

## • 临床基础研究 •

关附甲素对兔心室肌晚钠电流  
及兴奋传导速度的影响\*欧阳松<sup>1</sup> 张晓雅<sup>1</sup> 侯月梅<sup>1,2</sup>

**【摘要】** 目的:应用微电极阵(MEA)技术研究关附甲素(GFA)对兔心室肌晚钠电流(INaL)及兴奋传导速度(ECV)的影响。方法:新西兰大白兔64只,随机分成4组:对照组(8只),GFA组(1、3、10 μmol/L,每种浓度各8只),海葵毒素组(ATX II,8只),ATX II + GFA组(1、3、10 μmol/L,每种浓度各8只)。开胸取出心脏后进行langendroff灌注,用柔性电极贴附左心室,记录各项电生理信号的变化。结果:与对照组相比,GFA 1 μmol/L组、3 μmol/L组、10 μmol/L组心室肌场电位时限(fAPD)分别缩短至(338.88±10.93)、(327.13±11.57)、(314.25±9.38)ms( $P<0.05$ ),ECV分别减慢至(0.51±0.10)、(0.38±0.11)、(0.25±0.07)m/s( $P<0.05$ );ATX II组fAPD明显延长( $P<0.05$ ),ECV则无明显变化( $P>0.05$ )。与ATX II组相比,ATX II + GFA 1 μmol/L组、3 μmol/L组、10 μmol/L组心室肌fAPD分别缩短至(349.38±11.67)、(330.88±11.09)、(318.50±11.05)ms( $P<0.05$ ),ECV分别减慢至(0.51±0.10)、(0.41±0.08)、(0.30±0.07)m/s( $P<0.05$ ),其fAPD缩短率明显高于GFA组。结论:GFA具有抑制INaL与减缓ECV的作用,可能为其抗心律失常的主要机制。

**【关键词】** 微电极阵;关附甲素;场电位时限;兴奋传导速度;晚钠电流

doi:10.13201/j.issn.1001-1439.2016.12.019

[中图分类号] R541.7 [文献标志码] A

The effect of guanfu base A on the late sodium current and  
excitation conduction velocity in rabbit ventricular muscleOUYANG Song<sup>1</sup> ZHANG Xiaoya<sup>1</sup> HOU Yuemei<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>The Third Clinical Medical College of Southern Medical University, Department of Cardiology, Affiliated Fengxian Hospital of Southern Medical University, Guangzhou, 510515, China; <sup>2</sup>Department of Geratology, Affiliated Fengxian Hospital of Southern Medical University)  
Corresponding author: HOU Yuemei, E-mail:houyuemei@sina.com

**Abstract Objective:** To explore the effect of guanfu base A(GFA) on the late sodium current (INaL) and excitation conduction velocity (ECV) in rabbit ventricular muscle by Microelectrode array(MEA) technology. **Method:** Sixty four rabbits of either sex were randomly divided into 4 groups: control group( $n=8$ ), GFA group (1, 3, and 10 μmol/L,  $n=8$  for each concentration), ATX II group ( $n=8$ ), ATX II + GFA group (1, 3, and 10 μmol/L,  $n=8$  for each concentration). The heart was perfused with modified Tyrode's solution after removed. Flexible electrodes were attached to the left ventricle, and recorded the changes of electrophysiological signals. **Result:** In the GFA 1, 3, and 10 μmol/L groups, fAPD shortened to 338.88±10.93, 327.13±11.57, and 314.25±9.38 ms, respectively ( $P<0.05$ ), while ECV decelerated to 0.51±0.10, 0.38±0.11, and 0.25±0.07 m/s, respectively ( $P<0.05$ ). In the ATX II group, fAPD prolonged noticeably ( $P<0.05$ ), however, there was no change in CV ( $P<0.05$ ). In the ATX II + GFA 1, 3, and 10 μmol/L groups, fAPD shortened to 349.38±11.67, 330.88±11.09, 318.50±11.05 ms, respectively ( $P<0.05$ ), while ECV decelerated to 0.51±0.10, 0.41±0.08, 0.30±0.07 m/s, respectively ( $P<0.05$ ), the shortening rate in the ATX+GFA group was significantly higher than that in the GFA group ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** GFA can inhibit INaL and decelerate ECV in rabbit ventricular muscle, and it may be the primary mechanism of its antiarrhythmic.

