

关附甲素对离体豚鼠窦房结自发频率的作用

王逸平、陈维洲 (中国科学院上海药物研究所, 上海 200031, 中国)

顾培望 (上海第二医科大学药理教研室, 上海 200025, 中国)

Effects of guan-fu base A on spontaneous rate of isolated sinoatrial node of guinea pig

WANG Yi-Ping, CHEN Wei-Zhou (*Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China*)

GU Pei-Kun (*Department of Pharmacology, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025, China*)

ABSTRACT Guan-fu base A (GFA) is a new alkaloid isolated from the tuber of *Aconitum coreanum* in our institute⁽²⁾. Its effects on spontaneous electrical discharge rate of intact sinoatrial node preparations were investigated. Unipolar Ag-AgCl₂ electrodes and DC-amplification were used to record unipolar electrograms from the endocardial surface of the isolated right guinea pig atria. GFA (4.29-214.5 μg/ml) decreased the spontaneous electrical discharge rate of sinoatrial node in a dose-dependent manner. The most effective concentration (214.5 μg/ml) of GFA resulted in sinus rate of 115 ± 8 bpm (n = 7, control rate 208 ± 13 bpm) within 30 min. Low external Ca²⁺ (0.18 mmol/L) enhanced the rate in lowering effect of GFA, in contrast with high external K⁺ (10.8 mmol/L) diminishing the effect of GFA.

The ratios of IC₅₀ of negative inotropic effects over IC₅₀ of negative chronotropic effects were 9.38 for GFA and 1.73 for verapamil. GFA antagonized the positive chronotropic effect of isoproterenol but did not antagonize the positive inotropic effect of isoproterenol. The consequence of lowering sinus rate by GFA was not interfered by propranolol (0.15 μg/ml) or atropine (0.05 μg/ml).

These results suggest that the bradycardia by GFA is a direct effect on sinoatrial node, but not due to the calcium channel block or beta adrenoceptor block.

KEY WORDS guan-fu base A; verapamil; propranolol; isoproterenol; atropine; bradycardia; sinoatrial node; aconite

摘要 记录豚鼠窦房结电图观察关附甲素(GFA)对窦房结自发频率的作用。GFA(4.29-214.5 μg/ml)依剂量性减慢窦性频率。低Ca²⁺增强GFA的负性频率,高K⁺则减弱。GFA抑制肌力和频率的IC₅₀之比为9.38。GFA只对抗Iso的正性频率而不对抗正性肌力。Pro和Atr不能对抗GFA的减慢心率。提示GFA是直接作用于窦房结而减慢心率。

关键词 关附甲素; 维拉帕米; 普萘洛尔; 异丙肾上腺素; 阿托品; 心动过缓; 窦房结; 乌头

降低心肌耗氧是治疗缺血性心脏病的首要途径⁽¹⁾。β受体阻断剂和钙拮抗剂通过减慢心率而发挥疗效。但两者均抑制心肌收缩力。这对心脏代偿功能不全的病人不利。关附甲素(guan-fu base A, GFA)是从关白附子中提取的一种生物碱。它具有对抗动物模型的心律失常作用及减慢心率作用⁽²⁾。为探讨GFA减慢心率的作用机理,本文观察了GFA对离体豚鼠窦房结自发频率及对左心房肌收缩力的作用。并与维拉帕米、普萘洛尔及阿托品进行了比较研究。

MATERIALS AND METHODS

药品 GFA由本所植化室提供。维拉帕米(verapamil, Ver)由天津药物研究院赠送;普萘洛尔(propranolol, Pro)是上海第二制药厂的产品;异丙肾上腺素(isoproterenol, Iso)粉剂是上海第十七制药厂的产品;临用时配制;阿托品(atropine, Atr)为上海天丰药厂的产品。

