

【实验研究】

牛磺酸镁配合物对获得性长QT综合征模型的抗心律失常作用研究

安梦瑶^{1,2}, 李 燕³, 孙 凯⁴, 尹永强⁵, 孙 涛⁶, 娄建石^{5*}

1. 天津大学 化工学院制药工程系, 天津 300072

2. 天津天诚新药评价有限公司, 天津 300462

3. 天津市武清区人民医院, 天津 301700

4. 安徽医科大学附属阜阳医院, 安徽 阜阳 236000

5. 天津医科大学 基础医学院 药理学系, 天津 300070

6. 南开大学 药物化学生物学国家重点实验室, 天津 300071

摘要: 目的 研究牛磺酸镁配合物(TMCC)对获得性长QT综合征(LQTS)模型的抗心律失常作用及作用机制。方法 采用Langendorff逆行主动脉灌流酶解法,急性分离获得豚鼠单个心室肌细胞;建立表达KCNQ1/KCNE1基因的HEK293细胞模型。色原烷醇293B(5 $\mu\text{mol/L}$)用来建立LQTS模型,采用全细胞膜片钳技术记录TMCC(0.01、0.10、1.00 mmol/L)对正常和LQTS模型豚鼠心室肌细胞动作电位和缓慢激活延迟整流外向钾通道(I_{Ks})电流的影响。结果 色原烷醇293B可以显著延长50%和90%复极化动作电位持续时间(APD_{50} 和 APD_{90}),0.01、0.10、1.00 mmol/L TMCC可以显著减弱色原烷醇293B延长 APD_{50} 和 APD_{90} 的作用($P < 0.05$ 、 0.01)。TMCC(0.01、0.10、1.00 mmol/L)对抗色原烷醇293B对 I_{Ks} 电流的抑制作用,减弱色原烷醇293B对I-V曲线的下移,0.1、1.0 mmol/L浓度组显著减弱色原烷醇293B对 I_{Ks} 电流的抑制作用($P < 0.01$),呈现对抗LQTS的作用。结论 TMCC通过缩短动作电位复极时程,增大被抑制的 I_{Ks} 电流,发挥一定的抗LQTS的作用。

关键词: 长QT综合征; 牛磺酸镁配合物; 全细胞膜片钳技术; 缓慢激活延迟整流外向钾通道; 色原烷醇293B

中图分类号: R926 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2021)02-0314-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.02.009

Anti-arrhythmic effect of Taurine-Magnesium Coordination Compound on model of long QT syndrome

AN Mengyao^{1,2}, LI Yan³, SUN Kai⁴, YIN Yongqiang⁵, SUN Tao⁶, LOU Jianshi⁵

1. Department of Pharmaceutical Engineering, School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China

2. Tianjin Tiancheng New Drug Evaluation Research Co., Ltd., Tianjin 300462, China

3. People's Hospital of Wuqing, Tianjin 301700, China

4. Fuyang Hospital of Anhui Medical University, Fuyang 236000, China

5. Department of Pharmacology, College of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, 300070 Tianjin, China

6. State Key Laboratory of Medicinal Chemical Biology, Nankai University, Tianjin 300071, China

Abstract: objective The anti-arrhythmic effect of Taurine-Magnesium Coordination Compound (TMCC) was assessed on the model of long QT syndrome (LQTS). **Methods** Chromanol 293B (5 $\mu\text{mol/L}$) was used to establish the LQTS model in guinea pig ventricular myocytes and to inhibit HEK293 cells stably expressing I_{Ks} channels. All cells were incubated for 24 h in the absence and presence of drugs. The I_{Ks} current and action potentials were recorded by using the whole-cell patch-clamp technique. **Results** Chromanol 293B significantly prolonged APD_{50} and APD_{90} ($P < 0.01$). TMCC could attenuate the effect of chromanol 293B on

收稿日期: 2020-09-15

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81373410)

第一作者: 安梦瑶,女,博士,主要从事药理研究工作。E-mail: amymengyao@126.com

*通信作者: 娄建石,男,教授,博士生导师,研究方向为心血管药理和临床药理。Tel: (022)83336860 E-mail: jianshilou@163.com

prolongation APD₅₀ and APD₉₀, which could be reversed significantly by TMCC (0.01, 0.1, 1.0 mmol/L) ($P < 0.05$ and 0.01). TMCC (0.01, 0.1, and 1 mmol/L) were concentration-dependently against the effect of chromanol 293B on I_{Ks} current inhibition. The I_{Ks} I-V curve was shifted downwards by chromanol 293B (5 μ mol/L), while upwards by TMCC. TMCC (0.01, 0.10, and 1.00 mmol/L) could restore the decrease of peak I_{Ks} due to chromanol 293B ($P < 0.01$). **Conclusion** It was suggested that TMCC have anti-arrhythmic effect on LQTS through shortening the action potential duration and increasing the inhibited I_{Ks} current.

