

• 基础研究 •

Na⁺ / Ca²⁺ 交换对狗心室肌细胞复极的影响

巩燕¹ 王焱¹ Bela Szabo²

摘要 探讨生理状态下 Na⁺ / Ca²⁺ 交换 (NCX) 双向模式的离子转换对复极的影响, 以及在转换失调时是否为潜在的触发心律失常的机制。应用全细胞膜片钳技术研究单个心室肌细胞在不同频率刺激下动作电位时程 (APD) 的变化、药物干预改变 NCX 活性的条件下 APD 的变化以及与细胞舒张的关系。结果: 固定频率 (1.0 Hz) 刺激 APD 的变化范围和频率改变 (0.6~1.0 Hz) 时 APD 的变化范围均在一个相对固定的膜电位 (10~40 mV) 范围内。用 10 mmol/L EGTA 缓冲细胞内游离钙后, APD 的变异系数明显减小。而废除基质网功能及应用钙通道阻滞剂 nifedipine 并不改变 APD 的变异程度。因刺激频率减慢造成复极和细胞松弛的不匹配, 从而导致后收缩的出现以及 APD 的延长。在强化 NCX 逆向活性的条件下穹隆膜电位显著降低, 而 APD 显著延长。结论: 在动作电位的复极过程中 NCX 的逆向模式和顺向模式应该与机械收缩和松弛有完美的匹配。生理状态下的心脏一旦这种匹配失调, NCX 会向错误的方向运载钙, 从而造成基质网内钙超载, 诱发心律失常。

关键词 电生理学 动作电位 复极 Na⁺ / Ca²⁺ 交换 早期 延迟后除极 后收缩 心室肌细胞

中图分类号 R331.3⁺8 **文献标识码** A **文章编号** 1007-2659(2005)05-0368-05

GONG Yan, WANG Yan, Bela Szabo Effect of Na⁺ / Ca²⁺ Exchanger on the Repolarization of Canine Ventricle

To determine whether a mismatch between action potential (AP) repolarization and relaxation of the contraction has a arrhythmogenic effect. We studied the AP and contraction of single myocytes from the left ventricle in adult mongrel dogs by patch clamp system, which included beat-to-beat repolarization variability during different frequency stimulation as well as the relationship between AP and relaxation of the myocyte when enhancing the reverse mode of NCX. Results: There was a variance in the repolarization between 10 mV and -40 mV during the constant stimulation at 1.0 Hz or switching from 0.6 Hz to 1.0 Hz. After blocking the Ca²⁺ transient by intracellular dialysis with 10 mmol/L EGTA, the coefficient variability (CV = SD/mean APD%) significantly reduced. During a rate change of the stimulation from 0.6 Hz to 1.0 Hz, the AP duration increased (P < 0.05). Contraction was accompanied by an after contraction (A-CON). Substituting [Na⁺]_o with same amount of Li⁺ significantly decreased the dome of the AP, (P < 0.05). Conclusions: In keeping the normal function of canine myocyte, the reverse and forward activity of NCX should work in a well-matched manner with the rise and relaxation of the contraction. Otherwise it may be arrhythmogenic even in a physiological heart [Chinese Journal of Cardiac Pacing and Electrophysiology, 2005, 19(5): 368~372]

Electrophysiology Action potential Repolarization Na⁺ / Ca²⁺ exchange Early/delayed afterdepolarization After-contraction Ventricular myocyte

跨壁心室肌复极离散 (TDR) 是致心律失常性单向阻滞和折返的重要机制^[1-3], 而同一心肌细胞的动作电位时程 (APD) 的变异很可能为心律失常的另一机制^[4]。细胞膜上的钠-钙转运蛋白 (Na⁺ / Ca²⁺ exchange NCX) 可能是影响 APD 变异的重要因素之一。目前, 国外研究病理状态下的 NCX 电生理

