

· 基础研究 ·

重组人脑钠尿肽对兔缺血/再灌注后心室肌细胞钠离子通道电流的影响

丁超*, 郭洁, 王冬梅, 李洁, 于敏, 彭育红

(解放军白求恩国际和平医院心血管内科, 石家庄 050082)

【摘要】目的 研究重组人脑钠尿肽(rhBNP)对兔在体缺血/再灌注(I/R)后心室肌细胞钠离子通道电流(I_{Na})的影响,探讨rhBNP拮抗再灌注心律失常的细胞学离子机制。**方法** 新西兰大耳白兔45只随机分为3组($n=15$): I/R损伤组(I/R组,缺血30min后再灌注120min); rhBNP治疗组(rhBNP组,再灌注后经动物耳缘静脉注射rhBNP $0.06\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{min})$); 假手术对照组(CON组,只开胸不结扎血管)。采用酶解的方法分离缺血部位心室肌外膜单个心室肌细胞,应用全细胞膜片钳技术记录 I_{Na} 。**结果** CON组、I/R组、rhBNP组 I_{Na} 密度峰值(-30mV)分别为($-42.78\pm 5.48, n=16$), ($-22.46\pm 5.32, n=12$), ($-37.82\pm 5.45, n=15$) pA/pF, I/R组较CON组明显下降($P<0.01$), rhBNP组较I/R组明显升高($P<0.01$)。**结论** I/R后心肌 I_{Na} 明显下降,给予rhBNP可使下降的 I_{Na} 上调,提示rhBNP可减轻或逆转这种电重构。

【关键词】 重组人脑钠尿肽; 缺血/再灌注; 膜片钳; 离子通道

【中图分类号】 R972+.6; R541.7

【文献标识码】 A

【DOI】 10.3724/SP.J.1264.2013.00156

Effects of rhBNP on sodium current in isolated ventricular myocytes from ischemia/reperfusion myocardium of rabbit

DING Chao*, GUE Jie, WANG Dong-Mei, LI Jie, YU Min, PENG Yu-Hong

(Department of Cardiology, Bethune International Peace Hospital of PLA, Shijiazhuang 050082, China)

【Abstract】Objective To investigate the effects of recombinant human brain natriuretic peptide (rhBNP) on sodium current (I_{Na}) in left ventricular myocytes of rabbit heart undergoing ischemia/reperfusion(I/R), so as to explore the cellular (ionic) basis of rhBNP treatment for antiarrhythmia. **Methods** Forty-five rabbits were randomly divided into three groups ($n=15$): ischemic/reperfusion (I/R) group, rhBNP intervention (rhBNP) group and sham-operation control (CON) group. Anesthetized rabbits were subjected to 30min ischemia by ligation of the left anterior descending coronary artery and 120min reperfusion. rhBNP group was injected with rhBNP at a dose of $0.06\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{min})$ via ear-vein. Single ventricular myocytes were isolated enzymatically from the epicardial zone of the infarcted region derived from the hearts in I/R, rhBNP groups and the same anatomy region in CON group. Whole cell patch clamp technique was used to record I_{Na} . **Results** The peak I_{Na} density (at -30mV) was significantly decreased in I/R group [$(-22.46\pm 5.32)\text{pA}/\text{pF}, n=12$] compared with CON group [$(-42.78\pm 5.48)\text{pA}/\text{pF}, n=16; P<0.01$], while it was significantly increased in rhBNP group [$(-37.82\pm 5.45)\text{pA}/\text{pF}, n=15$] compared with I/R group ($P<0.01$). **Conclusion** Ischemia/reperfusion induces significant down-regulation of I_{Na} , and pretreatment with rhBNP could attenuate these changes, prevent and reverse this electrical remodeling.

【Key words】 rhBNP; ischemia/reperfusion; patch-clamp; ionic channel

This work was supported by the Science and Technology Support Program of Hebei Province(11276124D).

