

“973”专题——基于病证结合的气血相关理论研究

延胡索叔胺碱和季胺碱对豚鼠心室肌细胞动作电位和 HERG 通道电流的影响

孟红旭 姚明江 任钧国 刘建勋

(中国中医科学院西苑医院基础医学研究所, 中药药理北京市重点实验室, 北京, 100091)

摘要 目的: 观察延胡索叔胺碱和季胺碱对动作电位和 HERG 通道的影响, 探讨 2 种生物碱抗心律失常的作用机制。方法: 采用全细胞膜片钳技术记录急性分离的豚鼠心室肌细胞动作电位和培养的稳定转染 HERG 通道蛋白的 HEK293 细胞的 HERG 通道电流。结果: 叔胺碱 (30, 100 mg/L) 可延长 APD₉₀ (90% 复极化时程); 1 mg/L 和 3 mg/L 季胺碱可缩短 APD₉₀, 加深静息电位; 30 mg/L 和 100 mg/L 季胺碱可延长 APD₉₀; 叔胺碱 (3~300 mg/L) 可浓度依赖性抑制 HERG 尾电流幅度, IC₅₀ 为 55 μmol/L; 1 mg/L 和 3 mg/L 季胺碱可明显升高 HERG 尾电流电流幅度, 而 30 mg/L 和 100 mg/L 季胺碱可明显降低尾电流幅度。结论: 延胡索叔胺碱可浓度依赖性延长动作电位时程和抑制 HERG 通道电流, 而季胺碱高浓度与叔胺碱作用相同, 低浓度则能够缩短动作电位时程和兴奋 HERG 通道电流, 呈现双相性。

关键词 延胡索; 叔胺碱; 季胺碱; 动作电位; HERG 通道

Effects of Tertiary Alkaloids and Quaternary Alkaloids of Rhizoma Corydalis on Action Potential in Guinea Pig Ventricular Myocytes and HERG Channel Currents

Meng Hongxu, Yao Mingjiang, Ren Junguo, Liu Jianxun

(Institute of Basic Medical Sciences of Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing Key Laboratory of Chinese Materia Medica, Beijing 100091, China)

Abstract Objective: To investigate the effects of tertiary alkaloids and quaternary alkaloids of Rhizoma Corydalis on action potential and HERG channel, and to explore the mechanism of two alkaloids in anti-irregularity. **Methods:** Whole cell patch clamp technique was used to record the action potential of acutely isolated guinea pig ventricular myocytes and the HERG channel currents of cultured HEK293 cells stably transfected with HERG channel protein. **Results:** Tertiary alkaloids (30, 100 mg/L) could prolong APD₉₀, and quaternary alkaloids (1, 3 mg/L) could shorten APD₉₀ and enhance the resting potential. Quaternary alkaloids (30, 100 mg/L) prolonged APD₉₀. Tertiary alkaloids (3-300 mg/L) inhibited HERG tail current amplitude in concentration-dependent manner. IC₅₀ was 55 mg/L; quaternary alkaloids (1, 3 mg/L) could significantly increase HERG tail current amplitude, and quaternary alkaloids (30, 100 mg/L) could reduce the tail current amplitude. **Conclusion:** Corydalis tertiary alkaloids prolonged APD and inhibited HERG currents in concentration-dependent manner. Quaternary alkaloids in high concentration have the same effect as tertiary alkaloids and quaternary alkaloids in low concentration decrease APD and excite HERG currents, showing a double phase.

Key Words Corydalis; Tertiary alkaloids; Quaternary alkaloids; Action potential; HERG channel

中图分类号: R285.5 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2018.01.001

延胡索又名元胡、玄胡索等, 为罂粟科紫堇属植物延胡索 (*Corydalis yanhusuo* W. T. Wang) 的干燥块茎, 具有活血、行气、镇痛等功用, 用于胸胁、腕腹疼痛、经闭痛经、产后瘀阻等, 现在临床主要集中于心律失常、冠心病心绞痛、气滞血瘀诸痛^[1-4]。目前认为延胡索主要活性部位是延胡索碱, 主要分为

