

论著·基础研究

包公藤甲素衍生物 (S)-OTS · HCl 的心脏电生理效应

王红卫¹, 张颖², 李慈珍³, 刘远谋³, 杨智昉¹

1. 上海健康医学院 基础医学院生理教研室, 上海 201318; 2. 上海交通大学 基础医学院实验中心, 上海 200025; 3. 上海交通大学 基础医学院生理教研室, 上海 200025

[摘要] **目的**·研究 (S)-OTS · HCl 对心脏生物电活动的影响。**方法**·运用细胞内生物电记录、心电图及 Langendorff 心脏灌流技术, 在离体和在体情况下研究 (S)-OTS · HCl 对豚鼠和家兔心脏的作用。**结果**·(S)-OTS · HCl 可与 M₂ 型胆碱能受体结合, 并在动物整体心电图记录中剂量依赖性地延长 RR 间期。(S)-OTS · HCl 对心室肌的静息电位 (RP)、动作电位幅值 (APA) 和动作电位最大上升速率 ($V_{\max}$) 没有影响, 但 (S)-OTS · HCl (1×10^{-5} mol/L) 可显著缩短动作电位时程 APD₅₀ 和 APD₉₀ 分别至 91.6% 和 90.9%。当 (S)-OTS · HCl (1×10^{-7} mol/L) 灌流家兔窦房结标本时, 可使 4 期自动除极速率缩短至 13.7%, 也可有效抑制钙通道, 并使窦房结自律性动作电位的 APA 和 $V_{\max}$ 减小。离体心肌收缩力亦随 (S)-OTS · HCl 的剂量增加而降低。**结论**·(S)-OTS · HCl 是一个作用较强的胆碱能受体激动剂, 能与心肌 M₂ 受体结合, 产生负性变时、变力和变传导效应。

[关键词] (S)-OTS · HCl; 胆碱能受体激动剂; 动作电位; 心电图

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2017.02.009 **[中图分类号]** R96 **[文献标志码]** A

Cardiac electrophysiological effect of (S)-OTS·HCl, a derivative of Baogongteng A

WANG Hong-wei¹, ZHANG Ying², LI Ci-zhen³, LIU Yuan-mou³, YANG Zhi-fang¹

1. Department of Physiology, Shanghai University of Medicine and Health Science, Shanghai 201318, China; 2. Experimental Center, Basic Medicine Faculty of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200025, China; 3. Department of Physiology, Basic Medicine Faculty of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200025, China

[Abstract] **Objective**·To study the electrophysiological effect of (S)-OTS·HCl on the heart. **Methods**·The conventional intracellular recording, electrocardiograph (ECG) and Langendorff cardiac perfusion technique were employed to investigate the effect of (S)-OTS·HCl on *in-vivo* and *in-vitro* hearts of guinea pigs and rabbits. **Results**·(S)-OTS·HCl could bind to M₂ muscarinic receptors and dose-dependently prolong the RR intervals significantly *in vivo*. It had no effect on resting potential (RP), action potential amplitude (APA), and maximum upstroke velocity of phase 0 ($V_{\max}$) of ventricular myocytes. Instead, 1×10^{-5} mol/L (S)-OTS·HCl could shorten the action potential duration at 50 percent repolarization (APD₅₀) and APD₉₀ to 91.6% and 90.9%, respectively. And the spontaneous depolarization rate of phase 4 (SDR) of sinus nodes was reduced to its 13.7% when rabbit sinus nodes were exposed to 1×10^{-7} mol/L (S)-OTS·HCl. (S)-OTS·HCl could inhibit Ca²⁺ channel effectively. It decreased APA and $V_{\max}$ of sinus nodes and attenuated the cardiac contractility *in vitro*. **Conclusion**·(S)-OTS·HCl is a potent cholinergic agonist and has negative chronotropic, dromotropic, and inotropic effects on hearts *via* binding to M₂ muscarinic receptors.

[Key words] (S)-OTS·HCl; cholinergic agonist; action potential; electrocardiograph

毒蕈碱类药物在临床疾病治疗中有重要的作用, 如在治疗老年痴呆症和其他神经退行性疾病上毒蕈碱类药物发挥了较强的功能^[1-2]。包公藤甲素 [(2S, 6S)-2 α -hydroxy-6 β -acetoxynortropane, (6S)-BGT-A, 简称包甲素, 亦称丁公藤碱 II] 是从旋花科植物丁公藤 (*Erycibe obtusifolia* Benth.) 中分离提取的莨菪烷生物碱, 具有拟胆碱能作用。作为 M 受体的完全激动剂, 包公藤甲素具有强烈的缩瞳作用, 在临床上主要用于青光眼的治疗, 其疗效优于传统的拟胆碱药毛果芸香碱^[3]。同时, 它的心血管药理作用也有报道。在体研究

表明, 包公藤甲素可有效地降低小鼠心率和缩短动作电位时程^[4]; 也能降低心肌耗氧量, 并提高灌流液 pH 值, 同时降低组织液 K⁺ 浓度^[5]。由于从植物中提取包公藤甲素的产量过低, 限制了其在临床的研究与运用。经过多年的努力, 上海交通大学医学院药理学系在包公藤甲素的基础上研制出了缩瞳新药 (1R, 3S, 5R, 6S) -3 α -对甲苯磺酰氧基-6 β -乙酰氧基莨菪烷盐酸盐 [hydrochloride of (1R, 3S, 5R, 6S) -3 α -paramethyl benzenesulfonyloxy-6 β -acetoxytropane, (S)-OTS · HCl] (结构式见图 1)^[6]。该制剂具有极强的拟胆碱能活性^[7]。

[基金项目] 上海科学技术委员会重点资助项目 (06JC14045); 上海教育委员会科研创新项目 (13yz150); 上海健康医学院附属卫生学校课题 (FA1-3903-16-117067) (Key Project of Science and Technology Commission of Shanghai Municipality, 06JC14045; Scientific Research Innovation Project of Shanghai Education Committee, 13yz150; Subject of Health School Affiliated to Shanghai University of Medicine and Health Sciences, FA1-3903-16-117067)。

