

家兔右室流出道细胞双孔钾通道电流特性的分析研究

熊玉琴, 刘泰烽, 李源, 宗其梅, 黄卫斌

【摘要】 目的 已知特发性室速主要起源于右室流出道 (RVOT), 由于技术上的困难, 目前对特发性右室流出道室速 (RVOT-VT) 的离子通道机制研究很少, 本实验意在探索右室心肌 (RV) 和 RVOT 的双孔钾通道电流 (IK_{2p}) 的特性及其在 RVOT-VT 发生机制中可能参与的作用。方法 采用全细胞膜片钳技术记录右室和右室流出道心肌细胞的单细胞电流。结果 RVOT 的稳态外向电流较右室的小。对稳态电流进一步研究发现, 右室流出道和右室心肌细胞上均存在 IK_{2p}。右室流出道细胞的 IK_{2p} 电流密度明显小于右室细胞。结论 首次在电生理水平上, 证实了家兔右室心肌细胞上存在 IK_{2p}, RVOT 心肌细胞的 IK_{2p} 电流密度小于 RV 心肌细胞, 是构成右室流出道 APD 离散度增大及外向电流降低的基础, 从而易出现 EAD, 进而促进 RVOT-VT 的发生。

【关键词】 膜片钳制; 右室流出道; 心肌细胞; 心律失常; K_{2p} 电流

【中图分类号】 R 111 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1008-5971 (2012) 06-0983-03

Difference in Current Densities of Two Pore Domain Potassium Channel between Ventricular and Ventricular Outflow Tract Cardiomyocytes in Rabbit Heart XIONG Yu-qin, LIU Tai-feng, LI Yuan, et al. Fujian Medical University Xiehe Clinical Medical College, Xiamen 361004, China

【Abstract】 Objective Idiopathic ventricular tachycardia mainly originates from right ventricular outflow tract (RVOT). The ionic channel mechanism of idiopathic ventricular tachycardia arising from right ventricular outflow tract (RVOT-VT) has been seldom reported experimentally, for the technical difficulties. The aim of the experiment was to explore the difference of IK_{2p} between the myocardial cells in RVOT and free right ventricular wall (RV) in rabbit heart and the mechanism of the ventricular tachycardia genesis from RVOT. **Methods** The ionic currents of rabbit cardiomyocytes in RVOT and in RV were recorded with the whole-cell patch-clamp technique. **Results** The steady-state current in RVOT cardiomyocytes was less than that in RV. The further observation on the steady-state current showed that IK_{2p} currents existed in rabbit RVOT and RV myocardial cells, displaying that IK_{2p} current in RVOT was less than that in RV. **Conclusion** It was the first time on the electrophysiological level verified the existence of the IK_{2p} current in rabbit. The low IK_{2p} current density in some RVOT myocytes led to lower the outward current and prolonged APD in RVOT myocytes. These might induce EAD and resulted to genesis of RVOT-VT.

【Key words】 Patch-clamp; Right ventricular outflow tract; Cardiomyocytes; Arrhythmia; Two-pore domain potassium channel

室性心律失常是临床上常见的心律失常, 常发生于有器质性心脏病的患者, 但仍有 15% 室速和 10% 室颤患者发生于没有器质性心脏病的患者, 被称为特发性室速。特发性室速主要起源于右室室流出道, 称为特发性右室流出道室性心动过速 (RVOT-VT)。目前对 RVOT-VT 的离子通道机制报道很少。

作者单位: 361004 福建省厦门市, 福建医科大学协和临床医学院 (熊玉琴); 北京大学生命科学学院生理学及生物物理学系 (刘泰烽); 厦门大学附属中山医院 厦门市心脏中心 (李源, 宗其梅); 福建医科大学协和临床医学院 厦门大学附属中山医院 厦门市心脏中心 (黄卫斌)

通讯作者: 黄卫斌, 361004 福建省厦门市, 福建医科大学协和临床医学院 厦门大学附属中山医院 厦门市心脏中心; E-mail: xm-huangbo@163.com

IK_{2p} 电流在心血管系统中的重要作用, 日益为人们所关注。本工作运用膜片钳技术, 观察右室流出道和右室心肌细胞是否存在 IK_{2p}, 并研究右室流出道心肌细胞 IK_{2p} 特性。