Key words: long QT syndrome; taurine-magnesium coordination compound; whole-cell patch clamp; I_{Ks} ; chromanol 293B

长QT综合征(LQTS)亦称QT间期延长综合征,包括先天性和获得性LQTS,是第一个发现的离子通道疾病,它是一组有遗传倾向,以心室复极延长(QT间期延长、T波和/或U波形态异常)为特征,易发生尖端扭转型室性心动过速(torsades de pointes, TdP)、心室纤维性颤动(ventricular fibrillation)和心源性猝死的综合征^[1-2]。

先天性LQTS主要与基因突变有关,到目前为止,已经鉴定了15种不同基因突变导致先天性LQTS(LQT 1~15)^[3]。LQT1主要是因为基因KCNQ1突变,而LQT5主要是因为KCNE1的突变。KCNQ1和KCNE1共同组成缓慢激活延迟整流外向钾通道(slowly activated delayed rectifier potassium current, I_{Ks}), I_{Ks} 是有助于心脏复极电流的慢成分^[4]。两个基因的功能突变将会引起外向 I_{Ks} 减少,导致动作电位持续时间(action potential duration, APD)延长和诱导平台期发生早期后去极化(early afterdepolarizations, EAD),以及QT间期延长和室性心律失常TdP的发生^[5-6]。

除了遗传性LQTS外,获得性LQTS发病率也越来越高。获得性LQTS主要是由药物、缓慢心律失常、电解质紊乱、心动过缓、心肌病变(如急性心肌炎、心肌病、心肌缺血)、充血性心衰或心肌肥厚、脑血管意外、自主神经功能紊乱或营养改变等因素引起的可逆性QT间期延长伴TdP发作的临床综合征,占全部LQTS的80%以上,其中以药物为主,大约有40个类别,152种药,且有不断增加的趋势。这说明药物在治疗疾病的同时也存在着引发心律失常的潜在危险,如果遇到隐性先天性LQTS患者,或者多个危险因素或促发因素同时存在,其危险性更大,它为临床治疗和新药研发提出了新挑战。一些新药上市不久即因心脏毒性而遭撤市。因此,获得性LQTS的基础和临床研究备受人们关注。

色原烷醇293B(Chromanol 293B)作为首选 I_{Ks} 选择性抑制剂可以延长心肌细胞动作电位时程^[7],其功效与III类抗心律失常药相当。色原烷醇293B

抑制 I_{Ks} 选择性作用强于瞬时外向钾通道电流(I_{to})20倍以上,而对快速激活的延迟整流钾电流(I_{Kr})并无作用,是目前公认的 I_{Ks} 特异性阻断剂。

本实验室合成了牛磺酸镁配合物(taurine-magnesium coordination compound, TMCC),其分子式为 $Mg(NH_2CH_2CH_2SO_3)_2 \cdot H_2O$ (相对分子质量为290.04),见图1。前期的实验结果表明,TMCC对氯化铯、哇巴因、乌头碱、肾上腺素以及缺氧复氧条件下诱导的传统心律失常有肯定的防治效果,并且可以影响多个离子通道,包括延迟整流外向钾电流 I_K ^[8-11]。但TMCC对LQTS的作用机制还未见报道,本实验在细胞水平建立由色原烷醇293B所致LQT模型,观察TMCC对豚鼠心室肌细胞动作电位和HEK293细胞 I_{Ks} 通道的影响,旨在深入探讨其抗心律失常作用的可能机制。

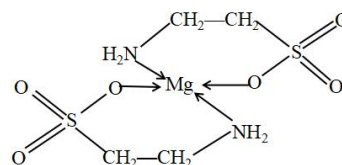


图1 TMCC分子结构

Fig. 1 Structure of TMCC

1 材料

1.1 药物及主要试剂

TMCC,本实验室合成,质量分数95%;色原烷醇293B,批号SC203889,Sigma,USA;肝素(1 000 U/mL,北京索莱宝科技有限公司);戊巴比妥钠(Sigma, USA)。

1.2 主要仪器

微电极拉制仪(P97, Sutter Instruments);毛细玻璃管(BF150-86-10, Sutter Instruments);倒置显微镜(IX71, Olympus);微电极操纵仪(MP285, Sutter Instruments);Patchmaster软件(HEKA);EPC-10放大器(HEKA)。

1.3 实验动物及细胞

健康成年雄性豚鼠,SPF级,体质量250~300 g,购于中国人民解放军军事医学科学院卫生学环境医

学研究所实验动物中心,实验动物质量合格许可证号SCXK-2014-0012。根据中国动物实验控制和监督委员会的指导方针饲养动物。实验方案由天津医科大学实验动物护理和使用伦理委员会批准,并遵循由美国国家卫生研究院出版的“实验动物护理和使用指南”(NIH Publication No. 852-3, 1996年修订)。

稳定表达 I_{Ks} 电流的HEK293细胞系,购自ICE Bioscience Co., Ltd.

2 方法

2.1 溶液的配制

K-H溶液(Krebs-Henseleit solution)、KB溶液(Kraft-Brühe solution)、记录 I_{Ks} 电流的细胞外液和细胞内液、Buffer A缓冲液、酶液、记录动作电位电极外液和电极内液的配制方法参照文献报道^[12]。药物母液:色原烷醇293B($5\text{ }\mu\text{mol/L}$)由DMSO溶解配成;TMCC(0.01、0.10、1.00、2.00、4.00 mmol/L)由纯水溶解配成。K-H灌流液中DMSO体积分数不能超过0.1%,溶液中DMSO不影响结果测定。

2.2 豚鼠心室肌细胞分离及给药

豚鼠麻醉前,ip 1 mL肝素抗凝,3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)ip麻醉豚鼠,开胸,迅速游离并取出心脏,离体心脏放入盛有 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ K-H溶液培养皿中,迅速清洗去除脂肪和心包膜,游离主动脉。将其放置在Langendorff装置中的套管的尖端上。在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下用无钙缓冲液Buffer A灌注心脏,直到缓冲液清澈,完全冲出血液,眼科剪剪除周围组织。快速用酶液灌注心脏持续约20 min,50 mL缓冲液A溶液灌注洗去酶液。从心尖部开始剪去心室肌细胞组织,放入盛有适量KB溶液的小烧杯中,用眼科剪将心室肌组织剪成尽量小的组织块,用吸管轻轻吹打,获得单个心室肌细胞。用200目的细滤网滤过含有心肌细胞的KB溶液,滤过后的细胞液定容至30 mL。将复钙后的细胞置于12 mmol/L盖玻片上,于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置,2 h后进行给药处理。