叔胺碱和季胺碱。研究报道叔胺碱和季胺碱房性早搏、交界性早搏具有较好的治疗作用, 并发现叔胺碱与奎尼丁对心电图的影响颇为相似, 而季胺碱能够产生与乙胺碘呋酮相似的作用, 这表明这 2 种生物碱在抗心律失常方面具有不同的作用特点, 虽然后续的研究发现延胡索碱的一些单体化合物对心肌细

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) 项目 (2015CB554405); 中国中医科学院创新团队建设项目 (YS1303); 中国中医科学院自助选题项目 (zz070821)

作者简介: 孟红旭 (1972.04—), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 心血管药理学研究, E-mail: amfd003@163.com

通信作者: 刘建勋 (1955.03—), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 药理学研究, E-mail: liujx0324@sina.com

胞的动作电位和钾通道产生一些效应,但是延胡索碱的抗心律失常机制仍不清楚^[56],本研究通过观察叔胺碱和季胺碱对豚鼠心肌细胞动作电位和 HERG 通道的影响从对离子通道角度探讨叔胺碱和季胺碱的作用机制和作用特点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 健康成年豚鼠(300 g),由北京斯克贝实验动物科技有限公司提供(合格证号:SCXK(京)2011-0004)。

1.1.2 药物 季胺碱(中国科学院大连化物所馈赠,批号:20140821,总碱含量>90%) and 叔胺碱(中国科学院大连化物所馈赠,批号:20140821 总碱含量>60%) and 特非那定(大连美仑生物技术有限公司,批号:S0425A)。

1.1.3 试剂与仪器 无钙台式液(mmol/L): NaCl 140, KCl 5.4, NaH₂PO₄ 0.33, MgCl₂ 1, Glucose 10, Hepes 10(用 NaOH 调节至 PH7.4); KB 液(mmol/L): KOH 70, KCl 40, KH₂PO₄ 20, Glutamic acid 50, MgCl₂ 3, Taurine 20, EGTA 0.5, Hepes 10, Glucose 10(用 KOH 调节至 PH7.4);测定动作电位电极内液(mmol/L): KCl 140, Na₂ATP 4, MgCl₂ 1, EGTA 5, HEPES 10, Glucose 10(用 KOH 调节至 pH 7.2);测定 HERG 电流电极内液(mmol/L): KCl 130, MgCl₂ 1, MgATP 5, EGTA 5, HEPES 10, glucose 10(用 KOH 调节至 pH 7.2),除指定药品外全部从 Sigma-Aldrich 中国公司购入。(PULL-100 美国)和膜片钳放大器(HEKA EPC10 德国)。

1.1.4 豚鼠单个心室肌细胞的分离 豚鼠用 20% 乌拉坦 10 mL/kg 腹腔注射麻醉,迅速开腹取下心脏,在 0℃ 无钙台式液的冰水混合液中去除脂肪以及多余组织,经主动脉逆行插管将心脏置于 Langendorff 灌流装置。用无钙台式液灌流心脏 3~5 min,再用含酶(胶原酶 I 0.3 g/L + 蛋白酶 E 0.1 g/L + 牛血清白蛋白 0.8 g/L)无钙台式液灌流 1 min 后,改成酶液环灌流 4 min。剪下心室肌,在 KB 液中剪碎并轻轻吹打,用 200 目筛网过滤,贮存于 4℃ 冰箱中待用。整个过程保持流入心脏的液体温度为 37℃,同时保证离体心脏的暴露环境温度在 22℃ 以上,各液体始终通以 99.5% 医用氧气。

1.2 方法

1.2.1 HERG-HEK293 细胞的培养 将转染并稳定表达人源心肌 HERG 离子通道的 HEK293 细胞(河北医科大学药理室提供)复苏后接种于玻璃片上置

于培养皿中,采用含 10% 胎牛血清 DMEM 培养基培养 48 h。HERG 通道蛋白由 GFP 荧光蛋白标记,在蓝色荧光激发下,发出绿色荧光,诱导出的电流能够被特非那定(1 μmol/L)阻断,证明为稳定表达 HERG 离子通道。见图 3。

