

· 基础研究 ·

9种不同心血管风险的临床药物对hERG钾通道的作用

孙红云^{1,2}, 邢红艳^{1,2}, 赵琪^{1,2}, 王淑颜^{1,2}, 宋征^{1,2}, 李华^{1,2*}, 汪溪洁^{1,2*}

¹中国医药工业研究总院, 国家上海新药安全评价研究中心, 上海 201203; ²上海益诺思生物技术股份有限公司, 上海 201203

[摘要] 目的: 在GLP实验室评估膜片钳检测临床用药物对hERG(human ether-à-go-go related gene)钾通道作用的差异性和重复性, 研究9种致尖端扭转型室速(TdP)风险的临床用药物(高风险临床用药物: 苄普地尔、奎尼丁、索他洛尔; 中风险临床用药物: 昂丹司琼、西沙比利、特非那定; 低风险临床用药物: 雷诺嗪、维拉帕米和美西律)对hERG钾通道的阻断作用。方法: 采用全细胞膜片钳技术记录不同浓度的苄普地尔、奎尼丁、索他洛尔、昂丹司琼、西沙比利、特非那定、雷诺嗪、维拉帕米和美西律作用于外源稳定转染表达hERG钾通道的HEK293细胞(hERG-HEK293稳态细胞)后hERG电流(I_{Kr})的变化, 研究上述临床用药物对 I_{Kr} 作用的浓度依赖性及半数抑制浓度(IC₅₀)。结果: 9种临床用药物对hERG-HEK293细胞上 I_{Kr} 作用具有浓度依赖性, 且高风险临床用药物苄普地尔和奎尼丁的IC₅₀值分别为98.32 nmol/L和1.95 μmol/L, 索他洛尔的IC₅₀值大于300 μmol/L; 中风险临床用药物昂丹司琼、西沙比利和特非那定的IC₅₀值分别为0.94 μmol/L、39.10 nmol/L和128.58 nmol/L; 低风险临床用药物雷诺嗪、维拉帕米和美西律的IC₅₀值分别为9.94 μmol/L、235.49 nmol/L和65.56 μmol/L。本实验所得临床用药物IC₅₀值基本与文献相符。结论: 临床用药物致TdP风险与hERG通道的阻滞作用密切相关, 但hERG通道阻滞不等同于TdP风险, 还与心脏上表达的多种离子通道有关, 某些临床用药物可以通过阻断钠通道和钙通道而降低风险。本研究结果提示本方法所得数据可靠, 为国内GLP实验室进行hERG钾通道评价研究提供了参考依据, 可用于药物心脏毒性评价。

[关键词] 药物验证; 尖端扭转型室速; hERG钾通道; 全细胞膜片钳

[中图分类号] R972

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2019)01-001-09

doi: 10.7655/NYDXBNS20190101

Effects of nine clinical drugs with different cardiovascular risk on hERG potassium channels

Sun Hongyun^{1,2}, Xing Hongyan^{1,2}, Zhao Qi^{1,2}, Wang Shuyan^{1,2}, Song Zheng^{1,2}, Li Hua^{1,2*}, Wang Xijie^{1,2*}

¹China State Institute of Pharmaceutical Industry, National Shanghai Center for New Drug Safety Evaluation and Research, Shanghai 201203; ²ShanghaiInnoStar Bio-tech Co., Ltd., Shanghai 201203, China

[Abstract] **Objective:** To assess the variability and reproducibility of patch clamp platforms/sites for defining clinical drug effects on human ether-à-go-go related gene(hERG) currents across and between platforms and sites and to investigate the blocking effect of nine clinical drugs that have high (bepridil, quinidine, sotalol), intermediate (ondansetron, cisapride, terfenadine) and low (ranolazine, verapamil and mexiletine) torsade de pointes risk (TdP) on hERG potassium channel. **Methods:** The whole-cell patch clamp technique was used to record the change in hERG potassium current (I_{Kr}) on HEK293 cells that stably expressed hERG potassium channel (hERG-HEK293 steady-state cells), which was treated with four test concentrations of bepridil, quinidine, sotalol, ondansetron, cisapride, terfenadine, ranolazine, verapamil and mexiletine, to study the concentration-dependence of the effects on I_{Kr} and the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀). **Results:** All of the nine clinical drugs tested produced a concentration-dependent reduction of hERG current. The IC₅₀ values of bepridil and quinidine (high TdP risk clinical drugs) were about 98.32 nmol/L and 1.95 μmol/L, respectively, and the IC₅₀ values of sotalol was >300 μmol/L. The IC₅₀ values of ondansetron, cisapride, terfenadine (intermediate TdP risk clinical drugs) were 0.94 μmol/L, 39.10 nmol/L, 128.58 nmol/L, respectively. The IC₅₀ values of ranolazine, verapamil and mexiletine (low TdP risk clinical drugs) were 9.94 μmol/L, 235.49 nmol/L and 65.56 μmol/L, respectively. The IC₅₀ values for the nine clinical drugs corresponded well to those published within the literature. **Conclusion:** The risk of drug-induced TdP is closely related to the block of the hERG

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2015ZX09501004-002-006); 上海市科委“科技创新行动计划”项目(17140900700)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: xjwang@ncdser.com, hli@ncdser.com

channel, but the hERG channel block is lack of specificity as a predictor of TdP, which is also associated with multiple ion channel effects. Some clinical drugs also block Nav1.5-late and/or Cav1.2 currents, which can reduce the risk of TdP caused by hERG block. The data obtained by this method is reliable, which provides a reference for the hERG block test performed by domestic GLP laboratories and can be used for the safety evaluation of drug cardiac toxicity.

