抑制作用[J]. 时珍国医国药 2015 ,26(4) : 845-848.
- [8] 马全顺 ,尹世金 ,张凡 ,等. 血竭总黄酮对三叉神经节细胞河豚毒素不敏感型钠电流峰值的浓度依赖性抑制[J]. 中国临床康复 2005 ,9(25) : 108-111.
- [9] 王少兵 ,田兵 ,操冰冰 ,等. 龙血竭总黄酮提取工艺的优化[J]. 中南民族大学学报(自然科学版) ,2015 ,34(4) : 58-61.
- [10] YAN L ,LIU X ,LIU W X ,et al. Fe₂O₃ nanoparticles suppress Kv1.3 channels via affecting the redox activity of Kvβ2 subunit in Jurkat T cells [J]. Nanotechnology , 2015 ,26(50) : 505103.
- [11] BEETON C ,WULFF H ,STANDIFER N E ,et al. Kv1.3 channels are a therapeutic target for T cell-mediated autoimmune diseases [J]. Proc Natl Acad Sci USA , 2006 ,103(46) : 17414-17419.
- [12] 尹世金 ,陈璇 ,闻闫翰 ,等. 少棘蜈蚣钾通道毒素 KTX-Ssm175 的表达、纯化与鉴定[J]. 中南民族大学学报(自然科学版) 2016 ,35(4) : 43-47.
- [13] ZOU Y ,ZHANG F ,LI Y ,et al. Cloning ,expression and identification of KTX-Sp4 ,a selective Kv1.3 peptidic blocker from *Scorpiops poccocki* [J]. Cell Biosci 2017 ,7(1) : 60.
- [14] 连亦田 ,万琨 ,毛奕 ,姜黄素对人 Kv1.3 通道作用的初步研究[J]. 临床心血管杂志 2014 ,30(10) : 885-889.
- [15] YIN S ,YI H ,MA Y ,et al. Characterization of a new Kv1.3 channel-specific blocker J123 from the scorpion *Buthus martensii* Karsch [J]. Peptides 2008 ,29(9) : 1514-1520.
- [16] FU X X ,DU L L ,ZHAO N ,et al. 18β-Glycyrrhetic acid potentially inhibits Kv1.3 potassium channels and T cell activation in human Jurkat T cells [J]. J Ethnopharmacol , 2013 ,148(2) : 647-654.
- [17] YIN S ,HU Q ,LUO J ,et al. Loureirin B ,an essential component of *Sanguis Draxonis* ,inhibits Kv1.3 channel and suppresses cytokine release from Jurkat T cells [J]. Cell Biosci 2014 ,4(1) : 78.
- [18] 唐春风 ,陈乾平 ,龙海荣 ,等. 国产及进口龙血竭原料中总黄酮、龙血素 A、龙血素 B 含量的测定[J]. 当代化工 2018 ,47(1) : 201-204.

(责任编辑 刘 钊)