离体窦房结标本的制备和记录表面电图 豚鼠68只,体重361 ± SD 36 g。♀♂兼用。击头致昏,取出心脏置于95%O₂+5%CO₂饱和的冷台氏液中,洗去血液,剪下含有完整窦房结的右心房。标本槽及记录方法见文献⁽³⁾。

Received 1989 Dec 8

Accepted 1990 Jul 28

将窦房结标本放入槽内，心内膜面向上固定在硅橡胶上。槽的容积为 4 ml，用 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ ，pH 7.4，95% O_2 +5% CO_2 饱和的台氏液⁽⁶⁾灌流，流速为 8 ml/min。记录窦房结表面电图，用直径为 0.5 mm 的 Ag-AgCl₂ 电极作为引导细胞外电位活动的记录电极，将电极置于距离窦房结表面 0.25-0.5 mm 近上腔静脉与心房组织交界处靠上腔静脉侧，找到优势起搏点细胞的电活动。无关电极置于标本槽的边缘。由记录电极引出的窦房结表面电活动通过前置放大器放大，一路输至示波器显示，另一路输至 JL-3 道生理记录仪记录，前置放大器高频滤波用 0.1 kHz，时间常数 1s，放大 1000 倍。记录到的窦房结表面电图与文献⁽³⁾相似。标本稳定 30 min 后开始实验。

离体豚鼠左心房的收缩 如上所述，取出豚鼠左心房，其一端固定在刺激电极上，用蛙心夹夹住另一端，用丝线与力位移换能器相连接，负荷为 1 g，将信号输至台式平衡记录仪 (XWT-200) 记录收缩曲线。刺激强度为阈值的两倍，频率为 1 Hz，波宽为 5 ms。标本稳定 30 min 后开始实验。

数据处理 实验数据用组间及配对 *t* 检验检测显著性。

RESULTS

GFA, Ver 和 Pro 对窦房结自发频率的作用 Fig 1 显示，GFA 依窦房结的自发频率剂量性降低，它的起效浓度为 $4.29 \mu\text{g/ml}$ ，每个剂量均灌流 10 min，累积剂量达到 $214.5 \mu\text{g/ml}$ ($500 \mu\text{mol/L}$) 时，窦性频率由对照值 $208 \pm 13 \text{ bpm}$ 降为 $115 \pm 8 \text{ bpm}$ ($P < 0.01$, $n = 7$)，减慢 $44.8 \pm 2.3\%$ 。换成正常台氏液灌流 1 h 后，窦性频率回复至 $188 \pm 5 \text{ bpm}$ ($n = 5$)。Ver $0.05-0.7 \mu\text{g/ml}$ 灌流窦房结，窦性频率明显减慢，当浓度大于 $0.3 \mu\text{g/ml}$ 时，5 个窦房结标本中有 1 个发生窦性静止，其余的窦房结自发频率进一步减慢，

再增加浓度至 $0.7 \mu\text{g/ml}$ ，5 个标本中的 4 个发生窦性静止。Pro 对离体窦房结的自发频率影响较小，累积剂量至 $5 \mu\text{g/ml}$ ，窦性频率由对照值 $219 \pm 11 \text{ bpm}$ 减慢为 $184 \pm 13 \text{ bpm}$ ($n = 5$)。

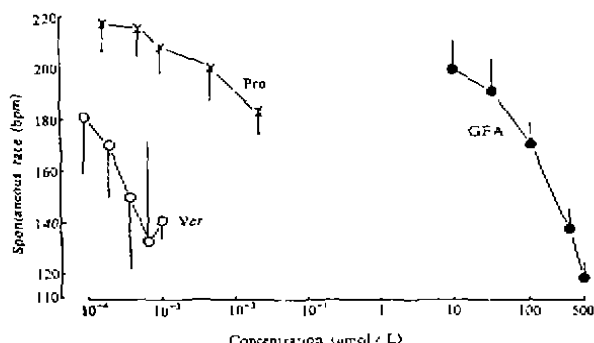


Fig 1. Effects of guan-fu base A, verapamil and propranolol on spontaneous electrical activity in guinea pig sinoatrial node. $n = 5$ except GFA ($n = 7$), $\bar{x} \pm \text{SD}$.

