

# 蝙蝠葛多酚类生物碱对心肌细胞动作电位的影响

邢莎莎<sup>1</sup>, 金肆<sup>2</sup>, 许高<sup>2</sup>, 李文婧<sup>2</sup>, 龚培力<sup>2</sup>, 杨晓燕<sup>2\*</sup>

(1. 成都大学附属医院, 成都 610081; 2. 华中科技大学同济医学院, 武汉 430030)

**[摘要]** 目的:研究蝙蝠葛多酚类生物碱(phenolic alkaloids of *Menispermum dauricum*, PAMD)对豚鼠乳头肌和兔窦房结优势起搏细胞动作电位的影响。方法:运用玻璃微电极记录豚鼠心室乳头肌动作电位,研究不同浓度PAMD(1, 3, 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )对心室乳头肌动作电位时程(action potential duration, APD),有效不应期(effective refractory period, ERP),最大除极化速度(maximum upstroke velocity,  $V_{\text{max}}$ ),动作电位幅度(amplitude, APA),超射(overshoot, OS)的影响;运用玻璃微电极记录兔窦房结优势起搏细胞动作电位,研究不同浓度PAMD(1, 3, 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )对窦房结细胞APD、最大舒张期电位(maximal diastolic potential, MDP), APA,  $V_{\text{max}}$ , 自发发电频率(rate of pacemaker firing, RPF)和舒张期去极化速度[velocity of diastolic (phase 4) depolarization, VDD]的影响。结果:在豚鼠右心室心肌乳头肌细胞中研究发现,PAMD可以剂量依赖性的显著延长APD和ERP,延缓 $V_{\text{max}}$ 。当浓度为10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,PAMD对窦房结自律性具有轻度影响,这种作用与对照组比有显著差异。结论:PAMD对心室肌的作用强于其对窦房结的作用,这表明其具有成为理想的抗室性心律失常的药物的潜力。

**[关键词]** 蝙蝠葛多酚类生物碱; 心室乳头肌; 窦房结细胞; 动作电位

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)17-088-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015170088

**Effect of Phenolic Alkaloids of *Menispermum dauricum* on Cardiac Electrophysiology** XING Sha-sha<sup>1</sup>, JIN Si<sup>2</sup>, XU Gao<sup>2</sup>, LI Wen-jing<sup>2</sup>, GONG Pei-li<sup>2</sup>, YANG Xiao-yan<sup>2\*</sup> (1. Affiliated Hospital of Chengdu University, Chengdu 610081, China; 2. Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effect of phenolic alkaloids of *Menispermum dauricum* (PAMD) on the action potential in papillary muscles of guinea pig and dominant pacemaker cells of rabbit sinoatrial nodes. **Method:** Capillary glass microelectrode was used to record the paction potential in papillary muscles of guinea pigs, study the effect of different concentrations (1, 3, 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) of PAMD on action potential duration (APD), effective refractory period (ERP), maximum upstroke velocity ( $V_{\text{max}}$ ), amplitude (APA) and overshoot (OS). Capillary glass microelectrode was also used to record the paction potential in dominant pacemaker cells of rabbit sinoatrial nodes and study the effect of different concentrations (1, 3, 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) of PAMD on APD, maximal diastolic potential (MDP), APA,  $V_{\text{max}}$ , rate of pacemaker firing (RPF), and velocity of diastolic (phase 4) depolarization (VDD). **Result:** According to the study for papillary muscle cells of right ventricular myocardia, PAMD can significantly prolong APD and ERP and delay  $V_{\text{max}}$  in a concentration-dependent manner. PAMD also had a mild effect on the automatic rhythmicity of sinus nodes at concentration of 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , with a significant difference with the control group. **Conclusion:** PAMD have a stronger effect on ventricular muscles than sinoatrial nodes, suggesting that it has the potential to be prepared into an ideal drug for ventricular arrhythmia.

