不同温度条件对药物作用于钠通道 Nav1.5 的比较研究

杜春燕[1,2#]，张玉卿[1,2#]，邢红艳[2]，赵　琪[2]，张艺哲[2]，汪溪洁[1,2*]
（1. 中国医药工业研究总院，上海 201203；2. 上海益诺思生物技术股份有限公司，上海 201203）

摘要：由于一些离子通道药物作用具有温度敏感性，测试温度可能是其安全性评价的重要影响因素。该研究在不同温度（29、33、35 和 37 ℃）条件下比较研究了药物对电压门控钠通道（Nav1.5）的作用。采用全细胞膜片钳技术记录不同温度下，温度敏感性药物（美西律、奎尼丁和雷诺嗪）作用于 Nav1.5- 人胚肾（HEK）293 细胞后钠通道电流（I_{Na}）的变化，考察温度对 I_{Na} 的浓度依赖性和上述药物半数抑制浓度（IC_{50}）的影响。结果显示，美西律、奎尼丁和雷诺嗪在不同温度（29、33、35 和 37 ℃）条件下均能浓度依赖性地抑制 I_{Na}；与 29 ℃相比，上述药物在 35 ℃条件下对 I_{Na} 的抑制作用更加显著。该研究评价了 4 种温度条件下 3 种药物对 Nav1.5 的影响，有助于提高药物临床前心脏毒性筛选和评价的准确性，为 GLP 机构开展离子通道药物评价试验提供了参考。

关键词：美西律；奎尼丁；雷诺嗪；温度敏感性；全细胞膜片钳；电压门控钠通道（Nav1.5）；人胚肾（HEK）293 细胞
中图分类号：R963　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2023)11-1614-10
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2023.11.011

Comparison Study of Effects Induced by Drugs on Sodium Channel Nav1.5 under Different Temperature Conditions

DU Chunyan[1,2#], ZHANG Yuqing[1,2#], XING Hongyan[2], ZHAO Qi[2], ZHANG Yizhe[2], WANG Xijie[1,2*]
(*1. China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203; 2. Shanghai InnoStar Bio-Tech Co., Ltd., Shanghai 201203*)

ABSTRACT: Due to the temperature sensitivity of some ion channel drugs, the testing temperature might be an important influencing factor in their safety evaluation. Therefore, this study compared the effects of some drugs on the voltage-gated sodium channel (Nav1.5) under different temperature (29, 33, 35, and 37 ℃)] conditions. The whole-cell patch clamp technique was used to record the changes in sodium channel current (I_{Na}) after the temperature-sensitive drugs (mexiletine, quinidine, and ranolazine) functioned on Nav1.5-human embryonic kidney (HEK) 293 cells at different temperatures. The study investigated the influence of temperature on the concentration-dependence of I_{Na} and the half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of the aforementioned drugs. The results showed that mexiletine, quinidine, and ranolazine could inhibit I_{Na} in a concentration-dependent manner at different temperatures (29, 33, 35, and 37 ℃). Compared to 29 ℃, the inhibitory effects of these drugs on I_{Na} was more significant at 35 ℃. This study evaluated the effects of three drugs on the sodium channel Nav1.5 under four temperature conditions, which was benefit to improve the accuracy of preclinical cardiac toxicity screening and evaluation of drugs, providing a reference for GLP institutions to conduct ion channel drug evaluation tests.

Key Words: mexiletine; quinidine; ranolazine; temperature sensitivity; whole cell patch clamp; voltage-gated sodium channel (Nav1.5); human embryonic kidney 293 cells

尖端扭转型室性心动过速（torsade de points，TdP）是一种特殊的快速性室性心动过速，其心电图（electrocardiogram，ECG）特点为“尖端”围绕基线反复扭转[1]。诱发 TdP 的机制被普遍认为与人类 ether-a-go-go 相关基因（human ether-a-go related

#对文章贡献等同
收稿日期：2023-01-03
作者简介：杜春燕（1998—），女，硕士研究生，专业方向：药物的心脏毒性。
张玉卿（1999—），女，硕士研究生，专业方向：药物的心脏毒性。
通信作者：汪溪洁（1979—），女，研究员，博士生导师，从事药物心脏毒性和神经毒性研究。
E-mail：xjwang@innostar.cn

gene，hERG）编码的钾通道电流减弱有关[2]。此外，有研究[3—4]表明，Tdp的病理生理学机制可能是多种离子通道［如电压门控钠通道（Nav1.5）、电压门控钙通道（Cav1.2）以及电压门控钾通道］异常，影响了心脏细胞的复极时程，进而诱发TdP等一系列心律失常。2013年，心脏安全研究协会（Cardiac Safety Research Consortium，CSRC）、健康和环境科学研究所（Health and Environmental Sciences Institute，HESI）和美国FDA共同提出了一项药物心脏安全性评价规范——综合性离体致心律失常风险评估（comprehensive *in vitro* proarrhythmia assay，CiPA）[5]。CiPA提出有7种主要的离子通道电流，I_{Na}、I_{NaL}、I_{CaL}、I_{to}、I_{Kr}、I_{Ks}、I_{K1}，参与了心脏复极化过程[6]。其中，Nav1.5参与Na^+快速进入心肌细胞、引起动作电位快速上升的过程[7]，在QT间期延长的过程中扮演重要角色，与药物致死率密切相关；这也使其成为药物临床前体外心脏毒性评价中必要的补充项目。

目前，临床前体外心脏毒性评价方法多数是对人胚肾（HEK）293细胞hERG钾通道进行全细胞膜片钳试验[8]，但hERG钾通道检测存在一定的局限性，单纯的hERG阻滞特异性不高且存在假阳性或假阴性结果[9]。2022年，ICH发布了E14/S7B《非抗心律失常药致QT/QTc间期延长及潜在致心律失常作用的临床与非临床评价问答》[10]，提出在采用膜片钳方法和过表达细胞系评估影响心脏离子电流的药物效能时，应重点考虑温度因素，因为一些药物效应具有温度敏感性，且目前尚无方法可预测哪些分子表现出温度依赖性效应和效应幅度。因此，本研究拟在前期成功建立并应用的生理温度下hERG钾通道评价方法的基础上，采用已知的钠通道阻滞剂［美西律（mexiletine，**1**）、奎尼丁（quinidine，**2**）、雷诺嗪（ranolazine，**3**）］为模型药物，建立不同温度（29、33、35和37 ℃）条件下Nav1.5评价方法，以满足药物心脏毒性体外评价的需求，为药物临床前安全性评价的进一步完善提供参考。

