

钠通道阻滞剂作用机制的闸门相关受体假说及模型

吴跃进* 方达超

(同济医科大学药理教研室, 武汉 430030)

摘 要

本文提出了钠通道阻滞剂作用机制的新假说——闸门相关受体假说,并建立了相应的数学模型. 用此模型模拟分析了利多卡因(Lidocaine Lid)、蝙蝠葛碱(dauricine, Dau)阻滞心肌钠通道的作用. 模型预测结果不仅与文献报道的实验结果一致,而且还提供了解释这些药物阻滞钠通道作用机制的新资料. 研究表明,闸门相关受体假说能较好地阐明心肌钠通道阻滞剂的作用机制.

关键词: 钠通道阻滞剂, 利多卡因, 蝙蝠葛碱, 数学模型, 计算机模拟

离子通道阻滞剂作用机制的研究对于阐明离子通道的结构与功能,理解药物的作用原理及开发新药均有重要的理论及实践意义. 近年来,生理科学界对此课题做了大量的理论和实验研究,并提出了一些理论假说及模型,其中广为接受的有调控受体假说(Modulated Receptor Hypothesis, MRH)^[1]和护卫受体假说(Guarded Receptor Hypothesis, GRH)^[2]. 前者认为药物在通道的结合部位具有可变的亲和力,药物与静息态通道亲和力低,而对通道的失活态有高亲和力. 药物与通道结合可改变通道失活的门控动力学. 此假说能解释一些钠通道阻滞剂的作用,但对于近来的一些实验发现难以解释,如1) Yeh等^[3,4]发现某些钠通道阻滞剂的作用受激活门调控,在去除失活门的作用后,这些阻滞剂的作用不变;2) Carmeliet^[5,6]发现Penticainide, transcaïnide, disopyramide等作用于心肌钠通道开放态的药物并不使稳态失活曲线偏移,表明通道的失活动力学并未改变. GRH则认为药物在通道的结合部位具有不变的亲和力,而药物进出通道结合部位的途径受门控变化的调控. 当闸门关闭时,受体被护卫(guarded),药物不能与其结合;而当闸门开放时,药物可与受体结合或解离出通道. 结合的药物可被关闭的闸门滞留(trap)在通道内. 实验所见稳态失活曲线偏移并非由于失活门控动力学的改变,而是通道阻滞所导致的表观现象. 这一假说亦得到新近一些膜片钳实验的证实,但难以解释:1)某些药物与通道结合并不需要闸门开放^[7,8];2)仅对失活态钠通道具有作用的药物^[9].

1991年1月5日收到修改稿.

* 现在地址: 广东湛江医学院药理教研室, 广东湛江 524023.

因而, 我们认为不能排除两种机制并存的可能^[10]. 这两种假说均建立在认为具抗心律失常作用的钠通道阻滞剂均作用于通道内同一受体的基础上, 然而这一点尚无充分的证据, 且无法解释为何不同的药物具有不同的状态依赖性. 近来的受体结合实验^[11, 12]证实了与 I 类抗心律失常药特异结合的心肌钠通道受体部位. 且发现, 在用与钠通道激活态特异结合的 [³H]BTXB 处理的心肌标本, 奎尼丁(quinidine, Qui)和利多卡因表现出抑制 [³H]BTXB 结合的不同方式, 前者增大 K_d , 但对 B_{max} 无显著影响; 后者降低 B_{max} , 但对 K_d 无显著影响. 这提示 Qui 竞争性地抑制 [³H]BTXB 的结合, 而 Lid 则表现为非竞争性地抑制 [³H]BTXB 的结合. 我们推测两药作用于不同的受体部位, 前者与激活态有关, 而后者与失活态有关. 新近的电生理实验^[13]发现 Lid 及其季胺类衍生物 QX314 在心肌钠通道有两个结合部位, 提示其它抗心律失常药也可能有两个结合部位. 在神经细胞钠通道, 通过对苯佐卡因(benzocaine)的研究, 也对单一受体部位的观点提出了质疑^[14].

