

## 高频刺激豚鼠乳头状肌动作电位除极的动态变化

沈为群、徐心怡、赵薇薇、端木肇夏、于志铭 (苏州医学院生理学教研室, 苏州 215007, 中国)  
虞献民、王路阳、张陆勇 (南京药学院生理学教研室, 南京 210009, 中国)

### Dynamic changes in depolarization of action potentials by high frequency stimulation in guinea pig papillary muscles

SHEN Wei-Qun, XU Xin-Yi, ZHAO Wei-Wei, DUAN-MU Zhao-Xia, YU Zhi-Min

(Department of Physiology, Suzhou Medical College, Suzhou 215007, China)

YU Xian-Min, WANG Lu-Yang, ZHANG Lu-Yong

(Department of Physiology, Nanjing College of Pharmacy, Nanjing 210009, China)

**ABSTRACT** The effect of high frequency stimulation on rate-dependent depression of depolarization of action potentials was studied with computer and standard micro-electrode techniques in guinea pig papillary muscles. After increasing driving frequency from 0.5 to 6 Hz, decreases in  $V_{max}$ , APA and OS were found. Changes of upstroke velocity during phase 0 between driving frequency 6 and 0.5 Hz could be described as a parabola. The rate-dependent depression of depolarization was exaggerated by tetrodotoxin (TTX), particularly during the accelerating period of phase 0. A progressive decline in  $V_{max}$ , which could be fitted by a power function curve, was observed after changing driving frequency from 1 to 5 Hz. TTX significantly influenced the decline in  $V_{max}$  and the regression coefficients in fitted equations.

**KEY WORDS** action potentials; tetrodotoxin; papillary muscles; microelectrodes

**摘要** 用不同频率电刺激豚鼠心室乳头状肌, 分析心肌 AP 零相的动态变化。6 Hz 较 0.5 Hz 刺激显著降低 AP 的  $V_{max}$ , APA 和 OS, RDB 为  $-20 \pm 17\%$ , 零相除极速率变化差值与除极水平呈开口向上抛物线关

系。刺激频率从 1 转换为 5 Hz 后, AP 的  $V_{max}$  下降与时间呈幂函数关系。河豚毒素 (TTX) 显著加强高频刺激的抑制作用。

**关键词** 动作电位; 河豚毒素; 乳头状肌; 微电极

心血管药理学和毒理学研究中, 常把心肌细胞快反应动作电位 (AP) 的零相最大除极速率 ( $V_{max}$ ) 作为兴奋性  $Na^+$  内流的指标<sup>(1)</sup>。AP 的  $V_{max}$  随刺激频率增快而下降<sup>(2)</sup>。许多 I 类抗心律失常药物抑制  $V_{max}$  的作用也具有显著的频率依赖关系<sup>(3,4)</sup>。我们以往的工作表明, 兴奋性  $Na^+$  内流的变化不仅影响  $V_{max}$ , 而且还导致零相全程除极速率发生变化<sup>(5)</sup>。为此, 本实验应用电子计算机和模数转换技术, 对豚鼠心室乳头状肌 AP 作实时快速采样记录, 进一步分析高频刺激时 AP 零相全程除极速率的动态变化, 同时观察特异性  $Na^+$  通道阻断剂河豚毒素 (tetrodotoxin, TTX) 的影响。

#### MATERIALS AND METHODS

豚鼠 19 只, ♀♂兼用, 体重  $412 \pm SD 43$  g。击昏开胸, 取心室乳头状肌固定于肌槽内, 用  $95\% O_2 + 5\% CO_2$  饱和 Tyrode 液持续灌流。肌槽容量为 2.5 ml, Tyrode 液 pH 为 7.5, 温

Received 1987 Sep 28 Accepted 1989 Feb 28

度为  $36.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ , 灌流速度  $10 \text{ ml/min}$ , 标本刺激电极为 Ag-AgCl 双电极, 刺激方波波宽  $1 \text{ ms}$ , 强度为舒张阈的 2 倍。标本在  $0.5 \text{ Hz}$  频率的电刺激驱动下稳定 1-2 h, 然后进行各项实验观察。

