

# 酸枣仁皂苷 B 对大鼠心室肌细胞电压门控钠通道的影响

董晓娜<sup>1,2</sup>, 向洁<sup>3,4</sup>, 朱业<sup>2</sup>, 彭晟展<sup>3</sup>, 许正新<sup>3,4,5</sup>, 顾翔<sup>2</sup>

(1. 扬州大学临床医学院, 江苏 扬州 225009; 2. 扬州大学附属苏北人民医院, 江苏 扬州 225001;

3. 扬州大学医学院药理学系, 江苏 扬州 225009; 4. 江苏省中西医结合老年病防治重点实验室, 江苏 扬州 225001;

5. 江苏省非编码 RNA 基础与临床转化重点实验室, 江苏 扬州 225009)

**摘要:**酸枣仁皂苷 B(Jujuboside B, JuB) 是安神药酸枣仁的主要成分之一, 具有抑制血小板聚集和抗血管再狭窄作用等多种药理活性。然而, JuB 的抗心律失常作用及其潜在机制尚不明确。研究通过全细胞膜片钳技术和分子对接研究探讨了 JuB 对大鼠心室肌细胞钠电流(sodium current,  $I_{Na}$ ) 的影响。结果显示, JuB 导致  $I_{Na}$  的电流-电压(current-voltage,  $I-V$ ) 曲线上移, 激活曲线沿电压轴正向即膜电位的去极化趋势移动, 稳态失活曲线向超极化方向移动, 延长了从失活到恢复所需的时间, 表示 JuB 抑制了  $Na^+$  通道的开放过程, 可能在失活期间对钠通道具有较强的结合亲和力。分子对接研究显示, JuB 主要结合在 rNav1.5 和 rNav1.5/QQQ 的电压感应域(voltage-sensing domain, VSD) III 和 IV 的跨膜螺旋结构中。研究首次初步证实 JuB 能够呈浓度依赖性抑制大鼠心室肌细胞  $I_{Na}$ 。

**关键词:**酸枣仁皂苷 B; 心肌细胞; 电压门控钠通道; 分子对接; 心律失常

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1673-7717(2025)12-0055-08

## Effect of Jujuboside B on Voltage-gated Sodium Channels in Rat Ventricular Myocytes

DONG Xiaona<sup>1,2</sup>, XIANG Jie<sup>3,4</sup>, ZHU Ye<sup>2</sup>, PENG Shengzhan<sup>3</sup>, XU Zhengxin<sup>3,4,5</sup>, GU Xiang<sup>2</sup>

(1. Clinical Medical College, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu, China;

2. Northern Jiangsu People's Hospital Affiliated to Yangzhou University, Yangzhou 225001, Jiangsu, China;

3. Department of Pharmacology, School of Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu, China;

4. Jiangsu Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine for Prevention and Treatment of Senile Diseases, Yangzhou University, Yangzhou 225001, Jiangsu, China;

5. Jiangsu Key Laboratory of Experimental & Translational Non-coding RNA Research, Yangzhou 225009, Jiangsu, China)

**Abstract:** Jujuboside B (JuB), one of the main constituents of herbal medicine Suanzaoren (Ziziphi Spinosae Semen), possess various pharmacological activities, including anti-inflammatory, antiplatelet and anti-restenosis potentials on the cardiovascular system. However, anti-arrhythmia and underlying mechanisms of JuB are uncertain. This study explored the effects of JuB on the sodium currents ( $I_{Na}$ ) in rat ventricular myocytes using whole-cell patch-clamp techniques and molecular docking studies. The whole-cell patch-clamp technique showed that the current-voltage ( $I-V$ ) curves of  $I_{Na}$  shifted along the positive axis in a dose-dependent manner with JuB. Besides, the administration of JuB caused the steady-state activation curve to shift positively along the voltage axis, i. e., a depolarization trend but the steady-state inactivation curve of  $I_{Na}$  shifted negatively, which represented that JuB suppressed the opening process of the  $Na^+$  channel and may had a strong affinity for binding to sodium channels during inactivation. The molecular docking study exhibited that JuB was mainly docked in the transmembrane helices of voltage-sensing domain (VSD) III and IV of rNav1.5 and rNav1.5/QQQ. The study preliminarily confirmed that JuB can inhibited voltage-gated sodium channel of cardiac myocytes for the first time.

**Keywords:** Jujuboside B; cardiac myocytes; voltage-gated sodium channel; molecular docking; arrhythmia

**基金项目:**国家自然科学基金青年科学基金项目(81800250); 中国博士后科学基金项目(2022M711417); 江苏省中医药科技发展计划项目(MS2023137)

**作者简介:**董晓娜(1989-), 女, 河北保定人, 医师, 博士研究生, 研究方向: 中西医结合临床。

**通讯作者:**许正新(1964-), 男, 江苏扬州人, 教授, 博士, 研究方向: 心血管药理学。E-mail: xuzhengxin405@126.com。

顾翔(1963-), 男, 江苏泰州人, 教授、主任医师, 博士, 研究方向: 心血管内科。E-mail: guxiang@yzu.edu.cn。

心血管疾病是全球主要死因之一<sup>[1]</sup>。正常的心脏功能与心肌细胞离子通道的开放和关闭以及调节跨膜离子的电位差相关<sup>[2]</sup>。大量的研究已经证实,通过心肌细胞膜离子通道的电流异常是诱发心律失常的重要因素<sup>[3]</sup>,与心血管疾病的死亡率和发病率的增加<sup>[4]</sup>。心肌细胞膜的跨膜蛋白电压门控钠离子通道负责心脏的膜去极化和动作电位传导,并在维持正常心脏节律中发挥重要作用<sup>[5-7]</sup>。心肌细胞钠通道的功能异常可能导致各种心脏的病理生理异常<sup>[8-10]</sup>,包括心室重塑、心肌损伤、心律失常和其他心脏疾病<sup>[11]</sup>。由钠电压门控通道 $\alpha$ 亚基5(sodium voltage-gated channel alpha subunit 5, *SCN5A*)基因编码的 $\text{Na}_v1.5$ 被认为是心肌细胞膜表达的主要电压门控钠通道,并传导内向去极化钠电流(sodium current,  $I_{\text{Na}}$ )<sup>[12-15]</sup>。心肌细胞 $\text{Na}_v1.5$ 的功能异常是触发心肌病和心律失常的主要因素之一<sup>[12]</sup>。

