

## • 基础研究 •

## 卡维地洛对老龄大鼠心房肌细胞起搏电流的作用

李泱 刘昱圻 李宗斌 王浩 陆艳 刘丹尼 王士雯

**【摘要】** 目的 研究卡维地洛(Car)对大鼠心房肌细胞起搏电流( $I_f$ )的影响,探讨其降低心房颤动的机制。方法 选择22~24月龄SD大鼠分离心房肌细胞,利用全细胞膜片钳技术记录 $I_f$ 。结果 Car可明显降低老龄大鼠心房肌细胞的超极化激活起搏电流,在-150 mV时,1.0  $\mu\text{mol/L}$  Car使 $I_f$ 的电流密度从(3.2 $\pm$ 0.4) pA/pF降至(2.4 $\pm$ 0.3) pA/pF( $P<0.01$ )。Car的抑制电流效应呈电压依赖性,即随着超极化电位的增加,Car的效应也增加。在0.1~30.0  $\mu\text{mol/L}$ 的范围内,Car以浓度依赖性方式阻滞起搏电流,其 $\text{IC}_{50}$ 为1.37  $\mu\text{mol/L}$ (95%可信限为1.96~0.57  $\mu\text{mol/L}$ )。进一步,Car可以使 $I_f$ 的稳态激活曲线向超极化方向移动,使半激活电压从(-87.5 $\pm$ 2.3) mV移至(-96.2 $\pm$ 4.7) mV。从而使电流激活减慢,这可能是其减少 $I_f$ 的主要原因。结论 卡维地洛可明显降低老龄大鼠心房肌细胞起搏电流密度。

**【关键词】** 卡维地洛;大鼠;起搏电流

## Effect of carvedilol on pacemaker current of atrial myocytes of old rats

LI yang, LIU Yuqi, LI Zongbin, et al

Institute of Geriatric Cardiology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

**【Abstract】** Objective To investigate the effect of carvedilol (Car) on pacemaker current ( $I_f$ ) of atrial myocytes of old rats (22-24 month). Methods The single atrial myocytes of the rats were isolated by Langendorff perfusion device.  $I_f$  was recorded with whole-cell patch clamp technique. Results  $I_f$  density was decreased significantly by Car. At the test potential of -150 mV, the average density of  $I_f$  was decreased from (3.2 $\pm$ 0.4) pA/pF to (2.4 $\pm$ 0.3) pA/pF by Car 1.0  $\mu\text{mol/L}$  ( $P<0.01$ ).  $I_f$  was inhibited by Car in voltage-dependent manner and Car significantly blocked  $I_f$  at negative test potential.  $I_f$  was reduced by Car in concentration-dependent manner at concentrations ranging from 0.1 to 30.0  $\mu\text{mol/L}$ , with  $\text{IC}_{50}$  of 1.37  $\mu\text{mol/L}$  (95% confidence limit; 0.57-1.96  $\mu\text{mol/L}$ ). Furthermore, steady state activation curves were shifted to negative by Car. The half-maximal activation voltages ( $V_{1/2}$ ) were shifted to (-96.2 $\pm$ 4.7) mV and (-87.5 $\pm$ 2.3) mV in Car treatment group and control group, respectively, demonstrating that  $I_f$  activation procedure was partly blocked by the effect of Car. Conclusion Car can decrease  $I_f$  density of atrial myocytes of old rats.

**【Key words】** carvedilol; rats; pacemaker current

心房纤颤(房颤)是老年人常见的心律失常,其发病率随着年龄增大而增高。老年人由于窦房结功能的减退,使得窦性心律过缓,而由起搏电流(pacemaker current,  $I_f$ )占主导地位的心房异位节律明显增高。Lai等<sup>[1]</sup>和Zorn-Pauly等<sup>[2]</sup>分别发现房颤发生与 $I_f$ 关系密切。心肌细胞上 $I_f$ 可直接受交感

神经的调控,当交感神经兴奋时该电流显著增加,从而诱导老年房颤的发生<sup>[3]</sup>。笔者的前期研究发现,老龄大鼠心房肌细胞起搏电流的密度和激活均高于青年鼠,且可记录到电流的细胞数也明显增加,提示这可能是老龄大鼠心房容易出现异位起搏和诱发的离子基础(另文发表)。文献报道,非选择 $\beta$ 受体阻