特性的改变较多^[5]。研究者的共识是 NCX 的顺向模式是在细胞松弛时将钙离子转运出细胞外, 而生理状态下的 NCX 逆向转运模式在复极中的意义还不甚明确。NCX 的离子转运模式失调是否为引发心律失常的另一重要机制的研究, 在国内外是一个前沿课题。本课题研究的目的在于探讨生理状态下 NCX 双向模式的离子转运对复极的影响, 以及在模式转换失调时是否成为潜在的触发心律失常的机制。

1 材料与与方法

本研究是在美国 Oklahoma 大学医学科学中心心律失常研究所细胞电生理研究室完成。

作者单位: 1 厦门大学医学院 厦门中山医院心脏中心 (福建厦门 361004)
Medicial College of Xiamen University Xiamen 361004, Fujian, China

2 美国 Oklahoma 大学心律失常研究中心

作者简介: 巩燕 (1969-), 女 (满族), 北京人, 副教授, 医学博士, 美国 Oklahoma 大学心律失常研究中心访问学者, 主要研究方向为心律失常。

然转为 1.0 Hz 的刺激, 图 2 显示其中一个细胞的连续 41 个 AP 的叠加。提示频率转换后平均 13 ± 2 次 AP 后 APD 的变异趋于随机, 呈正态分布。说明心肌细胞在频率改变的条件下, 需要 13 次左右的心动周期的适应才趋于稳定。还观察到这种频率适应所引起的 APD 的变化范围也在一个相对固定的复极中期膜电位 $10 \sim -40$ mV 范围内(箭头所示)。

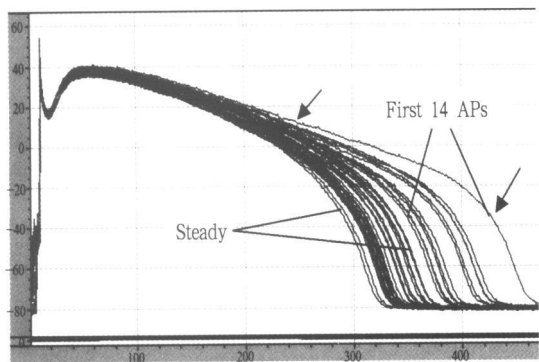


图 2 同一心肌细胞在刺激频率改变 (0.6~1.0 Hz) 后连续记录 40 个 AP 的叠加

10 mmol/L EGTA 电极液 (细胞内液) 螯和细胞内钙离子后, APD 的变异明显由 2.3 ± 0.8 减少到 1.3 ± 0.3 ($n = 19, P < 0.01$)。但用 $5 \mu\text{mol/L}$ nifedipine 阻断 I_{CaL} 以及 $3 \mu\text{mol/L}$ thapsigargin 和 $10 \mu\text{mol/L}$ ryanodine 废除基质网功能却对 APD 的变异性均不产生显著影响 ($n = 11, 2.4 \pm 0.4$ 和 $n = 10, 2.6 \pm 0.5, P > 0.05$)。

2.2 刺激频率突然减慢导致 AP 复极和细胞松弛间的不匹配 给细胞施加从快频率到慢频率 (1.0 Hz 到 0.6 Hz) 转化刺激, APD 从 278 ± 8 ms 增至 320 ± 9 ms ($n = 16, 220$ APs, $P < 0.05$)。其中 5 个细胞显示频率减慢后, 机械舒张较 AP 复极提前结束, 并伴随后收缩 (after-contraction A-Con)。图 3 为其中之一。

2.3 降低细胞膜外钠离子浓度对狗心肌细胞 AP 及收缩的影响 等量等价 Li^+ 替换细胞外液 40 mmol/L Na^+ , 促使 NCX 以逆向模式工作, 即摄钙排钠过程。但并不影响其他电压依赖性离子通道的特性。穹隆的高度明显减少, 从 4.8 ± 0.3 mV 到 -10.6 ± 1.2 mV, $P < 0.05$ 而 APD 显著性增加, 从 330 ± 13 ms 到 368 ± 14 ms, $P < 0.05$ ($n = 5$)。收缩幅度明显增强 25% (2.2 ± 0.1 到 3.7 ± 0.5 相对单位, $P < 0.05$) 图 4 左所记录的是低 $[\text{Na}^+]_o$ 液施加过程中, 收缩活动及动作电位的逐跳变化。并记录到早期后除极 (EAD) 的产生。图 4 右是图 4 左中选择的 5 个 AP 及相应收缩活动的叠加。

