

阻断 Ryanodine 受体对兔心肌肥厚触发性室性心律失常发生的影响*

肖幸¹ 柯俊² 张存泰¹ 贺莉³ 肖志超⁴ 阮磊¹

[摘要] 目的:研究阻断 Ryanodine 受体对兔心肌肥厚触发性室性心律失常发生的影响。方法:选择日本长耳兔,通过缩窄腹主动脉建立心肌肥厚模型(LVH组),并设立假手术组(仅游离腹主动脉,不进行缩窄)作为对照。8周后应用超声心动图证实心肌肥厚形成,采用酶解法分离左室心肌细胞,应用全细胞膜片钳技术记录动作电位,观察在异丙肾上腺素($1 \mu\text{mol/L}$)灌流和快频率(5 Hz)电刺激条件下,单个心肌细胞晚期后除极(DAD)和触发活动的发生率,以及预先分别灌流钙调蛋白激酶II抑制剂 KN-93($1 \mu\text{mol/L}$)和 Ryanodine 受体阻滞剂兰尼碱($10 \mu\text{mol/L}$)对肥厚心肌细胞 DAD 和触发活动发生率的影响。结果:假手术组、LVH组、KN-93组和兰尼碱组 DAD 的发生率分别为 0.85%、35%和 20%,触发活动的发生率分别为 0.60%、20%和 10%,KN-93组和兰尼碱组 DAD 和触发活动的发生率较 LVH组显著降低($P < 0.05$)。结论:阻断 Ryanodine 受体能够有效抑制兔心肌肥厚触发性室性心律失常的发生,Ryanodine 受体有望成为防治该类心律失常的新靶点。

[关键词] 心律失常,室性;Ryanodine 受体;钙调蛋白激酶II;晚期后除极;左室肥厚

[中图分类号] R541.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-1439(2013)03-0200-04

Effect of Ryanodine receptor blockage on triggered ventricular arrhythmia in rabbits with left ventricular hypertrophy

XIAO Xing¹ KE Jun² ZHANG Cuntai¹ HE Li³ XIAO Zhichao⁴ Ruan Lei¹

(¹Department of Geratology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430030, China; ²Department of Emergency, Fujian Provincial Hospital, Provincial College of Clinical Medicine, Fujian Medical University; ³Department of Cardiology, Puai Hospital in Wuhan; ⁴Department of Cardiology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology)

Corresponding author: KE Jun, E-mail: kejun801004@yahoo.com.cn

Abstract Objective: To investigate the effect of Ryanodine receptor blockage on triggered ventricular arrhythmia in rabbits with left ventricular hypertrophy (LVH). **Method:** Japanese rabbits were established LVH models by the coarctation of the abdominal aorta, while those in the sham group did not undergo the coarctation. After 8 weeks, single left ventricular myocyte was isolated by enzymatic dissociation method and action potential (AP) was recorded using whole cell patch clamp technique. Perfused with Tyrode's solution containing isoprenaline ($1 \mu\text{mol/L}$), the frequency of delayed afterdepolarization (DAD) and triggered activity was recorded under high-frequency stimulation (5 Hz). And the effect of KN-93 and Ryanodine perfusion on the frequency of

* 基金项目:福建省自然科学基金面上项目(No:2008J0075);国家自然科学基金资助项目(No:30971180)

¹ 华中科技大学同济医学院附属同济医院综合科(武汉,430030)

² 福建医科大学省立临床医学院 福建省立医院急诊内科

³ 武汉市普爱医院心内科

⁴ 华中科技大学同济医学院附属同济医院心内科

通信作者:柯俊, E-mail: kejun801004@yahoo.com.cn

[9] KUHN H J. Optimizing catheter-based therapy of hypertrophic obstructive cardiomyopathy: does alcohol dose matter? [J]. Can J Cardiol, 2011, 27: 668-670.

[10] VESELKA J, PROCHAZKOVA S, DUCHONOVA R, et al. Alcohol septal ablation for hypertrophic obstructive cardiomyopathy: Lower alcohol dose reduces size of infarction and has comparable hemodynamic and clinical outcome[J]. Catheter Cardiovasc Interv, 2004, 63: 231-235.

[11] KUHN H, LAWRENZ T, LIEDER F, et al. Survival af-

ter transcatheter ablation of septal hypertrophy in hypertrophic obstructive cardiomyopathy (TASH): a 10 year experience[J]. Clin Res Cardiol, 2008, 97: 234-243.

[12] FABER L, WELGE D, FASSBENDER D, et al. One-year follow-up of percutaneous septal ablation for symptomatic hypertrophic obstructive cardiomyopathy in 312 patients: predictors of hemodynamic and clinical response[J]. Clin Res Cardiol, 2007, 96: 864-873.