收稿日期:2007-07-03

基金项目:国家自然科学基金(项目编号:30570739)

作者单位:解放军总医院老年心血管病研究所

作者简介:李泱,男,1962年3月生,河北沧州市人,医学博士,研究员。Tel:010-66936762, E-mail: liyangbsh@163.com

通讯作者:王士雯, Tel: 010-66936761

断剂卡维地洛(carvedilol, Car)具有抗房颤的效应<sup>[4]</sup>,既往认为其主要是抑制 $\beta$ 受体所致,文献报道Car存在电生理效应<sup>[5]</sup>。然而,该药物是否对 $I_f$ 具有影响尚未见报道。本文利用膜片钳技术研究Car抗对老龄大鼠心房肌细胞 $I_f$ 电流有作用,旨在探讨该药抗房颤的作用机制。

## 1 材料与方 法

1.1 试剂与溶液 胶原酶II、蛋白酶E、牛血清白蛋白、MgATP、HEPES、CaCl<sub>2</sub>、BaCl<sub>2</sub>、CdCl<sub>2</sub>、CsCl、4-AP均为Sigma公司产品;EGTA购自Fluka Biochemika;其他试剂均为分析纯。所用Car原料药为罗氏制药有限公司提供,实验时用二甲亚砜(DMSO)溶解,配成贮备液。

台氏液成分(mmol/L):NaCl 135, KCl 5.4, CaCl<sub>2</sub> 1.8, MgCl<sub>2</sub> 1, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.33, HEPES 10, 葡萄糖 10, pH用NaOH调至7.4;无Ca<sup>2+</sup>台氏液和0.2 mmol/L Ca<sup>2+</sup>的台氏液分别为台氏液中不加CaCl<sub>2</sub>或仅加0.2 mmol/L CaCl<sub>2</sub>。

细胞外液(mmol/L):NaCl 115, KCl 25, CaCl<sub>2</sub> 2, glucose 10, MgCl<sub>2</sub> 1, HEPES 10;用NaOH调pH至7.4。BaCl<sub>2</sub> 2 mmol/L、CdCl<sub>2</sub> 200  $\mu$ mol/L和4-AP 4 mmol/L阻断 $I_{K1}$ 、 $I_{Ca,L}$ 和 $I_{to}$ 电流。

电极内液(mmol/L):K-glutamate 130, KCl 15, NaCl 5, MgCl<sub>2</sub> 1, HEPES 10, MgATP 5;用NaOH调pH至7.4。

1.2 老龄大鼠心房肌细胞分离 参照文献并改进分离方法<sup>[5]</sup>。健康老龄大鼠(22~24月龄),体重(650 $\pm$ 55)g。击昏后迅速开胸取出心脏,置于温浴(37 $^{\circ}$ C左右)的台氏液中,修剪后挂于灌流装置上,置于Langendorff装置上行主动脉逆向恒流灌流。灌流步骤:(1)无钙台氏液灌注至心脏充分停跳,以解除心肌细胞间的桥粒和连接,使心肌松弛,约5min。(2)胶原酶II(0.36g/L)和胰蛋白酶(0.1g/L)液消化10~15min;(3)剪下左右两个心耳,剪下心房部分置于37 $^{\circ}$ C液中剪碎,加新鲜消化液消化20min,经150 $\mu$ m尼龙网过滤,离心后重新置于新鲜KB液中室温保存。灌流系统保持37 $^{\circ}$ C,所以液体均用100% O<sub>2</sub>饱和。分离出棒状、横纹清晰、细胞膜完整的单个心房肌细胞。

1.3 膜片钳全细胞记录 采用全细胞膜片钳记录方法,膜片钳放大器(AXON-700B, USA)与计算机连接。刺激信号及电压输入信号的采集均由软件(Pclamp9.02)控制。玻璃毛坏(GG-17)经微电极拉

制仪(Narishige, pp-830)拉制成电阻为2.5~3.5M $\Omega$ 的电极。调节三维操纵器进行封接,使封接电阻达1G $\Omega$ 以上,吸破细胞膜形成全细胞记录模式。为消除细胞间误差,电流值以电流密度(pA/pF)表示。信号经截止频率为1kHz的四阶贝塞尔低通滤波器,采样率为5kHz。

