

# 氯苄律定对豚鼠心肌细胞钾通道的抑制作用

李海涛 戴德哉 吴才宏<sup>1</sup> 周培爱<sup>1</sup> 郝雪梅<sup>1</sup>

(中国药科大学药理学研究室,南京 210009, <sup>1</sup>北京大学生命科学院,北京 100871)

**摘要** 氯苄律定是四氢小檗碱的衍生物,具有抗心律失常作用,常规电生理发现其延长 APD<sub>50</sub>及减少心肌钾的丢失,本文研究它对心肌钾通道的影响。采用膜片钳全细胞记录的方法,研究氯苄律定对豚鼠心肌钾离子通道的作用。氯苄律定在 3<sup>μ</sup> mol/L, 10<sup>μ</sup> mol/L 和 30<sup>μ</sup> mol/L 抑制延迟整流钾电流分别为 15.7% ± 2.4%, 36% ± 3%, 59% ± 6%, 同样浓度下对内向整流钾通道无明显抑制作用。氯苄律定抗心律失常作用与抑制延迟整流钾通道有关。

**关键词** 氯苄律定; 膜片钳; 心肌细胞; 钾通道; 抗心律失常药

氯苄律定是新合成的四氢小檗碱衍生物,有抗多种模型心律失常作用,延长豚鼠心肌的 APD<sub>50</sub>及家兔在位心肌单相动作电位 APD<sub>50</sub><sup>[1]</sup>。由于 APD<sub>50</sub>主要反映钾外向电流的时间过程,所以氯苄律定可能阻滞了钾外向电流。氯苄律定可阻滞缺血再灌心肌细胞外钾离子的聚集<sup>[2]</sup>。为进一步揭示该药的作用机制,加快其开发利用。我们采用膜片钳技术研究其对豚鼠心肌细胞钾通道作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物

豚鼠,♂, 200~250 g,由北京大学动物房和北京医科大学动物房提供。

### 1.2 药物与试剂

氯苄律定由本校药物化学教研室提供。硫霉胰蛋白酶(Pronase E)及牛血清白蛋白(BSA), Sigma 产品,其余试剂为市售分析纯。

溶液 1(无钙盐溶液 mmol/L): NaCl 116, KCl 5.4, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.4, NaHCO<sub>3</sub> 1.5, MgSO<sub>4</sub> 1.2, 葡萄糖 15, pH = 7.35

溶液 2(酶液 mmol/L): NaCl 116, KCl 5.4, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.4, NaHCO<sub>3</sub> 1.5, MgSO<sub>4</sub> 1.2, CaCl<sub>2</sub> 0.15, 葡萄糖 15, 加硫霉胰蛋白酶 0.1 mg/ml, pH = 7.35

溶液 3(细胞贮存液 mmol/L): NaCl 116,

KCl 5.4, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.4, NaHCO<sub>3</sub> 1.5, MgSO<sub>4</sub> 1.2, CaCl<sub>2</sub> 1.8, 葡萄糖 15, 加 BSA 0.5 mg/ml, pH = 7.35

营养灌流液 (mmol/L): KCl 5.4, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.4, NaHCO<sub>3</sub> 1.5, MgSO<sub>4</sub> 1.2, CaCl<sub>2</sub> 1.8, 葡萄糖 15, pH = 7.4

电极液 (mmol/L): KCl 150, MgCl<sub>2</sub> 5, EDTA 10, HEPES 5, pH = 7.2

### 1.3 仪器

倒置显微镜(Olympus IM T-2, Japan), 微电极拉制器(Narishige PP-93, Japan), 玻璃微电极(中国科学院上海生理所出品), 微操纵控制器(Narishige MD-302 Medical System Corp Green Vale NY, USA), 膜片钳放大器(Patch clamp EPC-7, List, German), A/D, D/A转换板(Labmaster Model TL-1, Axon Instruments, Inc. CA, USA), 计算机(Casada, USA), 程序软件(Pclamp 5.51, Axon instruments, Inc.)。

### 1.4 单个豚鼠心室肌细胞的分离

取豚鼠,击头致昏后经颈动脉放血,迅速开胸取心,置 0℃ 的溶液 1 中。心脏经去除周围结缔组织后连于 Langendorff 灌流装置。经主动脉逆行灌流,灌流液中持续通入 95% O<sub>2</sub>+5% CO<sub>2</sub>, 保温 37℃。灌流心脏 6~7 min 后,换用溶液 2 灌流 3 min 左右,直到流出液变得粘稠,拉丝,心脏变得柔