基于上述考虑并通过计算机模拟试验, 我们提出了“闸门相关受体假说”(Gate-related Receptor Hypothesis, GrRH), 认为 I 类抗心律失常药在钠通道的结合部位不是单一的受体部位, 而是两个分别与通道激活门或失活门相关联(偶联或分别被激活门或失活门所护卫)的受体结合部位, 可分别称为激活门相关受体及失活门相关受体. 主要作用于通道激活态的药物与激活门相关受体结合, 其作用受激活门调控, 失活门的关闭可能影响此类药物阻滞通道的起效速率, 影响程度取决于药物的理化性质, 如脂溶性、分子量等. 主要作用于通道失活态的药物则与失活门相关受体结合, 其作用受失活门调控, 不受激活门的影响, 即通道的开放不是其产生作用所必需的. 可与这两种受体结合的药物则同时受激活门及失活门的调控.

依据上述理论假说, 我们建立了 GrRH 的数学模型, 计算机模拟 Lid, 蝙蝠葛碱阻滞心肌钠通道的作用所得结果与实验观察一致, 并进一步阐明了这些药物阻滞钠通道的作用机制.

一、闸门相关受体假说与模型

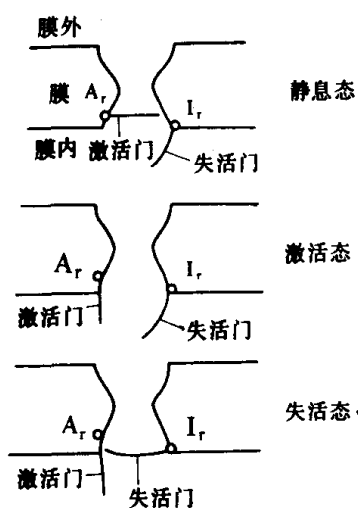


图 1 闸门相关受体假说模式图
(图示通道处于不同状态时闸门的位置及闸门相关受体表观亲和力的变化. A_r 激活门相关受体, 标志处为设想的位置, I_r 失活门相关受体, 标志处为设想的位置, 不同大小的 A_r , I_r 示表观亲和力的变化)

离子通道阻滞剂与受体的相互作用与一般的药物-受体相互作用的不同在于: 后者具有恒定的结合与解离速率常数, 其反应是连续进行的; 而前者要受通道门控变化的影响, 不是一种速率恒定的连续反应过程. GrRH 认为通道内存在两个分别与激活门或失活门相关的受体部位, 如图 1 所示. 在静息态, 激活门相关受体 A_r 及失活门相关受体 I_r 对于药物只有较低的表观亲和力. 这种表观的低亲和力对 A_r 来说, 激活门护卫是可能的机制; 对于 I_r , 可能是由于失活门的开放构象导致低亲和力. 当激活门开放时, 药物可与暴露的 A_r 结合, 表现出高亲和力; 当失活门处于关闭构象时, I_r 表现出高亲和力. 因而作用于 A_r 的荷电药物分子需激活门开放才能到达作用部位, 当持续去极化时, 失活门关闭而激活门仍开放, 此时失活门阻碍荷电药物分子进入 A_r 部位, 然而非荷电药物分子仍可从膜脂相到达 A_r . 由此, 对于叔胺类药物, 其阻滞起效速率将降低, 降低程度取决于药物的 pK_a 及溶液

的 pH 值,其限速步骤是荷电药物分子去质子化的速率. 作用于 I_r 的药物仅受失活门变化调控,当失活门关闭(失活),药物与 I_r 结合具最大亲和力,而失活门开放(失活恢复)则促进药物解离. 此外,激活门关闭有可能将与 A_r 结合的药物滞留于通道内,导致表观的静息阻滞,与 I_r 结合的药物有可能使失活恢复延迟.

根据此假说,我们构造的数学模型基本公式如下:

离子通道阻滞剂 D 与通道受体 C_r 的相互作用受门控变化影响,其基本反应可表示如下:



其中 $C_r D$ 表示药物与受体的结合, K 为结合速率常数, $L(v)$ 为受膜电场影响的解离速率

$$L(v) = L e^{-zVF/RT}, \quad (2)$$

其中 L 为解离速率常数, z 为药物分子荷电数, v 为膜电位, F 为 Faraday 常数, R 为普适气体常数, T 为热力学温度.