1.4 诱发 $I_f$ 刺激参数的设定  $I_f$ 的记录,保持电位-40mV,施予4000ms, -150mV的去极化脉冲,可引出超极化激活的内向电流。该电流可被100 $\mu$ mol/L CsCl阻断。加入Car 1.0 $\mu$ mol/L,观察电流的改变。

$I_f$ 电流 $I$ - $V$ 曲线,保持电位-40mV,施予4000ms,阶跃10mV, -150~-50mV系列脉冲刺激。将各电压下的电流和尾电流密度对相应刺激电位作图。加入Car 1.0 $\mu$ mol/L,观察药物对电流作用的电压依赖性。

$I_f$ 稳态激活过程,按 $I$ - $V$ 曲线刺激模式,获得各电压下电流,换算为电导,以各去极化电位下电导与最大电导的相对值对脉冲电压作图,得 $I_f$ 的激活曲线。依Boltzmann方程 $I/I_{max} = 1 / \{1 + \exp[-(V_m - V_{1/2}) / k]\}$ 求出半稳态激活电压( $V_{1/2}$ )和稳态激活曲线斜率( $k$ )。加入Car 1.0 $\mu$ mol/L,观察药物对电流稳态激活的影响。

1.5 给药 取Car贮备液加至细胞外液中,稀释成所需浓度,在膜片钳记录模式形成后,用含药细胞外液灌流细胞约5min,记录 $I_f$ 。

1.6 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计学处理用方差分析和 $t$ 检验,采用SPSS 10.0软件进行处理。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

2.1 Car对老龄大鼠心房肌细胞 $I_f$ 的作用 在-150mV时,老龄大鼠心房肌细胞 $I_f$ 的电流密度为(3.2 $\pm$ 0.4)pA/pF( $n=18$ ),在细胞外也应用1 $\mu$ mol/L的Car后电流密度降为(2.4 $\pm$ 0.3)pA/pF( $n=19, P < 0.01$ ),而加入2mmol/L CsCl后电流几乎完全被阻断(图1)。

2.2 Car对老龄大鼠心房肌细胞 $I_f$ - $V$ 曲线的作用 从 $I$ - $V$ 曲线可以看出,随着电位向超极化方向移动,对照细胞电流迅速增加,而应用1 $\mu$ mol/L的Car后电流虽然也有增加,但增加的幅度较对照细胞显著减小,在-140mV至-90mV之间,二者有极显著差异( $P < 0.01, n = 18$ ),在-80mV时,二

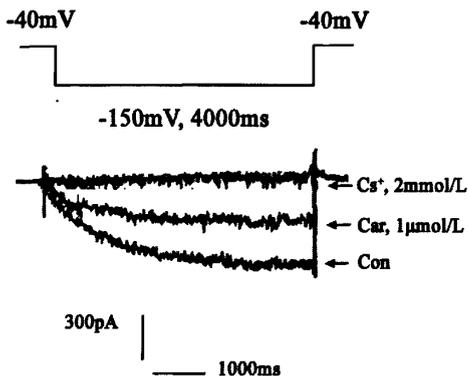


图1 Car对I<sub>f</sub>的作用

者有显著差异, ( $P < 0.05$ ,  $n = 18$ )。提示 Car 对  $I_f$  的抑制作用存在电压依赖性, 2 mmol/L CsCl 使电流的  $I-V$  曲线几乎变为一条直线(图 2)。

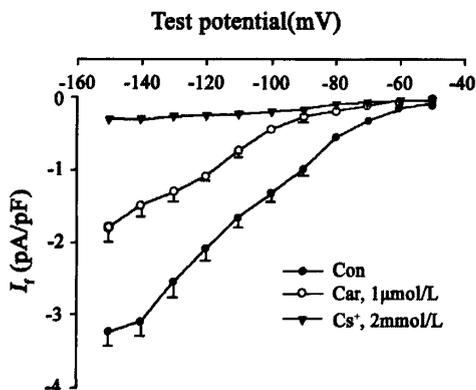


图2 Car对I<sub>f</sub> I-V曲线的作用

2.3 Car对老龄大鼠心房肌细胞I<sub>f</sub>稳态激活的作用 在对照细胞上,I<sub>f</sub>的半激活电压( $V_{1/2}$ )为( $-87.5 \pm 2.3$ )mV,而应用1µmol/L的Car后半激活电压为( $-96.2 \pm 4.7$ )mV,提示 $V_{1/2}$ 移向更负,将不利于通道的激活,而激活曲线斜率虽有差异,但无显著性意义( $n = 20$ ),见图3。