1 仪器与试药

Nanion Patchliner型8通道全自动膜片钳、膜片钳放大器（德国Nanion Technologies公司）；371型二氧化碳培养箱、ST16R型台式离心机（美国Thermo公司）；IX71型倒置显微镜（日本Olympus公司）；BSC-1600IIA2型生物安全柜［苏洁医疗器械（苏州）有限公司］；MS205DU电子天平（瑞士Mettler Toledo公司）。

1盐酸盐（规格25 g，批号BCCB6374）、**2**（规格10 g，批号BCBH7493V）均购自美国Sigma-Aldrich公司；**3**［阿拉丁试剂（上海）有限公司，规格500 mg，批号P2044414］；高糖改良Eagle培养基（DMEM）、磷酸盐缓冲液（PBS）、青-链霉素、遗传霉素（geneticin，G-418）和Accutase细胞消化液均购自美国Gibco公司；胎牛血清（FBS，以色列Biological Industries公司）；二甲基亚砜（DMSO，国药集团化学试剂有限公司）；细胞外液、钠电极内液、封接液均购自德国Nanion Technologies公司。

外源转染表达Nav1.5的人胚肾细胞（Nav1.5-HEK293稳态细胞）由香港大学馈赠。

2 方法与结果

2.1 溶液配制和Nav1.5-HEK293稳态细胞培养

细胞外液成分/（$mmol\cdot L^{-1}$）：NaCl 140，KCl 4.5，$MgCl_2$ 1，$CaCl_2$ 2，4-（2-羟乙基）-1-哌嗪乙磺酸（HEPES）10，葡萄糖10；用2 mmol/L氢氧化钠溶液调至pH 7.2～7.4。

钠电极内液成分/（$mmol\cdot L^{-1}$）：NaCl 10，CsCl 50，HEPES 10，乙二醇-双-（2-氨基乙醚）四乙酸（EGTA）20，CsF 60，用2 mmol/L氢氧化铯溶液调至pH 7.2～7.4。

封接液成分/（$mmol\cdot L^{-1}$）：NaCl 130，KCl 4，$MgCl_2$ 1，$CaCl_2$ 10，HEPES 5，葡萄糖5。

细胞培养：取对数生长期Nav1.5-HEK293稳态细胞，于37 ℃，5% CO_2的培养箱中培养，培养基为DMEM（含10% FBS，10 000 u/mL青-链霉素）。使用时取样在显微镜下观察，可见色泽较亮、无明显漂浮细胞的Nav1.5-HEK293稳态细胞。Nav1.5-HEK293稳态细胞经PBS清洗、Accutase细胞消化液消化，再用含1.2 mg/mL G-418的DMEM-10培养液终止消化；然后于20 ℃离心（110 ×*g*），去上清，加入细胞外液1 mL使细胞重悬，转移至全细胞膜片钳细胞槽。

2.2 全细胞膜片钳试验

Nav1.5 电流（I_{Na}）的刺激程序：钳制电位为 －80 mV，从 －120 mV 去极化到 －20 mV。时程为 200 ms，然后复极化到 －120 mV。

由 Patchcontrol HT 2.04.03 软件控制 8 通道全自动膜片钳工作站，设置温度为 29、33、35 和 37 ℃，采用 Patchmaster v2x90.5 软件通过 EPC-10 系列放大器在电脑上采集和存储 I_{Na} 数据，待电流稳定后依次加入阴性对照物（含 0.3% DMSO 的细胞外液或细胞外液）、药物（低、中、次高、高浓度）。

使用 Igor、IBM SPSS Statistics 21、Microsoft Excel 2019 软件统计分析所得试验数据，并用 Igor 和 Graphpad Prism 8 软件作图。试验数据采用单因素方差分析（ANOVA）和 *t* 检验进行数据统计，$P \leqslant 0.05$ 或 0.01 表示具有显著性差异或极显著性差异。

2.3 不同温度条件下 **1** 对 Nav1.5 的作用

采用“**2.2**”项下方法考察不同温度条件下 **1** 对 Nav1.5 的作用。

2.3.1 溶液配制

1 贮备液：称取 **1** 盐酸盐 43.14 mg 于玻璃瓶中，加细胞外液 2 mL，轻轻振荡溶解，配制成 100 mmol/L 的贮备液，用 2 mmol/L 氢氧化钠溶液调至 pH 7.2 ～ 7.4，分装为每支 100 μL，于 －20 ℃冰箱中保存备用。

1 工作液：取 100 mmol/L 的 **1** 贮备液 15 μL，置 15 mL 离心管中，用细胞外液定容至 5 mL，配制成 300 μmol/L 的最高浓度工作液；再用细胞外液逐级稀释，配制成 300、100、30 和 10 μmol/L 的 **1** 工作液。

2.3.2 试验结果

在 29、33、35 和 37 ℃下，记录到 Nav1.5-HEK293 细胞稳定的 I_{Na} 数据后，依次加入细胞外液、**1** 工作液（10、30、100、300 μmol/L），考察在不同温度条件下 I_{Na} 的浓度依赖性以及 **1** 的半数抑制浓度（IC_{50}）。结果（表 1、图 1）显示，在含 0.3% DMSO 的细胞外液对照组和 **1** 浓度为 10 μmol/L 的试验组中，温度对 I_{Na} 的影响不明显；而当 **1** 浓度≥ 30 μmol/L 时，在任一温度下，**1** 对 I_{Na} 的抑制作用均明显高于对照组，且呈浓度依赖性。经 Hill 方程拟合得到不同温度条件下 **1** 抑制 I_{Na} 的浓度 - 反应曲线（图 2），其在 29、33、35 和 37 ℃条件下对 I_{Na} 抑制作用的 IC_{50} 分别为（162.87±3.54）、（84.39±4.08）、（73.60±10.10）、（75.70±4.05）μmol/L，Hill 系数分别为 1.5、1.3、1.0、1.2，提示 **1** 对 Nav1.5 钠通道的作用位点可能不唯一。**1** 在 29、33、35 和 37 ℃条件下对 I_{Na} 的阻断作用具有显著性差异（$P \leqslant 0.05$），尤其 35 ℃条件下 **1** 对 Nav1.5-HEK293 细胞的 I_{Na} 的阻断作用强度更大，提示Ⅰ$_b$ 抗心律失常药物 **1** 为温度敏感性药物，温度影响 **1** 对 Nav1.5 的抑制作用。