[作者简介] 王红卫 (1967—), 男, 副教授, 硕士; 电子邮箱: jywanghw@shsmu.edu.cn。

[通信作者] 杨智昉, 电子邮箱: yangzhifang@189.cn。

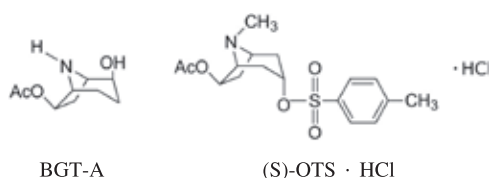


图1 包公藤甲素 (BGT-A) 和 (S)-OTS · HCl 的化学结构

Fig 1 Chemical structures of BGT-A and (S)-OTS · HCl

拟胆碱能药物主要通过 M 受体调节相应内脏器官的活动。M 受体广泛分布于全身各组织脏器, 且具有不同的功能亚型^[7]; 导致受体激活时, 在不同的脏器表现出不同的功能。为了解 (S)-OTS · HCl 对心脏的药理学效应, 我们在正常的动物整体心电活动、离体心脏泵功能、心肌组织跨膜生物电变化等方面观察 (S)-OTS · HCl 的拟胆碱能效应, 明确其对心脏生物电活动的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 用于在体心电图实验的豚鼠体质量 400 ~ 500 g; 用于离体心电图实验和心室肌标本制备的豚鼠体质量 250 ~ 350 g, 雌雄不拘。新西兰家兔体质量 1.5 kg, 雌雄不拘, 用于窦房结标本制备。豚鼠和家兔由上海交通大学医学院动物实验科学部提供, 生产许可证号: SYXK (沪) 2003-0026。本研究所开展的动物实验由上海健康医学院伦理委员会批准和监督, 也符合美国国立卫生研究院颁布的 *The Guide for Care and Use of Laboratory Animals* (《实验动物的护理和使用指南》)^[8] 的要求。

1.1.2 药品和溶液配制 灌流豚鼠心室肌标本台氏液: NaCl 137 mmol/L、NaHCO₃ 23 mmol/L、MgCl₂ 0.5 mmol/L、KCl 5.4 mmol/L、CaCl₂ 1.8 mmol/L、NaH₂PO₄ 0.4 mmol/L、葡萄糖 10 mmol/L。pH 值校准至 7.40 ± 0.05, 用 95% O₂ 和 5% CO₂ 饱和, 在灌流心室肌标本时维持灌流液温度为 (37.0 ± 0.5) °C。灌流家兔窦房结标本台氏液: NaCl 140 mmol/L、MgCl₂ 1.0 mmol/L、KCl 5.4 mmol/L、CaCl₂ 1.8 mmol/L、HEPES 5.0 mmol/L、葡萄糖 10 mmol/L。用 1 mol/L NaOH 校正 pH 值至 7.40 ± 0.05, 并以 100% O₂ 饱和, 实验时灌流液温度保持为 (35.5 ± 0.5) °C。(S)-OTS · HCl 制剂由上海交通大学医学院药理学系提供^[6], 相对分子质量 387.5。溶于去离子水, 制备成 1 mol/L 母液, 根据不同实验需要, 在灌流液中配制成不同的浓度。

1.1.3 主要仪器 多通道生物信号分析仪 (PowerLab, ML845, ADInstruments, 澳大利亚), 生物电放大器 (PowerLab, ML135), 张力换能器 (PowerLab, MLT050/D),

桥式放大器 (PowerLab, ML118), 微电极放大器 (MEZ8201, NIHON KOHDEN, 日本), 刺激器 (SEN-7203, NIHON KOHDEN), 隔离器 (SS102J, NIHON KOHDEN)。采样软件 Chart 5 for Windows (ADInstruments, 澳大利亚)。

1.2 实验方法

1.2.1 在体心电图记录 乌拉坦 (urethane, 20%, 5 mL/kg) 静脉注射麻醉豚鼠 ($n=5$), 采用标准肢体 II 导联从各肢体引导心电图。心电图信号通过生物电放大器和多通道生物信号分析仪采样并储存在计算机中。软件采样速率 4 kHz, 高通滤波和低通滤波分别设置为 1 kHz 和 0.01 Hz。根据实验要求, 从颈外静脉注射不同浓度的 (S)-OTS · HCl。同一动物多次注射时, 2 次注射间隔 10 min。采样的数据由 Chart 5 分析, 心电图指标 RR 间期、PR 间期和 QT 间期在注射 (S)-OTS · HCl 后 8 min 测量。由于 QT 间期易受心率影响, 其长短与心率成反比, 故此常采用校正 QT 间期 (QTc), 把 QT 间期转换成非心率依赖的校正值。本实验中采用 QTc 来观察药物对心电图的影响。其计算公式为: $QTc = QT \times RR^{(-1/2)}$ 。

1.2.2 离体心电图和心肌收缩力记录 乌拉坦 (20%, 5 mL/kg) 静脉注射麻醉豚鼠 ($n=5$), 开胸取出心脏, 使用 Langendorff 灌流系统从主动脉以 76 cmH₂O (1 cmH₂O = 9.8×10^{-2} kPa) 压力用正常台氏液灌流心脏。根据实验要求, 改换含有不同浓度 (S)-OTS · HCl 的台氏液, 观察 (S)-OTS · HCl 对心脏功能的影响。3 根白金电极分别放置于心尖、右心耳及主动脉根部, 通过生物电放大器引导心电图。用自制的钢丝夹夹住心尖, 通过压力换能器和桥式放大器采集心肌收缩力, 并储存于计算机。心电图和心肌收缩力采样速率 4 kHz, 高通滤波和低通滤波分别设置为 1 kHz 和 0.01 Hz。