**AP 的记录** 用玻璃微电极插入心肌细胞内记录跨膜电位。微电极内充灌  $\text{KCl } 3 \text{ mol/L}$  溶液, 其尖端电阻为  $10-15 \text{ M}\Omega$ 。电信号由 Ag-AgCl 电极引导入微电极放大器 (MEZ-7101)。放大的跨膜电位信号分两路并联输出, 一路信号直接输入计算机 (APPLE-II), 作模数转换后记录 AP (采样速率  $8 \text{ bit}/1 \text{ ms}$ ) 和 AP 零相除极曲线 (采样速率  $8 \text{ bit}/16 \mu\text{s}$ ); 另一路信号经电子微分器 (BIM-I, 时间常数  $20 \mu\text{s}$ ) 处理后再输入计算机, 记录 AP 零相除极速率曲线 (采样速率  $8 \text{ bit}/16 \mu\text{s}$ )。

**刺激频率变换和 AP 信号采集方式** 共分为两种:

1 先后以频率为  $0.5$  和  $6 \text{ Hz}$  电刺激分别驱动标本, 计算机采集两种频率下处于参数稳定状态的 AP 及其零相除极曲线, 采用中心触

发方式, 选择  $-25 \text{ mV}$  为触发电压点, AP 除极达  $-25 \text{ mV}$  时启动叠加, 得到 5 个连续 AP 的平均波形。

2 先以  $1 \text{ Hz}$  频率驱动标本, 待被记录细胞的 AP 各参数稳定后, 突然提高驱动频率至  $5 \text{ Hz}$ , 计算机采集 30 个连续的 AP 及其零相除极速率曲线, 包括  $1 \text{ Hz}$  驱动时最后 10 个波形和  $5 \text{ Hz}$  时最初 20 个波形。

**频率依赖性阻滞 (rate-dependent block, RDB) 的测定** 以高频和低频刺激时  $V_{\text{max}}$  的差值与低频刺激时  $V_{\text{max}}$  值的 %, 作为观察频率依赖性抑制作用的指标。

**TTX 作用观察** TTX (河北水产研究所制品) 的作用在灌流给药  $15 \text{ min}$  后进行观察。TTX 浓度选择为  $1.5, 3, 6, 9 \mu\text{mol/L}$ , 均在同一细胞作自身对照比较。

## RESULTS

**高频刺激和 TTX 对 AP 零相的影响** 分别测定在  $0.5$  和  $6 \text{ Hz}$  刺激下处于参数稳定状态的 AP。由 Tab 1 可见, 高频刺激可使 AP 振幅

Tab 1. Effects of driving frequency and tetrodotoxin (TTX) on depolarization of action potentials.  $\bar{x} \pm \text{SD}$ . \* $P > 0.05$ , \*\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.01$  vs  $0.5 \text{ Hz}$ .

Parameter	Frequency (Hz)	Tetrodotoxin ( $\mu\text{mol/L}$ )			
		0 (n=13)	3 (n=8)	6 (n=7)	9 (n=5)
APA (mV)	0.5	$110 \pm 9$	$107 \pm 8$	$106 \pm 7$	$94 \pm 7$
	6	$99 \pm 14^{***}$	$93 \pm 11^{***}$	$89 \pm 9^{***}$	$72 \pm 16^{***}$
OS (mV)	0.5	$28 \pm 8$	$25 \pm 6$	$20 \pm 7$	$17 \pm 10$
	6	$22 \pm 12^{***}$	$14 \pm 9^{***}$	$12 \pm 8^{***}$	$-1 \pm 10^{***}$
$V_{\text{max}}$ (V/s)	0.5	$282 \pm 88$	$248 \pm 97$	$239 \pm 83$	$189 \pm 97$
	6	$221 \pm 65^{***}$	$183 \pm 82^{***}$	$166 \pm 63^{***}$	$129 \pm 68^{***}$
RDB (%)	—	$-20 \pm 17$	$-24 \pm 24$	$-28 \pm 16$	$-29 \pm 18$
$V_{V_{\text{max}}}$ (mV)	0.5	$-22 \pm 12$	$-22 \pm 9$	$-23 \pm 55$	$-26 \pm 8$
	6	$-23 \pm 12^*$	$-26 \pm 9^*$	$-25 \pm 9^*$	$-31 \pm 7^*$
$P_{V_{\text{max}}}$ (%)	0.5	$58 \pm 7$	$60 \pm 5$	$60 \pm 5$	$61 \pm 8$
	6	$60 \pm 7^*$	$61 \pm 7^*$	$61 \pm 8^*$	$58 \pm 10^*$
RP (mV)	0.5	$-82 \pm 6$	$-82 \pm 6$	$-83 \pm 6$	$-80 \pm 5$
	6	$-77 \pm 8^{**}$	$-79 \pm 7^*$	$-77 \pm 7^{**}$	$-74 \pm 7^{**}$