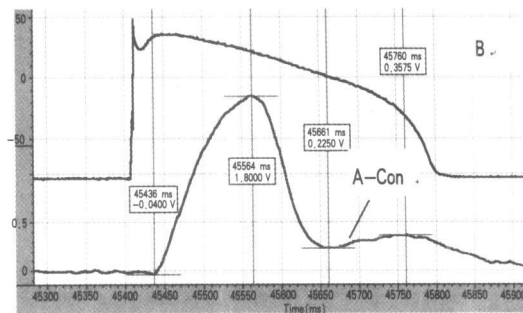


图 3 刺激频率突然减慢 (1.0~0.6 Hz) 导致复极拖后于舒张的完成并诱发后收缩

3 讨论

3.1 单个细胞 AP 复极时间呈现逐跳变异性, 变异在相对固定的膜电位范围 10 mmol/L EGTA 螯和游离钙使 APD 的变异明显减小, 提示细胞内游离钙与之密切相关。当然, 细胞内游离钙可以同时受至少 3 种主要因素的调控: L 型钙通道电流 (I_{CaL})^[6]、钠钙交换电流 (I_{CX})^[7] 和基质网 Ca^{2+} 的释放和摄取^[8,9]。本研究结果显示, 联合应用 $10 \mu\text{mol/L}$ ryanodine 和 $3 \mu\text{mol/L}$ thapsigargin 阻断基质网后并未影响 APD 的变异。而应用二氢吡啶敏感型 (DHPs) 钙通道阻滞剂 nifedipine ($5 \mu\text{mol/L}$) 有效阻断 I_{CaL} 后, 也未影响 APD 的变异。AP 的平台期可呈现平缓、穹隆, 下斜或以上情况的组合。主要特点是膜电位变化不大。这是因为此期中内向电流和外向电流保持平衡。内向离子流主要是 I_{CaL} , 外向离子流主要是超快外向钾电流 (I_{Kur})、快外向钾电流 (I_{Kr})、慢外向钾电流 (I_{Ks})。因 I_{Ku} 的门控非常快, 其形状被 AP 掩盖。 I_{K} 比 I_{Kr} 激活慢, I_{K} 随复极而逐渐加强, 它们共同维持着 AP 平台期离子流的平衡, 轻度改变某一离子流都会明显改变 AP 平台期时间。 I_{K} 在 $0 \sim +40$ mV 的范围内激活, 膜电位低于 -40 mV 时, 复极加速, 膜电位从平台期迅速降低为舒张期水平, I_{K} 对晚期加速复极起主要作用。Massimiliano 等^[4] 报道用 L-691, 121 阻断 I_{Kr} 可以明显增大 APD 变异系数。 I_{Ks} 内向整合钾电流 (I_{K1}) 的激活更落后于 I_{K} , 当复极进行到更负的膜电位水平时, I_{K} 钝化, 低于 -30 mV 时, I_{K1} 加速复极。AP 在膜电位相对较正的 I_{CaL} 和瞬间外向钾电流 (I_{to}) 激活范围叠加效果很好, 而在 -40 mV 以下 I_{Ks} 、 I_{Kr} 和 I_{K1} 的激活范围平行化程度也很高。故认为以上离子在生理状态下对 APD 变异所起的作用不是很大。而且同一细胞固定频率刺激时的离子含量不会呈瞬间变化。所以最可能对 $0 \sim +40$ mV 这个膜电位范围内造成影响