**[Key words]** phenolic alkaloids of *Menispermum dauricum*; ventricular papillary muscle; sinus node cell; action potential

**[收稿日期]** 20141208(016)

**[基金项目]** 国家“重大新药创制”科技重大专项(2012ZX09303018-001);成都大学青年基金项目(2015XJZ10)

**[第一作者]** 邢莎莎, 博士, 药师, 从事心血管药理研究, Tel:028-86437487, E-mail:xingshasha1230@126.com

**[通讯作者]** \* 杨晓燕, 博士, 副教授, 从事心血管药理研究, Tel:027-83691785, E-mail:tjyangxy@mail.hust.edu.cn

蝙蝠葛苏林碱和蝙蝠葛碱是蝙蝠葛根茎中最主要的两种双苄基异喹啉类生物碱,具有广泛的药理学活性。除了抗血小板聚集,抗炎和神经保护作用的特性外,蝙蝠葛苏林碱和蝙蝠葛碱在许多动物模型中也体现出良好的抗心律失常的作用<sup>[1-2]</sup>。前期研究证实,蝙蝠葛苏林碱<sup>[3]</sup>和蝙蝠葛碱<sup>[4]</sup>可以抑制具有促心律失常作用的早期后除极(early afterdepolarization, EAD),延迟后除极化和触发活动。在 402 例心房和心室心律失常的病人中评价了蝙蝠葛碱的抗心律失常作用,发现其对 91.5% 的病人有效<sup>[4]</sup>。在试验研究中发现,与奎尼丁、多非利特或索他洛尔不同,蝙蝠葛苏林碱和蝙蝠葛碱延长动作电位时程(action potential duration, APD)的作用具有正常的功能依赖性,而后三者表现为反向的功能依赖性<sup>[5-6]</sup>,这些结果表明,蝙蝠葛苏林碱和蝙蝠葛碱有可能成为理想的抗心律失常的药物。

然而,从蝙蝠葛中提取蝙蝠葛苏林碱和蝙蝠葛碱非常困难,这限制了其临床应用。蝙蝠葛多酚类生物碱主要成分为蝙蝠葛苏林碱和蝙蝠葛碱,因此认为其可能具有治疗的潜力。本实验室前期建立了一种新的蝙蝠葛多酚类生物碱(phenolic alkaloids of *Menispermum dauricum*, PAMD)的提取工艺并获得专利(No. CN1275565)<sup>[7]</sup>。现进一步研究这种新工艺提取的蝙蝠葛总碱对心肌动作电位的影响。

## 1 材料

**1.1 动物** 豚鼠(450 ± 10) g,雌雄各半,SPF 级,合格证号 SCXK(鄂)2004-2007;新西兰兔(2 ± 0.5) kg,雌雄各半,SPF 级,合格证号 SCXK(鄂)2004-2007;实验动物均购于华中科技大学实验动物中心。

**1.2 仪器** SWF-2W 型高阻微电极放大器(中国,成都仪器厂),RM6240C 型生理记录系统(中国,成都仪器厂)。

**1.3 药物** PAMD 由本实验室制备。PAMD 溶解于 1 mol·L<sup>-1</sup> HCl 后,NaOH 调节 pH 至 6.7,临用前用生理盐水稀释至所需浓度。戊巴比妥钠、乌头碱、G 毒毛旋花苷、氯化钙(Sigma 公司)。

**1.4 溶液** 改良的 Tyrode's 溶液配方(mmol·L<sup>-1</sup>): NaCl 147, KCl 5.4, CaCl<sub>2</sub> 1.8, MgCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O 1.05, Tris 10, 葡萄糖 11.0。临用前 100% O<sub>2</sub> 饱和。Krebs-Henseleit (K-H) 溶液配方(mmol·L<sup>-1</sup>): NaCl 130, KCl 4.0, CaCl<sub>2</sub> 2.7, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.5, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 1.8, NaHCO<sub>3</sub> 18, 葡萄糖 8.2。用前 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> 饱和。微量吸管用 3 mol·L<sup>-1</sup> KCl 充满。除