n: cell number, APA: action potential amplitude, OS: overshoot,  $V_{\text{max}}$ : maximum velocity of depolarization, RDB: rate-dependent block,  $V_{V_{\text{max}}}$ : membrane potential at which  $V_{\text{max}}$  occurred,  $P_{V_{\text{max}}}$ :  $V_{V_{\text{max}}}$  expressed as % of depolarization, RP: resting potential.

(APA)和超射(OS)降低,  $V_{max}$ 显著减慢,RDB为 $-20 \pm 17\%$ , 静息电位(RP)略变小,而 $V_{max}$ 所处的除极水平不变。由此显示了AP除极的频率依赖性抑制现象。

给予TTX后,无论在低频或高频刺激下,APA, OS及 $V_{max}$ 均显著下降( $P < 0.05$ ),并与TTX剂量相关,RP无显著变化, $V_{max}$ 所处的除极水平也无显著变化。此时仍可见到APA, OS及 $V_{max}$ 的频率依赖抑制现象(Tab 1)。结果表明TTX对AP零相除极频率依赖性抑制作用有显著影响。

**刺激频率增加和TTX对AP零相除极速率的影响** 高、低频刺激时AP零相除极速率曲线变化的比较表明,在膜电位除极至5-85%的区间范围内,高频刺激下的AP零相除极速率均显著减慢( $P < 0.05$ )。除极速率的减慢程度,先随除极速率增快而增加,在 $V_{max}$ 处减慢程度最显著,以后又逐渐减小。除极速率变化规律呈开口向上抛物线状(Fig 1 A)。

TTX作用后,高、低频刺激时的AP零相除极速率变化规律,仍呈开口向上的抛物线状,但其减慢程度较对照显著增加(Fig 1 A)。按零相除极加速期和减速期的概念<sup>(6)</sup>,对高、低频刺激时AP零相除极速率各对应水平下降差值作直线回归拟合和比较,结果显示,在零相除极加速期中,对照组和TTX各组间的回归直线斜率都有显著差异( $P < 0.05$ , Fig 1 B),而在减速期内都无显著差异。由此进一步提示,TTX对AP零相除极速率的频率依赖性抑制影响,主要在AP零相除极的加速期中。

**刺激频率增加后的 $V_{max}$ 动态变化及TTX影响** 刺激频率变换前后的 $V_{max}$ 连续动态变化显示,当驱动频率由1 Hz突然改变为5 Hz后, $V_{max}$ 即逐渐下降, $V_{max}$ 的这种变化过程可用幂函数曲线( $y = a x^{-b}$ )来拟合(Fig 2)。频率变换后, $V_{max}$ 达到稳定状态需经15-20个AP。

给予TTX 1.5  $\mu\text{mol/L}$ ,刺激频率增快后的 $V_{max}$ 变化规律仍为幂函数,但 $V_{max}$ 下降显著,曲线的弧度增大,曲线方程中的指数b值

