

三丙酮胺对心肌细胞膜电位的影响

I 抗心律失常作用机制研究*

许实波 王志国 冯建林**

(生物系)

林永成 龙康侯

(化学系)

摘 要

三丙酮胺(Triacetoneamine-HCl, TAA)明显延长离体豚鼠心肌ERP(有效不应期), APD(动作电位时程)和ERP/APD₉₀, 使坪台水平略为下降, 但不影响APA(动作电位幅度), V_{max}(零相最大去极速率)和RP(静息膜电位); TAA抑制心肌自发异位节律性和由Ba²⁺式缺氧诱发的自律活动, 延长LP(动作电位潜伏期), 提高TS(阈刺激强度); 用高钙液灌流心肌, 可部分逆转TAA的作用; TAA显著抑制由高K⁺造成的SRAP(慢反应动作电位), 并呈电压及频率依赖性; TAA可逆转利多卡因和乙酰胆碱缩短APD的作用。结果提示TAA通过抑制自律性, 延长不应期及阻滞Ca²⁺内流而起抗心律失常的作用。

关键词 三丙酮胺(TAA), 抗心律失常, 动作电位, 慢通道阻滞, 离子电流, 心肌细胞

三丙酮胺(Triacetoneamine-HCl, TAA)系根据南海鳞丁蕊柳珊瑚 *Juncella squamata* 天然提取物的分子结构进而人工合成的水溶性盐酸盐结晶物。1979年, 古巴 Rojas⁽¹⁾报道三丙酮胺具有降低血压的作用, 我们的工作表明, 除降压效应外¹⁾, TAA还具有抗心肌缺血缺氧²⁾及抗多种动物实验性心律失常的作用³⁾。它显著抵抗乌头碱、哇巴因、氯化钡诱发的动物心律失常, 抑制氯仿、氯化钙、冠脉结扎及电刺激造成的心室纤颤及乌头碱导致的心房纤颤, 且其作用可能与 β 肾上腺素能受体和M胆碱能受体无关。本工作采用微电极技术, 研究TAA对心肌细胞电生理的影响, 从而探讨其抗心律失常的作用机制。

本文1987年11月25日收到

● 国家教委博士点基金资助课题

●● 国家医药总局天津药物研究院药理室

1)、2)、3)许实波、冯建林、王志国等, 待发表

1 材料与方 法

1.1 仪器装置 WF-1型源跟随器及微电极放大器, BME-1型电子微分器, SR76型二线示波器, SB-408B型示波照相机, LM-2A型二道生理记录仪, AJC-1型双脉冲刺激器, GT-Ⅱ型恒流隔离刺激器, WⅡH型微电极操纵器, 501型超级恒温器, WSQ-B型微量输液器, 有机玻璃灌注槽(自制), 其中标本槽容积2ml(2×2×0.5cm); 灌注液采用改良Tyrode液⁽²⁾, 成分如下(mM): NaCl 143, KCl 5.6, CaCl₂ 2.16, MgCl₂ 0.25, C₆H₁₂O₆ 11, 溶液用 Tris—hydroxy—methyl—aminomethane 5mM 缓冲。

1.2 标本制备 健康豚鼠200只, 雌雄兼用, 体重244.5±4.6g(\bar{x} ±SD, 下同)。击头处死, 迅速开胸, 摘取心脏, 于37℃, 充O₂ Tyrode液中用注射器从主动脉切口逆行注入Tyrode液将冠脉及心腔内血液全部冲出。剖离右心室乳头肌及左心房, 将标本固定于标本槽底部硅胶片上, 正贴于埋藏有刺激电极的位置上。Tyrode液37℃, pH 7.4, 充O₂, 灌注速度6 ml/min, 心肌标本由频率1 Hz, 波宽1 ms, 2倍阈刺激强度的方波刺激驱动。待标本稳定1 h后再开始各项实验(凡静息电位<-70mV者拼弃)。为测定有效不应期, 给标本施以双脉冲刺激(每5个单刺激后给予一个强度相等的期前刺激)⁽³⁾, 逐渐缩短双脉冲间距, 测得恰好引起连续两个动作电位的最小间距, 即ERP。每次试验均在同一细胞内完成。

