

244-249

14

六种强心甙对羊心脏浦肯野纤维钠泵活动的抑制作用

韩大英 (首都医学院 心血管生理研究室, 北京 100054, 中国)

Inhibitory effects of 6 cardiac glycosides on sodium pump in sheep Purkinje fibers

HAN Da-Ying (Department of Cardiovascular Physiology, Capital Institute of Medicine, Beijing 100054, China)

ABSTRACT The inhibitory effects of 6 cardiac glycosides (digoxin, meprosillarlin, acrihellin, deslanoside, ouabain, K-strophanthin) on sodium pump in sheep Purkinje fibers were studied. Isolated Purkinje fibers were used and stimulated at 0.4 Hz regularly. Intracellular sodium activity ($a'Na$), potassium activity ($a'K$) and membrane potential (E_m) were monitored with single barrel normal and ion-selective micro-electrodes. It was shown that $a'Na$ rose definitely from the concentration of $30 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, and became more significant until the dose of $0.4 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. $a'Na$ rose very much faster within the range of toxic doses (from $1-20 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ to $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$). The occurrence time of delay afterdepolarization (DAD) after adding drugs varied with various drugs used, or with different experiments, hence the time points of DAD and $\Delta a'Na$ -time, concentration relation curves were quite scattered. But when basing on the appearance of DAD as a common time point we calculated the temporal variation of $a'Na$ before and after toxic effect, the relation curves in a same sort of glycoside were kept uniform. When the toxic effects of glycosides appeared, the inhibition degree of sodium pump activity was quite close (between 52.8% and 65.5%), suggesting that there existed close

Received 1990-10-24

Accepted 1993-11-08

R 972.1
relationship between sodium pump inhibition and toxic effects of glycosides. Intracellular potassium ions lost progressively within the scope of subtoxic doses ($10 - 30 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) and lost more significantly within the scope of toxic doses ($1 - 20 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$). Based on the results of calculation, the inward current induced by the sodium pump inhibition might be responsible for the abnormal automaticity.

KEY WORDS Purkinje fibers; micro-electrodes; cardiac glycosides; $Na^{(+)} K^{(+)}$ -transporting ATPase; membrane potentials

A **摘要** 用离子选择微电极定量研究了数种强心甙对羊心脏浦肯野纤维膜钠泵活动的抑制作用。表明从 $30 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 开始 $a'Na$ 有较明显的升高, 较高浓度 ($0.4 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 时 $a'Na$ 进一步升高。后除极 (DAD) 出现时钠泵活动抑制的百分比在不同药物较接近, 其范围在 52.8% - 65.5%。经计算, 由于钠泵受抑制细胞摄取 Na^+ 引起的内向电流能引起异常自律活动。

关键词 浦肯野纤维; 微电极; 强心甙类; $Na^{(+)} K^{(+)}$ -转移腺苷三磷酸酶; 膜电位

自从细胞内离子选择电极应用于心肌以来, 已有一些工作涉及强心甙对心肌电活动、膜钠泵活动的影响^(1,2), 以及后电位出现(毒性作用发生)与膜钠泵抑制的关系⁽³⁾。但在亚毒性作用范围内, 钠泵是否完全或近乎完全抑制? 引起后电位的离子基础是什么? 毒性作用的出现是否仅仅由于钠泵活动受到抑制等问题尚有待研究。本工作对 6 种不同的强心甙其毒性作用开始时刻细胞内 Na^+ 的累积及钠泵

抑制程度作定量测算,从而确定在治疗剂量范围内,强心甙对膜钠泵抑制的最高限度并将各种强心甙的有关参数作相互比较.同时观察在强心甙作用时细胞内 K^+ 丢失情况.

MATERIALS AND METHODS

羊心脏浦肯野纤维标本、灌流系统、离子电极制作、记录、计算方法等基本与前文^[4]相同.只是对本连续给予 0.4 Hz 的电刺激,需要时,间断刺激以更精确地读出膜电位(E_m)、离子电极电位(E_{Na})及反映离子活度的电位($E_{diff} = E_{Na} - E_m$)的瞬时数值以及迟后除极(DAD)的发生时间.分别测算给药前后的细胞膜电位、细胞内 Na^+ 活度($a'Na$)、膜钠泵活动(PA)及细胞内 K^+ 活度($a'K$).

