

血管紧张素 II 及其受体拮抗剂对豚鼠心肌细胞电生理及 L-型钙电流的作用

徐延敏 黄体钢 陈元禄

【摘要】 目的 探讨血管紧张素 II 及其受体拮抗剂对豚鼠心肌细胞动作电位间期及 L-型钙电流的作用。方法 分离豚鼠乳头肌的单个心室肌细胞,采用内充 3 mol/L KCl 的玻璃微电极记录心肌动作电位。采用膜片钳全细胞技术,钳制电位 -40 mV,保持时间 200 ms,指令电位为 0,并记录 L-型钙电流的最大峰电流。结果 灌注血管紧张素 II 可致多种机制的心律失常。灌注 1 min,动作电位振幅、动作电位复极 90% 的间期 (APD₉₀)、静息膜电位 (RMP) 较对照状态显著降低或缩短;灌注 3 min,动作电位复极 30% 和 50% 的间期 (APD₃₀ 和 APD₅₀) 及有效不应期均较对照状态显著缩短。膜片钳研究示血管紧张素 II 灌注 5 min, L-型钙电流较对照状态显著增加,氯沙坦灌注 1 min L-型钙电流显著降低,灌注 3 min 较 1 min 进一步降低,电压-电流关系曲线形状均无显著变化。结论 血管紧张素 II 降低动作电位幅度,缩短动作电位时程及有效不应期,电压依赖性增加 L-型钙电流最大峰电流,具有致心律失常作用,氯沙坦电压依赖性地降低 L-型钙电流。

【关键词】 膜片钳; L-型钙电流; 血管紧张素 II; 动作电位; 氯沙坦

Effect of angiotensin II and its receptor antagonist on electrophysiology and L-type calcium current in guinea cardiac myocytes XU Yan-min, HUANG Ti-gang, CHEN Yuan-lu. Department of Cardiology, The Second Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China

【Abstract】 Objective To evaluate the effect of angiotensin II (Ang II) and its receptor antagonist on action potential duration and L-type calcium current density of cardiac myocytes. **Methods** Single myocyte of the ventricle in guinea was isolated. Action potentials were recorded using a conventional glass microelectrode filled with 3 mol/L KCl solution. Membrane patch clamp whole cell recording technique was used to investigate L-type calcium current maximum in holding potential of -40 mV, length of time 200 ms, command potential 0 mV. **Results** Ang II induced arrhythmia of multiple electrophysiologic mechanisms. Action potential amplitude, 90% of action potential duration (APD₉₀), and resting membrane potential (RMP) were significantly decreased or shortened after being perfused Ang II for 1 minute compared with controls. 30% of action potential duration (APD₃₀), 50% of action potential duration (APD₅₀), effective refractory period (ERP) were also shortened significantly after perfused Ang II for 3 minutes compared with controls. Ang II increased the L-type calcium maximum current density after a perfusion of 5 minutes, but losartan perfusion for 1 minute decreased the L-type calcium maximum current density, and it further decreased after perfusion for 3 minutes. However, the current-voltage relationship curve was unchanged. **Conclusion** Ang II could decrease amplitude of monophasic action potential, rest membrane potential, shorten duration of monophasic action potential and effective refractory period, increase maximum current density of voltage dependent L-type calcium, and possess the effect of inducing arrhythmia. Losartan decreased maximum current density of voltage dependent L-type calcium.

【Key words】 membrane patch clamp; L-type calcium current; angiotensin II; action potential; losrtan

血管紧张素 II (Ang II) 是肾素-血管紧张素系统 (RAS) 中具有生物活性的主要成分之一,参与人体多种生理及病理过程。RAS 激活在高血压、充血性心力衰竭 (心衰)、心肌梗死后左室重塑及缺血/再灌注损伤的发生中均起重要作用。近年来学术界对

Ang II 在上述疾病发生的生化及代谢方面已进行了广泛研究^[1,2],然而对它发生作用的电生理机制及其离子机制的研究尚少。我们采用标准微电极技术及膜片钳全细胞技术,研究 Ang II 及其受体拮抗剂 (氯沙坦) 对豚鼠心肌细胞的电生理作用。

1 材料与方法

1.1 灌流液的成分: 台氏液: NaCl 137 mmol/L, CaCl₂ 1.8 mmol/L, MgCl₂ 1.0 mmol/L, NaHCO₃ 1.0 mmol/L, NaH₂PO₄ 0.05 mmol/L, 羟乙基哌嗪乙磺酸 (HEPES) 10 mmol/L, 葡萄糖 5.5 mmol/L; 以 NaOH 调 pH 7.4。无钙液 NaCl 137 mmol/L,

