

## 靶向hERG通道评价羟基吴茱萸次碱的心脏安全性

李相花<sup>1</sup>, 战歌<sup>1</sup>, 李加欣<sup>1</sup>, 任家成<sup>1</sup>, 樊攀<sup>2\*</sup>, 李宝馨<sup>1\*</sup>

(1. 哈尔滨医科大学药学院, 黑龙江 哈尔滨 150081; 2. 哈尔滨医科大学附属第二临床医院, 黑龙江 哈尔滨 150081)

**摘要:** 药物诱发长QT间期综合征 (long QT syndrome, LQTS) 已成为临床上重要的研究课题, 其中获得性长QT间期综合征 (acLQTS) 的发生主要是药物抑制人类 ether- $\alpha$ -go-go 相关基因 (the human ether- $\alpha$ -go-go related gene, hERG) 通道所致。hERG 基因编码快速激活延迟整流钾离子通道 (rapid component of the delayed rectifier potassium current, I<sub>Kr</sub>) 的  $\alpha$  亚基, 其在动作电位3期复极过程中发挥重要作用, 也是大多数抗心律失常药物作用的靶点。本文旨在探讨羟基吴茱萸次碱 (hydroxyrutaecarpine, HRU) 对 hERG 通道的影响, 评估其心脏安全性。利用全细胞膜片钳技术记录 HRU 对 hERG 通道电流及动力学的影响, 并验证与 hERG 通道的结合位点。运用 PCR 技术测定 HRU 对 hERG mRNA 表达水平的影响。利用 Western blot 技术检测 HRU 对 hERG 蛋白和转录因子 Sp1 (specificity protein 1) 表达的影响。采用免疫荧光技术证实 HRU 对 hERG 蛋白和转录因子 Sp1 的定位和表达的影响。研究显示, HRU 瞬时给药后对 hERG 电流具有抑制作用, 降低 hERG 通道的失活电流, 缩小失活时间常数, 作用位点是 S6 片段的两个芳香族氨基酸即第 656 位的苯丙氨酸 F656 和第 652 位的酪氨酸 Y652。HRU 孵育给药能够减少 hERG 蛋白表达量, 并抑制 hERG 电流, 降低 hERG mRNA 的水平, 降低细胞核内转录因子 Sp1 和细胞浆内 hERG 蛋白表达水平。激光扫描共聚焦实验也显示细胞核内转录因子 Sp1 和细胞浆内 hERG 蛋白表达都减少, 说明 HRU 抑制 Sp1 表达是导致 hERG mRNA 表达减少的原因。以上结果表明, HRU 瞬时给药抑制 hERG 电流的作用是通过结合 hERG 通道内 F656 和 Y652 位点, 缩小失活时间常数, 加快通道失活, 从而抑制 hERG 通道功能。此外, HRU 还抑制 hERG 蛋白表达, 主要是通过抑制转录因子 Sp1 的表达, 使 hERG 通道蛋白的转录功能下调, 最终导致 hERG 蛋白减少。

**关键词:** 羟基吴茱萸次碱; hERG 通道; 转录因子 Sp1; 获得性长QT间期综合征; 心律失常

**中图分类号:** R966      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0513-4870(2022)05-1367-08

## Evaluation of cardiac safety of hydroxyrutaecarpine, hERG channel inhibitor

LI Xiang-hua<sup>1</sup>, ZHAN Ge<sup>1</sup>, LI Jia-xin<sup>1</sup>, REN Jia-cheng<sup>1</sup>, FAN Pan<sup>2\*</sup>, LI Bao-xin<sup>1\*</sup>

(1. College of Pharmacy, Harbin Medical University, Harbin 150081, China; 2. The Second Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin 150081, China)

**Abstract:** Drug-induced long QT syndrome (LQTS) has become an important clinical research topic, and the occurrence of acquired long QT syndrome (acLQTS) is mainly caused by drug inhibition of the human ether- $\alpha$ -go-go related gene (hERG) channel. The hERG gene encodes the  $\alpha$  subunit of the fast-activating delayed rectifying potassium ion channel (I<sub>Kr</sub>), which plays an important role in the process of action potential phase 3 repolarization and is also the target of most antiarrhythmic drugs. The purpose of this study was to investigate the effect of hydroxyrutaecarpine (HRU) on the hERG channel and to evaluate its cardiotoxicity. The whole cell patch clamp technique was used to detect the effects of HRU on the current and kinetics of the hERG channel, and to confirm

收稿日期: 2021-11-26; 修回日期: 2021-12-29.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81673636).

\*通讯作者 Tel: 86-451-86605704, E-mail: aprilfanpan@126.com;

Tel: 86-451-86671354, E-mail: libaoxin@ems.hrbmu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-1690

the binding site on the hERG channel. PCR was used to determine the effect of HRU on *hERG* mRNA expression. Western blotting was used to detect the effects of HRU on the expression of hERG protein and transcription factor Sp1. Immunofluorescence was used to confirm the effects of HRU on localization and expression of hERG protein and transcription factor Sp1. Studies have shown that transient HRU can inhibit hERG current and shorten the inactivation time constant. Its binding sites to the hERG channel are F656 and Y652. After incubation for 24 h, HRU can reduce the expression of hERG protein, inhibit the hERG current, reduce the level of *hERG* mRNA, and reduce the expression of transcription factor Sp1 in the nucleus and hERG protein in the cytoplasm. Immunofluorescence experiments also showed the same results suggesting that the inhibition of Sp1 expression by HRU is the cause of the decreased expression of *hERG* mRNA. In conclusion, the acute inhibition of HRU accelerates the channel inactivation process and reduces the inactivation time constant by binding to the F656 and Y652 sites in the hERG channel, thus reducing the hERG current. In addition, HRU also inhibits the expression of hERG protein, mainly by inhibiting the expression of transcription factor Sp1, the transcription function of hERG channel protein is down-regulated, so that the hERG protein is reduced.