药物 六种强心甙均为联邦德国产安瓿装粉剂. Digoxin (Boehringer 公司), Meproscillarlin (Knoll 公司), Acridhellin (Degussa Pharma Gruppe 公司), Ouabain (Kali-chemie 公司), Deslanoside (Sandoz 公司), K-Strophanthin (Boehringer 公司).

RESULTS

膜钠泵活动(PA)的测量 $a'Na$ 对照值在 0.4 Hz 刺激基础上间断刺激时读出 E_{Na} 及 E_m 并换算为细胞内 Na^+ 活度. 结果值为 $6.0 \pm 0.9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($n=13$).

膜钠泵活动测定 钠泵活动测定原则是按搏动依赖性 Na^+ 摄取之后细胞内 Na^+ 活度以 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 为单位的衰变. 将停刺激即刻 $a'Na$ 下降速率相对于相应的(同一细胞,同一时刻) $a'Na$ 绝对值取点作图,可以发现它们呈现很好的线性关系. 13 个相关实验的这种关系曲线斜率均值为 $7.9 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 每 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \pm 2.5$ ($n=13$). 将其写作 $7.9 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. 其含义是:由于细胞内 Na^+ 逐出是与 $a'Na$ 成正比的,在任一胞内 Na^+ 水平上都将有 0.79% 的细胞内 Na^+ 在 1 s 内被逐出.

钠泵活动抑制百分比的测定 通过测定在静息时以及应用强心甙后提高了 $a'Na$ 情况下的钠泵活动速率,可以了解强心甙对细胞 Na^+

转运系统的影响. 为了这个目的,用每一种选定的强心甙作 7-8 个相同的实验,观察其引起膜除极及提高细胞内 Na^+ 的作用.

从 Acridhellin 典型作用过程的实际记录图(Fig 1)中可以看出,剂量为 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时细胞内 Na^+ 水平升高,膜除极. 该图也显示了毒性剂量的作用.

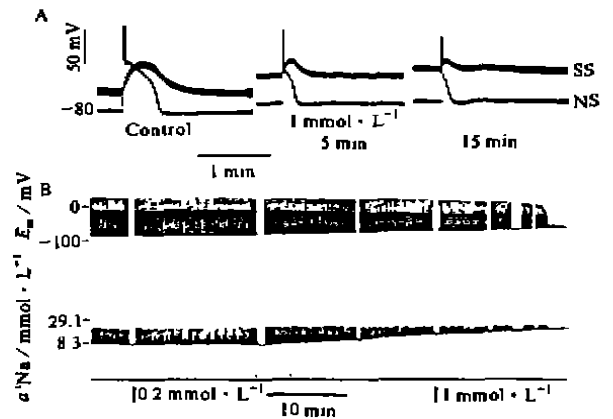


Fig 1. A record of E_m and $a'Na$ during exposure of Purkinje fiber to subtoxic ($0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) and toxic ($1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) doses of acridhellin.

A: Action potentials recorded by non-selective (NS) and Na^+ -selective (SS) electrodes.

B: E_m and $a'Na$ after adding acridhellin.

在毒性 ($21.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 及亚毒性 ($4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 浓度 ouabain 中 $a'Na$ 值与给药时间之间成正相关关系(Fig 2). 从 Fig 2A 中可以看出,每个实验中的 $a'Na$ 值均持续升高,而以箭头表示的 DAD 出现时间在不同纤维却相当不一致. 如果以 DAD 的出现作为一个共同的时间关系点,按照 DAD 出现前后来分析细胞内 Na^+ 随时间的变化,便可以使各种不同强心甙引起的 $a'Na$ 变化时程曲线变得一致起来(Fig 2B).

从 Fig 2B 中可清楚地看出, DAD 出现前的 $\Delta a'Na$ 值较为分散,至 DAD 出现时, $a'Na$ 升至中等水平,随时间延长 $\Delta a'Na$ 逐渐加大. 这一过程在同一种强心甙的所有实验都十分相

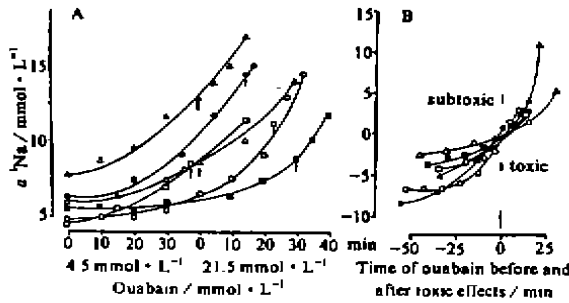


Fig 2. Intracellular sodium accumulation after exposure of Purkinje fiber to ouabain. (A): The arrows indicate the first displaying of after depolarization. (B): Intracellular sodium changes against the first onset of afterdepolarization as a common reference point (arrows). Each symbol represents a Purkinje fiber.