药物治疗是治疗心律失常的主要方法。当前抗心律失常药物的基本药理效应是通过影响心肌细胞膜的离子通道功能,改变离子电流并影响细胞的电生理特性,从而抑制心律失常的发生<sup>[16]</sup>。代表I类抗心律失常药物的 $\text{Na}^+$ 通道阻滞剂通过降低心脏组织的兴奋性发挥抗心律失常作用,从而防止异常的自发动作电位。然而,抗心律失常药物的疗效由于其潜在的严重不良反应而受到限制<sup>[17-18]</sup>。因此,研发更安全、更有效的抗心律失常药物仍然是治疗心律失常的重要方向。大量的研究在传统中药中寻找抗心律失常药物,包括针对 $I_{\text{Na}}$ 的效应<sup>[19-20]</sup>。

酸枣仁是鼠李科植物酸枣的干燥成熟种子,广泛用于治疗心悸、焦虑、失眠和多汗等症状。酸枣仁皂苷B(Jujuboside B, JuB)是酸枣仁的主要生物活性皂苷成分之一,具有镇静催眠<sup>[21]</sup>、抗热性惊厥<sup>[22]</sup>、抗炎<sup>[23]</sup>和保肝功能<sup>[24]</sup>。JuB分子式为 $\text{C}_{52}\text{H}_{84}\text{O}_{21}$ (图1)。一些研究已经证明了JuB在心血管系统方面的药理作用,包括抗血小板<sup>[25]</sup>、抗血管再狭窄<sup>[26]</sup>、保护血管内皮功能和降低血管张力作用<sup>[27]</sup>。最近的一项研究表明, JuB通过降低血管内皮生长因子受体2及其下游信号通路的激活,抑制血管新生和肿瘤生长,具有良好的耐受性和低毒性<sup>[28]</sup>。然而, JuB对心律失常的影响仍然是未知的。在这项研究中,我们通过全细胞膜片钳技术和分子对接分析初步得出 JuB是大鼠心肌细胞电压门控钠通道的潜在抑制剂。

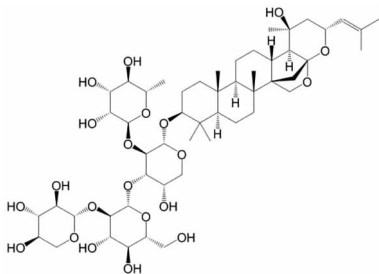


图1 酸枣仁皂苷B(JuB)的化学结构

## 1 材料

1.1 动物 Sprague-Dawley大鼠,体质量(200~300)g,雌雄不限,由扬州大学比较医学中心提供,动物合格证[SYXK(苏)

2017-0044)]。本实验通过扬州大学实验动物伦理委员会伦理审查,编号:YXYL-2022-135。

1.2 药物和试剂 JuB(CAS号55466-05-2,纯度 $\geq 98\%$ ,成都埃法生物科技有限公司,批号AB0608)溶解在二甲基亚砜(DMSO)中,配制成浓度为25、50、100、200  $\mu\text{mol/L}$ 的溶液;葡萄糖、肝素钠、L-谷氨酸(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为405A096、301A028、405A096);牛磺酸(Taurine)、氯化铯(CsCl)、四乙基氯化铵(TEA-Cl)、腺苷5'-三磷酸镁盐(Mg-ATP)、4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)(美国Sigma-aldrich公司,批号分别为101282014、101368097、101394223、1001571838、1001621577);河豚毒素(Tetrodotoxin, TTX)(Affix公司,批号AF02);牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA, 美国ICN公司,批号:8398F);乙二醇-双四乙酸(EGTA)(Fluka公司,批号101257840);胶原酶II(美国Worthington公司,批号:44N15308B)。

细胞保存液(Krebs, KB液)的配制如下(mmol/L):葡萄糖11.0、EGTA 1.0、L-谷氨酸70.0、牛磺酸10.0、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  10.0、KCl 25.0、KOH 89.0和HEPES 5.0,使用KOH调整溶液至pH 7.4。无钙台氏液的成分如下(mmol/L):葡萄糖10.0、 $\text{MgCl}_2$  1.0、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.33、KCl 5.4、NaCl 135和HEPES 5.0,使用NaOH调整溶液至pH 7.3。有钙台氏液:向无钙台氏液中加入 $\text{CaCl}_2$ (1.8 mmol/L)。电极内液(mmol/L):HEPES 10.0、EGTA 10.0、TEA-Cl 20.0、NaCl 5.0、CsCl 133.0和Mg ATP 5.0,用CsOH调pH至7.30。CsOH(99%)用于调整溶液至pH 7.40。细胞外液(mmol/L): $\text{CdCl}_2$  0.1、CsCl 5.4、 $\text{CaCl}_2$  1.8、葡萄糖10.0、NaCl 135.0、 $\text{MgCl}_2$  1.0和HEPES 5.0,使用NaOH将溶液调整至pH 7.40。酶溶液:无钙台氏液中加入1 g/L BSA、0.4 g/L牛磺酸、0.4 g/L胶原酶II。

1.3 仪器 EPC-10 USB/Patchmaster单通道膜片钳放大器(德国HEKA公司);IX73倒置科研级显微镜(日本Olympus公司);MP-225显微操作器系统、P-97微电极拉制仪(美国Sutter公司)。

