

· 实验研究 ·

康普瑞丁磷酸二钠对豚鼠心室肌细胞动作电位和 hERG 通道电流的影响

管晓媛¹, 华 潞^{2*}, 孟红旭³

1. 中国医学科学院 北京协和医学院 国家心血管病中心 阜外医院 国家心血管疾病临床医学研究中心 心血管疾病国家重点实验室 国家卫生健康委员会心血管药物临床研究重点实验室 中国牛津国际医学研究中心, 北京 100037
2. 中国医学科学院 阜外医院 血栓性疾病诊治中心, 北京 100037
3. 中国中医科学院西苑医院 基础医学研究所 中药药理北京市重点实验室, 北京 100091

摘要:目的 研究康普瑞丁磷酸二钠(CA4P)对豚鼠心室肌细胞动作电位间期(APD)和人类 ether-a-go-go 相关基因(hERG)编码的 K⁺离子通道的影响, 探讨 CA4P 对心脏毒性作用的体外细胞学机制。方法 使用全细胞膜片钳技术记录 CA4P 10、100 μmol/L 作用下豚鼠心室肌细胞的动作电位, 并记录 CA4P 3、10、30、100、300 μmol/L 下对 HEK293 细胞 hERG 通道尾电流的抑制率及 CA4P 30 μmol/L 在 10、20、30、40、50 mV 时对 hERG 电流的抑制率。结果 CA4P 10、100 μmol/L 显著延长动作电位复极 50%时程 (ADP₅₀) 和动作电位复极 90%时程 (ADP₉₀)。CA4P 可浓度相关性和电压相关性抑制 hERG 尾电流幅度, 半数抑制浓度 (IC₅₀) 为 54.9 μmol/L, 安全边缘范围为 30.5~2.8。结论 CA4P 可延长动作电位间期及抑制 hERG 通道电流。**关键词:** 康普瑞丁磷酸二钠; QTc 间期; 动作电位间期; hERG 通道

中图分类号: R966 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2019)05-1269-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2019.05.001

Effects of combretastatin A4 phosphate on action potential duration and hERG channel currents of ventricle muscle cell in cavy

GUAN Xiao-yuan¹, HUA Lu², MENG Hong-xu³

1. Oxford International Medical Research Center, NHC Key Laboratory of Clinical Research for Cardiovascular Medications, State Key Laboratory of Cardiovascular Disease, National Clinical Research Center of Cardiovascular Diseases, Fuwai Hospital, National Center for Cardiovascular Diseases, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100037, China
2. Thrombosis and Vascular Medicine Center, Chinese Academy of Medical Sciences, Fuwai Hospital, Beijing 100037, China
3. Beijing Key Laboratory of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Institute of Basic Medical Sciences of Xiyuan Hospital, Beijing 100091, China

Abstract: Objective To investigate the effects of combretastatin A4 phosphate (CA4P) on action potential duration (APD) and human-ether-a-go-go-related gene (hERG) K⁺ channel of ventricle muscle cell in cavy, and to explore *in vitro* cellular mechanism of CA4P in cardiotoxicity effects. **Methods** APD of ventricle muscle cell in cavy under the action of CA4P 10 and 100 μmol/L were recorded by the whole cell patch clamp technique. The inhibition ratio of hERG channel tail current under the action of CA4P 3, 10, 30, 100, and 300 μmol/L and the inhibition ratio of hERG channel tail current under the action of CA4P 30 μmol/L in 10, 20, 30, 40, and 50 mV were recorded. **Results** CA4P 10 and 100 μmol/L significantly prolonged the action potential duration at 50% of repolarization (ADP₅₀) and the action potential duration at 90% of repolarization (ADP₉₀). CA4P induced a concentration- and voltage-dependent inhibition of the current amplitude in the hERG tail current. The half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) was 54.9 μmol/L. The safety margin ratio was 30.5 — 2.8. **Conclusion** CA4P can prolong APD and inhibit hERG channel current.

