

常咯啉对分离的成年豚鼠心室肌单细胞的电生理作用

刘启营¹、陈维洲 (中国科学院上海药物研究所, 上海 200031, 中国)

魏丕敬、顾培壁、金正均 (上海第二医科大学药理教研室, 上海 200025, 中国)

Electrophysiological effects of changrolin on single ventricular myocytes isolated from adult guinea pigLIU Qi-Ying¹, CHEN Wei-Zhou

(Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

WEI Pi-Jing, GU Pei-Kun, JIN Zheng-Jun

(Department of Pharmacology, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025, China)

ABSTRACT Calcium tolerant single ventricular cardiomyocytes were dispersed from adult guinea pig hearts by retrograde perfusion with collagenase solution. More than 50% of the isolated cells retained rod shaped configuration and showed normal electrical activities with resting potentials (RP) at -82 ± 2 mV and action potential amplitude (APA) at 116 ± 6 mV. The effects of changrolin (CRL, 4-(3', 5'-bis [(N-pyrrolidinyl)-methyl]-4'-hydroxyanilino)-quinazoline) on the transmembrane action potentials of the single cells were measured with intracellular glass microelectrodes. At the concentration of 50 $\mu\text{mol/L}$, CRL caused profound reductions of APA, maximal rate of phase 0 depolarization (\dot{V}_{max}), and action potential duration (APD). The effective refractory period (ERP) was prolonged. The action of CRL on \dot{V}_{max} showed use- and frequency-dependences. Trains of stimuli in the studied range of frequencies led to an exponential decline in \dot{V}_{max} to a new plateau and the maximal reduction was at the highest fre-

quency. At 1 Hz, the onset rate of this action was $0.036 \pm 0.004 \text{ AP}^{-1}$. CRL did not cause a resting state block of \dot{V}_{max} . These findings suggest that CRL is a slow type, class I anti-arrhythmia drug.

KEY WORDS anti-arrhythmia agents; changrolin; quinazolines; myocardium; action potentials; cultured cells

摘要 常咯啉(CRL) 50 $\mu\text{mol/L}$ 使分离的耐 Ca^{2+} 性成年豚鼠心室肌单细胞的 APA, APD₅₀, APD₉₀ 和 \dot{V}_{max} 明显减小, ERP 延长, 差异均显著, RP 无改变。CRL 对 \dot{V}_{max} 的作用有使用 and 频率依赖性, 提示 CRL 仅作用于开放和/或失活态的 Na^+ 通道, 而对静息态的 Na^+ 通道则无明显作用。CRL 对 \dot{V}_{max} 作用的起效速率为 $0.036 \pm 0.004 \text{ AP}^{-1}$, 属 I 类、慢型抗心律失常药。

关键词 抗心律失常药; 常咯啉; 啞啞啉; 心肌; 动作电位; 培养的细胞

成年动物心肌单细胞是研究心肌细胞电生理的理想模型。自 Powell 与 Twist 于 1976 年首次成功地分离出成年大白鼠耐 Ca^{2+} 性心肌单细胞, 并将其应用于心肌电生理研究^(1,2) 以来, 人们对心肌细胞膜各种离子流成份的认识不断深入, 概念更新⁽³⁾ 很快。无疑, 这种单细胞模型将更有助于抗心律失常药物作用机理的阐

Received 1988 Dec 20 Accepted 1989 Jun 3

¹ Now in Shanghai Institute of Physiology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China

明。常咯啉(changrolin, CRL)是中国科学院上海药物研究所发现的抗心律失常新药^(4,5),对多种病因引起的心律失常有良效^(6,7),尤适用于快速型室性心律失常的治疗。为了进一步探讨其作用机理,我们按Bihler等的方法⁽⁷⁾稍加改进,成功地分离出耐Ca²⁺性成年豚鼠心室肌单细胞,并研究了CRL对这种心肌单细胞的电生理作用。