**Key words:** hydroxyrutaecarpine; hERG; transcription factor Sp1; acquired long QT syndrome; arrhythmia

长 QT 间期综合征主要分为遗传性 (congenial long QT syndrome, cLQTS) 和获得性 (acquired long QT syndrome, acLQTS) 两大类, 其中 acLQTS 的发生主要由药物抑制人类 ether- $\alpha$ -go-go 相关基因 (the human ether- $\alpha$ -go-go related gene, hERG) 通道所致, 占 acLQTS 发生率的 90%<sup>[1]</sup>。hERG 通道是由 4 个  $\alpha$  亚基组成, 每个  $\alpha$  亚单位包含 1 159 个氨基酸, 6 个 (S1~S6) 跨膜  $\alpha$  螺旋结构域, 其中 S1~S4 构成电压传感结构域 (voltage sensing domain, VSD), S5、S6 以及中间的孔环构成孔道区域<sup>[2,3]</sup>。在 S6 片段内含有两个特异性芳香族氨基酸, 分别是第 656 位苯丙氨酸 (phenylalanine, F)、652 位酪氨酸 (tyrosine, Y), 极易与药物结合<sup>[4,5]</sup>。当 hERG 通道被药物抑制后会诱发 QT 间期延长, 并伴有尖端扭转型室性心动过速 (torsade de pointes, Tdp) 的发生, 严重时可能导致猝死<sup>[6,7]</sup>。目前, 新药研发都需要检测对 hERG 通道的药理作用以评估药物对心脏的不良反应用<sup>[8]</sup>。吴茱萸是一种用途广泛、药理活性多样、临床疗效可靠的名贵中草药, 具有极大的药用价值, 临床上主要用于治疗高血压、心绞痛、胃十二指肠溃疡、子宫出血和月经不调等疾病<sup>[9]</sup>。至今已从吴茱萸中成功分离得到 165 种化学成分, 主要包括生物碱类、萜类和黄酮类等, 其中生物碱类成分含量最高。目前针对吴茱萸药理作用及代谢动力学的研究主要集中在吴茱萸的生物碱类成分上<sup>[10]</sup>。已有文献报道吴茱萸中的去氢吴茱萸碱 (dehydroevodiamine)、荷蒂芸香胺 (hortiamine) 能够抑制 hERG 通道并导致豚鼠 QT 间期延长<sup>[11]</sup>。羟基吴茱萸次碱 (HRU) 的化学结构与之相似, 因此推测 HRU 是否也会抑制 hERG 通道? 也会存在潜在致心律失常风险? 所以, 本文研究目的是探讨 HRU 对 hERG 通道的影响及机制, 评价其临床应用的安全性, 为其安

全用药提供理论依据。

## 材料与方法

**主要药品与试剂** HRU (湖北广奥生物有限公司); 胎牛血清 (FBS, Gibco 公司); 遗传霉素 (G418, Invitrogen 公司); DMEM (Hyclone 公司); Lipofectamine 2000 (Thermo 公司)。

**实验细胞及培养** HEK293 细胞系 (北京协和医学院); 稳定表达 *hERG* 基因的 HEK293 细胞系 (加拿大蒙特利尔心脏研究所馈赠)。细胞采用含 10% FBS 和 400  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  G418 的 DMEM 培养基进行培养。

**RNA 提取及 PCR 检测** 将细胞接种在 6 孔板中, 孵育给药 24 h, 每孔各加入 Trizol 1 mL, 提取的 RNA 保存于 DEPC 水中。使用逆转录试剂盒, 取 1  $\mu\text{g}$  RNA 逆转录合成 cDNA。以 GAPDH 作为内参, 并用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  方法来进行定量分析。

**电生理记录** 准备细胞, 用 PBS 润洗 3 次, 加入胰酶 1 mL, 消化至细胞从瓶壁脱落, 再迅速加入细胞培养液终止消化, 显微镜下观察细胞的消化情况, 吹散成单细胞混悬液。再转移至 15 mL 离心管中, 1 500  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5 min, 弃上层, 向沉淀的细胞中加台式液 2 mL, 使之重新混匀, 将细胞悬液铺至浴槽中, 静置 5 min, 等待细胞贴附于浴槽底部。开启灌流装置系统, 待药液灌满浴槽, 与细胞充分接触, 然后选择表面光滑、边缘完整的细胞进行高阻封接, 记录 hERG 电流及通道动力学, 运用软件 pClamp10.2 进行数据分析。

