

科技部補助

大專學生研究計畫研究成果報告

* ***** ***** *
* 計畫 新開發藥物 1-cyclohexyl-N-mesitylprolinamide *
* : hydrochloride 對於肌強直症(myotonia)作用之探討 *
* 名稱 與應用 *
* ***** ***** *

執行計畫學生： 彭玄慧

學生計畫編號： MOST 104-2815-C-040-004-B

研究期間： 104年07月01日至105年02月28日止，計8個月

指導教授： 林明忠

處理方式： 本計畫可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學生物醫學科學學系（所）

中華民國 105年03月31日

(一) 摘要

肌強直症(Myotonia)是一種肌肉收縮後不易放鬆的現象，會造成肌無力，更嚴重者會有肌萎縮等症狀，可以依其原因及遺傳的模式區分為多種疾病，影響到患者的正常生活，至今仍還沒有完全治癒的方法。肌肉強直症(Myotonia dystrophy)是成人發病的肌肉強直症中最常見的，為自體顯性遺傳的疾病，因屬基因異常疾病無法治癒，主要的治療方式是以減緩症狀為主。目前使用來減緩肌強直現象的藥物，會產生各種副作用，甚至造成骨骼肌或神經的麻痺，安全性也不高，因此我們希望可以尋找出一種副作用較小且安全性較高的新型化合物來治療肌強直。近期，研究發現鉀離子通道對肌肉收縮和膜電位的維持是相當重要的。目前藥物的治療主要是以鈉離子通道阻斷劑為治療方式，近期鉀離子通道開啟劑的開發提供了一個新的選擇。而我們要探討的本實驗室新開發藥物 1-cyclohexyl-N-mesitylprolinamide hydrochloride(CHMP)是 ML213 和 retigabine，所衍生出的結構相似化合物，既透過鉀離子通道開啟劑的作用，推測其可能具有相同的作用方式(初步結果見第 6-9 頁)。肌強直現象是因為骨骼肌過度收縮且舒張減緩而造成的，因此本實驗計畫使用氯離子通道抑制劑 9-AC (anthracene 9-carboxylic acid)來誘導肌強直的模式，再藉由小鼠橫膈肌(骨骼肌)、腳趾肌神經突觸後電位、肋間三角肌神經末梢電流等實驗，來探討 1-cyclohexyl-N-mesitylprolinamide hydrochloride 對於骨骼肌肌強直的作用。

(二) 研究動機

生物體內，帶電離子的分布在生理意義上扮演重要的角色。而細胞內外帶電離子的運輸，因受到細胞膜的阻礙，而有一些特異性蛋白存在於細胞膜上(1)，例如離子通道蛋白。

離子通道蛋白(Ion Channel Protein)可以使帶電離子條件性的在細胞內外移動，是幫助細胞調控膜電位變化的重要蛋白質。離子通道根據其調控開關的方式，可分為以下三類：

(1)電位依賴型離子通道 (Voltage-gated Ion Channels)：受細胞膜電位的變化影響，來調控離子通道蛋白的開啟和關閉。

(2)配體依賴型離子通道 (Ligand-Gate Ion channel)：和特定的受體分子結合來影響離子通道的開關。

(3)二級訊號依賴型離子通道 (Second Messenger mediated Ion channels)：藉由二級訊號分子與離子通道的結合調控。

在運動神經系統中，離子通道的開啟與關閉對於神經訊號的傳遞有關鍵的影響，肌肉收縮的機制同樣受離子通道的活性影響。帶電離子和離子通道在維持神經和肌肉細胞的膜電位上有密切的關聯。其中鈉離子通道和鉀離子通道的開啟或關閉，會產生膜電位的去極化和再極化等。而靜止膜電位的呈現，則是離子通道在動態平衡的狀況下達到的一種現象，一旦靜止膜電位發生異常，可能會使動作電位產生異常，進而導致一些生理上的疾病。

肌強直現象(myotonia) 是動作電位引起骨骼肌長時間持續地收縮，即使停止刺激後動作電位仍重覆性發生，因而無法順利放鬆所導致的肌肉僵直現象，通常有氯離子通道或鈉離子通道的異常 (2)。先前的研究指出，若阻斷肌肉周圍的神經作用，肌強直的現象依舊會產生，說明了此種症狀是由於肌肉細胞膜上出現的異常引起的。在骨骼肌上，激活鈉離子通道和氯離子通道後的作用是相反的，激活鈉離子通道會使細胞膜興奮，而激發氯離子通道則會穩定靜止膜電位。若是由鈉離子通道突變造成的肌強直，是因為鈉離子通道不活化的能力喪失，使得鈉離子通道過度開啟，細胞膜過度興奮造成；而氯離子通道突變造成的肌強直現象則是因為氯離子通道被阻斷，進而使氯離子無法穩定膜電位造成的 (3)。

