



论文

家兔右室流出道心肌细胞的 L-型钙电流

梁生辉^{①†}, 林晨晖^{①†}, 李源^②, 刘泰烽^③, 王焱^{①②*}

① 福建医科大学研究生教育学院, 福州 350004;

② 厦门大学附属中山医院心脏中心, 厦门 361004;

③ 北京大学生命科学学院生理学及生物物理学系, 北京 100871

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: wy@medmail.com.cn

收稿日期: 2011-09-28; 接受日期: 2011-11-10

摘要 特发性室速主要起源于右室流出道(RVOT), 目前对于此类心律失常的发生机制还不清楚. 已有临床报告指出, 源于右室流出道的心律失常, 可能是基于触发性机制. 但迄今为止, 由于技术上的困难, 对RVOT心肌细胞的实验研究极少, 尚无法证实所推测的机制. L-型钙电流(I_{Ca-L})是主要的内向电流之一, 在心律失常的发生中起重要作用. 本实验通过对家兔右室流出道心肌细胞 I_{Ca-L} 特性的研究, 探索特发性右室流出道室速的可能发生机制. 采用全细胞膜片钳技术记录 RVOT 和右室(RV)心肌细胞的动作电位(AP)及 I_{Ca-L} , 并对比分析两者 AP 及 I_{Ca-L} 的特性. 结果发现, RVOT 心肌细胞 AP 离散度较 RV 大 (RVOT, 577.2 ± 364.8 ms; RV, 386.2 ± 163.4 ms). 在 RVOT 存在 APD 明显缩短和明显延长的细胞. 用 4-AP 阻断瞬时外向钾电流(I_{to})后, 未记录到 APD 明显缩短的细胞; 而 APD 明显延长的细胞仍存在. 少数 RVOT 细胞 AP 具有很长的平台甚至复极无法恢复到静息电位. 它们能自发产生早后除极(EAD), 可以诱发出第二平台反应; 在 RV 中未记录到这种细胞; 这些 APD 明显延长的 RVOT 心肌细胞与 RV 心肌细胞相比具有较大的 I_{Ca-L} (13.16 ± 0.87 pA/pF, 8.59 ± 1.97 pA/pF, $P < 0.05$); 用尼非地平($10 \mu\text{mol/L}$)阻断 L-型钙通道后, I_{Ca-L} 减小, 动作电位时程缩短, RVOT 心肌细胞记录到的长平台、EAD 及第二平台反应消失. 结果表明, RVOT 心肌细胞 APD 离散度较 RV 心肌细胞大, 是源于右室流出道的室速(RVOT-VT)的细胞电生理学基础. 较大的 I_{to} 电流可能是导致 RVOT 心肌细胞 APD 明显缩短的原因之一; 较强的 I_{Ca-L} 是导致 RVOT 动作电位明显延长的因素之一, 并能出现 EAD, 这可能是 RVOT 产生触发性活动的机制之一.

关键词心律失常
室性心动过速
右室流出道心肌细胞
L-型钙电流
早后除极
触发活动
膜片钳

特发性室性心动过速(idiopathic ventricular tachycardia, IVT)指无明确器质性心脏病变依据及致心律失常因素基础上的一种室性心动过速^[1-3]. 其中 70%~80%的特发性室速起源于右室流出道, 称为特发性

右室流出道室性心动过速(RVOT-VT)^[1]. 胚胎学研究发现, 心脏流出道细胞与心室肌细胞的来源不同, 流出道细胞来源于胚胎期心脏管动脉球囊^[4-6]. 而临床上特发性室速又易发于右室流出道, 因此右室流出

英文版见: Liang S H, Lin C H, Li Y, et al. L-type calcium current in right ventricular outflow tract myocytes of rabbit heart. *Sci China Life Sci*, 2012, 55: 41-46, doi: 10.1007/s11427-012-4265-3

道心肌细胞在电学特性上是否存在异常值得研究。但是由于技术上的困难,如从细胞形态上难以区分RVOT和右室心室肌(RV)细胞,迄今为止,有关该领域实验研究的报道较少见。大量观察是来自临床报道和对机制的推测^[7,8]。因此,确定RVOT心肌细胞的功能特点,并与RV细胞相区别是首要问题。本工作运用膜片钳技术,研究右室流出道与右室壁心肌细胞动作电位的特点以及L-型钙电流在两种细胞上的密度差别,并探讨其在心律失常发生中的可能作用。本文的预初报告(摘要)已经发表^[9]。