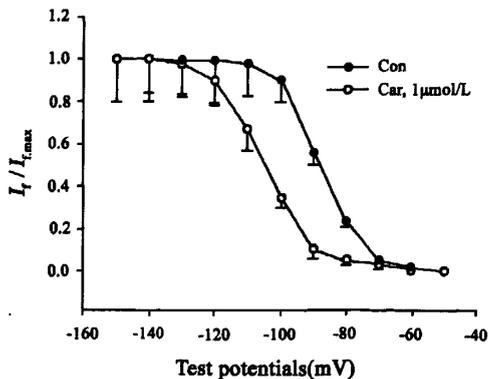


图3 Car对I<sub>f</sub>稳态激活曲线的作用

2.4 Car对老龄大鼠心房肌细胞I<sub>f</sub>翻转电位的作用 实验结果显示,在应用Car后I<sub>f</sub>的翻转电位与对照细胞的I<sub>f</sub>相近,用药组细胞为( $-75.4 \pm 4.3$ )mV,而对照组细胞为( $-73.3 \pm 6.8$ )mV,无显著差异( $n = 15$ )。

2.5 Car对老龄大鼠心房肌细胞I<sub>f</sub>作用的浓度依赖性 在细胞外分别应用0.1、0.3、1.0、3.0、10.0、30.0µmol/L的Car后,观察电流密度的改变,用 $I = I_{max} / (IC_{50} / [C] + 1)$ 方程计算其 $IC_{50}$ 为1.37µmol/L(95%可信限为1.96~0.57µmol/L)。以电流密度对药物浓度的对数作图得浓度依赖性曲线( $n = 20$ ),见图4。

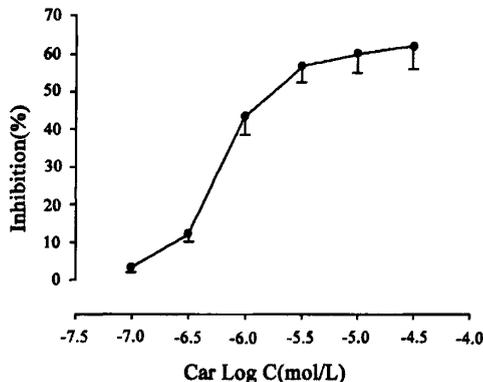


图4 Car对I<sub>f</sub>作用的浓度依赖性

### 3 讨论

本研究首先发现应用β受体阻断剂Car后,老龄大鼠心房肌细胞I<sub>f</sub>幅值和电流密度明显降低,此作用具有电压依赖性特征,即随着超极化电位的增加,药物抑制程度加大。在0.1~30.0µmol/L范围内Car对I<sub>f</sub>的抑制效应呈浓度依赖性( $IC_{50}$ 为1.37µmol/L)。进一步的实验显示,Car可以使电流稳态激活曲线向超极化方向移动,从而降低通道激活,提示这可能是Car减少电流的主要机制。I<sub>f</sub>是一种超极化激活的电流,其通道在-50 mV水平开始开放,到-120 mV充分开放。其主要成分是Na<sup>+</sup>和K<sup>+</sup>,尤其是Na<sup>+</sup>的内流。它是窦房结细胞的主要离子流,其活动增加,自律性增强。

I<sub>f</sub>在调解自主心律和心率方面具有重要作用。β受体激动剂可以使心率加快,而刺激迷走神经可以使心率减慢,这些生理过程都是通过影响细胞内cAMP进而影响I<sub>f</sub>的激活发挥作用。在衰竭或肥厚的心脏,其心肌组织中I<sub>f</sub>表达增加。研究认为,

衰竭心肌  $I_f$  过表达可能与室性心律失常的发生有关。无论窦性心律患者还是持续房颤患者,其心房中都有  $I_f$  的表达,证明  $I_f$  存在于心房肌组织中。持续房颤患者  $I_f$  通道 mRNA 表达明显高于窦性心律患者,提示  $I_f$  可能参与房颤发生的某种机制。有学者研究了  $I_f$  通道 mRNA 表达与左房充盈压的关系,发现左房充盈压越高,  $I_f$  通道 mRNA 表达越多。心房的异常自律性被认为参与房颤的启动,  $I_f$  过表达可能通过增加心房肌细胞的异常自律性启动房颤的发生。已有研究表明,临床房性异位兴奋与  $I_f$  通道 mRNA 表达增高相关。动物实验发现房颤发生与  $I_f$  增加关系密切。 $I_f$  可直接被交感神经的  $\beta$  受体兴奋所激活<sup>[6,7]</sup>。研制能够特异性抑制此电流活动的药物可能在房颤的治疗中有价值。