1.3 药品试剂 三丙酮胺(Triacetoneamine—HCl, TAA), 中山大学化学系天然有机化学研究室提供, 戊脉安(Verapamil, Ver), 天津医药工业研究所; 乙酰胆碱(Acetylcholine, Ach), 上海第八制药厂; 利多卡因(Lidocaine, Lid), 第二军医大学朝晖制药厂; 其它用于配制Tyrode液的试剂均为市售分析纯制品。

1.4 结果处理 准确测量由示波照相机及二道生理记录仪记录的动作电位各参数, 每个数据均为同一细胞三个AP测量值的平均值, 将所得数据输入PG-065型微电脑进行均值、t 测验等统计学处理并贮存。

2 实验结果

2.1 TAA对生理条件下乳头肌AP的影响

右心室乳头肌标本36例, Tyrode液灌注稳定1 h后, 用微电极操纵器将固定式玻璃微电极小心插入标本表层细胞, 测得RP, 方波刺激诱发AP。同一细胞内可连续记录1 h以上, AP参数基本不变, 见表1。空白对照组每5 min记录一次AP, 给药组记录正常AP 10min后加TAA, 浓度分别为5 mM, 7.5mM和10mM。观察给药前后AP各参数的变化, 5 min后, APD₅₀, APD₉₀, ERP及ERP/APD₉₀皆有所延长, 10min后作用达高峰, 特别是ERP及ERP/APD₉₀在三种浓度TAA作用下均显著延长。之后, 各参数基本维持不变。此外, AP坪台水平略有下降。RP, APA及V_{max}在TAA作用下无显著变化, 见表2。上述变化均为可逆, 当用正常Tyrode液冲去TAA后, AP各参数在20min后即可恢复到正常值。药效随药物浓度增加而加大, 呈现量—效关系。

表1 豚鼠乳头肌正常动作电位参数
Tab. 1 Normal action potential of guinea pig papillary muscles. n=8, $\bar{x}\pm SD$

	0min	20 min	60 min
RP (mv)	86.9±4.2	86.3±5.8	84.4±5.0
APA(mv)	115.4±4.3	115.6±7.3	113.1±5.9
OS (mv)	30.4±1.1	29.5±1.9	28.8±1.9
V _{max} (v/s)	322.5±39.9	320.5±33.3	318.8±33.1
APD50 (ms)	139.9±15.0	140.8±16.6	142.6±20.3
APD90 (ms)	195.6±11.2	196.3±11.6	196.3±11.3
ERP (ms)	157.5±11.6	158.1±11.3	158.1±12.8
ERP/APD90	0.80±0.04	0.80±0.03	0.80±0.05

表2 TAA (5,75, 10mM) 对豚鼠乳头肌动作电位的影响
Tab 2. Effects of TAA(5, 7.5,10mM) on action potentials in guinea pig papillary muscles. n=28, $\bar{x}\pm SD$

	RP (mv)	APA (mv)	V _{max} (v/s)	APD50 (ms)
对照(10min)	86.1±7.8	115.6±10.1	320.0±56.6	120.6±15.9
TAA 5mM(15min)	85.6±7.3	115.0±7.9	327.8±58.3	126.9±28.3
对照(10min)	84.4±5.3	116.7±7.1	291.1±44.3	140.6±14.9
TAA7.5mM(15min)	85.6±6.8	115.6±6.8	295.6±40.0	162.2±17.0
对照(10min)	87.0±6.7	114.5±7.6	296.5±29.9	125.7±37.6
TAA 10mM(15min)	85.5±6.4	113.5±5.3	291.0±25.6	147.5±44.6

续表2

	APD90 (ms)	ERP (ms)	ERP/APD90
对照(10min)	194.3±16.6	163.2±19.2	0.84±0.08
TAA5mM(15min)	203.9±22.2	198.9±30.6**	0.97±0.15** 17.4±2.3**
对照(10min)	211.7±22.2	177.8±13.9	0.84±0.05
TAA7.5mM(15min)	239.4±19.3*	231.1±15.6**	0.99±0.03** 18.5±11.7
对照(10min)	196.5±38.1	156.5±27.1	0.79±0.09
TAA10mM(15min)	240.5±45.6*	225.0±39.8**	1.0±0.10** 26.7±7.3