**Key words** microelectrode array; guanfu base A; field action potential duration; excitation conduction velocity; late sodium current

\* 基金项目:上海市卫计委重点项目(No:20134009)

<sup>1</sup>南方医科大学第三临床医学院 南方医科大学附属奉贤医院心内科(广州,510515)

<sup>2</sup>南方医科大学附属奉贤医院老年科

通信作者:侯月梅,E-mail:houyuemei@sina.com

关附甲素(guanfu base A, GFA)是从毛茛科黄花乌头的块根关白附子中提取的一种二萜类生物碱,是我国第1种具有自主知识产权的抗心律失常药物。药理实验证实该药可以特异性减慢心率,降低心肌氧耗量,且对心肌收缩及血流动力学无明显影响<sup>[1]</sup>。早在2005年,GFA就已通过Ⅱ和Ⅲ期临床试验,用于治疗室上性心律失常<sup>[2]</sup>。早前大量国内外研究表明,GFA对多种离子通道具有抑制作用,包括心肌细胞的L型钙通道(ICaL)、延迟整流钾电流(IK)、起搏电流(I<sub>f</sub>)、瞬态钠电流等(INaT)<sup>[3-6]</sup>。GFA的抗心律失常作用可能与对离子通道的抑制作用有关。新近研究发现,GFA对晚钠电流(late sodium current, INaL)具有选择性抑制作用,可能为其抗心律失常的主要机制之一<sup>[7]</sup>。有研究表明,微电极阵(microelectrode arrays, MEA)记录到的心室肌场电位与膜片钳记录到的细胞内动作电位具有可比性<sup>[8]</sup>。又因为INaL在决定动作电位时程(APD)方面起重要作用,故场电位时限(field action potential duration, fAPD)的长短变化可反映INaL增强与减少状态。本文在离体兔心脏langendroff灌流基础上,应用MEA技术进一步研究GFA对INaL及兴奋传导速度(excitation conduction velocity, ECV)的影响,并探讨其抗心律失常的主要机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物和分组

成年新西兰兔64只,体重2.5~3.0 kg,雌雄不拘,由南方医科大学动物实验中心提供,动物质量属于普通级标准。随机分成4组:对照组(8只),GFA组(1、3、10 μmol/L,每种浓度8只),海葵毒素组(ATXⅡ,8只),ATXⅡ+GFA组(1、3、10 μmol/L,每种浓度8只)。

### 1.2 试剂与仪器

改良台氏液成分(mmol/L): NaCl 144、KCl 5.0、CaCl<sub>2</sub> 1.8、MgCl<sub>2</sub> 1、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.33、HEPES 5.0、葡萄糖 10(NaOH滴定至pH值为7.4)。海葵毒素(ATXⅡ, A0981, 美国Sigma公司), GFA由南方医科大学提供,其余试剂均为国产分析纯。微电极阵列系统(Microelectrode arrays MEA64 System, 德国MCS公司),主要配置包括: MEA64(32×2)个位点柔性电极、PGA64放大器、USB-ME64转换卡、MC-Rack软件包。

### 1.3 langendroff离体心脏灌流模型建立

所有动物称重后,用3%戊巴比妥钠30 mg/kg经兔耳缘静脉注射麻醉后,静脉推注肝素800 U抗凝。将兔仰卧固定于动物台上,10 min后迅速开胸取出心脏,置于4℃充氧改良台氏液中,按心脏跳动节律挤压排出心脏内积血,简单修剪心脏。开启离体心脏灌流系统,改良台氏液流速15 ml/min,由

ALC-CWB数控恒温循环水槽控温在37℃,台氏液中通以95% O<sub>2</sub>+5% CO<sub>2</sub>的混合气体(pH<7.5)。显微器械提起主动脉,将灌注管道插入,置于主动脉瓣及冠状动脉开口上方,无创血管夹固定,丝线打结固定,取下血管夹,开始灌注,心脏迅速恢复搏动。

### 1.4 给药方法

ATXⅡ和GFA分别经二甲基亚砜(DMSO)和双蒸水溶解后混入改良台氏液中以达到最终药物浓度,改良台氏液中DMSO浓度不超过0.1%。

### 1.5 MEA柔性电极记录fAPD及ECV

柔性电极包括MEA1和MEA2,是在一块28 mm×6 mm的柔性塑料片基质头部1.8 mm×1.8 mm区域内以6×6阵列的形式植入32个记录心电活动的金电极,每个电极直径50 μm,相邻电极间隔300 μm。柔性电极由绝缘导线连接向外延伸,连接放大器。原理:柔性电极记录离体心脏心室肌电活动得到的原始信号,经放大器PGA64(增益100倍)调制后,由模数转换卡USB-ME64数字化,使用软件MC-Rack处理左室场电位各项参数:FPmin:第1个负向波的峰值;FPmax:最后一个正向波峰值;fAPD:从FPmin到FPmax的时间。两根柔性电极分别贴附离体心脏左心室,待心脏搏动稳定后开始记录64个位点的各组数据。ECV计算公式:最先激动与最晚激动位点之间的距离(0.14 m)/两点之间的时间差(s)。