1.2.2 全细胞膜片钳记录 取一滴心室肌细胞悬液,置于倒置显微镜实验平台上的 1 mL 浴槽内,静置 5 min 使细胞充分贴附于浴槽底部,然后用台式液进行灌流,流速为 2 mL/min,5 min 后选择边缘整齐、横纹清晰、表面光洁、静止的杆状心室肌细胞进行实验。将 HEK293 细胞培养玻璃片直接置于细胞槽内,然后用台式液(CaCl₂ 2.0 mmol/L)进行灌流,选择三角形,折光性好的细胞进行实验。操作微操使玻璃微电极接触细胞膜负压形成高阻抗封接(兆欧封接),吸破细胞膜形成全细胞记录状态。在 PULSE 软件控制下,数字脉冲经 D/A 转换成模拟电压或电流信号,再经膜片钳放大器放大,通过 Ag-AgCl 电极导入细胞,产生的电流或电压信号经膜片钳放大器输出,再经 A/D 转换,由计算机采集整理数据。实验在 22℃ 室温下进行。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 13.0 和 ORIGIN 6.0 对数据进行统计学处理,以均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)数表示,采用配对样本的 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 季胺碱和叔胺碱对豚鼠心室肌细胞动作电位的影响 膜片钳放大器在电流钳模式下记录单个心室肌细胞动作电位,给予细胞刺激电流(强度 400~900 pA,持续 10~35 ms)引发动作电位。给予叔胺碱(3、10 mg/L)后,动作电位未见明显变化(*n* = 3)(图 1A),给予叔胺碱(30、100 mg/L)可见动作电位时程明显延长,洗脱后部分恢复,静息电位和动作电位幅度未见明显变化(图 1B)。测定 ADP₉₀(复极至 90% 动作电位时程),将叔胺碱与灌流台式液(对照)指标进行比较,计算 ADP₉₀ 延长率($(ADP_{90叔} - ADP_{90台})/ADP_{90台}$),叔胺碱(30、100 mg/L)ADP₉₀ 的延长率分别为 $(10.8 \pm 9.2)\%$ (*n* = 5)、 $(35.3 \pm 22.3)\%$ (*n* = 5),差异有统计学意义(*P* < 0.05),表明叔胺碱延长动作电位时程具有浓度依赖性。给予季胺碱(1、3 mg/L)后,动作电位时程出现缩短,静息电位变深,动作电位幅度未见明显变化(*n* = 4)(图 2C);静息电位由 (-68.2 ± 10.5) mV 变为 (-71.1 ± 11.1) mV (*n* = 4, *P* < 0.05) 和 (81.5 ± 13.8) mV (*n* = 4, *P* > 0.05)。给予 10 mg/L 季胺碱(*n* = 2)

后对动作电位时程未见明显改变,给予季胺碱(30、100 mg/L)可见动作电位时程明显延长,洗脱后部分恢复,静息电位和动作电位振幅未见明显变化(图 2B),测定 ADP_{90} ,将季胺碱与灌流台式液(对照)指标进行比较,计算缩短率($ADP_{90台} - ADP_{90季} / ADP_{90台}$),30 mg/L 和 100 mg/L 季胺碱缩短率分别为 $(5.4 \pm 2.5)\%$ ($n=4$)、 $(7.6 \pm 6.2)\%$ ($n=4$),差异无统计学意义($P>0.05$)。

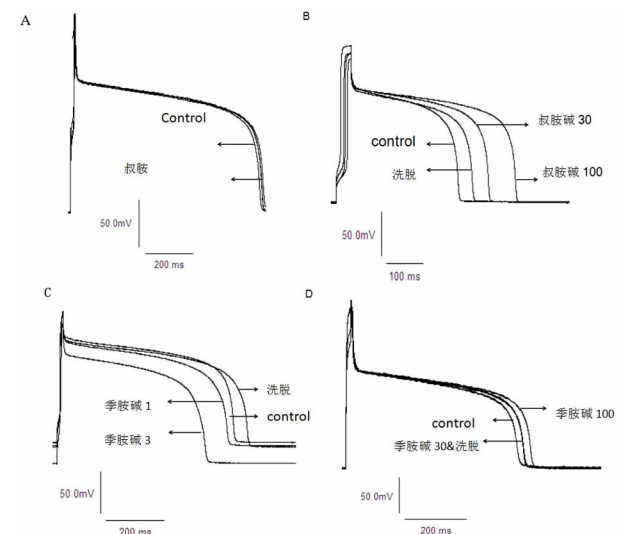


图 1 季胺碱和叔胺碱对豚鼠心室肌细胞动作电位的影响

注:A.叔胺碱(3、10 mg/L);B.叔胺碱(30、100 mg/L);C.季胺碱(1、3 mg/L);D.季胺碱(30、100 mg/L)

