

· 基础研究 ·

## 杠柳毒苷体外致心律失常风险评价

李 旻, 顾晓峰, 汪溪洁, 李 华, 马 璟\*

中国医药工业研究总院国家上海新药安全评价研究中心, 上海 201203

**[摘要]** 目的:评价传统中草药香加皮的主要活性成分杠柳毒苷致心律失常的风险。方法:采用离体组织(豚鼠乳头肌和兔浦肯野纤维),给予浓度为0、0.3、1.0、3.0  $\mu\text{mol/L}$ 杠柳毒苷,检测其对动作电位的影响。指标包括:静息电位(resting membrane potential, RMP)、动作电位幅度(action potential amplitude, APA)、最大除极速度(maximal depolarization rate of phase 0,  $dv/dt_{\text{max}}$ )、复极30%、50%和90%动作电位时程(action potential duration at 30%, 50% and 90% repolarization,  $\text{APD}_{30}$ 、 $\text{APD}_{50}$ 、 $\text{APD}_{90}$ )。结果:与0  $\mu\text{mol/L}$ 组比较,0.3和1.0  $\mu\text{mol/L}$ 杠柳毒苷可缩短豚鼠乳头肌的 $\text{APD}_{30}$ 和 $\text{APD}_{50}$ ;0.3、1.0、3.0  $\mu\text{mol/L}$ 杠柳毒苷降低兔浦肯野纤维的 $dv/dt_{\text{max}}$ ;3.0  $\mu\text{mol/L}$ 杠柳毒苷减少兔浦肯野纤维的APA;1.0、3.0  $\mu\text{mol/L}$ 杠柳毒苷缩短兔浦肯野纤维的 $\text{APD}_{30}$ 。差异均有统计学意义。结论:杠柳毒苷有潜在诱导心律失常的风险。

**[关键词]** 心律失常;动作电位;心脏毒性;杠柳毒苷

**[中图分类号]** R965.3

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2020)10-1437-05

**doi:**10.7655/NYDXBNS20201007

### Risk assessment of arrhythmia induced by periplocin *in vitro*

LI Min, GU Xiaofeng, WANG Xijie, LI Hua, MA Jing\*

China State Institutes of Pharmaceutical Industry National Shanghai Center for New Drug Safety Evaluation and Research, Shanghai 201203, China

**[Abstract]** **Objective:** The aim of the study was to evaluate the risk of arrhythmia induced by periplocin, the main active component of *Cortex Periplocae*, a traditional Chinese medicine preparation. **Methods:** In this experiment, isolated tissues (guinea pig papillary muscle and rabbit Purkinje fiber) were treated by 0.3, 1.0, or 3.0  $\mu\text{mol/L}$  periplocin to assess the effect on action potential. The following parameters and endpoints were assessed: resting membrane potential (RMP), action potential amplitude (APA), maximal depolarization rate of phase 0 ( $dv/dt_{\text{max}}$ ), action potential duration at 30%, 50%, and 90% repolarization ( $\text{APD}_{30}$ ,  $\text{APD}_{50}$ , and  $\text{APD}_{90}$ ). **Results:** As compared to the 0  $\mu\text{mol/L}$  group, periplocin-related significant reduction in  $\text{APD}_{30}$ ,  $\text{APD}_{50}$  was observed at guinea pig papillary muscle in the 0.3 or 1.0  $\mu\text{mol/L}$  periplocin. Periplocin-related significant decrease in  $dv/dt_{\text{max}}$  was observed at rabbit Purkinje fiber in the 0.3, 1.0, or 3.0  $\mu\text{mol/L}$  periplocin. Periplocin-related significant reduction in APA was observed at rabbit Purkinje fiber in the 3.0  $\mu\text{mol/L}$  periplocin. Periplocin-related significant reduction in  $\text{APD}_{30}$  was observed at rabbit Purkinje fiber in the 1.0, or 3.0  $\mu\text{mol/L}$  periplocin. **Conclusion:** Periplocin has the potential to induce arrhythmia.