### 1.6 统计学处理

所有数据均取自64个位点记录的相同时间段内的均数。采用SPSS20.0统计软件进行数据描述和统计处理,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用两独立样本 $t$ 检验,多组间比较采用单因素方差分析,方差齐时,采用LSD- $t$ 法进行多重比较;方差不齐时,采用Dunnett's  $t$ 检验,均以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

在改良台氏液langendroff灌流下,离体兔心脏可维持较长时间的自主节律。柔性电极贴附心室肌可记录到64个位点稳定的、敏感的基础和药物干预下的自主节律、场电位及兴奋传导的变化,且变化在64个位点之间具有一致性。

### 2.1 GFA组兔心室肌fAPD、ECV及心率的变化

分别用混有1、3、10 μmol/L GFA的改良台氏液灌流心脏,约30 min心脏搏动基本稳定后,开始记录各项电生理信号。与对照组相比,GFA组兔心室肌fAPD呈浓度依赖性缩短,ECV及心率呈浓度依赖性减慢(均 $P < 0.05$ )。见表1。

### 2.2 ATXⅡ组兔心室肌fAPD、ECV及心率的变化

用混有10 nmol/L ATXⅡ的改良台氏液灌流

心脏,约 30 min 心脏搏动基本稳定后,开始记录各项电生理信号。与对照组相比,ATX II 组 fAPD 明显延长( $P<0.05$ ),ECV 及心率则无明显变化。见表 2。

### 2.3 ATX II + GFA 组兔心室肌 fAPD、ECV 及心率的变化

先用混有 10 nmol/L ATX II 的改良台氏液灌

流心脏,约 30 min 心脏搏动基本稳定后,再分别改用混有 1、3、10  $\mu\text{mol/L}$  GFA 的改良台氏液继续灌流心脏。与 ATX II 组相比,GFA 组兔心脏心室肌 fAPD 呈浓度依赖性缩短,ECV 及心率呈浓度依赖性减慢(均  $P<0.05$ ),且其 fAPD 缩短率明显高于 GFA 组。见表 2 及图 1。

表 1 GFA 组心室肌 fAPD、ECV 及心率的比较

Table 1 fAPD, ECV and HR in ventricular myocytes in GFA group

组别	fAPD/ms	缩短率/%	ECV/( $\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ )	心率/(次 $\cdot \text{min}^{-1}$ )
对照组(8 只)	357.13 $\pm$ 13.53	—	0.65 $\pm$ 0.06	114 $\pm$ 7.00
1 $\mu\text{mol/L}$ 组(8 只)	338.88 $\pm$ 10.93 <sup>1)</sup>	5.10	0.51 $\pm$ 0.10 <sup>1)</sup>	101 $\pm$ 8.41 <sup>1)</sup>
3 $\mu\text{mol/L}$ 组(8 只)	327.13 $\pm$ 11.57 <sup>1)</sup>	8.40	0.38 $\pm$ 0.11 <sup>1)</sup>	92 $\pm$ 6.88 <sup>1)</sup>
10 $\mu\text{mol/L}$ 组(8 只)	314.25 $\pm$ 9.38 <sup>1)</sup>	12.01	0.25 $\pm$ 0.07 <sup>1)</sup>	81 $\pm$ 9.40 <sup>1)</sup>