Key words: combretastatin A4 phosphate; QTc; action potential duration; hERG channel

收稿日期: 2019-01-04

作者简介: 管晓媛, 女, 本科, 研究方向为临床药理学。E-mail: iosono_angela@sina.com

*通信作者 华 潞, 女, 博士, 研究方向为心血管内科。E-mail: ethannan@126.com

作为考布他汀 A4 类的化合物, 康普瑞丁磷酸二钠 (CA4P) 是肿瘤血管阻断剂的代表药物之一^[1], 它是一种微管蛋白破坏剂, 通过直接抑制微管蛋白的聚合而发挥其抗肿瘤血管的作用, 破坏有丝分裂并触发 G₂/M 期的细胞周期阻滞, 随着肿瘤血管内皮细胞的丢失, 肿瘤血管迅速萎缩和崩塌导致肿瘤中心血流减少而使肿瘤组织缺血性坏死, 阻断肿瘤血管网的这种机制具有高度选择性且仅针对未成熟内皮细胞和肿瘤新生血管^[2]。CA4P 正在进行 II 期和 III 期临床试验以评估其安全性和有效性, 在临床试验中发现其具有多项心脏毒性作用, 其中最常见的就是 QTc 间期延长^[3-5]。QTc 间期延长通常是药物引起的获得性心律失常, 特别是非抗心律失常药物^[6], 如不能迅速纠正可能引起心室颤动, 甚至尖端扭转型室性心动过速 (TdP) 而发生猝死, 因此, 临床及非临床方法的 QTc 间期延长评估是非常重要的。QTc 间期延长的主要机制是阻断延迟整流钾电流 (I_{Kr}), 它由 hERG 基因编码^[7-8], hERG 通道被阻滞导致外向钾离子电流减少使复极化时间延长。目前, CA4P 引起 QTc 间期延长的体外细胞学机制尚不清楚。本研究的目的是利用豚鼠心室肌细胞动作电位和 hERG-HEK293 细胞, 使用全细胞膜片钳方法评估 CA4P 诱导 QTc 间期延长发生的机制。

1 材料

1.1 药物

CA4P 由北京中科质检生物技术有限公司提供, 产品批号 K-025-1503327, 规格 5 mg, 质量分数 > 98%; 特非那定由大连美仑生物技术有限公司提供, 产品批号 S0425A, 规格 50 mg。

1.2 试剂

无 Ca²⁺台式液 (mmol/L): NaCl 140, KCl 5.4, NaH₂PO₄ 0.33, MgCl₂ 1, Glucose 10, Hepes 10 (用 NaOH 调节至 pH 7.4); 台式液 (mmol/L): CaCl₂ 2, NaCl 140, KCl 5.4, NaH₂PO₄ 40.33, MgCl₂ 1, Glucose 10, Hepes 10 (用 NaOH 调节至 pH 7.4) Kraft-Bruhe 溶液 (mmol/L): KOH 70, KCl 40, KH₂PO₄ 20, Glutamic acid 50, MgCl₂ 3, Taurine 20, EGTA 0.5, Hepes 10, Glucose 10 (用 KOH 调节至 pH 7.4); 记录动作电位电极内液 (mmol/L): KCl 140, Na₂ATP 4, MgCl₂ 1, EGTA 5, HEPES 10, Glucose 10 (用 KOH 调节至 pH 7.2); 记录 HERG 电流电极内液 (mmol/L): KCl 130, MgCl₂ 1, MgATP 5, EGTA 5, HEPES 10, Glucose 10 (用 KOH 调整至 pH

7.2), 以上试剂全部由 Sigma-Aldrich 中国公司购入。

1.3 仪器

膜片钳放大器 (HEKA EPC-10, 德国); 微操纵器 (SD MX7600, USA); PULL-100 拉拔器 (Sutter Instruments); 倒置显微镜 (DMIRB TL, LEICA)。