肌強直疾病的致病原因，可能是離子通道的基因單點突變或多點突變造成，根據突變位置的不同分為第一型與第二型。肌強直疾病的症狀包括，肌肉僵硬，短暫的無力，疲勞和疼痛，甚至導致許多個身體系統的功能低下，雖然很少直接危及到生命，但卻會造成患者無法順利進行日常生活中的活動(4)。Myotonic dystrophies 是成人發病中常見的肌強直症，屬於自體顯性遺傳疾病，主要影響骨骼肌，造成肌強直，肌萎縮，肌無力等(5)。但是由於這個疾病是基因變異導致，所以目前尚未有完全根治的方法，主要以減緩生理症狀為主。目前肌強直症的治療藥物以鈉離子通道阻斷劑，或者是鉀離子通道的開啟劑為主，藉此來抑制肌強直的現象。常見的藥物有美西律 (Mexiletine)(最有效)、妥卡胺 (Tocainide)、硫酸奎寧 (Quinine Sulfate)、甲妥英 (Null)、苯妥英

(Phenytoin)、普魯卡因醯胺(Procainamide)。但這些藥物大部分都有一些副作用，例如：腸胃不適、顫抖、運動失調、頭暈、肝毒性、噁心、厭食、感覺異常、腎結石等(6)。某些治療肌強直的藥物，像是美西律、苯妥英、卡馬西平(Carbamazepine)，他們最初其實是被用在抗心律不整或是抗癲癇，所以有導致無力的副作用(7)。以上這些藥物，都不可避免的會產生同樣影響患者生活的副作用，說明了這些藥物並不是最值得運用在臨床上的。因此，找出新型的藥物是我們所要研究的方向。

近 10 年來，電位依賴型鉀離子通道開啟劑的開發是新的一項類別。研究發現鉀離子通道對肌肉收縮和膜電位的維持相當重要(8)，而 ML213 和 retigabine 為目前已知的鉀離子通道的開啟劑(9)，其中 retigabine 甚至已被認定可以達到抗癲和止痛的效果(10)。我們利用此兩種藥物的分子結構中某特定結構(三甲基乙醯苯胺)當成模板，尋找出 21 種具有相似結構的化合物，試圖尋找出對於骨骼肌鉀離子通道有作用的鉀離子通道開啟劑。

在骨骼肌中，通常會產生氯離子電流來抑制由於肌強直所引起的骨骼肌細胞膜過度興奮，而不斷重複發生動作電位，使骨骼肌放鬆不及的現象。所以我們初步的實驗是利用一種氯離子通道抑制劑 9-AC (anthracene 9-carboxylic Acid)，以 100 μM 的濃度事先處理在小鼠的橫膈肌上。發現在高頻率刺激下，骨骼肌會出現過度收縮及延緩放鬆的現象，因此我們可以用 9-AC 模擬由氯離子通道缺陷而造成的肌強直，再對橫膈肌處理待測試的藥物，並且觀察其動作電位的變化，進一步推測藥物可能的作用方式。

(三) 文獻回顧與探討

以往，治療神經過度興奮所引發的疾病，例如癲癇、神經受損性的疼痛，都是使用電位依賴型鈉離子通道的阻斷劑(11)、電位依賴型鈣離子通道調控劑(12)、抑制性神經傳導物質 GABAergic 的調控藥劑(13)。

其中，已知藥物 Lidocaine 是以鈉離子通道阻斷做為治療神經性疼痛的藥物(14)。鈉離子通道作用在控制細胞興奮性及異常得幾項病理過程，像是心律不整、癲癇、痙攣等，因此已找出它對於治療慢性神經痛的潛力。而 Lidocaine 的發現，已被廣泛運用在抗心律不整、局部麻醉等，藉由使鈉離子通道不活化為治療方針。又特定的鈉離子通道亞型是傷害感受和神經性疼痛的關鍵決定因素，這表明未來很有可能以鈉通道阻滯劑具有較低的毒性和功效增強，治療神經性疼痛(15)。