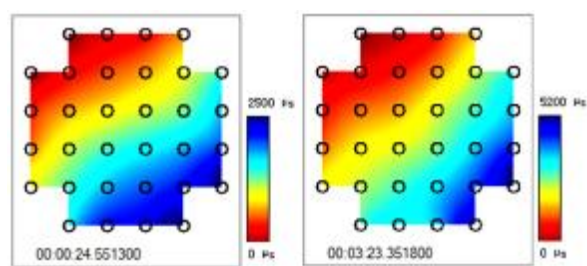
与对照组比较,<sup>1)</sup>  $P<0.05$ 。

表 2 ATX II + GFA 组心室肌 fAPD、ECV 及 HR 的比较

Table 2 fAPD, ECV and HR in ventricular myocytes in ATX II + GFA group

组别	fAPD/ms	缩短率/%	ECV/( $\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ )	心率/(次 $\cdot \text{min}^{-1}$ )
ATX II 组(8 只)	379.75 $\pm$ 13.54	—	0.69 $\pm$ 0.11	118 $\pm$ 7.16
10 $\mu\text{mol/L}$ 组(8 只)	349.38 $\pm$ 11.67 <sup>1)</sup>	8.00	0.51 $\pm$ 0.10 <sup>1)</sup>	103 $\pm$ 8.95 <sup>1)</sup>
20 $\mu\text{mol/L}$ 组(8 只)	330.88 $\pm$ 11.09 <sup>1)</sup>	12.87	0.41 $\pm$ 0.08 <sup>1)</sup>	89 $\pm$ 7.76 <sup>1)</sup>
40 $\mu\text{mol/L}$ 组(8 只)	318.50 $\pm$ 11.05 <sup>1)</sup>	16.13	0.30 $\pm$ 0.07 <sup>1)</sup>	78 $\pm$ 7.89 <sup>1)</sup>

与对照组比较,<sup>1)</sup>  $P<0.05$ 。



左为 ATX II 组,右为 ATX II + GFA 10  $\mu\text{mol/L}$  组。

图 1 ATX II 组和 ATX II + GFA 组 ECV 的比较

Figure 1 Comparison of ECV in GFA group and ATX II + GFA group

### 3 讨论

MEA 技术可同步 64 个位点记录多个心肌细胞的电活动,也可通过测定起搏细胞产生的兴奋传导到不同电极之间的时间差异,计算出兴奋的传播方向、传播途径及传导速度等,能对组织及心肌细胞群兴奋传导异常所致心律失常和抗心律失常的机制进行探讨<sup>[4]</sup>。尤其是柔性电极问世以后,应用 MEA 技术进行离体心脏及组织电生理方面的研究变得更易操作、更能接近生理情况。本实验应用 MEA 技术在兔离体心脏 langendroff 灌流基础上,用柔性电极贴附左心室,进行 1、3、10  $\mu\text{mol/L}$  3 种

不同浓度 GFA 对心室肌 INaL 及 ECV 影响的研究,不仅能够消除在体心脏实验中神经、体液等调节作用对药物效果的干扰,还能敏感、准确地反映出不同药物及相同药物不同浓度对观察对象的作用差异。

ATX II 作为一种 INaL 增强剂,浓度在 10 nmol/L 时可引起 INaL 显著增强<sup>[9]</sup>。通过合理的实验设计与分组,在使用和未使用 ATX II 增强 INaL 的条件下,比较各组间结果的差异,研究 GFA 对 INaL 的抑制作用,能使效果更加明显、更具有针对性。与 APD 一样,fAPD 主要由平台期外向的  $\text{K}^+$ 、内向的  $\text{Ca}^{2+}$  以及少量的内向  $\text{Na}^+$  (即 INaL) 决定。抑制平台期的 IK 和 ICaL、 $\text{Na}^+$  可分别导致 fAPD 延长和缩短。本实验中观察到使用 ATX II 增强 INaL,心室肌 fAPD 显著延长,验证了 fAPD 的长短变化可准确反映 INaL 增强与减少状态。

已有研究表明,GFA 对 ICaL 具有较弱的抑制作用,其平均血药浓度最高为 12.26  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  (相当于 26.20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),当浓度为 25  $\mu\text{mol/L}$  时,其抑制 ICaL 仅达 20%<sup>[2,11]</sup>。因此,本实验中,GFA 导致 fAPD 缩短与对 ICaL 的抑制作用关系不大。GFA 对 IK 同样具有抑制作用,可导致 APD 的延长<sup>[5,12]</sup>。与本实验中 GFA 最终导致 fAPD 缩短的

结果相反,且通过对比组间实验结果发现,ATX II +GFA组fAPD的缩短率显著高于GFA组。只有一种合理解释,即相较于GFA组,ATX II +GFA组在原有基础上还额外缩短了由ATX II增强晚钠电流而延长的fAPD,由此可推测出GFA是一种有效的INaL抑制剂。