**蛋白表达检测** 取出细胞, PBS 润洗 3 次, 加入弱裂解液, 提取细胞总蛋白, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳、转膜、封闭、孵育一抗, 置 4  $^{\circ}\text{C}$  摇床过夜。取出 NC 膜, 用 PBST 洗 3 次, 室温避光孵育辣根过氧化物酶标记

的二抗。最后运用Odyssey红外荧光扫描仪成像,使用Image Studio软件进行数据处理和分析。

**免疫荧光检测** 细胞用4%多聚甲醛固定30 min, PBS润洗3次,用0.4% Triton X-100穿透1 h后,10%山羊血清封闭1 h,加入抗体,置于4 °C冰箱孵育过夜。将细胞与稀释的Alexa Fluor 488和594在暗室中于37 °C孵育1 h,最后用DAPI进行染色10 min, PBS润洗3次,使用荧光显微镜进行图像采集。

**统计学分析** 使用GraphPad Prism7.0软件进行数据作图,所有实验数据均表示为均值±标准差( $\bar{x} \pm s$ ),两组间数据比较采用*t*检验,多组间数据比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)。 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

## 结果

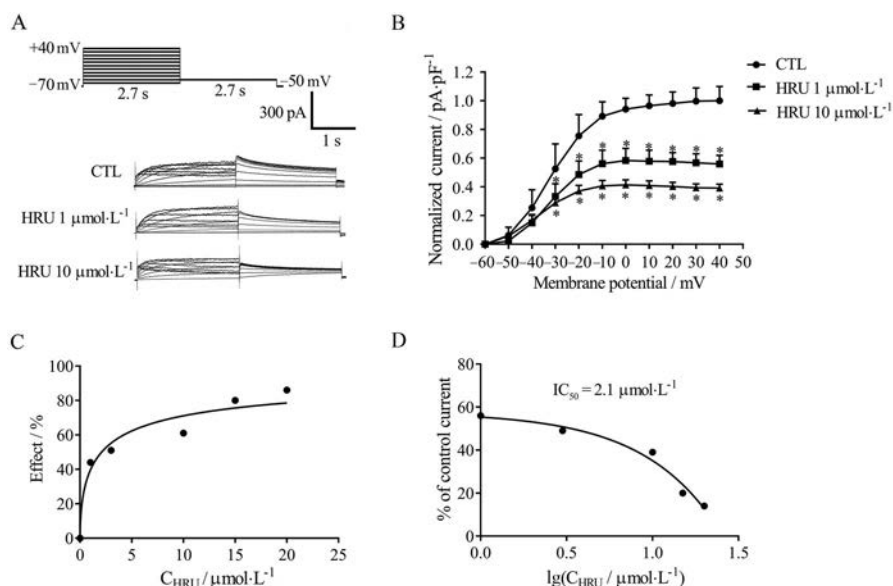
### 1 HRU对hERG通道的瞬时作用

**1.1 HRU瞬时给药对hERG电流的影响** 为了检测HRU是否会抑制hERG通道,利用全细胞膜片钳技术记录hERG-HEK293细胞的hERG电流,记为对照组,如图1A所示,在保证其他条件不变的情况下,利用膜片钳灌流装置,将HRU缓缓流进浴槽,记录hERG电流,记为HRU组。图1B中I-V曲线结果显示,HRU会使hERG电流明显减小,在+40 mV电压下,10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  HRU对hERG电流抑制率为60.8%。如图1C所示,HRU对hERG通道的抑制作用随浓度的增加而增大,20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的抑制率达到86%。图1D为HRU的半数

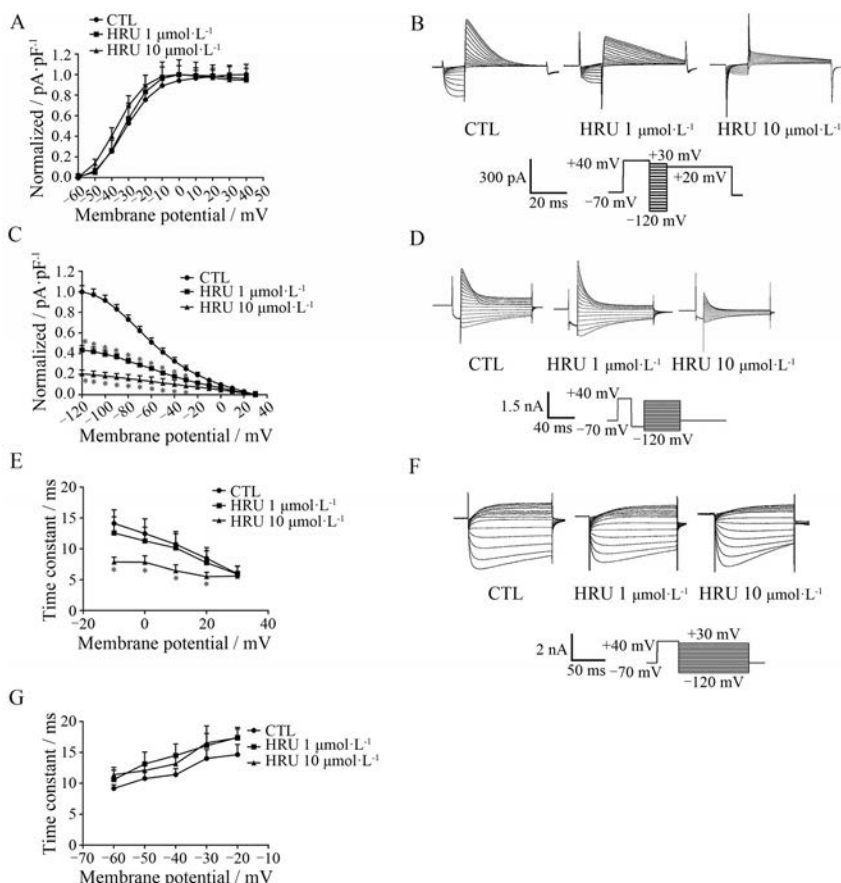
抑制浓度( $\text{IC}_{50}$ )曲线图,其 $\text{IC}_{50}$ 值为2.1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

