

无钾、低钠溶液诱发的豚鼠乳头肌触发活动及维拉帕米和蝙蝠葛苏林碱的抑制效应

张陆勇 季慧芳¹ 张 晖

(中国药科大学新中新药研究开发中心, 生理学教研室, 南京 210009)

摘 要 延迟后除极引起的触发活动是心律失常发生的细胞机制之一。触发活动是由于心肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 升高并使之发生振荡所致。本实验应用标准微电极技术, 观察了豚鼠乳头肌标本用含四乙基胺的无钾、低钠溶液灌流后, 诱导触发活动的情况。结果表明, 上述溶液可诱导出较稳定且可逆的触发活动。维拉帕米 ($11\mu\text{mol/L}$) 和蝙蝠葛苏林碱 ($50\mu\text{mol/L}$) 对触发活动均有一定的抑制作用, 但不能完全消除电位振荡。这种触发活动模型有助于研究抗心律失常药对心肌电活动的作用机制。

关键词 延迟后除极; 触发活动; 维拉帕米; 蝙蝠葛苏林碱

延迟后除极 (delayed afterdepolarizations, DAD) 引起的触发活动 (triggered activity, TA) 是心律失常发生的细胞机制之一^[1~3]。由于 TA 的易变性和不可预见性, 给人们评价药物的作用和研究 TA 的发生机制带来了一定困难。因此, 有必要建立一种较稳定而且可逆的 TA 模型。目前认为, 引起 TA 的 DAD 是由于心肌 $[Ca^{2+}]_i$ 升高, 并使之发生振荡所致^[1]。诱发 DADs 和 TA 的常见因素有: 高频冲动, 哇巴因, 咖啡因, 金刚烷胺, 儿茶酚胺等药物中毒, 低 K^+ 、高 Ca^{2+} 、低 Na^+ 环境, 心肌缺血再灌及某些致早后除极的因素等^[3]。尽管这些因素所引起的 TA 作用机制有所不同, 但均可引起心肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 升高。本实验采用无 K^+ 、低 Na^+ 溶液在豚鼠乳头肌标本上诱发出 DADs 及 TA, 同时观察了维拉帕米 (verapamil, Ver) 和蝙蝠葛苏林碱 (daurisorline, Dau) 对 TA 影响。

1 材料与方法

按文献^[4]制备豚鼠乳头肌标本, 以铂金丝双电极刺激标本, 刺激频率为 1 Hz, 波宽 1 ms, 强度为舒张阈的 150%, 标本稳定 1h 后开始实验, 记录电极为充以 3 mol/L KCl 的玻璃微电极, 电极电阻为

15~ 20 M Ω , 由玻璃微电极引导出的细胞跨膜电信号, 经微电极放大器 (MEZ-8201) 放大后分三路: 一路输入示波器 (SR-54) 以供监视观察; 一路输入数字磁带记录仪 (LJ-401), 先以高速录下来, 然后慢速回放至平衡记录仪 (TYPE-3066) 以描记曲线; 另一路经直流前置放大器 (FZG-1A) 放大后输入 AD 卡, 经微机采样分析, 测算动作电位 (AP) 的各项参数, 结果打印输出。四乙基胺 (tetraethylammonium, TEA) 和 Ver 为 Sigma 产品, Dau 由本校药学院提供。

2 测试步骤

标本稳定 1h 后, 将微电极插入心肌细胞内, 然后用含 TEA 的无 K^+ 、低 Na^+ 溶液 (简称 TEA 溶液, 表 1) 灌流标本, 当 TA 出现后即停止外部刺激, TA 出现 40~ 60 s 后用正常台氏液冲洗标本, 当 TA 消失后再给予外部刺激。然后用含 Ver 或 Dau 的台氏液灌流标本。约 20~ 30 min 后, 标本 AP 形态趋于稳定。此时, 用含 Ver 或 Dau 的 TEA 溶液灌流标本, 直至电活动趋于稳定, 最后再用含 Ver 或 Dau 的台氏液冲洗标本。

Tab 1. Composition of experimental solution(mol/L)

Solution	NaCl	Na ₂ SO ₄	NaHCO ₃	NaH ₂ PO ₄	KCl	CaCl ₂	MgCl ₂	TEACl	CsCl	Glucose	Sucrose
Tyrodé's	137.5	—	12.0	1.8	4.0	2.4	0.5	—	—	5.5	—
TEA	—	34.4	12.0	1.8	—	2.4	0.5	69.0	4.0	5.5	34.4