**[Key words]** arrhythmia; action potential; cardiotoxicity; periplocin

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(10): 1437-1441]

传统中草药在亚洲和欧洲的广泛应用,为民众带来便利和福祉。中草药“药性平和,安全无毒”的概念多年来影响着人们,许多中草药不仅被作为治

疗药物,还作为日常调理身体机能的健康食品和膳食补充剂<sup>[1]</sup>。然而随着现代科技水平的进步,人们对中草药安全的关注度和认知逐渐增强。心脏作为人体最重要的器官之一,大量中草药不良反应的临床报道不断涌现,虽然有中药具有保护心脏的作用<sup>[2]</sup>,但是也有不少中药因其严重的心脏毒性而退市或者限制临床使用范围<sup>[3]</sup>。

**[基金项目]** 国家重大科技专项(2018ZX09201017-008);上海市科委实验动物领域项目(17140900700)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: jma@ncdser.com

中药组分复杂,出现心脏毒性时难以鉴定与何种成分相关,故而有临床报道心脏毒性中药的活性单体具有重要的价值。香加皮(*Cortex Periplocae*)为萝藦科植物杠柳的干燥根皮,味辛苦,性温,有毒,归肾、肝、心经,具有祛风湿、强筋骨的功效,主要用于风寒湿痹、腰膝酸软、心悸气短、下肢水肿等<sup>[4]</sup>。近年来多有用于治疗心力衰竭,疗效虽然明显但不良反应较大,已有临床文献报道出现心脏毒性<sup>[5]</sup>。香加皮的主要化学成分为杠柳毒苷(periplocin)、C21甾体苷、4-甲氧基水杨醛、 $\beta$ 氧谷甾醇等<sup>[6]</sup>。因为杠柳毒苷结构与强心苷类成分相似,且有文献报道可导致心脏产生明显毒性,如心律异常<sup>[7-9]</sup>,同时考虑我国2010年版本药典中香加皮仅以4-甲氧基水杨醛为指标成分采用高效液相作为质量控制标准<sup>[10]</sup>而忽略了有心脏毒性作用的杠柳毒苷。故而本实验的目的是采用体外离体豚鼠乳头肌和兔浦肯野纤维检测杠柳毒苷对心脏动作电位的影响<sup>[11-14]</sup>,以期为后续香加皮的药用开发和临床使用提供参考信息。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 动物

雄性豚鼠6只,体重300~500 g,购于北京隆安实验动物养殖中心[实验动物生产许可证号:SCXK(京)2014-0003]。雄性新西兰兔6只,体重2.5~3.0 kg,购于北京芳元缘养殖场[实验动物生产许可证号:SYXK(京)2014-0039]。动物实验过程符合国家上海新药安全评价研究中心动物实验中心伦理要求。

#### 1.1.2 试剂

心肌保护液:108 mmol/L NaCl, 27 mmol/L KCl, 1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1.8 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 24 mmol/L NaH<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.9 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 55 mmol/L 葡萄糖, NaOH 调节 pH 至 7.4(CO<sub>2</sub>饱和后)。细胞外液记录液:118 mmol/L NaCl, 4 mmol/L KCl, 1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1.8 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 24 mmol/L NaH<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.9 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 11 mmol/L 葡萄糖, NaOH 调节 pH 至 7.4(CO<sub>2</sub>饱和后)。杠柳毒苷(Sigma公司,美国):将适量杠柳毒苷用 DMSO 配制成 103.379 mmol/L 的储液。在检测之前,每个浓度溶液稀释到实验所用的外液中。测试化合物工作液浓度为 0.3、1.0、3.0  $\mu$ mol/L。E4031(Sigma公司,美国):将适量 E4031 用 DMSO 配制成 50 mmol/L 的储液。在检测之前,使用实验所