软松驰为止。取下心脏,剪除心房,将心室肌剪为小块,再置上述含酶溶液中37°C条件下温孵、搅拌,约5 min后倾出上层液体。用溶液3稀释5倍,此为第一份细胞贮存液。而温孵液中的沉淀部分,可再用溶液2温孵搅拌10 min,吸取上清液,再用溶液3稀释5倍,此为第二份细胞贮存液,两份贮存液中一般都有20%~50%左右的杆状细胞,可做以下的电生理研究。

### 1.5 电生理记录

吸取上述贮存液中的细胞悬液,滴入细胞浴槽的底面盖玻片上,于倒置显微镜下观察等细胞贴壁后,用营养液持续灌流,流速为1.5~2.0 ml/min,保持浴槽中浴液体积2 ml,记录用微电极分两步拉制尖端直径约1μm左右的微管电极。尖端无需抛光<sup>[3]</sup>。电极液游离Ca<sup>2+</sup>浓度近似10~8 mol/L,经0.3~0.45 mm的微孔滤膜后充灌电极,细胞浴槽通过含AgCl导线的琼脂盐桥接地。电极经微操纵器控制于适当位置。等电极进入溶液后,补偿由液-金属(电极液与连接放大器的电极内导线)和液-液间形成的接点电位(junctional potential)。在电极附加一小的负向电压(-2 mV),由所得的电流反应根据欧姆定律R=V/I计算电极阻抗及封接电阻(本实验所用之电极阻抗为2~5 MΩ)。待电极尖端接触细胞表面后,经一负压吸引,使形成千兆欧封接(即giga-seal),继续加大负压直到吸破膜片,使电极内液与细胞内液相通,而与胞外近似绝缘,即形成“全细胞”(whole cell)状态。由未补偿的电容瞬量衰减估测串联电阻,大约相当于电极阻抗的1.5~2倍。根据需要对串联电阻进行补偿至80%以上,因此即使测定的电流达10 nA,由未补偿的串联电阻所产生的电压误差也不会超过8 mV,因此对测定值无需再作校正。调节电容补偿旋钮使电容瞬量在3 ms内完全衰减至基线水平,这样使其对所测电流的影响尽可能的小。

电流电压信号用EPC-7型膜片钳放大器放大,经A/D,D/A转换板与一台CASADA计算机相连电压钳制,信号采集与贮存,刺激信号的发放及结果分析等功能均借助计算机通过Pclamp 5.51程序完成,采样速度从20~100 kHz,电流电压信号在10 kHz滤波,经数字化处理后贮存于Maxell磁盘中。

测定细胞动作电位用电流钳制状态(current-

clamp)施以2倍阀强度刺激,频率0.5 Hz,测定膜离子电流时间用电压钳制状态(voltage-clamp),这时内向钠通道和T型钙通道已基本失活。在研究延迟整流钾通道电流(delayed rectifier K current I<sub>K</sub>)时,为消除I<sub>Ca</sub>对结果的影响,于溶液中加入了100 μmol/L的CdCl<sub>2</sub>。由于两种钾通道在激活及失活动力学上的明显差异,无需再用选择性阻滞剂(事实上也无特别有效的选择性阻滞剂)将对方抑制以利观察<sup>[4]</sup>。

### 1.6 数据分析

测定I<sub>K</sub>钳制电压-40 mV,去极化到+50 mV,保持时间由550 ms,每875 ms连续去极化5次到4040 ms,这时去极化过程中可见到一逐渐增加的电流,此代表I<sub>K</sub>,复极化过程完成后可见到一外向尾电流,它代表I<sub>Ktail</sub>

测定I<sub>Ktail-plateau</sub>钳制电压-40 mV,每步10 mV直到+40 mV,时间为4500 ms,此可见一电流代表I<sub>Ktail-plateau</sub>

测定I<sub>K</sub>:钳制电压-40 mV,在-100 mV到+30 mV之间,每隔10 mV连续去极化14次,脉冲保持时间为250 mV,脉冲结尾处的膜电流值代表I<sub>K</sub>

测定动作电位:给以0至+600 pA,23 ms的电流脉冲,可记录到细胞的动作电位。

所有操作均在室温(17~20°C)下进行,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,经配对t检验进行统计,<sup>\*</sup>P<0.05,<sup>\*\*</sup>P<0.01,<sup>\*\*\*</sup>P<0.001

## 2 结果

### 2.1 氯苯律定对单细胞动作电位的影响

豚鼠心室肌细胞在给氯苯律定0.15 μmol/L后,细胞动作电位平台期逐渐受抑,动作电位时程(APD)缩短,而AP幅度(APA)无明显改变,此为动作电位自然衰减,当用0.45 μmol/L灌流时,动作电位平台延长,动作电位时程延长。这与我室以前做的一系列常规微电极实验相吻合<sup>[1]</sup>。