豚鼠心室肌细胞分为对照组和TMCC 0.01、0.10、1.00 mmol/L组, TMCC浓度梯度参照前期研究结果^[12]。各组细胞孵育24 h后,进行动作电位检测,分别记录给予色原烷醇293B($5\text{ }\mu\text{mol/L}$)急性灌流前后各组细胞的动作电位变化。

2.3 动作电位记录

选择横纹清晰、边缘清楚、表面清洁的单个心肌细胞进行膜片钳检测。将各组细胞悬液加入细胞池(容积0.8 mL),置于倒置显微镜工作台上。室

温下灌流色原烷醇293B($5\text{ }\mu\text{mol/L}$),体积流量 2 mL/min 。细胞贴壁后,利用微操纵器移动电极,并轻压在细胞表面,稍加负压即可形成 $2\sim 4\text{ G}\Omega$ 水平的高阻封接,再用较大负压吸破细胞膜形成全细胞记录形式。信号经银/氯化银电极引导,由膜片钳放大器放大,采用Patchmaster软件。

形成全细胞记录模式后,在电流钳模式下记录动作电位。将细胞保持在 0 pA 并且步进至 1 nA 持续10 ms以激发动作电位。动作电位记录程序刺激方案为:首先电流钳制在 0 pA ,随后向细胞内注入 $2\text{ }000\text{ pA}$ 的电流,时间维持在4 ms,最后再落回 0 pA ,频率设定在1 Hz进行采集记录,稳定记录10 min后,以此记录色原烷醇293B对各组细胞作用的效果,每一组记录10 min以上。记录静息膜电位(resting membrane potential, RMP)、动作电位振幅(action potential amplitude, APA), 50%、90%复极化动作电位持续时间(APD_{50} 、 APD_{90})等参数。

2.4 HEK293细胞系培养

稳定表达 I_{Ks} 电流的HEK293细胞系,将 5×10^3 个细胞铺到盖玻片上,在24孔板中培养(最终体积 $500\text{ }\mu\text{L}$),孵育24 h后,进行实验检测。为维持细胞的电生理活性,细胞密度不能超过80%。

HEK293细胞分为对照组和TMCC 0.01、0.10、1.00 mmol/L组,各组细胞孵育24 h后,进行全细胞膜片钳电流检测,分别记录给予色原烷醇293B($5\text{ }\mu\text{mol/L}$)急性灌流前后各组细胞的 I_{Ks} 电流。

2.5 电生理记录

在倒置显微镜下使用标准全细胞膜片钳技术记录 I_{Ks} 电流。电压刺激方案如下:当形成全细胞封接后,细胞膜电压钳制在 -80 mV 。钳制电压由 -80 mV 除极至 $+60\text{ mV}$ 维持5 s,然后迅速保持在 -40 mV 维持4 s,可以激发出 I_{Ks} 通道的尾电流。每隔20 s重复采集数据,观察药物对 I_{Ks} 电流的作用。实验数据由EPC-10放大器进行采集并储存于PatchMaster软件中。

用微电极拉制仪将毛细玻璃管拉制成记录电极,玻璃微电极分两步拉制而成。在倒置显微镜下操纵微电极操纵仪将记录电极接触到细胞上,给予负压抽吸,形成 $2\sim 4\text{ G}\Omega$ 封接后进行快速电容补偿,然后继续给予负压,吸破细胞膜,形成全细胞记录模式。进行慢速电容的补偿并记录膜电容及串联电阻,不给予漏电补偿。

当全细胞记录的电流稳定后开始给予含色原烷醇293B($5\text{ }\mu\text{mol/L}$)的细胞外液,体积流量 2 mL/min ,

每组细胞作用至5 min(或者电流至稳定)后检测下一个。将铺有细胞的盖玻片置于倒置显微镜中的记录浴槽中,分别测试各给药组 I_{Ks} 电流。独立重复检测多个细胞。所有电生理实验在室温下进行。

由于全细胞构型下所测得的电流是宏膜电流即整个细胞电流总和,细胞体积越大其总电流就越大,为了消除了细胞间体积的差异而使结果具有可比性,应用电流密度作为指标来表示膜电流的大小。

2.6 数据分析

使用 Clampfit 10.1 软件将所记录的原始数据进行处理分析。所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, n 表示研究的细胞或心脏的数量。使用 GraphPad Prism 6.0(GraphPad Software, LA Jolla, CA) 进行数据分析。使用 OriginPro 8.0 和 Inkscape 0.48.4.0 软件进行图形绘制。运用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析,两两比较采用配对 t 检验;多组比较采用单因素方差分析(ANOVA),方差齐时,采用 LSD 法、SNK 法检验;方差不齐时,采用 Dunnett T_3 检验。