似。在后面强心甙引起细胞内 K⁺丢失的实验中,也以同样研究方法发现了 DAD 出现时刻与 Δa⁺K 时间、剂量依赖性的关系。

各组 a⁺Na 对照值,各种强心甙毒性剂量开始时 a⁺Na 已增加的量、净 Na⁺摄取速率 (da⁺Na/dt) 及 MP 的变化等均列在表中 (Tab 1)。从这些参数中看出 Digoxin 引起的 Δa⁺Na 及 Na⁺摄取速度明显地高于 Deslanoside 的相应值。

在 Tab 1 各项参数基础上,还可计算强心甙毒性作用出现时刻钠泵活动抑制的百分比。

前已述及本工作所测得的胞内 Na⁺主动逐出率为 0.79%,按 Tab 1 中 a⁺Na 对照值

5.3 — 5.8 mmol·L⁻¹,二者乘积即在静息状态下胞内 Na⁺主动逐出率。

$$PA(0) = 42.1 - 45.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$$

此值表示静息状态下的膜钠泵活动或者说运转速率。静息时, a⁺Na 总是保持在一相对稳定水平, Na⁺跨膜内、外流动是平衡的。因此,跨膜漏入的 Na⁺内流速率应与主动逐出速率相等: PA(0) = Na_{in}⁺(0)。

被动 Na⁺流的大小取决于两方面力:膜对 Na⁺流动的阻力或者对其电导 (g_{Na}) 及电化梯度对其驱动力 (E_{Na} - E_m),也就是, Na_{in}⁺ = g_{Na} > (E_{Na} - E_m)。

因此,有公式 [1] Na_{in}⁺ = PA(0) = g_{Na} × (E_{Na} - E_m(0)),从 Tab 1 看出在 DAD 发生时细胞膜有轻度除极,可以假设此时 g_{Na} 无明显变化。这样,用下面公式便可计算出每组实验 DAD 发生时刻 Na⁺跨膜内流速率:

$$Na_{in}^{+}(DAD) = g_{Na} > (E_{Na}(DAD) - E_m(DAD)) \quad [2]$$

公式 [2] 与公式 [1] 相同,但瞬时 Na⁺跨膜流量不同。将两公式中的 g_{Na} 提出可得公式 [3]:

$$Na_{in}^{+}(DAD) = PA(0) \times (E_{Na}(DAD) - E_m(DAD)) / (E_{Na}(0) - E_m(0)) \quad [3]$$

公式 [3] 右侧的参数中,应用强心甙前后的 MP 可直接测量 (见 Tab 1 第 4, 5 项),将所测得的 a⁺Na (Tab 1 第 2 项) 转换为胞内 Na⁺浓度后,按 Nernst 公式可计算出 E_{Na}(0) 及 E_{Na}(DAD)。

Tab 1. Sodium measurement. $\bar{x} \pm s$. *P < 0.01 vs control.

Steroid	n	a ⁺ Na / mmol·L ⁻¹		da ⁺ NaDAD/dt μmol·L ⁻¹ ·s ⁻¹	Resting potential / mV	
		Control	Uptake		Control	Ascent
Digoxin	12	5.4 ± 1.8	5.8 ± 3.0*	5.7 ± 2.5	-83.0 ± 5.2	5.4 ± 2.3
Meproscillarin	5	5.3 ± 1.2	4.7 ± 3.2*	3.9 ± 0.4	-81.8 ± 7.0	4.8 ± 4.4
Acridhellin	8	5.7 ± 1.2	4.3 ± 2.5*	4.6 ± 2.5	-82.6 ± 4.4	5.3 ± 3.5
Deslanoside	6	5.4 ± 0.6	3.8 ± 2.5*	3.4 ± 1.2	-83.2 ± 5.7	6.0 ± 2.7
Ouabain	6	5.8 ± 1.2	5.0 ± 2.2*	3.9 ± 1.5	-83.5 ± 6.2	5.3 ± 2.6
K-Strophanthin	8	5.7 ± 2.7	3.9 ± 2.2*	3.6 ± 1.2	-82.5 ± 2.8	7.9 ± 4.2

Tab 2. Inhibition of sodium pump at the beginning of toxicity.