Solutions gassed with 95% O₂/5% CO₂, pH= 7.2

3 数据分析

为了便于描述结果,我们根据文献^[5]定义了两类电活动: (1) 触发活动(TA)是与延迟后除极开始或结束有关的去极化时发生的自发性节律活动,TA可分为稳定性TA与非稳定性TA两种。稳定性TA是指当用TEA溶液灌流标本时持续存在的TA,非稳定性TA是指当用TEA溶液灌流标本时TA自动结束或转变为其它形式电活动。(2) 振荡电位(oscillatory activity, OS)是指膜电位自发性振荡而未有效去极化。OS也可分为稳定性OS和非稳定性OS,稳定性OS是指当标本用TEA溶液灌流时持续存在的OS,非稳定性OS是指尽管TEA溶液持续存在,但OS会自动消失。

以上实验过程均在同一细胞上进行,表2数据分析采用配对t检验。

4 结果

4.1 TEA溶液的作用

10例标本在用TEA溶液灌流后约30~60s可诱导出TA,然后再用正常的台氏液洗脱,其动作电位各参数无明显变化($P>0.05$),见表2。

Tab 2. Effects of TEA solution on action potential parameters (\pm s, n= 10)

Groups	RP (mV)	APA (mV)	APD ₃₀ (ms)	APD ₅₀ (ms)	APD ₉₀ (ms)
Control	-84±2	125±5	164±50	223±57	283±58
Post TEA	-84±3	124±8	167±42	234±37	30±35

RP: resting potential; APA: action potential amplitude; APD₃₀, APD₅₀, APD₉₀: action potential duration measured at 30%, 50% and 90% of repolarization. Control measurements were taken after perfusion with normal Tyrodé's solution for about 30 min. Post TEA measurements were taken about 10 min after reperfusion with normal Tyrodé's solution.

4.2 Ver的作用

图1表明了Ver对TEA溶液诱发TA的典型效应,标本单独用TEA溶液灌流后(图1, A1),其最大舒张电位逐渐变小,并诱发出DAD,且DAD逐渐变大,直至诱发出TA。此时停止刺激,

用正常台氏液灌流标本(图1, A2), TA幅度逐渐变大,而频率变慢,最后以一个DAD结束。标本电位保持在一种静息状态,直至再次给予电刺激。然后标本用含Ver的正常台氏液灌流,待AP形态稳定后,用含Ver的TEA溶液灌流标本(图1, B1和B2),其最大舒张电位略变小,并出现了DAD, DAD逐渐变大,直至诱发出一种非稳定性TA,此时停止刺激,TA逐渐变小,转变为一种非稳定性OS,用含Ver的台氏液冲洗标本后,又逐渐出现了TA,且每个TA后紧跟一个DAD,最终以一个DAD结束,膜电位出现类似缓慢复极化的现象,最后稳定于-82 mV左右,类似的现象亦可见于其它3例标本(表3)。

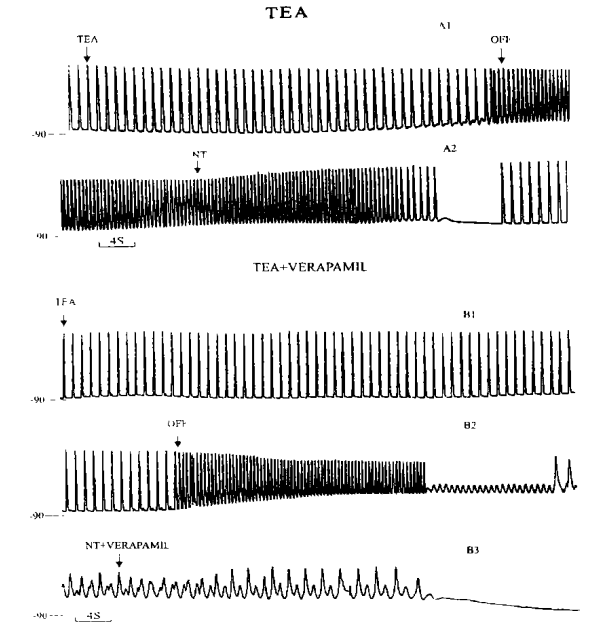


Fig 1. Effects of TEA solution and TEA solution containing verapamil on electrical activity at a guinea pig papillary muscle. A1-A2: The effects of exposure to TEA solution alone and reperfusion with normal Tyrodé's solution (NT) are shown. B1-B3: The effects of TEA solution and TEA solution containing verapamil (15 μ mol/L) and reperfusion with normal Tyrodé's solution (NT) containing verapamil are shown. OFF in A1 and B2 indicates with external stimulation was stopped. -90 in each panel indicates the level of -90 mV.