2.4 不同温度条件下 **2** 对 Nav1.5 的作用

采用“**2.2**”项下方法考察不同温度条件下 **2** 对 Nav1.5 的作用。

2.4.1 溶液配制

2 贮备液：取 **2** 粉末 21.70 mg，加 DMSO 2 mL，轻轻振荡溶解，配制成 33.33 mmol/L 的贮备液，分装为每支 100 μL，于 －20 ℃冰箱中保存备用。

表 1 不同温度条件下 **1** 对钠电流的抑制率（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.1 Inhibition Rates of Sodium Current by **1** at Different Temperatures ($\bar{x}\pm s$, n=3)

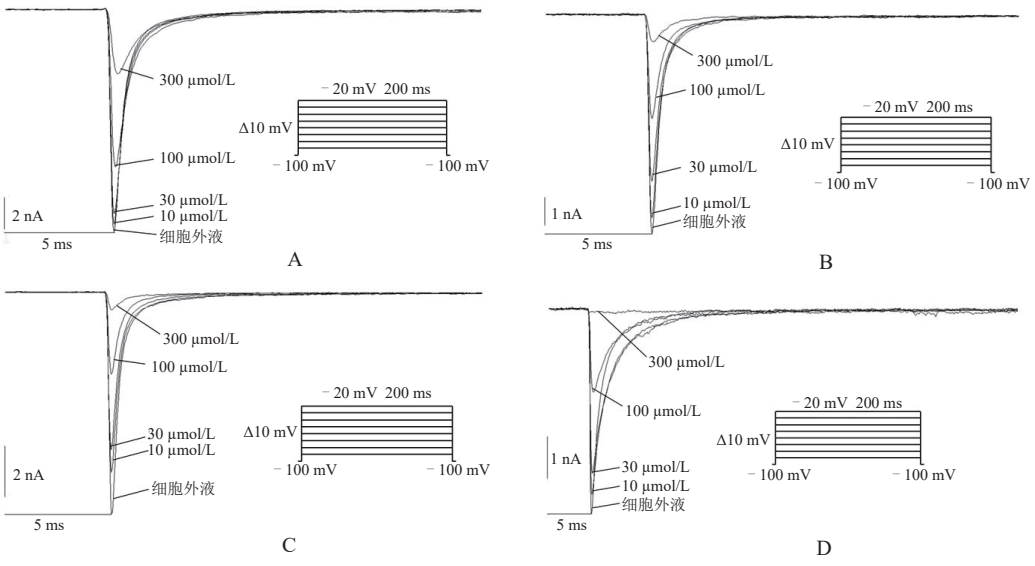
组别	**1**浓度/(μmol·L^{-1})	抑制率/%			
		29 ℃	33 ℃	35 ℃	37 ℃
含0.3% DMSO的细胞外液对照组	—	－0.30±1.10	－0.30±1.20	1.00±6.90	4.30±2.50
1试验组	10	0.70±2.10	4.30±3.80	17.30±4.00	9.70±2.90
1试验组	30	8.30±0.60$^{1)}$	23.30±4.50$^{2)}$	28.00±2.00$^{2)}$	23.00±4.60$^{1)}$
1试验组	100	32.00±3.00$^{2)}$	55.00±7.90$^{2)}$	54.00±9.50$^{2)}$	57.70±7.40$^{2)}$
1试验组	300	71.70±5.00$^{2)}$	82.30±9.90$^{2)}$	83.30±8.50$^{2)}$	86.70±8.60$^{2)}$

注：与细胞外液组相比，$^{1)}P \leqslant 0.05$，$^{2)}P \leqslant 0.01$。

2 工作液：取 **2** 贮备液 30 μL，置 15 mL 离心管中，加适量 DMSO 定容至 1 mL，配制成 1 mmol/L 的次级贮备液；再用细胞外液逐级稀释，配制成 300、100、30、10 μmol/L 的工作液。