1 材料与方 法

1.1 液体的配制

无钙台氏液(mmol/L): NaCl 137, KCl 5.4, MgCl₂ 1.0, NaH₂PO₄ 0.33, HEPES 5, 葡萄糖 10, pH用1 mol/L NaOH调至7.35~7.38。

KB液(mmol/L): KCl 30, L-谷氨酸 50, 牛磺酸 20, KH₂PO₄ 30, MgCl₂ 5, HEPES 10, 葡萄糖 10, EGTA 0.5, pH用1 mol/L KOH调至7.38。

普通电极外液(mmol/L): NaCl 137, KCl 5.4, MgCl₂ 1.0, NaH₂PO₄ 0.33, HEPES 5, 葡萄糖 10, CaCl₂ 1.8, pH用1 mol/L NaOH调至7.35~7.38。

普通电极内液(mmol/L): KCl 150, MgCl₂ 1, HEPES 5, EGTA 5, K₂-ATP 3, Mg-ATP 1, pH用1 mol/L KOH调至7.3。

L-型钙电流电极外液(mmol/L): NaCl 137, KCl 5.4, MgCl₂ 1.0, NaH₂PO₄ 0.33, HEPES 5, 葡萄糖 10, CaCl₂ 1.8, 4-AP 5, pH用1 mol/L NaOH调至7.35~7.38。

L-型钙电流电极内液: 同普通电极内液。

1.2 心室肌细胞的分离

将体重1.5~2.5 kg的新西兰大耳白兔(购自厦门大学动物中心)用乌拉坦静脉麻醉后迅速开胸取出心脏,置于4℃无钙台氏液中游离主动脉,于根部上方0.5 cm处剪断挂于Langendorff装置上,在37℃恒温和持续通氧条件下进行主动脉逆向灌流,流速4~6 mL/min,灌注压力40~60 cm H₂O^[10]。先用无钙台氏液灌流约5 min,接着用含有0.4 mg/mL II型胶原酶(美国Worthington公司)循环灌注10~15 min,可见心脏通体红润略带微黄,手感较先前柔软,酶解液体较

前混浊,开始取标本。用小眼科剪刀以肺动脉瓣为中心,取半径2 mm的圆锥形心肌组织作为右室流出道组(RVOT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),均置于37℃KB液中用小眼科剪刀剪碎,轻轻吹打3~5 min,即分离得到大量单个心肌细胞,于4℃下保存,1~8 h内用于电生理记录。

1.3 电生理记录与数据分析

将细胞悬液加入自制的细胞灌流槽中,置于倒置显微镜工作台上,细胞贴壁后用细胞外液灌流15 min,流速2 mL/min。选择表面光滑纹理清楚的杆状细胞做电生理学记录,应用EPC10放大器(Heka Electronic Co. 德国),联同计算机Patch Master记录软件(Heka Electronic Co. 德国)采集。利用三维操纵器移动电极,缓慢接近细胞表面光滑处可见电阻值逐渐变大,相比入电极外液时增大1 MΩ,略加负压即可形成1~5 GΩ水平的高阻封接,再用较大负压吸破细胞膜,补偿电容电流和电极串联电阻,形成全细胞记录形式。信号经AgCl电极引导,由膜片钳放大器放大,由计算机通过数模转换发送脉冲,通过模数转换采集数据,存放于硬盘,并进行数据分析,分析系统采用Clampfit 10.2软件。玻璃微电极由电极控制仪(Sutter, American)分5步拉制而成,电极电阻3~6 MΩ。所有实验的串联电阻补偿为60%~90%,细胞的输入电容为60~140 pF^[11]。

在全细胞电流钳记录模式下,给予频率1 Hz、时程5 ms、强度900 pA的电流刺激,记录心肌细胞动作电位;在全细胞电压钳记录模式下,钳制电位于-40 mV,10 mV阶跃由-40 ~ +60 mV,持续500 ms,频率1 Hz,记录L-型钙电流。

1.4 统计学分析

统计软件使用SPSS16.0。组间比较采用多个样本均数比较的方差分析。结果以 $\bar{x} \pm SD$ 表示。 $P < 0.05$ 示具有统计学差异。 N 表示细胞数。

2 结果

2.1 RVOT及RV心肌细胞的动作电位

RVOT和RV心肌细胞在形态上虽然没有可见的差别,但是在动作电位(AP),特别是动作电位时程

(APD)上有明显不同,即在电生理学特性上有明显差异. RV 心肌细胞的 APD 波动范围不大,而 RVOT 细胞的 APD 有的很短,有的与 RV 相似,另一些则很长,变化幅度较大(图 1).