用的外液稀释得最终浓度为 1.0  $\mu$ mol/L 的工作液,并确保 DMSO 浓度为 0.1%。

#### 1.1.3 仪器

Axonpatch 700B 放大器(Molecular Devices 公司,美国);MP285 微操纵器(Sutter Instruments 公司,美国);P-97 电极拉制仪(Sutter Instruments 公司,美国);IX71 显微镜(Olympus 公司,日本);BF150-86-10 毛皮玻璃管(Sutter Instruments 公司,美国);pCLAMP 10.6 数据采集和分析软件(Molecular Devices 公司,美国)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 剂量设计

豚鼠乳头肌和兔浦肯野纤维实验设计剂量均为 0.3、1.0、3.0  $\mu$ mol/L。同时还设立阴性对照组(0  $\mu$ mol/L)和阳性对照组(E4031 1  $\mu$ mol/L)。

### 1.2.2 离体组织准备

豚鼠乳头肌:①将实验动物固定后,腹腔注射戊巴比妥钠麻醉,打开胸腔取出心脏,迅速置于标准混合气饱和的心肌保护液中,轻轻挤压心脏,去除血液;②心脏离体后始终浸没于心肌保护液中,并持续通标准混合气(95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>),且心肌保护液在使用前需用标准混合气饱和备用;③将心脏转移至 10 cm 的细胞培养皿中,去除心房组织,沿室间隔分离右心室;④分离后的右心室展开后可见乳头肌,按照乳头肌的位置和方向将右心室组织切割成约 0.25 cm<sup>3</sup> 的小组织块,用针头将组织块固定于琼脂上,使乳头肌完全展开且无牵拉为宜,放入孵育槽中,心肌保护液室温孵育 1 h。

兔浦肯野纤维:①将新西兰兔固定后,耳缘静脉注射戊巴比妥钠麻醉,打开胸腔取出心脏,迅速置于预冷的心肌保护液中,轻轻挤压心脏,去除血液;②心脏离体后始终浸没于心肌保护液中,并持续通标准混合气(95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>),且心肌保护液在使用前需用标准混合气饱和备用;③将心脏转移至 10 cm 的细胞培养皿中,去除心房组织,沿室间隔分别分离左、右心室;④分离后的左、右心室展开后可见乳白色的浦肯野纤维,左心室心肌组织较厚,先用手术刀去除部分肌肉组织,使整个心室变薄,再按照浦肯野纤维的方向将左、右心室组织分别切割成约 0.25 cm<sup>3</sup> 的小组织块,用针头将组织块固定于琼脂上,放入孵育槽中,心肌保护液室温孵育 1 h。

### 1.2.3 加样

细胞动作电位稳定后加入阴性对照品工作液,作用至少 5 min;随后从低至高加入不同浓度的杠柳

毒苷工作液, 每个浓度作用至少 15 min; 最后加入阳性对照品工作液。

使用 WPI 蠕动泵将工作液加至待测豚鼠乳头肌或兔浦肯野纤维所在的平皿中, 使用 Harvard 微灌流槽保证蠕动泵灌流针出口温度为  $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$ 。

#### 1.2.4 电生理记录

乳头肌/浦肯野纤维置于记录灌流槽内, 由水浴控制温度, 灌流速度约 3 mL/min。细胞内膜电位记录采用传统的细胞内记录电极, 电极为硅酸盐玻璃毛细管, 用微电极控制仪控制而成, 电阻 30~80 M $\Omega$ 。电极内充满 3 mol/L KCl 溶液, 并与微电极放大器连接。以 Ag-AgCl 为参考电极。动作电位通过双极白金电极给予重复的电刺激诱发(刺激时程 1~3 ms, 1.5 倍阈刺激), 动作电位通过数模转换, 经过 1 kHz 低频数字滤波, 储存于 PCLAMP10.6 软件。所有实验在  $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$  条件下进行。