[Key words] drugs evaluation; torsade de pointes; hERG; whole-cell patch clamp

[Acta Univ Med Nanjing, 2019, 39(01):001-009]

hERG 基因(human ether- α -go-go related gene)编码蛋白质 Kv11.1(hERG 通道蛋白), hERG 钾通道电流(I_{Kr})在心脏动作电位复极化过程中发挥重要作用。临床用药物阻断 hERG 通道会导致获得性长 QT 综合征, 并增加了尖端扭转型室速(torsade de pointes, TdP)的风险^[1]。西沙比利、斯帕沙星等众多上市的非血管类药物因阻断 hERG 通道导致心律失常而撤市^[2], 自 2005 年人用药品注册技术国际协调会议(ICH)S7B 和 E14 文件规定几乎所有新药必须评估 hERG 阻滞以来, 没有上市药物因导致 TdP 而被撤市, 成效显著。

然而, 消除 hERG 阻滞在临床用药物开发中是一项艰巨的任务, 70% 的化合物在一定浓度下均可阻断 hERG 通道^[2], 这意味着潜在的安全候选药物可能会被淘汰^[3]。2013 年, 心脏安全研究协会(CSRC)、健康和环境科学研究所(HESI)和美国食品药品监督管理局(FDA)等提出了全面体外致心律失常分析(CiPA), 旨在开发新的基于人体自身机制的测试, 而不是目前的单一参数(hERG 阻滞)、间接指标(QT 间期)。CiPA 包括离子通道小组(ICWG)、in silico 模型工作组(ISWG)、干细胞工作组(SCWG)和临床转化工作组(CTWG)4 个小组^[3-4]。CiPA 临床转化工作组是一个由心脏电生理学家、安全药理学家和临床医师等组成的专家组, 其选择了一组涵盖致 TdP 低、中、高风险的 28 种临床用药物作为检测药物, 第一阶段的验证药物为 12 种, 第二阶段的检测药物为 16 种; 离子通道小组通过检测上述药物对 I_{CaL} 、 I_{Na} 、 $I_{Na-Late}$ 、 I_{Kr} (hERG)、 I_{Ks} 、 I_{to} 和 I_{K1} 7 种心脏离子通道的作用, 以验证高通量平台检测临床用药物对心脏离子通道作用的准确性, 评估不同高通量筛选平台和场点之间测定临床用药物对心脏离子通道影响的差异性和重复性, 并建立多种关键离子通道的数据库, 用于校准和验证 in silico AP 模型^[4]。

由于不同的操作方式、电生理溶液等, 目前不同试验平台和场点得出的数据差异较大, 本研究在 GLP 实验室采用 ICWG 推荐的标准 hERG 电流记

录程序、相同的电生理溶液成分、相同的药物配制方法和浓度, 检测了 9 种 CiPA 第一阶段验证药物对 hERG 通道的阻断作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞

外源稳定转染表达 hERG 钾通道的 HEK293 细胞(hERG-HEK293 稳态细胞, 批号: APC092811), 来源: SARL CREACELL 公司, 法国。

1.1.2 试剂

高糖 DMEM 培养基、青链霉素、G418 和 Accutase 消化液(Gibco 公司, 美国); 胎牛血清(Biological Industries 公司, 以色列); E-4031、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)(Sigma-Aldrich 公司, 美国); 细胞外液、电极内液、封接液(Nanion Technologies GmbH 公司, 德国)。

细胞外液成分(mmol/L): NaCl 140, KCl 4, MgCl₂ 1, CaCl₂ 2, HEPES 10, Glucose 5, NaOH 调节 pH 至 7.4, (298 ± 3)mOsmmol/kg; 电极内液成分(mmol/L): KF 120, KCl 10, EGTA 5, HEPES 10, NaCl 7, KOH 调节 pH 至 7.2, (285 ± 3)mOsmmol/kg; 封接液成分(mmol/L): NaCl 80, NMDG 60, KCl 4, MgCl₂ 1, CaCl₂ 10, HEPES 10, Glucose 5, NaOH 调节 pH 至 7.4, (305 ± 3)mOsmmol/kg。

1.1.3 主要仪器

Patchliner NPC16(Nanion 公司, 德国), EPC10 膜片钳放大器(HEKA 公司, 德国), 荧光显微镜(IMT-2, Olympus 公司, 日本), CO₂ 细胞培养箱(Forma Scientific 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

将 hERG-HEK293 稳态细胞接种于含 G418 的 DMEM-10 培养液(含有 1.2 mg/mL G418、10% 胎牛血清及 100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的 DMEM 高糖培养液)的培养瓶中, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的培养

箱中培养,每隔1 d更换1次培养液。

1.2.2 细胞准备

取1瓶培养良好的细胞(光镜下细胞色泽较亮,无明显漂浮细胞),弃去培养液,加入2 mL PBS清洗1次,然后加入1 mL Accutase 消化液消化约1 min,加入含G418的DMEM-10培养液终止消化,并吹打使细胞悬浮,将悬液转入离心管中离心(20 ℃,1 000 r/min,5 min)。弃去上清液,加入1~2 mL细胞外液悬浮细胞,将悬液转入Nanion Patchliner全自动膜片钳系统的细胞槽中。

1.2.3 药物处理

高浓度储液由ICWG提供,用DMSO将高浓度储液稀释出次高浓度储液、中浓度储液和低浓度储液,用细胞外液将储液分别稀释1 000倍得到相应的工作液(表1)。

表1 药物检测浓度及风险

Table 1 List of compounds, concentrations tested and risk profile		
药物	浓度(μmol/L)	风险
苾普地尔	0.3、0.1、0.03、0.01	高
奎尼丁	10、1、0.3、0.1	高
索他洛尔	300、100、30、10	高
昂丹司琼	10、3、1、0.3	中
西沙比利	0.3、0.1、0.01、0.001	中
特非那定	0.3、0.1、0.03、0.01	中
雷诺嗉	100、30、10、3	低/无
维拉帕米	1、0.3、0.1、0.03	低/无
美西律	100、30、10、1	低/无

1.2.4 全细胞膜片钳

在室温条件下由Patchcontrol HT软件控制Nanion Patchliner全自动膜片钳工作站完成程序树,采用Patchmaster软件通过EPC-10放大器在电脑上采集和存储hERG钾电流数据。首先由Patchliner全自动膜片钳工作站的机械臂从细胞槽中吸取细胞悬液至芯片上,调节压力和吸力从而将1个细胞定位在芯片的1个小孔上,芯片电阻为1~5 MΩ,随后Patchliner工作站完成封接过程,当芯片电极与细胞膜之间封接电阻>1 GΩ后,给予负压破膜,形成全细胞记录模式,待破膜稳定后补偿膜电容(Cs)及局部串联电阻(Rs)。采集和滤波频率分别为20 kHz和3 kHz。记录加药前的hERG钾通道电流(I_{Kr}),待电流稳定后采用累计加药法,同一个细胞累计加阴性(0.3% DMSO)、4个药物浓度(由低到高)、阳性(0.5 μmol/L E-4031)。