2.2 季胺碱和叔胺碱对 HERG 电流的影响 转染 HERG 通道的 HEK293 细胞,HERG 通道蛋白由 GFP 荧光蛋白标记,在蓝色荧光激发下,发出绿色荧光,给予单刺激电压诱导出 HERG 电流,可被特非那定($1 \mu\text{mol/L}$)所阻断。见图 2。给予叔胺碱(3~300 mg/L),HERG 通道尾电流随浓度增加变化逐渐减弱,洗脱后部分恢复。一例不同浓度的叔胺碱对同一个细胞 HERG 通道电流的作用。见图 3。将尾电流峰值作为观察指标,将给药后该指标与灌流台式液(对照)指标进行比较,计算抑制率($I_{台} - I_{药} / I_{台}$),其中叔胺碱(3、10、30、100、300 mg/L)抑制率分别为: $(6.4 \pm 5.3)\%$ ($n=4$)、 $(15.1 \pm 8.7)\%$ ($n=4$)、 $(31.6 \pm 10.2)\%$ ($n=7$)、 $(80.2 \pm 10.3)\%$ ($n=6$)、 100% ($n=2$),采用 logistic 公式 $y = A_2 + (A_1 - A_2) / [1 + (x/x_0)^p]$, A_1 、 A_2 分别为最小和最大抑制率, x_0 为 IC_{50} , p 为斜率)进行拟合,绘制量效曲线(图 3),计算出叔胺碱的 IC_{50} 为 $(55 \pm 7.2) \text{ mg/L}$ 。给予叔胺碱(1、3 mg/L)灌流,HERG 通道尾电流出现增强,洗脱后恢复,图 4 显示 1 例叔胺碱(1、3 mg/L)对同一个细胞 HERG 通道电流的作用。将尾电流峰

值作为观察指标,计算增强率($I_{药} - I_{台} / I_{台}$),其中 1 mg/L 和 3 mg/L 季胺碱增强率分别为: $(28.2 \pm 6.9)\%$ ($n=4$)、 $(40.6 \pm 11.3)\%$ ($n=4$)。给予叔胺碱(30、100、300 mg/L)灌流,HERG 通道尾电流出现抑制,洗脱后恢复,图 4 显示一例叔胺碱(10、30、100 mg/L)对同一个细胞 HERG 通道电流的作用。30、100、300 mg/L 季胺碱抑制率分别为: $(39.4 \pm 6.7)\%$ ($n=4$)、 $(84.7 \pm 0.7)\%$ ($n=2$)、 100% ($n=2$)。10 mg/L 季胺碱呈现出对 HERG 通道电流的双向作用,2 个细胞表现为增强效应,2 个细胞表现为抑制效应。