而最近的研究已指出 KCNQ 鉀離子通道蛋白家族開啟劑 retigabine 及其結構類似物 flupirtine 在臨床治療效用是相當顯著的，目前已應用於治療神經細胞的過度興奮、偏頭痛、神經退化疾病、精神病。另外，Kv channel(電位依賴型鉀離子通道)對調節細胞膜的興奮，扮演相當重要的角色(16)。鉀離子通道在肌肉的收縮、放鬆，以及維持靜止膜電位可能有一定的相關性(17)。目前已被發現的鉀離子通道開啟劑 flupirtine 和 retigabine，確認可達到抗痙攣及止痛的成效(18, 19, 16)。而 ML213 則發現是屬於電位依賴型鉀離子通道 KCNQ2 和 KCNQ4 的開啟劑(9)。且在使用了 ML213 後，小鼠的胸主動脈、腎動脈及腸繫膜

動脈皆會有舒張的表現(20)。由以上研究出的藥物的作用性，我們可以試著去尋找對於骨骼肌鉀離子通道有作用的鉀離子通道開啟劑。因此利用 ML213 分子結構中的三甲基乙醯苯胺當成模板，尋找結構相似的化合物，利用小鼠膈神經-橫膈骨骼肌為實驗設計，研究化合物的作用性。

肌強直是動作電位引起骨骼肌長時間持續收縮，即使停止刺激後也無法順利放鬆而導致的肌肉僵直現象，通常有氯離子通道或鈉離子通道的異常(2)。在骨骼肌上，激活鈉離子通道和氯離子通道後的作用是相反的。激活鈉離子通道會使細胞膜興奮，而激發氯離子通道則會使靜止膜電位穩定。若是鈉離子通道突變而造成的肌強直，是因為鈉離子通道過度開啟，讓細胞膜過度興奮造成；而氯離子通道突變造成的肌強直現象則剛好相反，是因為氯離子通道被阻斷，進而使氯離子無法穩定膜電位所造成的(3)。CLC-1 氯離子通道基因的缺陷，會引起細胞膜的過度興奮，造成肌肉的放鬆弛緩，然後造成先天性的肌強直(myotonia congenital)，其中會引起肌肉的強直性收縮，使肌肉持續地收縮，以及收縮後暫時性不自主的肌肉僵硬，還有放鬆減緩(21)。使用 9-AC(Anthracene 9-carboxylic Acid)也可以造成相同的效果，9-AC 在實驗上很常被用來誘導肌強直的現象。9-AC 是一種氯離子通道阻斷劑，也是一種強效的肌強直誘導藥物。它可以減少骨骼肌細胞膜上氯離子的傳導，造成體內或體外的肌強直現象，導致哺乳類動物骨骼肌細胞膜的動作電位進行重複性放電，以及骨骼肌放鬆的減緩。在刺激前，先使用 9-AC 預處理，會導致半放鬆期(half relaxation) 時間以及晚期放鬆期(late relaxation) 時間顯著的延長

(21, 22, 23)。由於 9-AC 在誘導肌強直現象這方面，不論是處理後的效果，或者是使用時的劑量等各方面，都已經有許多實驗及文獻可以參考以及使用，所以在這個計畫中，我們同樣也是使用 9-AC 這個氯離子通道阻斷劑，模擬出氯離子通道缺陷的肌強直模式來進行實驗，觀察 1-cyclohexyl-N-mesitylprolinamide hydrochloride 對於經過 9-AC 預處理過的小鼠骨骼肌有何效果，並探討其詳細的作用機轉。

(四) 材料與方法

➤ 動物實驗

實驗動物及飼養條件：

本計畫所採用的實驗動物為小白鼠(品系:ICR)，體重約 20-30 公克，皆為雄性鼠。品系 ICR 小白鼠是和一般不需要特殊遺傳基因固定之實驗，通常被運用於一般研究、安全評估試驗、生理學研究、藥理學研究及毒理學研究。本計畫所使用之小鼠來源為樂斯科生物科技股份有限公司。

實驗動物之飼養，為將飼育環境控制在室溫($24\pm 1^{\circ}\text{C}$)，濕度為 $55\pm 5\%$ ，並維持各十二小時的白天黑夜的光照週期，使之自由進食及飲水。