电流记录程序:钳制电压为-80 mV,去极化至+40 mV,时程为500 ms,然后施予+40 mV至-80 mV、时程为100 ms的恒速斜坡刺激(1.2 V/s)。每5 s记录1次电流,峰值尾电流在斜坡期间测量,以电流稳定的数据为有效数据。浓度-效应关系由Hill方程拟合得到: $I=I_{max} \cdot \{1/[1+(C_{1/2}/[C])^h]\}$,其中[C]代表药物浓度, $C_{1/2}$ 为半数抑制浓度(IC₅₀),h为Hill系数。

1.3 统计学方法

使用Igor6.05和SPSS 21.0软件分析,实验数据以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用方差分析和独立样本t检验进行数据统计, $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 苾普地尔对hERG钾通道的作用

苾普地尔10 nmol/L对hERG钾通道电流(I_{Kr})无作用,30、100和300 nmol/L对 I_{Kr} 有抑制作用,且随着浓度增大,苾普地尔对 I_{Kr} 的抑制率越大(表2,图1A),即苾普地尔对hERG钾通道的作用具有浓度依赖性。经Hill方程拟合得到苾普地尔的浓度-效应曲线(图1B),苾普地尔的IC₅₀值为(98.32 ± 11.3) nmol/L, Hill系数为1.52 ± 0.25。

表2 苾普地尔对hERG电流的抑制率

Table 2 Percentage of inhibition of hERG current by bepridil ($\bar{x} \pm s, n=4$)	
浓度(nmol/L)	电流抑制率(%)
0(0.3% DMSO)	-1.45 ± 1.75
10	0.33 ± 5.06
30	8.91 ± 5.54*
100	54.45 ± 4.65*
300	79.64 ± 4.80*

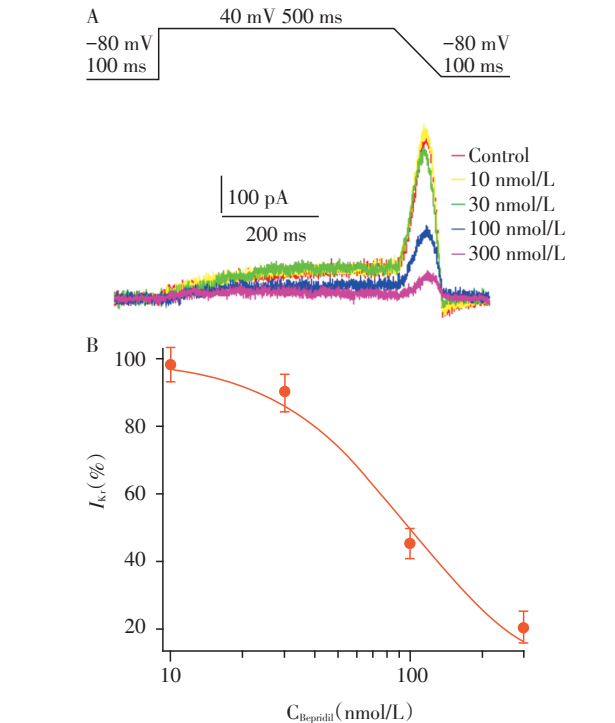
与0(0.3% DMSO)比较,* $P < 0.05$ 。

2.2 奎尼丁对hERG钾通道的作用

奎尼丁0.1、0.3 μmol/L对 I_{Kr} 无作用,1、10 μmol/L对 I_{Kr} 有抑制作用,且随着浓度增大,奎尼丁对 I_{Kr} 的抑制率越大(表3,图2A),即奎尼丁对hERG钾通道的作用具有浓度依赖性。经Hill方程拟合得到奎尼丁的浓度-效应曲线(图2B),奎尼丁的IC₅₀值为(1.95 ± 0.12) μmol/L, Hill系数为0.97 ± 0.04。

2.3 索他洛尔对hERG钾通道的作用

索他洛尔10、30 μmol/L对 I_{Kr} 无作用,100、300 μmol/L对 I_{Kr} 有抑制作用,且随着浓度增大,索他洛尔对 I_{Kr} 的抑制率越大(表4,图3),即索他洛尔对



A:室温下hERG电流的记录程序(上方)和苜普地尔对hERG电流的作用(下方);B:苜普地尔抑制hERG通道的浓度-效应曲线($\bar{x} \pm s, n=4$)。

图1 苜普地尔对hERG电流(I_{Kr})的阻断作用
Figure 1 hERG current(I_{Kr}) block by bepridil

表3 奎尼丁对hERG电流的抑制率

Table 3 Percentage of inhibition of hERG current by quinidine ($\bar{x} \pm s, n=4$)

浓度(nmol/L)	电流抑制率(%)
0(0.3% DMSO)	-1.03 $\pm$ 2.96
0.1	3.60 $\pm$ 7.41
0.3	11.81 $\pm$ 10.59
1.0	35.16 $\pm$ 8.48*
10.0	81.80 $\pm$ 2.85*

与0(0.3% DMSO)比较,* $P < 0.05$ 。

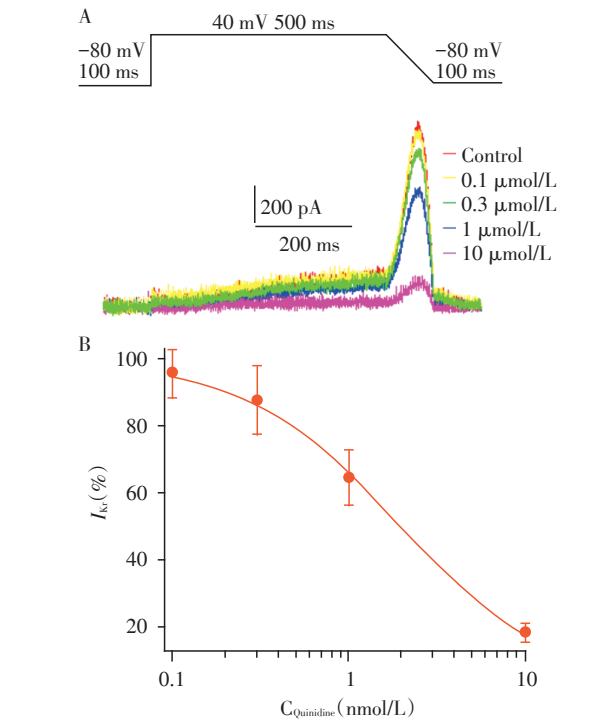
hERG钾通道的作用具有浓度依赖性。本实验检测的索他洛尔最高浓度300 $\mu\text{mol/L}$ 时的抑制率为(41.95 $\pm$ 3.64)%,所以索他洛尔的 IC_{50} 值>300 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.4 昂丹司琼对hERG钾通道的作用