与对照组比较 *P<0.05, **P<0.01

2.2 TAA对高[K⁺]. 造成的慢反应电位的影响

右心室乳头肌标本43例,先记录10min正常AP,然后用含17.5mM K⁺浓度的Tyrode液灌流标本,20min内,RP,APA,V_{max}及APD均显著减小,P<0.01,AP_{1,2}相消失,仅存0,3,4相,呈现慢反应电活动^[45],并且可一直维持40min以上不变,见表3.若在高K⁺作用20min出现稳定SRAP时分别加入0.2mM,1mM及5mM TAA,则在10—15min内SRAP各参数均显著减小,个别甚至受到完全抑制而消失,见表4. TAA的作用呈量—效关系.同时显示电压依赖性和频率依赖性.在本实验中,Ver抑制Ca²⁺依赖性的作用与TAA相似.提示TAA可能具有抑制慢Ca²⁺内流的作用.

表3 17.5mM KCl诱发的豚鼠乳头肌慢反应动作电位

Tab 3. The slow response action potentials caused by 17.5mM K⁺ in guinea pig papillary muscles
n=8, $\bar{x} \pm SD$

	RP (mv)	APA (mv)	V _{max} (v/s)	APD50 (ms)	APD90 (ms)
对照	83.1±6.5	107.6±10.0	306.3±26.2	176.3±29.1	230.6±37.8
高钾20min	44.4±3.2**	75.6±5.0**	22.3±1.9**	123.3±26.2**	151.3±24.9**
高钾40min	43.1±2.6**	74.4±6.2**	22.0±2.0**	117.7±29.0**	140.0±28.4**
冲洗20min	75.0±8.7	101.6±4.8	268.0±34.2	174.0±59.6	221.0±15.9

与对照组比较 ** P<0.01

表4 TAA对豚鼠乳头肌慢反应动作电位的影响

Tab 4. Effects of TAA on slow response action potentials in guinea pig papillary muscles
n=35, $\bar{x} \pm SD$

	RP (mv)	APA (mv)	V _{max} (v/s)	APD50 (ms)	APD90 (ms)
对照	45.0±4.6	74.4±6.8	22.9±4.2	82.5±29.2	103.8±34.3
0.2mM TAA	39.4±5.0* -12.4±7.2%	64.4±7.3* -12.1±3.4%	17.5±3.9* -23.1±10.9%	71.3±27.0 -15.4±9.8%	94.4±26.0 -10.5±3.3%
对照	43.3±4.3	71.1±7.4	23.6±2.8	75.6±21.9	98.3±24.9
1mM TAA	35.0±5.0** -19.4±6.1%	60.0±8.3** -15.9±4.2%	15.0±3.6** -30.9±10.8%	60.6±25.4 -20.5±9.3%	81.7±17.0 -20.9±12.6%
对照	45.9±4.4	75.0±5.8	22.8±2.4	98.2±22.7	120.5±25.4
5mM TAA	33.6±4.5** -25.8±6.8%	50.5±10.1** -32.5±13.3%	12.2±2.3** -46.9±11.4%	60.5±9.4** -43.2±13.4%	82.7±31.4** -35.1±13.4%
对照	42.9±3.9	70.0±7.1	23.6±2.9	91.4±25.0	114.3±23.2
2μM戊脉安	35.0±4.1** -18.3±6.2%	57.1±7.0** -18.2±7.01%	13.1±2.7** -44.0±11.6%	72.9±18.7 -18.1±6.9%	96.1±8.9 -15.4±8.9%

* P<0.05, ** P<0.01

2.3 TAA对高 $[Ca^{2+}]$ 作用下AP的影响

用含5.4mM高 Ca^{2+} 浓度的Tyrode液灌流标本7例,分别于5、10、15及20min时记录一次AP。结果AP坪台水平逐渐上抬,APD,ERP逐渐缩短,但RP,APA和ERP无显著改变。若用含5mM TAA + 5.4mM Ca^{2+} 的Tyrode液直接灌流标本7例,APD及ERP亦缩短,但缩短程度比单纯用高 Ca^{2+} 灌流时要小,坪台水平基本不变。若先用5mM TAA灌流标本7例,20min后APD有所延长,ERP显著延长,此时加入5.4mM Ca^{2+} ,结果APD₅₀, APD₉₀及ERP虽然比之单纯用TAA时有所缩短,但仍比正常对照时长,如图1所示,提示TAA具有 Ca^{2+} 拮抗作用。

