

O-(4-乙氧基丁基)小檗胺对离体蛙心的影响

郑广华¹, 陈钟伦¹, 蒋家华²

(广东药学院生理教研室, 广州 510224; ²暨南大学医学院药理教研室, 广州 510632, 中国)

Effects of O-(4-ethoxyl-butyl)-berbamine on isolated frog hearts

ZHENG Guang-Hua¹, CHEN Zhong-Lun, JIANG Jia-Hua²

(Department of Physiology, Guang-dong College of Pharmacy, Guangzhou 510224;

²Department of Pharmacology, Medical College, Ji-nan University, Guangzhou 510632, China)

KEY WORDS berbamine; cimetidine; prazosin; ouabain; verapamil; isoproterenol; caffeine; calcium chloride; Bay-K-8644; myocardial contraction

AIM: To study the effects of O-(4-ethoxyl-butyl)-berbamine (EBB) on isolated frog heart.

METHODS: The isolated frog hearts were prepared with Straub's method; heart contractions were recorded using LMS-2A recorder by tonotransducer. **RESULTS:** EBB 1-100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ caused concentration-dependent increase in systolic and diastolic activities, but did not alter the heart rate. EBB 250-500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ slowed the heart beats and caused ventricular asystole. Cimetidine 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ or prazosin 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ did not inhibit the positive inotropic action of EBB. Whereas verapamil 0.01 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ antagonized the positive inotropic action of EBB. EBB enhanced positive inotropic action of CaCl_2 . The action of EBB was slower but longer than caffeine or isoproterenol. At room temperature (21.0 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$, however, the onset of ouabain was slower, but the duration of its peak action was longer, than EBB. **CONCLUSION:** The positive inotropic action of EBB was, at least partially, via promoting the inward current of $[\text{Ca}^{2+}]_o$, rather than increasing the intracellular Ca^{2+} release.

关键词 小檗胺; 西咪替丁; 哌唑嗪; 哇巴因; 维拉帕米; 异丙肾上腺素; 咖啡因; 氯化钙; Bay-K-8644; 心肌收缩

目的: 探讨 O-(4-乙氧基丁基)小檗胺(EBB)对离体蛙心的影响。 **方法:** 应用 Straub 法制备离体蛙心; 使用 LMS-2A 记录仪经张力换能器描记心脏活动。 **结果:** EBB 1-100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 剂量依赖性增强蛙心收缩与舒张活动, 但不影响心率; EBB 250-500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 则引起心跳减慢, 甚至停搏。 EBB 的正性肌力作用不受西咪替丁 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和哌唑嗪 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 影响; 但可被维拉帕米 0.01 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 所拮抗。 EBB 能增强 CaCl_2 的正性肌力作用。 与咖啡因和异丙肾上腺素比较, EBB 起效较慢, 作用持续时间较长; 但室温为 (21.0 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$ 时, 与哇巴因比较却恰好相反。 **结论:** EBB 的正性肌力作用至少部分是通过促进外 Ca^{2+} 内流而非促进内 Ca^{2+} 释放所致。

O-(4-乙氧基丁基)小檗胺 [O-(4-ethoxyl butyl)-berbamine, EBB] 是从植物粉防己 (*Stephania tetrandra*) 根中提取的粉防己碱 (tetrandrine) 的一种衍生物 (属 bisbenzylisoquinoline)。 它有拮抗钙调素依赖性膜 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶和磷酸二酯酶的活性, 其 IC_{50} 分别为 0.35 和 2.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 是目前发现的最强的钙调素拮抗剂之一^[1,2]。 但未见 EBB 对心脏作用及其机制的研究报道 (1986-1997)。 本文在探讨 EBB 对离体蛙心的作用的基础上研究了几种药物对 EBB 作用的影响, 旨在探讨 EBB 对心脏活动的作用机制。

MATERIALS AND METHODS

EBB (南开大学分子生物学研究所纯化), 黄色粉末, 碱性, $M_r = 709$; 其化学纯度用薄层色谱检验; 质谱 $m/e = 709$ (M^+), $m/e = 101$ ($[\text{C}_4\text{H}_9\text{OC}_2\text{H}_5]^+$); 西咪替丁 (cimetidine, Cim, Sigma); 哌唑嗪 (prazosin, Pra, Sigma); 维拉帕米 (verapamil, Ver, Knoll); Bay-K-8644 由美国 Mices Laboratories 赠送; 咖啡因 (caffeine, Caf, Wako Pure

¹ Correspondence to Prof ZHENG Guang-Hua.