基金项目:天津市科技发展计划项目 (993112911)

作者单位:300211 天津心脏病研究所,天津医科大学第二医院心脏科

作者简介:徐延敏 (1966-),男 (汉族),天津人,医学博士,副教授,硕士研究生导师,主要从事心律失常的基础与临床研究,发表相关论著 20 余篇 (Email: xuyanmin@eyou.com)。

KCl 5.4 mmol/L, KH₂PO₄ 1.2 mmol/L, MgSO₄ 1.2 mmol/L, HEPES 为 6.0 mmol/L, 葡萄糖 10 mmol/L, pH 值以 NaOH 调至 7.4。心肌细胞分离液为无钙液加胶原酶 0.3 g/L, 牛血清白蛋白 (BSA) 0.5 g/L, 蛋白酶 E 0.1 g/L, 使用时配制成 50 ml 上述液体。低钙液为无钙液加入 180 μmol/L CaCl₂。电极内液成分为 KCl 110 mmol/L, Na₂ATP 5.0 mmol/L, MgCl₂ 5.8 mmol/L, 乙二醇四乙酸酯 (EGTA) 0.5 mmol/L, CaCl₂ 0.02 mmol/L, HEPES 10 mmol/L。将 Ang II 直接溶于台氏液配成浓度为 200 ng/L。

1.2 豚鼠乳头肌的制备及单个心肌细胞的分离: 豚鼠 20 只, 雌雄不拘, 体重 250~300 g。快速剖取心脏, 浸入冰冷台氏液, 沿心室游离壁剪开, 取右心室乳头肌, 置于灌流槽内以备记录动作电位 (MAP), 3~4 ml/min 台氏液灌流, 保持 (37.5±0.5) °C 温度, 向灌流槽内通以体积分数为 95% 的 O₂ 和 5% 的 CO₂。钝器击打头部致死, 迅速取出心脏, 至冰冷 (4 °C) 无钙液中洗去残留血液, 将主动脉用棉线固定于 Langendorff 灌流装置上, 以无钙液经主动脉逆行非循环灌注 7 min, 再以含钙 150 mmol/L、蛋白酶 0.1 g/L、胶原酶 0.3 g/L、BSA 0.5 g/L 无钙液灌注 3 min。将心肌切为小块, 置上述含酶低钙液中, 37 °C 恒温下温孵吹打 5 min, 再以尼龙网过滤心肌细胞, 复钙至浓度为 1.8 mmol/L, 将分离的单个心肌细胞贮存于上述溶液中, 室温下静置 2 h, 供膜片钳全细胞记录。

1.3 实验方法: 以与程序刺激器相联的双极电极, 于基础周长 600 ms, 舒张期 2 倍阈值, 脉冲宽度 1 ms 起搏乳头肌。稳定 15 min 后, 以内充 3 mol/L KCl 溶液的标准玻璃微电极记录动作电位, 以含 Ang II 的灌流液灌注 1、3 和 5 min 后分别记录动作电位及有效不应期 (ERP), 动作电位记录复极 30%、50% 和 90% 的间期 (APD₃₀、APD₅₀ 和 APD₉₀), ERP 以期外刺激法测定。经放大器后输出显示于示波器及输入计算机数据采集系统。豚鼠心肌细胞贮存液 1.5 ml 加入倒置显微镜的细胞池中, 贴壁 10 min 后以台氏液灌流清除死细胞及污物, 流速为 2 ml/min。微电极经双步拉制, 尖端直径 < 1 μm, 充灌电极内液后电阻为 3~5 MΩ, 轻轻抽吸于细胞膜与电极之间建立高阻抗封接, 负压打孔, 形成全细胞钳制, 通过 AD/DA 转换器支持 Axon 200 B 微电极放大器, 以电压钳制状态下记录 L-型钙电流, 保持电压 -40 mV, 持续时间 200 ms, 阶跃 10 mV, 测试

电位 -50 mV~+40 mV, 测定电流-电压关系。保持电位 -40 mV, 持续时间 200 ms, 指令电位为 0, 测定 L-型钙电流的最大峰电流。以含 Ang II 及氯沙坦灌流液灌注 1、3 和 5 min 分别记录 L-型钙电流, 如果高阻抗封接及破膜在 3~10 min 内不能形成, 将摒弃该细胞。