#### 1.2.5 动作电位数据分析

动作电位各项参数用 pCLAMP(版本 10.6, Molecular Devices) 软件进行分析。动作电位参数包括: 静息电位(resting membrane potential, RMP)、动作电位幅度(action potential amplitude, APA)、最大除极速度(maximal depolarization rate of phase 0,  $dv/dt_{\max}$ )、复极 30%、50% 和 90% 动作电位时程(action potential duration at 30%, 50% and 90% repolarization,  $APD_{30}$ 、 $APD_{50}$ 、 $APD_{90}$ )。浓度依赖性作用数据用各浓度下的作用与给药前的基线(溶剂对照)的比值

表示。

#### 1.3 统计学方法

实验数据以均数  $\pm$  标准误 ( $\bar{x} \pm s_x$ ) 表示, 使用 SPSS 21.0 软件及 Microsoft Excel 2010 对数据进行统计学分析。不同剂量杠柳毒苷组与阴性对照组比较时, 按照以下方法统计: ①用 Levene's 检验检测数据的方差齐性, 如方差齐则进行单因素方差分析(ANOVA); 如方差不齐则以 Dunnett's T3 检验进行组间比较。②当方差分析结果有统计学差异, 则进一步用 Dunnett's *t* 检验进行组间比较检验。阳性组与对照组比较时采用 Student's *t* 检验。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

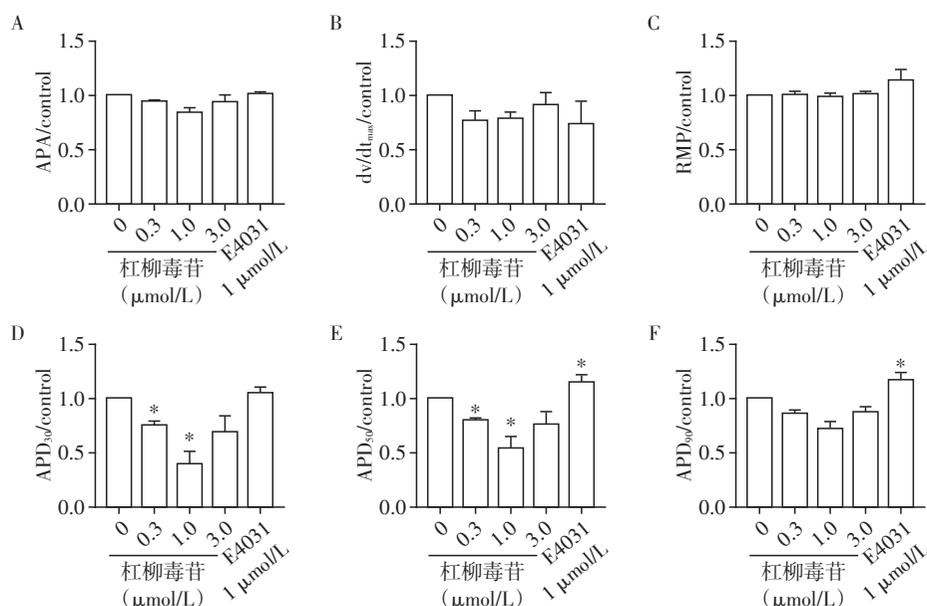
### 2.1 对豚鼠乳头肌动作电位的影响

与阴性对照组相比, 阳性对照药物 E4031 延长  $APD_{50}$  和  $APD_{90}$  ( $P < 0.05$ ), 而对 APA、 $dv/dt_{\max}$ 、RMP、 $APD_{30}$  均无显著影响 ( $P > 0.05$ , 图 1)。

与阴性对照组相比, 0.3、1.0、3.0  $\mu\text{mol/L}$  杠柳毒苷对 APA、 $dv/dt_{\max}$ 、RMP、 $APD_{90}$  均无明显影响 ( $P > 0.05$ )。同时 3.0  $\mu\text{mol/L}$  杠柳毒苷对  $APD_{30}$  和  $APD_{50}$  有缩短趋势, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。0.3 和 1.0  $\mu\text{mol/L}$  杠柳毒苷缩短  $APD_{30}$  和  $APD_{50}$ , 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ , 图 1)。