## 2 方法

2.1 大鼠心室肌细胞的急性分离 SD大鼠心室肌细胞的急性分离<sup>[29]</sup>操作步骤中,先在大鼠腹腔注射肝素(2000 IU/kg),10 min后,使用2%的戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射进行麻醉。随后,立即固定大鼠并切开胸腔,取出心脏并置于4  $^{\circ}\text{C}$ 的无钙台氏液中,修剪多余的组织,将心脏固定在Langendorff灌流装置中。通过有钙台氏液灌注心脏30 s,接着,给心脏灌注无钙台氏液,直到残余的血液被洗掉。大约经过25 min的100%氧饱和酶溶液灌流后,心脏变软并膨大。当流出物黏稠混浊、滴速较快时,终止消化。取出心室组织,解剖,并通过100目滤网过滤。所获得的单个心室肌细胞在KB溶液中洗涤3次,并在室温下保存10 min,待细胞沉淀后除去上清液。经过30 min的充氧后,静置2 h。

2.2 全细胞膜片钳实验 将细胞悬浮液放入含有细胞外液的培养皿中,静置,待细胞贴壁后,用细胞外液进行灌流以除去残

存的KB液。具有光滑完整边缘、清晰横纹和立体外观且没有任何自发性收缩和震颤的细胞被认为处于良好状态,适合进行后续实验。用单通道膜片钳放大器记录 $I_{Na}$ 。

**2.3 刺激方案** 在单刺激方案中,在电压钳模式下,保持电位 $-80$  mV,给予 $-30$  mV、持续 $30$  ms时间的方波刺激。在电压钳模式下,保持电位 $-80$  mV,给予 $-70 \sim 50$  mV、阶跃 $5$  mV、持续时间 $30$  ms的方波串刺激, $0.5$  Hz刺激频率。以膜电位为横坐标,峰电流为纵坐标绘制出 $I_{Na}$ 的电流-电压(current-voltage, I-V)关系曲线。

激活电流刺激方案中,在电压钳模式下,钳制电位 $-80$  mV,给予 $-80 \sim 50$  mV、阶跃 $5$  mV、 $0.5$  Hz频率、持续时间 $30$  ms的方波串刺激。

在电压钳模式下,采取双脉冲刺激方案记录 $I_{Na}$ 失活曲线,保持电位 $-80$  mV,条件脉冲从 $-140 \sim 40$  mV,阶跃 $10$  mV,持续时间 $50$  ms去极化心室细胞,然后再给予条件脉冲至 $-30$  mV,持续时间 $25$  ms。

双脉冲刺激方案用于检测 $I_{Na}$ 失活后的恢复曲线,保持电位 $-80$  mV,给予去极化至 $-30$  mV的刺激,持续 $30$  ms,回到保持电位持续 $5$  ms后,再给予一系列条件脉冲至 $-30$  mV,持续 $25$  ms,脉冲总数为 $15$ ,两个脉冲之间的设定间隔时间逐渐增加 $10$  ms。

**2.4 分子建模和计算方法** 在有机小分子生物活性数据PubChem化合物数据库中查询天然化合物的化学结构(<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), JuB的化合物编号(compound identity document, CID)为 $24721031$ ,从蛋白数据库(Protein Data Bank, PDB) (<http://www.rcsb.org/pdb>)获取大鼠电压门控钠通道 $Nav1.5$  (PDB ID:  $6UZ3$ )和 $rNav1.5/QQQ$  (PDB ID:  $7FBS$ )的晶体结构。使用AutoDock-Vina软件进行分子对接计算。配体和蛋白质的pdbqt文件均按照AutoDock方案进行分子对接计算。除了最大能量评估次数和遗传算法运行次数(genetic algorithm, GA)外,所有对接参数都保持在默认值。对接网格作为受体的结合位点,网格大小为 $40 \text{ \AA} \times 40 \text{ \AA} \times 40 \text{ \AA}$ 。网格间距值被调整为 $0.375 \text{ \AA}$ 。PyMol (<https://pymol.org>)用于可视化,以获得氢键、疏水和静电相互作用<sup>[30]</sup>。使用分子力学广义波恩表面积(molecular mechanics/generalized born surface area, MM/GBSA)结合自由能计算方法,打分函数为MMGBSA  $\Delta G_{\text{Bind}}$ <sup>[31]</sup>。

**2.5 统计分析** 实验数据使用Origin 7.0软件(Microcal Software)进行分析,使用GraphPad Prism 8软件进行曲线拟合。数据以均值 $\bar{x} \pm s$ 标准偏差SD表示。使用 $t$ 检验和方差分析(analysis of variance, ANOVA)进行均值比较。当 $P < 0.05$ 时被认为具有显著统计学意义。

### 3 结果

**3.1 JuB对大鼠心室肌细胞 $Na^+$ 通道I-V曲线的影响** 在短时间内诱导产生内向电流,然后在短时间内达到最大电流。当外部溶液中加入选择性 $Na^+$ 通道阻滞剂 $10 \mu\text{mol/L}$  TTX时,电流明显受到抑制。在用外部溶液灌洗去除TTX后,电流在

一定程度上恢复,表明在刺激方案中诱发的电流是 $I_{Na}$ 。

监测和记录JuB和胺碘酮给药前后的 $I_{Na}$ 结果,以研究JuB对不同电压条件下 $Na^+$ 通道电流的影响。JuB在 $25, 50$ 和 $100 \mu\text{mol/L}$ 浓度下以浓度依赖性的方式抑制了 $I_{Na}$ 。然而,与胺碘酮相比, $200 \mu\text{mol/L}$ 的JuB显示出更强的抑制作用。为了防止过度抑制引起的心律失常,选择了 $25, 50$ 和 $100 \mu\text{mol/L}$  JuB用于后续实验。如插页XX图2所示,记录了JuB和胺碘酮给药后 $Na^+$ 通道的电流及其随电压的变化。电流值以电流密度表示,即通过细胞膜的电流幅度除以细胞膜的面积,单位为皮安培/皮法拉(pA/pF)。 $25, 50$ 和 $100 \mu\text{mol/L}$  JuB以及 $24.24 \mu\text{mol/L}$ 胺碘酮导致 $Na^+$ 通道I-V曲线向上移动和内向电流的减小,而不影响曲线形状。在施加电压约为 $-40$  mV时,每个测试电压条件下电流密度显著减小。