### 2.2 氯苯律定对延迟整流钾电流的影响

在营养灌流液中加入CdCl<sub>2</sub>100 μmol/L,5 min后完全阻断内向钙电流由保持电压-40 mV去极化至+50 mV,可见到一随时间变化的延迟外向钾电流(I<sub>K</sub>)和一外向尾电流(I<sub>Ktail</sub>),其具有电压和时间依赖性。氯苯律定对I<sub>Ktail</sub>在3,10,30 μmol/L

$I_L$ 抑制率分别为 $15.7\% \pm 2.4\%^*$ , $36\% \pm 3\%^{**}$ , $59\% \pm 6\%^{***}$ (n=6),洗脱5~15 min未见明显改变。 $3\mu\text{mol/L}$ 下,氯苯律定对 $I_K$ 有明显抑制反应,抑制率30%,n=6, $P < 0.01$ 。氯苯律定抑制时间依赖的 $I_K$ 及 $I_{tail}$ 对 $I_{tail}$ 具明显的浓度依赖作用。

氯苯律定对 $I_{tail-plateau}$ 的影响,在电压负值时,抑制不明显,尾电流数值也较小,从-10 mV~-+40 mV抑制明显,尾电流数值较大,说明 $I_{tail}$ 是一电压依赖性电流,氯苯律定对其具有抑制作用。以上有4个细胞作为空白对照, $I_K$ 、 $I_{tail}$ 及 $I_{tail-plateau}$ 在相等的时间间隔内未见减少,因而 $I_K$ 、 $I_{tail}$ 及 $I_{tail-plateau}$ 的电流幅度减少,直接是由于氯苯律定作用所引起的,而不是因为run-down自发地改变的。

洗脱5,10及15 min均未见明显改变。

### 2.3 氯苯律定对 $I_K$ 的影响

细胞膜保持电位为-40 mV,在-100 mV至+30 mV之间,每隔10 mV连续去极化14次,脉冲保持时间为250 ms,脉冲结尾处的膜电流值代表内向整流钾电流,此电流随电压的变化即电流电压曲线(I-V曲线)表现为N型。氯苯律定 $3\mu\text{mol/L}$ , $10\mu\text{mol/L}$ 各给药5 min和10 min,对该电流影响无统计学显著意义(n=6)。

## 3 讨 论

本实验结果显示氯苯律定抑制 $I_{tail}$ 以及 $I_K$ ,说明在常规电生理研究中氯苯律定延长APD<sub>50</sub>作用是由于 $I_K$ 被抑制所致,澄清了以往的疑问。

$I_K$ 为一种去极化激活的时间依赖性电流,其激活与其失活过程均较慢,在短时间内难以达到稳定,故在测定时去极化时间应保持足够长(本实验用4 s)。在去极化过程中可见一逐渐增加的电流,此代表 $I_K$ 的激活,显然此期易受到其它去极化电流的影响,而在复极化过程完成后常立即出现一外向尾电流,它代表 $I_K$ 的缓慢失活过程,由于尾电流不易受到其它电流成分的影响<sup>[4~6]</sup>,且随去极时程的延长该电流与 $I_K$ 的激活程度成比例增加<sup>[5]</sup>。

$I_K$ 在很多情况下,它不仅仅代表 $I_K$ ,而是多种 $K^+$ 外流成分的综合表现。受到诸如 $Na^+$ 电流及 $Na^+-Ca^{2+}$ 交换电流等影响<sup>[6]</sup>。故现在将 $I_{tail}$ 代表纯净的延迟整流钾电流。UK-68, 798, E-4031及MS-551均可特异地阻断这一电流,这三种药都

正在开发为抗心律失常新药。本实验我们以尾电流为观测指标。在 $3\mu\text{mol/L}$ 时对 $I_K$ 有明显抑制作用,对 $I_{tail}$ 电平(即 $I_{tail-plateau}$ )<sup>[7]</sup>的影响,随电压升高,尾电流值也逐渐增大。氯苯律定对其抑制程度也逐渐增大。由于 $I_K$ 受抑,复极化时间变长,从而延长APD及ERP,使病变心肌动作电位和传导方面不均一性减少,发挥抗心律失常作用。本实验得出在3~30 $\mu\text{mol/L}$ 剂量依赖性地抑制 $I_{tail}$ ,说明也具III类药作用特征,根据我室以往电生理研究显示氯苯律定明显抑制 $V_{max}$ <sup>[1]</sup>。与同济医科大学作出的 $100\mu\text{mol/L}$ 剂量抑制钠电流一致,说明其亦具I类抗心律失常药特征。