(1)式中的 $f(v)$, $g(v)$ 为门控变化调控药物-受体相互作用的电压(状态)依赖性函数. $f(v)$ 表示未阻滞通道中药物可结合的分数, $g(v)$ 为已阻滞通道中药物未被滞留而可解离的分数. 根据上述假说定义如下:

1) 作用于 A_r 的药物

$$\text{季胺类药物} \quad f(v) = m^3 h, g(v) = m^3 h, \quad (3)$$

$$\text{叔胺类药物} \quad f(v) = m^3, g(v) = m^3, \quad (4)$$

$$\text{中性药物} \quad f(v) = 1, g(v) = 1. \quad (5)$$

2) 作用于 I_r 的药物

$$f(v) = 1 - h, g(v) = 1. \quad (6)$$

上述各式中 m , h 分别为钠通道的激活门变量和失活门变量.

设通道阻滞分数为 b , 其时间过程表示为:

$$db/dt = f(v)KD(1-b) - g(v)L(v)b, \quad (7)$$

当阻滞达平衡时,可得平衡阻滞 $b(\infty)$

$$b(\infty) = \left(1 + \frac{g(v)L(v)}{f(v)KD} \right)^{-1}, \quad (8)$$

$$\text{表观阻滞起效速率 } \lambda = f(v)KD + L(v)g(v), \quad (9)$$

$$\text{时间常数 } \tau = 1/\lambda, \quad (10)$$

对(7)式积分得一指数时间过程:

$$b(t) = b(\infty) + [b(0) - b(\infty)]e^{-t/\tau}, \quad (11)$$

其中 $b(0)$ 为零时刻的初始阻滞.

二、通道阻滞过程的动力学分析

在连续刺激情况下,通道阻滞的进行性变化可用一系列递推关系式来描述,即前一刺激间期末所达到的阻滞作为下一刺激间期阻滞发展的初始阻滞. 每一间期的阻滞可由(11)式求得,则第 n 个刺激后达到的阻滞 b_n 可表示为:

$$b_n = b_{ss} + [b(0) - b_{ss}]e^{-n\lambda}, \quad (12)$$

其中 b_{ss} 为稳态阻滞, λ 为表观阻滞起效速率, 在此可表示为内在阻滞起效速率 λ_e 和阻滞恢复速率 λ_r 的加权和:

$$\lambda = \lambda_e t_e + \lambda_r t_r, \quad (13)$$

其中 t_e 为除极时间, t_r 为静息时间.

为能利用实验易得的稳态阻滞数据求解动力学参数, 根据由(11)式递推得到的稳态阻滞公式作适当的变换得到

$$b_{ss} = E_{(\infty)} + \frac{(1 - e^{-\lambda_r t_r})(R_{(\infty)} - E_{(\infty)})}{1 - e^{-\lambda_e t_e - \lambda_r t_r}}, \quad (14)$$

其中 $E_{(\infty)}$, $R_{(\infty)}$ 分别为去极间期及静息间期达到的平衡阻滞. 用实验所得的稳态阻滞数据拟合上式可求出 $E_{(\infty)}$, $R_{(\infty)}$, λ_r 和 λ_e , 进而可求出其它动力学参数.

药物对通道表观稳态失活曲线的影响可认为是由于药物使可开放通道减少所致. 如用 h_a 表示表观失活变量, 则在通道阻滞达平衡时,

$$h_a = h \left(1 + \frac{f(v)KD}{g(v)L(v)} \right)^{-1}, \quad (15)$$

由此可见, 表观稳态失活曲线是否偏移取决于药物作用的不同闸门相关受体, 亲和力和药物浓度, 以及膜电场的作用.

三、计算机模拟结果及讨论

Clarkson 等^[15] 用膜片钳方法研究了 Lid 对心肌细胞钠电流的抑制作用. 在保持电位 -140mV , 钳制电位 -20mV , 钳制时间 20ms , 刺激频率分别为 $1.0, 2.0, 3.3, 5.0\text{Hz}$ (温度 16°C , $\text{pH}7.3$) 观察到 Lid $100\mu\text{mol/L}$ 频率依赖性地抑制钠电流达到的稳态阻滞分数分别为 $0.25, 0.37, 0.49$ 和 0.58 .

宗贤刚^[1] 用电压钳方法研究了 Dau 对心肌浦氏纤维钠电流的抑制作用. 在保持电位 -80mV , 钳制电位 -50mV , 钳制时间 200ms (温度 36°C , $\text{pH}7.3$), 分别记录了刺激频率为 $0.33, 1.0$ 和 3.3Hz 时, Dau $40\mu\text{mol/L}$ 频率依赖性地抑制钠电流所达到的稳态阻滞分数分别为 $0.21, 0.33$ 和 0.42 .

