

· 论著 ·

手动膜片钳检测 HMS-01 对 HEK293 细胞 hERG 通道电流的影响

张慧敏, 向科发, 史小飞, 秦臻, 刘霞 (海军军医大学药学院临床药学教研室, 上海 200433)

[摘要] 目的 检测新化合物 HMS-01 有无心脏毒性, 对其进行临床前安全评价研究, 为进入临床试验做准备。方法 用手动膜片钳检测转染后 hERG 钾通道稳定表达的 HEK293 细胞的电流, 西沙必利做阳性药, 将 HMS-01 依次稀释成 0.3、1、3、10、30 $\mu\text{mol/L}$, 依次作用于细胞, 记录电流变化, 计算抑制率。结果 HMS-01 在实验设计的最高浓度 30 $\mu\text{mol/L}$ 时, 对细胞 hERG 钾通道的抑制率低于 30%, 与阳性对照药西沙必利相比, 无明显抑制作用。结论 新化合物 HMS-01 对 hERG 通道无明显抑制作用, 不具有心脏毒性。

[关键词] 手动膜片钳; HEK293 细胞; hERG 通道

[中图分类号] R965

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2022)02-0132-04

[DOI] 10.12206/j.issn.1006-0111.202110082

The effect of HMS-01 on stably expressed hERG channel currents in HEK293 cells detected with the manualpatch clamp method

ZHANG Huimin, XIANG Kefa, SHI Xiaofei, QIN Zhen, LIU Xia (Department of Clinical Pharmacy, School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To test the cardiac toxicity of new compound HMS-01 and evaluate the safety profile for clinical trials. **Methods** Manualpatch clamp method was used to measure human Ether-a-go-go-Related Gene (hERG) potassium channel currents with different concentrations of HMS-01. Cisapride was selected as the positive control drug. HMS-01 was diluted to the concentration of 0.3, 1, 3, 10 and 30 $\mu\text{mol/L}$ and applied to the cells. The changes in electrical currents were recorded and the inhibition rate was calculated. **Results** At the highest concentration of 30 $\mu\text{mol/L}$, the inhibitory rate of HMS-01 on hERG channel was less than 30%. There was no obvious inhibitory effect compared with cisapride. **Conclusion** Compared with the cisapride, HMS-01 has no obvious inhibitory effect on hERG channel and has no cardiotoxicity.

[Key words] manualpatch clamp method; HEK293 cells; hERG channel

HMS-01 是由我们实验室以红霉素为前体改造而来的抗疲劳新药, 笔者在前期工作中发现, 红霉素能明显延长小鼠游泳和跑台的疲劳时间, 肌肉疲劳指数提高, 增加糖原含量, 增强线粒体功能和 ATP 水平, 有望成为治疗肌肉疲劳的潜在药物^[1]。但是红霉素作为大环内酯类抗生素无法应用为抗疲劳药物, 因此, 笔者在红霉素的基础上进行改造, 得到了新化合物 HMS-01, 在抗疲劳实验研究中效果显著, 得到国家重大新药研发的资金支持, 目前已进入临床前研究阶段。红霉素具有潜在的心脏毒性, 导致 QT 延长综合征^[2]。因此对新化合物

HMS-01 进行心脏毒性评价十分必要。

人类 Ether-a-go-go-Related 基因 (hERG) 编码的快速激活钾通道是参与心肌动作电位 3 期复极形成的重要离子通道^[3-4]。药物阻断 hERG 通道会导致心脏复极延长, 心电图表现为 QT 间期延长, 称为长 QT 间期综合征。药物引起的心室延迟复极在某些情况下可能引发致命性心律失常-尖端扭转型室性心动过速^[5-6]。

据统计, 25% ~ 40% 的先导化合物都显示出不同程度的 hERG 相关毒性, 而且很多药物由于可能导致 QT 间期延长风险而被撤出市场。在临床上, 若某药物诱导发生扭转型室性心动过速后果极其严重, 有必要采用合适的技术方法, 检测是否可能诱发这种严重的心律失常, 因此 2005 年国际协调会 (ICH) 颁布的指导原则“评价人用药品潜在致心室复极化延迟作用 (QT 间期延长) 的安全药理学研究 (S7B)”建议所有的药物均需要评估其在原代

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (82073842); 上海市 2021 年度“科技创新行动计划”优秀学术/技术带头人计划项目 (21XD1404700)