3 结果

3.1 TMCC 对豚鼠心室肌细胞动作电位的影响

对照组的 RMP 为 (-80.90 ± 0.87) mV,与对照组比较, TMCC(0.01、0.10、1.00 mmol/L) 3 个浓度均可以升高 RMP 值,其中 0.1、1.0 mmol/L 浓度组差异显著 ($P < 0.05$ 、0.01)。与对照组比较, TMCC(0.01、0.10、1.00 mmol/L) 对动作电位幅度均无显著影响。与对照组比较, TMCC(0.01、0.10、1.00 mmol/L) 均可以显著缩短 APD_{50} 、 APD_{90} ($P < 0.05$ 、0.01), 分别将 APD_{50} 缩短 39.61%、55.91%、28.03%, 分别将 APD_{90} 缩短 38.59%、54.45%、28.37%。结果见表 1。

3.2 TMCC 对 LQTS 模型中豚鼠心室肌细胞动作电位的影响

对照组和 TMCC 组的 RMP 和 APA 在给予色原

烷醇 293B 前后均没有显著性变化。与给色原烷醇 293B 前比较, 色原烷醇 293B 可以延长 APD_{50} 和 APD_{90} , 分别将 APD_{50} 从 (441.72 ± 27.50) ms 延长到 (492.03 ± 28.83) ms, 将 APD_{90} 从 (475.31 ± 26.29) ms 延长到 (525.33 ± 28.38) ms。0.01、0.10、1.00 mmol/L TMCC 可以减弱色原烷醇 293B 对豚鼠心室肌细胞 APD_{50} 和 APD_{90} 的延长作用。TMCC(0.01 mmol/L) 不能显著减轻色原烷醇 293B 对 APD_{50} 和 APD_{90} 的延长作用, TMCC(0.1、1.0 mmol/L) 均可以逆转色原烷醇 293B 对 APD_{50} 和 APD_{90} 延长作用到正常水平。见图 2-A。

如图 2-B 所示, 与给色原烷醇 293B 前比较, 色原烷醇 293B 可以延长豚鼠心室肌细胞 APD_{50} (13.78 ± 2.49); TMCC(0.01、0.10、1.00 mmol/L) 可以将色原烷醇 293B 延长 APD_{50} 比例分别降至 $(5.61 \pm 1.33)\%$ 、 $(1.94 \pm 2.11)\%$ 、 $(6.71 \pm 1.24)\%$, 与对照组比较均差异显著 ($P < 0.05$ 、0.01)。

如图 2-C 所示, 与给色原烷醇 293B 前比较, 色原烷醇 293B 可以延长豚鼠心室肌细胞 APD_{90} (12.58 ± 2.03); TMCC(0.01、0.10、1.00 mmol/L) 可以将色原烷醇 293B 延长 APD_{90} 比例分别降至 $(4.87 \pm 1.10)\%$ 、 $(2.56 \pm 1.87)\%$ 、 $(6.11 \pm 1.10)\%$ ($P < 0.05$ 、0.01)。结果提示, TMCC 可以减弱色原烷醇 293B 对豚鼠心室肌细胞动作电位的延长作用, 从而产生一定的抗 LQTS 作用。

3.3 TMCC 减弱色原烷醇 293B 抑制 I_{Ks} 电流峰值的作用

对照组及 TMCC(0.01、0.10、1.00 mmol/L) 与 HEK293 细胞分别孵育 24 h 后, 急性灌流色原烷醇 293B ($5 \mu\text{mol/L}$), I_{Ks} 电流峰值变化见表 2。结果显示, 与给予色原烷醇 293B 前比较, 色原烷醇 293B 急性灌流后, 各组 I_{Ks} 电流峰值均显著减小 ($P < 0.01$)。

TMCC(0.01、0.10、1.00 mmol/L) 预孵 24 h 可明显减弱色原烷醇 293B 对 I_{Ks} 电流的抑制作用, 且表现出

表 1 TMCC 对豚鼠心室肌细胞动作电位的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 Effects of TMCC on different action potential parameters of guinea pig ventricular myocytes ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(mmol·L ⁻¹)	RMP/mV	APA/mV	APD_{50} /ms	APD_{90} /ms
对照	—	-80.90 ± 0.87	131.48 ± 2.48	392.94 ± 36.75	437.30 ± 36.29
TMCC	0.01	-83.23 ± 0.81	129.39 ± 1.42	$237.31 \pm 32.85^{**}$	$268.55 \pm 32.42^{**}$
	0.10	$-83.94 \pm 1.11^{*}$	136.77 ± 2.19	$173.26 \pm 26.37^{**}$	$199.19 \pm 24.13^{**}$
	1.00	$-85.18 \pm 1.02^{**}$	129.31 ± 3.15	$282.81 \pm 32.03^{*}$	$313.23 \pm 31.80^{**}$