由图 1 可见,从 APD 的差异中,可以找到两种细胞的明显区别,为进一步研究提供用以识别它们的功能指标. 本工作就是利用这个指标作为鉴别它们的基础. 即 APD 短于和长于 RV 细胞 APD 范围者,视为 RVOT 心肌细胞的指标.

以往报道表明, RVOT 细胞上 I_{to} 的电流密度较大^[12],因此用 4AP 阻断 I_{to} 后,观察两种心肌细胞 APD 的变化,以确定该离子流在两种细胞 APD 差异中的作用.

在 RV 和 RVOY 心肌细胞记录到 3 种形态的动作电位(图 2). 它们的静息电位水平及最大去极化电位水平无显著性差异.

可以看出,经 4AP 处理后,APD 最短的类型被消

除. 由此推测, I_{to} 在 RVOT 的某些细胞中起重要作用.

在未施与诱发因素的情况下,有些 RVOT 心肌细胞出现超长的平台,动作电位在记录时间内不能回到静息电位水平. 在少数细胞上还记录到 EAD 及第二平台反应^[13],如图 3 所示;而 RV 心肌细胞未记录到类似现象.

2.2 L-型钙电流

用 4-AP 阻断 I_{to} , 电位钳制在 -40 mV 使钠通道失活,于 0 mV 记录得 L-型钙电流, RVOT 及 RV 心肌细胞动作电位时程与 L-型钙电流密度呈正相关关系(图 4).

以 RV 心肌细胞为标准,计算其 APD(阻断 I_{to} 后)95%参考值范围: 290~671 ms.

RVOT 心肌细胞 APD 落入此区间者视为 RVOT 正常 APD 心肌细胞,落于此区间之外者视为 RVOT 长/短 APD 心肌细胞. 分组比较见表 1.

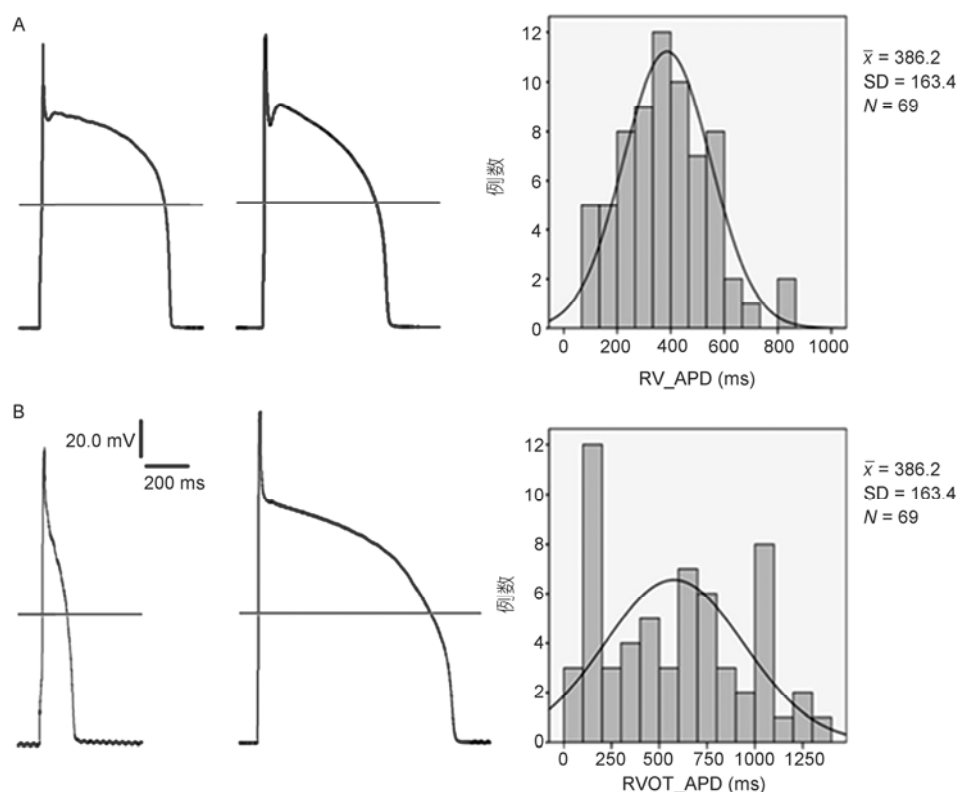


图 1 右心室肌与右心室流出道细胞的动作电位

A: 右心室肌细胞动作电位,其动作电位时程比较适中. 右侧为动作电位时程分布直方图, $APD=(386.2\pm 163.4)$ ms, $N=69$; B: 右心室流出道细胞动作电位,其动作电位时程变化幅度较大,图示最短与最长的动作电位时程. 右侧为动作电位时程分布直方图, $APD=(577.2\pm 364.8)$ ms, $N=60$