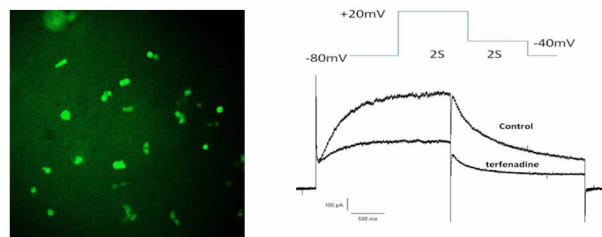


图 2 稳定转染 HERG 通道的 HEK293 细胞和特非那定的抑制作用

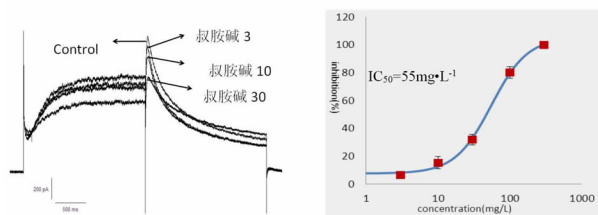


图 3 叔胺碱对 HERG 通道电流的作用

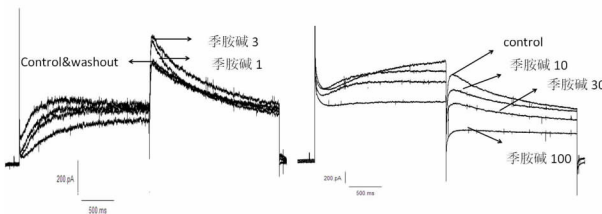


图 4 季胺碱对 HERG 通道电流的作用

3 讨论

现代药物化学和药理学实验表明,延胡索中的主要活性成分为叔胺和季胺型两类生物碱,其中叔胺碱含量约为 0.65%,季胺碱含量约为 0.3%^[7]。这 2 类成分在结构、溶解性和药理作用上也有着很大的不同:以延胡索甲素、乙素、丙素、丁素等为代表的叔胺型生物碱几乎不溶于水,往往具有良好的镇痛镇静作用,是延胡索用于传统止痛治疗的主要活性成分,而延胡索在抗心肌缺血、减少心肌氧耗等方面的显著作用,主要是缘于而水溶性较好的季胺碱,其主要包括小檗碱型的黄连碱、小檗碱、脱氢紫堇碱、非洲防己胺等^[8-10]。早在上世纪八十年代马胜

兴、陈可冀等发现延胡索碱具有治疗快速性心律失常的作用,而且叔胺碱和季胺碱对心电图产生不同影响:叔胺碱能够引起心电图 P、QRS 波增宽和 P-R、Q-T 间期延长,与奎尼丁对心电图的影响颇为相似,而季胺碱具有与乙胺碘呋酮相似的延长 Q-T 间期、使 T 波变形、心率减慢和扩张血管及降低血压等作用,在抗乌头碱诱发大鼠心律失常治疗作用的实验中,延胡索总碱中水不溶性(相当于叔胺碱)部分作用更为显著,表明叔胺碱和季胺碱在快速性心律失常方面具有不同的作用机制和作用特点,随后的研究发现延胡索碱的一些主要单体化合物可以抑制钾离子通道和钙离子通道,延长动作电位时程和有效不应期,降低自律性等作用^[5]。本研究从动作电位和离子通道角度探讨叔胺碱和季胺碱的抗心律失常方面不同的作用机制和作用特点,结果发现高浓度的叔胺碱和季胺碱均可以延长豚鼠心室肌细胞的动作电位时程(APD),这可能是 2 种生物碱皆可延长心电图 Q-T 间期的原因,但是在低浓度 2 种生物碱的作用相反,叔胺碱对 APD 无明显影响,而季胺碱可明显缩短 APD,季胺碱的效应双相性可能是其治疗快速型心律失常方面弱于叔胺碱的原因。

目前认为心肌细胞动作电位形成与维持是心肌细胞的特异性或非特异性离子通道在动作电位各期呈现不同开闭的结果,心脏快速延迟整流钾电流(IKr)是心肌细胞动作电位 3 期复极的主要电流,对 IKr 通道的抑制是其延长动作电位时程的机制之一,但是天然表达的 IKr 电流幅值较小,易受其他通道电流的干扰。HERG 基因编码 IKr 的 α 亚单位,通过利用转染并稳定表达 HERG 通道的人胚肾细胞株(HEK-293)建立的外源性表达系统可以有效解决这些问题^[11-13]。本研究采用这种稳定转染的细胞观察了叔胺碱和季胺碱对 HERG 通道的影响,结果显示高浓度的叔胺碱和季胺碱均可以抑制 HERG 通道电流,低浓度的叔胺碱可轻度抑制 HERG 通道电流,而低浓度的季胺碱与之相反,兴奋 HERG 通道电流,也呈现明显的双相性。叔胺碱和季胺碱对 HERG 通道的影响与对心肌细胞动作电位的作用相一致,表明这 2 种生物碱对动作电位的作用主要是通过抑制 IKr 产生的,也进一步说明延胡索碱的抗快速心律失常的靶点之一可能是 IKr 的 α 亚单位。一些文献报道了延胡索碱的一些单体化合物也对心肌细胞的 L-型钙通道具有抑制效应^[14],说明延胡索碱的抗快速心律失常也许是多种特异性或者非特异离子通道共同作用的结果,后续的研究将进一步观察其他类型