1.2.3 豚鼠心室肌标本制备及动作电位记录 豚鼠 ($n=5$) 麻醉后 (乌拉坦, 20%, 5 mL/kg), 开胸取出心脏, 放置于 37 °C 台氏液中, 手术选取右心室乳头肌。乳头肌用不锈钢钉固定于灌流槽中, 台氏液以 3 mL/min 速率灌注入灌流槽内, 灌流液温度维持在 (37 ± 0.5) °C, 并用 95% O₂ 和 5% CO₂ 饱和。刺激器控制隔离器刺激标本, 刺激频率 1 Hz, 刺激持续时间 0.1 ms, 刺激强度为阈值的 1.5 倍。标本刺激 30 min 后, 用内充 3 mol/L KCl、内阻 15 ~ 20 MΩ 的玻璃电极引导动作电位, 通过微电极放大器和多通道生物信号分析仪记录至计算机, 采样频率为 100 kHz。测量的生物电参数包括静息电位 (resting potential, RP)、动作电位幅值 (action potential amplitude, APA), 0 期最大除极速度 (maximum upstroke velocity of

phase 0, $V_{\max}$) 和动作电位时程 (action potential duration at 50% of repolarization, APD_{50} ; action potential duration at 90% of repolarization, APD_{90})。

1.2.4 家兔窦房结标本制备及自律性动作电位记录 击昏成年家兔 ($n=5$) 后迅速打开胸腔, 取出心脏置于 $36\text{ }^{\circ}\text{C}$ 充氧的台氏液中, 制备带部分右心耳组织的窦房结标本。将兔窦房结标本固定于恒温 (35.5 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$ 、恒流 (3 mL/min) 标本槽中。标本自律性活动稳定后, 用内充 3 mol/L KCl 的 20 M Ω 玻璃微电极作细胞内穿刺, 记录窦房结动作电位。记录的电变化通过微电极放大器经 PowerLab 系统输入计算机储存和分析。计算机采样频率为 100 kHz, 测量的生物电参数包括自律性心率 (spontaneous beating rate, HR)、APA、 $V_{\max}$ 和 4 期自动除极速率 (spontaneous depolarization rate of phase 4, SDR)。

1.3 统计学方法

实验数据和图线经 Chart 5 软件读取和初步分析。采

用 SPSS 19.0 统计软件进行统计学分析, 实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。显著性检验采用配对 t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 (S)-OTS · HCl 与 M₂ 受体结合并抑制豚鼠心律

每隔 10 min 从豚鼠颈外静脉注射 (S)-OTS · HCl, 使药物负荷剂量分别达到 5、10、20、30、40 和 50 $\mu\text{g/kg}$ 。结果显示, 在 40 $\mu\text{g/kg}$ 药物负荷剂量下, 豚鼠心率从 295/min 减少到 128/min, 下降了 56.6%。与此相对应, 豚鼠心电图的 RR 间期从 ($0.203\ 5\pm0.004\ 8$) s 延长到 ($0.468\ 2\pm0.019\ 7$) s。同样, QTc 也相应延长, 但是大剂量 (S)-OTS · HCl 使 QTc 显著缩短。(S)-OTS · HCl 也显著影响 PR 间期, 使 PR 间期从 ($0.052\ 7\pm0.001\ 2$) s 延长到 ($0.067\ 3\pm0.008\ 1$) s (表 1)。图 2A 显示了不同浓度 (S)-OTS · HCl 作用下, 动物心电图的变化。

表 1 (S)-OTS · HCl 影响豚鼠在体心电图 ($n=5$)
Tab 1 Effect of (S)-OTS·HCl on ECGs of guinea pigs *in vivo* ($n=5$)

(S)-OTS · HCl 负荷剂量 / ($\mu\text{g/kg}$)	RR 间期 /s	QT 间期 /s	QTc	PR 间期 /s
给药前	$0.203\ 5\pm0.004\ 8$	$0.108\ 3\pm0.003\ 6$	$0.217\ 9\pm0.004\ 8$	$0.052\ 7\pm0.001\ 2$
5	$0.223\ 9\pm0.008\ 2$	$0.118\ 7\pm0.008\ 6$	$0.215\ 1\pm0.003\ 2$	$0.054\ 0\pm0.006\ 5$
10	$0.268\ 7\pm0.013\ 9^{\text{①}}$	$0.129\ 4\pm0.009\ 1^{\text{②}}$	$0.216\ 7\pm0.007\ 0$	$0.053\ 8\pm0.004\ 8$
20	$0.354\ 2\pm0.018\ 2^{\text{③}}$	$0.142\ 7\pm0.017\ 8^{\text{④}}$	$0.186\ 8\pm0.004\ 0^{\text{⑤}}$	$0.057\ 0\pm0.008\ 3$
30	$0.412\ 3\pm0.022\ 6^{\text{⑥}}$	$0.144\ 8\pm0.009\ 4^{\text{⑦}}$	$0.207\ 7\pm0.008\ 1^{\text{⑧}}$	$0.058\ 1\pm0.007\ 6$
40	$0.468\ 2\pm0.019\ 7^{\text{⑨}}$	$0.153\ 2\pm0.008\ 1^{\text{⑩}}$	$0.174\ 9\pm0.008\ 3^{\text{⑪}}$	$0.062\ 9\pm0.007\ 9^{\text{⑫}}$
50	$0.468\ 1\pm0.020\ 4^{\text{⑬}}$	$0.154\ 1\pm0.009\ 9^{\text{⑭}}$	$0.175\ 2\pm0.007\ 8^{\text{⑮}}$	$0.067\ 3\pm0.008\ 1^{\text{⑯}}$

注: ^① $P=0.031$, ^② $P=0.044$, ^③ $P=0.007$, ^④ $P=0.039$, ^⑤ $P=0.046$, ^⑥ $P=0.008$, ^⑦ $P=0.040$, ^⑧ $P=0.035$, ^⑨ $P=0.034$, ^⑩ $P=0.047$, ^⑪ $P=0.017$, ^⑫ $P=0.011$, ^⑬ $P=0.035$, ^⑭ $P=0.042$, 与给药前比较。