本实验中发现GFA减缓ECV,与GFA减慢心率呈正相关。曾有研究推测GFA减慢心率与其对IK的抑制作用延长了心室肌复极化有关,但后来进一步的研究否认了这一推测<sup>[13-14]</sup>。通过对本实验结果的分析,发现GFA抑制INaL导致复极化的缩短,但与此同时ECV反而减慢,进一步说明GFA减慢心率的作用与对IK的抑制作用无关。又因为GFA对ICaL、If都具有抑制作用,前文已提到GFA对ICaL抑制作用较弱,故可推测GFA主要通过抑制If延缓动作电位4期去极化发挥减慢心率的作用。

GFA可拮抗心房颤动<sup>[15]</sup>、室性期前收缩和室性心动过速等多种心律失常。GFA的抗心律失常作用,一方面可能与抑制If特异性减慢心率有关,另一方面可能像其他INaL抑制剂一样,与抑制动作电位平台期异常增强的内向Na<sup>+</sup>有关。但想要弄清GFA对INaL的具体抑制情况,以及对其他离子通道的相关作用,需要应用膜片钳技术做进一步的研究。

综上所述,MEA是一种可靠的、非常有前景的药物研发检测工具。GFA具有抑制INaL与减缓ECV的作用,可能为其抗心律失常的主要机制。

#### 参考文献

[1] 梁岩,朱俊,杨艳敏,等. 盐酸关附甲素对急性心肌缺血五指山小型猪血流动力学的影响[J]. 中国新药与临床杂志,2007,26(3):190-195.  
[2] WANG M W, HAO X, CHEN K, et al. Biological screening of natural products and drug innovation in China[J]. Philos TR Soc B,2007,362:1093-1105.  
[3] 高鑫,浦介麟,杨艳敏,等. 盐酸关附甲素对大鼠心室肌细胞膜L型钙通道(ICa-L)的影响[J]. 中国新药杂志,2006,15(22):1926-1929.  
[4] LI Y, YANG Y M, PU J L, et al. Blocking effects of

Guanfu base A on potassium current in isolated rat and guinea pig ventricular myocytes[J]. Chin J Card Pacing Electrophysiol, 2006, 20:255-258.  
[5] FAN X R, CHEN Y J, XING J L, et al. Blocking effects of acehytisine on pacemaker currents (I<sub>f</sub>) in sinoatrial node cells and human HCN4 channels expressed in *Xenopus laevis* oocytes[J]. J Ethnopharmacol, 2012, 139: 42-51.  
[6] 裴德安,李庚山,蒋锡嘉,等. 关附甲素对单个心肌细胞钙通道和内向整流钾通道的阻断作用[J]. 中国心脏起搏与心电生理杂志,1999,13(2):45-47.  
[7] JIN S S, GUO Q, XU J, et al. Antiarrhythmic ionic mechanism of Guanfu base A—Selective inhibition of late sodium current in isolated ventricular myocytes from guinea pigs[J]. Chin J Nat Med,2015,13: 361-367.  
[8] 段亚琦,唐明,梁华敏,等. 微电极阵列研究小鼠胚胎心脏电生理活动[J]. 生理学报,2006,58(1):65-70.  
[9] BELARDINELLI L, LIU G, SMITH-MAXWELL C, et al. A novel, potent, and selective inhibitor of cardiac late sodium current suppresses experimental arrhythmias[J]. J Pharmacol Exp Therapeut,2012, 344:23-32.  
[10] 王国干,崔华东,朱俊,等. 静脉注射盐酸关附甲素的人体药代动力学研究[J]. 中国临床药理学杂志,2000,16(4):283-285.  
[11] 孙娟,侯月梅,刘政疆,等. 钾通道阻断剂对心房快速起搏兔右心耳场电位时限的影响[J]. 中华心律失常学杂志,2010,14(2):147-151.  
[12] 王逸平,陈维洲,王晓良,等. 盐酸关附甲素对豚鼠心室肌细胞延迟整流钾电流的抑制作用[J]. 药学学报,1996,31(8):581-584.  
[13] 黄兴富,杨艳敏,朱俊,等. 盐酸关附甲素对HERG基因F656C突变钾通道的影响[J]. 中国新药杂志,2010,19(7):612-616.  
[14] 郭巧,孙建国,黄潞,等. 关附甲素抗氧化和抗房颤作用[J]. 中国药科大学学报,2015,46(2):235-241.  
[15] BANYASZ T, SZENTANDRASSY N, MAGYAR J, et al. An emerging antiarrhythmic target: late sodium current[J]. Curr Pharm Des,2015,21:1073-1090.  
(收稿日期:2016-06-28 修回日期:2016-07-28)