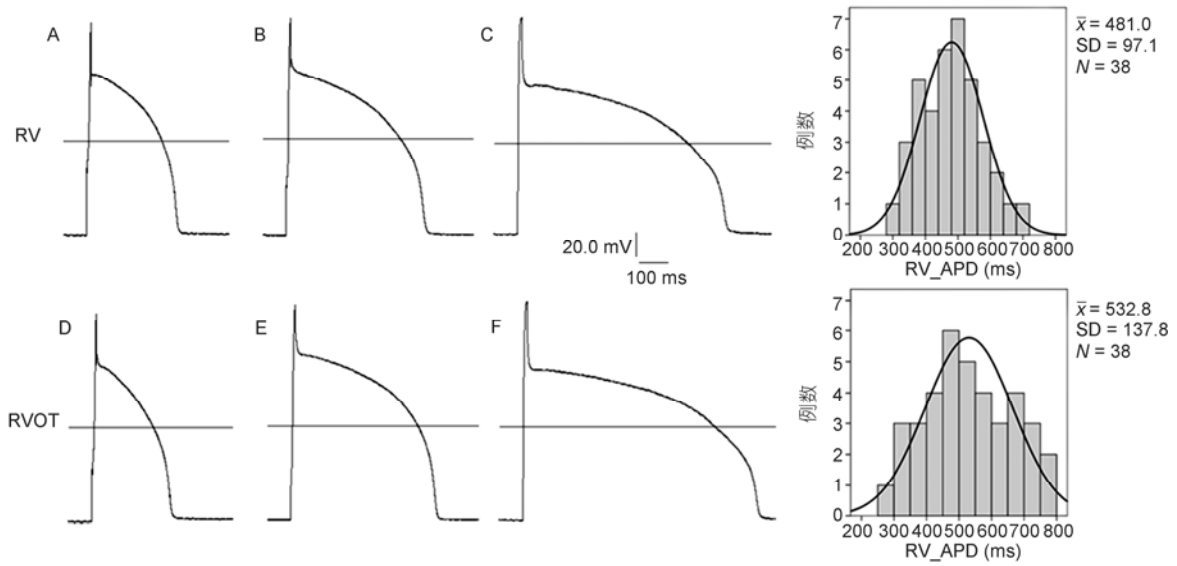


图2 经4AP处理后RV及RVOT心肌细胞的动作电位(刺激频率1 Hz)

A: 短 APD 右室心肌细胞; B: 中等长度 APD 右室心肌细胞; C: 长 APD 右室心肌细胞; D: 短 APD 右室流出道心肌细胞; E: 中等长度 APD 右室流出道心肌细胞; F: 长 APD 右室流出道心肌细胞. 右侧为动作电位时程分布直方图, RV_{APD}=(481.0±97.1) ms, N=38; RVOT_{APD}=(532.8±137.8) ms, N=38

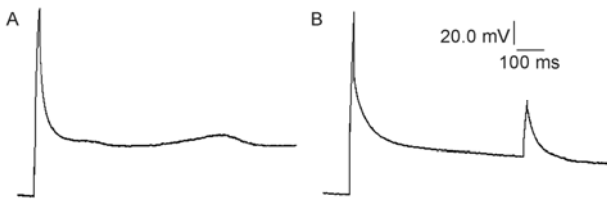


图3 RVOT心肌细胞的触发活动(刺激频率1 Hz)

A: RVOT心肌细胞动作电位复极无法恢复至静息电位水平, 并自发产生EAD; B: RVOT心肌细胞第二平台反应

后)95%参考值范围: 290~671 ms.

RVOT心肌细胞APD落入此区间者视为RVOT正常APD心肌细胞, 落于此区间之外者视为RVOT长/短APD心肌细胞. 分组比较见表1.

进行多个样本均数比较的方差分析可得, RV对照组、RVOT正常APD组之间无明显统计学差异; RVOT长APD组与RV, RVOT正常APD组之间均存在显著性差异.