Corresponding author: DING Chao, E-mail: dingch2001@163.com

经皮冠状动脉介入治疗(percutaneous coronary intervention, PCI)技术带来的再灌注损伤,直接影响患者的预后,缺血/再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)心律失常以室性心律失常最常见,包括室性期前收缩、室性心动过速(室速)以及室性纤颤(室颤),心律失常是I/R期间患者猝死的最主要原因之一^[1]。重组人脑

钠尿肽(recombinant human brain natriuretic peptide, rhBNP)可以拮抗肾素-血管紧张素系统和交感神经系统的激活,抑制心肌重构^[2,3]。rhBNP对心肌细胞是否有电生理学效应,目前的研究报道不多。本研究采用全细胞膜片钳技术,研究rhBNP对I/R后兔心室肌细胞跨膜钠离子通道电流(sodium current, I_{Na})的影响,探讨

收稿日期: 2013-03-10; 修回日期: 2013-05-15

基金项目: 河北省科技支撑计划项目课题(11276124D)

通信作者: 丁超, Tel: 0311-87978303, E-mail: dingch2001@163.com

rhBNP拮抗再灌注心律失常的细胞学离子机制。

1 材料与方法

1.1 动物与分组

健康新西兰大耳白兔45只, 体质量2.5~3.0kg, 雌雄不拘, 由河北医科大学实验动物中心提供。随机分为3组(每组15只): 假手术对照组(CON组), I/R损伤组(I/R组)和rhBNP治疗组(rhBNP组)。

1.2 实验试剂

N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸[4-(2-hydroxyethyl) piperazine-1-erhanesulfonic acid, HEPES], 乙二醇双(2-氨基乙基醚)四乙酸[Ethylene glycol-bis(2-aminoethyl ether)-N, N, N', N'-tetraacetic acid, EGTA], 4-氨基吡啶(4-aminopyridine, 4-AP), 胶原酶I购自Sigma公司。rhBNP(商品名新活素, 0.5mg/支, 成都诺迪康生物制药有限公司生产)。按文献[4]方法配置 I_{Na} 电极外液和 I_{Na} 电极内液。

1.3 心肌I/R动物模型建立

家兔采用2.5%硫喷妥钠耳缘静脉麻醉(1.0ml/kg)。剪开心包膜后, 分离左冠状动脉前降支, 用不锈钢圆针带6-0丝线穿过心肌浅层, 丝线穿过一塑料管, 结扎丝线使塑料管压迫冠状动脉造成心肌缺血, 30min后, 放松结扎线后行心肌再灌注120min, 建成心肌I/R动物模型^[5]。CON组开胸后仅分离左冠状动脉前降支并穿线但不结扎, 以排除开胸手术本身对心肌细胞电生理参数的影响。在I/R即刻, rhBNP组动物经耳缘静脉注射rhBNP0.06 μ g/(kg·min), 持续30min, CON组和I/R组动物注射相同剂量的生理盐水。

1.4 细胞分离

I/R模型建立并用药后即处死动物并分离细胞, 采用酶解(胶原酶I 0.4mg/ml, Sigma公司)方法^[6]分离单个心室肌细胞。I/R组和rhBNP组细胞来源于左心室前壁梗死区, 特征为此梗死区外膜变为白斑片状; CON组细胞则取自左心室与梗死区相对应的部位。

1.5 膜片钳全细胞记录

按文献[7]方法进行, 脉冲信号经EPC-9膜片钳放大器(HEKA, 德国)放大, 并经EPC-9转换, 用Pulse+Pulsefit软件(HEKA, 德国)收集、分析。电流幅值除以细胞膜电容所得即为电流密度(单位pA/pF)。从维持电位(holding potential, HP) -80mV, 阶跃+10mV, 逐步除极到+60mV, 刺激频率0.5Hz, 钳制时间50ms。以不同钳制电压下的 I_{Na} 强度绘成电流-电压(I-V)曲线。所有实验在室温(25℃)下进行。

1.6 统计学处理

采用SPSS13.0统计学软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用方差分析, 组间两两比较采用 q 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

图1示3组细胞 I_{Na} 的I-V曲线, 均在-60mV激活, -30mV达峰值, +40mV时反转。I/R组与CON组相比, I-V曲线上移。rhBNP组与I/R组相比, I-V曲线下移, 接近CON组。但 I_{Na} 电压依赖性不变, 对激活电位、峰值电位、反转电位及I-V曲线的形态轨迹均无影响。