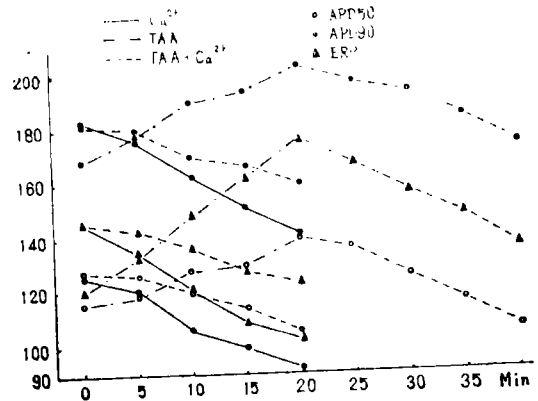


图1 TAA对豚鼠乳头肌动作电位的钙(Ca)拮抗作用
Fig 1. The antagonism between TAA 5mM and Ca^{2+} 5.4mM on action potentials in guinea pig papillary muscles

2.4 TAA对右室乳头肌自律性的影响

在制备右室乳头肌标本时,使其连带部分心室壁肌,这样制得的标本由于含浦氏纤维较多,在正常灌流液中亦可发生持续性或阵发性节律性活动,或由短时电刺激诱发其自律活动,在8例标本中,自发活动频率达 154.8 ± 22.3 次/分。且维持时间均在30min以上。若在自发活动出现时立即加入1mM TAA,则5min后自发活动被完全抑制而消失,除去药物则自律性恢复到 109.0 ± 2.3 次/分。表明TAA可明显抑制自发异位节律性。

2.5 TAA对BaCl₂诱发乳头肌自律性的影响

11例标本在0.4mM Ba^{2+} 作用下,AP₄相出现复极不完全现象,在 20.5 ± 4.0 min即可诱发乳头肌标本出现自律活动,频率达 189.2 ± 18.9 次/分,此时加入1mM TAA可逐渐抑制其自律性,约10min后使之消失,若给正常22例标本同时加入0.4mM Ba^{2+} + 1mM TAA,则标本自律活动出现时间推迟到 30.3 ± 6.1 min左右,延迟率为 $47.8 \pm 5.2\%$,频率也仅达 95.1 ± 40.7 次/分,降低率为 $49.7 \pm 12.3\%$, $P < 0.01$ 。提示TAA可有效地抑制 Ba^{2+} 诱发的自律活动。

2.6 TAA对缺氧诱发乳头肌自律性的影响

右室乳头肌标本10例,记录10min内正常AP,然后用 N_2 代替 O_2 ,模拟心肌缺氧状态,1h后,有6例标本出现自发节律性活动,频率不甚规则,加入1mM TAA 5—10min后,自律性被抑制而消失。

2.7 TAA对Lid缩短乳头肌APD的影响

先记录6例标本正常AP 10min,然后换用含0.4mM Lid的Tyrode液灌流,20min后,APA, V_{max} 及RP基本不变,而APD₅₀, APD₉₀及ERP则显著缩短。但ERP/

APD₅₀明显增加。此时加入 1 mM TAA, 则APD₅₀有所延长但不明显, 而APD₉₀, ERP均显著延长, 特别地, ERP/APD₉₀ > 1. 见表5.

表5 TAA对利多卡因缩短APD的影响

Tab 5. The prolonging effect of TAA 1mM on APD shortened by Lido 0.4mM in guinea pig papillary muscles
n = 6, $\bar{x} \pm SD$

	对照 10min	利多卡因 20min	TAA + 利多卡因 15min	冲洗 30min
APD ₅₀ (ms)	125.8 ± 13.9	81.7 ± 6.8** -34.7 ± 5.6%	109.7 ± 24.7°° 33.1 ± 2.1%	126.7 ± 15.1
APD ₉₀ (ms)	183.3 ± 14.0	134.2 ± 8.6** -26.5 ± 7.1%	170.7 ± 9.5°° 27.5 ± 8.8%	182.2 ± 11.7
ERP(ms)	135.0 ± 13.4	109.3 ± 16.1**	244.0 ± 31.6°°	139.0 ± 10.4
ERP/APD ₉₀	0.73 ± 0.04	0.82 ± 0.03**	1.43 ± 0.25°°	0.72 ± 0.04