右室流出道还记录到复极无法恢复到静息电位的细胞, 及无诱发因素存在下自发产生EAD及第二

以RV心肌细胞为标准, 计算其APD(阻断I_{to})

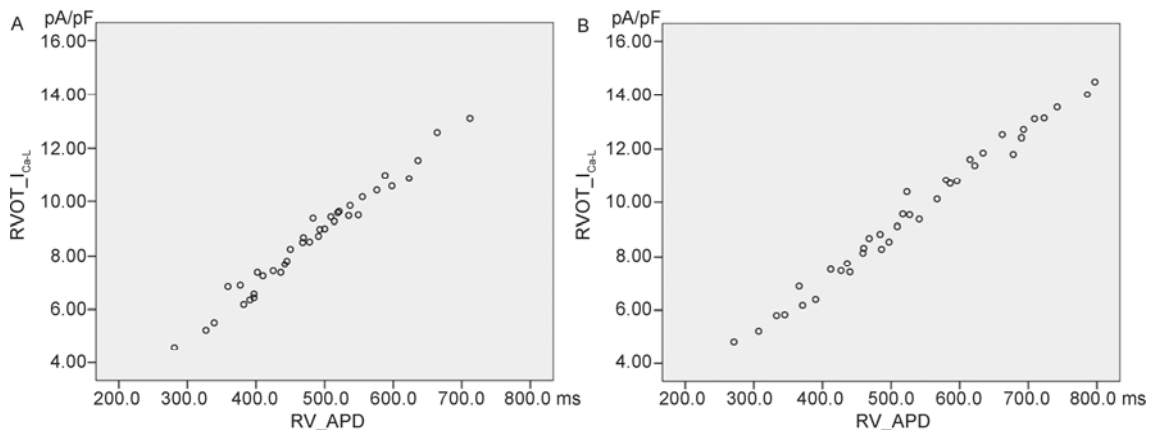


图4 RV及RVOT心肌细胞APD与L-型钙电流密度的关系

A: RV心肌细胞APD与L-型钙电流密度呈正相关的关系; B: RVOT心肌细胞APD与L-型钙电流密度呈正相关的关系

表 1 各组细胞 L-型钙电流密度比较

分组	例数	APD(ms)	I_{Ca-L} (pA/pF)
RV 对照组	38	481.0±97.12	8.59±1.97
RVOT 正常 APD 组	29	488.28±96.46	8.80±1.98
RVOT 长 APD 组	8	727.25±44.52	13.16±0.87*
RVOT 短 APD 组	1	271	4.83

*: 示 $P < 0.05$

平台反应的细胞, 共 3 例(图 3), 与正常的 RVOT 及 RV 细胞相比, 它们具有较大的 I_{Ca-L} (图 5).

在 RVOT 长 APD 组的细胞外液中加入 L-型钙通道阻断剂尼非地平(终浓度 10 $\mu\text{mol/L}$)后, L-型钙电流减小, 动作电位时程缩短, 长平台、EAD 及第二平台反应消失(图 6).

在对比 RV 及 RVOT 心肌细胞对尼非地平(终

浓度 10 $\mu\text{mol/L}$)阻断 L-型钙通道的反应时, 发现 RVOT 长 APD 组细胞动作电位时程缩短程度较 RV 组及 RVOT 正常 APD 组大, 且 RVOT 的长 APD 组缩短后的动作电位时程比 RV 组及 RVOT 正常 APD 组长(图 7).

3 讨论

关于如何鉴定 RVOT 心肌细胞的问题, 目前尚无理想方法. 本工作采用测量 APD 的方法, 能够基本解决这个难题. 当然 APD 的长短与刺激频率有一定关系, 但 APD 的频率依赖性改变有一定的幅度, 并非任意延长或缩短. 为了排除频率变化的因素, 采