Phn 86-20-8442-9040. Fax 86-20-8444-9735.

Received 1997-05-08

Accepted 1998-07-13

Chemical Industries); 哇巴因(ouabain, Oua, Sigma); 异丙肾上腺素(isoproterenol, Iso, Sigma).

青蛙 (*Rana nigronaculata*) (45 ± 5) g, ♀♂ 兼用. 用 Straub 法制备离体蛙心. 营养液成份 (mmol · L⁻¹): NaCl 112, KCl 1.88, CaCl₂ 1.08, NaH₂PO₄ 0.06, NaHCO₃ 3.57, glucose 10.58, pH 7.2. 插管内为 2 mL 营养液. 蛙心的收缩活动经张力换能器导入 LMS-2A 二道生理记录仪(成都仪器厂)记录. 实验前 20 min 调节连线的松紧度, 使蛙心收缩力处于最佳状态. 每 5 min 滴数滴营养液于蛙心表面. 实验温度为(21.0 ± 0.5) °C (10-12 月内完成).

药物浓度以插管内终浓度表示, 加入的药物总容量不超过插管内液总容量的 10%. EBB 先用 15 μL HCl 12 mol · L⁻¹ 溶解, 然后加双蒸水配成 10 mmol · L⁻¹, pH 5.0; Pra 用 10% glucose 溶液溶解; Ver, Cim, Oua, Caf 及 Iso 则用双蒸水稀释或溶解.

心肌张力用 g 表示(1 g/5 mm); 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 自身对照的实验数据用前后配对 *t* 检验; 不同浓度间实验结果比较用单因素 ANOVA; 不同组间比较用组间 *t* 检验.

RESULTS

EBB 的正性肌力作用 EBB 以 1 μmol · L⁻¹ 开始, 按 5 倍的给药浓度递增, 加药 3 min 后, 收缩幅度若无变化, 则加入更高一级剂量的 EBB 或在前一级剂量产生的正性肌力作用稳定之后 4 min, 再加入高一级剂量的 EBB. EBB 剂量依赖性地增大蛙心收缩和舒张幅度, EBB 加入后约 21-150 s 起效, 其起效快慢与使用剂量无明显依赖关系, 起效浓度为 1-2 μmol · L⁻¹. 随加入的 EBB 剂量增大(2, 10, 50 μmol · L⁻¹), 其正性肌力作用的强度也随之增大(Fig 1, Tab 1).

本实验条件下未见心跳频率变化(Fig 1, 2).

当 EBB 浓度为 250-500 μmol · L⁻¹ 时蛙心跳明显受抑, 甚至停搏. EBB 10 μmol · L⁻¹ 的起效时间、作用高峰时间及其维持时间分别为(40 ± 8)、(234 ± 32)、(81 ± 11) s. EBB 一旦起效便较快达到作用高峰, 当室温为 28.0 °C 时对 EBB 起效时间影响不大, 最快仍可达到 21 s, 各个蛙心差异较大. 用 15 μL HCl 12 mol · L⁻¹ 配制的 pH 为 5 的等容量双蒸水做对照实验, 未见收缩幅度变化.

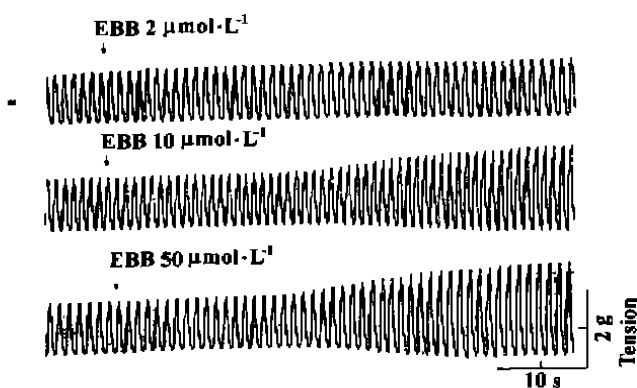


Fig 1. Effects of EBB on isolated frog hearts at (21.0 ± 0.5) °C.

Tab 1. Effects of EBB on amplitude of systole and diastole of isolated frog hearts at (21.0 ± 0.5) °C. n = 11 frogs, $\bar{x} \pm s$, 1 g/5 mm, ^bP < 0.05, ^cP < 0.01 vs before drug.

Ub: Ultimate range of normal ventricular beat.
IC: Increase range of ventricular systole.
ID: Increase range of ventricular diastole.