图 2B 显示了 (S)-OTS · HCl 对豚鼠心电图 RR 间期影响的剂量 - 效应非线性拟合曲线。横坐标为表 1 中不同的 (S)-OTS · HCl 药物负荷剂量, 纵坐标为豚鼠心电图 RR 间期增加的百分比。其百分比用如下的公式进行标准化:

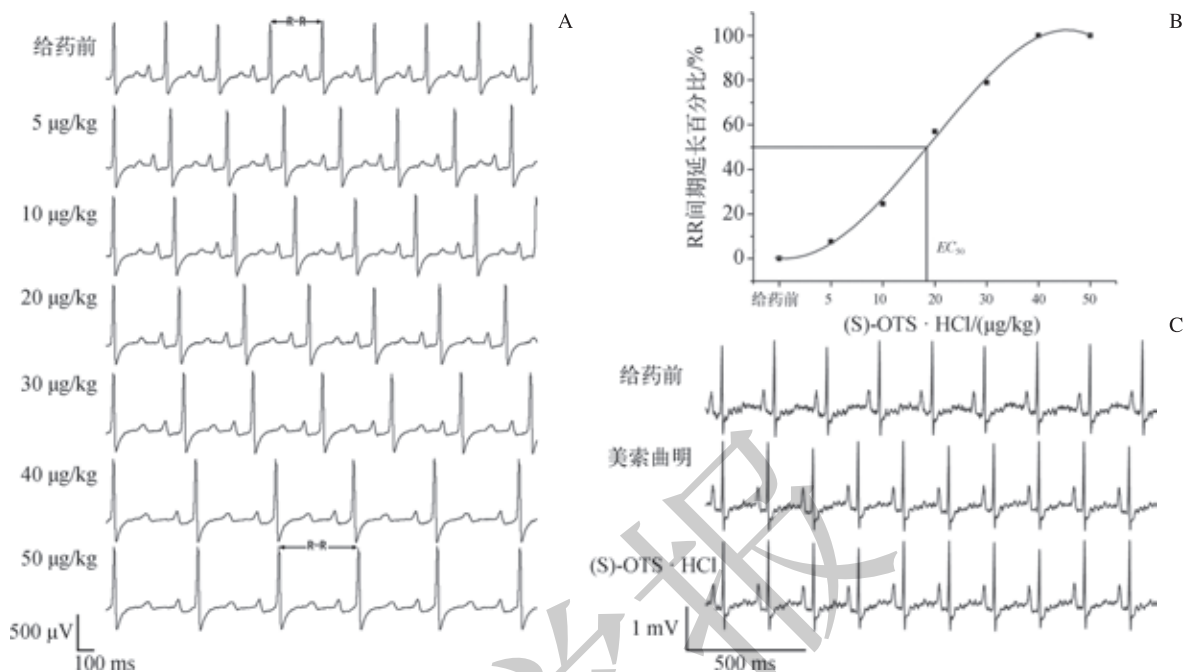
$$\frac{(RR-RR_{\text{对照}})}{(RR_{40\ \mu\text{g/kg}}-RR_{\text{对照}})} \times 100\%$$

由此曲线可得 EC_{50} 约为 18.5 $\mu\text{g/kg}$ 。

如果在注射 (S)-OTS · HCl 前用 M₂ 胆碱能受体拮抗剂美索曲明 (methoctramine, 400 $\mu\text{g/kg}$) 预处理豚鼠, 美索曲明使豚鼠心率从 (271 ± 6) /min 增加到 (318 ± 4) /min ($n=3$, 图 2C), 增加了 17.3%。40 $\mu\text{g/kg}$ (S)-OTS · HCl 无法逆转美索曲明增加心率的效果。

2.2 (S)-OTS · HCl 抑制家兔窦房结生物电活动

在记录家兔自发性动作电位时, 灌流液中加入不同浓度的 (S)-OTS · HCl。观察发现, 1×10^{-7} mol/L (S)-OTS · HCl 可导致窦房结出现严重心律不齐; 1×10^{-6} mol/L (S)-OTS · HCl 灌流, 数分钟即可致窦房结自律活动停止。故实验中仅用低浓度 ($1\times10^{-8}\sim1\times10^{-7}$ mol/L)。(S)-OTS · HCl (1×10^{-7} mol/L) 可有效抑制家兔窦房结的生物电活动, 使 APA、 $V_{\max}$ 、HR 和 SDR 分别下降 10.5%、22.3%、44.0% 和 86.3% (表 2)。图 3A 是其中一例窦房结标本在正常台氏液灌流下的自律性动作电位, 图 3B ~ E 显示了在 1×10^{-8} 、 2.5×10^{-8} 、



注: A. 豚鼠在体心电图, 间隔 10 min, 从豚鼠颈外静脉处注射不同剂量 (S)-OTS·HCl, 可见随负荷剂量的增加, 豚鼠心电图 RR 间期明显延长; B. 剂量-效应曲线, 以 (S)-OTS·HCl 的药物负荷剂量为横坐标, 标准化的 RR 间期变化百分比为纵坐标, 非线性曲线拟合 (S)-OTS·HCl 对 RR 间期的影响; C. 美索曲明的效应, 美索曲明可缩短 RR 间期, 增加心率, 美索曲明预处理可阻断 (S)-OTS·HCl 对心电图的影响。

图 2 (S)-OTS·HCl 延长豚鼠在体心电图 RR 间期
Fig 2 (S)-OTS·HCl prolonged RR intervals of ECGs in guinea pigs