细胞外低 Ca^{2+} 溶液对 GFA 减慢窦性频率的影响 当台氏液中 Ca^{2+} 的浓度由 1.8 降低为 0.18 mmol/L 时，灌流 1 h，观察到低 Ca^{2+} 台氏液的窦性频率较正常台氏液的窦性频率略有下降。而加入 GFA，累积浓度达 $214.5 \mu\text{g/ml}$ 时，在 7 个标本中有 6 个发生窦性静止。结果表明 GFA 的负性频率作用可为低 Ca^{2+} 溶液所增强 (Tab 1)。

Tab 1. Effects of GFA $214.5 \mu\text{g/ml}$ on spontaneous electrical activity in the guinea pig sinoatrial node superfused with Tyrode solution. $n = 7$, $\bar{x} \pm \text{SD}$. * $P > 0.05$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$.

Tyrode solution	CaCl_2 (mmol/L)	KCl	Control (bpm)	GFA (bpm)
Normal	1.8	5.4	208 ± 13	$115 \pm 8^{***}$
High K^+	1.8	10.8	186 ± 24	$141 \pm 15^{***}$
Low Ca^{2+}	0.18	5.4	177 ± 11	87^*

*: $n = 6$, standstill in 7 preparations.

细胞外高 K^+ 溶液引起去极化对 GFA 减慢窦性频率的作用 用高 K^+ (10.4 mmol/L) 台氏液灌流标本 1 h，正常窦性频率由 208 ± 14

bpm 降为 186 ± 24 bpm. 再加入 GFA, GFA 减慢窦性频率的作用明显减弱(Tab 1).

GFA 和 Ver 抑制心房肌收缩力作用的比较 GFA 与 Ver 均可减慢窦性频率, 但是 Ver 对心肌收缩力的抑制作用较 GFA 大. 抑制心房肌收缩力 30% (IC_{30})和减慢心率 30% (IC_{30})之比, GFA 为 9.4, 而 Ver 为 1.7. 表明 GFA 和 Ver 在相同抑制心率 (IC_{30})时, Ver 对抑制心房肌收缩力作用要比 GFA 强约 6 倍

GFA 对 Iso 引起正性频率及正性肌力的作用 为观察 GFA 减慢心率是否通过阻滞窦房结细胞 β 受体, 将 GFA 与 Pro 进行比较, 观察它们对 Iso 引起的正性频率及正性肌力作用的影响. 预先分别用 GFA 42.9 和 214.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 及 Pro 0.15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 灌流不同的窦房结标本 30 min, 然后加入 Iso 引起正性频率作用, 结果 Pro 和 GFA 均有对抗 Iso 的正性频率作用. 而在 Iso 引起的左心房正性肌力作用

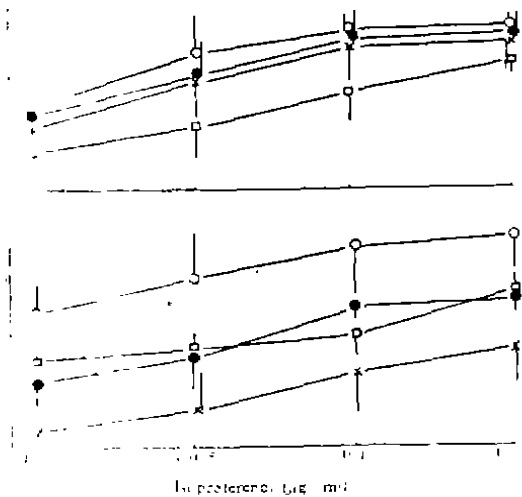


Fig 2. Effects of GFA, Pro on the positive inotropic action of isoproterenol (Iso) in electrical driven left atria of guinea pig (A), and on the positive chronotropic action of Iso in spontaneous electrical activity in guinea pig sinoatrial node (B). $n=5$, $\bar{x} \pm \text{SD}$. (O) Iso, (●) Iso + Pro 0.15 $\mu\text{g}/\text{ml}$, (x) Iso + GFA 42.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$, (□) Iso + GFA 214.5 $\mu\text{mg}/\text{ml}$.