2.4.2 试验结果

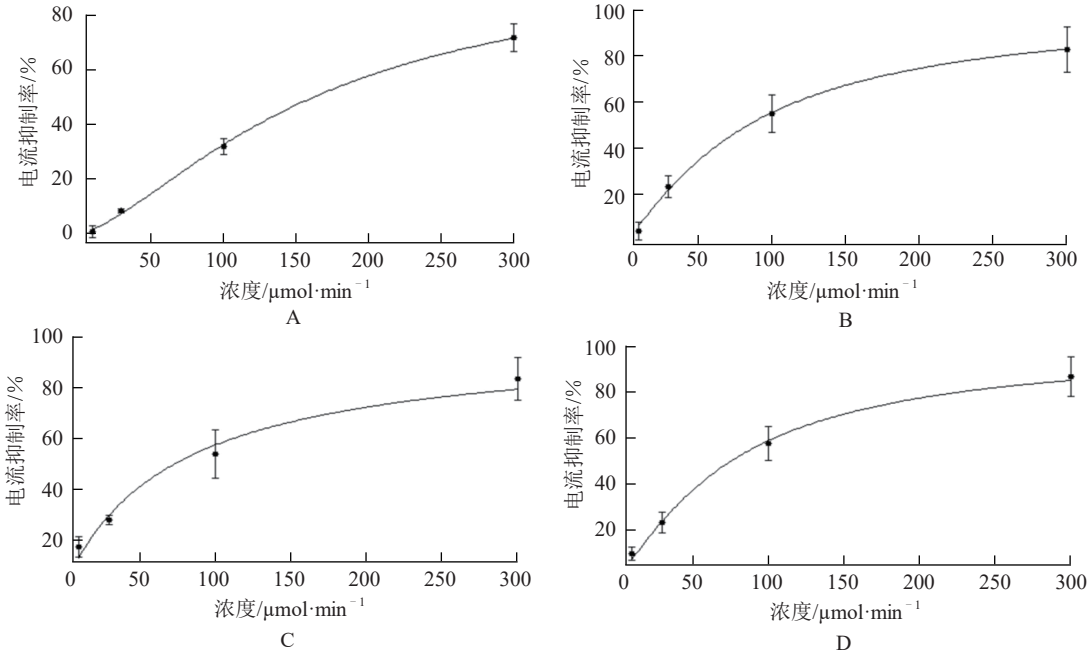
在 29、33、35 和 37 ℃ 条件下，记录到



A—29 ℃；B—33 ℃；C—35 ℃；D—37 ℃。

图 1 1 在不同温度下对 I_{Na} 的阻断作用（*n*=3）

Fig.1 Blocking Effect of **1** on I_{Na} at Different Temperatures (*n*=3)



A—29 ℃；B—33 ℃；C—35 ℃；D—37 ℃。

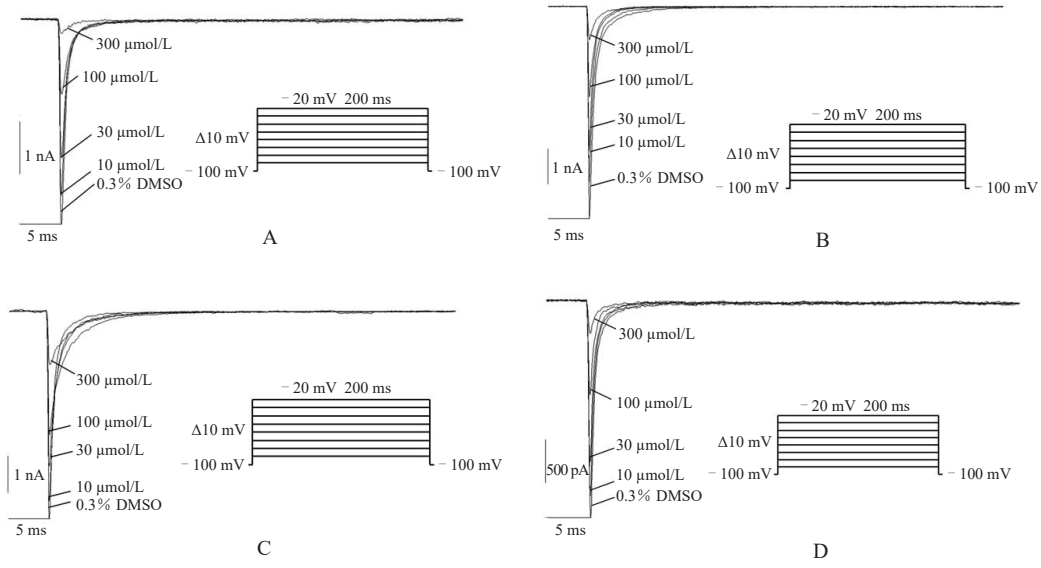
图 2 1 在不同温度下抑制 Nav1.5 的浓度 - 反应曲线（*n*=3）

Fig.2 Concentration-response Curves of **1** Inhibiting Sodium Channel Nav1.5 at Different Temperatures (*n*=3)

Nav1.5-HEK293 细胞稳定的钠电流 I_{Na} 数据后，依次加入 0.3% DMSO、**2**（10、30、100、300 μmol/L），考察 **2** 在不同温度条件下抑制 Nav1.5 电流作用的浓度依赖性以及 IC_{50}。结果（表 2）显示，在 29 ℃条件下，0.3% DMSO 和浓度为 10、30 μmol/L 的 **2** 对 I_{Na} 均无明显影响，而 **2** 浓度≥ 100 μmol/L 时可浓度依赖性地抑制 I_{Na}（图 3A）；在 33 和 37 ℃条件下，**2** 浓度≥ 30 μmol/L 时可浓度依赖性地抑制 I_{Na}（图 3B、3D）；在 35 ℃条件下，**2** 浓度≥ 10 μmol/L 时即可浓度依赖性地抑制 I_{Na}（图 3C）；经 Hill 方程拟合得到不同温度条件下 **2** 抑制 I_{Na} 的浓度 - 反应曲线（图 4），其在 29、33、35 和 37 ℃条件下对 I_{Na} 抑制作用的 IC_{50} 分别为（122.08±6.87）、（91.27±11.70）、（39.02±3.30）、（64.21±14.50）μmol/L，Hill 系数分别为 1.4、1.1、1.0、1.1，提示 **2** 对 Nav1.5 钠通道的作用位点可能不唯一。与 29 ℃相比，**2** 在 35 和 37 ℃条件下对 I_{Na} 的阻断作用显著增强（$P \leqslant 0.01$），29 ℃下测得的 IC_{50} 约为 35 ℃下测得的 3 倍，提示 Ⅰ$_a$ 抗心律失常药物 **2** 为温度敏感性药物，温度会影响 **2** 对 Nav1.5 的抑制作用。

2.5　不同温度条件下 **3** 对 Nav1.5 的作用

采用“**2.2**”项下方法考察不同温度条件下 **3** 对



A—29 ℃；B—33 ℃；C—35 ℃；D—37 ℃。

图 3　2 在不同温度下对 I_{Na} 的阻断作用（n=3）

Fig.3　Blocking Effect of **2** on I_{Na} at Different Temperatures（n=3）

表 2　不同温度条件下 2 对钠电流的抑制率（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.2　Inhibition Rate of Sodium Current by **2** at Different Temperatures（$\bar{x}\pm s$, n=3）

组别	**2**浓度/(μmol·L^{-1})	抑制率/%			
		29 ℃	33 ℃	35 ℃	37 ℃
含0.3% DMSO的细胞外液对照组	—	1.30±5.10	− 0.30±2.50	− 4.00±6.10	2.70±5.50
2试验组	10	5.30±1.50	12.30±7.60	22.30±4.90[1)]	16.30±7.10
2试验组	30	15.70±2.10	22.30±4.90[1)]	42.70±2.10[1)]	31.00±4.60[1)]
2试验组	100	41.00±2.00[1)]	48.70±4.50[1)]	69.70±4.00[1)]	54.30±5.10[1)]
2试验组	300	78.70±4.20[1)]	83.00±1.00[1)]	91.70±3.20[1)]	93.00±5.30[1)]