1.4 动物

成年健康豚鼠体质量 250~300 g, 合格证号 SCXK (京) 2011-0004, 由北京斯克贝实验动物科技有限公司提供。

1.5 细胞

HEK293 细胞由中国中医科学院西苑医院中药药理重点实验室提供。

2 方法

2.1 心室肌细胞的急性分离

豚鼠腹腔注射 20% 乌拉坦 (10 mL/kg) 进行麻醉, 在 4 °C 环境下将心脏快速取出, 置 0 °C 无 Ca²⁺台式液的冰水混合液中切除结缔组织、血液残余物和脂肪等多余组织, 在 Langendorff 装置上迅速进行逆行主动脉灌注, 随后, 灌注无 Ca²⁺台式液 3~5 min 后改为低 Ca²⁺台式液 (30 μmol/L Ca²⁺) 和酶溶液 (0.3 g/L I 型胶原酶、0.1 g/L 链霉菌蛋白酶 E 和 0.8 g/L 牛血清白蛋白), 该过程持续 1 min 后转为酶溶液灌注 5 min。心室肌被剪成小块, 然后通过尼龙网 (200 μm) 在 Kraft-Bruhe 溶液中滤过, 最后, 细胞在室温中孵育 2 h 后储存在 4 °C 冰箱中待用。试验在室温 22 °C 下进行, 流入心脏的液体温度为 37 °C, 各液体始终通以 99.5% 医用氧气, 超纯水电导率低于 1 μs/cm。

2.2 hERG-HEK293 细胞培养

将稳定表达 hERG 通道的 HEK293 细胞复苏后接种在玻璃片上置于培养皿中, 用含 10% 胎牛血清 DMEM 培养基培养 48 h。用绿色荧光蛋白 (GFP) 标记 hERG 通道蛋白, 在荧光显微镜下可见绿色荧光, 并且诱导出的电流可被特非那定 (1 μmol/L) 所阻断, 表明 hERG 通道蛋白稳定表达成功。

2.3 记录心室肌细胞动作电位

使用传统的全细胞膜片钳技术记录细胞膜电流, 将心室肌细胞悬液滴入倒置显微镜实验台上的 1 mL 浴槽内静置 5 min, 细胞充分贴壁后, 以流速为 2 mL/min 的台式液灌注 5 min, 选择边缘整齐、条纹清晰的杆状细胞进行实验。使用 PULL-100 拉拔器拉微电极, 电极尖端为 1~2 μm, 电极内液的入液电阻为 2~5 MΩ。操作微操使玻璃微电极接触细胞膜负压形成高阻封接, 破膜成功形成全细胞方

案，使用膜片钳放大器在电流钳模式下记录单个细胞动作电位，由400~900 pA 阈上刺激激发动作电位，频率为1 Hz，持续时间10~35 ms，使用Pulse软件进行数据采集和分析。给予CA4P 1 μmol/L后记录动作电位未见变化，给予CA4P 10、100 μmol/L后记录动作电位，可见动作电位时程明显延长，经洗脱后部分恢复。将CA4P与灌流台式液（对照）指标进行比较，计算动作电位复极50%时程（APD₅₀）延长率和动作电位复极90%时程（ADP₉₀）延长率。

$$ADP_{50} \text{ 延长率} = \frac{ADP_{50CA4P} - ADP_{50台}}{ADP_{50台}}$$

$$ADP_{90} \text{ 延长率} = \frac{ADP_{90CA4P} - ADP_{90台}}{ADP_{90台}}$$

2.4 记录 hERG 通道电流

将 hERG-HEK293 细胞培养玻璃片置于细胞槽内，用台式液进行灌流，实验选择三角形，折光性好的细胞进行。形成全细胞封接后，封接电阻为2~4 MΩ，细胞膜钳制电位保持在-80 mV，随后电流被2 s的去极化脉冲引出到+20 mV，跟随2 s复极化脉冲到-40 mV形成 hERG 电流，并可被1 μmol/L特异性 hERG 通道阻断剂特非那定所抑制。给予CA4P（3、10、30、100、300 μmol/L）后 hERG 通道尾电流振幅呈浓度相关性下降趋势，洗脱后部分