1 材料与与方法

1.1 心肌细胞的分离 将体质量 1.5~2.5 kg 的新西兰大耳白兔 (购自厦门大学动物室) 用乌拉坦静脉麻醉后迅速开胸取出心脏, 置于通氧的 4℃ 冰台式液中, 剪去心包, 游离主动脉, 心脏经修饰后连接在 Langendorf 心脏灌流装置上, 经主动脉根部逆行用无钙台式液灌流 (灌流压约 70 cmH₂O, 恒温 37℃), 边灌流边进行修剪, 清楚分离出右心室, 灌流至液体变清后 (4~6 min) 改灌含有 0.04 mmol/L CaCl₂ 和 0.3 mg/ml II 型胶原酶 (worthington) 的酶液, 酶液反复循环灌流 10~20 min, 至心脏膨大, 松弛变软后, 用眼科剪以肺动脉瓣为中心, 向右室方向, 取半径约 3 mm 的圆锥形心肌组织作为右室

流出道组 (RVOT 组), 即为实验组, 在远离右室流出道的右室游离壁取心肌组织作为右室组 (RV 组), 即为对照组, 并分别置于 37°C KB 液中用眼科剪剪碎, 轻轻吹打, 分离的单细胞在 KB 液中 -4°C 下保存, 1~8h 内用于电生理记录。

1.2 液体的配制 无钙台氏液 (mmol/L): KCl 5.4, NaCl 137, MgCl₂ 1.0, NaH₂PO₄ 0.33, HEPES 5, Glucose 10, PH 值用 1mol/L NaOH 调至 7.35~7.36。KB 液 (mmol/L): KCl 30, L-谷氨酸 50, taurine 20, KH₂PO₄ 30, MgCl₂ 1, HEPES 10, Glucose 10, EGTA 0.5, PH 值用 KOH 调至 7.38。IK_{2p} 电流电极外液 (mmol/L): KCl 5.4, NaCl 137, MgCl₂ 1.0, NaH₂PO₄ 0.33, HEPES 5, Glucose 10, CaCl₂ 1.8, TEA 25, CdCl₂ 0.5, PH 值用 NaOH 调至 7.35~7.36。IK_{2p} 电流电极内液 (mmol/L): KCl 120, NaCl 4, MgCl₂ 1, HEPES 10, EGTA 0.5, ATP-K₂ 5, 4-AP 5, PH 值用 1mol/L KOH 调至 7.3。

1.3 全细胞膜片钳记录及分析软件 应用全细胞膜片钳技术, 检测单细胞兔心室肌细胞的电流^[3]。心肌细胞置于倒置显微镜的细胞池中, 贴壁约 10min, 并用细胞外液灌流约 15min, 选择表面光滑纹理清楚的细胞做电生理学记录。实验在室温 (23~25°C) 下进行。用微玻璃控制仪分多步控制微电极, 使其充入电极内液并加入水后的电阻为 3~5mΩ, 采用高阻封接, 封接电阻 >1GΩ, 负压破膜, 使电极内液与细胞内液相通, 形成全细胞钳制, 随后补偿电容电流, 封接破膜后使灌流液与电极内液平衡约 3min 后开始记录, 脉冲信号由 Pulse + Pulsefit 8.31 软件控制, 经 EPC-10 放大器 (Heka Electronic Co. 德国) 放大后通过 Ag-AgCl 电极丝和填充电极内液的玻璃微电极导入细胞, 产生的电流信号经 EPC-10 放大器转换并存储于计算机硬盘中, 供测量分析用。在电压钳模式下, 钳制电位于 -40mV, 以失活钠通道, 20mV 阶跃由 -120mV 至 +80mV, 持续 500ms, 频率 1Hz, 记录 IK_{2p} 电流。

1.4 统计学方法 以单个细胞为统计单位, 使用单位膜面积上的电流密度作为同一标准, 电流密度 = 电流强度/电容 (pA/pF), 计量资料采用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用相应的独立样本 *t* 检验, 配对 *t* 检验, 以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。n 表示细胞数。