离子通道的作用。另一方面,阻断 IKr 电流可导致心电图 QT 间期延长、T 波和 U 波异常等,易发生室性心律失常,尤其是尖端扭转型室性心动过速(TdP),可致猝死,体外 IKr/HERG 通道检测目前已成为心血管安全性药理试验的重要部分,近年中药注射剂频发不良反应事件,中药注射剂对 QT 间期的影响缺乏风险评估^[15]。由于通过口服等方式摄入体内的延胡索碱含量较低,所以心脏毒性并不明显,若制成延胡索碱注射剂时,叔胺碱的对 HERG 电流抑制的 IC₅₀ 已经达到 55 mg/L,有必要对其心脏毒性进行进一步研究。

总之,本研究发现了心脏快速延迟整流钾电流是延胡索碱的抗心律失常机制主要靶点之一,并且延胡索碱的 2 种生物碱叔胺碱和季胺碱对这种离子通道的作用存在差异。

参考文献

- [1] 施婷婷,王建新,李希. 延胡索总生物碱类有效部位的研究进展[J]. 中药与临床,2015,6(2):110-113.
- [2] 杨波,纪宏宇,郑东友,等. 中药延胡索的炮制工艺和药理作用的研究进展[J]. 药学实践杂志,2017,35(2):112-115.
- [3] 何四琴,李艳. 复方延胡索汤剂联合美托洛尔治疗老年缺血性室性心律失常的临床研究[J]. 医药,2016(11):00132-00132.
- [4] 王凤,杜文婷,章怡伟,等. 辨病证论治心律失常概况与展望[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(13):217-221.
- [5] 张萍,徐凤芹,马晓昌,等. 延胡索碱治疗快速性心律失常的研究进展[J]. 中国中西医结合杂志,2012,32(5):713-716.
- [6] 贺凯,高建莉,赵光树. 延胡索化学成分、药理作用及质量控制研究进展[J]. 中草药,2007,38(12):1909-1912.
- [7] 赵丽沙,董宇,寿旦. 延胡索生物碱类化学成分及质量控制研究进展[J]. 中华中医药学刊,2017,35(2):299-302.
- [8] 赵翡翠,赵晓琴,李永和. 醋制延胡索中延胡索乙素含量及镇痛作用的对比研究[J]. 新疆中医药,2007,25(2):34-36.
- [9] 杨望,李真真,潘丽,等. 延胡索总生物碱对异丙肾上腺素诱导的心肌梗死大鼠的心肌保护作用[J]. 中国临床研究,2016,29(8):1057-1061.
- [10] 张萍,王海云,苏博,等. 延胡索提取物对 AMI 大鼠模型心肌梗死面积及 Na⁺ + -K⁺ + -ATPase、Ca²⁺ + -ATPase 活性的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2017,15(4):410-415.
- [11] 张建成,林琨,魏芝雄,等. 大蒜素对 HEK293 细胞 HERG 电流的阻滞作用[J]. 南方医科大学学报,2015,35(8):1128-1132.
- [12] 夏静,彭双清. 应用膜片钳技术检测药物对 HERG 通道抑制作用的实验过程及要点[J]. 军事医学,2015,39(11):884-886.
- [13] 方培亮,廉姜芳. HERG 钾通道蛋白质转运异常和功能恢复与 LQTS 的研究进展[J]. 中华医学遗传学杂志,2016,33(1):101-104.
- [14] 姚岚,芳芳. 作用于心肌细胞离子通道的抗心律失常中药研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2017,15(9):1057-1059.
- [15] 杜群群,陈晓南,祝妮,等. 抗心律失常复方中药稳心颗粒的心脏安全性再评价[J]. 中南药学,2016,14(6):567-571.