试验中, Pro 完全阻断 Iso 的正性肌力作用, 而 GFA 则无对抗作用. 另一实验预先用 Pro 0.15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 灌流标本 30 min, 然后加入 GFA 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (IC_{30}). 窦性频率减慢 $30 \pm 4\%$, 与不加 Pro 的对照值比较 $P > 0.05$ ($n=5$). 结果表明 Pro 不对抗 GFA 减慢窦性频率的作用. 提示 GFA 减慢窦房结自发频率与 Pro 有所不同, GFA 不是通过阻滞 β 受体 (Fig 2).

Atr 对 GFA 减慢窦性频率的影响 为观察 GFA 减慢窦性频率是否通过 M 胆碱能受体, 预先用 Atr 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 灌流标本 30 min, 然后加入 GFA. GFA 减慢窦性频率的作用与对照基本一致 (Fig 3).

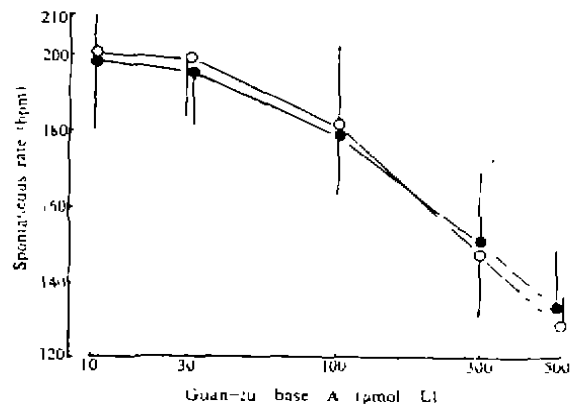


Fig 3. Effects of atropine (Atr) on negative chronotropic action of GFA in spontaneous electrical activity in guinea pig sinoatrial node. $n=5$, $\bar{x} \pm \text{SD}$. (O) GFA, (●) GFA+Atr 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

DISCUSSION

本文采用描记离体豚鼠窦房结电图⁽³⁾, 直接记录到窦房结优势起搏细胞的自发节律, 可避免窦房结传导阻滞或心肌收缩性改变所造成的窦性频率的测量误差. Ver 减慢心率是通过抑制细胞外 Ca^{2+} 内流, 使窦房结慢反应细胞 4 相除极受抑⁽⁴⁾. 本文观察到低浓度 Ver 减慢窦性频率, 而高浓度时, 则引起窦性静止. 同样, GFA 对窦性频率也有抑制作用, 并随剂

量的增加而增强。GFA 减慢窦性频率的作用是否与钙拮抗有关呢?在降低细胞外 Ca^{2+} 浓度时,观察到离体豚鼠窦房结的自发频率减慢,与文献⁽⁵⁾的结果相似。在细胞外低 Ca^{2+} 情况下, GFA 减慢窦性频率的效应被增强,而 Ver 的作用被减弱⁽⁶⁾, 两者有明显差别。增加细胞外 K^+ 浓度,可使细胞膜去极化,促进慢内向离子流的阻断⁽⁷⁾。GFA 在高 K^+ 条件下减慢窦性频率的作用被减弱,而 Ver 被加强⁽⁸⁾。以上实验结果均不支持 GFA 减慢窦性频率的作用与钙拮抗剂的作用机理相同。