**1.2 HRU对hERG通道动力学的影响** 接下来,本研究观察了hERG通道动力学的变化来探讨HRU抑制hERG电流的内在机制,包括激活、失活、复活过程。图2A显示,对照组hERG通道的半数激活电压( $V_{1/2}$ )为 $-32.01 \pm 0.48$  mV,1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  HRU组 $V_{1/2}$ 值为 $-32.72 \pm 0.57$  mV ( $P > 0.05$ ),10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  HRU组 $V_{1/2}$ 值为 $-37.98 \pm 0.92$  mV ( $P > 0.05$ ),可见,HRU对通道的激活过程几乎没有影响。如图2B所示,首先在+40 mV电压下确保hERG通道失活,在+20 mV电压下,记录-120~+30 mV电压刺激下产生的稳态失活电流。结果如图2C,HRU能降低hERG通道稳态失活电流。如图2D,先使通道完全失活,再在-100 mV电压使通道开放,然后给与-120~+30 mV的一系列脉冲,测试每个电压下的瞬时失活电流。图2E是经单指数方程拟合得出瞬时失活时间常数,显示出HRU缩短了失活时间常数。图2F是记录在-120~+30 mV电压下的hERG复活电流。图2G显示出HRU给药后复活时间常数无明显改变( $P > 0.05$ ),说明HRU对hERG通道复活过程无影响。

**1.3 HRU与hERG通道的结合位点** 应用计算机辅助研究药物阻断hERG通道的方法简便快捷、经济高效<sup>[12]</sup>。本研究采用分子对接技术模拟羟基茛菪碱与hERG通道的相互作用<sup>[13,14]</sup>。预测结果显示,HRU与hERG通道结合的位点为芳香族氨基酸第656位苯丙氨酸(F656)和第652位酪氨酸(Y652)。如图3A



**Figure 1** The effect of hydroxyrutaecarpine (HRU) on the human ether- $\alpha$ -go-go related gene (hERG) channels current after instantaneous perfusion. A: Protocol and representative current traces under control or HRU-treated conditions in hERG-HEK293 cells; B: Normalized I-V curve of the hERG tail current; C: Dose-response curve, the inhibitory effect of HRU on hERG increased with the increase of dose; D: Half maximal inhibitory concentration ( $\text{IC}_{50}$ ) curve of HRU inhibition of hERG channels. Student's *t* test,  $n = 8$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$  vs control (CTL)



**Figure 2** The effects of HRU on the hERG channel kinetics after instantaneous perfusion. A: Voltage-dependent activation curves for the control and HRU group ( $1$  and  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ); B: Voltage clamp protocol, representative current traces for steady-state inactivation; C: Normalized steady-state inactivation curves before and after exposure to HRU; D: Voltage clamp protocol and representative current traces for the onset of inactivation; E: Time constant of inactivation curves; F: Voltage clamp protocol and representative current traces for recovery; G: Time constant of recovery curves. Student's  $t$  test,  $n = 8$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$  vs CTL

所示, HRU 中的苯环结构与氨基酸残基 F656 形成  $\pi$ - $\pi$  堆积作用, 结构中的氮原子与氨基酸残基 Y652 形成氢键相互作用。接下来, 本研究对这一预测结果进行验证。将 hERG 通道内的苯丙氨酸和酪氨酸分别突变成缬氨酸 (valine, V) 和丙氨酸 (alanine, A), 再瞬时转染至 HEK293 细胞中, 分为 WT-hERG 组 (图 3B)、Y652A-hERG 组 (图 3C)、F656V-hERG 组 (图 3D)。使用全细胞膜片钳技术记录 HRU 对 hERG 电流的影响。结果显示,  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  HRU 显著降低了 WT-hERG 组的 hERG 电流, 对 Y652A-hERG、F656V-hERG 组几乎无抑制作用。以上结果证明 HRU 与 hERG 通道的瞬时作用是结合了通道中 F656 和 Y652 位点。

## 2 HRU 对 hERG mRNA 的影响

为了探究 HRU 抑制 hERG 通道的内在机制, 本研究运用稳定表达 hERG 的 HEK293 细胞, 检测了 HRU 作用前后 hERG mRNA 表达水平是否发生了改变。如图 4 结果显示, HRU 显著降低 hERG mRNA 表达水平。由此说明, HRU 对 hERG 通道的抑制作用极有可能是