注：与 0.3% DMSO 相比，[1)]$P \leqslant 0.01$。

Nav1.5 的抑制作用。

2.5.1 溶液配制

3 贮备液：称取 **3** 28.50 mg，加 DMSO 2 mL，轻轻振荡溶解，配制成 33.33 mmol/L 的贮备液，分装为每支 100 μL，于 －20 ℃冰箱中保存备用。

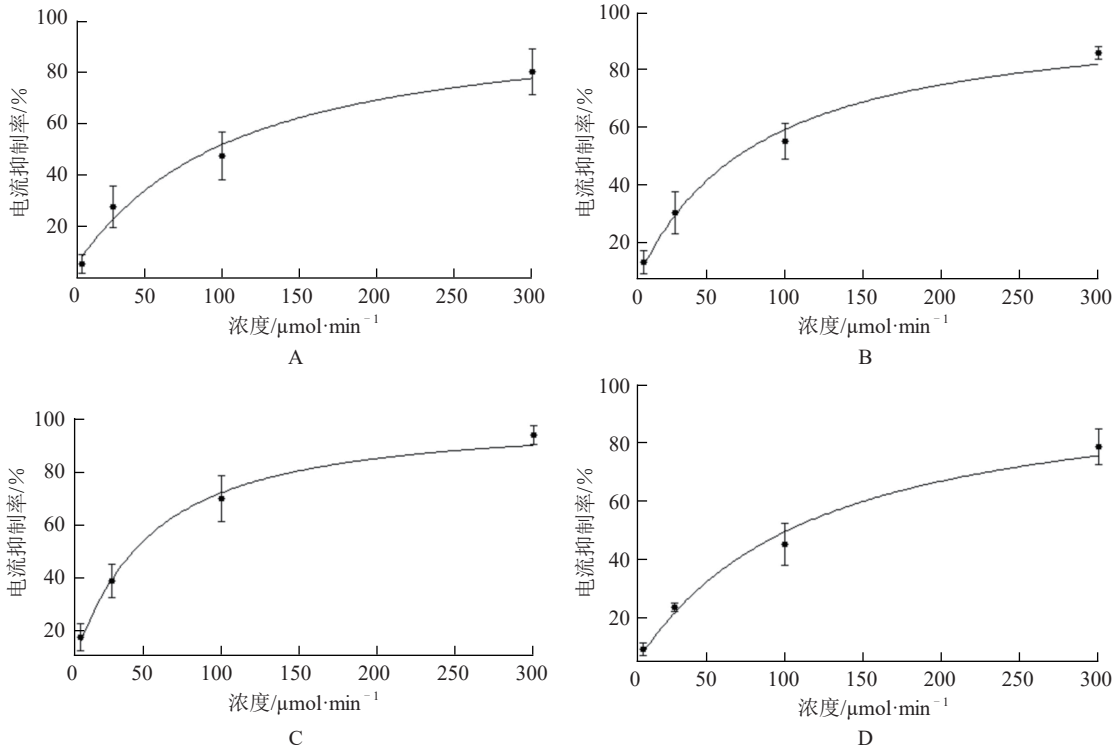
3 工作液：取 **3** 贮备液 30 μL，置 15 mL 离心管中，加 DMSO 定容至 1 mL，配制成 1 mmol/L 的次级贮备液；再用细胞外液逐级稀释，配制 300、100、30、10 μmol/L 的 **3** 工作液。

2.5.2 试验结果

在 29、33、35 和 37 ℃条件下，记录到 Nav1.5-HEK293 细胞稳定的 I_{Na} 数据后，依次加入 0.3 % DMSO、**3**（10、30、100、300 μmol/L），考察 **3** 在不同温度条件下 I_{Na} 的浓度依赖性以及 **3** 的 IC_{50}。结果（表 3，图 5）显示，在不同温度条件下，0.3% DMSO 和 10 μmol/L 的 **3** 对 I_{Na} 均无明显影响；当 **3** 浓度≥ 30 μmol/L 时，在任一温度下均可抑制 I_{Na}，且呈浓度依赖性。经 Hill 方程拟合得到不同温度条件下 **3** 抑制 I_{Na} 的浓度 - 反应曲线（图 6），其在 29、33、35 和 37 ℃条件下对 I_{Na} 抑制作用的 IC_{50} 分别为（94.20±13.20）、（69.81±7.93）、（43.75±3.70）、（103.43±11.10）μmol/L，Hill 系数分别为 1.1、1.0、1.1、1.0，提示 **3** 对 Nav1.5 钠通道的作用位点可能不唯一。与 29 ℃相比，**3** 在 35 ℃条件下对 I_{Na} 的阻断作用差异具有显著性（$P \leqslant 0.01$），29 ℃下测得的 IC_{50} 约为 35 ℃下测得的 2 倍，提示 I_d 抗心律失常药物 **3** 为温度敏感性药物，温度可以影响 **3** 对 Nav1.5 的抑制作用。