Steroid	Basic state of pump PA(0)/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$	Sodium influx $\text{Na}_m^+(\text{DAD})$ / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$	Pump rate (actual) PA(DAD)/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$	Pump rate (possible) PA(might)/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$	Pump inhibition/ %
Digoxin	42.7	36.2	30.5	88.5	65.5
Meprosicllarin	42.1	36.3	32.6	79.0	59.1
Acridhelin	45.0	39.3	34.7	79.0	56.1
Deslanoside	42.9	37.6	34.2	72.5	52.8
Ouabain	45.8	39.6	35.7	85.3	58.2
K-Strophanthin	45.0	38.8	35.2	75.85	53.6

将这些参数代入公式[3]便可计算出 DAD 发生时刻 Na^+ 被动流入速率 (Tab 2 第2项). 从中扣除净 Na^+ 摄取速率 (Tab 1 第3项), 便得到同一时刻钠泵运转速率 (PA(DAD), Tab 2 第3项). 显然, 到 DAD 出现时, PA 已被部分抑制. 若按应用强心甙升高了的 $a'\text{Na}$ 值, 在假定钠泵活动未受到抑制情况下计算其应有的速率则为:

$$\text{PA (might)} = 7.9 \times a'\text{Na}(\text{DAD}) \quad (\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{s}^{-1})$$

计算所得数已列入 Tab 2 第4项. 从钠泵活动应有速率与实际速率数值便可以计算出其抑制的百分比 % $(\text{PA (might)} - \text{PA (DAD)}) / \text{PA (might)} \times 100$ (已列入 Tab 2 第5项). 从 Tab 2 可看出强心甙毒性作用开始时钠泵活动抑制的百分比为 52.8% - 65.5%. 其中 Digoxin 抑制程度最高, 而 deslanoside 最低. 按这一电生理方法研究所得数值与其它方法 (放射性同位素、酶活性测量等) 所得结果十分符合^(5,6).

$a'\text{K}$ 的测量 在 0.4 Hz 刺激下测得 $a'\text{K}$ 为 $104.6 \pm 9.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($n=14$). Fig 3 显示了强心甙对 $a'\text{K}$ 作用的一例. 图上方照片为 AP. 记录图上线为用普通电极记录的 E_m , 下线是反映细胞内 K^+ 活度的电位. 标尺已折算为细胞内 K^+ 活度. 应用 Meprosicllarin 后最大舒张膜电位 (MDP) 轻度下降. 亚毒性浓度

($0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 时 E_{diff} 轻度降低, 毒性浓度 ($0.6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 进一步降低.

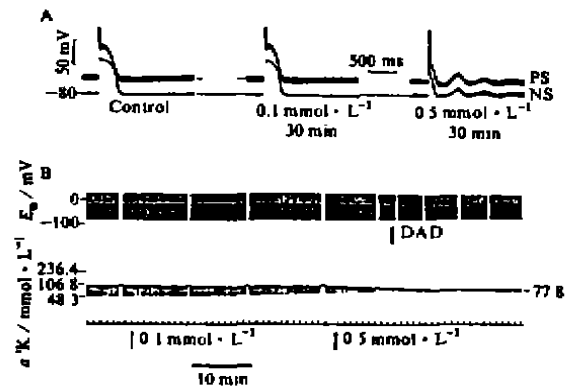


Fig 3. A record of E_m and $a'\text{K}$ during exposure of Purkinje fiber to meprosicllarin. A: Action potentials recorded by NS and SS electrodes. B: E_m and $a'\text{K}$ after adding meprosicllarin.

在亚毒性范围内, $a'\text{K}$ 的变化 ($\Delta a'\text{K} / a'\text{K}$ (0)%) 很小. 但在多数实验中仍然记录到了胞内 K^+ 的逐渐丢失.

在不同浓度 digoxin 作用下, 用前述处理方法表示胞内 K^+ 相对其对照值的时间依赖性丢失示于 Fig 4. 为便于观察 K^+ 丢失量与 MP 降低的关系, 这里 $\Delta a'\text{K}$ 的纵座标用了自下而上递增. 在这一图中, 已将 K^+ 丢失及膜除极程度按 DAD 出现时间重新整理过, 所以这些数据点显得比较集中.