### 2.2 对兔浦肯野纤维动作电位的影响

与阴性对照组相比, 阳性对照药物 E4031 显著



A~F: 分别代表杠柳毒苷对豚鼠乳头肌动作电位参数 APA、 $dv/dt_{\max}$ 、RMP、 $APD_{30}$ 、 $APD_{50}$ 、 $APD_{90}$  的影响。与阴性对照组相比, \* $P < 0.05$  ( $n=3$ )。

图 1 杠柳毒苷对豚鼠乳头肌动作电位的影响

Figure 1 Effects of periplocin on action potential of guinea pig papillary muscle

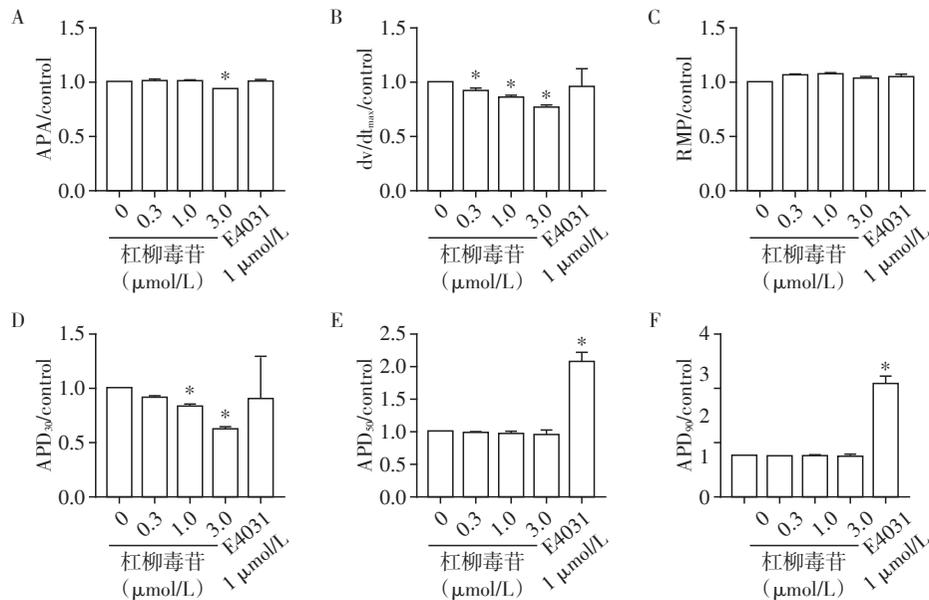
延长 APD<sub>50</sub> 和 APD<sub>90</sub> ( $P < 0.05$ ), 而对 APA、dv/dt<sub>max</sub>、RMP 和 APD<sub>30</sub> 均无显著影响 ( $P > 0.05$ , 图 2)。

与阴性对照组相比, 0.3、1.0、3.0 μmol/L 杠柳毒苷对兔浦肯野纤维 APD<sub>50</sub> 和 APD<sub>90</sub> 均无明显影响 ( $P > 0.05$ )。0.3、1.0、3.0 μmol/L 杠柳毒苷显著缩短 dv/dt<sub>max</sub> ( $P < 0.05$ )。同时 3.0 μmol/L 杠柳毒苷显著减弱 APA ( $P < 0.05$ )。1.0、3.0 μmol/L 杠柳毒苷显著缩

短 APD<sub>30</sub> ( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

E4031 是 hERG 钾通道阻断剂, 可以引起心肌动作电位时程延长。本研究中 E4031 对豚鼠乳头肌和兔浦肯野纤维动作电位的影响与文献报道一致, 证明本研究体系成立。



A-F: 分别代表杠柳毒苷对兔浦肯野纤维动作电位参数 APA、dv/dt<sub>max</sub>、RMP、APD<sub>30</sub>、APD<sub>50</sub>、APD<sub>90</sub> 的影响。与阴性对照组相比, \* $P < 0.05$  ( $n=3$ )。