**3.2 JuB对 $I_{Na}$ 稳态激活曲线的影响** 监测和记录胺碘酮和JuB给药前后的 $I_{Na}$ 变化(插页XX图3A, B),并绘制 $I_{Na}$ 的激活曲线(插页XX图3C),以研究JuB对 $Na^+$ 通道激活和开放的影响。不同浓度的JuB和胺碘酮都导致稳态激活曲线向右移动,即去极化方向,并导致通道半数激活电压(half activation voltage,  $V_{1/2-ac}$ )的增加。 $25, 50$ 和 $100 \mu\text{mol/L}$ 浓度的JuB分别使 $V_{1/2-ac}$ 值从 $(-53.22 \pm 1.30)$  mV(给药前)变为 $-50.50 \pm 1.17$  mV、 $(-48.59 \pm 0.81)$  mV、 $(-44.88 \pm 1.29)$  mV ( $n = 6; P < 0.05$ )。因此, JuB可以提高钠通道激活的阈值。

**3.3 JuB对 $I_{Na}$ 失活曲线的影响** 插页XX图4A, B展示了在添加不同浓度JuB和胺碘酮前后获得的诱导 $I_{Na}$ 失活电流的结果。电流与最大电流的比值用相对电流 $I/I_{\text{max}}$ 表示,作为纵坐标,膜电位为横坐标,通过Boltzmann方程进行拟合稳态失活曲线:

$$I/I_{\text{max}} = 1 / \{ 1 + \exp[(V - V_{1/2})/k] \} \quad (1)$$

$k$ 和 $V_{1/2}$ 分别代表失活曲线的斜率因子和通道半数失活时的条件脉冲电压(half inactivation voltage,  $V_{1/2}$ )。

不同浓度JuB和胺碘酮均导致失活曲线向左移动,即向超极化方向移动(插页XX图4C)。JuB在 $25, 50$ 和 $100 \mu\text{mol/L}$ 浓度下,  $V_{1/2}$ 从 $(-72.96 \pm 1.08)$  mV减少到 $(-81.63 \pm 0.76)$  mV、 $(-86.14 \pm 1.56)$  mV、 $(-94.62 \pm 1.20)$  mV ( $n = 6; P < 0.05$ )。因此, JuB能够加速 $Na^+$ 通道失活。

**3.4 JuB对 $I_{Na}$ 失活后恢复曲线的影响** 插页XX图5A, B展示了胺碘酮和不同浓度JuB添加前后的 $I_{Na}$ 恢复电流。插页XX图5C展示了 $I_{Na}$ 失活后的恢复曲线。通过拟合单相关方程来构建 $I_{Na}$ 失活后的恢复曲线:

$$I/I_{\text{max}} = 1 - \exp(-t/\tau) \quad (2)$$

$\tau$ 和 $t$ 分别表示失活后再激活的时间常数和两个脉冲之间的时间间隔。在JuB( $25, 50$ 和 $100 \mu\text{mol/L}$ )的作用下,  $\tau$ 值分别从 $(18.18 \pm 1.13)$  ms变为 $(20.72 \pm 1.41)$  ms、 $(25.86 \pm 1.65)$  ms、 $(30.13 \pm 1.70)$  ms ( $n = 6, P < 0.05$ )。因此, JuB改变了 $I_{Na}$ 失活后恢复的动力学,并延长了 $I_{Na}$ 从失活到激活所需的时间。

**3.5 分子对接模拟** 使用分子对接方法探讨了JuB与大鼠电

压门控钠通道 (rNav1.5) 和 rNav1.5 开放态结构 (rNav1.5/QQQ) 的相互作用 (插页XX图 6、表 1)。JuB 与 rNav1.5 和 rNav1.5/QQQ 的亲合力结合能分别为  $-6.502$  kcal/mol (吉布斯自由能为  $-64.75$  kcal/mol) 和  $-6.722$  kcal/mol (吉布斯自由能为  $-30.38$  kcal/mol)。其中, JuB - rNav1.5 的对接模式存在 7 个氢键, 分别结合在 Gly1717、Ala1688、Gly320、Arg896、Asp1425、Ser1720 和 Gln1416 氨基酸残基, 而 JuB 与 rNav1.5/QQQ 在 Thr321、Gly220、Ala1688、Glu1687、Lys1401 和 Asp908 位点处形成氢键 (插页XX图 6、表 1)。

表 1 大鼠电压门控钠通道和开放态结构与 JuB、MM - GBSA 分子间结合相互作用

离子通道蛋白	结合/ (kcal/mol)	MM - GBSA 绑定能/ (kcal/mol)	氢键
rNav1.5	-6.502	-64.75	Gly1717 Ala1688 Gly320 Arg896 Asp1425 Ser1720 Gln1416
rNav1.5/QQQ	-6.722	-30.38	Thr321 Gly320 Ala1688 Glu1687 Lys1401 Asp908

