

- ten. *Railway Med J* 1990; **18**: 264-5.
- 5 Liu NF, Huang YW, Lou DA, Hu CR. An experimental study of glucosylated low density lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Chin J Cardiol* 1990; **18**: 353-6.
- 6 Kober G, Schneider W, Kaltenbach M. Can the progression of coronary sclerosis be influenced by calcium antagonists? *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; **13** Suppl 4: 2-6.
- 7 Keogh AM, Schroeder JS. The antiatherogenic effects of calcium antagonists. *Am J Hypertens* 1991; **4**: 512S-8S.
- 8 Filipovic I, Buddecke E. Calcium channel blockers stimulate LDL receptor synthesis in human skin fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; **136**: 845-50.
- 9 Eckardt H, Filipovic I. Calcium antagonists increase the amount of mRNA for the low density lipoprotein receptor in skin fibroblasts. *Artery* 1991; **18**: 168-83.
- 10 Stein O, Leitersdorf E, Stein Y. Verapamil enhances receptor-mediated endocytosis of low density lipoproteins by aortic cells in culture. *Arteriosclerosis* 1985; **5**: 35-44.

86-188

BIBLID: ISSN 0253-9756 Acta Pharmacologica Sinica 中国药理学报 1994 Mar; 15 (2); 186-188

24

## 美西律对大鼠背根神经节细胞钠电流的抑制作用<sup>1</sup>

张旭峰, 王天佑, 张莉 (北京市神经外科研究所, 北京100050, 中国)

R965.2

### Inhibition of mexiletine on sodium current in dorsal root ganglion neurons of rats

ZHANG Xu-Feng, WANG Tian-You, ZHANG Li  
(Beijing Neurosurgical Institute, Beijing 100050, China)

**ABSTRACT** Using whole-cell configuration of patch clamp technique we found that mexiletine (Mex) reversibly inhibited the sodium current in a voltage- and use-dependent manner in cultured dorsal root ganglion (DRG) neurons. The threshold concentration of Mex was 5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . The inhibitory action heightened with increasing concentrations of Mex. Complete inhibition was achieved at 150  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  and the 50% inhibition concentration was 31  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . It is suggested that the inhibition of Mex on sodium current in neurons may be one of the mechanisms of its anti-ischemic and anti-anoxic effects on the neuron.

**KEY WORDS** mexiletine; sodium channels;

Received 1992-08-06

Accepted 1993-04-15

<sup>1</sup> This work was finished in the Laboratory of Neurophysiology, Department of Biological Sciences and Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084, China

spinal ganglia; cultured cells

**A 摘要** 应用膜片钳技术, 全细胞钳位方式可见 Mex 对大鼠背根神经节细胞  $\text{Na}^+$  电流有明显的抑制作用。其临界作用浓度为 5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 50% 抑制浓度为 31  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 完全抑制浓度为 150  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。其抑制作用具有电压和频率依赖性。抑制剂量与小鼠抗脑缺血缺氧作用量相近。提示 Mex 抗脑缺血缺氧作用的机制之一可能是通过对  $\text{Na}^+$  电流的抑制。

**关键词** 美西律; 钠通道; 脊神经节; 培养的细胞

美西律 (mexiletine, Mex) 系 IB 类抗心律失常药, 并有止痛<sup>[1]</sup> 和抗惊厥<sup>[2]</sup> 的作用, 对小鼠脑缺血缺氧还有保护作用<sup>[3]</sup>。Mex 对心肌及外周神经作用的共同特点是抑制  $\text{Na}^+$  内流, 增加膜稳定性<sup>[4]</sup>, 但尚未见到对神经细胞作用的报道。本实验旨在研究 Mex 对神经细胞  $\text{Na}^+$  通道的作用, 了解其抗脑缺血缺氧作用的机制。

### MATERIALS AND METHODS

**药物** 盐酸美西律, 常州第三制药厂, 批号

900403. 河豚毒素(tetrodotoxin, TTX), Sigma 公司, 二者均用蒸馏水溶解。

**细胞培养** 取新生大鼠4只, ♀♂各2只, 断头后, 在解剖显微镜下取出背根神经节, 置于无  $\text{Ca}^{2+}$ , 无  $\text{Mg}^{2+}$  的 Dulbecco's PBS 液中, 用 0.25% 胰酶及 0.02% EDTA 在 37℃ 消化约 20 min 吹打分散, 接种于涂有鼠尾胶原的盖玻片上, 培养液为 IMDM (Iscover's modified Dulbecco's medium), 内含 10% 小牛血清, 3% 谷氨酰胺, 青链霉素各  $100 \text{ IU} \cdot \text{ml}^{-1}$ , 37℃ 培养。