昂丹司琼0.3、1.0、3.0、10.0 $\mu\text{mol/L}$ 对 I_{Kr} 有抑制作用,且随着浓度增大,昂丹司琼对 I_{Kr} 的抑制率越大(表5,图4A),即昂丹司琼对hERG钾通道的作用具有浓度依赖性。经Hill方程拟合得到昂丹司琼的浓度-效应曲线(图4B),昂丹司琼的 IC_{50} 值为(0.94 $\pm$ 0.07) $\mu\text{mol/L}$,Hill系数为0.84 $\pm$ 0.06。

2.5 西沙比利对hERG钾通道的作用

西沙比利1 nmol/L对 I_{Kr} 无作用,10、100、300 nmol/L



A:室温下hERG电流的记录程序(上方)和奎尼丁对hERG电流的作用(下方);B:奎尼丁抑制hERG通道的浓度-效应曲线($\bar{x} \pm s, n=4$)。

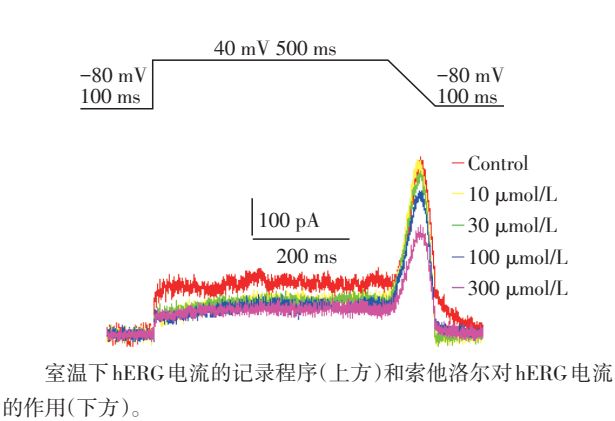
图2 奎尼丁对hERG电流(I_{Kr})的阻断作用
Figure 2 hERG current(I_{Kr}) block by quinidine

表4 索他洛尔对hERG电流的抑制率

Table 4 Percentage of inhibition of hERG current by sotalol ($\bar{x} \pm s, n=3$)

浓度(nmol/L)	电流抑制率(%)
0(0.3% DMSO)	3.70 $\pm$ 4.11
10	8.09 $\pm$ 9.37
30	6.86 $\pm$ 2.37
100	21.22 $\pm$ 2.21*
300	41.95 $\pm$ 3.64*

与0(0.3% DMSO)比较,* $P < 0.05$ 。



室温下hERG电流的记录程序(上方)和索他洛尔对hERG电流的作用(下方)。
图3 索他洛尔对hERG电流(I_{Kr})的阻断作用
Figure 3 hERG current(I_{Kr}) block by sotalol

表5 昂丹司琼对hERG电流的抑制率
Table 5 Percentage of inhibition of hERG current by ondansetron ($\bar{x} \pm s, n=3$)

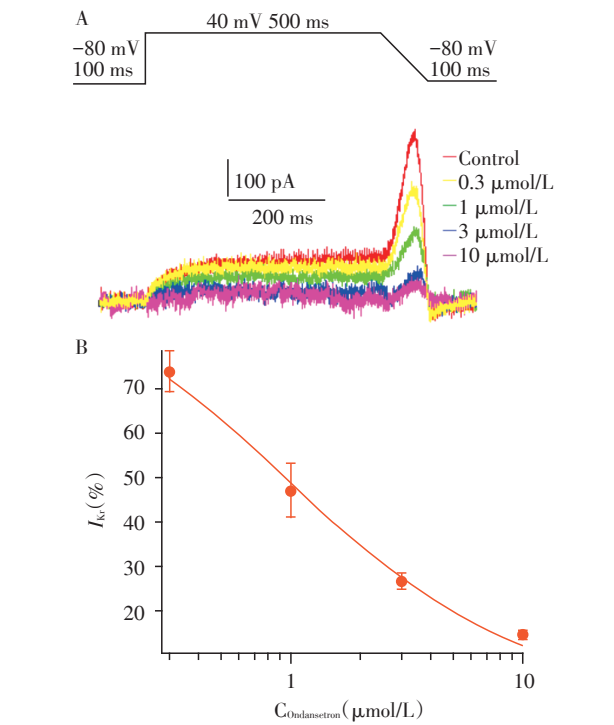
浓度(nmol/L)	电流抑制率(%)
0(0.3% DMSO)	3.03 ± 1.12
0.3	28.25 ± 4.49*
1.0	54.31 ± 5.92*
3.0	75.80 ± 3.43*
10.0	85.89 ± 0.82*

与0(0.3% DMSO)比较,* $P < 0.05$ 。

表6 西沙比利对hERG电流的抑制率
Table 6 Percentage of inhibition of hERG current by cisapride ($\bar{x} \pm s, n=4$)

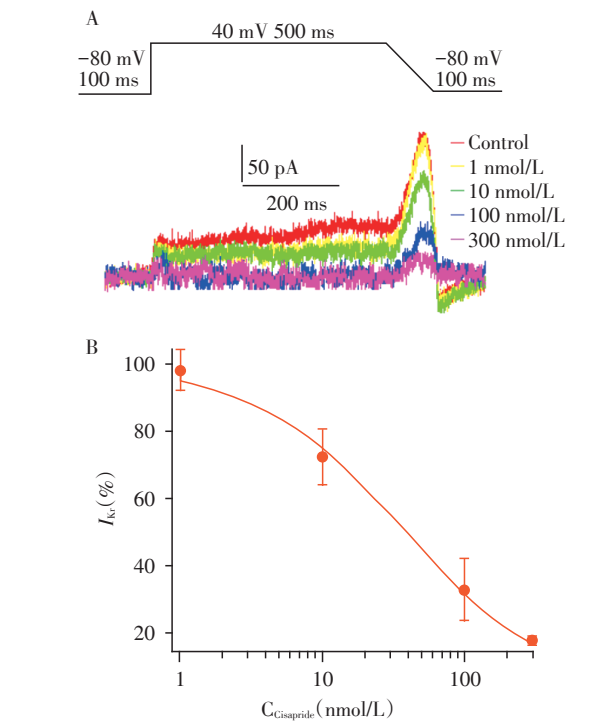
浓度(nmol/L)	电流抑制率(%)
0(0.3% DMSO)	0.64 ± 4.71
1	-2.35 ± 6.26
10	28.22 ± 8.44*
100	67.45 ± 9.19*
300	82.44 ± 1.03*