I. 小鼠橫膈肌實驗

橫膈肌製備：

使用約五週大雄性小白鼠，利用二氧化碳將之安樂死後，將小鼠放入鐵盤中，用大剪在約耳下連線處斷頸，用水把血液沖洗掉。接著，剪開胸部及腹部上的皮和肉，將橫膈膜分離出，並且放入一塊經由充氧飽和的Kreb' s solution (muscle tension recording buffer)：NaCl 131, NaHCO₃ 12.5, Glucose 11, KCl 4.8, MgSO₄ 1.2, CaCl₂ 2.5 (mM) 的棉球來保持橫膈膜的活性和生理功能。處理好的橫膈肌，將其分別綁到電極上，再把神經穿過電極環，橫膈肌尖端則用棉線綁住，掛到張力測量儀器上，使其形成一個三角形，浸泡於維持在 36~37 °C 的Kreb' s buffer(10cc)中。

橫膈膜收縮力記錄：

刺激方式分為間接刺激（刺激膈神經引發橫膈膜收縮）和直接刺激（直接刺激橫膈膜引發收縮）兩種。刺激頻率則分別為低頻刺激（以 0.1 Hz，0.05 ms 和 0.5 ms 的期間進行刺激）和高頻刺激（以 50 Hz，持續 3 秒，每次 0.05 ms 和 0.5 ms 的期間進行刺激）兩種。

將製備好的組織，放在由水浴槽灌流，使Kreb' s solution維持在 37

°C的容器中，並且給予混合氣(95% O₂ 和 5% CO₂)。記錄時使用電刺激器 (GRASS S88 STIMULATOR) 刺激已經製備好的橫膈肌膈神經(間接)或骨骼肌 (直接)，使橫膈肌收縮，再將其收縮的張力經由等張轉能器 (Isometric transducer, Grass AT 307)放大，並且用生理記錄器 (GOULD TA 240)記錄放大後的收縮張力之訊號。

在直接刺激的實驗，我們會事前加入 20 μM 的(+)-Tubocurarine chloride pentahydrate 來阻斷神經的傳導，避免藉由神經來刺激骨骼肌的可能性，排除神經對肌肉的影響。而在間接刺激的實驗中，我們則在實驗結束後才加入 20 μM 的(+)-Tubocurarine chloride pentahydrate 來觀察收縮力完全消失與否，以確定整個實驗中是經由神經刺激來使肌肉收縮，並非是直接刺激肌肉所引起的收縮。

II. 小鼠肋間三角肌神經末梢電流實驗

三角肌製備：

使用約五週大雄性小白鼠，使用二氧化碳犧牲後，將小鼠放入鐵盤中，剪開胸部及腹部上的皮和肉，將胸腔從靠近右側處剪開，並且沿著脊椎骨左側剪開，取下左半邊胸骨，將多餘的肌肉去除掉，移至解剖顯微鏡下，尋找三根肋骨之間的範圍，胸骨朝上，取下中間以及右側肋骨的軟骨部分。把這