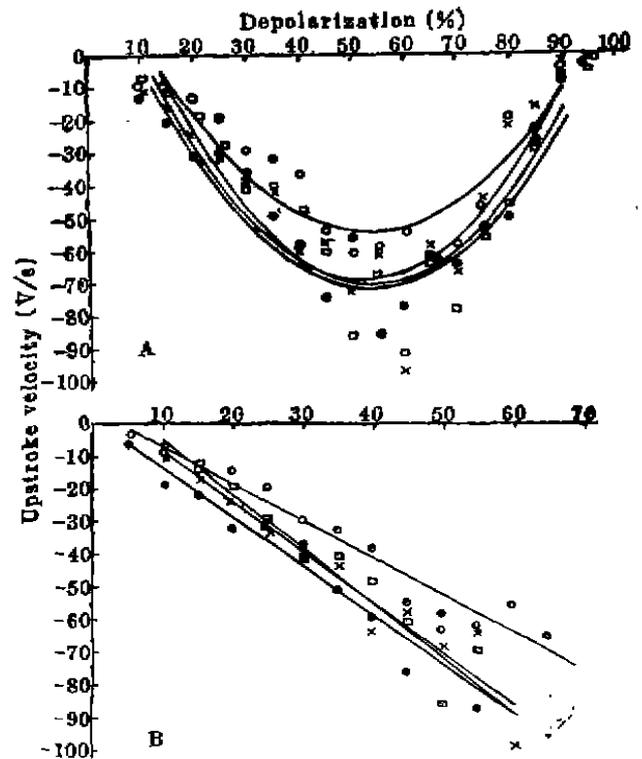


Fig 1. Effect of TTX on rate-dependent depression of depolarization of action potentials (A) and that during the acceleration period (B). Changes of upstroke velocity between driving frequency 6 and 0.5 Hz were fitted by regression equations.

- (○) Control (A)  $y = 36.52 - 3.41x + 0.032x^2$ ,  $r = 0.89$ , (B)  $y = 3.94 - 1.11x$ ,  $r = -0.97$   
 (●) 3  $\mu\text{mol/L}$  (A)  $y = 33.88 - 3.95x + 0.037x^2$ ,  $r = 0.91$ , (B)  $y = 2.15 - 1.49x$ ,  $r = -0.97$   
 (×) 6  $\mu\text{mol/L}$  (A)  $y = 41.94 - 4.27x + 0.041x^2$ ,  $r = 0.89$ , (B)  $y = 6.43 - 1.52x$ ,  $r = -0.96$   
 (□) 9  $\mu\text{mol/L}$  (A)  $y = 49.36 - 4.43x + 0.041x^2$ ,  $r = 0.90$ , (B)  $y = 11.51 - 1.64x$ ,  $r = -0.97$

产生显著变化(Tab 2, Fig 2)。结果表明,TTX对AP零相频率依赖性的影响在频率增快后立即显露,曲线方程中的指数b是描述 $V_{max}$ 变化的一个重要参数。

## DISCUSSION

心肌快反应细胞AP的 $V_{max}$ 常被作为 $\text{Na}^+$ 内流指标。当刺激频率增加时,高速驱动一方

Tab 2. Effect of TTX 1.5  $\mu\text{mol/L}$  on  $V_{\text{max}}$  after changing driving frequency from 1 to 5 Hz.  $n=6$ ,  $\bar{x}\pm\text{SD}$ . \* $P>0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs before

	Before		TTX	
	1 Hz	5 Hz	1 Hz	5 Hz
$V_{\text{max}}$ (V/s)	277 $\pm$ 69	251 $\pm$ 72	223 $\pm$ 73**	178 $\pm$ 68**
RDB(%)	-9.92 $\pm$ 5.74		-20.93 $\pm$ 5.41**	
b	-0.03 $\pm$ 0.02		-0.08 $\pm$ 0.03**	
CC	0.89 $\pm$ 0.03		0.86 $\pm$ 0.09*	
CI	0.99 $\pm$ 0.01		0.99 $\pm$ 0.01*	

b: b value in the equation of power function curve, CC: correlation coefficient of fitting equation. CI: correlation index of fitting equation.