3 讨论

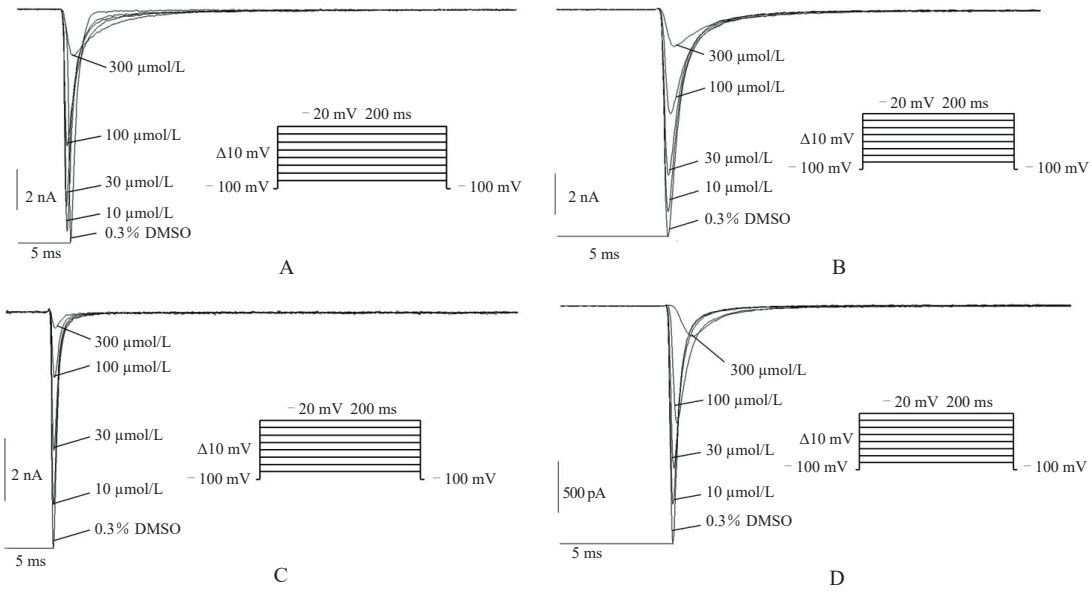
电压门控性钠电流参与心脏传导和起搏器速率的调节[11—12]，其基本功能包括激活、失活和失活后恢复[13]。心脏中常见的钠通道是由 *SCN5A* 编码的 Nav1.5[7]，是评价药物对离子通道影响的重要研究对象。然而，国内药品非临床研究质量管理规范



A—29 ℃；B—33 ℃；C—35 ℃；D—37 ℃。

图 4 2 在不同温度下抑制 Nav1.5 的浓度 - 反应曲线（*n*=3）

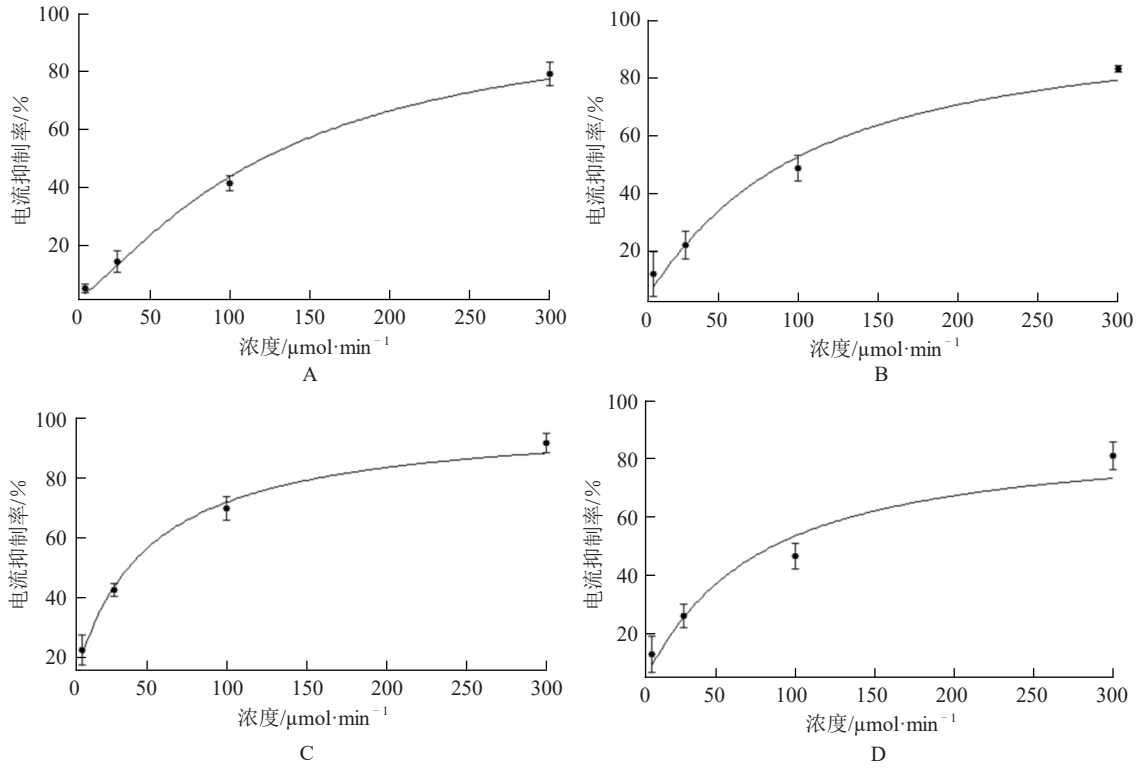
Fig.4 Concentration-response Curve of **2** Inhibiting Nav1.5 Sodium Channels at Different Temperatures（*n*=3）



A—29 ℃；B—33 ℃；C—35 ℃；D—37 ℃。

图 5　3 在不同温度下对 I_{Na} 的阻断作用（*n*=3）

Fig.5　Blocking Effect of **3** on I_{Na} at Different Temperatures (*n*=3)



A—29 ℃；B—33 ℃；C—35 ℃；D—37 ℃。

图 6　3 在不同温度下抑制 Nav1.5 的浓度 - 反应曲线（*n*=3）

Fig.6　Concentration-response Curve of **3** Inhibiting Nav1.5 Sodium Channels at Different Temperatures (*n*=3)

表 3 不同温度条件下 3 对 I_{Na} 的抑制率（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.3 Inhibition Rates of I_{Na} by **3** at Different Temperatures ($\bar{x}\pm s$, n=3)

组别	**3**浓度/(μmol·L^{-1})	抑制率/%			
		29 ℃	33 ℃	35 ℃	37 ℃
含0.3% DMSO的细胞外液对照组	—	－1.30±3.80	4.00±4.60	3.70±4.20	0.70±6.00
3试验组	10	5.30±3.50	13.70±4.20	17.30±4.90	9.30±2.30
3试验组	30	27.70±8.10[1)]	30.70±7.10[1)]	38.70±6.50[1)]	23.70±1.50[1)]
3试验组	100	47.30±9.30[1)]	55.00±6.20[1)]	70.00±8.50[1)]	45.00±7.00[1)]
3试验组	300	80.00±8.90[1)]	85.70±2.10[1)]	94.00±3.60[1)]	78.30±6.00[1)]