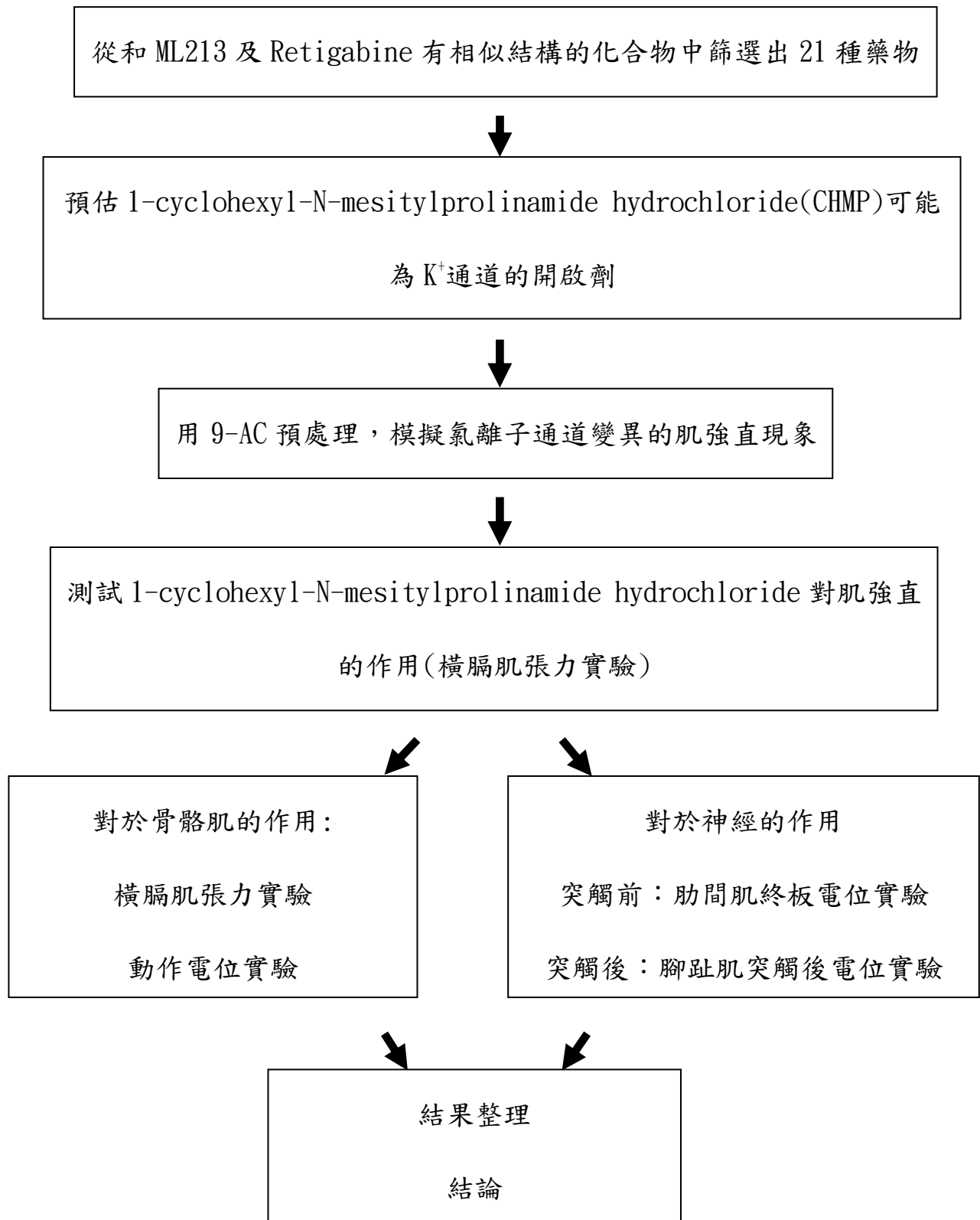
三根肋骨範圍內的肌肉，分離到剩下最底層的肌肉層以及神經。沿著最右側肋骨的硬骨部分將神經分出來。

神經末梢電流記錄：

將製備好的橫膈肌固定在底部塗有 sylgard 的容器中，放在 Kreb' s solution 中，並且給予混合氣(95% O_2 和 5% CO_2)充飽和，利用刺激器(A-M SYSTEM isolated pulse stimulator MODEL 2100)刺激使三角肌跳動後，加入 20 μ M 的(+)-Tubocurarine chloride pentahydrate 阻斷運動神經突觸後的傳遞，使骨骼肌不會跳動，以免影響下針位置，架設地線消除背景值。

使用填充 3 M KCl 的微小玻璃電極(電阻約 6~10M Ω)插進神經細胞內記錄，經由高阻抗放大器(Axon instruments MultiClamp 700B)將訊號放大，再通過類比數位訊號轉換器(Axon instruments digidata 1322A)轉換，最後搭配 pClamp 9.2 軟體記錄及儲存製電腦中，用 Clampfit 10.0 軟體記錄。

(五) 研究流程大綱



(六) 結果與討論

小鼠橫膈肌實驗

分別比較加藥前後低頻及高頻的變化。(高頻後端最高處／高頻前端最高處)