与对照组比较: $^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$

$^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ vs control group

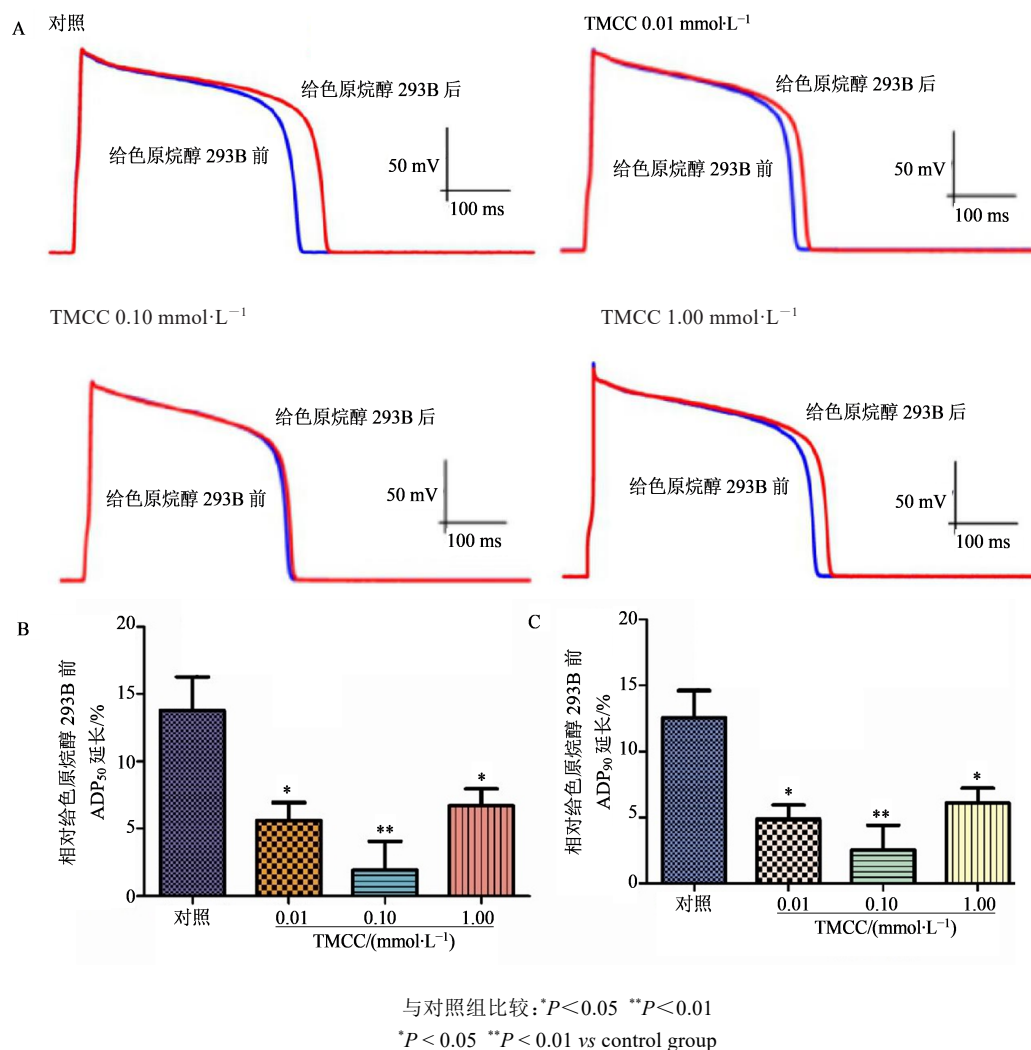


图2 TMCC对LQTS模型中豚鼠心室肌细胞动作电位(A)、ADP₅₀(B)、ADP₉₀(C)的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 2 Effect of TMCC on action potentials (A), ADP₅₀ (B), and ADP₉₀ (C) of myocytes in guinea pig LQTS model ($\bar{x} \pm s, n=6$)

表2 TMCC对色原烷醇293B抑制HEK293细胞I_{Ks}电流峰值的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 2 Effects of TMCC on I_{Ks} current density (pA/pF) in chromanol 293B - induced LQTS model of HEK293 cells ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/ (mmol·L ⁻¹)	电流峰值(pA/pF)	
		给色原烷醇 293B 前	给色原烷醇 293B 后
对照	—	229.89±33.78	88.63±13.27**
TMCC	0.01	177.72±24.94	72.13±9.59**
	0.10	161.98±38.12	88.24±19.09**
	1.00	79.81±8.37	41.02±4.09**

与给色原烷醇293B前比较:** $P < 0.01$

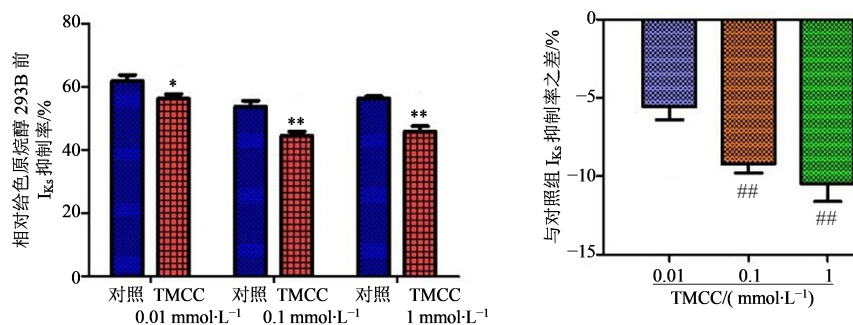
** $P < 0.01$ vs same group before treatment of Chromanol 293B

浓度相关性。0.01、0.10、1.00 mmol/L TMCC 分别将色原烷醇293B对I_{Ks}电流峰值的抑制率从(61.78±1.96)%降至(56.22±1.48)%;从(53.71±1.90)%降

至(44.49±1.44)%($P < 0.01$),从(56.38±0.66)%降至(45.91±1.68)%($P < 0.01$)。与相应对照组比较,0.01、0.10、1.00 mmol/L TMCC对抗色原烷醇293B对I_{Ks}电流的抑制作用,分别减弱了(5.56±2.54)%、(9.22±1.07)%、(10.48±2.31)%,呈现浓度相关性($P < 0.01$)。见图3。