实验中,发现对 $I_K$ 及 $I_{tail}$ 的抑制洗脱5,10及15 min后,电流值无明显改变。可能是氯苯律定吸附较持久所致。我室以往研究发现氯苯律定虽 $t_{1/2}$ 只有1~2 h,但其抑制心律失常作用却较lidocaine显示更持久效应。一天给药一次即可,而lidocain却必须连续静注以维持一定的血药浓度,该结论与我们得出的不易洗脱,即对心肌细胞具长久吸附作用一致。

## 参 考 文 献

- 于 锋,戴德哉,黄君等. 氯苯律定对心肌动作电位的影响. 新药基金会会报, 1991, 1: 83.
- 戴德哉,安鲁凡,黄君等. 氯苯律定提高心肌内钾阻断 $\alpha$ 受体及负性肌力作用. 新药基金会会报, 1991, 1: 58.
- Lauer M R, Gunn MD, Clusin W T. Endothelin activates voltage-dependent  $Ca^{2+}$  Current by a G protein-dependent mechanism in Rabbit cardiac myocytes. *J Physiol (Lond)*, 1992, 448: 729.
- Hadley RW, Ilume JR. Permeability of time-dependent  $K^+$  channel in Guinea-Hg ventricular myocytes to  $Cs^+$ ,  $Na^+$ ,  $NH_4^+$  and  $Rb^+$ . *Am J Physiol*, 1990, 259 H 1448.
- Matsuura H, Ehara T, Imoto Y. An analysis of the delayed outward current in single ventricular cells of the Guinea-pig. *Pflugers Arch*, 1987, 410: 596.
- Weltwer E, Scholtysik G, Schoad A, et al. Effects of the new class III antiarrhythmic drug E-4031 on myocardial contractility and electrophysiological parameters. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1991, 17: 480.
- Zhang Zhi-Hao, Christopher HF, Jonnalagadda S, et al. Effect of ambasilide, a new class III agent, on plateau currents in isolated Guinea Pig ventricular myocytes. Block of delayed outward potassium current. *J Pharmacol Exp Ther*, 1992, 263: 40.

# Effect of Chlorobenzyltetrahydroberberine on Potassium Channels in Isolated Guinea Pig Ventricular Myocytes

Li Haitao, Dai Dezai, Wu Caihong<sup>1</sup>, Zhou Peiai<sup>1</sup>, Hao Xuemei<sup>1</sup>

Research Division of Pharmacology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009;<sup>1</sup>  
Life Science College, Peking University Beijing 100871

**Abstract** In the routine electrophysiology, we found that chlorobenzyltetrahydroberberine prolonged the APD<sub>50</sub> and depleted the potassium collection outside the cell. For the purpose of detecting chlorobenzyltetrahydroberberine principle of action, we examined the effects of chlorobenzyltetrahydroberberine on both whole-cell inward rectifier potassium current( $I_K$ ) and delayed outward potassium current( $I_K$ ) in isolated guinea pig ventricular myocytes using patch-clamp techniques. Chlorobenzyltetrahydroberberine was found to reduce the delayed outward current in guinea pig ventricular myocytes when cells were depolarized by holding potential from -40 mV to +50 mV. After blocking  $\text{Ca}^{2+}$  inward current with  $\text{Cd}-\text{Cl}_2$  100 $\mu$  mol/L,  $I_K$  current can be recorded. Chlorobenzyltetrahydroberberine 3 $\mu$  mol/L inhibited the  $I_K$  30%±4% ( $P < 0.05$ ), chlorobenzyltetrahydroberberine 3 $\mu$  mol/L inhibited the  $I_{K\text{at}}$  apparently 15.7%±24% ( $P < 0.05$ ), 10 $\mu$  mol/L 36%±3% ( $P < 0.01$ ), and 30 $\mu$  mol/L 59%±6% ( $P < 0.001$ ), whereas the inward rectifier current( $I_K$ ), was not changed by chlorobenzyltetrahydroberberine from 3, 10, 30 $\mu$  mol/L. Chlorobenzyltetrahydroberberine had no effect on the I-V relationship of the inward rectifier potassium current. These results suggest that the APD<sub>50</sub> prolongation induced by chlorobenzyltetrahydroberberine was likely due to the  $I_K$  blocking effects. Chlorobenzyltetrahydroberberine was therefore a selective  $K^+$  channel blocking agent with showing class III antiarrhythmic properties.

**Key words** Chlorobenzyltetrahydroberberine; Cardiac myocyte; Potassium channels; Antiarrhythmic agent