恢复。将尾电流峰值作为观察指标，将给药后该指标与灌流台式液指标进行比较，计算尾电流的抑制率。

$$\text{尾电流抑制率} = \frac{I_{台} - I_{CA4P}}{I_{CA4P}}$$

2.5 统计学方法

统计学处理采用SPSS 19.0软件和Origin 6.0软件，所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，显著性检验采用 Wilcoxon 检验。

3 结果

3.1 CA4P 对心室肌细胞动作电位的影响

CA4P 10、100 μmol/L 的 ADP₅₀ 的延长率分别为15.77%、42.01%，ADP₉₀ 的延长率分别为10.15%、31.36%，差异具有统计学意义（ $P < 0.05$ ），表明CA4P可延长动作电位时程并具有浓度相关性。静息膜电位（RMP）、动作电位幅度（APA）、0期最大上升幅度（ V_{max} ）无明显变化，见表1。

3.2 CA4P 对 hERG 电流传导阻滞的浓度相关性

CA4P 3、10、30、100、300 μmol/L 下尾电流抑制率分别为（9.8±4.8）%、（19.2±5.0）%、（44.3±2.5）%、（77.2±2.9）%、100%。浓度相关性曲线符合 Hill 方程： $I_{drug}/I_{control} = 1/[1 + (IC_{50}/D)^n]$ ，其中 IC₅₀ 为 CA4P 的半数最大抑制浓度，D 为 CA4P 药物浓度，

表1 CA4P对心室肌细胞动作电位间期的影响

Table 1 Effects of CA4P on action potential duration of ventricle muscle cell

分组	剂量/(μmol·L ⁻¹)	RMP/mV	APA/mV	$U_{max}/(V \cdot s^{-1})$	ADP ₅₀ /ms	ADP ₉₀ /ms
对照	—	-81.5±3.9	162.6±7.4	75.9±1.6	388.7±61.3	461.1±45.9
CA4P	10	-85.1±4.7	166.4±7.1	77.8±0.8	454.6±64.7**	515.6±52.4**
	100	-86.0±7.6	161.3±7.8	77.3±1.4	546.9±112.0*	596.4±94.6*

与对照组比较：* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

n为Hill方程系数。由图1可知IC₅₀值为54.9 μmol/L， $n = 0.9 \pm 0.1$ ，根据 hERG 安全边缘计算 IC₅₀/C_{max}，安全边缘范围为30.5~2.8^[13]，提示CA4P对 hERG 通道尾电流的抑制作用有明显的浓度相关性。CA4P 300 μmol/L 阻断 hERG 电流的时间相关性呈逐渐下降趋势，8 min 后 hERG 通道尾电流可全部被抑制，并于洗脱后恢复。

3.3 CA4P 对 hERG 电流传导阻滞的电压相关性

以正常的 hERG 通道尾电流为对照条件，给予CA4P 30 μmol/L 后尾电流表现出明显抑制作用，较10 μmol/L 抑制效果显著。对于电流-电压（I-U）关系曲线分析，CA4P 在较高电压下显著抑制尾电流，CA4P 30 μmol/L 在10、20、30、40、50 mV 时对 hERG

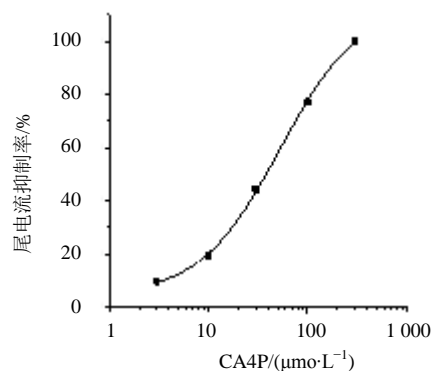


图1 CA4P对 hERG 电流传导阻滞的浓度相关性
Fig. 1 Concentration correlation of CA4P on hERG current conduction block

电流的抑制率分别为 $(9.9 \pm 8.5) \%$ 、 $(23.7 \pm 9.1) \%$ 、 $(27.3 \pm 7.5) \%$ 、 $(32.3 \pm 9.4) \%$ 、 $(31.8 \pm 10.5) \%$ ，提示 CA4P 对 hERG 通道尾电流的抑制作用有明显的电压相关性。见图 2。