Figure 1. 濃度 $10\mu\text{M}$ CHMP 對骨骼肌產生的影響

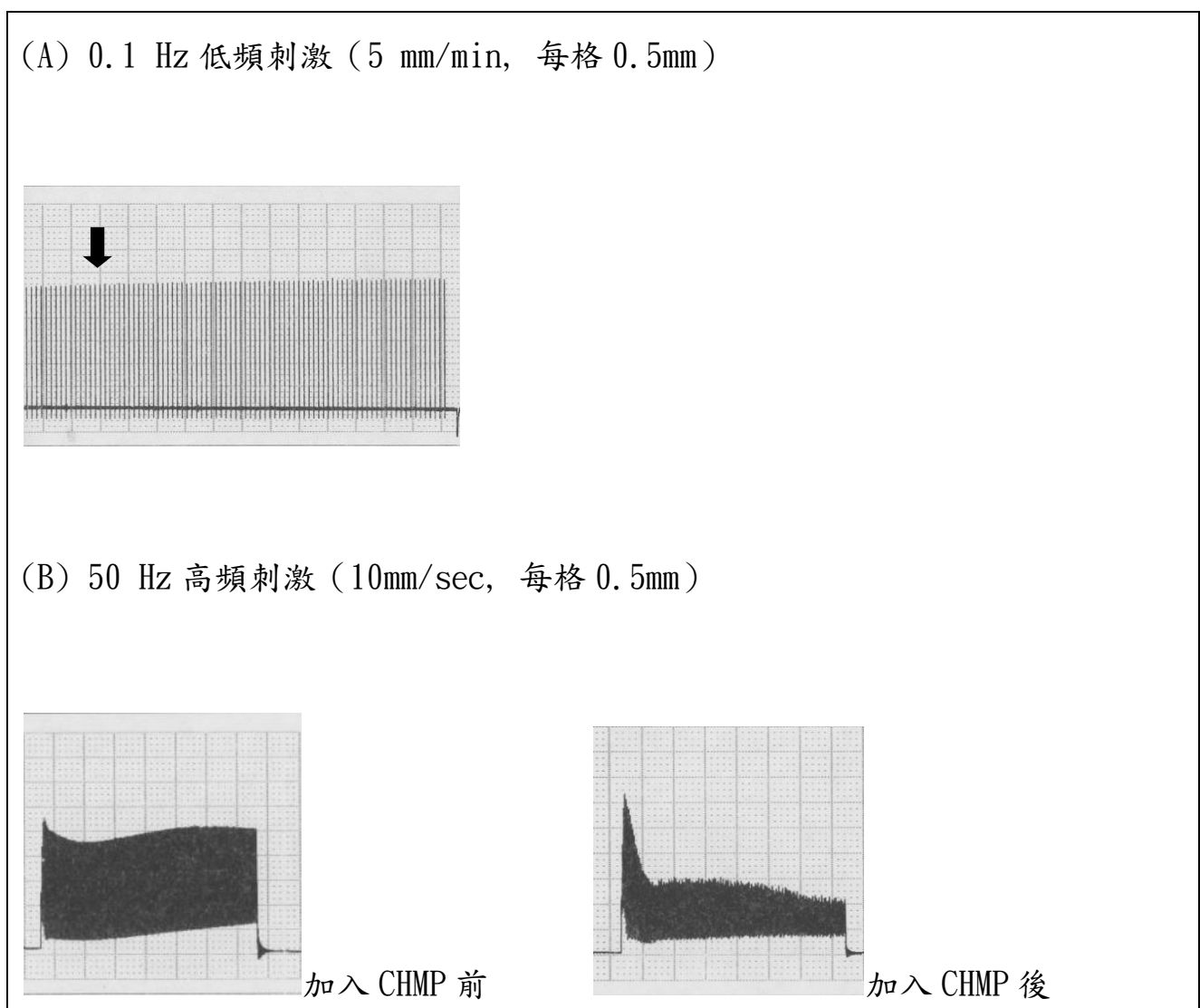
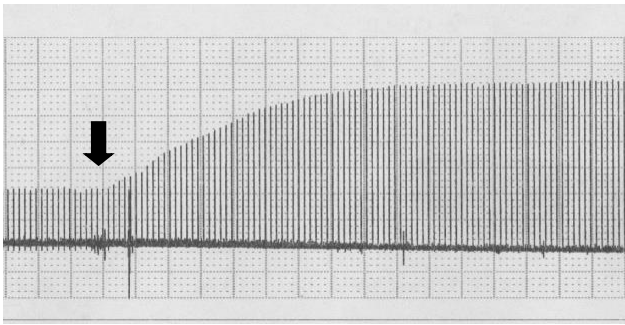


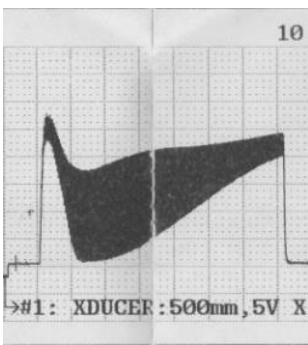
Figure 2. $100\mu\text{M}$ 9-AC 預處理(模擬肌強直)後，再加入 CHMP($10\mu\text{M}$)對於骨骼肌的影響

(A) 0.1 Hz 低頻刺激 (5mm/min, 每格 0.5mm)

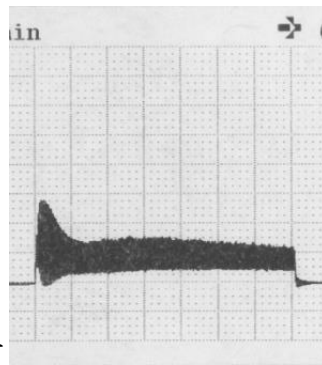


加入 9-AC 而未加入 CHMP 前

(B) 50 Hz 高頻刺激 (10mm/sec, 每格 0.5mm)