与0(0.3% DMSO)比较,* $P < 0.05$ 。



A:室温下hERG电流的记录程序(上方)和昂丹司琼对hERG电流的作用(下方);B:昂丹司琼抑制hERG通道的浓度-效应曲线($\bar{x} \pm s, n=3$)。

图4 昂丹司琼对hERG电流(I_{K_r})的阻断作用
Figure 4 hERG current(I_{K_r}) block by ondansetron



A:室温下hERG电流的记录程序(上方)和西沙比利对hERG电流的作用(下方);B:西沙比利抑制hERG通道的浓度-效应曲线($\bar{x} \pm s, n=4$)。

图5 西沙比利对hERG电流(I_{K_r})的阻断作用
Figure 5 hERG current(I_{K_r}) block by cisapride

对 I_{K_r} 有抑制作用,且随着浓度增大,西沙比利对 I_{K_r} 的抑制率越大(表6,图5A),即西沙比利对hERG钾通道的作用具有浓度依赖性。经Hill方程拟合得到西沙比利的浓度-效应曲线(图5B),西沙比利的 IC_{50} 值为(39.10 ± 3.92)nmol/L, Hill系数为0.80。

2.6 特非那定对hERG钾通道的作用

特非那定 10、30 nmol/L 对 I_{K_r} 无作用, 100、300 nmol/L 对 I_{K_r} 有抑制作用, 且随着浓度增大, 特非那定对 I_{K_r} 的抑制率越大(表7, 图6A), 即特非那定对hERG钾通道的作用具有浓度依赖性。经Hill方程拟合得到特非那定的浓度-效应曲线(图6B), 特非那定的

IC_{50} 值为(128.58 ± 40.10)nmol/L, Hill系数为1.62 ± 0.79。

2.7 雷诺嗉对hERG钾通道的作用

雷诺嗉 3、10、30、100 μmol/L 对 I_{K_r} 有抑制作用, 且随着浓度增大, 雷诺嗉对 I_{K_r} 的抑制率越大(表8, 图7A), 即雷诺嗉对hERG钾通道的作用具有浓度依赖性。经Hill方程拟合得到雷诺嗉的浓度-效应曲线(图7B), 雷诺嗉的 IC_{50} 值为(9.94 ± 0.56)μmol/L, Hill系数为0.98 ± 0.06。

2.8 维拉帕米对hERG钾通道的作用

维拉帕米 30 nmol/L 对 I_{K_r} 无作用, 100、300、

表7 特非那定对hERG电流的抑制率
Table 7 Percentage of inhibition of hERG current by terfenadine ($\bar{x} \pm s, n=5$)

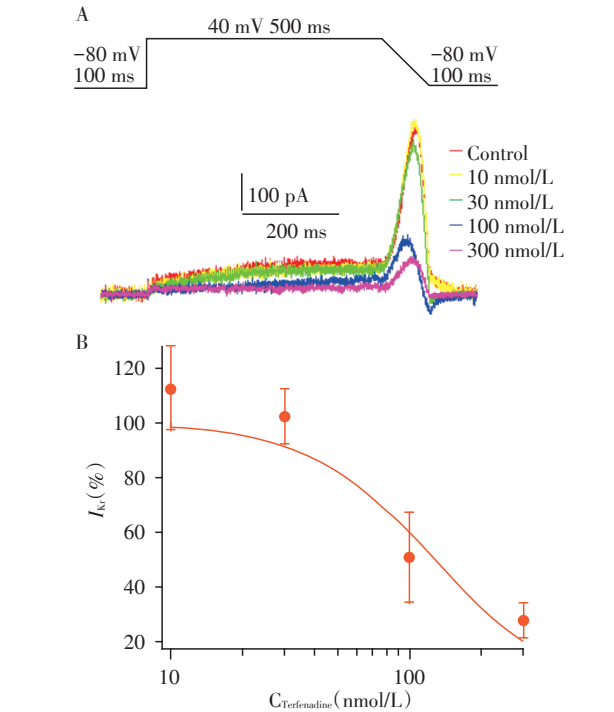
浓度(nmol/L)	细胞数	电流抑制率(%)
0(0.3% DMSO)	5	0.11 ± 4.71
10	5	-12.34 ± 15.51
30	5	-2.06 ± 10.05
100	5	49.22 ± 16.74*
300	5	72.03 ± 6.55*

与0(0.3% DMSO)比较,* $P < 0.05$ 。

表8 雷诺嗪对hERG电流的抑制率
Table 8 Percentage of inhibition of hERG current by ranolazine ($\bar{x} \pm s, n=4$)

浓度(nmol/L)	细胞数	电流抑制率(%)
0(0.3% DMSO)	4	2.72 ± 3.45
3	4	24.16 ± 6.57*
10	4	52.91 ± 4.91*
30	4	75.84 ± 3.10*
100	4	88.97 ± 1.05*

与0(0.3% DMSO)比较,* $P < 0.05$ 。



A:室温下hERG电流的记录程序(上方)和特非那定对hERG电流的作用(下方);B:特非那定抑制hERG通道的浓度-效应曲线($\bar{x} \pm s, n=5$)。