[作者简介] 张慧敏, 硕士研究生, Email: 2968389545@qq.com

[通信作者] 刘霞, 教授, 博士生导师, 研究方向: 心脑血管药理学, Email: lxfling@aliyun.com

心肌细胞或重组细胞中对心肌延迟复极的作用^[7-9], 美国 FDA 等药物监管部门也要求新药申报必须有 hERG 心脏安全性的评估数据。心脏毒性问题也越来越引起我国重视, 2014 年, 我国食品药品监督管理总局推出《药物 QT 间期延长潜在作用非临床研究技术指导原则》, 明确指出体外实验中可使用“离体动物或人心肌细胞、培养心肌细胞系或克隆的人离子通道异种表达体系测定离子流”^[10], 目前, 中国食品药品监督总局(NMPA)也要求研究中的新药(IND)申报临床试验前需要有 hERG/IKr 安全性评价的数据。

因此, 在新药临床前试验引入 hERG 安全性检测, 是非常必要的, 可以有效控制新药研发的风险和成本。在体外实验中, 常常会选择稳定表达钾离子通道蛋白的转染有 hERG 基因的哺乳动物细胞系细胞^[9], 哺乳动物细胞的实验结果更接近于人体生理条件^[10], 本次实验中我们选用的是人胚肾细胞(HEK293 细胞)^[11]。实验中使用的阳性对照药西沙必利有促心律失常的作用, hERG 是西沙必利作用的分子靶点, 基本机制是阻断 hERG 电流, 低浓度时可有效阻断 HEK293 中异源表达的 hERG 通道^[12]。

全细胞膜片钳技术是 hERG 安全性评价的金标准, “膜片”即表示细胞膜, “钳”则是指控制, 可分为电压钳和电流钳, 膜片钳技术简单说是一种通过玻璃微吸管电极控制细胞后监测并记录膜电流, 通过分析膜电流的变化了解离子通道的本质。膜片钳技术在药物体外安全性评价中已经广泛普及, 在发现药物毒性后及时止损大大缩短药物开发周期。

笔者采用膜片钳技术检测被测化合物(HMS-01)对 hERG 通道阻断作用的浓度效应关系, 从而评价样品对心脏 hERG 钾通道抑制作用的风险, 评价其引发心室复极毒性的风险。本试验是遵循 GLP 指导原则进行的非 GLP 实验, 研究根据相关文献以及标准操作程序进行。

1 材料与仪器

1.1 细胞培养

将 hERG 钾通道稳定表达的 HEK293 细胞系在含有 10% 胎牛血清及 0.8 mg/ml G418 的 DMEM 培养基中, 置于 5%CO₂, 37℃ 孵箱培养。除去旧培养基 PBS 洗一次, 加入 1 ml TrypLE™ Express 溶液, 37℃ 孵育 0.5 min。当细胞从皿底脱离, 加入 5 ml、37℃ 预热的完全培养基, 将细胞悬液用吸管轻轻吹打使聚集的细胞分离, 转移至无菌的离心管中, 1000 r/min 离心 5 min 收集细胞。扩增或维持培养, 将细

胞接种于 6 cm 细胞培养皿, 每个细胞培养皿, 接种细胞量为 2.5×10^5 细胞(最终体积: 5 ml)。为维持细胞的电生理活性, 细胞密度不能超过 80%。实验之前细胞用 TrypLE™ Express 分离, 将 3×10^3 细胞铺到盖玻片上, 在 24 孔板中培养(最终体积: 500 μ l) 18 h 后, 进行实验检测。

1.2 药品与试剂

1.2.1 HMS-01 的配制

称量 10mg HMS-01(本实验室自制)溶于二甲亚砜(DMSO)配制成母液, 用 10 ml 的细胞外液将母液依次稀释成 0.3、1、3、10、30 μ mol/L 浓度的样品, 所有浓度超声 20 min, 至所有样品全部溶解, 没有肉眼可见沉淀。

1.2.2 阳性对照药西沙必利的配制

将 10 mg 西沙必利^[12-13](购自 Sigma 公司)阳性对照药用 DMSO 配制成 10 mmol/L 的母液, 再用 DMSO 将西沙必利母液依次稀释为 1、10、100 μ mol/L 以及 1 mmol/L 4 个浓度, 西沙必利最终的工作浓度为 1、10、100 nmol/L 以及 1 μ mol/L, 西沙必利全部溶解, 没有肉眼可见的沉淀。