1.4 统计学方法: 采用 SPSS 10.0 统计分析软件。计量资料以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用配对 *t* 检验; 计数资料采用 χ^2 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Ang II 致心律失常的作用: 100 ng/L Ang II 灌注后, 40% 发生异位自主节律性心律失常; 40% 发生与起搏后有关的心律失常。心律失常于停止起搏后消失, 恢复起搏可诱发。提示可能与触发激动有关, 心律失常多为期前收缩或短暂的心动过速。Ang II 灌注 5 min 起搏阈值即显著增高 [(2.0±0.6) mV 比 (5.0±0.9) mV, *P* < 0.05], Ang II 灌注后心律失常发生率显著增多, 提示 Ang II 可致心律失常。

2.2 Ang II 对豚鼠乳头肌的电生理作用 (表 1): Ang II 灌注 1 min, 动作电位振幅 (APA)、APD₉₀、静息膜电位 (RMP) 均显著降低或缩短, 灌注 3 min 时 APD₃₀、APD₅₀ 及 ERP 也均显著缩短。

表 1 Ang II 对豚鼠乳头肌的电生理作用 ($\bar{x} \pm s, n=20$)

Table 1 Effects of Ang II on electrophysiology of myocyte in guinea ($\bar{x} \pm s, n=20$)

参数	对照状态	灌注 1 min	灌注 3 min	灌注 5 min
APA (mV)	106.7±17.1	76.8±24.9*	55.6±27.8	50.0±21.6
APD ₃₀ (ms)	124.9±44.0	129.2±26.1	98.1±42.2*	95.4±38.4
APD ₅₀ (ms)	168.7±43.2	173.8±26.7	145.5±25.4*	140.4±22.3
APD ₉₀ (ms)	303.0±73.8	235.4±58.3*	189.5±38.7	177.2±38.0
RMP (mV)	92.0±74.8	61.5±18.2*	61.1±15.9	52.0±9.8
ERP (ms)	252.0±24.0	229.4±32.5	174.0±22.0*	170.0±18.4

注: 与对照状态比较, **P* < 0.05

2.3 Ang II 及氯沙坦对豚鼠心肌细胞 L-型钙电流的作用: 以含 Ang II (200 ng/L) 的台氏液灌注 5 min 后, L-型钙电流的最大峰电流较对照状态显著增加 (342.4±297.6) pA/pF 比 (279.0±240.6) pA/pF, 增加率达 27.9%; 以氯沙坦 (50 μg/L) 灌注 1 min 和 3 min, L-型钙电流较对照状态显著降低, 分别为 (280.3±94.3) pA/pF 比 (355.2±151.4) pA/pF; (177.4±108.2) pA/pF 比 (355.2±151.4) pA/pF, 抑制率分别为 21.1% 和 50.1%, 灌注 3 min 时较 1 min 进一步降低, 电压-电流关系曲线形状均无明显变化, 最大峰电流仍然出现在 +10 mV。

3 讨论

Ang II 灌注可诱发心律失常,40%为异位自主节律性心律失常;40%是与起搏后有关的心律失常。停止起搏心律失常消失,恢复起搏可诱发心律失常,显示 Ang II 致心律失常为多种机制,Ang II 致心律失常的作用与其直接电生理作用有关。本研究结果显示,Ang II 灌注可显著降低 APA,减慢心肌传导性,缩短动作电位 APD₃₀、APD₅₀ 和 APD₉₀,缩短 ERP,有利于形成折返机制。此外,升高 RMP,增加兴奋性,易于发生自主节律性心律失常。研究显示,Ang II 灌注增加心律失常的发生率及延长其持续时间;在体动物的研究显示,早期心肌缺血时 Ang II 水平增加伴有室颤(室颤)的增加,表明 Ang II 可能是缺血/再灌注心律失常的始动因素之一^[3]。本研究结果显示,Ang II 通过直接的电生理作用,有致多种机制的心律失常作用,与文献^[3]报道一致。