#### 4 讨论

心脏钠通道在膜去极化的过程中迅速激活, 导致  $\text{Na}^+$  向内跨膜传导, 心脏动作电位上升, 以调节心脏组织动作电位的均匀性和传播速率<sup>[32]</sup>。心脏离子通道的紊乱属于离子通道病, 可能导致心律失常和心脏结构异常, 目前被认为是心血管疾病的重要危险因素以及致病机制<sup>[33]</sup>。在生理条件下, 钠通道的失活和激活机制受到严格控制, 钠通道的功能障碍可能对心律失常的发生和心脏电生理特性产生深远影响<sup>[9-10]</sup>。事实上, 电压门控钠通道已经成为许多常用抗心律失常药物的靶点。心脏钠通道的高分辨率结构解析有助于研究心律失常的发病机制、离子选择性、电压依赖性激活以及抗心律失常药物在分子水平上的作用机制研究<sup>[14]</sup>。在哺乳动物中,  $\text{Na}_v1.5$  是用于启动和传递电信号的主要心脏钠通道亚型。rNav1.5 通道的结构包括  $\alpha$  - 亚单位的 I、II、III、IFM 基序和 IV 区域, 以及  $\beta 1$  和  $\beta 2$  亚单位<sup>[34]</sup>。rNav1.5 的开放态结构是通过引入 IFM/ QQQ 突变来实现的, 以去除快速失活门<sup>[35]</sup>。更具体地说, rNav1.5 和 rNav1.5/ QQQ 电压感应域 (voltage - sensing domain, VSD) III 和 IV 的跨膜  $\alpha$  螺旋已被确定为影响通道功能的核心区域<sup>[34-35]</sup>。因此, 分析离子通道功能, 揭示潜在的生物分子机制, 并识别特定的靶向药物对于未来心脏保护和抗心律失常药物的研发至关重要。I 类抗心律失常药物的主要靶标是 Nav1.5, 其功能是阻断心脏动作电位的形成和传导<sup>[36]</sup>。膜片钳技术经常被用于研究细胞膜的详细电生理特性, 尤其是膜电位随着药物作用的变化。因而, 本论文使用原代分离的大鼠心肌细胞进行离子通道蛋白功能的研究<sup>[20,37]</sup>。JuB 已被广泛认为具有多种药理特性, 包括心血管方面的功效<sup>[25-28]</sup>。目前, 关于 JuB 对心肌细胞离子通道影响的研究较少, 本论文初步验证了 JuB 对电压门控  $\text{Na}^+$  通道的抑制作用, 并且利用新鲜分离的大鼠心肌细胞展示了其潜在的抗心律失常机制。

在这项研究中, 我们研究了不同浓度的 JuB 对 SD 大鼠心肌细胞的激活、失活和恢复动力学影响。JuB 对  $I_{\text{Na}}$  的影响在不同的膜电位水平上变化。结果显示: JuB 能够抑制  $I_{\text{Na}}$ , 引起 I - V 曲线上移, 但没有影响曲线形状 (插页XX图 2); JuB 对  $I_{\text{Na}}$  激活动力学的抑制作用表明 JuB 阻滞了  $\text{Na}^+$  的流入 (插页XX图 3); 在 JuB 的作用下, 失活曲线向左移动 (插页XX图 4), 而恢复曲线向右移动 (插页XX图 5)。膜片钳实验结果表明, JuB 减缓了  $\text{Na}^+$  通道的激活阶段, 减少了通道开放程度, 加速了失活阶段, 并延长了  $\text{Na}^+$  通道从失活到静息状态的恢复阶段, 导致  $I_{\text{Na}}$  在心室复极时的恢复动力学延迟。影响作用于不应期可以降低  $\text{Na}^+$  通道的间隙兴奋性并抑制快速心律失常, 这与 I 类抗心律失常药物中  $\text{Na}^+$  通道阻滞剂的特性相似。Ju 对钠通道的整体抑制作用表明其在未来具有很好地治疗应用前景。分子对接研究表明, JuB 与 rNav1.5 的 VSD III 的跨膜螺旋结构在 Asp1425 和 Glu1416 位点处形成 2 个氢键, 另外 3 个氢键, 即 Gly1717、Ala1688 和 Ser1720, 结合在 VSD IV 区域。JuB 与 rNav1.5/ QQQ 中 VSD III 的 Lys1410 和 VSD IV 的 Ala1688 和 Glu1687 位点形成氢键 (插页XX图 6)。计算模型的结果进一步验证了 JuB 对大鼠心肌细胞电压门控  $\text{Na}^+$  通道的抑制作用。

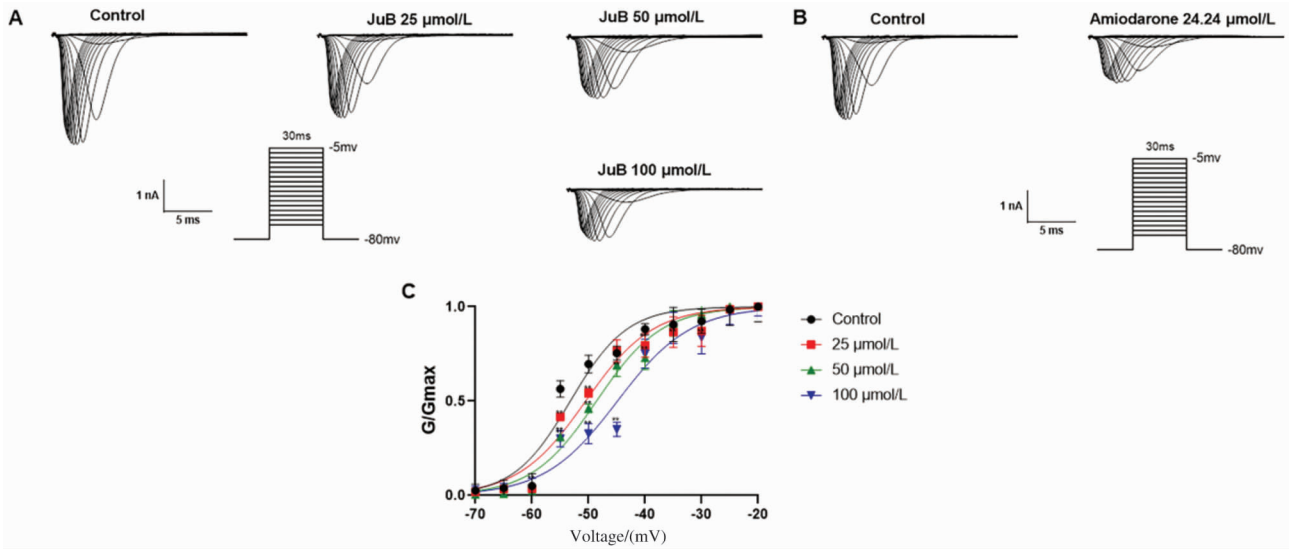
我们的研究初步表明, JuB 影响心肌细胞电压门控钠通道的电流、减缓激活、加速失活, 延长从失活到激活的恢复时间, 提示 JuB 可能作为潜在的新型 I 类抗心律失常和心肌保护药物的治疗前景。然而, 理想的抗心律失常药物应该影响多离子通道电流, 并同时调节相应的通道基因和蛋白表达水平, 以恢复离子通道功能的平衡从而使异常的动作电位恢复正常。所以, 后续应全面地探索 JuB 对心脏其他离子通道特异性调节作用的电生理机制和在体实验数据的研究。