与对照组比较 **P < 0.01, 与利多卡因比较 °°P < 0.01

2.8 TAA对ACh缩短左心房肌APD的影响

制备左心房标本7例, Tyrode液灌流稳定1h, 记录正常AP10min, 之后加入30 μM ACh作用10min, 使APD₅₀, APD₉₀及ERP均显著减小, APA, V_{max}则仅稍微降低。此时再加入1 mM TAA, 则APD及ERP皆明显增加, 见表6.

表6 TAA (1 mM) 对乙酰胆碱 (30 μM) 缩短豚鼠左心房肌APD的影响

Tab 6. The prolonging effect of TAA 5mM on APD shortened by Ach 30uM in left atrial muscles of guinea pigs
n = 7, $\bar{x} \pm SD$

	对照 10min	乙酰胆碱 10min	TAA + 乙酰胆碱 10min
APA(mv)	95.0 ± 9.1	93.6 ± 9.9	95.0 ± 10.0
V _{max} (v/s)	300.0 ± 30.0	298.6 ± 38.9	317.1 ± 34.0
APD ₅₀ (ms)	54.4 ± 8.4	31.4 ± 5.6** -41.5 ± 0.01%	57.1 ± 7.0°° 81.8 ± 0.50%
APD ₉₀ (ms)	92.0 ± 10.9	58.6 ± 6.3** -36.6 ± 0.09	97.4 ± 20.5°° 66.0 ± 0.25%
ERP(ms)	63.9 ± 3.5	37.9 ± 8.0**	74.4 ± 21.7°°
ERP/APD ₉₀	0.70 ± 0.09	0.64 ± 0.10	0.76 ± 0.05°°

与对照组比较 **P < 0.01

与乙酰胆碱比较 °°P < 0.01

2.9 TAA对右室乳头肌兴奋性的影响

标本6例, 稳定1h后, 测出使标本恰好产生正常幅度AP时的最小刺激强度, 即

阈刺激强度。加入5 mM TAA,每5 min记录一次AP,发现TS逐渐升高,TAA作用10 min时,TS提高达48.9%,用正常Tyrode液冲洗后,TS渐渐恢复原值。此外,心肌标本LP从 10.5 ± 1.1 ms延长到 20.7 ± 3.1 ms, $P < 0.01$,提示TAA具有降低乳头肌兴奋性的作用。

3 讨 论

3.1 TAA抑制心肌自律性的作用

实验结果表明,TAA显著抑制甚至消除离体乳头肌在生理条件下产生的自律活动及 Ba^{2+} 诱发的自律活动。Shibata^[6]认为 Ba^{2+} 可以降低 K^+ 电导(抑制 I_{k_2}),增加 Na^+ 电导及慢内向 Ca^{2+} 电流,从而诱发产生类似异位起搏细胞的4相自动除极。由于TAA不影响APA及 V_{max} ,推测它对 I_{Na} 不起作用,可能是作用于起搏电流,增加 I_{k_2} 而消除异位自律性。

TAA提高TS,延长LP,表明它可以降低心肌兴奋性,由于TAA不影响RP、APA及 V_{max} ,似乎对膜电位水平及膜反应性不起作用,因此它可能通过减小阈电位(TP)水平而降低兴奋性,TP与舒张电位之距离增大,膜去极化达TP的时间就长,自律性便下降。

TAA显著延长ERP,增加ERP/APD₅₀比值,这本身就能使心肌自律频率减小,从而抑制自律性。

3.2 TAA延长不应期的作用

延长ERP或增加ERP/APD₅₀是所有抗心律失常药物的一个共同特征。TAA不仅显著增加生理条件下的ERP和ERP/APD₅₀比值,也可明显延长病理条件下的ERP和ERP/APD₅₀。这是其抗心律失常机制的一个重要方面。