	EBB/μmol · L ⁻¹		
	2	10	50
Ub(g)	2.6 ± 0.1	2.6 ± 0.1	2.4 ± 0.1
IC(g)	0.14 ± 0.01 ^b	0.76 ± 0.05 ^c	1.8 ± 0.1 ^c
IC/Ub(%)	5.3 ± 1.4 ^c	30 ± 7 ^c	86 ± 28 ^c
ID(g)	0.14 ± 0.02 ^b	0.5 ± 0.1 ^c	1.0 ± 0.1 ^c
ID/Ub(%)	5.8 ± 2.5 ^b	19 ± 4 ^c	46 ± 12 ^c

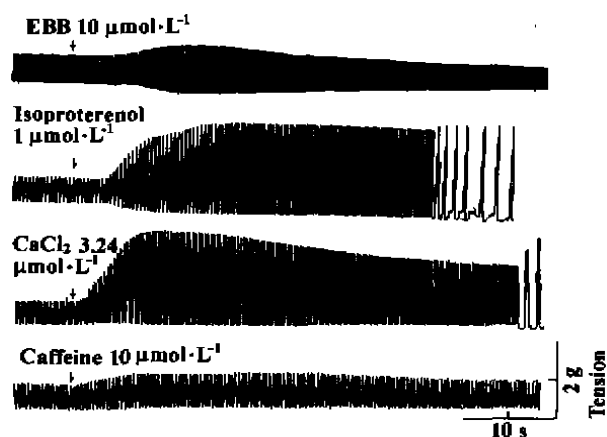


Fig 2. Effects of EBB, isoproterenol, CaCl₂, and caffeine on isolated frog hearts at (28.0 ± 1.5) °C.

Cim、Pra 和 Ver 对 EBB 正性肌力作用的影响 当蛙心收缩幅度稳定之后, 加入 Cim 10 μmol · L⁻¹, 作用 20 min 未见收缩幅度变化. 20 min 末加入 EBB 100 μmol · L⁻¹, 收缩幅度明显增加, 由(2.5 ± 0.4) g 增加到(5.3 ± 0.5) g (n = 7, P < 0.01).

待 EBB 的正性肌力作用趋向稳定时, 再加入 Pra $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 作用 15 min 亦未见收缩幅度明显变化. 然而, 当加入 Ver $0.01 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 收缩幅度迅速减小, 10 min 后收缩幅度降至正常水平以下. 当 Ver 增至 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 蛙心活动完全受抑.

Ca²⁺ 的正性肌力作用及 EBB 对其影响 当蛙心收缩稳定之后加入 CaCl₂, 使插管内液的 Ca²⁺ 浓度从 $1.08 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 增至 $3.24 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 蛙心收缩幅度迅速从 $(2.2 \pm 0.5) \text{ g}$ 增加到 $(4.8 \pm 0.5) \text{ g}$ ($n = 10, P < 0.01$), 但无正性频率作用 (Fig 2).

在此基础上, 加入 EBB $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 结果使蛙心收缩幅度进一步增至 $(6.6 \pm 0.8) \text{ g}$ ($n = 10, P < 0.01$); 为了观察 CaCl₂ 的起效时间, 作用高峰时间和作用维持时间, 实验观察了另外 10 例仅给 CaCl₂ 的标本, 结果表明, CaCl₂ 起效时间比 EBB 早, 而作用维持时间比 EBB 短 (Tab 2, Fig 2).

Iso 的正性肌力作用 Iso $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作用于蛙心引起蛙心收缩增强, 但其起效时间和作用高峰时间均比 EBB 早, 而作用持续时间则比 EBB 短 (Tab 2). 此外, Iso 对某些蛙心产生正性频率作用 (Fig 2), 每分钟心率增加 15 次至 20 次不等, 各个蛙心差异较大.

Caf 的正性肌力作用 Caf $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 引起蛙心正性肌力作用的起效时间和作用高峰时间远快于 EBB, 而作用持续时间较 EBB 短, 而且易产生心率减慢和不规则收缩 (Fig 2, Tab 2).