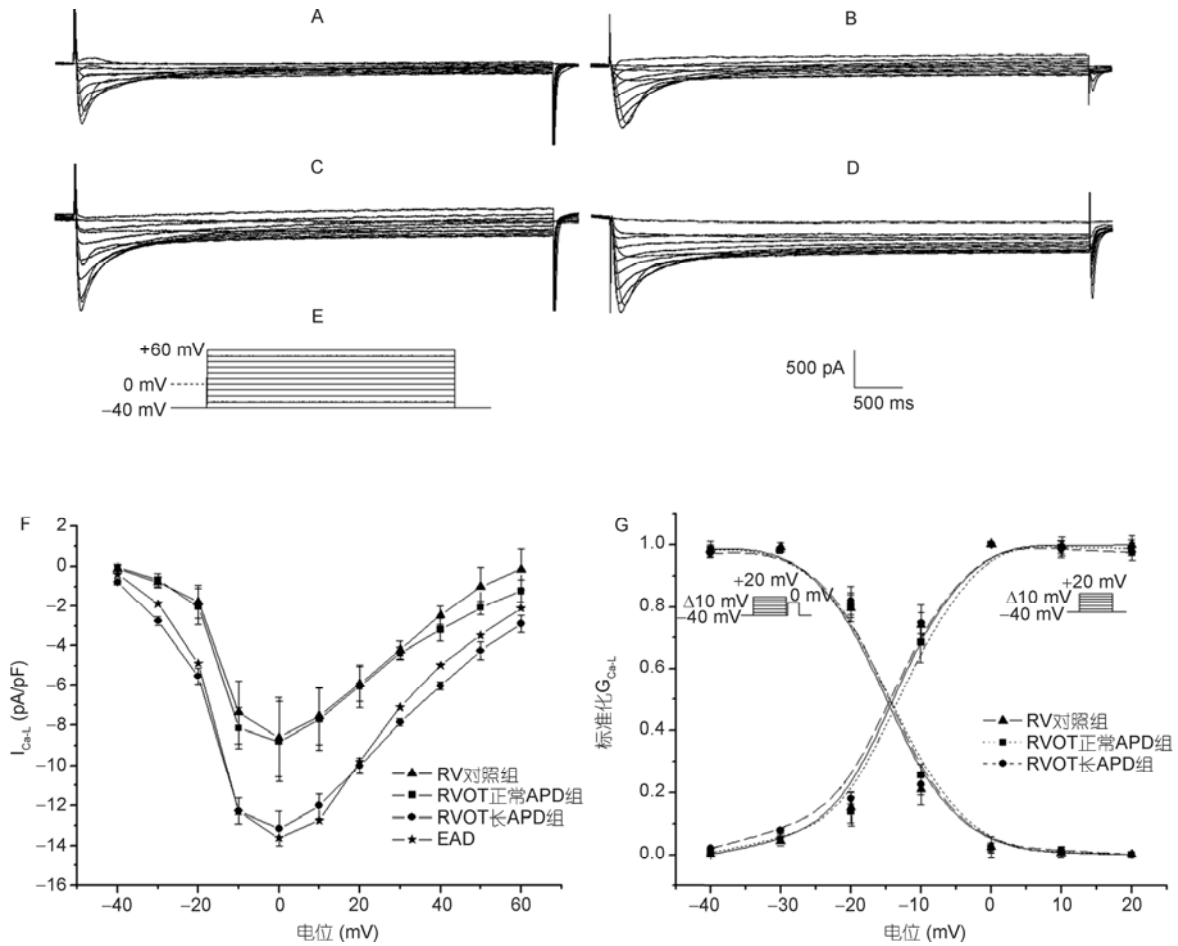


图 5 RV 及 RVOT 心肌细胞 L-型钙电流

用 4-AP 阻断 I_{K_0} , 钳制电位位于 -40 mV, 10 mV 阶跃由 -40 ~ +60 mV, 持续 500 ms, 频率 1 Hz, 诱发 L-型钙电流. A: RV 对照组 L-型钙电流; B: RVOT 正常 APD 组 L-型钙电流; C: RVOT 长 APD 组 L-型钙电流; D: 自发产生 EAD 及第二平台反应的细胞的 L-型钙电流; E: I_{Ca-L} 的刺激程序, 刺激频率 1 Hz, 刺激时程为 500 ms; F: 各组心肌细胞 L-型钙电流 I-V 曲线; G: RV 对照组、RVOT 正常 APD 组及 RVOT 长 APD 组的激活曲线、失活曲线均无显著性差异

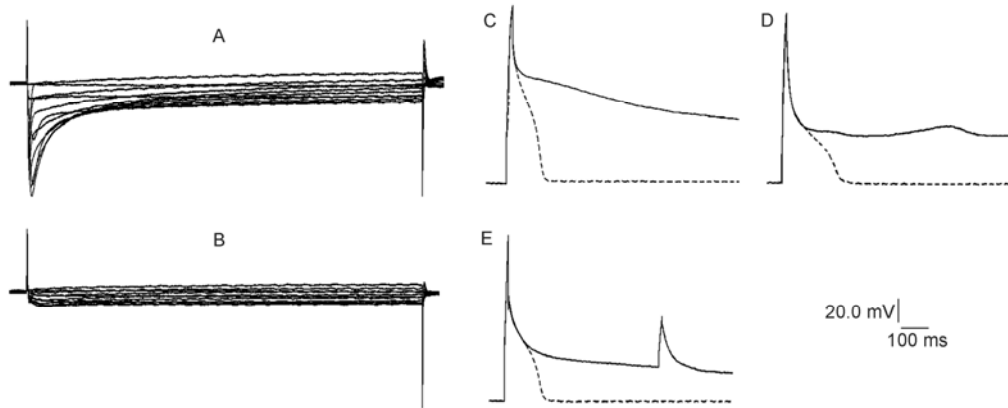


图6 加入L-型钙通道阻断剂尼非地平(终浓度 10 μmol/L)后L-型钙电流及动作电位的改变

A和B: 加尼非地平前后L-型钙电流的变化; C-E: 加入尼非地平后, 动作电位时程缩短, 长平台、EAD及第二平台反应消失(虚线)