**信号记录** 用培养 1-2 d 孤立的背根神经节细胞, 直径约 20-30  $\mu\text{m}$ , 突起不超过一个细胞直径, 应用膜片钳技术, 全细胞记录, 保持电位 ( $V_h$ ) 为 -80 mV, 滤波 3 kHz, 刺激时间 20 ms, 频率 0.1 Hz, 记录 Mex 对  $\text{Na}^+$  电流的抑制作用, 增加刺激频率至 1 Hz, 连续记录刺激 1, 5, 10, 15, 20, 30 次时 Mex 的抑制作用, 记录的电流信号通过 List EPC-7 膜片钳放大器储存于磁带记录仪, 电极内液为 NaF 30, CsCl 70, Tris-HCl 30, HEPES 10  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 7.2, 浴槽液为 NaCl 50, CsCl 5,  $\text{MgCl}_2$  2, sucrose 200, glucose 10, HEPES 10  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 7.4<sup>[3]</sup>, 实验在 20-25℃ 进行。

**给药方法** 充灌药物在直径约 1.5 mm, 尖端开口约 10  $\mu\text{m}$  的玻璃管中, 置于距细胞约 20  $\mu\text{m}$  处, 用加压空气吹入。

**统计** 数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 各组间用 *t* 检验。

## RESULTS

**Na 电流的分离**  $V_h$  在 -80 mV, 10 mV 去极化递增, 在 -50 mV 左右出现内向电流, 在 -20 mV 左右最大, 反转电位约在 +20 mV, 接近接 Nernst 方程计算的  $\text{Na}^+$  平衡电位, 该电流在 2-3 ms 内激活并达峰值, 约 10 ms 内失活, 0.1  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 TTX 能完全抑制, 故认为此内向电流为电压依赖性的 TTX 敏感的  $\text{Na}^+$  电流 (Fig 1 A, B)。

**Mex 对  $\text{Na}^+$  电流的抑制** 在  $V_h$  -80 mV 去极化 60 mV 时记录内向  $\text{Na}^+$  电流, 5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Mex 对该电流抑制  $1.7 \pm 2.5\%$  ( $P > 0.05$ ), 药物浓度增大为 25, 50, 100, 150  $\mu\text{mol}$

$\cdot \text{L}^{-1}$  时, 抑制率分别为  $41.6 \pm 6.0$ ,  $53.0 \pm 5.5$ ,  $79.0 \pm 5.2$ ,  $97.5 \pm 5.0\%$  ( $P < 0.01$ ), 根据回归方程可推算抑制  $\text{Na}^+$  电流 50% 所需剂量为 30  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 其 95% 可信限为  $31.6 \pm 0.3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 在给药后 5 min 抑制达稳态, 停止给药后 10 min 内恢复, 其抑制的 I-V 曲线表明, 不影响激活电压和平衡电位, 并且在不同的膜电位抑制均不同, 表明 Mex 对  $\text{Na}^+$  电流的抑制具有电压依赖性 (Fig 1)。

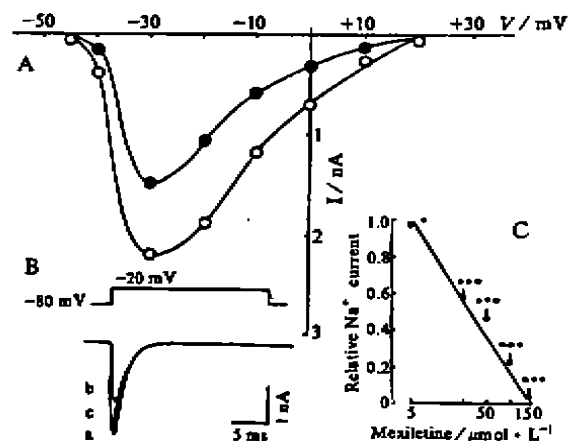


Fig 1. Voltage-dependent  $\text{Na}^+$  current of rat dorsal root ganglion cells and its response to Mex. A)  $\text{Na}^+$  current in control ( $\circ$ ) and in cells treated with Mex 25  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $\bullet$ ). B)  $\text{Na}^+$  current. a: control, b: Mex 25  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , c: washout. C)  $\text{Na}^+$  currents at Mex 5, 25, 50, 100, 150  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ . Leakage and capacity currents have been subtracted.  $n = 4-5$  cells. \*  $P > 0.05$  control. \*\*\*  $P < 0.01$  vs control and Mex 5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ .

**Mex 对  $\text{Na}^+$  电流抑制的频率依赖性** 给药后在 0.1 Hz 频率的连续刺激下, 抑制率未发生变化, 增加频率至 1 Hz 后, 其抑制率从第一次的  $22.6 \pm 5.2\%$  逐渐增加, 第 5, 10, 15, 20 次分别为  $33.5 \pm 5.6$ ,  $39.8 \pm 4.8$ ,  $44.8 \pm 4.6$ ,  $47.5 \pm 2.9\%$ , 至第 20 次逐渐达稳态, 第 30 次仍为  $47.5 \pm 2.9\%$ , 表明 Mex 对  $\text{Na}^+$  电流的抑制具有频率依赖性 (Fig 2)。