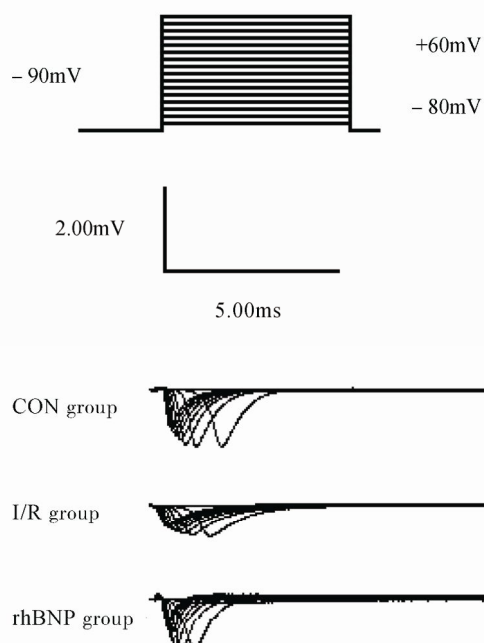


图1 3组细胞典型的 I_{Na} 形态曲线
Figure 1 Representative I_{Na} traces recorded from myocytes of three groups

由图2可见, CON组、I/R组、rhBNP组 I_{Na} 电流密度峰值(-30mV)分别为 $(-42.78 \pm 5.48, n = 16)$, $(-22.46 \pm 5.32, n = 12)$, $(-37.82 \pm 5.45, n = 15)$ pA/pF。与CON组比较, I/R组 I_{Na} 明显下降($P < 0.01$); 与I/R组比较, rhBNP组 I_{Na} 明显升高($P < 0.01$)。rhBNP组与对照组 I_{Na} 差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨论

脑钠肽(brain natriuretic peptide, BNP)是一种主要由心室肌分泌的循环激素。国外基础及临床研究结果表明: BNP可以扩张机体动静脉血管, 降低肺及外周血管阻力, 提高心输出量, 降低容量负荷; 并可以拮抗继发性的肾素-血管紧张素系统和交感神经系统的激活, 对抗其毒性作用, 减少心肌梗死面积,

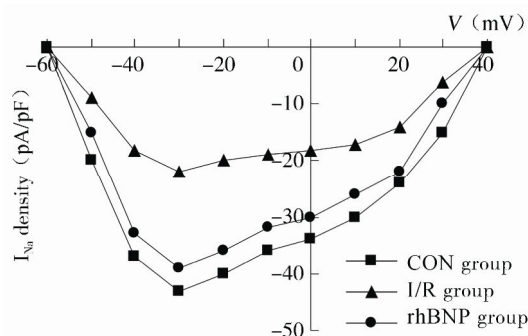


图2 rhBNP对缺血心肌细胞 I_{Na} I-V曲线的影响

Figure 2 Effect of rhBNP on I_{Na} current-voltage relations in rabbit ischemic/reperfusion cardiomyocytes

改善患者的临床和血流动力学指标^[8-11]。rhBNP是一种应用生物重组技术生产的、与人类内源性BNP等同的肽类物质,已在2002年被美国食品及药品管理署(FDA)批准应用于临床治疗急性失代偿性心力衰竭。

再灌注心律失常是指缺血心肌部分或全部恢复血流灌注的过程中所发生的心律失常。这些心律失常尤其是室性心律失常常会导致患者的血流动力学改变,是I/R期患者猝死的原因之一。如何减少I/R损伤及预防再灌注心律失常的发生是目前研究的热点。

rhBNP可减轻心肌I/R损伤^[12],但是否对心肌电生理产生影响,目前研究不多。姚维等^[13]研究发现,健康兔静脉滴注rhBNP后,心脏三层细胞的动作电位时程无明显变化,认为rhBNP对电生理指标没有直接影响。杨建华^[14]研究发现,急性心肌梗死患者应用rhBNP可降低溶栓后再灌注心律失常的发生。

本研究结果显示,心肌I/R后 I_{Na} 明显下降, rhBNP预处理可使下降的 I_{Na} 上调,逆转电重构,这可能是rhBNP降低心律失常发生率的细胞学离子机制。rhBNP逆转电重构的机制,可能与rhBNP增强抗氧化酶活性,减少氧自由基对心肌的氧化损伤有关^[12], rhBNP还可能通过直接扩张冠状动脉血管及微血管,对抗神经激素应激导致的冠状动脉及微血管痉挛,增加冠状动脉及微血管血流量,减轻心肌微血管损伤,从而发挥保护I/R损伤心肌的作用。