MATERIALS AND METHODS

药品与溶液 牛血清白蛋白(Fraction V)及Taurine均是Fluka产品;胶原酶(Type I)与HEPES分别是Sigma和Merck公司产品;CRL由上海第十六制药厂提供。台氏液组成为(mmol/L): NaCl 140, KCl 5.4, CaCl₂ 1.8, MgCl₂ 1, HEPES 5, Glucose 10, pH 7.4; 无Ca²⁺液: NaCl 120, KCl 30, MgCl₂ 3.4, HEPES 5, Taurine 25, Glucose 15, 牛血清白蛋白0.1%, pH 7.4, 渗透压310 mosmol/L; 高蛋白液中牛血清白蛋白浓度增加至2%, 并含CaCl₂ 50 μmol/L, 余同无Ca²⁺溶液; 胶原酶溶液含胶原酶200 IU/ml, CaCl₂ 50 μmol/L, 余同无Ca²⁺溶液。胶原酶溶液和无Ca²⁺溶液用0.22 μm微孔滤膜过滤后使用。溶液均通以100%O₂饱和。

细胞分离方法 豚鼠9只, 体重290±SD 43g, ♀♂均用重击枕部致昏, 迅速开胸取出心脏放于4℃生理盐水中, 将心脏套管插入主动脉后, 按Langendoff法37℃恒流灌流。先用无Ca²⁺液灌流5 min (8 ml/min); 接着用胶原酶溶液10 ml循环灌流20 min, 灌流速度由8 ml/min逐渐加大到15 ml/min。灌流结束后, 将心室肌剪碎, 放入含10 ml高蛋白溶液的50 ml三角烧瓶中, 35℃恒温缓慢搅拌20 min。在此过程中不断向三角烧瓶中通100%O₂。用尼龙网(孔径250 μm)滤去未消化组织, 将细胞悬液离心1 min (50×g)。去除上清液后, 加10 ml台氏液使细胞重新混悬。再离心1 min (50×g)。重复此过程以去除细胞碎片和残留

的胶原酶。细胞悬液在室温通氧保存。

电生理方法 将细胞悬液放入容量为0.5 ml的有机玻璃槽中, 置于倒置显微镜载物台上。待细胞沉到槽底后, 即用34-35℃的台氏液以2-2.5 ml/min的速度灌流。细胞膜电位用充以KCl 3 mol/L, 电阻为20-30 mΩ的玻璃微电极引导。动作电位由施加于记录微电极的除极化电流(5 ms, 1 Hz)诱发。自微电极放大器(Dagan 8500)引出的电信号, 一路直接输入示波器的第一道, 另一路经微分器后输入第二道以显示动作电位的0相最大除极化速率(\dot{V}_{max})。照相记录以测量信号数值。实验选用边界清楚, 胞浆透亮, 横纹排列整齐的细胞。微电极插入细胞稳定15 min后进行药物实验。

在测量CRL对 \dot{V}_{max} 的使用依赖性作用(use-dependent effect)时, 先停止刺激5 min, 然后用串刺激(1 Hz)诱发动作电位。记录每个 \dot{V}_{max} 值。第一个 \dot{V}_{max} 被抑制的程度, 反映静息态Na⁺通道被阻断的情况。使 \dot{V}_{max} 的幅度降低至第一个 \dot{V}_{max} 幅度的1-1/e倍的动作电位个数的倒数, 为CRL对 \dot{V}_{max} 使用依赖性阻断作用的起效速率(onset-rate), 其单位为AP⁻¹(⁸)。