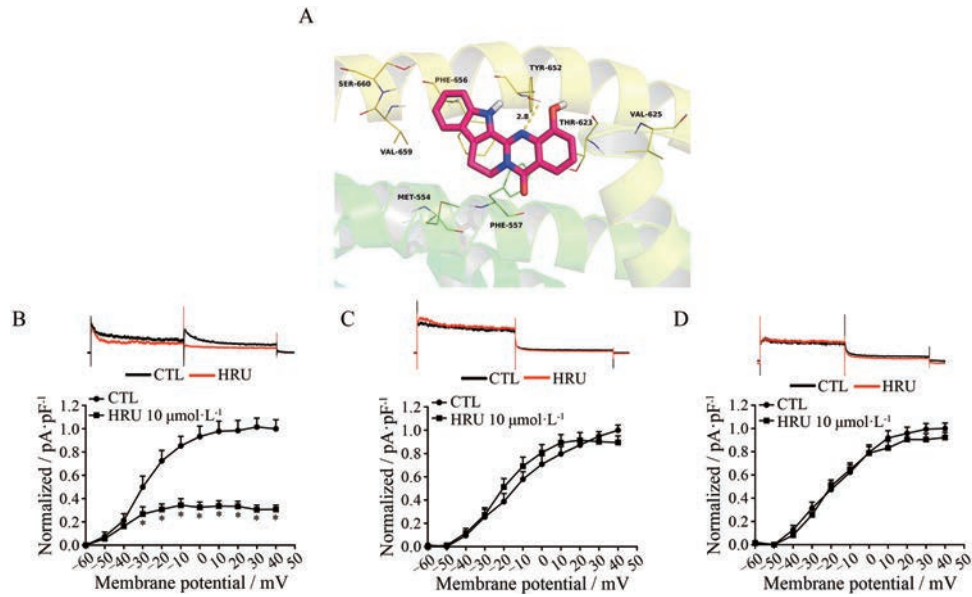
发生在转录调控过程。

## 3 HRU 孵育给药对 hERG 通道蛋白及 hERG 电流的影响

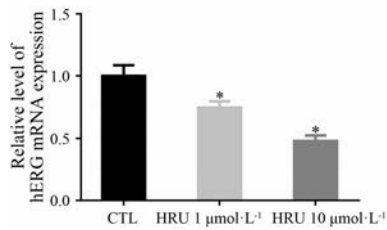
基于前期实验, 本课题组预测 HRU 对 hERG 通道可能会具有长期抑制作用。运用稳定表达 hERG 的 HEK293 细胞系, 观察 HRU 孵育 24 h 对 hERG 的影响。如图 5A 和 B 所示, HRU 孵育 24 h 明显抑制 hERG 蛋白表达。图 5C 和 D 显示, HRU 孵育 24 h 降低 hERG 电流,  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  HRU 对 hERG 电流的抑制率为 62.2%。以上结果表明, HRU 对 hERG 通道具有长期抑制作用, 并且 HRU 降低的 hERG 蛋白为功能性蛋白。

## 4 HRU 是通过下调 Sp1 使 hERG 蛋白减少

转录因子 Sp1 对 hERG 基因的转录过程具有极其重要的作用<sup>[15,16]</sup>。本研究检测 HRU 是否能够降低 Sp1 的表达水平, 如图 6A 和 B 显示, HRU 作用 24 h 后, 1 和  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  HRU 均能抑制 Sp1 表达。为了证明 Sp1 是否参与 HRU 引起的 hERG 通道蛋白的下调, 运用基因敲减技术对 Sp1 基因进行敲减, 如图 6C 和 D 所示, 敲

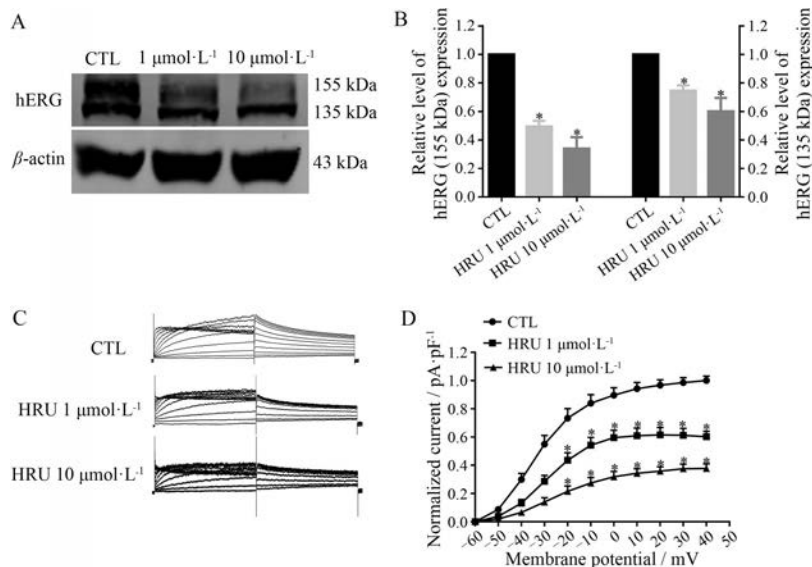


**Figure 3** Effects of HRU on hERG channel action sites. A: The HRU was docked into the binding site of the hERG channels, the HRU binds to the active pocket of hERG; B: Examples of WT hERG current traces and normalized I-V curve of the hERG tail current; C: Examples of Y652A hERG current traces and normalized I-V curve of the hERG tail current; D: Examples of F656V hERG current traces and normalized I-V curve of the hERG tail current. Student's *t* test,  $n = 10$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$  vs CTL