抗心律失常药物传统作用靶点是直接阻断某一离子通道,但这些药物对病变心脏的室性快速心律失常的疗效不佳且有负性效应,并可能出现促心律失常的副作用,特别是心律失常抑制试验(cardiac arrhythmia suppression trial, CAST)中,抗心律失常药物增加死亡率的研究结果,引发了我们对传统抗心律失常药物副作用的争议和担忧。心肌细胞膜上的离子通道本来是有序的,病变心肌多离子通道的改变使动作电位时程改变,导致心律失常。由于动作电位的长度与细胞膜复极化过程总的离子流相关,单纯阻断某一离子通道的抗心律失常药物效果往往不佳,且容

易发生促心律失常的副作用。所以,有效的抗心律失常药物的新靶点应以减轻或逆转离子通道的损伤为楔入点,改变离子通道的环境尤为重要。

【参考文献】

- [1] Mehta D, Curwin J, Gomes JA, *et al.* Sudden death in coronary artery disease: acute ischemia *versus* myocardial substrate[J]. *Circulation*, 1997, 96(9): 3215-3223.
- [2] Jensen KT, Carstens J, Pedersen EB. Effect of BNP on renal hemodynamics, tubular function and vasoactive hormones in humans[J]. *Am J Physiol*, 1998, 274(Suppl): F63-F72.
- [3] D'Souza SP, Yellon DM, Martin C, *et al.* B-type natriuretic peptide limits infarct size in rat isolated hearts *via* KATP channel opening[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, 284(5): H1592-H1600.
- [4] Ding C, Fu XH, He ZS, *et al.* Effects of simvastatin on ion channel currents in ventricular myocytes from acute infarcted heart of normocholesterolemic rabbits[J]. *South China J Cardiol*, 2008, 9(3): 150-154.
- [5] 丁超, 何振山, 陈会校, 等. 辛伐他汀对血脂正常兔心肌缺血再灌注后L钙电流的影响[J]. *中国心脏起搏与心电生理杂志*, 2008, 22(4): 357-360.
- [6] Ding C, Fu XH, He ZS, *et al.* Cardioprotective effects of simvastatin on reversing electrical remodeling induced by myocardial ischemia-reperfusion in normocholesterolemic rabbits[J]. *Chin Med J(Engl)*, 2008, 121(6): 551-556.
- [7] 丁超, 何振山, 陈会校, 等. 辛伐他汀对急性心肌梗死兔心室肌细胞钠离子电流的影响[J]. *心脏杂志*, 2009, 21(4): 453-456.
- [8] Peacock WF 4th, Emerman CL, Young J. Nesiritide in congestive heart failure associated with acute coronary syndromes: a pilot study of safety and efficacy[J]. *J Card Fail*, 2004, 10(2): 120-125.
- [9] Matsumura T, Kugiyama K, Sugiyama S, *et al.* Neutral endopeptidase in neutrophils modulates protective effects of natriuretic peptides against neutrophils-induced endothelial cytotoxicity[J]. *J Clin Invest*, 1996, 97(10): 2192-2203.
- [10] Burley DS, Baxter GF. B-type natriuretic peptide at early reperfusion limits infarct size in the rat isolated heart[J]. *Basic Res Cardiol*, 2007, 102(6): 529-541.
- [11] Kousholt BS. Natriuretic peptides as therapy in cardiac ischaemia/reperfusion[J]. *Dan Med J*, 2012, 59(6): B4469.
- [12] 王丽, 赵学忠, 于晓风, 等. 重组人脑利钠肽对大鼠实验性心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *中国老年学杂志*, 2010, 30(6): 813-814.
- [13] 姚维, 杨波, 钱进, 等. 重组人脑利钠肽对兔血流动力学和电生理的影响[J]. *第四军医大学学报*, 2006, 27(24): 2265-2267.
- [14] 杨建华. 重组人脑利钠肽对急性心肌梗死溶栓后再灌注损伤的影响[J]. *中国煤炭工业医学杂志*, 2011, 14(4): 512-514.