1.2.3 内外液制备

细胞外液的配方为: 140 mmol/L NaCl, 3.5 mmol/L KCl, 1 mmol/L MgCl₂, 2 mmol/L CaCl₂, 10 mmol/L 葡萄糖, 10 mmol/L HEPES, 1.25 mmol/L NaH₂PO₄, 用 NaOH 将 pH 调节为 7.4。细胞内液的配方为: 20 mmol/L KCl, 115 mmol/L K-Aspartic, 1 mmol/L MgCl₂, 5 mmol/L EGTA, 10 mmol/L HEPES, 2 mmol/L Na₂-ATP, 用 KOH 将 pH 调节为 7.2。

1.3 实验仪器

P97 电极拉制仪、BF150-86-10 毛细玻璃管、MP285R 微操纵器(美国 Sutter Instruments); IX71 显微镜(Olympus); BT100L 蠕动泵(Lead Fluid); EPC10 放大器(德国 HEKA); Patchmaster v2x73.2、IGOR 6.0.1.0 数据采集和分析软件(德国 HEKA)。

1.4 数据统计与处理

将每一个药物浓度作用后的电流和空白对照电流标准化(化合物峰尾电流/空白组峰尾电流), 然后计算每一个药物浓度对应的抑制率(1-化合物峰尾电流/空白组峰尾电流)。对每一个浓度计算平均数和标准误, 并用以下的方程计算每种化合物的半抑制浓度:

$$\text{抑制率} = \frac{1}{1 + \left(\frac{IC_{50}}{C}\right)^h}$$

用以上方程对剂量依赖效应进行非线性拟合,

其中, c 代表药物浓度, IC_{50} 为半抑制浓度, h 代表希尔系数。曲线拟合以及 IC_{50} 的计算利用 IGOR 软件完成。

2 实验方法

2.1 准备工作

用微电极拉制仪将毛细玻璃管拉制成记录电极。在倒置显微镜下操纵微电极操纵仪将记录电极接触到细胞上, 给予负压抽吸, 形成 $G\Omega$ 封接, 封接电阻 $\geq 1 G\Omega$ 。形成 $G\Omega$ 封接后进行快速电容补偿, 然后继续给予负压, 吸破细胞膜, 形成全细胞记录模式。然后进行慢速电容的补偿并记录膜电容及串联电阻。不给予漏电补偿。

2.2 全细胞记录

当形成全细胞封接后, 细胞膜电压钳置于 $-80 mV$, 在膜电位为 $-80 mV$ 下无明显的漏电流 (漏电流 $\leq 100 pA$)。钳制电压由 $-80 mV$ 除极至 $+30 mV$ 维持 $2.5 s$, 然后迅速保持在 $-50 mV$ 维持 $4 s$, 可以激发出 hERG 通道的尾电流, 起始尾电流峰值 $\geq 400 pA$, 起始尾电流峰值大于激活电流峰值, 尾电流没有明显的自发性衰减 ($5 min$ 内自发性衰减 $< 5\%$)。每隔 $10 s$ 重复采集数据, 观察药物对 hERG 尾电流的作用。以 $-50 mV$ 为漏电流检测值。实验数据由 EPC-10 放大器进行采集并储存于 PatchMaster 软件中。

2.3 给药

当全细胞记录的 hERG 电流稳定后开始给药, 每个药物浓度作用至 $5 min$ (或者电流至稳定) 后检测下一个浓度, 每一个测试化合物检测多个浓度。将铺有细胞的盖玻片置于倒置显微镜中的记录浴槽中, 测试化合物以及不含化合物的外液利用重力灌注的方法从低浓度到高浓度依次流经记录小室从而作用于细胞, 在记录中利用真空泵进行液体交换。每一个细胞在不含化合物的外液中检测到的电流作为自己的对照组。独立重复检测多个细胞。所有电生理实验均在室温下进行。

3 实验结果

3.1 hERG HEK-293 细胞系特征

使用带有 hERG 基因的重组质粒对 HEK-293 细胞进行转染, 细胞表达的重组蛋白有: Homo sapiens potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 2 (KCNH2), transcript variant1。表达系统为 constitutive (pSG5-Kana)。最终用 G418 ($0.8 mg/ml$) 作为标记进行细胞筛选。