我们根据上述实验提供的刺激方案及稳态阻滞数据, 用模型模拟分析了 Lid 及 Dau 阻滞钠通道的动力学过程及阻滞作用的状态依赖性特点. 分析计算程序如下:

- 1) 根据刺激方案及稳态阻滞数据拟合(14)式得出 $E_{(\infty)}$, $R_{(\infty)}$, λ_r 和 λ_e ;
- 2) 用求得的 λ_r, λ_e 由(13)式得 λ ;
- 3) 由(10)式可得表观阻滞起效时间常数 τ 及内在阻滞起效时间常数 τ_e 和阻滞恢复时间常数 τ_r ;
- 4) 由(3)~(6) 式求解 $f(v), g(v)$ 函数;
- 5) 由(8)~(10)式及作适当的变换可求出 $K, L, L(v), K_d$ 等值;
- 6) 由(15)式可分析药物对通道表观稳态失活曲线的影响;
- 7) 由上述各步骤计算的参数结合离子电流公式及(12)式可重现实验观察到的频率依赖性阻滞现象.

分析计算结果如下:

1) 宗贤刚, 博士论文, 同济医科大学, 1988.

(1) 频率依赖性阻滞的动力学特点

计算结果见表 1.

表 1. Lid, Dau 在不同刺激频率时的表观阻滞起效速率

药 物	Lid (100 μ mol/L)				Dau (40 μ mol/L)		
刺激频率 (Hz)	1.0	2.0	3.3	5.0	0.33	1.0	3.3
λ (pulse ⁻¹)	1.074	0.653	0.484	0.4	0.535	0.33	0.259
阻滞恢复 时间常数 (s)	1.1 ($V_h^* = -140\text{mV}$)				9.8 ($V_h = -80\text{mV}$)		
*	V_h : 保持电位						

Courtney^[16] 实验测得刺激频率 2.0Hz 时, Lid 抑制心肌动作电位 $V_{\max}$ 的 λ 值为 0.62 ± 0.05 pulse⁻¹, 可见计算值与实验值吻合. 计算得 Lid 阻滞恢复时间常数与 Crumb, Clarkson^[17] 在同样实验条件下测得值 $1.0 \pm 0.4\text{s}$ 十分一致. 上述结果证实 Lid 具快起效及快恢复的动力学过程, 而首次阐明 Dau 的阻滞钠通道动力学特点为起效较快而阻滞恢复较慢, 在动力学上表明其不同于其它 I 类抗心律失常药.

(2) 状态依赖性阻滞特点

计算 Lid, Dau 的静息阻滞分别为 13.3% 和 5.8%, 与文献[15]实测值 14%, 宗贤刚¹⁾ 的实验观察一致. 表明两药对静息态亲和力低.

设定不同的 $f(v)$, $g(v)$ 模拟实验发现, Lid 对钠通道的阻滞作用受失活门控变化影响, 而 Dau 主要受激活门控变化影响. 图 2(a) 示 Lid 与钠通道受体的表观亲和力 K_d 值随失活通道增多而减小, 当通道全部失活则达到恒定的内在亲和力 K_d 为 $8.4\mu\text{mol/L}$, 此值与文献[17] 实验值 $8\mu\text{mol/L}$ 一致. 计算在膜电位 -90mV ($h \rightarrow 1$) 时的 K_d 为 $346\mu\text{mol/L}$, 与 Bean 等^[18] 在