资料处理 实验数据由测量照相记录结果而得。求 $\bar{x} \pm SD$, 用非配对t检验检测显著性。

RESULTS

成年豚鼠心室肌单细胞的形态及电生理特性 9次实验分得的豚鼠心室肌单细胞有51±7%呈柱状, 细胞边界与横纹清晰。在含CaCl₂ 1.8 mmol/L的台氏液中, 绝大多数柱状细胞呈静息状态。其长为123±30 μm, 宽30±9 μm。肌小节长1.8-2.2 μm (n=21)。电生理参数为: 静息电位(RP) -81±2 mV, 动作电位幅度(APA) 116±6 mV, 50%复极化时间(APD₅₀) 214±25 ms, 90%复极化时间(APD₉₀) 236±24 ms (n=35)。在室温下置于台氏液中12 h, 柱状细胞的形态及电生理参数无明显变

化。24 h 后胞浆内出现颗粒状物, RP, APA, APD 和 \dot{V}_{max} 均不同程度地减小。实验用分离 12 h 内的细胞。

CRL 对成年豚鼠心室肌单细胞动作电位参数的影响 CRL 的作用在加药 15 min 内达峰值。本实验记录用药后 15 min 的值。CRL 50 $\mu\text{mol/L}$ 不影响分离的成年豚鼠心室肌单细胞的 RP ($-81 \pm 2 \text{ mV}$), 但使 APA 自 117 ± 7 降至 $109 \pm 8 \text{ mV}$, APD_{50} 和 APD_{90} 分别自 211 ± 28 和 $230 \pm 23 \text{ ms}$ 缩短至 197 ± 25 和 $219 \pm 22 \text{ ms}$ (Fig 1); \dot{V}_{max} 自 191 ± 50 减小至 $114 \pm 21 \text{ V/s}$; ERP 自 283 ± 28 延长至 $342 \pm 32 \text{ ms}$ 。以上参数加药前后的差别均显著 ($P < 0.01$, $n = 8$)。冲洗 10 min 后, CRL 的作用可部分恢复。CRL 25 $\mu\text{mol/L}$ 对心肌单细胞的电生理参数无明显作用。

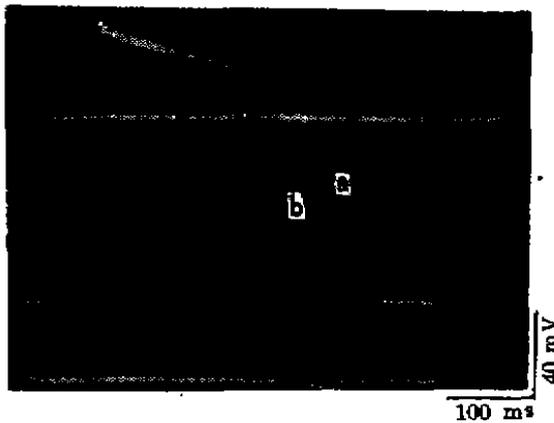


Fig 1. Effects of changrolin on the configuration and \dot{V}_{max} of transmembrane action potential recorded from a single adult guinea pig ventricular cell. A) Control trace; B) Trace of changrolin action.

CRL 对 \dot{V}_{max} 的使用依赖性作用 在 CRL 50 $\mu\text{mol/L}$ 的作用下, 停止刺激 5 min 后串刺激诱发的第一个动作电位的 \dot{V}_{max} 为 $217 \pm 29 \text{ V/s}$, 与加药前的 \dot{V}_{max} ($214 \pm 45 \text{ V/s}$) 无显著差别 ($P > 0.05$, $n = 7$)。此后, \dot{V}_{max} 呈单指数减小 (Fig 2, 3), 最后达到一稳态值。刺激频率为 1 Hz 时, CRL 对 \dot{V}_{max} 使用依赖性阻断作用的起效速率为 $0.036 \pm 0.004 \text{ AP}^{-1}$ 。