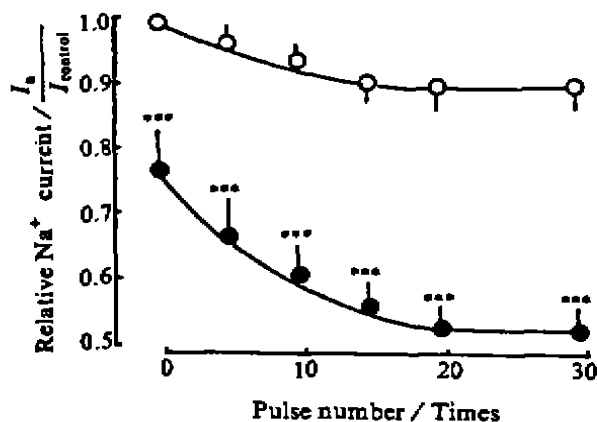


Fig 2. Progressive increase in blocking Na<sup>+</sup> current by Mex 10 μmol·L<sup>-1</sup> during pulse train at 1 Hz. n = 4 cells. \*\*\* P < 0.01 vs control.

## DISCUSSION

本实验采用 Cs<sup>+</sup>代替电极液及浴槽液 K<sup>+</sup>, 以抑制 K<sup>+</sup>电流, 用 Mg<sup>2+</sup>代替 Ca<sup>2+</sup>, 并在电极液加 F<sup>-</sup>以抑制 Ca<sup>2+</sup>电流. 降低内外液 Na<sup>+</sup>浓度使 Na<sup>+</sup>电流适当减小而便于观察. 这种条件下可以满意地记录到电压依赖性 TTX 敏感的 Na<sup>+</sup>电流.

Mex 5—150 μmol·L<sup>-1</sup>能可逆地抑制电压依赖性 Na<sup>+</sup>电流, 且剂量-效应成直线关系. Mex 对 Na<sup>+</sup>电流的抑制作用还具有电压和频率依赖性. 许多局麻药, 抗惊厥药及 IB 类抗心律失常药对 Na<sup>+</sup>电流的抑制作用都具有电压和频率依赖性, 目前认为其作用机制有受体调节学说和闸门控制学说. Mex 对神经元 Na<sup>+</sup>电流的作用机制有待于对其通道动力学的研究.

急性脑缺血缺氧时, 细胞外 K<sup>+</sup>浓度增高, Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>内流, 兴奋性递质释放, 这些均增

加神经元兴奋性, 加重损伤. 抑制 Na<sup>+</sup>内流可以增加膜稳定性, 使电压依赖性的通道开放减少而降低电活动和能量消耗. Mex 对 Na<sup>+</sup>电流的抑制剂量与小鼠脑缺血缺氧保护量 6.25—50 mg·kg<sup>-1</sup>相近<sup>[4]</sup>. 因此, Mex 抗脑缺血缺氧的机制之一可能是通过对 Na<sup>+</sup>电流的抑制.

苯妥英钠, 利多卡因也属 IB 类抗心律失常药, 可以抑制 Na<sup>+</sup>电流<sup>[5,6]</sup>, 并有抗脑缺血缺氧作用<sup>[3,7]</sup>. 因此可以推测其它 Na<sup>+</sup>电流抑制剂也可能具有对抗脑缺血缺氧作用.

**ACKNOWLEDGMENTS** 清华大学生物系谢佐平教授提供实验设备及技术指导, 汤云贵博士协助完成.

## REFERENCES

- 1 Chabal C, Russel LC, Burchiwl KJ. The effect of intravenous lidocain, tocinide, and mexiletine on spontaneously active fibers or iginating in rat sciatic neuromas. *Paun* 1989; **38**: 333—8.
- 2 Alexander GJ, Kopelff LM, Alexander RB, Chatterjee N. Mexiletine: Biphasic action on convulsive seizures in rodents. *Neurobehav Toxicol Teratol* 1986; **8**: 231—5.
- 3 Dong LP, Wang TY, Xu LX, Zhang L. The protective effect of mexiletine and phenytoin against hypoxia and cerebral ischemia in mice. *Chin J Neurosurg* 1990; **6** Suppl: 26—8.
- 4 Courteny KR. Comparative actions of mexiletine on sodium channels in nerve, skeletal and cardiac muscle. *Eur J Pharmacol* 1981; **74**: 9—18.
- 5 Kaneda M, Oyama Y, Ikemoto Y, Akaike N. Blockade of the voltage-dependent sodium current in isolated rat hippocampal neurons by tetrodotoxin and lidocaine. *Brain Res* 1989; **484**: 348—51.
- 6 Matsuki N, Quandt FN, Eick RE, Yeh JZ. Characterization of the block of sodium channels by phenytoin in mouse neuroblastoma cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1984; **228**: 523—30.
- 7 Rasool N, Farouqi M, Rubinstein EH. Lidocaine accelerates neuroelectrical recovery after incomplete global ischemia in rabbits. *Stroke* 1990; **21**: 929—35.