**Figure 4** Effects of HRU (1 and 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) on *hERG* mRNA levels. HRU reduced *hERG* mRNA levels. One-way ANOVA,  $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$  vs CTL

减 Sp1 后, 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  HRU 组的 hERG 表达量显著减少, 说明 Sp1 参与了 HRU 引起的 hERG 蛋白表达降低。Sp1 是在细胞核内发挥转录调控作用, 而 hERG 主要存在于细胞浆中。本研究利用核浆蛋白提取试剂盒检测细胞核内 Sp1 和细胞浆内 hERG 蛋白表达水平, 记为对照组、1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  HRU 孵育组、10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  HRU 孵育组。如图 6E~H 显示, 细胞浆中 hERG 蛋白表达量减少, 细胞核内转录因子 Sp1 表达也是降低的。免疫荧



**Figure 5** HRU reduces hERG protein levels and hERG current after incubation. A, B: Western blot results and statistics for hERG expression levels ( $n = 5$ ), one-way ANOVA; C: Protocol and representative current tracing on the hERG current under CTL group or HRU-treated 24 h; D: Normalized I-V curve of the hERG current. Student's *t* test,  $n = 10$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$  vs CTL

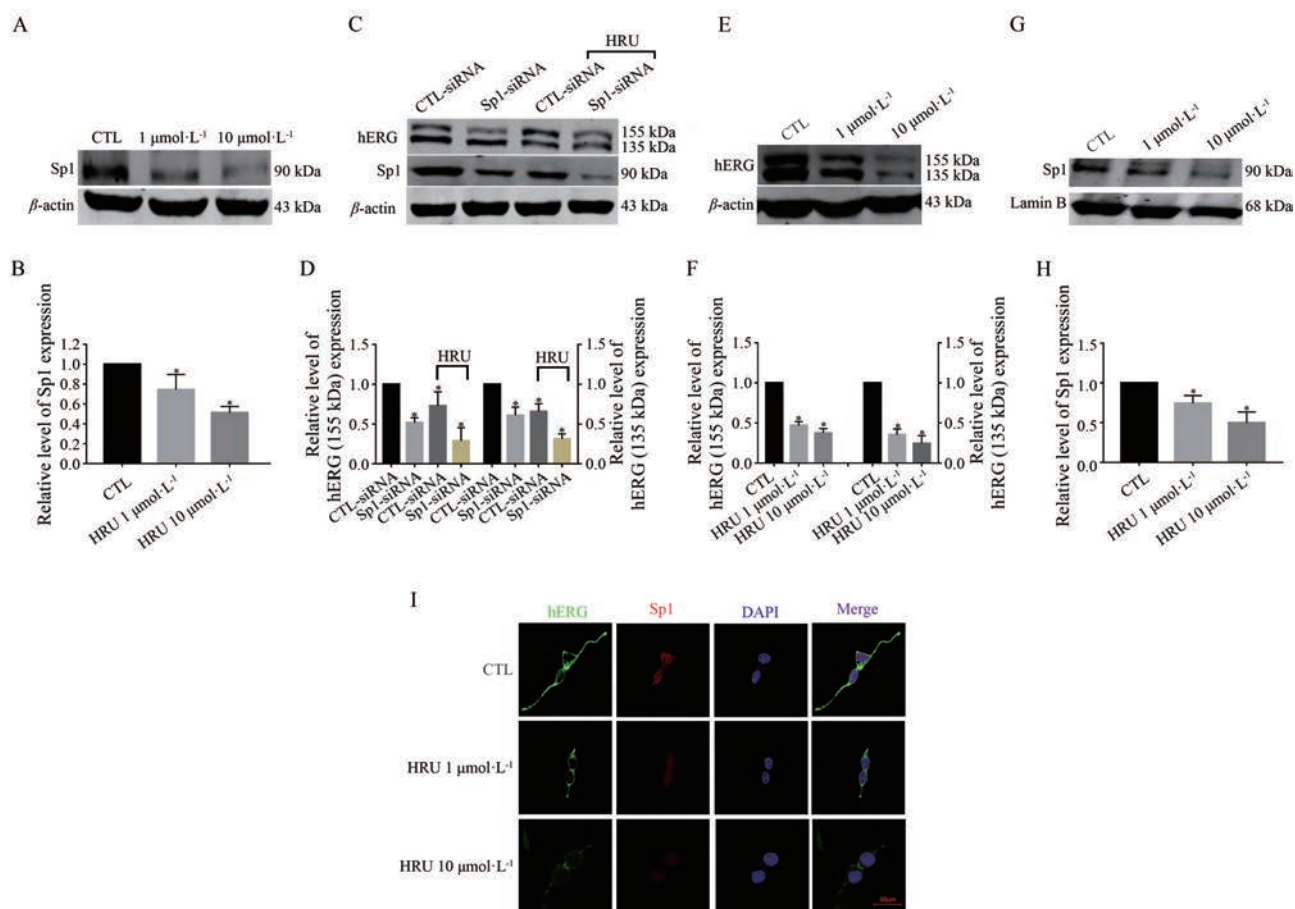
光结果如图 6I 所示, HRU 组与对照组相比, 细胞质膜上的 hERG 表达量随 HRU 浓度的增加而下降, 同时细胞核内 Sp1 水平也降低。以上说明, 转录因子 Sp1 是调控 HRU 降低 hERG 蛋白表达的关键因子。