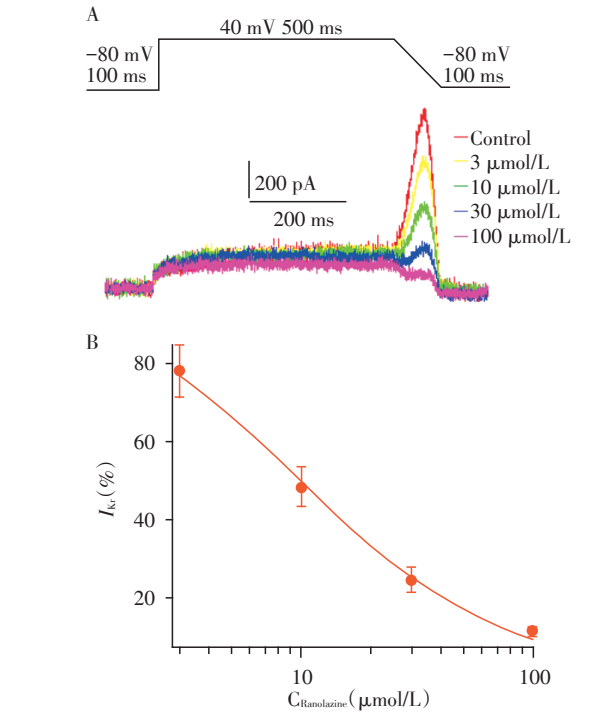
图6 特非那定对hERG电流(I_{kr})的阻断作用。

Figure 6 hERG current(I_{kr}) block by terfenadine

1 000 nmol/L对 I_{kr} 有抑制作用,且随着浓度增大,维拉帕米对 I_{kr} 的抑制率越大(表9,图8A),即维拉帕米对hERG钾通道的作用具有浓度依赖性。经Hill方程拟合得到维拉帕米的浓度-效应曲线(图8B),维拉帕米的 IC_{50} 值为 (235.49 ± 14.40) nmol/L, Hill系数为 1.25 ± 0.09 。

2.9 美西律对hERG钾通道的作用

美西律1、10 $\mu\text{mol/L}$ 对 I_{kr} 无作用,30、100 $\mu\text{mol/L}$ 对 I_{kr} 有抑制作用,且随着浓度增大,美西律对 I_{kr} 的抑制率越大(表10,图9A),即美西律对hERG钾通道的作用具有浓度依赖性。经Hill方程拟合得到美西律的浓度-效应曲线(图9B),美西律的 IC_{50} 值为



A:室温下hERG电流的记录程序(上方)和雷诺嗪对hERG电流的作用(下方)。B:雷诺嗪抑制hERG通道的浓度-效应曲线($\bar{x} \pm s, n=4$)。

图7 雷诺嗪对hERG电流(I_{kr})的阻断作用

Figure 7 hERG current(I_{kr}) block by ranolazine

(65.56 ± 9.73) $\mu\text{mol/L}$, Hill系数为1.60。

3 讨论

由于不同临床用药物与hERG钾通道的结合位点、结合程度、结合后状态及解离能力等不同,会导致某些临床用药物在不同刺激程序下得出的数据不同,研究表明采用本实验中的hERG电流刺激程序所得的实验结果重复性较高^[7]。本研究表 明 苊 普 地 尔、奎 尼 丁、索 他 洛 尔、昂 丹 司 琼、西 沙 比 利、特 非 那 定、雷 诺 嗪、维 拉 帕 米 和 美 西 律 可 抑 制 hERG 钾 通 道,且随着浓度增大,药物对 I_{kr} 的抑制率越大,即该9种临床用药物对hERG钾通道的阻断作用具有浓度

表9 维拉帕米对hERG电流的抑制率
Table 9 Percentage of inhibition of hERG current by verapamil ($\bar{x} \pm s, n=4$)

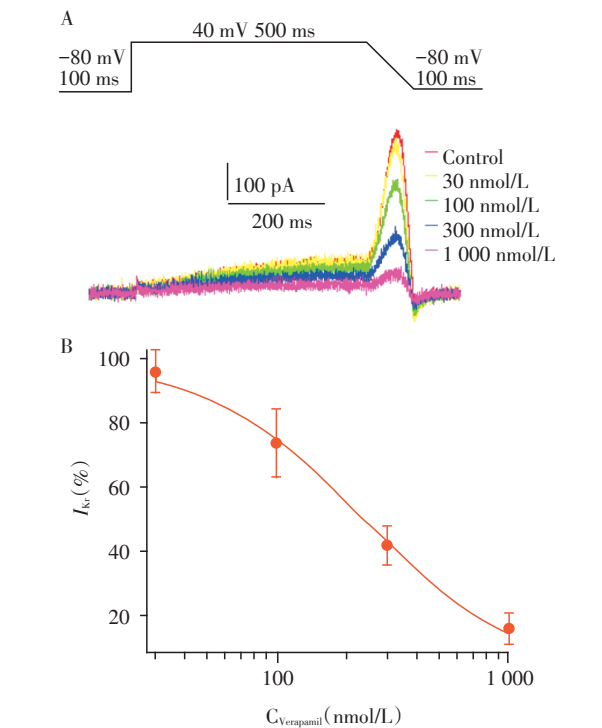
浓度(nmol/L)	细胞数	电流抑制率(%)
0(0.3% DMSO)	4	1.03 ± 4.06
30	4	4.96 ± 6.47
100	4	27.39 ± 10.58*
300	4	58.63 ± 6.15*
1 000	4	84.61 ± 4.77*

与0(0.3% DMSO)比较,* $P < 0.05$ 。

表10 美西律对hERG电流的抑制率
Table 10 Percentage of inhibition of hERG current by mexiletine ($\bar{x} \pm s, n=4$)

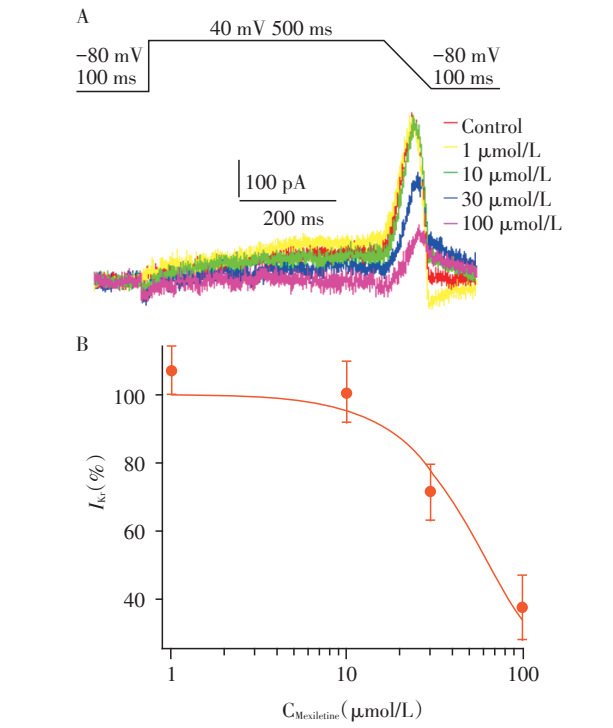
浓度(nmol/L)	细胞数	电流抑制率(%)
0(0.3% DMSO)	4	-1.47 ± 4.65
1	4	-8.80 ± 7.13
10	4	-2.21 ± 9.23
30	4	27.56 ± 8.36*
100	4	61.91 ± 9.68*