3.4 TMCC对色原烷醇293B抑制I_{Ks}电流-电压关系的影响

以去极化的膜电位为横坐标,相应的标准化电流密度为纵坐标绘制I_{Ks}的I-V曲线。色原烷醇293B可以使I-V曲线下移,呈现抑制I_{Ks}的作用;而经过TMCC(0.01、0.10、1.00 mmol/L)孵育后的细胞,可以减弱色原烷醇293B对I-V曲线下移,减弱色原烷醇293B对I_{Ks}电流的抑制作用,呈现对抗LQTS的作用,无明显剂量相关性,结果见图4。



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与 TMCC 0.01 mmol·L⁻¹ 组比较: ## $P < 0.01$
 $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ $P < 0.01$ vs TMCC 0.01 mmol·L⁻¹ group

图3 TMCC减弱色原烷醇293B抑制I_{Ks}的作用

Fig. 3 Effects of TMCC on inhibition percent of chromanol 293B on I_{Ks} (A) and compared to control (B)

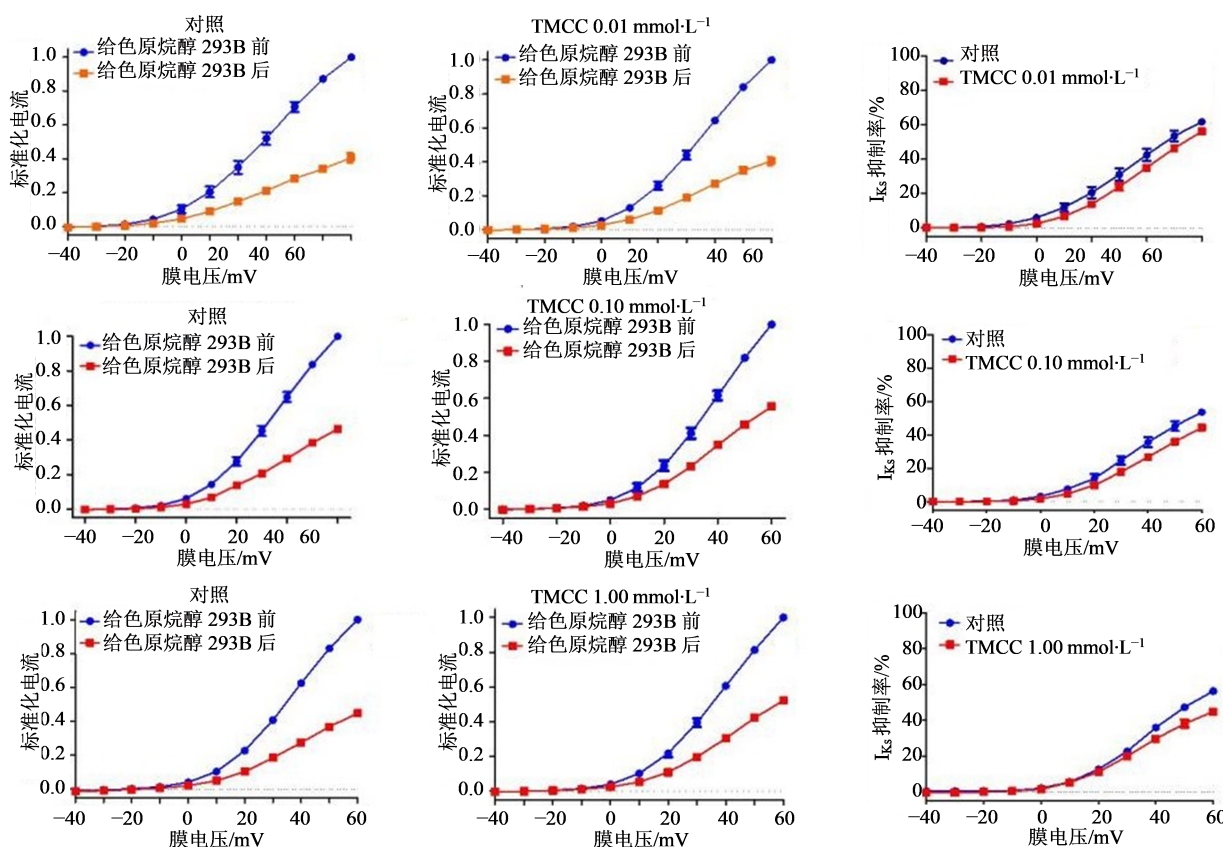


图4 TMCC改变色原烷醇293B对I_{Ks}电流I-V曲线的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 4 Effects of chromanol 293B on I-V curves of I_{Ks} densities in HEK293 cell stable expressing I_{Ks} channel after incubated for 24 h with/without TMCC ($\bar{x} \pm s, n=8$)

4 讨论

在本研究中,通过应用色原烷醇293B以及低K⁺溶液制备LQTS模型,色原烷醇293B是在瞬时外向电流上等阻断活性的I_{Ks}拮抗剂。选择豚鼠作为LQTS模型的基础,因为在豚鼠心脏中缺乏I_{to}。选用单独稳定表达I_{Ks}电流的HEK293细胞系,避免了其他电流的干扰。

在前期灌流豚鼠离体心脏实验中,本课题组发

现TMCC可通过降低离体心脏跨室壁复极离散度和QT间期不稳定性以及抑制早后除极的发生而发挥抗TdP作用,降低TdP发生率^[11]。为了进一步探讨TMCC抗LQTS的机制,在本实验中,本课题组在豚鼠心室肌细胞和稳定单独表达I_{Ks}电流的HEK293细胞上,分别进行了动作电位和I_{Ks}通道电流的相关测定。