TAA延长各种条件下的APD,抵抗Lid或Aoh缩短APD的作用,结果提示TAA可能抑制AP 3相 K^+ 外流从而减慢AP复极过程。

3.3 TAA对慢通道的阻滞作用

TAA明显抑制高 K^+ 造成的 Ca^{2+} 依赖性慢反应AP,且显示了电压依赖性和频率依赖性的作用特点。阳性对照药Ver也得出相似的结果,TAA与 Ca^{2+} 对心肌AP的影响具有相互拮抗的作用,这也与许多慢通道阻滞剂如Ver, D600等的作用是类似的,TAA使正常条件下心肌AP坪台水平略微下降,这也是抑制 Ca^{2+} 内流的结果。以上结果均提示TAA具有 Ca^{2+} 通道阻滞的作用。

综上所述,TAA通过抑制心肌自律性,延长ERP,增加ERP/APD₅₀及阻滞慢 Ca^{2+} 内流等几方面而起抗心律失常的作用。其对心肌膜离子流的作用比较复杂,可能作用于 Ca^{2+} 通道而抑制 I_{si} ,作用于 K^+ 通道,抑制复极3期 K^+ 外流从而延长APD,作用于 Na^+ 通道而延长ERP。但对 I_{Na} 似乎不起作用。

参 考 文 献

- [1] Rojas Martinez R et al, Triacetoneamine I, Mechanism of Hypotensive Action. Rev Cubana Farm 13(1979), 1:37
- [2] Diacono J, Suggestive Evidence for the Activation of an Electrogenic

Pump in Stimulated Rat Atria: Apparent Discrepancy Between the Pump Inhibition and the Positive Inotropic Response Induced by Ouabain, *J Mole Cell Cardiol*, 1979, 11:5.

- [3] 范世藩等, 抗心律失常新药常咯啉对心肌电活动的作用, *生理学报*, 1979, 31:175.
 [4] 徐有秋等, 普罗帕酮对心肌慢反应动作电位和慢内向离子流的作用, *中国药理学报*, 1986, 2:138.
 [5] Beeler GW et al, Membrane Calcium Current in Ventricular Myocardial Fibers, 1970, 207:191.
 [6] Shibata J, The Effects of Barium on the Action Potential and the Membrane Current on Sheep Heart Purkinje Fiber, *J Pharmacol Exp Ther*, 1973, 185:418.

Effects of Triacetoneamine-HCl(TAA) on Myocardial Transmembrane Potentials I. The Antiarrhythmic Mechanism of Triacetoneamine

Xu Shibo Wang Zhiguo Feng Jianlin

Lin Yongcheng Long Kanghou

Abstract

Triacetoneamine-HCl(TAA) is synthesized artificially based on the molecular structure of the substance isolated from South China Sea *Juncella squamata*. The electrophysiological effects of TAA on transmembrane potentials of isolated guinea pig papillary and atrial muscles were studied using conventional intracellular microelectrode technique.

1. Under normal superfusion condition, TAA(5, 7.5, 10mM) caused a significant increase in ERP, APD and ERP/APD₉₀, and a slight decrease in the level of plateau. But RP, APA, V_{max} were not influenced, and this suggested that TAA has no effects on I_{Na} and the conductability.

2. TAA (1mM or 5mM) effectively inhibited the automaticity in normal superfusion, the spontaneous rhythm induced by Ba²⁺(0.4mM)_i and the automaticity occurring during superfusion with O₂-free Tyrode solution. The results gave a hint that TAA may increase I_{k2} or decrease I_{Na,b}.

3. TAA(0.2, 1, 5ml) significantly suppressed the slow response action potential caused by superfusion with 17.5mM K⁺. The inhibition of APA and V_{max} showed frequency-dependent manner. Verapamil had the same action in our experiment. The Antagonism was observed between TAA(5mM) and Ca²⁺(5.4mM) on action potential. The results indicated that TAA has a directly inhibitory effect on the slow inward current (I_{si}).

4. TAA(1mM or 5mM) evidently prolonged the latent period of action potential and raised the threshold stimulus of muscles. It showed that TAA decreases the excitability.

5. TAA (1mM or 5mM) lengthened APD shortened by pretreatment with lidocaine or acetylcholine. Thus TAA is inferred to inhibit I_{x1} and I_{k1}.

Keywords triacetoneamine-HCl(TAA), antiarrhythmia, action potential, slow-channel block, ion current, cardiocyte