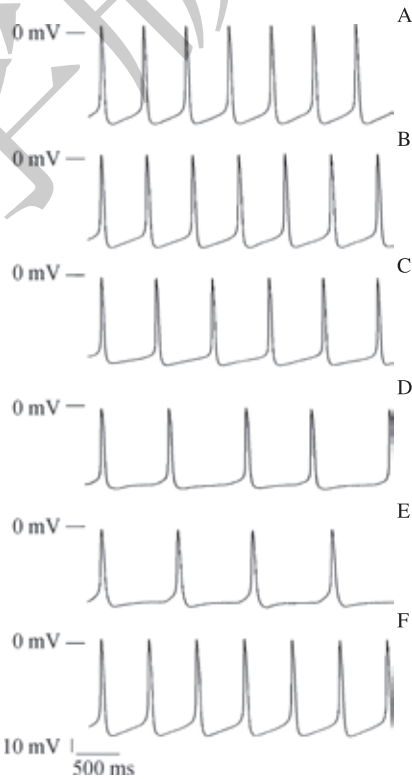
5×10^{-8} 和 1×10^{-7} mol/L (S)-OTS·HCl 作用下, 窦房结 HR、APA 和 SDR 随药物浓度增加而改变的情况。图 3F 显示正常台氏液洗回后自律性动作电位基本恢复。

如果预先用美索曲明 (1×10^{-5} mol/L) 灌流窦房结标本 3 min, 随后改为含美索曲明 (1×10^{-5} mol/L) 和 (S)-OTS·HCl (1×10^{-7} mol/L) 的台氏液, 则 (S)-OTS·HCl 对窦房结生物电活动的影响消失 (结果未显示)。

表 2 (S)-OTS·HCl 对家兔窦房结动作电位的影响 (n=5)
Tab 2 Effect of (S)-OTS·HCl on action potential of rabbit sinus nodes (n=5)

(S)-OTS·HCl 浓度	APA/mV	$V_{max}/(V/s)$	HR/(/min)	SDR/(mV/s)
给药前	74.14±0.26	11.66±0.31	118.34±0.44	57.12±0.33
1×10^{-8} mol/L	71.50±0.41	11.24±0.26	109.80±3.33 ^①	47.52±0.67 ^②
2.5×10^{-8} mol/L	67.41±0.38 ^③	10.16±0.44 ^④	92.74±3.35 ^⑤	21.64±1.44 ^⑥
5×10^{-8} mol/L	66.31±0.49 ^⑦	9.18±0.50 ^⑧	75.36±5.46 ^⑨	10.61±2.51 ^⑩
1×10^{-7} mol/L	66.39±0.58 ^⑪	9.06±0.52 ^⑫	66.26±7.55 ^⑬	7.80±4.67 ^⑭
洗回	72.10±0.33	11.34±0.37	107.28±0.98	55.28±0.41
美索曲明预处理	73.32±0.41	11.59±0.22	119.33±0.59	59.08±0.46

注: ^① P=0.049, ^② P=0.040, ^③ P=0.043, ^④ P=0.047, ^⑤ P=0.034, ^⑥ P=0.007, ^⑦ P=0.044, ^⑧ P=0.039, ^⑨ P=0.008, ^⑩ P=0.003, ^⑪ P=0.038, ^⑫ P=0.009, ^⑬ P=0.006, ^⑭ P=0.002, 与给药前比较。



注: A. 给药前; B~E. 灌流液中分别含有浓度为 1×10^{-8} 、 2.5×10^{-8} 、 5×10^{-8} 和 1×10^{-7} mol/L (S)-OTS·HCl, 随 (S)-OTS·HCl 浓度增大, 窦房结自律性活动显著降低, 并出现节律不齐; F. 洗回, 各项指标基本恢复。

图 3 (S)-OTS·HCl 抑制窦房结自发生物电活动
Fig 3 (S)-OTS·HCl attenuated spontaneous electric activity of rabbit sinus nodes

2.3 (S)-OTS · HCl 延长心室肌动作电位时程

心电图的 QT 间期与动作电位时程 (APD) 呈正相关。为了探讨 (S)-OTS · HCl 缩短 QTc 的机制, 我们记录豚鼠右室乳头肌的动作电位, 分别以含 1×10^{-8} mol/L 至 1×10^{-5} mol/L (S)-OTS · HCl 的台氏液灌流标本, 测量每次给药后 10 min 心室乳头肌动作电位各参数的数值。结果表明, (S)-OTS · HCl 对 RP、APA 和 $V_{\max}$ 无显著影响, 但 1×10^{-5} mol/L (S)-OTS · HCl 可使灌流的心室乳头肌动作电位时程 APD_{50} 和 APD_{90} 分别缩短 8.4% 和 9.1% (表 3)。图 4 为其中 1 例标本在 (S)-OTS · HCl 作用下动作电位的变化。

表 3 (S)-OTS · HCl 对心室肌动作电位的影响 (n=5)
Tab 3 Effect of (S)-OTS·HCl on action potential of ventricular myocytes (n=5)

(S)-OTS · HCl 浓度	RP/mV	APA/mV	$V_{\max}/(V/s)$	APD_{50}/ms	APD_{90}/ms
给药前	89.32 ± 1.75	119.70 ± 1.65	161.62 ± 10.71	120.90 ± 1.16	157.57 ± 4.92
1×10^{-8} mol/L	89.94 ± 1.64	120.41 ± 2.81	164.23 ± 11.41	119.68 ± 3.69	155.93 ± 5.64
1×10^{-7} mol/L	88.99 ± 1.51	119.66 ± 2.77	162.93 ± 8.18	119.40 ± 4.87	155.32 ± 8.94
5×10^{-7} mol/L	90.06 ± 1.84	119.07 ± 2.70	161.43 ± 8.95	115.62 ± 7.80	151.73 ± 6.40
1×10^{-6} mol/L	90.60 ± 2.67	119.70 ± 2.61	163.45 ± 8.86	$114.08 \pm 6.78^{\text{①}}$	$149.57 \pm 8.56^{\text{①}}$
1×10^{-5} mol/L	88.78 ± 4.64	119.64 ± 2.58	162.87 ± 9.15	$110.73 \pm 5.96^{\text{②}}$	$143.17 \pm 6.01^{\text{③}}$
洗回	89.77 ± 2.82	120.06 ± 2.91	163.99 ± 8.04	118.05 ± 9.34	153.35 ± 8.58
美索曲明预处理	89.73 ± 1.19	119.14 ± 1.88	162.40 ± 9.52	121.38 ± 2.17	156.71 ± 6.92