与0(0.3% DMSO)比较,* $P < 0.05$ 。



A:室温下hERG电流的记录程序(上方)和维拉帕米对hERG电流的作用(下方);B:维拉帕米抑制hERG通道的浓度-效应曲线($\bar{x} \pm s, n=4$)。

图8 维拉帕米对hERG电流(I_{kr})的阻断作用
Figure 8 hERG current(I_{kr}) block by verapamil



A:室温下hERG电流的记录程序(上方)和美西律对hERG电流的作用(下方);B:美西律抑制hERG通道的浓度-效应曲线($\bar{x} \pm s, n=4$)。

图9 美西律对hERG电流(I_{kr})的阻断作用
Figure 9 hERG current(I_{kr}) block by mexiletine

依赖性。本实验所得 IC_{50} 值基本在文献范围内(表11)^[5-10],其中奎尼丁在范围外,可能是由于测定温度、膜片钳平台和电流记录程序等实验参数不同。

苳普地尔、奎尼丁和索他洛尔是致TdP高风险临床用药物,其中,苳普地尔作为治疗心绞痛药物被开发处理,在日本苳普地尔被用作抗心律失常药物,其具有与Ⅰ、Ⅲ和Ⅳ类抗心律失常药物类似的作用,小剂量(100~200 mg/d)能缓解持续性房颤^[11];在美国和欧洲,苳普地尔的临床用药剂量曾高达600 mg/d,经常导致QT延长和TdP。本实验苳普地尔的 IC_{50} 值约为98.32 nmol/L,具有强hERG钾通道阻断作用,与其致TdP高风险相符;Hill系数约为

表11 本实验 IC_{50} 值和文献比较
Table 11 Comparison of IC_{50} values to the literature

药物	IC_{50} (μmol/L)	Hill系数	文献 IC_{50} (μmol/L)
苳普地尔	0.098	1.52	0.023~0.149 ^[5-9]
奎尼丁	1.95	0.97	0.235~1.1 ^[5-10]
索他洛尔	>300	—	74~810 ^[5,6-10]
昂丹司琼	0.94	0.84	0.081~1.5 ^[5-6,10]
西沙比利	0.039	0.80	0.002~0.045 ^[5-10]
特非那定	0.129	1.62	0.006 6~0.204 ^[5-9]
雷诺嗪	9.94	0.98	6.5~53.2 ^[5,8-10]
维拉帕米	0.235	1.25	0.136~0.499 ^[5-10]
美西律	65.56	1.60	104.7 ^[10]

1.52,提示苻普地尔对hERG钾通道的作用位点可能不唯一。奎尼丁是I_a类抗心律失常药物,本实验奎尼丁的IC₅₀值约为1.95 μmol/L, Hill系数约为0.97,提示奎尼丁对hERG钾通道的作用位点可能是唯一的。研究表明奎尼丁是一种多通道阻滞剂,对Nav1.5 (I_{NaF})、hERG (I_{Kr})、Cav1.2 (I_{CaL})^[8]和KvLQT1 (I_{Ks})、Kv4.3 (I_{to})^[5]均有阻断作用,临床结果显示奎尼丁在较低血药浓度下发生TdP的概率更大,这也可能与其阻断多种通道有关^[12]。索他洛尔是第Ⅲ类抗心律失常药物,选择性阻断 I_{Kr} ,同时兼有β₁、β₂受体阻滞作用^[12]。索他洛尔是致TdP高风险临床用药物,但本实验索他洛尔的IC₅₀值大于300 μmol/L,由于索他洛尔特异性阻滞 I_{Kr} 而对 I_{Ks} 作用不大,而心脏中层心肌细胞 I_{Ks} 比外膜下、内膜下心肌细胞小,从而使索他洛尔对中层心肌细胞的作用更明显,因此中层心肌细胞复极延长更明显,导致跨室壁复极离散度(TDR)增大,从而增加TdP风险。

昂丹司琼、西沙比利和特非那定是致TdP中风险临床用药物,其中昂丹司琼是止吐药物,2001年美国FDA在其包装上增加了一个“黑匣子”的警告,说明其可能导致QT延长及心律失常。本实验昂丹司琼的IC₅₀值约为0.94 μmol/L, Hill系数约为0.84,提示昂丹司琼对hERG钾通道的作用位点可能是唯一的。西沙比利是苯甲酰胺类5-HT₄受体激动剂类药物,临床上用于胃肠促动力,因大剂量使用会引发TdP,美国FDA于2000年将其撤市。本实验西沙比利的IC₅₀值约为39.10 nmol/L,具有强hERG钾通道阻断作用, Hill系数为0.8,提示西沙比利对hERG钾通道的作用位点可能是唯一的。西沙比利是多离子通道阻断剂,其在低浓度下对hERG通道的阻断作用表现突出,引起QT间期延长,动作电位时程延长;高浓度时则表现出对钙离子通道和钠离子通道的阻断效应^[13]。特非那定是抗组胺类药物,因其致心律失常风险,美国于1998年将其撤市,国家食品药品监督管理局(CFDA)将其由处方药改为非处方药^[13]。本实验特非那定的IC₅₀值约为128.58 nmol/L,具有强hERG钾通道阻断作用, Hill系数约为1.62,提示特非那定对hERG钾通道的作用位点可能不唯一。

雷诺嗉、维拉帕米和美西律是致TdP低风险临床用药物,其中雷诺嗉是治疗心绞痛药物,本实验雷诺嗉的IC₅₀值为9.94 μmol/L, Hill系数为0.98,提示雷诺嗉对hERG钾通道的作用位点可能是唯一的。雷诺嗉诱发TdP风险较低,与其阻断钠通道有关,其对Nav1.5-Late的阻断可以消除hERG通道阻