4.3 Dau的作用

图 2表明了 Dau对 TEA溶液诱发 TA的典型效应,标本用 TEA溶液灌流后,诱发出一种较稳定的 TA(图 2, A2),用正常台氏液灌流后, TA逐渐变大,变慢,最后以一个较大的 DAD结束(图 2, A3),然后标本用含 Dau的台氏液灌流,待动作电位形态稳定后,换以含 Dau的 TEA溶液灌流,约 2.5 min后,最大舒张电位逐渐变小,并诱发出一种频率较慢、幅度较小的 TA,改用含 Dau的台氏液灌流后, TA逐渐变大,变慢,后期每个 TA后紧跟一个 DAD,最后以一个较小的 DAD结束,膜电位出现类似复极化的现象,最后稳定于 - 80 mV 左右,类似的结果亦可见于其余 3个标本(表 3)。

5 讨论

以上结果表明, TEA溶液确实可重复诱发出可逆性的 TA 标本用 TEA溶液灌流后,由于细胞外无 K^+ (Na^+-K^+ 泵受抑制),低 Na^+ (Na^+-Ca^{2+} 交换受抑制),从而导致心肌细胞 $[Ca^{2+}]$ 升高。据文献报道, TEA溶液可提高心肌收缩力^[5],该现象与 $[Ca^{2+}]$ 升高的作用相符。细胞内 Ca^{2+} 超负荷, Ca^{2+} 从肌浆网周期性释放,引起胞浆内 Ca^{2+} 振荡,通过 Na^+-Ca^{2+} 交换,使 Ca^{2+} 易于排出, Na^+ 易于进入。由于 Na^+-Ca^{2+} 交换是生电性的(比例为 3:2),可引起正电荷内流,这样便产生了 DAD,当 DAD达阈电位,则触发了 TA

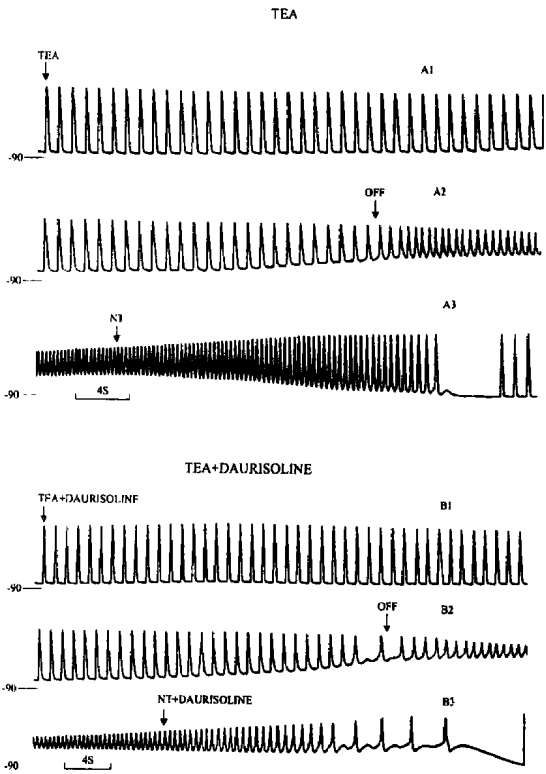


Fig 2. The effects of TEA solution and TEA solution containing daurisoline on electrical activity at a guinea pig papillary muscle. A1-A3 The effects of exposure to TEA solution alone and reperfusion with normal Tyrode's solution (NT) are shown. B1-B3 The effects of TEA solution containing daurisoline are shown. OFF in A2 and B2 indicates when external stimulation was stopped. - 90 in each panel indicates the level of - 90 mV.