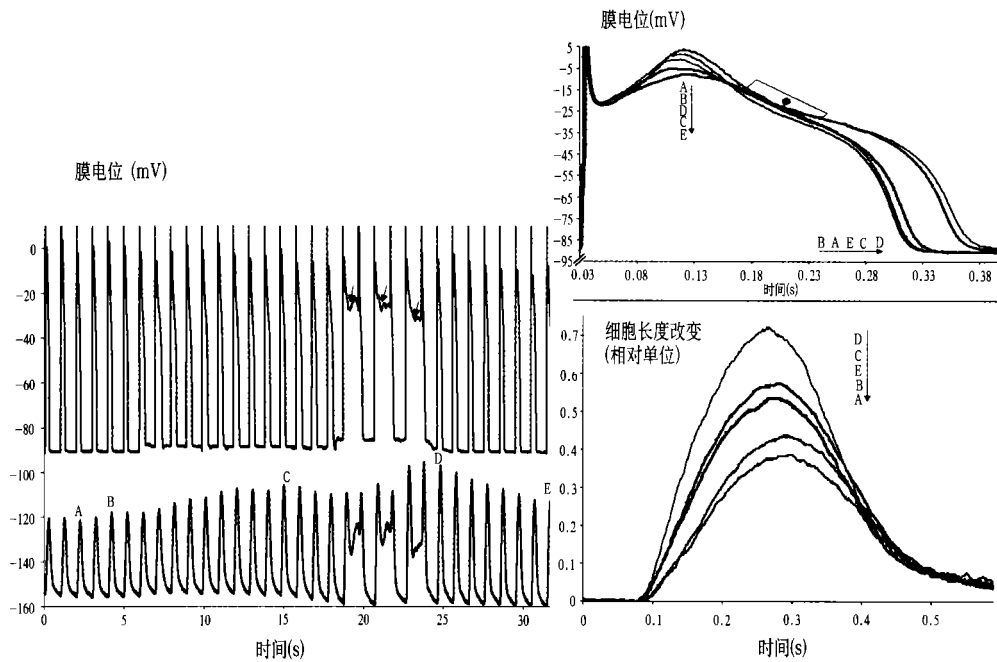


图 4 降低细胞外 Na⁺ 浓度 (40 mmol/L Li⁺ 代替等量 Na⁺) 对 AP 和收缩的影响 箭头示后收缩和 EAD。AP 穹隆水平降低而 APD 延长。* 所示为 -15 ~ -30 mV。A 低钠液干预前对照, B 干预开始起效时的收缩, C EAD 发生前最大幅度的收缩, D EAD 发生后的收缩, E 新的稳定状态下的收缩

是 NCX。

3.2 当复极与细胞松弛过程不相匹配时, NCX 将以错误模式工作。NCX 在细胞膜的两端分别带有 3 个 Na⁺ 和 1 个 Ca²⁺, 转运过程中 3 个 Na⁺ 置换 1 个 Ca²⁺。所以 Na⁺ 端总有一个净电荷产生。方向与 Na⁺ 的运动方向一致^[10]。电化学驱动力作用于 NCX 使之可沿两个方向转运。向细胞外排出 Ca²⁺ 吸收 Na⁺ 的过程被称为正向转运, 反之则为逆向转运。静息期离子浓度相对稳定, 电驱动力为唯一驱动力。膜电位为静息水平 (-84 mV) 时, Na⁺ 内流, NCX 对除级起一定作用。当膜电位水平相对较正时, NCX 将 Na⁺ 排出细胞外, NCX 逆向转运, Ca²⁺ 转运至细胞内。膜电位在平台期水平时, 接近 0 mV 左右, 没有作用于 Na⁺ 的电驱动力。使 Ca²⁺ 有充分的时间作用于收缩系统。当 AP 时间较正常延长时, 加强 NCX 逆向转运活性。Ca²⁺ 在肌浆网内积累, 可导致肌浆网内 Ca²⁺ 超载从而导致心律失常。

