

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¹ 周培爱¹ 郝雪梅¹

(中国药科大学药理学研究室,南京 210009, ¹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 APD₅₀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 μ mol/L, 10 μ mol/L和 30 μ mol/L抑制延迟整流钾电流分别为 15.7% \pm 2.4%, 36% \pm 3%, 59% \pm 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 APD₅₀及家兔在位心肌单相动作电位 APD₅₀^[1]。由于 APD₅₀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^[2]。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, NaH₂PO₄ 1.4, NaHCO₃ 1.5, MgSO₄ 1.2,葡萄糖 15, pH= 7.35

溶液 2(酶液 mmol/L): NaCl 116, KCl 5.4, NaH₂PO₄ 1.4, NaHCO₃ 1.5, MgSO₄ 1.2, CaCl₂ 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, NaH₂PO₄ 1.4, NaHCO₃ 1.5, MgSO₄ 1.2, CaCl₂ 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, NaH₂PO₄ 1.4, NaHCO₃ 1.5, MgSO₄ 1.2, CaCl₂ 1.8,葡萄糖 15, pH= 7.4

电极液 (mmol/L): KCl 150, MgCl₂ 5, EDTA 10, HEPES 5, pH= 7.2

1.3 仪器

倒置显微镜 (Olympus IMT-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 (Lab-master 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% O₂+ 5% CO₂,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

松软弛为止。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成尖端直径约 $1\mu\text{m}$ 左右的微管电极。尖端无需抛光^[3]。电极液游离 Ca^{2+} 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 M Ω)。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 倍阈强度刺激,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_K)时,为消除 I_{Ca} 对结果的影响,于溶液中加入 $100\mu\text{mol/L}$ 的 CdCl_2 。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^[4]。

1.6 数据分析

测定 I_K 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_K ,复极化过程完成后可见到一外向尾电流,它代表 I_{Ktail} 。

测定 $I_{Ktail-plateau}$ 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 $I_{Ktail-plateau}$ 。

测定 I_{Kr} 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 ms,脉冲结尾处的膜电流值代表 I_{Kr} 。

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 $^{\circ}\text{C}$)下进行,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,经配对 t 检验进行统计,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。

2 结果

2.1 氯苄律定对单细胞动作电位的影响

豚鼠心室肌细胞在给氯苄律定 $0.15\mu\text{mol/L}$ 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 $0.45\mu\text{mol/L}$ 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^[1]。

2.2 氯苄律定对延迟整流钾电流的影响

在营养灌流液中加入 CdCl_2 $100\mu\text{mol/L}$, 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_K)和一外向尾电流(I_{Ktail}),其具有电压和时间依赖性。氯苄律定对 I_{Ktail} 在 3, 10, 30 $\mu\text{mol/L}$

I_K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, 氯苄律定对 I_K 具明显抑制反应, 抑制率 30%, $n=6$, $P<0.01$ 氯苄律定抑制时间依赖的 I_K 及 I_{Ktail} 对 I_{Ktail} 具明显的浓度依赖作用。

氯苄律定对 I_{Ktail-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_{Ktail} 是一种电压依赖性电流, 氯苄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_{Ktail} 及 I_{Ktail-plateau} 在相等的时间间隔内未见减少, 因而 I_K, I_{Ktail} 及 I_{Ktail-plateau} 的电流幅度减少, 直接是由于氯苄律定作用所引起的, 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 氯苄律定对 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。氯苄律定 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

本实验结果显示氯苄律定抑制 I_{Ktail} 以及 I_K, 说明在常规电生理研究中氯苄律定延长 APD₅₀ 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^[4~6], 且随去极化时间的延长该电流与 I_K 的激活程度成比例增加^[5]。

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⁺-Ca²⁺ 交换电流等影响^[6]。故现在将 I_{Ktail} 代表纯净的延迟整流钾电流。UK-68, 798, E-4031 及 MS-551 均可特异性地阻断这一电流, 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_{Ktail} 电平 (即 I_{Ktail-plateau})^[7] 的影响, 随电压升高, 尾电流值也逐渐增大。氯苄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_{Ktail}, 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苄律定明显抑制 V_{max}^[1]。与同济医科大学作出的 1~100 $\mu\text{mol/L}$ 剂量抑制钠电流一致, 说明其亦具 I_K 类抗心律失常药特征。

实验中, 发现对 I_K 及 I_{Ktail} 的抑制洗脱 5, 10 及 15 min 后, 电流值无明显改变。可能是氯苄律定吸附较持久所致。我室以往研究发现氯苄律定虽 $t_{1/2}$ 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 lidocaine 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

- 1 于锋, 戴德哉, 黄君等. 氯苄律定对心肌动作电位的影响. 新药基金会会报, 1991, 1: 83
- 2 戴德哉, 安鲁凡, 黄君等. 氯苄律定提高心肌内钾阻断 α 受体及负性肌力作用. 新药基金会会报, 1991, 1: 58
- 3 Lauer MR, Gunn MD, Clusin WT. Endothelin activates voltage-dependent Ca²⁺ Current by a G protein-dependent mechanism in Rabbit cardiac myocytes. *J Physiol (Lond)*, 1992, 448: 729
- 4 Hadley RW, Ilume JR. Permeability of time-dependent K⁺ channel in Guinea-Hg ventricular myocytes to Cs⁺, Na⁺, NH₄⁺ and Rb⁺. *Am J Physiol*, 1990, 259: H1448
- 5 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
- 6 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
- 7 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 Caihong¹, Zhou Peiai¹, Hao Xuemei¹

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

Abstract In the routine electrophysiology, we found that chlorobenzyltetrahydroberberine prolonged the APD₅₀ 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_{K1}) 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 Ca²⁺ inward current with CdCl₂ 100 μmol/L, I_K current can be recorded. Chlorobenzyltetrahydroberberine 3 μmol/L inhibited the I_K 30% ± 4% (P < 0.05), chlorobenzyltetrahydroberberine 3 μmol/L inhibited the I_{Kai} apparently 15.7% ± 24% (P < 0.05), 10 μmol/L 36% ± 3% (P < 0.01), and 30 μmol/L 59% ± 6% (P < 0.001), whereas the inward rectifier current(I_{K1}), was not changed by chlorobenzyltetrahydroberberine from 3, 10, 30 μmol/L. Chlorobenzyltetrahydroberberine had no effect on the I-V relationship of the inward rectifier potassium current. These results suggest that the APD₅₀ 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