筛选出的细胞中, hERG 通道的表达经过免疫标记, 被 hERG 转染的 HEK293 细胞表面被标记上荧光 (图 1A) 以及通过蛋白质印记表达实验 (图 1B), 均表明 hERG 基因转染进入 HEK293 细胞并表达了 hERG 通道蛋白。

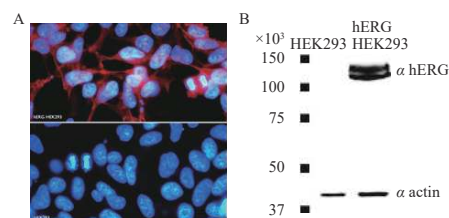


图 1 hERG 通道的表达经过免疫标记以及蛋白质印迹结果
注: A.免疫印迹; B.蛋白质印迹

3.2 典型的 hERG 电流形态及电流-电压曲线

在形成全细胞状态后, 将细胞钳制在 $-90 mV$, 给予指令电位从 $-60 \sim +60 mV$, 然后电压保持在 $-40 mV$, 记录 I 结果 (图 2)。所记录到的尾电流在 $+10 mV$ 时接近高峰, 当膜电位再升高时尾电流饱和 (图 3)。

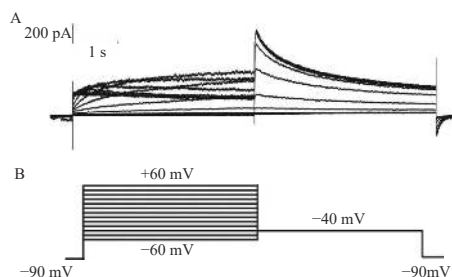


图 2 被 hERG 转染的 HEK293 细胞的电流记录
注: A.hERG 电流形态; B.hERG 电压记录

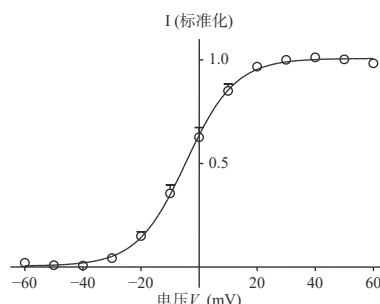


图 3 被 hERG 转染的 HEK293 细胞尾电流电流-电压曲线

3.3 与西沙必利相比 HMS-01 对 hERG 通道无明显抑制作用

在几次独立重复实验中检测 HMS-01 与西沙必利对 hERG 通道抑制作用, 并通过拟合计算出样品对 hERG 电流的半抑制浓度 (IC_{50}), 笔者采用了通用标准判断被试化合物对 hERG 的抑制效应^[4], 极强抑制: $IC_{50} < 0.1 \mu mol/L$; 强抑制: $0.1 \mu mol/L \leq$

$IC_{50} \leq 1 \mu\text{mol/L}$; 中度抑制: $1 \mu\text{mol/L} \leq IC_{50} \leq 10 \mu\text{mol/L}$; 弱抑制或无抑制: $IC_{50} > 10 \mu\text{mol/L}$ 。根据以上标准, 实验结果表明, 与阳性对照药西沙必利相比, 化合物 HMS-01 对 hERG 通道具有弱抑制或无抑制作用(图 4)。