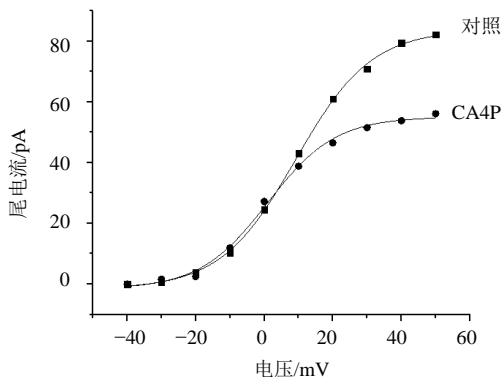


图 2 CA4P 对 hERG 电流传导阻滞的电压相关性

Fig. 2 Voltage correlation of CA4P on hERG current conduction block

4 讨论

CA4P 作为抗肿瘤血管靶向药物在多项临床试验中显示具有心脏毒性作用，一项 I 期临床试验表明，33% 患者 QTc 间期延长 >450 ms，最长间期为 480 ms，且大多数患者为 1~2 级不良事件^[9]。另一项 I 期临床试验显示，44% 患者在 CA4P 60 mg/m² 后 10 min 发现 CTCAE 1 级 QTc 间期延长，其中 43% 患者都有一个单次 QTc 间期延长约 559 ms。除此之外，研究还发现心动过速、心肌缺血、急性 ST 段改变、T 波改变以及其他心脏毒性副作用^[10]。严重的心律失常会导致 Tdp 的发生，而患者是否存在 Tdp 风险是很难预测的，在药物使用前了解 Tdp 的风险收益比也很重要，安全边缘是用于评估药物所致 Tdp 潜在风险的指标^[11]。本实验得到的 IC₅₀ 结果为 54.9 μmol/L，由临床试验得到 CA4P 的 C_{max} 在人体最低治疗剂量 (10 mg/m²) 和最大耐受剂量 (65 mg/m²) 分别为 (1.8 ± 0.63) 、 (19.5 ± 4.77) μmol/L^[12]，根据 hERG 安全边缘计算 IC₅₀/C_{max}，其结果 <30 为阳性结果，提示药物易导致 Tdp 的发生。经计算此时 CA4P 的安全边缘范围为 30.5~2.8，即表明当药物使用剂量达到人体最低治疗剂量以上时则具有较高的药物 hERG 易感性，也就是说，治疗剂量的 CA4P 具有导致 Tdp 发展的风险。本研究从动作电位和离子通道角度探讨 CA4P 致 QTc 间期延长方面

的不同作用机制和作用特点，结果发现低浓度和高浓度 CA4P 均可延长豚鼠心室肌细胞的 APD，这可能是该药引起 QTc 间期延长的原因。心脏快速延迟整流钾电流 (IKr) 是心肌细胞动作电位 3 期复极的主要电流，对此通道的抑制是延长 APD 的主要机制，天然表达的 IKr 电流幅值易受其他通道电流干扰很难成功记录，而 hERG 基因编码 IKr 的 α 亚基通过转染可稳定表达于 HEK293 细胞，由此建立的外源性表达系统可有效记录 IKr 电流，体外 IKr/hERG 通道检测目前已成为心血管安全性药物试验的重要部分。本研究通过采用 hERG-HEK293 细胞观察从低至高 5 个不同浓度 CA4P 对 HERG 通道电流均表现为抑制作用，并呈浓度相关性和电压相关性，此结果与对豚鼠心室肌细胞 APD 的作用一致，表明 CA4P 对 APD 的作用主要是通过抑制 IKr 产生，也因此说明 CA4P 具有诱发 QT 间期延长的风险，这一结果与多项临床试验观察结果相同，即 CA4P 可延长心电图 QTc 间期。