Tab 3. Effect of verapamil and daurisoline on triggered activity induced by TEA solution

Potentials	Verapamil (11 μ mol/L)				Daurisoline (50 μ mol/L)			
	1	2	3	4	1	2	3	4
Maximum diastolic potential prior to TEA	85	87	85	84	85	84	86	80
Maximum diastolic potential during sustained triggered activity (- mV)	-	-	-	-	-	-	-	-
Membrane potential at which nonsustained triggered or oscillatory activity stopped (- mV)	56	58	-	43	35	40	38	-
Maximum negative potential during sustained oscillatory activity (- mV)	-	-	62	-	-	-	-	67

Ver抑制了由 TEA溶液诱发的稳定性 TA,延缓了非稳定性 TA的出现,在 4例标本中,有一例呈现出稳定性振荡电位的现象。Ver为钙通道拮抗剂,由于 Ca^{2+} 内流受阻,胞浆内 Ca^{2+} 浓度降低,因此,对 TA有一定的抑制作用。但是,据文献报道,在低 Na^+ 溶液中, Ca^{2+} 的振荡并不依赖于肌膜钙通道^[6],因此, Ver并不能完全消除稳定性电位振荡

DC)中提取的一种双苄基四氢异喹啉类生物碱,其含量仅次于抗心律失常新药蝙蝠葛碱^[7]。实验发现 Dau对心肌电生理特性的影响与蝙蝠葛碱相似,且作用更明显。本实验同时观察了 Dau对 TA的影响。结果表明, Dau对 TA亦有一定的抑制作用,在 4例标本中,也有 1例仍出现了稳定性振荡电位。因此推测, Dau对于由延迟后除极所致室颤有一定的疗效,但是对其作用特点及作用机制仍不太清楚。有必要采取多种药物浓度,多种 DADs及 TA

诱导因素作进一步的研究

综上所述, TEA溶液能够诱发出稳定且可逆的 DADs及 TA 这种触发活动模型有助于研究抗心律失常药对心肌电活动的作用机制。

参考文献

- 1 January CT, Fozzard HA. Delayed afterdepolarizations in heart muscle: mechanisms and relevance. *Pharmacological Reviews*, 1988, **40**(3): 219
- 2 Berlin JR, Cannell MB, Lederer WJ. Cellular origins of the transient inward current in cardiac myocytes: role of fluctuations and waves of elevated intracellular calcium. *Circ Res*, 1989, **65**: 115

- 3 王镇辛. 心肌迟后除极和触发活动及其治疗的药理基础. 中国药理学通报, 1992, **8**(3): 178
- 4 张陆勇, 秀慧芳, 王秋娟等. 关附甲素对心肌细胞电生理特性的影响. 中国药科大学学报, 1999, **22**(16): 354
- 5 Glat E, Aronson RS, Nordin C. Triggered activity induced by K^+ -free, Na^+ -deficient solution in guinea pig ventricular muscle. The effects of ouabain, lidocaine, and Ca^{2+} channel blockers. *J Cardiovas Pharmacol*, 1990, **16**(2): 267
- 6 Allen DG, Eisner PA, Orchard CH. Characterization of oscillations of intracellular calcium concentration in ferret ventricular muscle. *J Physiol*, 1984; **352**: 113
- 7 潘锡平. 蝙蝠葛中的新生物碱—蝙蝠葛苏林碱. 药学学报, 1991; **26**: 387

Triggered Activity Induced by K^+ -Free, Na^+ -Deficient Solution in Guinea Pig Papillary Muscle: the Effects of Verapamil and Daurisoline

Zhang Luyong, Ji Huifang¹, Zhang Hai

Xinzhong New Drug R&D Center, Department of Physiology, China pharmaceutical University, Nanjing 210009

Abstract Triggered activity induced by delayed afterdepolarizations has been suggested as a cellular mechanism for some arrhythmias. The development of triggered activity should be favored by conditions that increase myoplasmic Ca^{2+} and induce spontaneous oscillatory fluctuation of $[Ca^{2+}]$. Using standard microelectrode technique, we observed the electrical activity in guinea pig papillary muscles after perfusion with a K^+ -free Na^+ -deficient solution containing tetraethylammonium (TEA). The results showed that the solution containing TEA could develop a highly reliable and readily reversible triggered activity. Both of verapamil ($11\mu\text{mol/L}$) and daurisoline ($50\mu\text{mol/L}$) could inhibit the triggered activity, but not underlying voltage oscillations. The triggered activity induced by TEA solution well suited for studying the effects of antiarrhythmic drugs on this type of electrical activity.

Key words Delayed afterdepolarizations; Triggered activity; Verapamil; Daurisoline