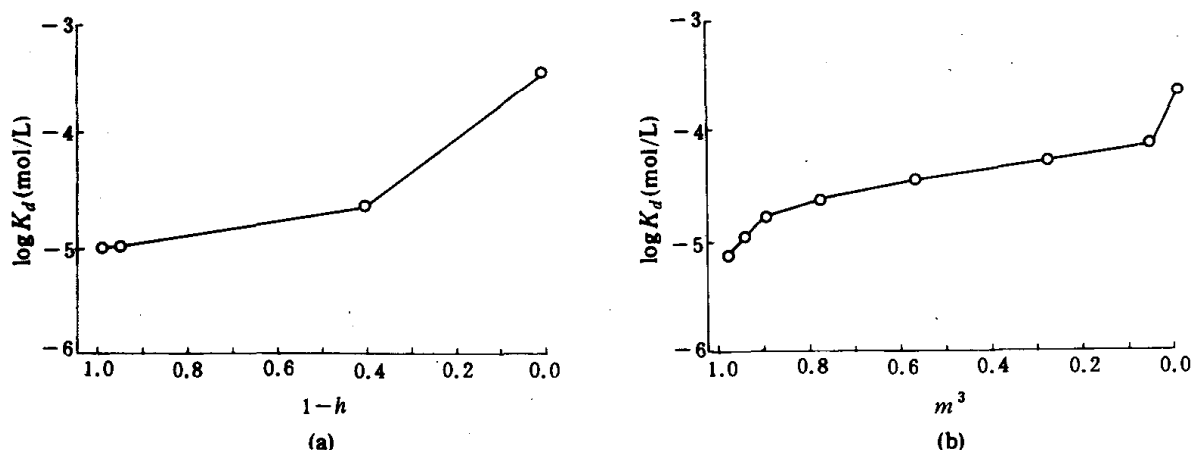


图 2 Lid, Dau 与钠通道受体表观亲和力随通道门控过程的变化

((a) Lidocaine 与钠通道受体表观亲和力 K_d 随通道失活过程的变化,

(b) Dauricine 与钠通道受体表观亲和力 K_d 随激活门 m^3 的变化)

1) 见 1070 页脚注:

-120mV ($h \rightarrow 1$) 所测值 $353\mu\text{mol/L}$ 一致. 图 2(b) 示 Dau 的表观亲和力 K_d 值随通道激活而减小, 当通道近于全部激活则达到其恒定的内在 K_d 为 $6.69\mu\text{mol/L}$. 膜电位 -50mV 时的表观 K_d 为 $44\mu\text{mol/L}$, 与宗贤刚¹⁾ 实验所得 Dau 抑制钠电流的 IC_{50} $46\mu\text{mol/L}$ 十分接近.

图 3(a) 示不同膜电位时 Lid 达到的平衡阻滞与失活过程的关系, 可见平衡阻滞分数与通道的失活分数呈平行关系, 进一步表明其阻滞作用受失活门控影响, 而与激活门无关. 图 3(b) 示不同膜电位时 Dau 达到的平衡阻滞与通道激活过程的关系, 在较 -40mV 为正的电压, Dau 的平衡阻滞与通道开放成正比; 而较 -40mV 为负的电压, 由于激活门的滞留作用 (参见图 4) 使平衡阻滞与激活过程不成比例, 此结果与宗贤刚¹⁾ 的电流-电压曲线的结果一致. 图 4 示 Dau 的阻滞恢复时间常数随激活门的关闭 (膜电位复极) 而延长, 提示 Dau 可被激活门所滞留.

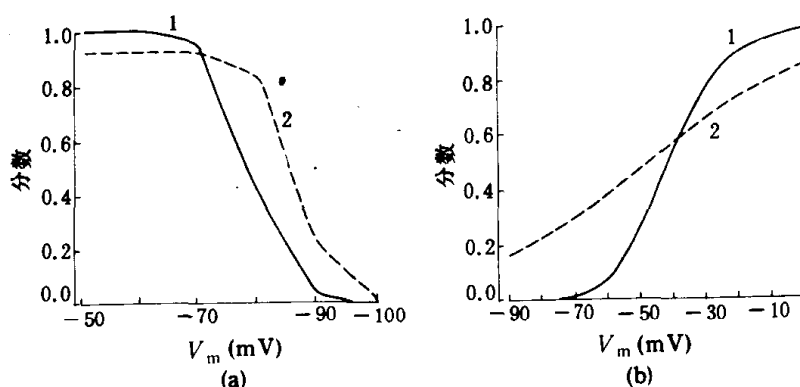


图 3 Lid, Dau 的平衡阻滞与钠通道门控过程的关系

((a) Lidocaine $100\mu\text{mol/L}$ 在不同膜电位达到的平衡阻滞与钠通道失活过程的关系, 1 —— $1-h$, 2 —— $b_{(\infty)}$;

(b) Dauricine $40\mu\text{mol/L}$ 在不同膜电位达到的平衡阻滞与钠通道激活过程的关系, 1 —— m^3 , 2 —— $b_{(\infty)}$)