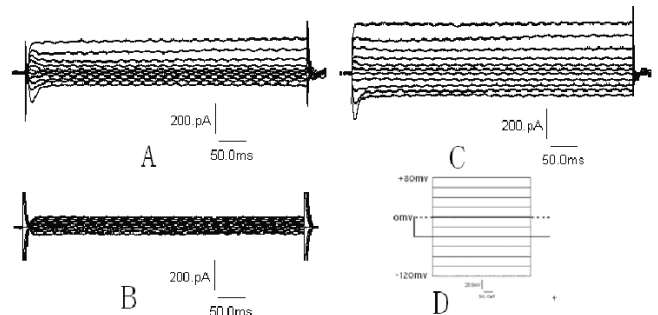
2 结果

2.1 稳态电流的记录 参照宋艳东等^[4]的实验方法, 在电极内液中加入 5mmol/L 4-AP 阻断 I_{to} 和 I_{Kur}, 在细胞外液中加入 0.5mmol/L CdCl₂ 和 25mmol/L TEA 阻断 I_{Ca²⁺} 和 I_{K1}, 钳制电位为 -40mV, 实验电位 -120~+80mV, 以 20mV 步幅递增, 引发出一组非时间依赖性电流, 称为稳态电流。发现右室流出道心肌细胞的稳态外向电流密度较右室心肌细胞的小, 甚至有些右室流出道心肌细胞无明显稳态外向电流, 而右室心肌细胞的稳态外向电流均比较大 (见图 1)。此结果与宋艳东等研究结果一致。钳制电位为 +70mV 时, 在 RVOT 中有 20 (n=25) 的细胞稳态电流密度小于 1pA/pF, 而 RV 中未发现稳态电流密度小于 1pA/pF 的细胞, 两部位外向电流密度分布见表 1。稳态电流的成分比较复杂, 而 IK_{2p} 被认为是构成稳态电流的主要成分之一。因此, 进一步对 IK_{2p} 进行研究。

表 1 在 +70mV 时, RVOT 和 RV 的稳态电流的电流密度 (%)

Table 1 Current density of the steady state current in +70mV, RVOT and RV

类型	例数	<1pA/pF	1-3pA/pF	>3pA/pF
RVOT 细胞	25	20	72	8
RV 细胞	20	0	85	15



注: A 为 RVOT 心肌细胞较大的稳态电流; B 为 RVOT 心肌细胞较小的稳态电流; C 为 RV 典型的稳态电流; D 为激活该电流的刺激程序

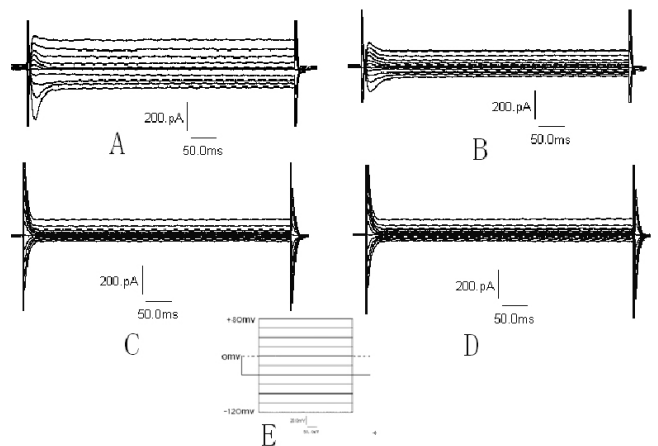
图 1 RVOT 和 RV 的稳态电流

Figure 1 Steady state current of RVOT and RV

2.2 IK_{2p} 的特性研究

2.2.1 IK_{2p} 的记录 在上述实验中, 当灌流液中加入 0.1mmol/L 奎尼丁 (为一种双孔钾通道阻滞剂) 灌流 10min 后, 稳态外向电流的幅度明显下降, 这种电流能被奎尼丁明显抑制, 减少的部分即为 IK_{2p} (见图 2, 3)。