### 讨论

在我国, 中药的发展已有千年之久, 因其疗效稳定、效果突出、应用范围广泛等优点, 所以人们往往忽略其不良反应。药物产生不良反应是不可避免的, 目前临床上针对药物引发的心脏毒性作用给予极大的关注。

从上世纪 90 年代末至今, 已经有若干中药因含有生物碱单体成分抑制 hERG 通道而被证实有致心律失常的风险, 如黄连素、乌头碱等<sup>[17,18]</sup>。吴茱萸具有抗心绞痛、抗癌和降压等功效, 是一种开发前景广阔的天然药物。为了增强吴茱萸的疗效, 降低其不良反应, 临床上常与黄连、人参、五味子等药物合用制成复方制剂, 如左金丸 (萸莲丸) 和戊己丸等<sup>[19]</sup>。有文献报道吴茱

萸贴剂穴位治疗心律失常, 作用机制尚不明确<sup>[20]</sup>。本课题组前期实验已对吴茱萸中生物碱类成分进行了部分研究, 发现吴茱萸次碱抑制 hERG 通道, 具有强烈致豚鼠心律失常的作用<sup>[15]</sup>。HRU 是从吴茱萸中提取的一种吡啶喹啉类生物碱<sup>[21]</sup>, 结构中包含氮碱基, 更是增加了与 hERG 通道结合的可能性, 运用分子对接技术将药物与 hERG 通道进行拟合, 结果显示 HRU 与 hERG 通道紧密结合, 验证了前期的推测, HRU 具有极大的潜在致心律失常风险。本文应用稳定转染 hERG 的 HEK293 细胞系, 首先观察到 HRU 瞬时给药能抑制 hERG 电流, 其抑制 hERG 通道与其加速通道失活, 缩小失活时间常数, 即与加速通道的失活动力学有关。hERG 通道的 S6 结构域中包含两个芳香族氨基酸 F656 和 Y652, 这两个残基的侧链都朝向通道的中央大空腔, 是 hERG 通道阻断剂的主要结合位点。本研究检测了 HRU 对突变的 hERG 通道 Y652A、F656V 的作用, 与野生型相比, 突变组电流的抑制作用明显减弱,



**Figure 6** HRU reduced hERG and Sp1 expression levels. A, B: Representative bands and statistics of Sp1 after HRU incubation for 24 h; C, D: Representative bands and statistics of hERG after transfection with a Sp1 siRNA; E, F: Representative bands and statistics of hERG in cytoplasm; G, H: Representative bands and statistics of Sp1 in nucleus, one-way ANOVA; I: Immunofluorescence showed reduced hERG and Sp1 expression levels by incubation with HRU, green represented hERG protein and red represented Sp1 protein. Scale bar, 50  $\mu\text{m}$ .  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$  vs CTL

说明HRU与hERG通道的结合位点是Y652和F656,抑制了hERG通道的开放过程。药物除了影响hERG通道功能,也会影响hERG蛋白的合成、转运过程,这也是导致发生acLQTS的重要原因之一。hERG通道的合成有两种形式:①定位于内质网的135 kDa的未成熟核糖基化蛋白;②约155 kDa的完全糖基化为成熟蛋白,转运到细胞表面。hERG位于7q35~36基因位置,从细胞核内转录成mRNA出核,在内质网翻译合成初始hERG,经过复杂正确的折叠、糖基化(135 kDa)、组装等过程方可离开内质网,到达高尔基完全糖基化后再运输到细胞膜上,形成成熟hERG蛋白,发挥其电压门控通道特性。在这个过程中,发生错误折叠或装配不完全的蛋白会在内质网中被质量控制识别并使其滞留在内质网中,导致膜上蛋白表达减少,即发生逆行转运障碍(anterograde trafficking defects)。核转录因子Sp1蛋白以及帮助hERG折叠、转运的伴侣蛋白热休克蛋白Hsp70、Hsp90在此过程中起重要调控作用。HRU孵育给药抑制hERG蛋白的表达,同时电流减少,说明HRU抑制的是功能性hERG蛋白。课题组前期实验首次证实,转录因子Sp1在hERG的转录过程中起到重要调控作用<sup>[22]</sup>,本实验应用Western blot观察到细胞核内Sp1和细胞浆内hERG蛋白表达都明显降低,免疫荧光结果也与之保持一致,说明HRU是通过下调Sp1而减少转录过程,进而发挥调控hERG的作用。综上所述,HRU对hERG通道的瞬时作用主要是通过加快通道失活过程,从而抑制hERG电流。HRU对hERG通道的长期抑制作用主要通过降低转录因子Sp1表达,导致hERG通道在转录过程出现障碍,使hERG mRNA水平降低,导致蛋白表达量降低。