#### 参考文献

- [1] ROTH G A, MENSAH G A, JOHNSON C O, et al. Global burden of cardiovascular diseases and risk factors, 1990 - 2019: update from the GBD 2019 study [J]. J Am Coll Cardiol, 2020, 76 (25): 2982 - 3021.
- [2] MAURYA S, MILLS R W, KAHNERT K, et al. Outlining cardiac ion channel protein interactors and their signature in the human electrocardiogram [J]. Nat Cardiovasc Res, 2023, 2(7): 673 - 692.
- [3] LEI M, SALVAGE S C, JACKSON A P, et al. Cardiac arrhythmogenesis: roles of ion channels and their functional modification [J]. Front Physiol, 2024, 15: 1342761.
- [4] YOUNG W J, HAESSLER J, BENJAMINS J W, et al. Genetic architecture of spatial electrical biomarkers for cardiac arrhythmia and relationship with cardiovascular disease [J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 1411.
- [5] NOWAK M B, GREER - SHORT A, WAN X, et al. Intercellular sodium regulates repolarization in cardiac tissue with sodium channel gain of function [J]. Biophys J, 2020, 118(11): 2829 - 2843.
- [6] RIVAUD M R, DELMAR M, REMME C A. Heritable arrhythmia syndromes associated with abnormal cardiac sodium channel function: ionic and non - ionic mechanisms [J]. Cardiovasc Res, 2020, 116