老年人由于心脏组织结构和神经支配改变,特别是窦房结的退行性变化,窦房结细胞减少消失,或是出现功能障碍,使得窦性心律降低,而潜在的起搏点如心房肌细胞电活动增强,为房颤的发生提供条件,  $I_f$  在异位节律增高方面均起关键作用<sup>[8]</sup>。目前一些药物将  $I_f$  作为治疗心律失常的作用靶点,成为研究的一个热点<sup>[9,10]</sup>。药物通过选择性干预  $I_f$  通道来控制起搏功能。在过去的几年,  $I_f$  的特异性阻断剂发展很快,最初称它们为“纯心动过缓”药剂,后来称为“减慢心率”的药剂,它们都是应用于临床的潜在药物。有报道显示 Car 具有抗老年人房颤的作用<sup>[11,12]</sup>,显示 Car 对老年人房颤患者具有一定作用。本研究显示,Car 通过电压依赖性和浓度依赖性抑制  $I_f$ ,提示 Car 通过影响老化心房肌细胞的  $I_f$  减少心房肌异位起搏点,从而起到降低房颤发生的作用,可能是其抗老年人房颤的电生理机制之一。

#### 参考文献

- [1] Lai LP, Su MJ, Lin JL, et al. Measurement of funny current mRNA human atrial tissue: correlation with left atrial filling pressure and a fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 1999, 10:947-953.
- [2] Zorn-Pauly K, Schaffer P, Pelzmann B, et al.  $I_f$  in left human atrium: a potential contributor to atrial ectopy. *Cardiovasc Res*, 2004, 64:250-259.
- [3] Qu J, Cohen IS, Robinson RB. Sympathetic innervation alters activation of pacemaker current ( $I_f$ ) in rat ventricle. *J Physiol*, 2000, 526 (Pt3):561-569.
- [4] Kamei M, Morita S, Hayashi Y, et al. Carvedilol versus metoprolol for the prevention of atrial fibrillation after off-pump coronary bypass surgery: rationale and design of the Carvedilol or Metoprolol Post-Revascularization Atrial Fibrillation Controlled Trial (COM-PACT). *Cardiovasc Drugs Ther*, 2006, 20:219-227.
- [5] 牛惠燕,刘念,李泮,等.早期口服卡维地洛对兔陈旧性心肌梗死边缘带不应期和钠电流的影响. *中国心脏起搏与心电生理杂志*, 2005, 19:218-221.
- [6] Baruscotti M, Bucchi A, DiFrancesco D. Physiology and pharmacology of the cardiac pacemaker ("funny") current. *Pharmacol Ther*, 2005, 107:59-79.
- [7] Honjo H, Kodama I, Toyama J. Autonomic regulation of pacemaker activity in the sinoatrial node. *Nippon Rinsho*, 1996, 54:2035-2040.
- [8] Thule T, Ahn JR, Woo SH. Inhibition of L-type  $Ca^{2+}$  channel by mitochondrial  $Na^+$ - $Ca^{2+}$  exchange inhibitor CGP-37157 in rat atrial myocytes. *Eur J Pharmacol*, 2006, 552:15-19.
- [9] Yusuf S, Camm AJ. Sinus tachyarrhythmias and the specific bradycardic agents: a marriage made in heaven. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2003, 8: 89.
- [10] DiFrancesco D, Camm AJ. Heart rate lowering by specific and selective  $I_f$  current inhibition with ivabradine: a new therapeutic perspective in cardiovascular disease. *Drugs*, 2004, 64:1757-1765.
- [11] El-Sherif N, Turitto G. Electrophysiologic effects of carvedilol: is carvedilol an antiarrhythmic agent? *Pacing Clin Electrophysiol*, 2005, 28:985-990.
- [12] Naccarelli GV. Antiadrenergic therapy in the control of atrial fibrillation. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2005, 10(Suppl 1):S33-S43.