临床上应用吴茱萸等这类含大量生物碱的药物治疗疾病时,有必要进行血药浓度监测,尤其和具有抑制hERG通道风险的药物联用时,需要及时调整用药剂量,尽量避免不良反应的产生。

**作者贡献:** 李相花负责实验设计、实验操作以及论文初稿的完成;战歌、李加欣、任家成负责部分分子生物学及膜片钳等实验工作;樊攀、李宝馨负责课题设计指导以及稿件的修改等工作。

**利益冲突:** 所有作者均不存在利益冲突。

## References

- [1] Fitzgerald P, Ackerman M. Drug-induced torsades de pointes: the evolving role of pharmacogenetics [J]. *Heart Rhythm*, 2005, 2: S30-S37.
- [2] Jonsson M, van der Heyden M, van Veen T. Deciphering hERG channels: molecular basis of the rapid component of the delayed rectifier potassium current [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2012, 53: 369-374.
- [3] Butler A, Helliwell M, Zhang Y, et al. An update on the structure of hERG [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 1572.
- [4] Zhang Y, Colenso C, El Harchi A, et al. Interactions between amiodarone and the hERG potassium channel pore determined with mutagenesis and in silico docking [J]. *Biochem Pharmacol*, 2016, 113: 24-35.
- [5] Al-Moubarak E, Sharifi M, Hancox J. In silico exploration of interactions between potential COVID-19 antiviral treatments and the pore of the hERG potassium channel-A drug antitarget [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2021, 8: 645172.
- [6] Liu T, Liu J, Lu H, et al. Utility of normalized TdP score system in drug proarrhythmic potential assessment: a blinded *in vitro* study of CiPA drugs [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2021, 109: 1606-1617.
- [7] Fogli Iseppa A, Ni H, Zhu S, et al. Sex-specific classification of drug-induced torsade de pointes susceptibility using cardiac simulations and machine learning [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2021, 110: 380-391.
- [8] Ridder B, Leishman D, Bridgland-Taylor M, et al. Corrigendum to "a systematic strategy for estimating hERG block potency and its implications in a new cardiac safety paradigm" [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2020, 395: 114983.
- [9] Chen JJ, Fang HY, Duh CY, et al. New indolopyridoquinazoline, benzo[c]phenanthridines and cytotoxic constituents from *Zanthoxylum integrifolium* [J]. *Planta Med*, 2005, 71: 470-475.
- [10] Li M, Wang C. Traditional uses, phytochemistry, pharmacology, pharmacokinetics and toxicology of the fruit of *Tetradium rutilcarpum*: a review [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 263: 113231.
- [11] Baburin I, Varkevisser R, Schramm A, et al. Dehydroevodiamine and hortiamine, alkaloids from the traditional Chinese herbal drug *Evodia rutaecarpa*, are IKr blockers with proarrhythmic effects *in vitro* and *in vivo* [J]. *Pharmacol Res*, 2018, 131: 150-163.
- [12] Knape K, Linder T, Wolschann P, et al. *In silico* analysis of conformational changes induced by mutation of aromatic binding residues: consequences for drug binding in the hERG K<sup>+</sup> channel [J]. *PLoS One*, 2011, 6: e28778.
- [13] Kudaibergenova M, Guo J, Khan H, et al. Allosteric coupling between drug binding and the aromatic cassette in the pore domain of the hERG1 channel: implications for a state-dependent blockade [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 914.
- [14] Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading [J]. *J Comput Chem*, 2010, 31: 455-461.
- [15] Zhan G, Wang F, Ding YQ, et al. Rutaecarpine targets hERG channels and participates in regulating electrophysiological properties leading to ventricular arrhythmia [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25: 4938-4949.

- [16] Feng P, Zhang B, Zhao L, et al. Intracellular mechanism of rosuvastatin-induced decrease in mature hERG protein expression on membrane [J]. *Mol Pharm*, 2019, 16: 1477-1488.
- [17] Hu H, Zhou S, Sun X, et al. A potent antiarrhythmic drug *N*-methyl berbamine extends the action potential through inhibiting both calcium and potassium currents [J]. *J Pharmacol Sci*, 2020, 142: 131-139.
- [18] Li Y, Tu D, Xiao H, et al. Aconitine blocks HERG and Kv1.5 potassium channels [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 131: 187-195.
- [19] Zhang BG, Liu QF. Zuojin pill is newly used in modern clinic [J]. *Chin Tradit Pat Med (中成药)*, 2010, 32: 1408-1411.
- [20] Xu LD, Zhang YX, Zheng YH. Observation on therapeutic effect of acupoint sticking at Neiguan (PC 6) and Xinshu (BL 15) for treatment of bradycardia [J]. *Chin Acupunct Moxib (中国针灸)*, 2010, 30: 192-194.
- [21] Yan Q, Shan Y, Yin M, et al. Phytochemical and chemotaxonomic study on *Evodia rutaecarpa* var. *officinalis* [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2020, 88: 103961.
- [22] Zhang Y, Dong Z, Jin L, et al. Arsenic trioxide-induced hERG K<sup>+</sup> channel deficiency can be rescued by matrine and oxymatrine through up-regulating transcription factor Sp1 expression [J]. *Biochem Pharmacol*, 2013, 85: 59-68.