断对早期复极的影响^[14]。有研究表明^[15],雷诺嗉在治疗浓度时会使QT间期适度延长,说明Nav1.5-Late阻断不能完全抵消hERG阻滞诱导的QT间期延长,但足以抵消诱发TdP的风险。本实验维拉帕米的IC₅₀值为235.49 nmol/L,对hERG钾通道阻断作用较强; Hill系数为1.25,提示维拉帕米对hERG钾通道的作用位点可能不唯一。维拉帕米是治疗高血压、心绞痛药物,在全世界范围使用了40多年,使用患者达数百万,其治疗浓度阻断了hERG通道,但对动作电位时程(APD)和QT间期仅有很小的影响,没有发生TdP^[15]。除了阻断hERG通道外,维拉帕米还是第Ⅳ类抗心律失常药,属于强钙阻断剂,对Cav1.2 (I_{CaL})的阻断可以消除hERG通道阻断对早期复极和晚期复极的影响,从而降低TdP风险^[16]。美西律是第I_b类抗心律失常药物,本实验美西律的IC₅₀值为65.56 μmol/L,对hERG通道的阻断作用较小,其对Nav1.5-Late的阻断可以消除hERG通道阻断对早期复极的影响; Hill系数为1.6,提示美西律对hERG钾通道的作用位点可能不唯一。

临床用药物致TdP风险与hERG通道的阻滞作用密切相关,几乎所有临床用药物致TdP病例均显示该药物在血药浓度下选择性阻断hERG通道,但hERG通道阻断不能完全代表TdP风险,其还与心脏上表达的多种离子通道有关,某些临床用药物可以通过阻断钠通道(如雷诺嗉)和钙通道(如维拉帕米)而降低TdP风险。Crumb等^[5]发现致TdP高风险临床用药物只阻断hERG通道或对hERG通道的阻断能力强于其他离子通道,致TdP中风险临床用药物的平均hERG通道阻滞能力低于高致TdP风险临床用药物,而致TdP低风险临床用药物的hERG阻断能力低于或等于Cav1.2或Nav1.5阻断能力。

目前,国内仅有少数GLP实验室可进行hERG钾通道评价研究,但由于测定温度、电生理溶液和电流记录程序等的不同,造成试验数据的差异性较大。通过在GLP实验室采用不同致TdP风险临床用药物来验证ICWG推荐的标准hERG电流检测条件,以判断不同类型临床用药物最合适的检测条件,从而统一规范操作,更有利于数据库的建立及各场点数据的准确性和可重复性。本研究目前验证了第一阶段临床用药物对hERG通道的作用,后续会进行第二阶段16种临床用药物的验证,进一步验证此方法的准确性和重复性,以便为国内GLP实验室进行hERG钾通道评价研究提供参考依据,能够更准确地评估心律失常风险,进而推广到全国的药物心

脏毒性安全性评价。

[参考文献]

- [1] Curigliano G, Cipolla C, De BF. Drug-induced prolongation of the QT interval [J]. *New Engl J Med*, 2004, 350 (25):2618-2621
- [2] Shah RR. Drug-induced QT interval prolongation--regulatory guidance and perspectives on hERG channel studies [J]. *Novartis Found Symp*, 2005, 266:251-280
- [3] Fermini B, Hancox JC, Abi-Gerges N, et al. A new perspective in the field of cardiac safety testing through the comprehensive *in vitro* proarrhythmia assay paradigm [J]. *J Biomol Screen*, 2016, 21(1):1-11
- [4] Colatsky T, Fermini B, Gintant G, et al. The comprehensive *in vitro* proarrhythmia assay (CiPA) initiative-update on progress [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2016, 81:15-20
- [5] Jr CW, Vicente J, Johannesen L, et al. An evaluation of 30 clinical drugs against the comprehensive *in vitro* Proarrhythmia assay proposed ion channel panel [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2016, 81:251-262
- [6] Hishigaki H, Kuhara S. hERGAPDBase: a database documenting hERG channel inhibitory potentials and APD - prolongation activities of chemical compounds [J]. *Database*, 2011, 2011(1):bar017
- [7] Kirsch GE, Trepakova ES, Brimecombe JC, et al. Variability in the measurement of hERG potassium channel inhibition; Effects of temperature and stimulus pattern [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2004, 50(2):93-101
- [8] Kramer J, Obejeropaz CA, Myatt G, et al. MICE models: superior to the HERG model in predicting Torsade de Pointes [J]. *Sci Rep*, 2013, 3(7):2100
- [9] Redfern WS, Carlsson L, Davis AS, et al. Relationships between preclinical cardiac electrophysiology, clinical QT interval prolongation and torsade de pointes for a broad range of drugs: evidence for a provisional safety margin in drug development [J]. *Cardiovasc Res*, 2003, 58 (1):32-45
- [10] Windley MJ, Abi-Gerges N, Fermini B, et al. Measuring kinetics and potency of hERG block for CiPA [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2017, 87:99-107
- [11] Kawamura M, Ito H, Onuki T, et al. Combination therapy of renin angiotensin system inhibitors and bepridil is useful for maintaining sinus rhythm in patients with atrial fibrillation [J]. *J Cardiol*, 2007, 50(6):343-350
- [12] Britton OJ, Abi-Gerges N, Page G, et al. Quantitative comparison of effects of dofetilide, sotalol, quinidine, and verapamil between human *ex vivo* trabeculae and in silico ventricular models incorporating inter-individual action potential variability [J]. *Front Physiol*, 2017, 8:597
- [13] Kamiya K, Niwa R, Morishima M, et al. Molecular determinants of hERG channel block by terfenadine and cisapride [J]. *J Pharmacol Sci*, 2008, 108(3):301-307
- [14] Johannesen L, Vicente J, Mason JW, et al. Differentiating drug-induced multichannel block on the electrocardiogram: randomized study of dofetilide, quinidine, ranolazine, and verapamil [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2014, 96 (5):549-558
- [15] Vicente J, Johannesen L, Mason JW, et al. Comprehensive T wave morphology assessment in a randomized clinical study of dofetilide, quinidine, ranolazine, and verapamil [J]. *J Am Heart Assoc*, 2015, 4(4):141-143
- [16] Veroli GY, Davies MR, Zhang H, et al. hERG Inhibitors with similar potency but different binding kinetics do not pose the same proarrhythmic risk: implications for drug safety assessment [J]. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 2014, 25(2):197-207

[收稿日期] 2018-03-14