在人类心脏中,缓慢的延迟整流钾电流I_{Ks}对心

脏动作电位复极化至关重要^[13]。在正常情况下, I_{Ks} 在心室动作电位复极化中几乎没有作用^[14]。然而, 当心室复极面临挑战的情况, 特别是在增加交感神经紧张情况下, I_{Ks} 贡献显著提高。 I_{Ks} 通道属于慢激活和失活的通道动力学^[15]。因此, 在脆弱的条件下, I_{Ks} 提供了一种复极化储备, 可以防止过度的 AP 延长和致心律失常早期后去极化的发展, 特别是当另一个复极电流 I_{Kr} 受损时。

本课题组前期研究探讨了单独 TMCC (0.01、0.10、1.00 mmol/L) 可以使 HEK293 细胞 I_{Ks} 通道电流的 I-V 曲线下移, 呈现抑制 I_{Ks} 的作用; 且 TMCC 可以延长被缩短的动作电位复极时程, 来减慢心室复极化, 延长 QT 和复极不应期, 降低跨室壁离散度和 RR、QT 间期不稳定性, 对抗吡那地尔和曲匹地尔造成的 3 个 SQT2 模型, 发挥一定的抗心律失常作用^[12]。本实验研究结果显示, 色原烷醇 293B 使得 I_{Ks} 的功能障碍, 显著抑制 HEK293 细胞 I_{Ks} 通道电流, 从而显著延长豚鼠心室肌细胞 APD_{50} 和 APD_{90} , 呈现 LQTS 的电生理特征。然而细胞经过 TMCC (0.01、0.1、1 mmol/L) 预孵 24 h 后, 能够明显削弱色原烷醇 293B 的作用, TMCC 也能减弱色原烷醇 293B 对 I_{Ks} 电流的抑制作用, 增大被抑制的 I_{Ks} 电流, 从而降低色原烷醇 293B 对 APD_{50} 和 APD_{90} 的延长作用。同时, 中、高浓度 TMCC (0.1、1 mmol/L) 可以逆转色原烷醇 293B 对 APD_{50} 和 APD_{90} 延长作用到正常水平, 呈现对抗 LQTS 的作用。本实验中未发现剂量相关性, 原因可能是: ①中间浓度的标准误差较其余两个都大; ②可能存在饱和效应; ③浓度范围可能过大, 超出了细胞变化范围。更明确的原因还需后期进一步研究。TMCC 对正常状态下、长 QT 综合征和短 QT 综合征的抗心律失常作用, 看似矛盾, 却也有一定科学依据。根据“最佳靶点学说”: 在正常状态下, 心肌细胞上各离子通道处于平衡状态; 但在病理条件下, 各种原因导致各通道之间平衡紊乱, 偏离了正常平衡点, 都将引起心律失常; 在失衡中起主要作用的通道, 是心律失常发生过程中的主要作用靶点; 而作用于心律失常时的主要靶点、使失衡的离子通道恢复正常或接近正常的药物具有较好的抗心律失常效应。所以, 在此项研究中, 本课题组发现, 在不同病理条件下, TMCC 均可以使偏离了正常平衡点的 I_{Ks} 通道恢复正常或者接近正常状态, 从而发挥其抗心律失常作用。推测 TMCC 或许是一个部分抑制剂, 在不同病理模型下, 其或许会与其他模型药竞争作用靶点, 减弱模

型药(色原烷醇 293B、吡那地尔和曲匹地尔)的药理作用, 从而发挥抗心律失常作用。至于 TMCC 对 LQTS 或者 SQTs 其他通道在病理状态下的作用还需进一步验证。

目前, 已经在动物模型上证实小分子激动剂能够通过挽救 KCNQ1 基因突变导致的 I_{Ks} 通道功能缺陷, 上调通道功能, 逆转 LQT1 患者延长的 QT 间期, 发挥抗心律失常作用。已经证实苯二氮䓬类化合物 L-364373 (R-L3) 可缓解 LQT1 的症状^[16]。芬那酸衍生物(甲芬那酸和氟芬那酸)通过稳定 I_{Ks} 通道开放状态发挥上调通道功能的作用^[17-18]。吡啶硫铜锌 (ZnPy) 仅可以增大 KCNQ1 通道电流幅度, 但对 I_{Ks} 通道不敏感^[19]。丹参酮 II_A 对 I_{Ks} 的激动作用主要是显著左移激活曲线, 减缓通道的开放和关闭速度^[20]。麻黄碱通过与 I_{Ks} 通道 S5 和 S6 之间的 Pore-loop 区域的芳香氨基酸残基作用, 激活 I_{Ks} 并左移电压激活曲线^[21]。Choi 等^[22]发现人参皂苷 Rg₃ 通过与 K318、V319 相互作用, 使 KCNQ1/KCNE1 通道稳定开放。但是研究发现, KCNE1 可以改变以上小分子激动剂的活性。