特殊说明外,其他试剂均为国产分析纯。

## 2 方法

**2.1 豚鼠心肌动作电位的测定** 豚鼠 28 只,用戊巴比妥钠麻醉(40 mg·kg<sup>-1</sup>, ip)后取出心脏放在修正后台氏液中,按照文献[8]所示方法制备右心室乳头肌标本,置于肌槽内,槽内温度维持在(36.5 ± 0.5) °C,用提前充 100% O<sub>2</sub> 饱和的修正后的台氏液灌流。刺激电极为双极银质电极,记录电极为内充 3 mol·L<sup>-1</sup> KCl,电阻为 5 ~ 20 MΩ 的,连接高输入阻抗前置放大器的玻璃微电极。记录电极穿刺入心肌细胞内记录跨膜电位。预刺激强度为 1.1 倍阈电压,矩形脉冲 1 ms,刺激频率为 1 Hz。预刺激 1 h 后,用生理记录系统记录并分析动作电位零相最大上升速率(maximum upstroke velocity, V<sub>max</sub>),振幅(amplitude, APA),超射(overshoot, OS),有效不应期(effective refractory period, ERP),动作电位时程(action potential duration, APD)包括 50% 复极化时间(APD<sub>50</sub>)和 90% 复极化时间(APD<sub>90</sub>)。

**2.2 兔窦房结优势起搏细胞动作电位测定** 新西兰兔 28 只,用戊巴比妥钠麻醉(40 mg·kg<sup>-1</sup>, ip)后取出心脏。右心房领域局限在界嵴、上腔静脉、下腔静脉。在 K-H 液(0 ~ 4) °C 中将房隔与周围组织剪下,水平固定于含有 K-H 液的浴槽内。K-H 液温度维持在(36.5 ± 0.5) °C,并用 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> 进行氧饱和,灌注流速 4 mL·min<sup>-1</sup>,平衡超过 1 h 后,根据文献方法记录基线处动作电位,随后加入不同质量浓度 PAMD,通过 2.1 所用玻璃电极记录窦房结优势起搏细胞动作电位<sup>[9]</sup>,相关参数包括:最大舒张期电位(maximal diastolic potential, MDP),动作电位振幅(APA),APD<sub>50</sub>, APD<sub>90</sub>, V<sub>max</sub>,自发放电频率(rate of pacemaker firing, RPF)和舒张期去极化速度[velocity of diastolic (phase 4) depolarization, VDD]。

**2.3 统计分析** 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析,利用 ANOVA 和 Dunnett's 进行统计学检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 对豚鼠乳头肌动作电位的影响** 图 1 所示为 PAMD 处理后,豚鼠乳头肌动作电位变化的原始记录。结合表 1 的结果共同表明,PAMD 可以显著增加 APD<sub>50</sub>, APD<sub>90</sub> 和 ERP,并且这种增加作用具有浓度依赖性。在 PAMD 浓度分别为 1, 3, 10 μmol·L<sup>-1</sup> 时,APD<sub>50</sub> 增加率分别为(20 ± 7)%, (35 ± 15)% 和(63 ± 43)%, APD<sub>90</sub> 增加率分别为(14 ± 6)%, (27 ±

12)% 和 (58 ± 35)% ; ERP 增加率分别为 (16 ± 4)% , (27 ± 14)% 和 (62 ± 38)% 。PAMD 同时降低  $V_{max}$  和 OS。PAMD 浓度为 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时可以降低 APA。

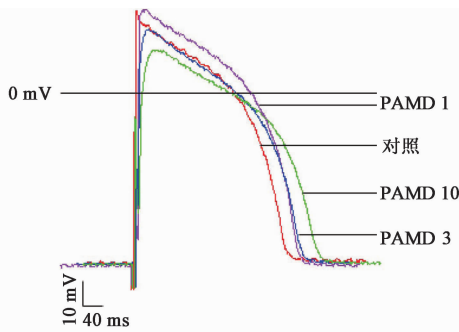


图 1 PAMD 对豚鼠乳头肌动作电位的影响  
Fig. 1 Effect of PAMD on transmembrane action potential in papillary muscles of guinea pigs

表 1 PAMD 对豚鼠乳头肌动作电位相关参数影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 7$ )