注：与 0.3% DMSO 组相比，[1)]$P\leqslant 0.01$。

（Good Laboratory Practice of Drug，GLP）机构在药物体外心脏毒性评价中针对 Nav1.5 钠通道的研究很少，且不同实验室、GLP 机构可能会因钳制电压、刺激程序，尤其是测试温度等因素导致试验结果差异很大。EL-BATTRAWY 等[14]报道的一项热疗对钠通道阻滞剂的研究中，人诱导多能干细胞分化的心肌细胞在生理温度（36 ℃）和发热温度（40 ℃）下，电压门控性钠通道的稳态激活、失活以及失活后恢复无显著性差异（P>0.05），然而与室温条件相比，温度低于 37 ℃时测得的 I_{Na} 峰值以及失活后恢复时间常数有显著性差异（P<0.05），说明钠通道门控动力学的温度依赖性变化可能发生于低于 37 ℃的一定范围内。此外，已知钠通道的门控动力学在非生理范围内对温度敏感[15—16]。基于此，本研究建立了一种在 29、33、35 和 37 ℃下评价 Nav1.5 钠通道的方法。

2 是一种非选择性钠通道阻滞剂，为Ⅰa类抗心律失常药物，临床用于预防特发性室颤、Brugada 综合征、短 QT 综合征及早复极综合征患者多形性室速 / 室颤的复发[17]。《2020 美国心脏协会科学声明：药物性心律失常》[18]中指出，**2** 可能加剧窦性心动过缓或房室传导阻滞，其原因和机制普遍认为与离子通道阻滞有关。**2** 在较低浓度时是一种对 hERG 具有高亲和力的多离子通道阻滞剂，较高浓度时也可抑制电压门控钠通道和 Cav1.2。文献[19]显示，**2** 在室温条件下对 Nav1.5 钠通道阻滞作用的 IC_{50} 值为 51.28 μmol/L。本研究在 29、33、35 和 37 ℃条件下测得 **2** 对 I_{Na} 抑制作用的 IC_{50} 分别为（122.08±6.87）、（91.27±11.70）、（39.02±3.30）、（64.21±14.50）μmol/L。29 ℃下测得的 IC_{50} 约为 35 ℃的 3 倍（P<0.05），**2** 不仅浓度依赖性地抑制 I_{Na} 且具有一定的温度依赖性，与文献报道有差异可能是由于不同实验室电生理溶液或者电流刺激程序不同导致的。Ⅰa类抗心律失常药物在不同温度条件下对 Nav1.5 电流的作用略有差异，提示临床前评价可建议在 35 ℃条件下测定 **2** 对 I_{Na} 的作用，这样可以更准确地反映其在人体内对 Nav1.5 的作用。

1 是一种非选择性的电压门控钠通道阻滞剂，为Ⅰ$_b$类抗心律失常药物，主要用于治疗室性心律失常[20]。最新研究显示其在与电压门控钠通道功能障碍相关的疾病治疗方面有潜在的价值，例如神经性疼痛[21]、强直综合征[22]和 Timothy 综合征[23]等。临床试验研究[24]也显示高剂量的 **1** 会引起低血压和房室性心脏传导阻滞等不良反应。有研究[25]表明，**1** 也可降低人诱导多能干细胞分化的心肌细胞（human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocyte，hiPSC-CM）动作电位的上行速度并阻断 hERG 通道。将 hiPSC-CM 暴露于 10 μmol/L **1** 后，尖峰幅度显著降低（70.0±3.7）%，节拍率降低（38.0±4.2）%。在一项兔离体心室楔的体内试验[26]中，**1** 抑制 hNav1.5 通道的 IC_{50} 为 67.20 μmol/L。本试验在 29、33、35 和 37 ℃条件下测得的 **1** 对 Nav1.5 I_{Na} 抑制作用的 IC_{50} 分别为（162.87±3.54）、（84.39±4.08）、（73.60±10.10）、（75.70±4.05）μmol/L。经 ANOVA 检验，不同温度条件下 **1** 对钠通道的阻滞作用存在显著性差异（P<0.05），尤其 35 ℃条件下抑制作用更强烈，表明 **1** 对 I_{Na} 的阻滞作用不仅有浓度依赖性，还存在温度依赖性，对于此类温度

敏感性药物的临床前安全性评价，建议在 35 ℃条件下研究药物对细胞过表达离子通道的作用，以更准确、更真实地反映药物在人体内是否阻断心脏钠通道。

此外，**3** 也是一种具有抗心绞痛和抗心律失常的 Nav1.5 拮抗药[27]。研究[14]表明，在发热温度（如 40 ℃）下，温度升高能降低 **3** 对峰值 I_{Na} 的抑制作用，正如本研究中 37 ℃相较于 35 ℃，抑制作用减弱，但 29 ℃下测得的 **3** 对 Nav1.5-HEK293 细胞的半数抑制浓度是 35 ℃下的 2 倍左右，提示温度也对 **3** 作用钠通道有影响。

综上所述，药物对 Nav1.5 钠通道的作用会因温度的变化而产生差异，对于温度敏感性药物，29 ℃条件下测定的 IC_{50} 值普遍偏高。因此，GLP 实验室中，在接近生理温度的条件下对 Nav1.5 进行膜片钳技术将更有利于模拟人体温度对温度敏感性药物进行体外评价。为保证数据的科学性、合理性和准确性，后续工作将采用更多的温度敏感性药物，进一步验证此方法的准确性和重复性，此外也会针对温度导致药物作用于 Nav1.5 的差异进行机制探索，进一步研究温度对药物作用钠通道的激活、失活以及失活后恢复的影响。

参考文献：

[1] DESSERTENNE F. La tachycardie ventriculaire a deux foyers opposes variables [J]. *Arch Mal Coeur*, 1966, **59**: 263-272.

[2] 胡晓敏, 张子腾, 宗　英, 等. 心脏安全药理学评价新策略——CiPA [J]. 中国新药杂志, 2016, **25**(17): 1939-1945.