注: ^① $P=0.046$, ^② $P=0.040$, ^③ $P=0.039$, ^④ $P=0.043$, 与给药前比较。

2.4 (S)-OTS · HCl 减弱豚鼠离体心脏的心肌收缩力

离体心脏以正常台氏液灌流, 记录其心肌收缩力, 然后在灌流液中, 加入 (S)-OTS · HCl, 使其浓度从 1×10^{-8} mol/L 逐渐增大到 1×10^{-6} mol/L, 最后再回复到正常台氏液。连续记录心脏的收缩力。因动物个体间的差异, 不同心脏的收缩力大小不一, 为此, 以正常台氏液灌流下心肌收缩力作为对照, 计算不同浓度 (S)-OTS · HCl 对心肌收缩力影响的百分比 (表 4)。结果显示, (S)-OTS · HCl 可剂量依赖性地抑制心脏收缩力, 当 1×10^{-6} mol/L (S)-OTS · HCl 灌流心脏时, 心肌收缩力可下降到 $(51.8 \pm 17.7)\%$, 对心脏的泵血功能产生极大的抑制效应。图 5A 显示的是其中一例心脏在正常台氏液灌流下心肌的收缩力曲线。 1×10^{-8} 、 1×10^{-7} 和 1×10^{-6} mol/L (S)-OTS · HCl 可使心脏收缩力分别下降至 6.9%、12.6% 和 49.7% (图 5B ~ D); 当用正常台氏液灌流洗回时, 心肌收缩力恢复到对照的 93.8% (图 5E)。

当离体心脏用含 1×10^{-5} mol/L 美索曲明的台氏液灌流 5 min 后, 不同浓度 (S)-OTS · HCl 对心肌收缩力的影响消失。

与结果 2.2 相似, 当灌流液中加入 1×10^{-5} mol/L 美索曲明时, 不同浓度的 (S)-OTS · HCl 对右室乳头肌标本生物电活动的影响消失 (结果未显示)。

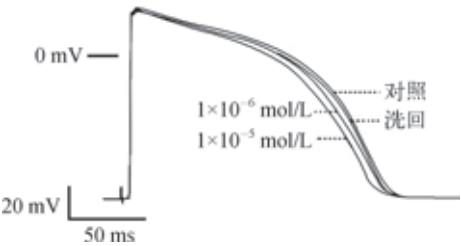
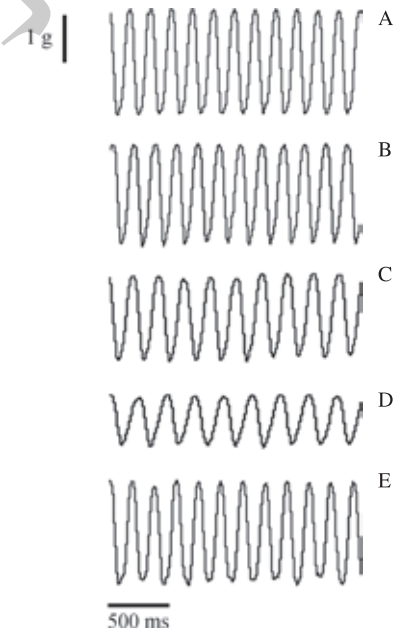


图 4 (S)-OTS · HCl 缩短豚鼠心室肌动作电位时程
Fig 4 (S)-OTS·HCl shortened APD of guinea pig myocytes



注: A. 给药前; B ~ D. 离体心脏灌流液中分别含有 1×10^{-8} 、 1×10^{-7} 和 1×10^{-6} mol/L (S)-OTS · HCl, 可见心脏收缩力及收缩频率显著下降; E. 洗回。

图 5 (S)-OTS · HCl 抑制离体心脏的心肌收缩力
Fig 5 (S)-OTS·HCl attenuated cardiac contraction force in vitro

表 4 (S)-OTS · HCl 减弱心肌收缩力 (n=5)
Tab 4 (S)-OTS · HCl weakened cardiac contraction force (n=5)

(S)-OTS · HCl 浓度	心肌收缩力抑制百分比 /%
1 × 10 ⁻⁸ mol/L	6.2 ± 4.6
5 × 10 ⁻⁸ mol/L	16.1 ± 8.0
1 × 10 ⁻⁷ mol/L	24.8 ± 12.8
5 × 10 ⁻⁷ mol/L	33.7 ± 10.8
1 × 10 ⁻⁶ mol/L	51.8 ± 17.6
洗回	3.4 ± 3.0

注: 抑制百分比由公式 $|F-F_c|/F_c \times 100\%$ 计算, F_c 为正常台氏液灌流时心肌收缩力, F 为不同浓度 (S)-OTS · HCl 作用下心肌收缩力。

表 5 相同剂量 (40 μg/kg) 的 (S)-OTS · HCl 和 ACh 对豚鼠心电图的影响比较 (n=5)
Tab 5 Comparison of effects of the same dose (40 μg/kg) of (S) -OTS · HCl and ACh on electrocardiogram of guinea pigs (n=5)

处理	RR 间期 /s	QT 间期 /s	QTc	PR 间期 /s
给药前 1	0.203 5 ± 0.004 8	0.108 3 ± 0.003 6	0.217 9 ± 0.004 8	0.052 7 ± 0.001 2
(S)-OTS · HCl	0.468 2 ± 0.019 7 ^①	0.153 2 ± 0.008 1 ^②	0.174 9 ± 0.008 3 ^③	0.062 9 ± 0.007 9 ^④
给药前 2	0.208 8 ± 0.007 6	0.133 8 ± 0.005 1	0.294 4 ± 0.006 0	0.053 8 ± 0.003 1
ACh	0.298 1 ± 0.009 2 ^{⑤⑥}	0.168 1 ± 0.007 9 ^⑦	0.300 7 ± 0.009 8 ^⑧	0.063 1 ± 0.006 5 ^⑨