图 2 杠柳毒苷对兔浦肯野纤维动作电位的影响

Figure 2 Effects of periplocin on action potential of rabbit Purkinje fiber

由于使用整体动物进行心脏毒性的研究时间长、投入大, 并考虑到动物福利 3R 原则, 利用动物离体组织进行药物心脏毒性研究的替代方法具有较高的实用价值<sup>[15]</sup>。本研究使用两种组织可更充分评估药物心脏毒性。0.3 和 1.0 μmol/L 杠柳毒苷显著缩短豚鼠乳头肌 APD<sub>30</sub> 和 APD<sub>50</sub>。虽然 3.0 μmol/L 杠柳毒苷对豚鼠乳头肌 APD<sub>30</sub> 和 APD<sub>50</sub> 的影响无显著性, 但是趋势一致, 均为明显缩短 (25%~32%), 故而考虑是组织个体差异导致。在另一个离体组织兔浦肯野纤维中, 1.0、3.0 μmol/L 杠柳毒苷显著缩短 APD<sub>30</sub>。两种不同离体组织结果的相似性说明杠柳毒苷显示能够缩短心肌细胞的 ADP。APD<sub>30</sub>、APD<sub>50</sub> 和 APD<sub>90</sub> 均与心肌细胞上若干离子通道的综合作用相关, 其中钾离子通道 K<sub>v</sub>4.3 和钙离子通道 Ca<sub>v</sub> 对 APD<sub>30</sub> 影响相对较大; 钙离子通道 Ca<sub>v</sub> 和钾离子通道 hERG 对 APD<sub>50</sub> 影响相对较大; 钙离子通道 Ca<sub>v</sub>、钾离子通道 hERG 和钾离子通道 I<sub>Ks</sub> 对 APD<sub>90</sub> 影响相对较大。杠柳毒苷为强心苷类成分, 具有类似洋地黄的

强心作用。药理作用为钠钾 ATP 酶抑制剂, 从而导致细胞内钠离子含量的增加, 进而促进钠钙交换体的运转, 将细胞内多余的钠离子转运至细胞外, 而将细胞外钙离子转运至细胞内, 细胞内钙离子含量的升高增加了心肌细胞的兴奋性, 亦会影响细胞内的钙离子通道<sup>[16]</sup>。故而结合上述结果, 推测杠柳毒苷对钙离子通道 Ca<sub>v</sub> 影响较大从而同时缩短了 APD<sub>30</sub> 和 APD<sub>50</sub>。

杠柳毒苷能够显著缩短兔浦肯野纤维的 APA 和 dv/dt<sub>max</sub>, 虽然对豚鼠乳头肌 APA 和 dv/dt<sub>max</sub> 的影响没有显著性差异, 但是改变的趋势与兔浦肯野纤维一致。强心苷类化合物除了可使细胞内钙离子浓度进一步升高导致细胞内产生钙超载, 从而对心肌细胞产生抑制作用<sup>[17-18]</sup>外, 还可能作用于迷走神经、心肌细胞中的多种离子通道、第二信使等, 从而对心脏的电生理功能产生间接或者直接的作用<sup>[19]</sup>。APA 的改变与细胞外钠离子浓度密切相关, 钠离子浓度低则 APA 缩短, 故而其缩短可能与

杠柳毒苷抑制钠钾 ATP 酶,导致细胞内钠离子浓度增加而细胞外钠离子浓度降低有关。 $dv/dt_{max}$ 的改变与动作电位 0 相钠离子内流速度密切相关,当细胞钠离子内流速度降低时,则  $dv/dt_{max}$  减少,故而其缩短可能与杠柳毒苷抑制 0 相钠离子内流速度有关。