Table 1 Effect of PAMD on parameter of action potential in papillary muscles of guinea pigs ( $\bar{x} \pm s, n = 7$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	APA/mV	OS/mV	$V_{max}/V \cdot s^{-1}$	APD <sub>50</sub> /ms	APD <sub>90</sub> /ms	ERP/ms
对照	-	111 ± 6	37 ± 9	158 ± 39	160 ± 34	206 ± 41	194 ± 41
PAMD	1	102 ± 13	30 ± 7 <sup>1)</sup>	113 ± 23 <sup>2)</sup>	193 ± 43 <sup>2)</sup>	235 ± 50 <sup>2)</sup>	225 ± 50 <sup>2)</sup>
	3	99 ± 12	26 ± 9 <sup>1)</sup>	77 ± 29 <sup>2)</sup>	214 ± 41 <sup>2)</sup>	258 ± 43 <sup>2)</sup>	244 ± 45 <sup>2)</sup>
	10	85 ± 13 <sup>1)</sup>	13 ± 5 <sup>2)</sup>	23 ± 8 <sup>2)</sup>	253 ± 44 <sup>2)</sup>	318 ± 54 <sup>2)</sup>	306 ± 56 <sup>2)</sup>

注:与对照组相比<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$  (表 2 同)。

表 2 PAMD 对兔窦房结优势起搏细胞动作电位相关参数的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 7$ )

Table 2 Effect of PAMD on parameter of action potential in sinoatrial nodes of rabbits ( $\bar{x} \pm s, n = 7$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	APA/mV	MDP/mV	$V_{max}/V \cdot s^{-1}$	VDD/ $V \cdot s^{-1}$	APD <sub>50</sub> /ms	APD <sub>90</sub> /ms	RPF/beat · min <sup>-1</sup>
对照	-	63 ± 16	-61 ± 6	21 ± 8	0.27 ± 0.08	73 ± 11	113 ± 21	145 ± 30
PAMD	1	60 ± 17	-61 ± 13	19 ± 7	0.23 ± 0.06 <sup>2)</sup>	80 ± 17	123 ± 24	141 ± 31
	3	54 ± 12	-60 ± 13	18 ± 8	0.21 ± 0.06 <sup>2)</sup>	79 ± 14 <sup>1)</sup>	124 ± 18 <sup>2)</sup>	138 ± 29 <sup>1)</sup>
	10	49 ± 10	-58 ± 7	12 ± 7 <sup>1)</sup>	0.18 ± 0.05 <sup>1)</sup>	86 ± 13 <sup>1)</sup>	135 ± 22 <sup>1)</sup>	139 ± 15 <sup>2)</sup>

#### 4 讨论

PAMD 是蝙蝠葛根茎中提取的酚类生物碱,主要成分为蝙蝠葛碱和蝙蝠葛苏林碱。心肌细胞膜上各种离子通道时维持正常窦性心律的基础,心律失常发生与离子通道失衡有关。前期研究发现,蝙蝠葛碱可抑制缺血大鼠心脏去甲肾上腺素的释放<sup>[10]</sup>,减轻缺血再灌注家兔心脏的脂质过氧化损伤,增加 SOD 的活性<sup>[11]</sup>。减轻脂质过氧化诱导的损伤。蝙蝠葛碱和蝙蝠葛苏林碱可以通过功能依赖性方式延长 ADP 和 ERP,这种作用于奎尼丁和多菲莱德不同。我们前期研究发现,蝙蝠葛碱浓度低于

3.2 对兔窦房结优势起搏细胞动作电位的影响  
图 2 显示了在 PAMD 存在条件下,兔窦房结优势起搏细胞动作电位的改变。表 2 结果表明,不同浓度 PAMD (1 ~ 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 可以显著降低 VDD。PAMD 3, 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  可以显著延长 APD<sub>50</sub> 和 APD<sub>90</sub>, 减缓 RPF。PAMD 浓度为 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时可以显著降低  $V_{max}$ 。PAMD 对 APA 和 MDP 没有显著影响。

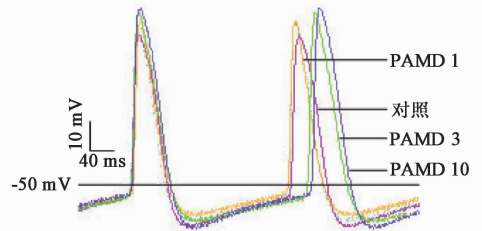


图 2 PAMD 对兔窦房结优势起搏细胞动作电位相关参数影响  
Fig. 2 Effect of PAMD on transmembrane action potential in sinoatrial nodes of rabbit