[3] KRAMER J, HIMMEL H M, LINDQVIST A, *et al*. Cross-site and cross-platform variability of automated patch clamp assessments of drug effects on human cardiac currents in recombinant cells [J]. *Sci Rep*, 2020, **10**(1): 5627.

[4] 曲云鹏, 刘　洋, 张春鹏, 等. 尖端扭转型室性心动过速的机制及危险因素的研究进展[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2019, **11**(1): 124-125.

[5] STRAUSS D G, GINTANT G, LI Z H, *et al*. Comprehensive *in vitro* proarrhythmia assay (CiPA) update from a cardiac safety research consortium/health and environmental sciences institute/FDA meeting [J]. *Ther Innov Regul Sci*, 2019, **53**(4): 519-525.

[6] PARK J S, JEON J Y, YANG J H, *et al*. Introduction to in silico model for proarrhythmic risk assessment under the CiPA initiative [J]. *Transl Clin Pharmacol*, 2019, **27**(1): 12-18.

[7] NGUYEN P T, DEMARCO K R, VOROBYOV I, *et al*. Structural basis for antiarrhythmic drug interactions with the human cardiac sodium channel [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, **116**(8): 2945-2954.

[8] BRINKWIRTH N, TAKASUNA K, DOI M, *et al*. Reliable identification of cardiac liability in drug discovery using automated patch clamp: benchmarking best practices and calibration standards for improved proarrhythmic assessment [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2020, **105**: 106884.

[9] RIDDER B J, LEISHMAN D J, BRIDGLAND-TAYLOR M, *et al*. A systematic strategy for estimating hERG block potency and its implications in a new cardiac safety paradigm [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2020, **394**: 114961.

[10] ICH. ICH E14/S7B Implementation Working Group Clinical and Nonclinical Evaluation of QT/QTc Interval Prolongation and Proarrhythmic Potential Questions and Answers E14/S7B Q&As [EB/OL]. (2022-02-22) https://database. ich. org/sites/default/files/E14-S7B_QAs_Step4_2022_0221. pdf.

[11] PARK D S, FISHMAN G I. Nav-igating through a complex landscape: SCN10A and cardiac conduction [J]. *J Clin Invest*, 2014, **124**(4): 1460-1462.

[12] LEI M, ZHANG H G, GRACE A A, *et al*. SCN5A and sinoatrial node pacemaker function [J]. *Cardiovasc Res*, 2007, **74**(3): 356-365.

[13] WANG Y, MI J X, LU K, *et al*. Comparison of gating properties and use-dependent block of Nav1.5 and Nav1.7 channels by anti-arrhythmics mexiletine and lidocaine [J]. *PLoS One*, 2015, **10**(6): e0128653.

[14] EL-BATTRAWY I, LANG S, ZHAO Z H, *et al*. Hyperthermia influences the effects of sodium channel blocking drugs in human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes [J]. *PLoS One*, 2016, **11**(11): e0166143.

[15] KELLER D I, ROUGIER J S, KUCERA J P, *et al*. Brugada syndrome and fever: genetic and molecular characterization of patients carrying SCN5A mutations [J]. *Cardiovasc Res*, 2005, **67**(3): 510-519.

[16] AMIN A S, VERKERK A O, BHUIYAN Z A, *et al*. Novel Brugada syndrome-causing mutation in ion-conducting

pore of cardiac Na^+ channel does not affect ion selectivity properties［J］. *Acta Physiol Scand*, 2005, **185**(4): 291-301.

［17］ 中华医学会心电生理和起搏分会, 中国医师协会心律学专业委员会. 2020室性心律失常中国专家共识解读[J]. 中华心律失常学杂志, 2020, **24**(4): 348-350.

［18］ TISDALE J E, CHUNG M K, CAMPBELL K B, *et al*. Drug-induced arrhythmias: a scientific statement from the American Heart Association［J］. *Circulation*, 2020, **142**(15): e214-e233.

［19］ WANG C, WANG H, XIAO J H, *et al*. Inhibitory effects of neferine on Nav1.5 channels expressed in HEK293 cells［J］. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2016, **36**(4): 487-493.

［20］ MUGNAI G, PAOLINI C, CAVEDON S, *et al*. Mexiletine for ventricular arrhythmias in patients with chronic coronary syndrome: a cohort study［J］. *Acta Cardiol*, 2022, **77**(3): 264-270.

［21］ AMANITI A, SARDELI C, FYNTANIDOU V, *et al*. Pharmacologic and non-pharmacologic interventions for HIV-Neuropathy pain. A systematic review and a meta-analysis［J］. *Medicina* (Kaunas), 2019, **55**(12): 762.

［22］ CASALE R, ATZENI F, SARZI-PUTTINI P. The therapeutic approach to complex regional pain syndrome: light and shade［J］. *Clin Exp Rheumatol*, 2015, **33**(88): S126-S139.

［23］ HERMIDA A, JEDRASZAK G, KUBALA M, *et al*. Long-term follow-up of a patient with type 2 Timothy syndrome and the partial efficacy of mexiletine［J］. *Gene*, 2021, **777**: 145465.

［24］ LEE H S, KIM N Y, KIM J. A fatal case of mexiletine intoxication in a 25-year-old Korean man［J］. *Forensic Toxicol*, 2020, **38**(2): 517-522.

［25］ ZWARTSEN A, DE KORTE T, NACKEN P, *et al*. Cardiotoxicity screening of illicit drugs and new psychoactive substances (NPS) in human iPSC-derived cardiomyocytes using microelectrode array (MEA) recordings［J］. *J Mol Cell Cardiol*, 2019, **136**: 102-112.

［26］ HEATH B M, CUI Y, WORTON S, *et al*. Translation of flecainide- and mexiletine-induced cardiac sodium channel inhibition and ventricular conduction slowing from nonclinical models to clinical［J］. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2011, **63**(3): 258-268.

［27］ ROUHANA S, VIRSOLVY A, FARES N, *et al*. Ranolazine: an old drug with emerging potential; lessons from pre-clinical and clinical investigations for possible repositioning［J］. *Pharmaceuticals* (Basel), 2021, **15**(1): 31.