众所周知，QTc 延长程度与 Tdp 风险没有正相关性，特非那定延长 QTc 间期 5~10 ms 即可引起 Tdp，直接导致其退出市场^[14]。在临床研究中如患者合并其他心血管问题，如心绞痛、心肌梗死、心律失常等复杂相关疾病时，一般会作为排除标准，因此，尽管 CA4P 在临床试验中尚无关于 Tdp 病例的发生，但由于 QTc 间期延长和对 Tdp 的潜在风险，特别是对于老年患者、复杂疾病患者，仍然需要密切的心电图监测，尤其使用高剂量时还应注意于其他药物间的相互作用^[15]。

综上所述，药物阻断 hERG 心肌钾通道已被列为评价心脏安全性的重要指标，本研究作为首次针对 CA4P 药物的体外细胞学电生理机制研究证明 CA4P 可延长 APD，抑制 hERG 通道电流。

参考文献

- [1] Greene L M, Meegan M J, Zisterer D M. Combretastatins: more than just vascular targeting agents? [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2015, 355(2): 212-227.
- [2] Liang W, Ni Y, Chen F. Tumor resistance to vascular disrupting agents: mechanisms, imaging, and solutions [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(13): 15444-15459.
- [3] Mohammed A A, El-Shentenawy A. Advanced thyroid cancers: new era of treatment [J]. *Med Oncol*, 2014, 31(7): 49.
- [4] Jaroch K, Karolak M, Górski P, et al. Combretastatins: in

- vitro*, structure-activity relationship, mode of action and current clinical status [J]. *Pharmacol Rep*, 2016, 68(6): 1266-1275.
- [5] Chase D M, Chaplin D J, Monk B J. The development and use of vascular targeted therapy in ovarian cancer [J]. *Gynecol Oncol*, 2017, 145(2): 393-406.
- [6] De Ponti F, Poluzzi E, Cavalli A, *et al.* Safety of non-antiarrhythmic drugs that prolong the QT interval or induce torsade de pointes: an overview [J]. *Drug Saf*, 2002, 25(4): 263-286.
- [7] Kraushaar U, Meyer T, Hess D, *et al.* Cardiac safety pharmacology: from human ether-a-gogo related gene channel block towards induced pluripotent stem cell based disease models [J]. *Expert Opin Drug Saf*, 2012, 11(2): 285-298.
- [8] Walsh K B. Targeting cardiac potassium channels for state-of-the-art drug discovery [J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2015, 10(2): 157-169.
- [9] Rustin G J, Shreeves G, Nathan P D, *et al.* A Phase Ib trial of CA4P (combretastatin A-4 phosphate), carboplatin, and paclitaxel in patients with advanced cancer [J]. *Br J Cancer*, 2010, 102(9): 1355-1360.
- [10] Dowlati A, Robertson K, Cooney M, *et al.* A phase I pharmacokinetic and translational study of the novel vascular targeting agent combretastatin a-4 phosphate on a single-dose intravenous schedule in patients with advanced cancer [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(12): 3408-3416.
- [11] Redfern W S, Carlsson L, Davis A S, *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.
- [12] He X, Li S, Huang H, *et al.* A pharmacokinetic and safety study of single dose intravenous combretastatin A4 phosphate in Chinese patients with refractory solid tumours [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2011, 71(6): 860-870.
- [13] Hazell L, Raschi E, De Ponti F, *et al.* Evidence for the hERG liability of antihistamines, antipsychotics, and anti-infective agents: a systematic literature review from the ARITMO project [J]. *J Clin Pharmacol*, 2017, 57(5): 558-572.
- [14] Pratt C M, Ruberg S, Morganroth J, *et al.* Dose-response relation between terfenadine (Seldane) and the QTc interval on the scalar electrocardiogram: distinguishing a drug effect from spontaneous variability [J]. *Am Heart J*, 1996, 131(3): 472-480.
- [15] Wisniewska B, Tylutki Z, Wyszogrodzka G, *et al.* Drug-drug interactions and QT prolongation as a commonly assessed cardiac effect - comprehensive overview of clinical trials [J]. *BMC Pharmacol Toxicol*, 2016, 17: 12.