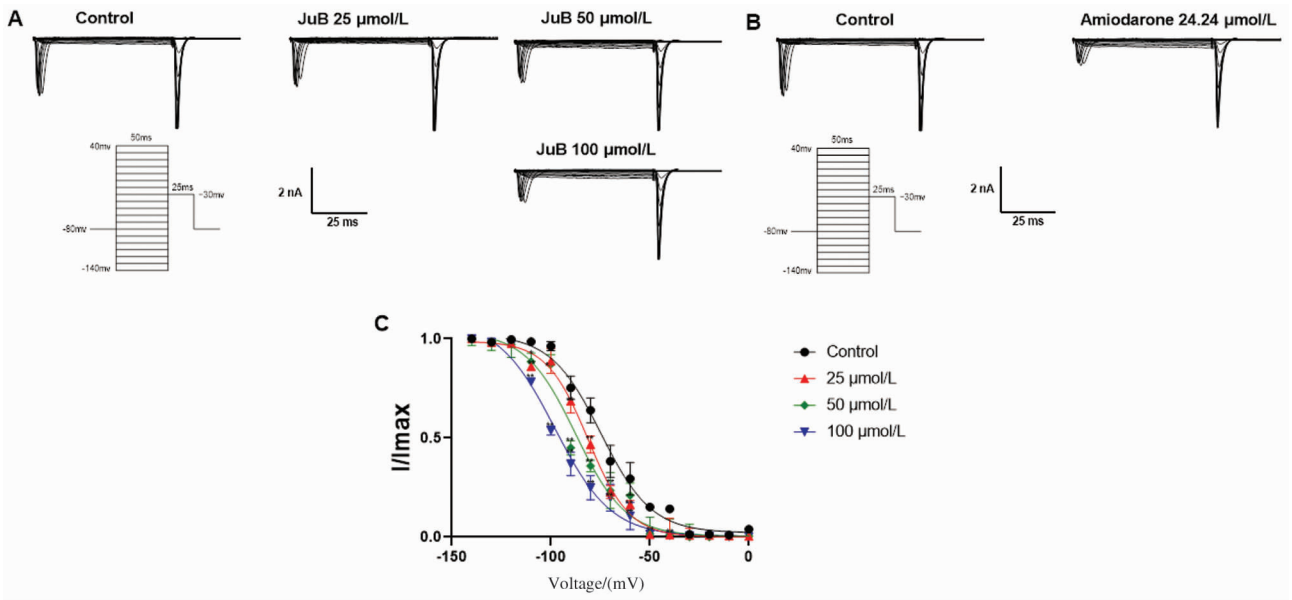
- (9):1557–1570.
- [7] BENDEL P, DYBKOVA N, TIRIOMIS P, et al. Detrimental proarrhythmic interaction of  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II and  $Na_v1.8$  in heart failure[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 6586.
- [8] NAKAJIMA T, DAVIES S S, MATAFONOVA E, et al. Selective gamma-ketoaldehyde scavengers protect  $Na_v1.5$  from oxidant-induced inactivation[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2010, 48(2): 352–359.
- [9] REMME C A, BEZZINA C R. Sodium channel (dys)function and cardiac arrhythmias[J]. *Cardiovasc Ther*, 2010, 28(5): 287–294.
- [10] REMME C A, WILDE A A. Targeting sodium channels in cardiac arrhythmia[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2014, 15: 53–60.
- [11] ZAYTSEVA A K, KULICHIK O E, KOSTAREVA A A, et al. Biophysical mechanisms of myocardium sodium channelopathies[J]. *Pflugers Arch*, 2024, 476(5): 735–753.
- [12] REMME C A. SCN5A channelopathy: arrhythmia, cardiomyopathy, epilepsy and beyond[J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2023, 378(1879): 20220164.
- [13] DONG C, WANG Y, MA A, et al. Life cycle of the cardiac voltage-gated sodium channel  $Na_v1.5$ [J]. *Front Physiol*, 2020, 11: 609733.
- [14] JIANG D, SHI H, TONGGU L, et al. Structure of the cardiac sodium channel[J]. *Cell*, 2020, 180(1): 122–134. e10.
- [15] WANG Z, VERMIJ SH, SOTTAS V, et al. Calmodulin binds to the N-terminal domain of the cardiac sodium channel  $Na_v1.5$ [J]. *Channels (Austin)*, 2020, 14(1): 268–286.
- [16] DE SENSI F, DE POTTER T, CRESTI A, et al. Atrial fibrillation in patients with diabetes: molecular mechanisms and therapeutic perspectives[J]. *Cardiovasc Diagn Ther*, 2015, 5(5): 364–373.
- [17] TADROS R, TAN HL, ESCAPE – NET INVESTIGATORS, et al. Predicting cardiac electrical response to sodium-channel blockade and Brugada syndrome using polygenic risk scores[J]. *Eur Heart J*, 2019, 40(37): 3097–3107.
- [18] SOBOTA V, GATTA G, VAN HUNNIK A, et al. The acetylcholine-activated potassium current inhibitor XAF-1407 terminates persistent atrial fibrillation in goats[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 11: 608410.
- [19] LI M T, DU Y Y, ZHONG F, et al. Inhibitory effects of alopeline on voltage-gated  $Na^+$  channels in rat ventricular myocytes[J]. *Nauyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol*, 2021, 394(7): 1579–1588.
- [20] GU Y W, WANG J R, LI M T, et al. Inhibitory effects of nobiletin on voltage-gated  $Na^+$  Channel in rat ventricular myocytes based on electrophysiological analysis and molecular docking method[J]. *Int J Mol Sci*. 2022, 23(23): 15175.
- [21] WANG W, WANG Y, PEI H Y, et al. The mechanism of simultaneous intake of Jujuboside A and B in the regulation of sleep at the hypothalamic level[J]. *Aging (Albany NY)*, 2023, 15(18): 9426–9437.
- [22] JIN B H, BAI W J, ZHAO J J, et al. Jujuboside B inhibits febrile seizure by modulating AMPA receptor activity[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2022, 304: 116048.
- [23] KIM N, KIM C, RYU S H, et al. Jujuboside B inhibited high mobility group box protein 1-mediated severe inflammatory responses in human endothelial cells and mice[J]. *J Med Food*, 2023, 26(1): 40–48.
- [24] KIM C, JEONG Y H, KIM N, et al. Hepatoprotective functions of jujuboside B[J]. *Journal of Natural Medicines*, 2023, 77(1): 87–95.
- [25] SEO E J, LEE S Y, KANG S S, et al. Zizyphus jujuba and its active component jujuboside B inhibit platelet aggregation[J]. *Phytotherapy Research*, 2013, 27(6): 829–834.
- [26] JI Z X, LI J Q, WANG J B. Jujuboside B inhibits neointimal hyperplasia and prevents vascular smooth muscle cell dedifferentiation, proliferation, and migration via activation of AMPK/PPAR- $\gamma$  signaling[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 672150.
- [27] ZHAO Y X, ZHANG X, LI J N, et al. Jujuboside B reduces vascular tension by increasing  $Ca^{2+}$  influx and activating endothelial nitric oxide synthase[J]. *PLoS One*, 2016, 11(2): e0149386.
- [28] ZHANG P, LAI X, ZHU M H, et al. Jujuboside B suppresses angiogenesis and tumor growth via blocking VEGFR2 signaling pathway[J]. *Heliyon*, 2023, 9(6): e17072.
- [29] GUINAMARD R, HOF T, SALLÉ L. Current recordings at the single channel level in adult mammalian isolated cardiomyocytes[J]. *Methods Mol Biol*, 2014, 1183: 291–307.
- [30] RIGSBY R E, PARKER A B. Using the PyMOL application to reinforce visual understanding of protein structure[J]. *Biochem Mol Biol Educ*, 2016, 44(5): 433–437.
- [31] CHEN F, LIU H, SUN H Y, et al. Assessing the performance of the MM/PBSA and MM/GBSA methods. 6. Capability to predict protein-protein binding free energies and re-rank binding poses generated by protein-protein docking[J]. *Phys Chem Chem Phys*, 2016, 8(32): 22129–22139.
- [32] LI Z Q, JIN X Q, WU T, et al. Structure of human  $Na_v1.5$  reveals the fast inactivation-related segments as a mutational hotspot for the long QT syndrome[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118(11): e2100069118.
- [33] YAMPOLSKY P, KOENEN M, MOSQUEIRA M, et al. Augmentation of myocardial If dysregulates calcium homeostasis and causes adverse cardiac remodeling[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 3295.
- [34] PAN X J, LI Z Q, JIN X Q, et al. Comparative structural analysis of human  $Na_v1.1$  and  $Na_v1.5$  reveals mutational hotspots for sodium channelopathies[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2022, 119(12): 12101.
- [35] JIANG D H, ZHANG J T, XIA Z Y. Structural advances in voltage-gated sodium channels[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 908867.
- [36] LI Z Q, JIN X Q, WU T, et al. structural basis for pore blockade of the human cardiac sodium channel  $nav1.5$  by the antiarrhythmic drug quinidine[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2021, 60(20): 11474–11480.
- [37] POULSEN P C, SCHRÖLKAMP M, BAGWAN N, et al. Quantitative proteomics characterization of acutely isolated primary adult rat cardiomyocytes and fibroblasts[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2020, 143: 63–70.