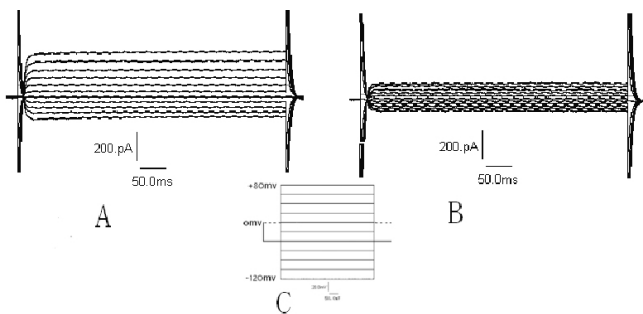
2.2.2 右室流出道 IK_{2p} 的分析 采用两样本 *t* 检验比较右室流出道和右室的 IK_{2p}, 钳制电位为 +60mV 时, 右室流出道心肌细胞 IK_{2p} 的电流密度为 (0.41 ± 0.17) pA/pF (n = 25), 右室心肌细胞的 IK_{2p} 的电流密度为 (0.57 ± 0.19) pA/pF (n = 20), 右室流出道心肌细胞 IK_{2p} 的电流密度较右室心肌细胞的 IK_{2p} 的电流密度小 (*P* < 0.05, 见图 2-4)。



A、C 依次为稳态外向电流较大和较小的 RVOT 心肌细胞的稳态电流; B、D 分别为稳态外向电流较大和较小的 RVOT 心肌细胞加入奎尼丁后所记录的离电流, 减少部分为 IK_{2p}, 由图可知稳态外向电流较小的 RVOT 细胞在加药前后离子流无明显变化; E 为激活该电流的刺激程序

图 2 奎尼丁对 RVOT 心肌细胞稳态电流的作用

Figure 2 Current role of quetiapine clothianidin on RVOT myocardial cell homeostasis



A 为典型的 RV 心肌细胞的稳态电流; B 为 RV 心肌细胞加入奎尼丁后所记录的离子流, 由图可知 RV 心肌细胞在加要前后离子流发生明显变化

图 3 奎尼丁对 RV 心肌细胞稳态电流的作用

Figure 3 Current role of quetiapine clothianidin on RV myocardial cell homeostasis

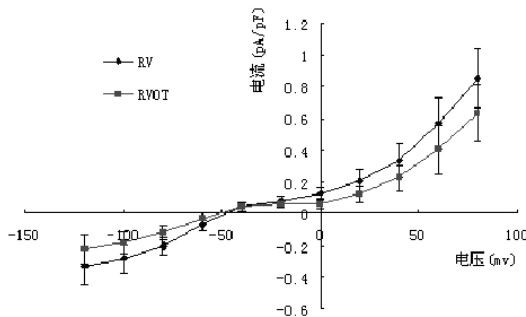


图 4 RVOT 和 RV 对奎尼丁敏感电流的 I ~ V 曲线

Figure 4 RVOT and RV on quetiapine clothianidin sensitive current I ~ V curve

3 讨论

在心律失常的发生中, 直接由离子通道活动异常而发生的心律失常, 以触发活动最为明显, 机制也比较清楚, 触发活动的特点是其发生由动作电位触发, 是在一个动作电位的中或其后所发生的单个或连续性去极化波。触发活动可分为 EAD 和 DAD。EAD 是在一个动作电位尚未完全复极时, 即在动作电位的平台期, 出现了新的去极化波。由于 EAD 可以传播, 因而可以产生快速性心律失常。目前, EAD 的离子机制比较清楚。凡能延长 APD 的因素, 即外向电流的减小和 (或) 内向电流的增强均可导致 EAD 的发生^[5]。现有的研究表明, 绝大多数的 RVOT - VT 的发生机制是触发活动^[6]。宋艳东等^[4]研究发现, 部分 RVOT 细胞的动作电位具有很长的平台相, 其动作电位时程很长, 甚至有些细胞的动作电位无法复极到静息电位水平, 并观察到 RVOT 细胞的 EAD 和 DAD, 本实验室梁生辉等人也得到类似的结果^[7]。对其进一步研究发现, 有些 RVOT 细胞的稳态外向电流很小, 甚至缺乏稳态外向电流, 这对应的动作电位就是动作电位时程很长甚至动作电位不能复极到静息电位水平。本实验发现有些 RVOT 细胞的稳态外向电流很小, 甚至缺乏稳态外向电流, 此结果与宋艳东等研究相一致。从图 1 看到稳态外向电流类似背景电流, 具有无失活或慢失活的特点, 但具有电压依赖性, 因此, 本研究推测稳态电流对动作电位的各个时相都有重要的影响, 特别是动作电位的复极阶段。有些 RVOT 细胞的稳态外向电流很小, 甚至缺乏稳态外向