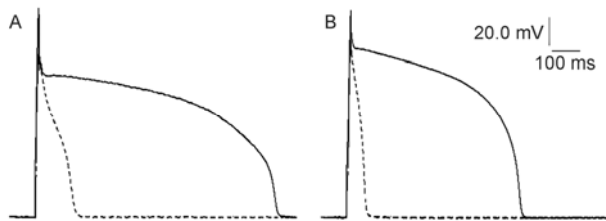


图7 加入L-型钙通道阻断剂尼非地平(终浓度 10 μmol/L)后动作电位时程的改变

A: RVOT长APD组; B: RV组及RVOT正常APD组; 在加入L-型钙通道阻断剂尼非地平后, RVOT长APD组动作电位时程缩短程度较RV组及RVOT正常APD组大(RVOT长APD组: (515.30 ± 39.54) ms; RV对照组: (369.49 ± 65.44) ms; RVOT正常APD组: (380.28 ± 50.58) ms), 且RVOT长APD组缩短后的动作电位时程比RV组及RVOT正常APD组长(RVOT长APD组: (211.95 ± 33.56) ms; RV对照组: (111.51 ± 43.21) ms; RVOT正常APD组: (108 ± 35.84) ms)

用固定的刺激频率(1 Hz). 此外, 家兔心肌细胞与其他哺乳动物心肌细胞不同. 由于表达兔心肌细胞 I_{to} 的离子通道是 $K_v1.4$, 属于慢失活通道($I_{to,s}$). 兔心肌细胞对刺激频率的反应与其他哺乳动物相反: 刺激频率快时 APD 延长, 而刺激慢时 APD 缩短^[14,15]. 实验观察了 APD 的频率依赖性, 得到与以前一致的结果^[12], 即 APD 随刺激频率的增加而延长. 并在此基础上观察了 4-AP 对这种依赖性的影响, 结果表明 APD 的频率依赖性变小(图 8).

这不仅说明 $I_{to,s}$ 在兔心肌细胞对 APD 的影响, 也说明在 4AP 处理后, 更减少了刺激频率对 APD 的作用. 因此, 用 APD 作为一个指标鉴定 RVOT 细胞是可行的.

目前多数学者认为, 特发性右室流出道室速的

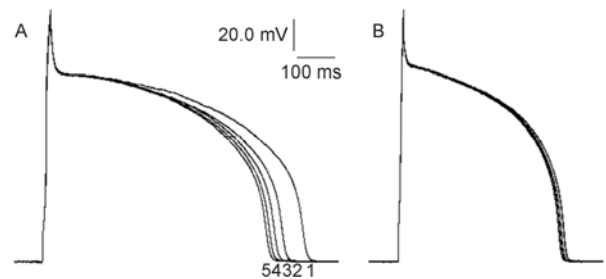


图8 频率依赖性 APD 改变

A: RV 及 RVOT 心肌细胞 APD 随刺激频率的增加而延长, 刺激频率: 1: 0.5 s/次, 2: 1 s/次, 3: 1.5 s/次, 4: 2 s/次, 5: 3 s/次; B: 4-AP 阻断 I_{to} 后, RV 及 RVOT 心肌细胞 APD 不随刺激频率的改变而改变, 且其频率依赖性 APD 改变无明显差异

可能机制为触发活动^[16], 本实验通过研究右室流出道心肌细胞动作电位及 L-型钙通道特性, 在细胞离子通道水平揭示触发活动的可能机制.

宋艳东等人^[12]在研究特发性右室流出道室速机制过程中发现, I_{to} 是引起 RVOT 心肌细胞 APD 离散度增大的原因. 本实验用 4-AP 阻断 I_{to} , 以排除其对动作电位的影响. 在阻断 I_{to} 后, 发现 APD 离散度较先前减小, 且 RVOT 短 APD 的那部分消失, 提示 RVOT 心肌细胞 APD 明显缩短可能与 I_{to} 增大有关, 也有可能是 I_{to} 被阻断后, 原本由于 I_{Na} 降低引起的 APD 缩短被抵销, 类似于 Brugada 综合征.