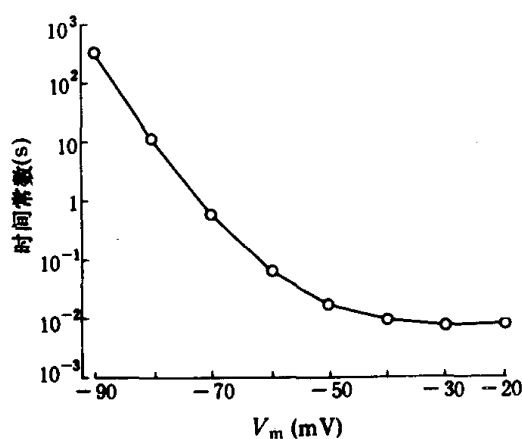


图4 Dauricine 阻滞恢复时间常数 τ_r 随膜电位的变化

通道的开放不仅有利于 Dau 与受体结合, 且有利于其解离. 用上述结果模拟^{[15] 1)} 的实验得到在不同刺激频率时 Lid, Dau 频率依赖性地抑制钠电流的动态过程 (图 5(a), (b)). 其中图 5(a) 与文献 [15] 实验记录一致, 宗贤刚¹⁾ 未记录此类动态过程.

(3) 对钠通道稳态失活曲线的影响

根据模型模拟 Lid, Dau 对钠通道稳态失活曲线的影响 (图 6(a), (b)), 可见 Lid 使稳态失活曲线向超极化方向平行偏移, 中点偏移约 16mV , 此结果与文献 [15] 实验值 $10 \pm 1\text{mV}$, Bean 等^[18] 实验值 19.3mV 相近. Dau 使稳态失活曲线非平行偏移, 偏移随电位超极化而增大, 中点偏移约 4mV .

上述结果表明了与不同闸门相关受体结合的药物对通道稳态失活曲线的影响具有不同的特点: 与 I_r 结合的药物使 h_{∞} 曲线平行左移, 而与 A_r 结合的药物使 h_{∞} 曲线非平行左移或不偏移. 这一特点是过去的单一受体假说未能阐明的. 这一特点亦提示 Lid 可能通过延缓整个失活过程而使 h_{∞} 曲线偏移, 而 Dau 对 h_{∞} 曲线的影响可能是由于激活门关闭对药物的滞

1) 见 1070 页脚注.

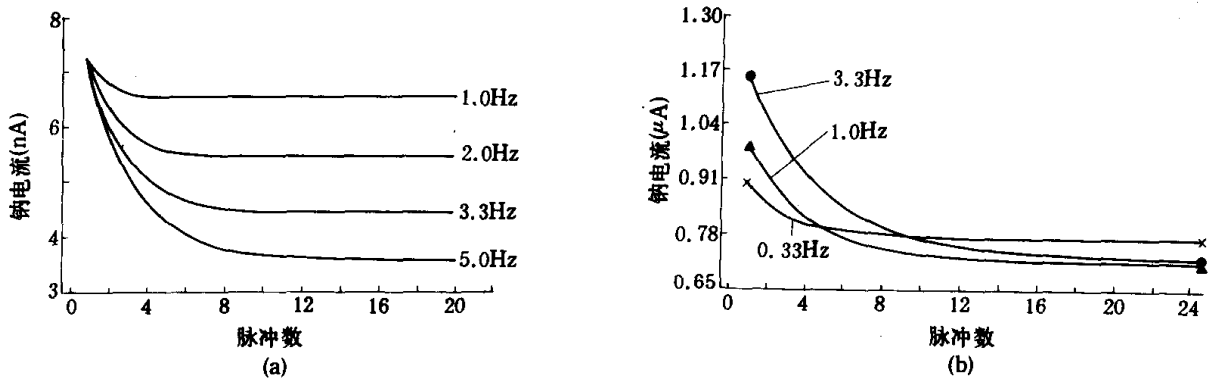


图5 据模型模拟的Lid, Dau频率依赖性地抑制钠电流的动态过程
((a)Lid 100 μ mol/L, 右边标示刺激频率, (b)Dau 40 μ mol/L, 图中标示刺激频率)