Oua 的正性肌力作用及 EBB 对其影响 室温

为 $(21.0 \pm 0.5) \text{ }^\circ\text{C}$ 时, Oua $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 引起蛙心肌收缩舒张幅度逐渐增大, 无正性频率作用. 其起效时间和达到高峰时间慢于 EBB, 而作用高峰的持续时间较长 (Tab 2). 室温为 $28.0 \text{ }^\circ\text{C}$ 时, Oua $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的起效时间明显缩短, 与 $21.5 \text{ }^\circ\text{C}$ 时比较, 由 (47 ± 7) 缩短至 $(17 \pm 4) \text{ s}$ ($n = 10, P < 0.01$), 因而达到作用高峰时间也相应缩短, 由 $(353 \pm 83) \text{ s}$ 缩短至 $(201 \pm 26) \text{ s}$ ($n = 10, P < 0.05$).

在另一组实验, 先给予 EBB $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 结果使蛙心收缩幅度从 $(2.4 \pm 0.5) \text{ g}$ 增加到 $(5.3 \pm 0.6) \text{ g}$, 在此基础上加入 Oua $2.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 未见蛙心收缩幅度再明显增大, 但较早出现不规则心律失常.

DISCUSSION

本文证明 EBB 不仅可呈剂量依赖性增强蛙心的收缩舒张活动, 而且能增强 CaCl₂ 的正性肌力作用; 其正性肌力作用不受 α_1 受体阻断剂 Pra 和 H₂ 受体阻断剂 Cim 所影响, 但可被钙通道阻断剂 Ver 所拮抗, 提示 EBB 的正性肌力作用是由于细胞外钙经钙通道内流所致. 当 EBB 浓度增至 $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时出现心收缩减弱, 甚至停搏, 这可能与细胞内钙超载造成心肌损伤有关. 从多种比较实验看到, EBB 正性肌力作用的特点与内钙释放激活剂 Caf 的特点明显不同. EBB 起效时间和到达高峰时间慢, 而作用持续时间很长, 这就排除了 EBB 直接激活肌浆网上钙通道的可能性. EBB 的正性

Tab 2. Effects of EBB, CaCl₂, caffeine, isoproterenol, and ouabain on isolated frog hearts at $(21.0 \pm 0.5) \text{ }^\circ\text{C}$. $n = 10$ frogs, $\bar{x} \pm s$, ^a $P < 0.05$ vs NCF, ^b $P < 0.05$ vs EBB.

	EBB $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	CaCl ₂ $3.24 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	Caffeine $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	Isoproterenol $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Ouabain $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
Normal contractile force (NCF)/g	2.4 ± 0.3	2.4 ± 0.5	2.3 ± 0.4	2.2 ± 0.5	2.6 ± 0.4
Acting time/s	40 ± 8	4.2 ± 1.1^a	3.2 ± 0.4^a	10.0 ± 1.0^a	47 ± 7
Peaked time/s	234 ± 32	26 ± 10^a	10.7 ± 2.1^a	13.8 ± 1.6^a	353 ± 83^a
Maintaining time of peak/s	81 ± 11	30 ± 5^a	24 ± 4^a	18 ± 3^a	129 ± 11^a
Stimulated maximal contractile force/g	3.5 ± 0.4^b	5.1 ± 0.5^b	5.0 ± 0.7^b	4.2 ± 0.5^b	4.1 ± 0.4^b
Effective maintaining time/min	6.5 ± 0.7	3.6 ± 0.5^c	2.1 ± 0.2^c	4.1 ± 1.5^c	11.5 ± 1.5

肌力作用特点与 β 受体兴奋剂 Iso 不同, EBB 起效时间和到达高峰的时间慢, 而作用的维持时间长, 不存在正性频率作用, 表明 EBB 不是 β 受体激动剂. 在本实验条件下, EBB $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 增强蛙心收缩力而未引起中毒现象, 高钙亦未见诱发 EBB 出现中毒. EBB 的正性肌力作用与 Oua 相似, 两者起效时间和作用维持时间都较长; 但室温为 $21.5 \text{ }^\circ\text{C}$ 时, Oua 起效时间和到达高峰时间较慢, 而作用高峰的持续时间较长 (Tab 2); 但室温升高 ($28.0 \text{ }^\circ\text{C}$) 时, Oua 的起效时间明显加快, 而 EBB 则否; 表明 EBB 与 Oua 的作用机制有一定差异; 且 EBB 能加速 Oua 中毒现象的出现, 结果提示 EBB 的正性肌力作用的机制可能不是通过或者主要不是通过抑制钠-钾 ATP 酶, 使心肌细胞内钠增加, 从而促进钠-钙交换而间接增加心肌细胞内钙所致. 至于 EBB 有否抑制钠-钾 ATP 酶作用仍有待于研究. 从以往对 Bay-K-8644 的研究表明^[4], EBB 的正性肌力作用的起效时间和到达高峰时间虽比钙通道激活剂 Bay-K-8644 慢, 但作用维持时间很接近, 且均无正性频率作用^[3]; 而且 EBB 与 Bay K-8644 和 CaCl_2 相似, 一旦起效, 很快便达到作用高峰 (Fig 1, Fig 2). 结果进一步提示, EBB 的正性肌力作用与心肌细胞膜上钙通道激活促进细胞外 Ca^{2+} 内流有关; 但不能排除 EBB

还有其它作用机制.