加入 CHMP 前



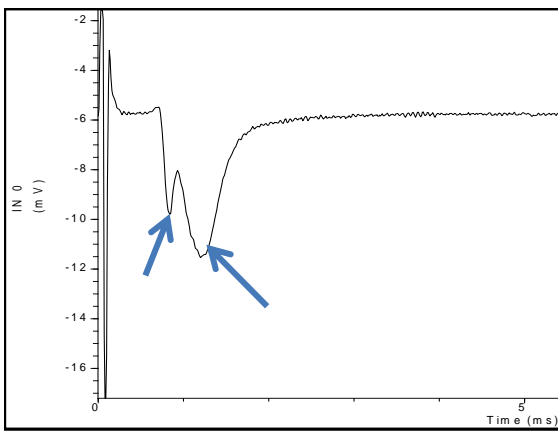
加入 CHMP 後

討論:

由圖 1-A 可以觀察到於低頻率刺激時，引發之肌肉張力在加入 CHMP(10 μ M)後，會有些微上升的現象。圖 1-B 則可觀察到於高頻刺激時，引發之肌肉張力在加入 CHMP 後，有明顯地收縮減緩(titanic failure)現象。圖 2 藉由 9-AC 誘導出肌強直，在加入 CHMP(10 μ M)後，可於高頻刺激時觀察到收縮減緩的現象，與已知藥物 Lidocaine 所呈現的結果類似。因此由以上兩項小鼠橫膈肌實驗的結果，

判斷 1-cyclohexyl-N-mesitylprolinamide hydrochloride (CHMP)和 Lidocaine 作用類似，皆屬於鈉離子通道阻斷劑，並非我們所預期的和 ML213 有相同之作用為鉀離子通道開啟劑。

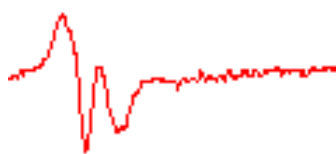
小鼠肋間三角肌神經末梢電流實驗



小白鼠的運動神經末梢有許多鉀離子通道，而鈉離子通道較少。我們將電極放置於最後一個蘭氏結附近，此處鈉離子會進入細胞膜內，可觀察到電極所記錄的第一個向下尖峰波，當迴路電流接近神經末梢時，會有大量鉀離子流出細胞外，將記錄到另一個相對向下的尖峰波。

Figure 3. 對於神經末梢電流波型之紀錄

(A) 已加入 d-TC(2 μ M)抑制肋間肌之動作電位，所記錄的神經末梢電流波型



2mV
1ms

(B) 加入 CHMP(20 μ M)作用 10 分鐘後，記錄的神經末梢電流波型



(C)作用 20 分鐘後，記錄到的神經末梢電流波型



討論：

由圖 3-A 至圖 3-C 可以觀察到，在小鼠肋間肌處理 CHMP(20 μ M)後，神經末梢的 Na⁺和 K⁺之波型會有明顯降低的現象。

總結：

CHMP 在小鼠橫膈肌張力實驗及三角肌神經末梢電流實驗所呈現之結果類似，於張力實驗高頻刺激下的表現，觀察到 CHMP 使肌肉張力有明顯收縮減緩的現象；而神經末梢電流的實驗中，也觀察到 CHMP 處理作用後，鈉離子的電流波型有明顯降低，由以上兩項結果判斷鈉離子通道皆被 CHMP 抑制。藉由這兩種實驗結果，與先前已知藥物 Lidocaine 的研究結果比對，發現 CHMP 作用的機制應類似於已知藥物 Lidocaine，而非我們所預期的為 ML213(鉀離子通道開啟劑)的類似物。然而，此項計畫的執行，有許多不足之處，於圖 3 的結果，所測到的神經末梢 Na⁺的電流波型應小於 K⁺的電流波型，導致記錄不正確的原因可能為肋間肌的活性在操作實驗的過程中，切取肌肉作為實驗材料時，已傷到薄層肌肉組織；抑或是在移動肌肉組織時，未能確實做好充氧及保持水溫的步驟，進而影響肌肉及神經的活性，致使實驗結果不如預期。