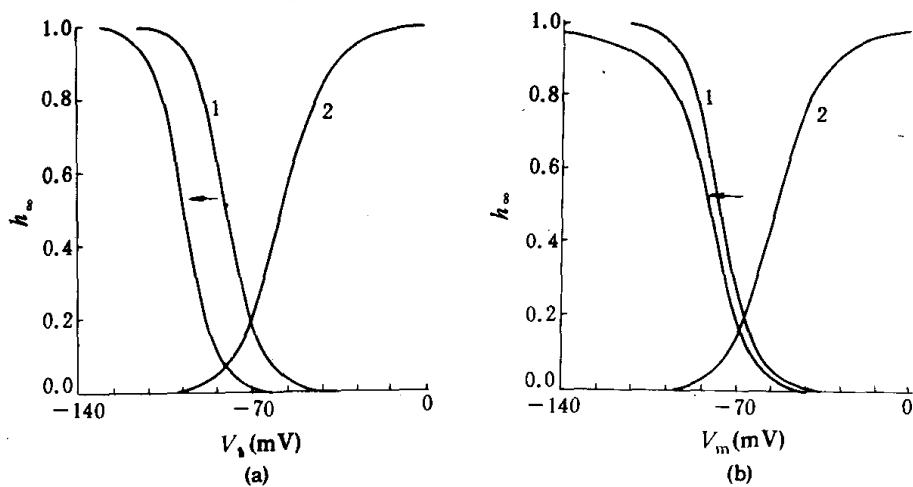


图6 Lid, Dau对钠通道稳态失活曲线的影响

((a)Lid 100 μ mol/L, (b)Dau 40 μ mol/L. 1—— h_{∞} 正常稳态失活曲线, 2—— m_{∞}^3 激活曲线, 箭头表示曲线为药物作用导致的 h_{∞} 曲线向超极化方向的偏移)

留作用使在正常静息电位以至超极化电位时可开放通道减少所致, 而并非对失活过程的延缓所致, 故可认为是一种表观的 h_{∞} 曲线偏移。

四、结 论

通过运用闸门相关受体模型对Lid, Dau阻滞心肌钠通道作用的模拟及分析, 我们得到了与实验所见基本一致的结果。尽管尚需更多的验证, 但以上结果提示我们值得进一步去探讨这一假说。

这一假说与MRH, GRH的本质区别在于提出了与通道闸门相关的两个受体结合部位, 而非单一受体部位。由此可能解释单一受体假说难以解释的实验现象, 有助于进一步弄清钠通道阻滞剂作用的分子机制。运用模型分析具体药物阻滞通道作用的动力学机制及状态依赖性特点有助于定量描述药物的作用特点, 加深对其作用机理的了解, 为药物开发、药理实验研究及临床合理用药提供有价值的参考资料。

参 考 文 献

- [1] Hondeghem, L. M. & Katzung, B. G., *Biochim. Biophys. Acta*, **472**(1977), 373 — 398.
- [2] Starmer, C. F. et al., *Biophys. J.*, **46**(1984), 15 — 27.
- [3] Yeh, J. Z. & TenEick, R. E., *ibid.* **51**(1987), 123 — 135.
- [4] Yeh, J. Z. & Tanguy, J., *Biophys. J.*, **47**(1985), 685 — 694.
- [5] Carmeliet, E., *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **12**(1987), 110 — 115.
- [6] Carmeliet, E., *Circ. Res.*, **63**(1988), 50 — 60.
- [7] Gilliam, F. R. et al., *ibid.*, **65**(1989), 723 — 739.
- [8] Gintant, G. A. et al., *ibid.*, **52**(1983), 735 — 746.
- [9] Cahalan, M. D., *Biophys. J.*, **23**(1978), 285 — 311.
- [10] 吴跃进、方达超, 中国心血管药理通讯, 1989, 4: 271 — 276.
- [11] Hill, R. J. et al., *Mol. Pharmacol.*, **36**(1989), 150 — 159.
- [12] Robert, S. et al., *Circ. Res.*, **61**(1987), 492 — 497.
- [13] Alpert, L. A. et al., *Am. J. Physiol.*, **257**(1989), H79 — H84.
- [14] Mrose, H. E. & Ritchie, J. M., *J. Gen. Physiol.*, **71**(1978), 223 — 225.
- [15] Clarkson, C. W. et al., *Circ. Res.*, **63**(1988), 869 — 879.
- [16] Courtney, K. R., *Life Sci.*, **24**(1979), 1581 — 1588.
- [17] Crumb, W. J. & Clarkson, C. W., *Biophys. J.*, **55**(1989), 314a(Abstr).
- [18] Bean, B. P. et al., *J. Gen. Physiol.*, **81**(1983), 613 — 642.