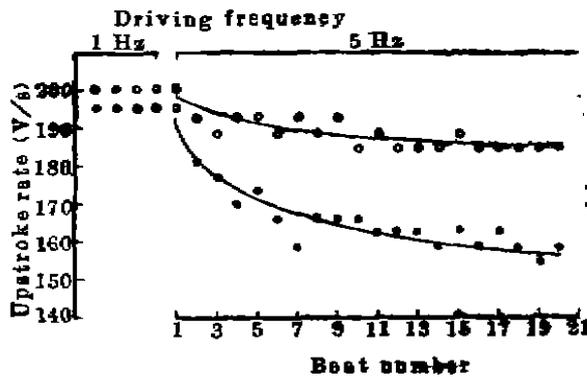


Fig 2. Effect of TTX on  $V_{\text{max}}$  after changing driving frequency from 1 to 5 Hz. Power function curve equations.

(○) Control  $y=198.28x^{-0.024}$ ,  $r=0.85$   
 (●) TTX 1.5  $\mu\text{mol/L}$   $y=190.43x^{-0.065}$ ,  $r=0.94$   
 (Data from the 1st cell in the 30th guinea pig)

面促使细胞外  $\text{Na}^+$  大量内流, 细胞内  $\text{Na}^+$  浓度上升,  $\text{Na}^+$  平衡电位下降, 导致  $\text{Na}^+$  内流的电化学驱动力减小; 另一方面, 细胞内  $\text{K}^+$  大量外流, 在细胞膜外积聚, RP 减小, 引起呈活化状态的  $\text{Na}^+$  通道数量减少, 这些因素促使 AP 零相的  $V_{\text{max}}$  下降, 表现了频率依赖性抑制作用。本实验中高频刺激引起  $V_{\text{max}}$  显著下降, 与文献报道<sup>(2)</sup>一致。同时发现, 高频刺激时 AP 零相的除极速率下降程度不一致, 提示在不同的除极水平,  $\text{Na}^+$  内流净通量的抑制性减少程度不同。

实验显示, TTX 对 AP 零相除极速率的频

率依赖性抑制存在着显著影响。高频刺激时, TTX 与除极阶段呈开放状态的  $\text{Na}^+$  通道亲和力增高, 而在复极期间从关闭状态的  $\text{Na}^+$  通道上离解减少, 因此使得 TTX 对于  $\text{Na}^+$  通道的抑制作用加强<sup>(4,6)</sup>。

一般认为 TTX 是特异性  $\text{Na}^+$  通道阻断剂<sup>(7)</sup>。直线回归分析表明, TTX 对 AP 零相除极频率依赖性抑制的影响主要发生在零相除极加速期中, 与以往观察<sup>(6)</sup>相似, 提示了 AP 零相除极加速期中除极速率变化主要与  $\text{Na}^+$  相关。在  $V_{\text{max}}$  后的除极减速期中, TTX 的影响不显著, 可能是由于此时的离子流成份复杂所致。TTX 对减速期除极速率的影响规律有待研究。

#### REFERENCES

- Grant AO, Starmer CF, Strauss HC. Antiarrhythmic drug action, blockade of the inward sodium current. *Circ Res* 1984, 55 : 427
- Chen CM, Gettes LS. Combined effects of rate, membrane potential, and drugs on maximum rate of rise ( $V_{\text{max}}$ ) of action potential upstroke of guinea pig papillary muscle. *Ibid* 1976, 38 : 464
- Campbell TJ. Importance of physico-chemical properties in determining the kinetics of the effects of Class I antiarrhythmic drugs on maximum rate of depolarization in guinea-pig ventricle. *Br J Pharmacol* 1983, 80 : 33
- Courtney KR. Quantitative structure/activity relations based on use-dependent block and repriming kinetics in myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 1987, 19 : 319
- Yu XM, Shen WQ. A kinetic analysis of the effects of TTX on depolarization of ventricular muscles in guinea pigs. *Chin J Pharmacol Toxicol* 1988, 2 : 11
- Reuter H, Baer M, Best PM. Voltage dependent of tetrodotoxin action in mammalian cardiac muscle. In: Morad M, ed. *Biophysical aspects of cardiac muscle*. London: Academic Press, 1978 : 129-42
- Narahashi T. Chemicals as tools in the study of excitable membranes. *Physiol Rev* 1974, 54 : 813