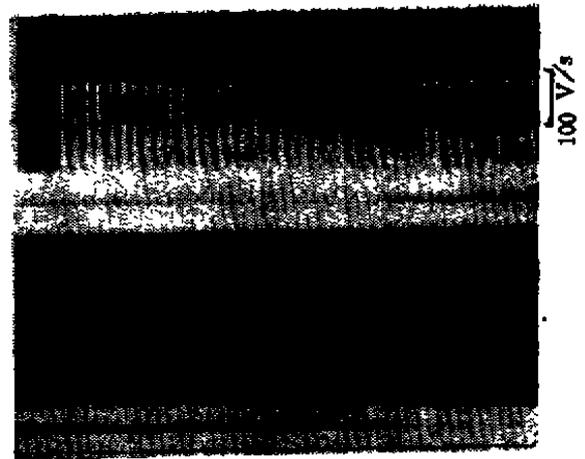


Fig 2. Onset effect of changrolin on \dot{V}_{max} . Stimulation frequency was 1 Hz. Panel A is a control record and panel B was recorded after changrolin addition (50 $\mu\text{mol/L}$).

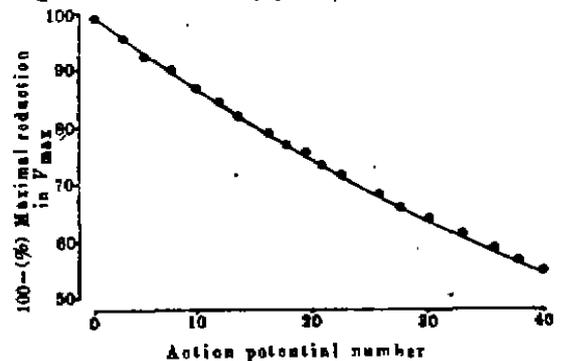


Fig 3. A monoexponential function fitted to the onset of the use-dependent effect. Rate constant is 0.036 AP^{-1} .

CRL 对 \dot{V}_{max} 的频率依赖性作用 CRL 50 $\mu\text{mol/L}$ 对 \dot{V}_{max} 的抑制作用有明显的频率依赖性, 表现为当刺激频率为 0.5, 1, 2 Hz 时, \dot{V}_{max} 分别被抑制 32 ± 4 , 36 ± 6 和 $41 \pm 6\%$ 。频率间 \dot{V}_{max} 的差别有显著性 ($P < 0.05$, $n = 4$)。

DISCUSSION

分离的成年豚鼠心肌单细胞, 不受神经、激素、血液循环和组织解剖等因素的影响, 可以严格控制 pH 和离子组份等实验条件, 是一种理想的实验模型。本文分得的细胞在形态、对 Ca^{2+} 的耐受性及电生理特性等方面, 均与文献报道^(9,10)一致。常咯啉对这种心肌单细胞

动作电位参数的作用,与用心肌条所得结果⁽¹¹⁾相似,从另一个侧面说明了这种单细胞电生理方法的可靠性。本文使用的心脏灌流装置,只需10 ml的溶液就可进行心脏循环灌流,从而可以大大减少胶原酶的用量。为了提高分离效果,本文中的细胞分离液采用高 Mg^{2+} ,高 K^+ ,低 Na^+ 溶液。高浓度的 Mg^{2+} 对无 Ca^{2+} 灌流时的心肌细胞有保护作用^(12,13)。高 K^+ 、低 Na^+ 则可防止心肌细胞分离过程中细胞内 K^+ 的丢失和 Na^+ 的聚积⁽¹⁴⁾。

常咯啉是I类抗心律失常药,主要是通过阻断 Na^+ 通道而发挥作用。本实验发现常咯啉对 Na^+ 通道的阻断作用有使用和时间依赖性。根据受体调制学说(modulated receptor hypothesis)⁽¹⁵⁾,我们推测常咯啉对静息态的 Na^+ 通道(或与 Na^+ 通道相邻的受体蛋白)的亲和力较低,而与开放的和/或失活态的(open and/or inactivated state) Na^+ 通道的亲和力则较高。要进一步区分常咯啉对开放和失活态 Na^+ 通道的不同作用,则要结合电压钳等技术做进一步的实验研究。