注: ① $P=0.007$, ② $P=0.009$, ③ $P=0.040$, ④ $P=0.044$, 与给药前 1 比较; ⑤ $P=0.047$, ⑥ $P=0.043$, ⑦ $P=0.038$, 与给药前 2 比较; ⑧ $P=0.033$, ⑨ $P=0.037$, 与 (S)-OTS · HCl 处理时比较。

3 讨论

自主神经系统中, 副交感神经系统通过分泌神经递质 ACh, 广泛地作用于各内脏平滑肌和腺体细胞的 M 受体, 调节相应脏器的活动和腺体的分泌。目前分子克隆技术发现了 5 种不同基因编码的 M 受体亚型^[9], 分别是 M₁、M₂、M₃、M₄ 和 M₅。每种 M 受体亚型有其特定的分布, 导致 ACh 和胆碱能受体激动剂在不同的脏器或组织具有特定的生理功能^[10-14]。以心脏为例, ACh 与心脏的 M₂ 受体结合, 通过细胞膜上的 G 蛋白受体导致细胞内 cAMP 含量下降、钙内流减少, I_{K-ACh} 离子流增强以及窦房结的 I_f 电流抑制, 导致心脏产生负性的变时、变力和变传导效应^[15-17], 从而使心率下降、心脏收缩功能减弱以及心内兴奋的传导减慢, 进而导致心输出量减少、血压下降。而且副交感神经的活动, 对缺血心肌具有保护作用^[18]。

从丁公藤分离提炼的包公藤甲素属生物碱类 M 胆碱受体激动剂, 具有拟胆碱能作用。在这种莨菪烷类化合物的基础上, 上海交通大学医学院药学院合成的新制剂 (S)-OTS · HCl 具有强烈的拟胆碱特性, 用于临床缩瞳和青光眼的治疗。眼组织的 M 受体以 M₃ 亚型为主, (S)-OTS · HCl 通过 M₃ 受体介导发挥强烈的缩瞳效应, 但其对心脏 M₂ 受体的作用还不清楚。为此, 我们在整体动

2.5 (S)-OTS · HCl 和乙酰胆碱对豚鼠在体心电图作用的比较

采用相同剂量的 (S)-OTS · HCl 和乙酰胆碱 (acetylcholine, ACh) 分别注射入豚鼠体内, 观察 2 种药物对豚鼠在体心电图的影响, 比较两者的作用差异 (表 5)。40 μg/kg 剂量的 (S)-OTS · HCl 注射入豚鼠体内 10 min 后, 豚鼠心电图的 RR 间期、QT 间期和 PR 间期分别延长了 130%、41.5% 和 19.4%, QTc 则缩短了 19.7%。而同等剂量的 ACh 使豚鼠心电图的 RR 间期、QT 间期、QTc 和 PR 间期分别延长了 42.8%、25.7%、5.2% 和 17.4%。

物、离体心脏、心室肌和窦房结等多方面开展了相应的电生理检测。

在豚鼠整体心电图记录中测量了 RR 间期、PR 间期和 QT 间期 3 组参数。RR 间期可换算为心率, 反映窦房结的自律活动。不同剂量 (S)-OTS · HCl 能剂量依赖性地延长 RR 间期, 使动物的心率下降。但 (S)-OTS · HCl 对美索曲明预处理的动物没有效应。美索曲明是特异性 M₂ 受体拮抗剂。由此可见, (S)-OTS · HCl 对心脏的作用是由 M₂ 受体介导的。

动物的整体心率受窦房结自动节律的控制, 故此我们进一步观察了 (S)-OTS · HCl 对家兔窦房结生物电活动的影响。表 2 显示 (S)-OTS · HCl 能剂量依赖性地降低窦房结细胞 SDR, 1 × 10⁻⁶ mol/L (S)-OTS · HCl 可致窦房结自律性动作电位消失 (结果未显示)。SDR 决定了窦房结的自律性及动物心电图的 RR 间期。SDR 越小, RR 间期越大, 动物的心率越慢。美索曲明可阻断 (S)-OTS · HCl 对 SDR 的影响。故此可以推论 (S)-OTS · HCl 与 M₂ 受体结合, 对动物心脏产生负性的变时效应。

PR 间期代表了兴奋从心房传向心室所需的时间, 房室交界处兴奋的传导速度是影响 PR 间期的主要因素。表 1 数据显示, (S)-OTS · HCl 使 PR 间期从 (0.052 7 ± 0.001 2) s 延长到 (0.067 3 ± 0.008 1) s (给药前 vs 50 μg/kg 组), 增加

了 27.7%, 表明 (S)-OTS · HCl 可降低房室间兴奋的传导速度。美索曲明对动物的预处理效果, 提示 (S)-OTS · HCl 对心脏产生的负性变传导效应亦由 M_2 受体所介导。

在表 1 和图 2A 中, 最显著的变化是心电图的 QT 间期呈剂量依赖性延长。为去除心率变化对 QT 间期的影响, 实验中引入校正 QT 间期 QTc。与 QT 间期延长的现象相反, QTc 显著缩短。QT 间期反映心室兴奋至完全复极所需的时间过程。图 4 及表 3 的统计结果显示, (S)-OTS · HCl 可有效地缩短动作电位时程 APD_{50} 和 APD_{90} 。 APD_{50} 由动作电位平台期所决定, 内向 Ca^{2+} 离子流 (I_{Ca-L}) 的大小是决定平台期长短的主要因素之一。同时在心脏中 I_{Ca-L} 也决定了窦房结动作电位 APA 和 V_{max} 。心室肌和窦房结拥有相同的 L 型 Ca^{2+} 通道。图 3 和表 2 均显示, (S)-OTS · HCl 可有效抑制窦房结的 APA 和 V_{max} 。故此可以推论, (S)-OTS · HCl 能抑制 I_{Ca-L} , 从而缩短心室肌动作电位时程 APD_{50} , 并在心电图上使 QTc 减小。此效应也可被美索曲明阻断。