几种强心甙对 $a'\text{K}$ 的影响列于 Tab 3.

Tab 3. Potassium measurement. $\bar{x} \pm s$. * $P > 0.05$, ° $P < 0.01$ vs control.

Steroid	n	$a^1K / \text{mmol} \cdot L^{-1}$		Resting potential/mV	
		Control	Loss	Control	Ascent
Digoxin	4	111.2 ± 13.7	-2.3 ± 2.3*	-82.0 ± 1.2	5.5 ± 1.1
Meproscillarlin	6	103.5 ± 11.0	-5.0 ± 6.9*	-80.7 ± 6.1	3.3 ± 0.8
Deslanoside	4	101.0 ± 14.8	-12.3 ± 3.4*	-81.5 ± 5.3	7.0 ± 3.5
Ouabain	3	102.8 ± 10.3	-18.3 ± 2.7°	-84.0 ± 4.5	3.7 ± 0.5
K-Strophanthin	6	104.5 ± 13.4	-24.1 ± 9.0°	-85.2 ± 4.8	10.8 ± 7.2

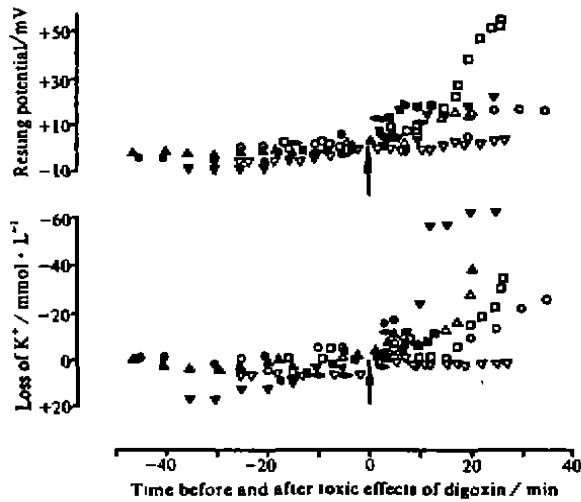


Fig 4. Depolarization, K^+ loss, and beginning of toxic effect (arrows) after adding digoxin 0.10 — 3.25 $\text{mmol} \cdot L^{-1}$. Each symbol refers to a Purkinje fiber.

从中可以看出，在 DAD 发生之前，整个亚毒性范围内，脂溶性强心甙(digoxin, meproscillarlin)所引起的胞内 K^+ 丢失要少于水溶性组(deslanoside, ouabain, strophanthin)，而这与它们对钠泵活动的抑制程度(Tab 2)无关。

DISCUSSION

从结果中(Fig 2B, Fig 4)看出，当我们以 DAD 的出现作为一个共同的时间关系基点时，各种制剂、所有实验中 Δa^1Na (或 Δa^1K) 的数据点离散程度大大减小，而且，在 DAD 出现后， Δa^1Na (或 Δa^1K) 显著加大。根据本工作资料，再进一步作定量分析，如 Tab 2 所示，DAD 首次出现时，钠泵抑制程度为 58 % 左

右，尽管不同制剂化学结构有着明显的差别，但它们在 DAD 的发生与 PA 抑制程度之间的关系上却十分近似。因此，可以说，强心甙毒性作用的产生(本实验以 DAD 出现为标准)与钠泵活动受抑制程度之间有着明确的关系。

强心甙引起自律活动除由于 α_1 激活或 Na^+-Ca 置换电流⁽⁷⁻⁹⁾外，也还有另外一种可能性，在到达毒性阈时，由于钠泵活动大部分受到抑制，跨膜外向离子流无法补偿很高的净 Na^+ 内流($4.2 \mu\text{mol} \cdot L^{-1} \cdot s^{-1}$ Tab 1 第3项均值)，若将其折算成电流，需先除以活度系数将其转换成浓度，再乘以 Faraday 常数(将其转换为电荷数)，最后除以浦肯野纤维的细胞面积/体积比($5.9 \times 10^6 \text{cm}^2 \cdot L^{-1}$)⁽¹⁰⁾。得到内向 Na^+ 电流： 92nA/cm^2 ，膜电容若按 $1 \mu\text{F/cm}^2$ 计，这额外的内向电流会使膜以 $92 \text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$ 的速度充电，这一速度相当于产生后电位的膜除极速度。除极使得 Ca^{2+} 通道开放， Ca^{2+} 内流，进而细胞内 Ca^{2+} 释放，这一方面引起后收缩，另外也使 g_K 升高，从而使膜复极。这一过程周而复始，形成一个或多个后电位和后收缩。而且，在钠泵抑制引起较大的内向电流时，正是 DAD 出现的时刻。这种可能性的存在以往虽然曾有人提出过⁽⁷⁾，但本工作进一步提供了定量研究的依据。另一方面从 Tab 1 可以看出，digoxin 及 deslanoside 在毒性作用发生时的 Δa^1Na 、净 Na^+ 摄取速度以及钠泵活动抑制程度均有较明显的差别。因此，除了对钠泵的抑制作用外，不能排除另外的因素对 DAD 的发