综上所述,杠柳毒苷可以影响心肌细胞的电生理活动并有诱导心律失常的风险。

#### [参考文献]

- [1] FU Y X, WANG Y H, ZHANG B. Systems pharmacology for traditional Chinese medicine with application to cardio-cerebrovascular diseases [J]. *J Tradit Chin Med Sci*, 2014, 1(2): 84-91
- [2] 杨 莉,王亚非,姚祖培,等. 中药预防蒽环类化疗药物急性心脏毒性反应的临床研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2010, 30(10): 1435-1438
- [3] LI Y B, ZHOU H N, XIE J B, et al. A novel method for evaluating the cardiotoxicity of traditional Chinese medicine compatibility by using support vector machine model combined with metabonomics [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2016, 2016: 6012761
- [4] 丁菲菲,张晓静,邓雁如. 杠柳毒苷体外抑制肝癌细胞和乳腺癌细胞增殖的实验研究[J]. *药物评价研究*, 2014, 37(1): 30-33
- [5] 陈颖萍. 香加皮临床应用情况及不良反应预防[J]. *辽宁中医杂志*, 2005, 32(6): 598-599
- [6] 任晓亮,谢跃生,潘桂湘,等. 香加皮强心成分杠柳毒苷肠菌代谢研究[J]. *天津中医药*, 2007, 24(6): 515-518
- [7] 孙 达,张 静,陈金堂,等. 杠柳毒苷单次给药的毒性研究[J]. *毒理学杂志*, 2010, 24(6): 461-463
- [8] 毕 波,周 昆,胡利民. 香加皮及其主要毒性成分的研究进展[J]. *毒理学杂志*, 2010, 24(1): 73-75
- [9] 孙 达,张 静,陈金堂,等. 香加皮中强心苷类对大鼠离体心脏的强心作用比较[J]. *中华中医药学刊*, 2011, 29(12): 2633-2635
- [10] 徐 鑫,马志会,孙 达,等. 香加皮急性毒性与其杠柳毒苷含量相关性研究[J]. *中国药物警戒*, 2015, 12(5): 261-263
- [11] POURRIAS B, PORSOLT R D, LACROIX P. QT interval prolongation by noncardiovascular drugs: a proposed assessment strategy [J]. *Drug Develop Res*, 1999, 47(2): 55-62
- [12] LU H R, MARIEN R, SAELS A, et al. Species plays an important role in drug-induced prolongation of action potential duration and early after depolarizations in isolated Purkinje fibers [J]. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 2001, 12(1): 93-102
- [13] SANGUINETTI M C, JURKIEWICZ N K. Two components of delayed rectifier  $K^+$  current: differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents [J]. *J Gen Physiol*, 1990, 96(1): 195-215
- [14] YAP Y G, CAMM A J. Arrhythmogenic mechanisms of non-sedating antihistamines [J]. *Clin Exp Allergy*, 1999, 29(Suppl3): 174-181
- [15] FERDINANDY P, BACZKO' I, BENCSIK P, et al. Definition of hidden drug cardiotoxicity: paradigm change in cardiac safety testing and its clinical implications [J]. *Eur Heart J*, 2019, 40(22): 1771-1777
- [16] 白玉国,赵秀丽,张爱琴. 洋地黄强心苷类药治疗充血性心力衰竭的研究进展[J]. *药物不良反应杂志*, 2006, 8(3): 165-168
- [17] LI Q, POGWIZD S M, PRABHU S D, et al. Inhibiting  $Na^+/K^+$  ATPase can impair mitochondrial energetics and induce abnormal  $Ca^{2+}$  cycling and automaticity in guinea pig cardiomyocytes [J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e93928
- [18] RUCH S R, NISHIO M, WASSERSTROM J A. Effect of cardiac glycosides on action potential characteristics and contractility in cat ventricular myocytes: role of calcium overload [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003, 307(1): 419-428
- [19] DEMIRYÜREK A T, DEMIRYÜREK S. Cardiotoxicity of digitalis glycosides: roles of autonomic pathways, autacoids and ion channels [J]. *Auton Autacoid Pharmacol*, 2005, 25(2): 35-52

[收稿日期] 2020-01-14