至于 EBB 的正性肌力作用是否与心肌细胞的磷酸二酯酶被抑制引起 cAMP 增加有关, 则有待进一步证明. 因为 cAMP 增加可同时产生正性肌力和正性频率作用, 而 EBB 并不产生正性频率作用.

本工作表明, EBB 对蛙心的正性肌力作用不受 α_1 受体阻断剂和 H_2 受体阻断剂所影响; 但可被钙通道阻断剂所拮抗; EBB 本身不是 β 激动剂, 其作用机制至少部分是通过外 Ca^{2+} 内流而非促进内 Ca^{2+} 释放所致.

REFERENCES

- Zhang SP, Xu YH. Inhibition of the activities of calmodulin-dependent Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase by bis benzylisoquinolines: structure-activity relationships. *Acta Biochim Biophys Sin* 1988; 20: 13-20.
- Xu YH, Zhang SP. A derivative of bis benzylisoquinoline alkaloid is a new and potential calmodulin antagonist. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; 140: 461-3.
- Jiang JH, Temma K, Akera T. Doxorubicin-induced changes in intracellular Ca^{2+} transients observed in cardiac myocytes isolated from guinea-pig heart. *Can J Physiol Pharmacol* 1994; 72: 622-31.
- Jiang JH, Temma K, Akera T. Dual effects of nicardipine: evidence from intracellular Ca^{2+} transients and twitch contractions observed in single myocyte obtained from rat heart. *Eur J Pharmacol* 1994; 266: 155-63.

《天然产物研究与开发》征稿、征订启事

《天然产物研究与开发》由中国科学院成都分院、中国科学院成都文献情报中心与中国科学院成都地奥制药公司、国家天然药物工程技术中心合办, 国内统一刊号 CNS1-1335/Q, 国际标准连续出版物号 ISSN1001-6880. 学科横跨生物、化学、生物化学和药学. 内容既有基础理论. 又包括应用技术. 本刊从 1989 年创办以来, 已先后被美国化学文摘(CA)、中国生物学文摘、中国药化学文摘、中国化学化工数据库、中国农林数据库等收录. 据《美国化学文摘(CA)资料来源索引》统计,《CA》收录的 14000 多种期刊、专刊、会议录、学位论文中, 1992 年中国科技期刊仅有 45 种入选“CA 千名表”, 本刊居中国期刊第 29 名.

1. 本刊欢迎有关天然产物研究与开发的各方面稿件, 包括植物(重点是天然药物)、动物、微生物、生物高分子等天然产物的资源、鉴定、提取、分析、改性、合成、仿生和利用方面的研究论文、实验报告、综述或报道、开发动向等.

2. 来稿要求内容充实、论据可靠、论点明确、文字精炼, 每篇文章不超过 5000 字. 论文应附中、英文文摘与关键词. 英文要打字.

3. 文中插图应用碳膜描图纸描绘, 描绘一定要用墨汁, 图中文字须打印、植字, 并附上准确的底图, 附表应尽量精简、清晰.

4. 所附参考文献须注明作者、出处、年份和卷期号. 外文部分要求打字.

5. 来稿文责自负, 本刊有权作文字删改, 如不愿删改者请事先申明.

6. 本刊将在接到来稿半年内通知作者是否采用, 未用稿件一律负责退还.

7. 本刊按中国科学院有关文件酌情收取发表费并支付稿酬.

8. 来稿请寄四川省成都市人民南路 4 段 9 号中国科学院成都文献情报中心《天然产物研究与开发》编辑部. 邮政编码: 610041.

9. 本刊通过全国邮局公开发刊, 邮发代号: 62-107, 季刊, 每期 96 页, 每本定价 10.00 元, 全年 40.00 元(含邮费), 欢迎补订. 订费可通过邮局直接汇至本刊编辑部, 或通过银行信汇至中国科学院成都文献情报中心.

开户行: 成都市交行磨支科分处. 帐号: 0149002028.