电流是导致其动作电位时程很长甚至无法复极到静息电位水平的原因之一, 在一定程度上构成了 EAD 发生的基础。

稳态电流的成分复杂, I_{K2p} 是构成稳态电流的主要成分之一, 在稳定静息膜电位、促进复极过程和调控细胞兴奋性等方面发挥重要作用。 I_{K2p} 通道, 即双孔钾通道, 由两个亚单位构成, 而每个亚单位均有 2 个 p 环, 从形成双孔钾通道, 广泛分布于体内各种可兴奋和不可兴奋细胞。受许多物理性和化学性刺激的调控, 如细胞牵拉、温度、PH 值、缺氧、第二信使、花生四烯酸和吸入性麻醉剂等。能被奎尼丁等阻断。 I_{K2p} 通道所产生的电流具有瞬时性和非失活性特征, 在所有膜电位时程中均有活性, 而且对经典的钾通道阻滞剂不敏感等背景或泄漏钾通道的特点, 目前成为一个热门的研究领域。据报道, I_{K2p} 通道亚型之一, TASK - 1 最初被称为平台电流, 其抑制能导致 EAD 的发生并出现心律失常^[8-9]。本实验证实了右室流出道和右室心肌细胞上均存在 I_{K2p} , 并比较了 I_{K2p} 在 RVOT 心肌细胞和 RV 心肌细胞的大小, 本实验发现 RVOT 心肌细胞的 I_{K2p} 的电流密度较 RV 心肌细胞的小, 因此, 存在于某些 RVOT 心肌细胞的 I_{K2p} 较右室的小是导致 RVOT 细胞的稳态外向电流很小, 甚至缺乏稳态外向电流的原因之一, 进而是 RVOT 细胞动作电位形成长平台, 甚至无法复极到静息电位水平及产生 EAD 的原因之一。

RVOT 细胞的稳态电流, 包括 I_{K2p} , 明显小于心室肌细胞, 是形成其动作电位具有长的 APD 的基础。因之, 就存在一种可能性, 即这种细胞具有潜在的发生 EAD 的可能性。

本研究首次在离子流水平证实了家兔右室流出道和右室心肌细胞上均存在 I_{K2p} 电流, 而 RVOT 细胞的 I_{K2p} 电流明显小于右室心肌细胞, 在 VOT - VT 的发生上有重要意义。

参考文献

- 1 Vergara I, Wharton JM. Ventricular tachycardia and fibrillation in normal hearts [J]. *Curr Opin Cardiol*, 1998, 13: 9 - 19.
- 2 Gurey A, Manoury B. Two - pore potassium channels in the cardiovascular system [J]. *Eur Biophys*, 2009, 38: 305 - 318.
- 3 Hamill OP, Marty A, Neher E, et al. Improved patched - clamp techniques for high - resolution current recording from cells and cell - free membrane patches [J]. *Pflugers Arch*, 1981, 391: 85.
- 4 宋艳东, 李忠志, 杨新春, 等. 源于右室流出道的室性心律失常的电生理研究 [J]. *中国心脏起搏与电生理志*, 2007, 21: 47 - 50.
- 5 刘泰熹. 心肌细胞离子通道和通道病 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 70 - 73.
- 6 郭继鸿. 心律失常新进展 [M]. 北京: 中华医学电子音像出版社, 2010: 113 - 115.
- 7 Liang S, Li Y, Liu T. L - type calcium current of rabbit cardiomyocytes in right ventricular outflow Tract [J]. *Heart*, 2011, 97: 73.
- 8 Backx PH, Marban E. Background potassium current active during the plateau of the action potential in guinea pig ventricular myocytes [J]. *Circ Res*, 1993, 72: 890 - 900.
- 9 Barbuti A, Ishii S. Block of the background K^+ channel TASK - 1 contributes to arrhythmogenic effects of platelet - activating factor [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002, 282: 2024 - 2030.

(收稿日期: 2012 - 02 - 08)