外向性的 K^+ 离子流对心室肌的复极有重要影响, 其含有多种成分, 如 I_K 、 I_{K-ACh} 等。当 ACh 与 M_2 受体结合后, 可激活 $I_{K-ACh}^{[19]}$ 。(S)-OTS · HCl 是强大的拟胆碱能制剂, 可与心肌 M_2 受体特异性地结合, 从而激活 I_{K-ACh} , 使心室肌复极加速, APD_{50} 和 APD_{90} 缩短。(S)-OTS · HCl 激

活 I_{K-ACh} 亦能增大窦房结最大复极电位, 使 SDR 下降, 导致心率显著降低。

在离体心脏实验中, 心肌收缩力受 (S)-OTS · HCl 的作用而减小。 1×10^{-6} mol/L (S)-OTS · HCl 可使心肌收缩力减小到给药前的 51.8%。特异性 M_2 胆碱能受体拮抗剂美索曲明可消除 (S)-OTS · HCl 减弱心肌收缩力的现象。心肌的收缩力依赖于流入心肌细胞内的 Ca^{2+} 流。当 (S)-OTS · HCl 与 M_2 受体结合后, 抑制了动作电位平台期内流入细胞的 Ca^{2+} 流 (I_{Ca-L}), 导致心肌收缩力显著下降。与 ACh 类似, (S)-OTS · HCl 可对动物心脏产生负性变力效应。

以 ACh 作为对照, 在整体动物的心电图上比较相同剂量 (40 μ g/kg) 下 (S)-OTS · HCl 的作用, 发现 (S)-OTS · HCl 对心电图各参数的影响远大于 ACh, 且 2 种药物的效应有显著性差异。表明 (S)-OTS · HCl 对心脏的抑制效应比 ACh 强, 是一种作用强大的拟胆碱能药物。

综上所述, (S)-OTS · HCl 是一个作用强大的拟胆碱能药物, 对心脏具有与 ACh 相似的效应, 可通过与心脏 M_2 受体结合, 对心脏产生负性变时、变力和变传导作用。

参 · 考 · 文 · 献

- [1] Bartus RT. On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis[J]. *Exp Neurol*, 2000, 163(2): 495-529.
- [2] Fibiger HC. Cholinergic mechanisms in learning, memory and dementia: a review of recent evidence[J]. *Trends Neurosci*, 1991, 14(6): 220-223.
- [3] 姚天荣, 陈泽乃. 包公藤的化学研究 I: 缩瞳有效成分包公藤甲素的分离与初步研究[J]. *药学报*, 1979, 14(12): 731-735.
- [4] 张景夏, 王秀宜, 张勇, 等. 包公藤甲素对在位大鼠心肌细胞电活动的作用[J]. *上海第二医科大学学报*, 1982(4): 38-39.
- [5] 成柏华, 唐海铭, 李丽, 等. 包甲素对大鼠心缩功能及 K^+ 、 H^+ 、 pO_2 的影响[J]. *上海第二医科大学学报*, 1986(4): 130-132.
- [6] 喻轶群, 杨丽敏, 谢一凡, 等. 缩瞳新药 (S)-OTS · HCl 的制备工艺研究[J]. *上海交通大学学报 (医学版)*, 2009, 29(4): 412-415.
- [7] Niu YY, Zhu L, Cui YY, et al. The absolute configuration plays an important role in muscarinic activity of BGT-A and its analogs[J]. *Bioorg Med Chem*, 2008, 16(24): 10251-10256.
- [8] National Research Council (US) Committee. The guide for care and use of laboratory animals[M]. 8th ed. Washington (DC): National Academies Press (US), 2011.
- [9] Caulfield MP, Birdsall NJ. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors[J]. *Pharmacol Rev*, 1998, 50(2): 279-290.
- [10] Brodde OE, Michel MC. Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart[J]. *Pharmacol Rev*, 1999, 51(4): 651-690.
- [11] Stengel PW, Gomez J, Wess J, et al. M_2 and M_4 receptor knockout mice: muscarinic receptor function in cardiac and smooth muscle *in vitro*[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2000, 292(3): 877-885.
- [12] Wang H, Han H, Zhang L, et al. Expression of multiple subtypes of muscarinic receptors and cellular distribution in the human heart[J]. *Mol Pharmacol*, 2001, 59(5): 1029-1036.
- [13] Krejčí A, Tucek S. Quantitation of mRNAs for M_1 to M_5 subtypes of muscarinic receptors in rat heart and brain cortex[J]. *Mol Pharmacol*, 2002, 61(6): 1267-1272.
- [14] Dhein S, van Koppen CJ, Brodde OE. Muscarinic receptors in the mammalian heart[J]. *Pharmacol Res*, 2001, 44(3): 161-182.
- [15] Nagata K, Ye C, Jain M, et al. $G\alpha(i2)$ but not $G\alpha(i3)$ is required for muscarinic inhibition of contractility and calcium currents in adult cardiomyocytes[J]. *Circ Res*, 2000, 87(10): 903-909.
- [16] Brown HF, Denyer JC. Low-dose acetylcholine reduces calcium current in isolated sino-atrial node cells of rabbit[J]. *J Physiol*, 1989, 410: 65P.
- [17] DiFrancesco D, Tromba C. Muscarinic control of the hyperpolarization-activated current (if) in rabbit sino-atrial node myocytes[J]. *J Physiol*, 1988, 405: 493-510.
- [18] 臧伟进, 孙蕾, 于晓江, 等. 迷走神经功能调节与心肌缺血保护[J]. *生理学报*, 2008, 60(4): 443-452.
- [19] Hibino H, Inanobe A, Furutani K, et al. Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles[J]. *Physiol Rev*, 2010, 90(1): 291-366.

[收稿日期] 2016-10-14

[本文编辑] 邵碧云