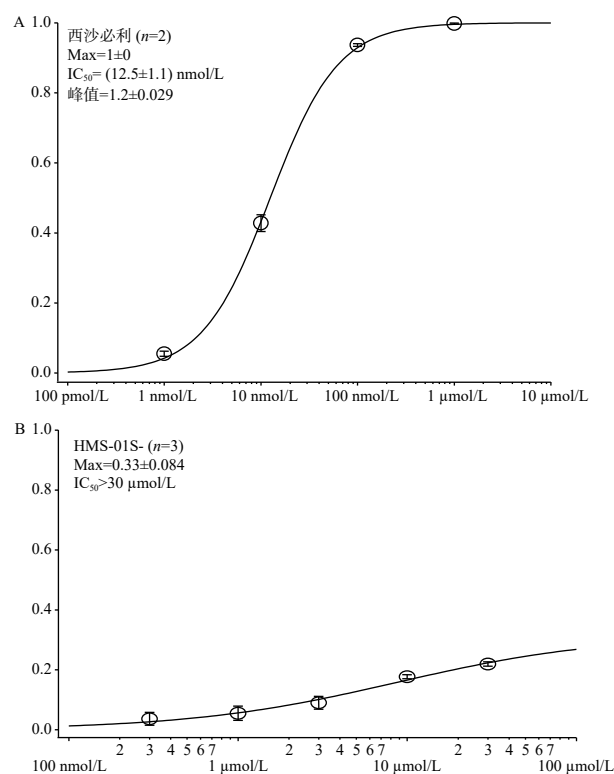


图 4 不同浓度西沙必利与 HMS-01 对 hERG 通道的抑制比例

注: A. 西沙必利; B. HMS-01

4 讨论

有证据表明, 药物会以浓度依赖的方式减缓复极化, 当药物 hERG 半抑制浓度超过其在血液中的浓度峰值的 30 倍左右时, 是一个相对安全的范围^[15-17]。本实验研究结果证明, 与阳性对照药西沙必利相比, HMS-01 作为新药对 hERG 通道无明显抑制作用。尽管大环内酯类抗生素红霉素作为该化合物前体具有心脏毒性^[18-19], 红霉素第一次改造后变成无抗菌活性的螺缩酮, 二次结构改造后才成为我们的新药 HMS-01, 改造后心脏毒性作用消失, 本研究结果对于推动该新药进入临床试验, 是一个十分积极的信号。

目前膜片钳技术的水平大为提升, 已经广泛活跃在各种离子通道相关研究中。尽管膜片钳研究

在预测化合物引起 QT 延长的风险中是灵敏的指标, 但仅凭 hERG 电生理的结果来评价化合物潜在的延长 QT 间隔的风险是远远不够的。还要通过安全药理学和毒理学等综合研究。

【参考文献】

- [1] WAN J, QIN Z, LEI H, et al. Erythromycin has therapeutic efficacy on muscle fatigue acting specifically on orosomucoid to increase muscle bioenergetics and physiological parameters of endurance[J]. *Pharmacol Res*, 2020, 161: 105118.
- [2] 王佩. 大环内酯类抗生素的心脏毒性[J]. *药物不良反应杂志*, 2000, 2(2): 80-83.
- [3] ABBOTT G W, SESTI F, SPLAWSKI I, et al. MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia[J]. *Cell*, 1999, 97(2): 175-187.
- [4] SMITH P L, BAUKROWITZ T, YELLEN G. The inward rectification mechanism of the HERG cardiac potassium channel[J]. *Nature*, 1996, 379(6568): 833-836.
- [5] JO S H, HONG H K, JUNG S J, et al. Maprotiline block of the human ether-a-go-go-related gene (HERG) K⁺ channel[J]. *Arch Pharmacol Res*, 2007, 30(4): 453-460.
- [6] EAP C B, CRETOL S, ROUGIER J S, et al. Stereoselective block of hERG channel by (S)-methadone and QT interval prolongation in CYP2B6 slow metabolizers[J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2007, 81(5): 719-728.
- [7] 王玉珠. 新药临床试验前安全药理学研究的发展过程[J]. *中国临床药理学杂志*, 2011, 27(7): 557-560.
- [8] 李波. 安全药理学的快速发展对创新药物研发作用巨大[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2015, 29(5): 720-721.
- [9] 李波. 安全药理学的国内外发展概况[J]. *中国新药杂志*, 2004, 13(11): 694-698.
- [10] 夏静. 应用膜片钳技术检测药物对HERG通道抑制作用的实验过程及要点[J]. *军事医学*, 2015, 11: 884-886.
- [11] 李春. 人胚肾(HEK293)细胞自身的钾通道[J]. *中国血液净化*, 2007, 6(11): 604-607.
- [12] MOHAMMAD S, ZHOU Z, GONG Q, et al. Blockage of the HERG human cardiac K⁺ channel by the gastrointestinal prokinetic agent cisapride[J]. *Am J Physiol*, 1997, 273(5): H2534-H2538.
- [13] 元沙沙. 胃肠动力药西沙比利对表达于HEK293细胞的人ether-a-go-go相关基因2通道的影响[J]. *首都医科大学学报*, 2014, 35(6): 670-674.
- [14] ROCHE O, TRUBE G, ZUEGGE J, et al. A virtual screening method for prediction of the HERG potassium channel liability of compound libraries[J]. *Chembiochem*, 2002, 3(5): 455-459.
- [15] 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.