本研究结果还显示,Ang II 显著增加 L-型钙电流的最大峰电流,增加率达 27.9%,Ang II 能电压依赖性增加 L-型钙电流,缩短动作电位时程,增加自发搏动的产生及降低动作电位的阈电流强度,降低心肌 ERP,具有促室性心律失常作用^[4]。膜片钳研究显示,Ang II 增加自发搏动频率的作用是由于其增加 L-型钙电流,并电压依赖性地影响 L-型钙电流稳态激活成分^[4],本文结果与其相似。Ang II 作用于 AT1 受体,激活磷脂酶 C,触发 1,4,5-3 磷酸肌醇(IP₃)及甘油二酯(DG)的产生,促进细胞外 Ca²⁺内流及肌浆网终池 Ca²⁺向细胞浆中释放,促进 Ca²⁺通道及 Na⁺通道开放,大量细胞外 Ca²⁺内流,导致细胞内钙超负荷及钠超负荷而间接导致瞬间内向电流(Iti)^[5]。Iti 是钙依赖的病理性内向钙电流,它导致早期后除极等触发活动的发生^[6]。氯沙坦为非肽类 I 型 Ang II 受体(AT1)拮抗剂,其直接阻断由 AT1 受体介导 Ang II 的功能。本研究结果显示,氯沙坦电压依赖性及时间依赖性地降低 L-型钙电流,显示氯沙坦可抑制 Ang II 引起的细胞内钙超负荷及瞬间内向电流,具有潜在抗心律失常作用。Nakashima 等^[7]研究显示,Ang II AT1 受体拮抗剂可有效地防止快速心房起搏犬心房有效不应期(AERP)及动作电位的缩短,显著减少房性心律失常的发生。Rials 等^[8]研究也显示,氯沙坦显著减少左心室肥厚小鼠室性心律失常的发生,以上研究均

显示氯沙坦显著降低 L-型钙电流及细胞内钙超负荷,对心肌细胞电重构发挥有益作用。

动作电位平台期的变化取决于内向电流与外向电流的净结果,这与对心肌动作电位氯电流,内向整流钾电流有关^[9,10],Ang II 及氯沙坦对动作电位作用的离子机制有待于从分子水平进一步研究。

参考文献:

- 1 Dijkhorst - Oei L T, Strose E S, Koomans H, et al. Acute simultaneous stimulation of nitric oxide and oxygen radicals by angiotensin I in humans in vivo[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 1999, 33:420 - 424.
- 2 Matoba S, Tatsumi T, Keira N, et al. Cardioprotective effect of angiotensin-converting enzyme inhibition against hypoxia/reoxygenation injury in cultured rat cardiac myocytes [J]. Circulation, 1999, 99:817 - 822.
- 3 Linz W, Scholkens B A. Influence of local converting enzyme inhibition on angiotensin and bradykinin effects in ischemic rat hearts[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 1987, 10:75 - 82.
- 4 Paz Y, Gurevitch J, Frolkis I, et al. Effects of an angiotensin I antagonist on ischemic and nonischemic isolated rat hearts[J]. Ann Thorac Surg, 1998, 65:474 - 479.
- 5 Krizanova O, Orlicky J, Masanova C, et al. Angiotensin I modulates Ca - transport systems in the rat heart through angiotensin I [J]. J Mol Cell Cardiol, 1997, 29:1739 - 1746.
- 6 Enous R, Opie L H. Effect of the angiotensin-converting enzyme inhibitor, perindoprilat, and of angiotensin - I on the transient inward current of rabbit ventricular myocytes [J]. Cardiovasc Drugs Ther, 1994, 8:647 - 651.
- 7 Nakashima H, Kumagai K, Urata H, et al. Angiotensin I antagonist prevents electrical remodeling in atrial fibrillation [J]. Circulation, 2000, 101:2612 - 2617.
- 8 Rials S J, Wu Y, Xu X, et al. Restoration of normal ventricular electrophysiology in renovascular hypertensive rabbits after treatment with losartan[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2001, 37: 317 - 323.
- 9 Moorman J R, Kirsch G E, Lacerda A E, et al. Angiotensin I modulates cardiac Na⁺ channels in neonatal rat [J]. Circ Res, 1989, 65:1804 - 1809.
- 10 Morita H, Kimura J, Endoh M. Angiotensin I activation of a chloride current in rabbit cardiac myocytes [J]. J Physiol, 1995, 483:119 - 130.

(收稿日期:2006-05-16 修回日期:2006-07-05)

(本文编辑:李银平)

• 广告目次 •

- ① 珠海丽珠:丽珠血液灌流器 (封二)
- ② 深圳迈瑞:监护仪 (插页)
- ③ 廊坊爱尔:炭肾 (插页)
- ④ 恩华药业:力月西 (插页)
- ⑤ 天津红日药业:血必净注射液 (封底)

欢迎订阅《中国中西医结合急救杂志》 邮发代号 6-93