在 RVOT 记录到动作电位时程长甚至复极无法恢复至静息电位水平的细胞, 它们的 L-型钙电流较 RV 及 RVOT 正常 APD 细胞大, 另外在 RVOT 心肌细胞还记录到自发产生的 EAD, 其 L-型钙电流也较大, 加入尼非地平后, L-型钙电流减小, 动作电位时

程缩短, 长平台、EAD 及第二平台反应消失, 提示 EAD 的产生与 L-型钙电流有明显的相关性. 各组细胞 L-型钙通道激活曲线、失活曲线均无显著差异, 提示 APD 的延长与通道的激活、失活过程无关.

RVOT 长 APD 组较 RV 组及 RVOT 正常 APD 组具有较大的 L-型钙电流, 在加入尼非地平后, RVOT 长 APD 组动作电位时程缩短程度较 RV 组及 RVOT 正常 APD 组大, 说明 L-型钙电流对 APD 延长具有较大作用; 并且 RVOT 长 APD 组缩短后的动作电位时程比 RV 组及 RVOT 正常 APD 组长, 提示除 L-型钙

通道外, 还有其他通道对 APD 的延长起作用, 如非选择性阳离子通道(NSCC), 这与宋艳东等人^[12]的研究相一致.

综上所述, RVOT 心肌细胞 APD 离散度较 RV 心肌细胞大, 是导致临床上短 QT 综合征和长 QT 综合征的基础, 进而可能来源于右室流出道的室速(RVOT-VT)的发生机制中起到一定的作用; I_{to} 电流可能是导致 RVOT 心肌细胞 APD 明显缩短的原因之一; RVOT 动作电位明显延长的心肌细胞, I_{Ca-L} 较大, 容易出现 EAD, 进而诱发 RVOT-VT 的发生.

参考文献

- 1 Altemose G T, Buxton A E. Idiopathic ventricular tachycardia. *Cardiol Rev*, 1999, 50: 159-177
- 2 Lerman B B, Stein K M, Markowitz S M. Mechanism of idiopathic left ventricular tachycardia. *Cardiovasc Electrophysiol*, 1997, 8: 571-583
- 3 Lerman B B, Stein K M, Markowitz S M. Idiopathic ventricular outflow tract tachycardia: a clinical approach. *Pacing Clin Electrophysiol*, 1996, 19: 2120-2137
- 4 Moorman A F, Christoffels V M. Cardiac chamber formation: development, genes, and evolution. *Physiol Rev*, 2003, 83: 1223-1267
- 5 Jorg Manner. Ontogenetic development of the helical heart: concepts and facts. *Eur J Cardio-Thorac*, 2006, 29: S69-S74
- 6 Chien K R, Domian I J, Parker K K. Cardiogenesis and the complex biology of regenerative cardiovascular medicine. *Science*, 2008, 322: 1494-1497
- 7 Boukens B J, Christoffels V M, Corinel R, et al. Developmental basis for electrophysiological heterogeneity in the ventricular and outflow tract myocardium as a substrate for life-threatening ventricular arrhythmias. *Circ Res*, 2009, 104: 19-31
- 8 Aliot E M, Stevenson W G, Almendral-Garrote J M, et al. EHRA/HRS Expert consensus on catheter ablation of ventricular arrhythmias. *Europace*, 2009, 11: 771-817
- 9 Liang S H, Li Y, Liu T P. L-type calcium current of rabbit cardiomyocytes in right ventricular outflow tract. *Heart*, 2011, 97: A73
- 10 陈吉球. 心肌细胞分离术. *中国病理生理杂志*, 1999, 15: 475
- 11 Hamill O P, Marty A, Neher E, et al. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch*, 1981, 391: 85
- 12 宋艳东, 杨新春, 刘泰樾, 等. 源于右室流出道的室性心律失常的电生理机制研究. *中国心脏起搏与心电生理杂志*, 2007, 21: 47-50
- 13 Liu T F, Han D Y. Role of take-off potential and second plateau response in generation of early afterdepolarization in atrial fibers of mouse heart. *Meth Fin Exp Clin Pharmacol*, 1991, 13: 181-185
- 14 Clark R B, Giles W R, Imaizumi Y. Property of the transient outward current in rabbit atrial cells. *J Physiol*, 1988, 405: 147-168
- 15 Fermi B, Wang Z, Duan D, et al. Differences in rate dependence of transient outward current in rabbit and human atrium. *Am J Physiol*, 1992, 263: H1747-H1754
- 16 Lerman B B, Stein K M, Engelstein E D, et al. Mechanism of repetitive monomorphic ventricular tachycardia. *Circulation*, 1995, 93: 421-429