近年有些学者提出^(8,16),根据 \dot{V}_{max} 作用的特点,I类抗心律失常药可进一步分为快、中和慢三型,它们对 \dot{V}_{max} 使用依赖性阻断作用的起效速率依次减小。常咯啉对 \dot{V}_{max} 作用的起效速率为 $0.036 \pm 0.004 AP^{-1}$,属慢型药物。这种药物起效较慢,对偶发的单个室性早搏的作用较差,而对持续性、快速型心律失常的作用则较好⁽⁸⁾。这与临床应用结果⁽⁴⁻⁶⁾是相吻合的。

实验结果显示CRL对 Na^+ 通道有明显作用。但其使动作电位的时程改变,提示也可能作用于其他离子通道如 K^+ , Ca^{2+} 通道等,有待进一步证实。

REFERENCES

- 1 Powell T, Twist VW. A rapid technique for the isolation and purification of adult cardiac muscle cells having respiratory control and a tolerance to calcium. *Biochem Biophys Res Comm* 1976; 72 : 327
- 2 Powell T, Terrar DA, Twist VW. Membrane

- potentials in muscle cells isolated from adult rat heart. *J Physiol (Lond)* 1978; 282 : 23 P
- 3 Noble D. The surprising heart: a review of recent progress in cardiac electrophysiology. *Ibid* 1984; 353 : 1
- 4 Li LQ, Qu ZX, Wang ZM, et al. Studies on a new antiarrhythmic drug changrolin—4-{3',5'-bis[(N-pyrrolidiny] methyl]-4'-hydroxyanilino}-quinazoline. *Sci Sin* 1979; 22 : 1220
- 5 Chen WZ, Li LQ. A new antiarrhythmic drug—changrolin. *New Drugs Clin Remed* 1982; 1 : 16
- 6 Xu JM, Yang XY, Li ZS, et al. Changrolin by intravenous administration in the treatment of arrhythmia. *Ibid* 1987; 6 : 133
- 7 Bihler I, Ho TK, Sawh PC. Isolation of Ca^{2+} -tolerant myocytes from adult rat heart. *Can J Physiol Pharmacol* 1984; 62 : 581
- 8 Campbell TJ. Kinetics of onset of rate-dependent effects of class I antiarrhythmic drugs are important in determining their effects on refractoriness in guinea pig ventricle and provide a theoretical basis for their subclassification. *Cardiovasc Res* 1983; 17 : 344
- 9 Hume JR, Uehara A. Ionic basis of the different action potential configurations of single guinea-pig atrial and ventricular myocytes. *J Physiol (Lond)* 1985; 368 : 525
- 10 Kameyama M. Electrical coupling between ventricular paired cells isolated from guinea pig heart. *Ibid* 1983; 336 : 345
- 11 Fan SF, Hsu SG, Zhou NH, Wang ZM. Effects of a new potent antiarrhythmic drug changrolin on the electrical activity of myocardial cells. *Acta Physiol Sin* 1979; 31 : 175
- 12 Moustafa E, Skomedal T, Osnes J-B, Øye I. Cyclic AMP formation and morphology of myocardial cells isolated from adult heart: effect of Ca^{2+} and Mg^{2+} . *Biochim Biophys Acta* 1976; 421 : 411
- 13 Crevey BJ, Langer GA, Frank JS. Role of Ca^{2+} in maintenance of rabbit myocardial cells membrane structural and functional integrity. *J Mol Cell Cardiol* 1978; 10 : 1081
- 14 Altschuld R, Gibb L, Ansel A, Hohl C, Kruger FA, Brierley GP. Calcium tolerance of isolated rat heart cells. *Ibid* 1980; 12 : 1383
- 15 Hondeghem LM, Katzung BG. Antiarrhythmic agents: the modulated receptor mechanism of action of sodium and calcium channel-blocking drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1984; 24 : 387