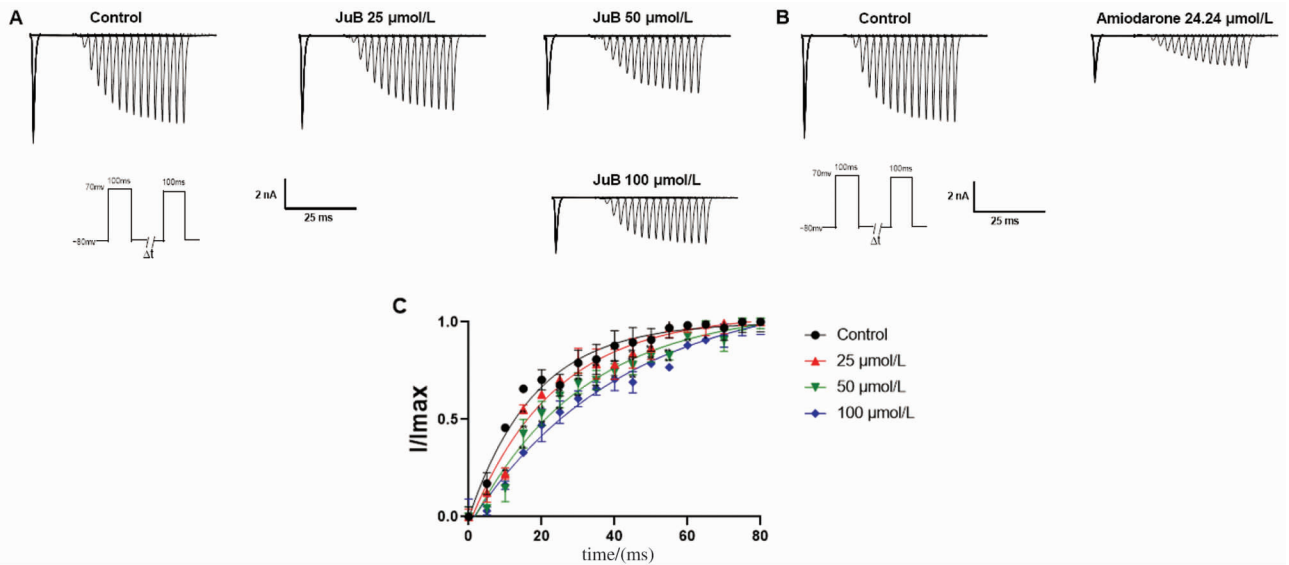
注:A 不同浓度 JuB 对  $I_{\text{Na}}$  激活曲线作用的原始电流图;B 24.24  $\mu\text{mol/L}$  胺碘酮对  $I_{\text{Na}}$  激活曲线作用的原始电流图;C JuB 对  $I_{\text{Na}}$  激活曲线作用的拟合图。 $n=6$ ,与对照组相比, $P<0.05$ 。

图3 JuB 和胺碘酮对大鼠心肌细胞  $I_{\text{Na}}$  激活曲线的影响



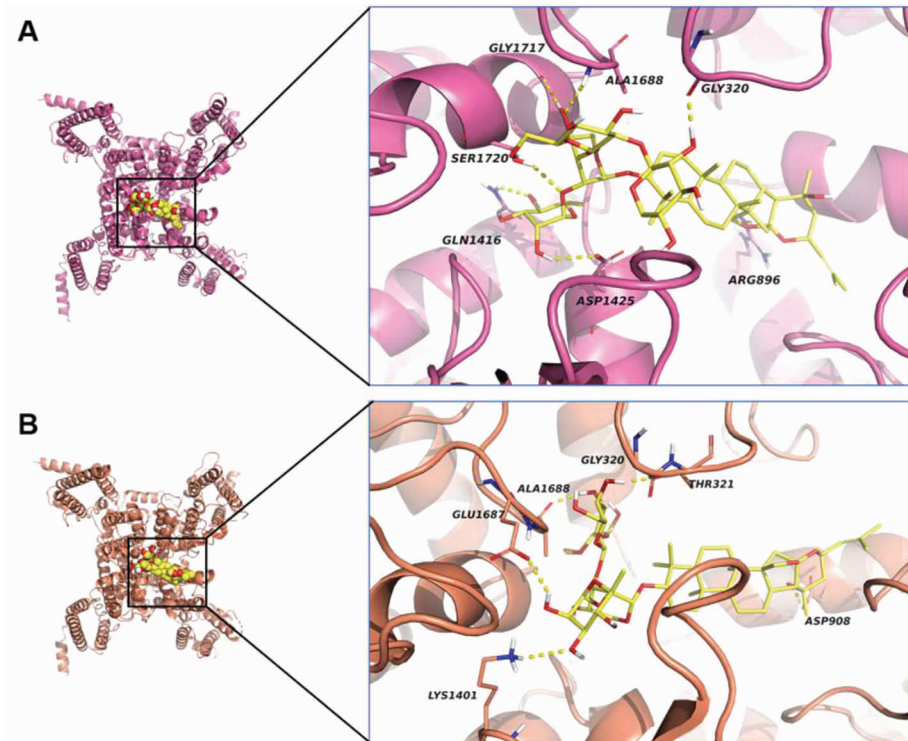
注:A 不同浓度 JuB 对  $I_{\text{Na}}$  失活曲线作用的原始电流图;B 24.24  $\mu\text{mol/L}$  胺碘酮对  $I_{\text{Na}}$  失活曲线作用的原始电流图;C JuB 对  $I_{\text{Na}}$  失活曲线作用的拟合图。 $n=6$ ,与对照组相比, $P<0.05$ 。

图4 JuB 和胺碘酮对大鼠心肌细胞  $I_{\text{Na}}$  失活曲线的影响



注:A 不同浓度 JuB 对  $I_{Na}$  失活后恢复曲线作用的原始电流图;B 24.24  $\mu\text{mol/L}$  胺碘酮对  $I_{Na}$  失活后恢复曲线作用的原始电流图;C JuB 对  $I_{Na}$  失活后恢复曲线作用的拟合图。 $n=6$ ,与对照组相比, $P<0.05$ 。

图5 JuB 和胺碘酮对大鼠心肌细胞  $I_{Na}$  失活后恢复曲线的影响



注:rNav1.5(A)和 rNav1.5/3QQ(B)活性域中与 JuB 结合的关键靶点已标出,配体和结构域蛋白的残基形成的氢键注释为黄色虚线。

图6 JuB 和 大鼠电压门控钠通道(rNav1.5)和开放态结构(rNav1.5/3QQ)的对接示意图