(下转第 142 页)

- [9] ZHANG J, LEI Z, HUANG Z, et al. Epigallocatechin-3-gallate(EGCG) suppresses melanoma cell growth and metastasis by targeting TRAF₆ activity[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(48): 79557-79571.
- [10] MANJEGOWDA M C, DEB G, KUMAR N, et al. Expression profiling of genes modulated by estrogen, EGCG or both in MCF-7 breast cancer cells[J]. *Genom Data*, 2015, 5: 210-212.
- [11] DETTLAFF K, STAWNY M, OGRODOWCZYK M, et al. Formulation and characterization of EGCG for the treatment of superficial bladder cancer[J]. *Int J Mol Med*, 2017, 40(2): 329-336.
- [12] BORUTINSKAITĖ V, VIRKŠAITĖ A, GUDELYTĖ G, et al. Green tea polyphenol EGCG causes anti-cancerous epigenetic modulations in acute promyelocytic leukemia cells[J]. *Leuk Lymphoma*, 2018, 59(2): 469-478.
- [13] YANG C G, DU W F, YANG D G. Inhibition of green tea polyphenol EGCG((-)-epigallocatechin-3-gallate) on the proliferation of gastric cancer cells by suppressing canonical wnt/ β -catenin signalling pathway[J]. *Int J Food Sci Nutr*, 2016, 67(7): 818-827.
- [14] KLOS K S, ZHOU X, LEE S, et al. Combined trastuzumab and paclitaxel treatment better inhibits ErbB-2-mediated angiogenesis in breast carcinoma through a more effective inhibition of Akt than either treatment alone[J]. *Cancer*, 2003, 98(7): 1377-1385.
- [15] CITRI A, YARDEN Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7(7): 505-516.
- [16] ZHANG H, BEREZOV A, WANG Q, et al. ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies[J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(8): 2051-2058.
- [17] IGNATOSKI K M, MAEHAMA T, MARKWART S M, et al. ERBB-2 overexpression confers PI 3' kinase-dependent invasion capacity on human mammary epithelial cells[J]. *Br J Cancer*, 2000, 82(3): 666-674.
- [18] PIANETTI S, ARSURA M, ROMIEU-MOUREZ R, et al. Her-2/neu overexpression induces NF- κ B via a PI₃ kinase/Akt pathway involving calpain-mediated degradation of I κ B- α that can be inhibited by the tumor suppressor PTEN[J]. *Oncogene*, 2001, 20(11): 1287-1299.
- [19] YAKES F M, CHINRATANALAB W, RITTER C A, et al. Herceptin-induced inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase and Akt is required for antibody-mediated effects on p27, cyclin D1, and antitumor action[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(14): 4132-4141.
- [20] SPECTOR N L, BLACKWELL K L. Understanding the mechanisms behind trastuzumab therapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(34): 5838-5847.
- [21] LIANG Y C, LIN-SHIAU S Y, CHEN C F, et al. Suppression of extracellular signals and cell proliferation through EGF receptor binding by (-)-epigallocatechin gallate in human A431 epidermoid carcinoma cells[J]. *J Cell Biochem*, 1997, 67(1): 55-65.
- [22] SHIMIZU M, DEGUCHI A, JOE A K, et al. EGCG inhibits activation of HER3 and expression of cyclooxygenase-2 in human colon cancer cells[J]. *J Exp Ther Oncol*, 2005, 5(1): 69-78.
- [收稿日期] 2021-12-11 [修回日期] 2022-02-28
[本文编辑] 李睿旻

(上接第 135 页)

- [16] CAVERO I, MESTRE M, GUILLON J M, et al. Drugs that prolong QT interval as an unwanted effect: assessing their likelihood of inducing hazardous cardiac dysrhythmias[J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2000, 1(5): 947-973.
- [17] WEBSTER R, LEISHMAN D, WALKER D. Towards a drug concentration effect relationship for QT prolongation and torsades de pointes[J]. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 2002, 5(1): 116-126.
- [18] 梁永志. 大环内酯类抗生素心脏毒性防治[J]. *中国实用医药*, 2008, 3(5): 49-50.
- [19] 伦新强. 大环内酯类抗生素心脏毒性防治[J]. *中国药物应用与监测*, 2005, 2(3): 28-29.
- [收稿日期] 2021-10-25 [修回日期] 2022-01-12
[本文编辑] 李春德