生起作用。

REFERENCES

- 1 Deitmer JW, Ellis D. The intracellular sodium activity of cardiac Purkinje fibres during inhibition and re-activation of the Na-K pump. *J Physiol (Lond)* 1978; **284**: 241-59.
- 2 Glitsch HG. Characteristics of active Na transport in intact cardiac cells. *Am J Physiol* 1979; **238**: H189-99.
- 3 Glitsch HG. Inhibition of the Na pump — a mechanism in the genesis of cardiac arrhythmias. *Basic Res Cardiol* 1984; **79**: 611-9.
- 4 Han DY, Liu BY, Chen XL, Liu WF. Effects of extracellular sodium concentration on the sodium-pump activity in Purkinje fibres of sheep. *Acta Physiol Sin* 1990; **42**: 562-70.
- 5 Marsh AJ, Lloyd BL, Taylor RR. Age dependence of myocardial Na⁺-K⁺-ATPase activity and digitalis intoxication in the dog and guinea pig. *Circ Res* 1981; **48**: 329-33.

- 6 Rhee HM. Ouabain sensitivity of Rb uptake in canine Purkinje fiber and ventricular muscle. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1982; **310**: 344-8.
- 7 Lederer WJ, Tsien RW. Transient inward current underlying arrhythmogenic effects of cardiotonic steroids in Purkinje fibers. *J Physiol (Lond)* 1976; **263**: 73-100.
- 8 Colquhoun D, Neher E, Reuter H, Stevens CF. Inward current channels activated by intracellular Ca in cultured cardiac cells. *Nature* 1981; **284**: 752-4.
- 9 Fedida D, Noble D, Rankin AC, Spindler AJ. The arrhythmogenic transient inward current *i_{T1}* and related contraction in isolated guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol (Lond)* 1987; **382**: 523-42.
- 10 Daut J. The role of intracellular sodium ions in the regulation of cardiac contractility. *J Mol Cell Cardiol* 1982; **14**: 189-92.

249 - 252

15

4-氨基吡啶诱发小鼠舔体反应与肥大细胞释放组胺¹

林宇红, 徐建华² (浙江医科大学 药理学系 药理教研室, 杭州 310006, 中国)

R 965.2

4-Aminopyridine-induced licking response and histamine liberation in mice

LIN Yu-Hong, XU Jian-Hua
(Department of Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Medical University, Hangzhou 310006, China)

ABSTRACT 4-Aminopyridine (4-AP) 1 mg · kg⁻¹ sc at the scruff induced a licking response in mice. H₁ receptor blockaders, such as diphenhydramine HCl (1, 10 mg · kg⁻¹, sc at the scruff or 40 mg · kg⁻¹, ip), chlorphenamine maleate (20 mg · kg⁻¹, ip), and

astemizole (2 mg · kg⁻¹, ig), inhibited the licking response caused by 4-AP. Repeated injections of 4-AP (1 mg · kg⁻¹) reduced the times of lick and the histamine content in the skin of injected site. 4-AP also promoted histamine release from incubated mouse peritoneal mast cells (PMC) in a dose-dependent manner. The results indicate that the licking response may originate from the histamine liberation of mast cells.

KEY WORDS 4-aminopyridine; animal behavior; histamine H₁ receptor blockaders; mast cells; histamine liberation

Received 1992-07-31 Accepted 1993-12-06
¹ Project supported by the National Natural Science Foundation of China, No 39270788.
² To whom correspondence should be addressed.

A摘要 4-氨基吡啶 (4-AP) 1 mg · kg⁻¹ 颈背部 sc 能诱发小鼠舔体反应。该反应可被苯海拉明、氯苯那敏或阿司咪唑所抑制。重复注射

(基...)