Iso 的正性频率及正性肌力效应是通过兴奋 β_1 肾上腺素受体引起的⁽⁹⁾, 可为 Pro 所阻断。而 GFA 只拮抗 Iso 的正性频率作用,不拮抗 Iso 的正性肌力作用。同时, Pro 也不能阻断 GFA 的减慢窦性频率作用。所以,我们认为 GFA 减慢窦性频率作用与 β 肾上腺素受体无关。

Noble 和钱永佑提出的起搏点电流(I_p)概念⁽¹⁰⁾, 通过很多实验证实 I_p 与心率的增加或减慢有关^(11,12)。GFA 减慢窦性频率的机理是否作用于 I_p , 也有待于证实。

综上所述表明: GFA 的负性频率作用不是通过 β 肾上腺素受体及 M 胆碱受体,并不同于钙拮抗剂 Ver。GFA 是一直接作用于窦房结而减慢心率的药物(specific bradycardic agents)^(13,14)。GFA 的优点在于它的负性频率作用较负性肌力作用强约 9 倍,而 Ver 只有 1.7 倍,又 GFA 不引起窦性静止,所以临床上应用 GFA 较钙拮抗剂 Ver 来得安全。

REFERENCES

1 Shanks RG. The discovery of beta adrenoceptor blocking drugs. In: Parnham MJ, Bruinvels J, eds *Discoveries in pharmacology*: vol 2. Amsterdam: Elsevier, 1984: 37-72.
2 Chen WZ, Dong YL, Zhang YF, Ding GS. Anti-arrhythmic effects of guan-fu base A. *Acta*

Pharmacol Sin 1983; 4: 247
3 Cramer M, Siegal M, Bigger JT Jr, Hoffman BF. Characteristics of extracellular potentials recorded from the sinoatrial pacemaker of the rabbit. *Circ Res* 1977; 41: 292
4 Lucchesi BR, Gibson JK, Patterson E. Pharmacology of antiarrhythmic drugs. In: Craig CR, Stitzel RE, eds. *Modern pharmacology*. 1st ed. Boston: Little, Brown & Co, 1982: 217-68
5 Op't Hof T, Mackaay AJC, Blecker WK, Houtkooper JM, Abels R, Bouman LN. Dependence of the chronotropic effects of calcium, magnesium and sodium on temperature and cycle length in isolated rabbit atria. *J Pharmacol Exp Ther* 1980; 212: 183
6 Lillie C, Kobinger W. Comparison of the bradycardic effects of alinidine (St 567), AQ-A 39 and verapamil on guinea-pig sinoatrial node superfused with different Ca^{2+} and NaCl solutions. *Eur J Pharmacol* 1983; 87: 25
7 Toda N, West TC. Interactions of K, Na and vagal stimulation in the S-A node of the rabbit. *Am J Physiol* 1967; 212: 416
8 Lillie C, Kobinger W. Decrease in bradycardic effect of AQ-A 39 and alinidine in guinea-pig sinoatrial node depolarized by high external K^+ -concentration. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1984; 328: 210
9 Kunos G. Adrenoceptor. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1978; 18: 291
10 Noble D, Tsien RW. The kinetics and rectifier properties of the slow potassium current in cardiac Purkinje fibers. *J Physiol(Lond)* 1968; 195: 185
11 DiFrancesco D. Characterization of single pacemaker channels in cardiac sino-atrial node cells. *Nature* 1986; 324: 470
12 DiFrancesco D, Tromba C. Acetylcholine inhibits activation of the cardiac hyperpolarizing-activated current, i_p . *Pflügers Arch* 1987; 410: 139
13 Kobinger W, Lillie C, Pichler L. Cardiovascular actions of N-allyl-clonidine (ST 567), a substance with specific bradycardic action. *Eur J Pharmacol* 1979; 58: 141
14 Kobinger W, Lillie C. AQ-A 39 (5,6-dimethoxy-2-[3[[α -(3,4-dimethoxy)-phenyl-ethyl]methylamino]propyl]phtalimidine), a specific bradycardic agent: with direct action on the heart. *Ibid* 1981; 72: 153