EAD 和延迟后除级 (DAD) 的重要性在于它的致心律失常作用。笔者认为 I_{cx} 在 EAD 和 DAD 的产生中起重要作用。在相对较慢的频率刺激下 (0.6 Hz), 复极结束时间拖后于舒张结束时间, 在此条件下, 细胞内低 [Ca²⁺]_i 在相对正的膜电位水平激活 NCX 的逆向模式。也就是说游离 Ca²⁺ 在复极结束前就已经被全部吸收回肌浆网, 此时的电驱动力有利于 NCX 的逆向模式, 因此 Ca²⁺ 将朝着“错误方

向”转运, 造成细胞肌浆网内 Ca²⁺ 超载, 从而诱发 EAD 或 DAD 的产生。Antzelevitch^[11] 的研究指出, 心室肌透壁性电异质性以及不同细胞频率依赖性 APD 的适应程度不同是致心律失常的重要因素。这个论点已得到公认。但笔者并不完全同意其中 APD 的绝对延长是导致心律失常的必要条件的论点, 在功能正常的心室肌并没有观察到超过 400 ms 的 M 细胞, 故认为只要 AP 2 相复极与细胞舒张不匹配时, NCX 就有潜在的致心律失常作用。这种情况下, APD 并不一定延长。

3.3 NCX 逆向模式的活性增强导致细胞内 Ca²⁺ 超载是致心律失常性 EAD 和 DAD 产生的基础。结果表明, 强化 NCX 的逆向模式活性可加强 Ca²⁺ 对肌浆网的装载作用, 这是致心律失常的潜在机制。本试验用降低 [Na⁺]_o 的方法加强 NCX 的逆向转运活性。低 [Na⁺]_o 液抵达的过程中, 收缩幅度逐跳增加直至达到新的稳定状态。说明 NCX 的逆向模式可以装载 Ca²⁺。NCX 逆向模式装载的 Ca²⁺ 多于其顺向模式卸载的 Ca²⁺, 因而肌浆网内 Ca²⁺ 得以蓄积。NCX 逆向模式在低 [Na⁺]_o 液逐渐抵达的过程中逐渐增强的效应可以从相应 AP 穹隆的膜电位水平逐渐降低得以证明。同时 NCX 的逆向活性的增强还加强外向 I_{cx} 的强度因而减低 AP 穹隆的高度。当膜电位复极至相对较负的水平, NCX 因电压驱动力转为顺向模式工作, 因此造成复极的延迟, 因而

APD延长。复极速度的减慢与 2期 NCX 以逆向模式工作产生过渡极化电流的假设相一致。

用等量 Li^+ 置换 Na^+ 减低 $[Na^+]$ 。不影响任何其他离子流的特性,仅增强 NCX 的逆向转运活性。故认为凡可增强此活性的试验手段均可产生本试验的效果。在相对较正的膜电位范围内,增多的 Ca^{2+} 装载基质网,致使基质网 Ca^{2+} 超载而致心律失常。同时增强的 I_{NCX} 又强化去极化过程,从而减低穹隆高度。当 NCX 在相对较负的膜电位水平转为排 Ca^{2+} 的顺向模式时,需要相应更多的 Na^+ ,实际上增强的 I_{NCX} 强化了去极化过程而使 APD 延长。

因为穹隆被由装载 Ca^{2+} 形成的超极化电流抵消,同时相应的 APD 逐渐延长。在叠加的 AP 图形上穹隆的逐渐降低和 APD 的逐渐延长形成的交叉在 $-15 \sim -30 mV$ 的膜电位范围内。提示在这个膜电位范围,NCX 由逆向模式转为顺向模式。在膜电位水平下降至一定水平时,基质网内蓄积的 Ca^{2+} 由顺向 NCX 转运出细胞外时需要相应数量的 Na^+ 内流。结果导致除极度的强化,APD 延长。另一方面,基质网内 Ca^{2+} 的蓄积达饱和时,产生自发性基质网 Ca^{2+} 的释放,是 EAD、DAD 产生的重要机制。