结合前期研究结果^[10], 通过选用色原烷醇 293B 溶液模拟获得性 LQTS 药理模型, 出现婴儿型 ST-T 波形或者宽大 T 波, 早后除极 (EAD) 以及电交替心电图症状和 TdP 现象, 并延长动作电位和抑制 I_{Ks} 电流。而加入 TMCC 后, TMCC 通过减弱 I_{Ks} 电流被抑制的情况, 增强复极储备, 缩短被延长了的动作电位, 进而减少心室复极时间, 缩短心室不应期, 降低跨室壁离散度和心室不稳定性, 产生抗心律失常作用, 从而降低发生 TdP 的风险, 产生一定的抗 LQTS 的作用。这与 Jost 等^[23]关于 I_{Ks} 的激活剂将增强复极化储备, 从而在 I_{Ks} 被抑制或下调的情况下降低 TdP 的风险的推测是一致的。本课题组研究的 TMCC 为治疗 LQT1、LQT5 提供一些参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Schwartz P J, Periti M, Malliani A. The long Q-T syndrome [J]. Am Heart J, 1975, 89(3): 378-390.
- [2] Roden D M, Lazzara R, Rosen M, et al. Multiple mechanisms in the long-QT syndrome. Current knowledge, gaps, and future directions. The SADS Foundation Task Force on LQTS [J]. Circulation, 1996, 94(8): 1996-2012.
- [3] Hedley P L, Jørgensen P, Schlamowitz S, et al. The genetic basis of long QT and short QT syndromes: a

- mutation update [J]. Hum Mutat, 2009, 30(11): 1486-1511.
- [4] Sanguinetti M C, Curran M E, Zou A, et al. Coassembly of K(V)LQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I (Ks) potassium channel [J]. Nature, 1996, 384(6604): 80-83.
- [5] Wang Q, Curran M E, Splawski I, et al. Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias [J]. Nat Genet, 1996, 12(1): 17-23.
- [6] Schulze-Bahr E, Wang Q, Wedekind H, et al. KCNE1 mutations cause jervell and Lange-Nielsen syndrome [J]. Nat Genet, 1997, 17(3): 267-268.
- [7] Busch A E, Suessbrich H, Waldegger S, et al. Inhibition of IKs in guinea pig cardiac myocytes and guinea pig IsK channels by the chromanol 293B [J]. Pflugers Arch, 1996, 432(6): 1094-1096.
- [8] Zhao L, Lou J S, Wu H, et al. Effects of taurine-magnesium coordination compound on ionic channels in rat ventricular myocytes of arrhythmia induced by ouabain [J]. Biol Trace Elem Res, 2012, 147(1/3): 275-284.
- [9] Zhao L, Lou J S, Kang Y. Taurine-magnesium coordination compound attenuates hypoxia/reoxygenation induced ion channel dysfunction in rat ventricular myocytes [J]. Drug Res, 2013, 63(4): 185-191.
- [10] Li Y, Sun K, An M Y, et al. Anti-arrhythmic effects of taurine-magnesium coordination compound on torsades de pointes [J]. Chin J appl physiol, 2018, 34(2): 106-110.
- [11] Lou J S, Wu H, Wang L F, et al. Taurine-magnesium coordination compound, a potential anti-arrhythmic complex, improves aconitine-induced arrhythmias through regulation of multiple ion channels [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2018, 356: 182-190.
- [12] An M Y, Sun K, Li Y, et al. Therapeutic effects of a taurine-magnesium coordination compound on experimental models of type 2 short QT syndrome [J]. Acta Pharmacol Sin, 2018, 39(3): 382-392.
- [13] Charpentier F, Mérot J, Loussouarn G, et al. Delayed rectifier K(+) currents and cardiac repolarization [J]. J Mol Cell Cardiol, 2010, 48(1): 37-44.
- [14] Silva J, Rudy Y. Subunit interaction determines IKs participation in cardiac repolarization and repolarization reserve [J]. Circulation, 2005, 112(10): 1384-1391.
- [15] Jurkiewicz N K, Sanguinetti M C. Rate-dependent prolongation of cardiac action potentials by a methanesulfonanilide class III antiarrhythmic agent. Specific block of rapidly activating delayed rectifier K⁺ current by dofetilide [J]. Circ Res, 1993, 72(1): 75-83.
- [16] Salata J J, Jurkiewicz N K, Wang J, et al. A novel benzodiazepine that activates cardiac slow delayed rectifier K⁺ currents [J]. Mol Pharmacol, 1998, 54(1): 220-230.
- [17] Xiong Q, Gao Z, Wang W, et al. Activation of Kv7 (KCNQ) voltage-gated potassium channels by synthetic compounds [J]. Trends Pharmacol Sci, 2008, 29(2): 99-107.
- [18] Busch A E, Herzer T, Wagner C A, et al. Positive regulation by chloride channel blockers of I_{Ks} channels expressed in *Xenopus* oocytes [J]. Mol Pharmacol, 1994, 46(4): 750-753.
- [19] Gao Z, Xiong Q, Sun H, et al. Desensitization of chemical activation by auxiliary subunits: convergence of molecular determinants critical for augmenting KCNQ1 potassium channels [J]. J Biol Chem, 2008, 283(33): 22649-22658.
- [20] Sun D D, Wang H C, Wang X B, et al. Tanshinone II_A: a new activator of human cardiac KCNQ1/KCNE1 (I(Ks)) potassium channels [J]. Eur J Pharmacol, 2008, 590(1-3): 317-321.
- [21] Jing H J, Luo L, Li H, et al. Ephedrine controls heart rhythms by activating cardiac I-ks currents [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2010, 55(2): 145-152.
- [22] Choi S H, Shin T J, Lee B H, et al. Ginsenoside Rg3 activates human KCNQ1 K⁺ channel currents through interacting with the K318 and V319 residues: a role of KCNE1 subunit [J]. Eur J Pharmacol, 2010, 637(1-3): 138-147.
- [23] Jost N, Virág L, Bitay M, et al. Restricting excessive cardiac action potential and QT prolongation: a vital role for IKs in human ventricular muscle [J]. Circulation, 2005, 112(10): 1392-1399.

[责任编辑 兰新新]