(七) 參考文獻

1. Hille B, Armstrong CM, MacKinnon R.(1999)Ion channels: from idea to reality. *Nat Med.* 5(10):1105-9.
2. Kurihara T.(2005) New classification and treatment for myotonic disorders. *Intern Med.* 44:1027-32.
3. Pusch M.(2002) Myotonia caused by mutations in the muscle chloride channel gene CLCN1. *Hum Mutat.* 19:423-434.
4. Weglewski A, Juryńczyk J.(1998)Current problems in myotonic dystrophy. *Neurol Neurochir Pol.* 32(4):903-11.
5. Trivedi JR1, Cannon SC2, Griggs RC3.(2013) Nondystrophic myotonia: Challenges and future directions. *Exp Neurol.* 18:28-30.
6. Timchenko L.(2013) Molecular mechanisms of muscle atrophy in myotonic dystrophies. *Int J Biochem Cell Biol.* 45:2280-7
7. Dunø M, Colding-Jørgensen E. Myotonia Congenita. 2005 Aug 3 [Updated 2011 Apr 12]. In: Pagon RA, Adam MP, Bird TD, et al., editors. *GeneReviews™* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2014.
8. Pongs, O.(1999)Voltage-Gated potassium channels: from hyperexcitability to excitement. *FFBS Lett.*452:31-35.
9. Yu H, Wu M, Townsend SD, Zou B, Long S, Daniels JS, McManus OB, Li M, Lindsley CW, Hopkins CR.(2011)Discovery, Synthesis, and Structure Activity Relationship of a series of N-Aryl-bicyclo[2.2.1]heptane-2-carboxamides:Characterization of ML213 as a novel KCNQ2 and KCNQ4 Potassium channel opener. *ACS Chem Neurosci.* ;2(10):572-577.
10. Korsgaard MP, Hartz BP, Brown WD, Ahring PK, Strøbaek D, Mirza NR.(2005)Anxiolytic effects of Maxipost(BMS-204352) and retigabine via activation of neuronal Kv7 channels. *J Pharmacol Exp Ther.* 314(1):282-92.
11. Priest BT, Kaczorowski GJ.(2007)Blocking sodium channels to treat neuropathic pain. *Expert Opin Ther Targets.* 11(3):291-306.
12. Todorovic SM, Jevtovic-Todorovic V.(2007)Regulation of T-type calcium channels in the peripheral pain pathway. *Channels (Austin).* ;1(4):238-45.
13. Lason W, Chlebicka M, Rejdak K.(2013)Research advances in basic mechanisms of seizures and antiepileptic drug action. *Pharmacol Rep.* ;65(4):787-801.
14. Sheets MF, Hanck DA.(2003)Molecular action of lidocaine on the voltage sensors of sodium channels. *J Gen Physiol.* 121(2):163-75.
15. Cummins TR, Rush AM.(2007)Voltage-gated sodium channel blockers for the treatment of neuropathic pain. *Expert Rev Neurother.* 7(11):1597-612.

16. Wieland SJ, Gong QH.(1995)Modulation of a potassium conductance in developing in skeletal muscle. *Am J Physiol.* 268(2 Pt 1):C490-5.
17. Rostock A, Tober C, Rundfeldt C, Bartsch R, Engel J, Polymeropoulos EE, Kutscher B, Löscher W, Hönack D, White HS, Wolf HH.(1996)D-23129:a new anticonvulsant with a broad spectrum activity in animal models of epileptic seizures. *Epilepsy Res.*23:211-223.
18. Blackburn-Munro G.(2004)Pain-like behaviours in animals – how human are they?.*Trends Pharmacol Sci.*25:299-305.
19. Jepps TA, Bentzen BH.(2014)Vasorelaxant effects of novel Kv7.4 channel enhancers ML213 and NS15370.*Br J Pharmacol.* 171(19):4413-24.
20. Van Lunteren E, Spiegler SE, Moyer M (2011). Fatigue-inducing stimulation resolves myotonia in a drug-induced model. *BMC Physiol.* 28;11:5.
21. Villegas-Navarro A, Martinez-Morales M, Morales-Aguilera A (1986). Pharmacokinetics of anthracene-9-carboxylic acid, a potent myotonia-inducer. *Arch Int Pharmacodyn Ther.*280:5-21.
22. Su TR, Zei WS, Su CC, Hsiao G, Lin MJ (2012). The Effects of the KCNQ Openers Retigabine and Flupirtine on Myotonia in Mammalian Skeletal Muscle Induced by a Chloride Channel Blocker. *Evid Based Complement Alternat Med.* Volume 2012, Article ID 803082, 1-9.