心脏结构和功能正常者可在夜间心率减慢时和在交感神经兴奋的条件下发作心律失常。电解质紊乱如低钠血症以及应用任何延长 APD 的药物可能诱发心律失常。笔者所阐述的电-机械匹配失调机制可能是以上心律失常的重要机制。抑制 NCX 的逆向转运有望成为抗心律失常的作用靶点。

参考文献

- 1 Antzelevitch C. The M cell Invited editorial comment[J]. Cardiovasc Pharmacol Ther 1997; 2: 73
- 2 Antzelevitch C, Sicouri SH, Litovsky A, et al Heterogeneity within the ventricular wall: electrophysiology and pharmacology of epicardial, endocardial and M cell[J]. Circ Res 1991; 69: 1427
- 3 Anyukhovsky EP, Sosunov EA, Cainullin RZ, et al The controversial M cell[J]. J Cardiovasc Electrophysiol 1999; 10: 244
- 4 Massimiliano Z, Andrew EP, Yang L, et al Beat to beat repolarization variability in ventricular myocytes and its suppression by electrical coupling[J]. Am J Physiol 2000; 278: 677
- 5 Studer R, Reinecke H, Bilger J, et al Gene expression of the Na^+ / Ca^{2+} exchange in end stage human heart failure[J]. Circ Res 1994; 75: 443
- 6 McC Brooks C, Hoffman BF, Suckling EE, et al The effects of heart rate, action of autonomic nerves and chemical mediators on cardiac excitability. In McC Brooks C, Hoffman BF, Suckling EE, eds. Excitability of the Heart[M]. 21. New York: Grune & Stratton, 1995. 221- 230
- 7 Szabo B, Sweidan R, Rajagopalan CV, et al Role of Na^+ / Ca^{2+} exchange current in Ca^{2+} - induced early afterdepolarization in Purkinje fiber[J]. J Cardiovasc Electrophysiol 1994; 5: 933
- 8 Cheng H, Lederer WJ, Cannell MB. Calcium sparks: Elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle [J]. Science 1993; 262: 740
- 9 LopezLopez J, Schacklock PS, Balke CW, et al Local stochastic release of Ca^{2+} in voltage clamped rat heart cells. Visualization with confocal microscopy[J]. J Physiol (Lond), 1994; 480: 21
- 10 Blaustein MP, Lederer WJ. Sodium/calcium exchange: Its physiological implications[J]. Physiol Rev 1999; 79(3): 763
- 11 Antzelevitch C. Ion channels and ventricular arrhythmogenesis: Cellular and ionic mechanisms underlying the Brugada syndrome[J]. Curr Opin Cardiol 1999; 12: 274 (2004- 09- 28 收稿)

(李晓清编辑)

加入台湾华艺 CEPS中文电子期刊服务声明

《中国心脏起搏与心电生理杂志》已于 2004年 8月起,加入台湾中文电子期刊服务——思博网 (CEPS)。中文电子期刊服务——思博网是目前台湾地区最大的期刊全文数据库,收录台湾地区 300余种核心期刊的全文,其访问地址为: www. ceps.com.tw。自此,读者可以通过这一网址检索《中国心脏起搏与心电生理杂志》于 2004年起各期的全文,在一段时期后,还可以回溯检索 2003年前历年的全文。

此外,由于《中国心脏起搏与心电生理杂志》被 CEPS收录,故凡向本刊投稿者,均视为其文稿刊登后可供国内外文摘刊物或数据库收录、转载并上网发行;其作者文章著作权使用费与稿酬一次付清,本刊不再另付其它报酬。

华艺 CEPS目前除提供免费网上检索目次和摘要,并且每日动态更新期刊全文。未来更将免费提供给本刊投稿者《期刊引文频次分析检索与作者文章引用统计分析》之数据资料。请各位继续支持本刊,谢谢!