30  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时可以阻断 hERG 的作用,但是对 hERG 通道的表达和功能没有影响。蝙蝠葛碱和蝙蝠葛苏林碱可以阻断多菲莱德诱导的 EAD,可能与其阻断 ICa-L 通道的作用有关<sup>[5-6]</sup>。这些研究结果有助于我们理解 PAMD 的抗心律失常作用。我们研究发现,通过新的方法制备的 PAMD 可以延长豚鼠乳头肌动作电位 APD,ERP,显著降低 APA,  $V_{max}$  和 OS。这表明 PAMD 对  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{K}^+$  离子通道具有抑制作用,这种作用与单独的蝙蝠葛碱和蝙蝠葛苏林碱相同。

APD 缩短是多种快速型心律失常的基础,

PAMD 使心室肌动作电位  $V_{max}$  下降,提示其可能具有抑制钠通道的作用,从而提高动作电位发生阈值,减少迟后除极,降低自律性、兴奋性和传导性;PAMD 延长  $APD_{50}$ ,  $APD_{90}$  的作用可能与抑制钾离子外流,延长 ERP 有关,从而降低心肌细胞兴奋性、自律性和传导性。

此外,PAMD 也具有轻度的抑制兔窦房结优势起搏细胞动作电位的作用。PAMD 浓度为  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时仅引起 PRF 降低 4%。结果表明 PAMD 对心室肌的作用潜力远强于窦房结。

综上所述,PAMD 具有良好的抗心律失常的潜力,其对室性心律失常具有更好的效果。

#### [参考文献]

[ 1 ] Zhao J, Lian Y, Lu C, et al. Inhibitory effects of a bisbenzylisoquinoline alkaloid dauricine on HERG potassium channels[J]. J Ethnopharmacol, 2012, 141(2):685-691.

[ 2 ] Liu Q, Mao X, Zeng F, et al. Effect of daurisolone on HERG channel electrophysiological function and protein expression[J]. J Nat Prod, 2012, 75(9):1539-1545.

[ 3 ] Liu Q N, Zhang L, Gong P L, et al. Daurisdine suppressed early after depolarizations and inhibited L-type calcium current [J]. Am J Chinese Medicine, 2010,38(1):37-49.

[ 4 ] Feng K, Hu C, Zhou J. Clinical observations on

sustained arrhythmias treated with dauricine [J]. Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi, 1984, 12(4):315-316.

[ 5 ] 李真,林先明,夏敬生,等. 蝙蝠葛苏林碱对家兔在体心脏单相动作电位的影响(英文)[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2001, 15(2):116-120.

[ 6 ] Guo D, Zeng F, Hu C. Effects of dauricine, quimidine, and sotalol on action potential duration of papillary muscles *in vitro*[J]. Acta Pharmacologica Sinica, 1997, 18(4):348-350.

[ 7 ] 刘长丽,杨绍云,曾繁典. 北豆根中蝙蝠葛酚性碱提取工艺的正交试验优选[J]. 中草药,2007, 38(9):1340-1342.

[ 8 ] 高原,朱明军,朱初麟,等. 炙甘草汤浸膏粉溶液对豚鼠心室肌细胞动作电位的影响[J]. 中华中医药杂志,2014,29(4):1248-1250.

[ 9 ] Bleeker W K, Mackaay A J, Masson-Pevet M, et al. Functional and morphological organization of the rabbit sinus node[J]. Circ Res, 1980, 46(1):11-22.

[10] Zhang Y Z, Feng Y B, Huang K, et al. Effect of dauricine on the release of norepinephrine in anoxic guinea pig hearts[J]. Chin J Pharmacol Toxicol, 1999, 13(2):123-126.

[11] 张长元,马建群,韩兆东,等. 蝙蝠葛碱对兔心肌缺血再灌注时血清 MDA 浓度和 SOD 活性的影响[J]. 山东医药, 2008, 48(46):25-27.

[责任编辑 聂淑琴]