(收稿日期:2012-09-26)

DAD and triggered activity was observed. **Result:** The frequency of DAD was 0 in sham group, 85% in LVH group, 35% in KN-93 group, and 20% in Ryanodine group. The frequencies of triggered activity were 0, 60%, 20%, and 10%, respectively. The frequencies of DAD and triggered activity in KN-93 and Ryanodine groups were much lower than those in LVH group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Blockage of Ryanodine receptor is a new method of treatment which effectively reduce the occurrence of triggered ventricular arrhythmia in rabbits with LVH.

Key words arrhythmia, ventricular; Ryanodine receptor; calmodulin kinase II; delayed afterdepolarization; left ventricular hypertrophy

心肌肥厚是临床常见的心脏病理改变。流行病学研究显示,心肌肥厚患者室性心律失常的发生率远高于正常人群,且恶性程度高,易导致心源性猝死^[1]。近年研究发现,心肌肥厚时 Ca^{2+}/CaM 依赖的钙调蛋白激酶 II (calmodulin kinase II, CaMK II) 表达增加,继而磷酸化下游的 Ryanodine 受体导致其功能异常,这可能是室性心律失常增加的重要机制^[2-3]。之前的研究中,我们在心肌组织块水平证明了阻断 Ryanodine 受体可显著减少肥厚心肌心律失常的发生^[4]。本研究中我们深入细胞水平,观察在异丙肾上腺素灌流和快频率电刺激条件下,单个肥厚心肌细胞晚期后除期 (delayed afterdepolarization, DAD) 和触发活动的发生情况,并分别应用 CaMK II 抑制剂 KN-93 与 Ryanodine 受体阻滞剂兰尼碱进行干预,观察其对 DAD 和触发活动发生率的影响,探讨肥厚心肌心律失常发生的细胞电生理机制和阻断 Ryanodine 受体的防治价值。

1 材料与方法

1.1 试剂及溶液组成

KN-93、DMSO、HEPES、EGTA、蛋白酶 (TYPE XIV) 购自 Sigma 公司, II 型胶原酶购自 Worthington 公司, 兰尼碱购自 Enzo Life Sciences, 其他试剂均为分析纯。无钙台氏液成分 (mmol/L): NaCl 135, KCl 5.4, NaH_2PO_4 0.33, $MgCl_2$ 1.0, HEPES 10, 葡萄糖 10; 用 NaOH 将 pH 值调至 7.28~7.30。KB 液成分 (mmol/L): L-谷氨酸 50, KCl 70, KH_2PO_4 20, 牛磺酸 20, $MgCl_2$ 5, KOH 70, EGTA 0.5, HEPES 10, 葡萄糖 10; 用 KOH 将 pH 值调至 7.28~7.30。记录单细胞动作电位的电极内液成分 (mmol/L): NaCl 5, KCl 120, $CaCl_2$ 1.0, $MgCl_2$ 5, Na_2ATP 5, EGTA 11, HEPES 10; 用 KOH 将 pH 值调至 7.28~7.30。正钙台氏液: 无钙台氏液中加入 $CaCl_2$, 终浓度 2 mmol/L; 异丙肾上腺素直接溶于正钙台式液中, 终浓度为 $1 \mu mol/L$; KN-93 和兰尼碱分别溶于 DMSO, 再溶于正钙台氏液中, 终浓度分别为 $1 \mu mol/L$ 和 $10 \mu mol/L$ 。

1.2 动物模型制备

选取健康日本长耳兔 (由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供) 20 只, 雌雄不拘, 体重 2.0~

2.5 kg。随机分为假手术组和心肌肥厚组 (LVH 组), 每组 10 只。LVH 组采用腹主动脉缩窄术建立心肌肥厚模型, 以 20% 乌拉坦 (1 g/kg) 耳缘静脉全身麻醉, 手术分离腹主动脉近心端, 在右肾动脉开口以上, 用 4# 丝线将其缩窄 60%~70%, 术中无菌操作。术后肌肉注射青霉素 80 万 U 抗感染 3 d, 普通饲料喂养 8 周。假手术组除不行腹主动脉缩窄外, 其他操作同 LVH 组。

1.3 超声心动图检查

术后 8 周行超声心动图检查, 证实室室肥厚形成且射血分数正常: 以 20% 乌拉坦 (1 g/kg) 耳缘静脉全身麻醉, 胸部脱毛, 仰卧位固定, 通过 M 型超声 (GE 公司 Vivid 7 超声诊断仪, 探头 10 s, 图像深度 3.0~5.0 cm, 频率 11.4 MHz), 测量室间隔厚度 (SW)、左室后壁厚度 (LVPW) 和左室舒张末期左室内径 (LVDd), 按 Devereux 公式计算左室重量 = $1.04 \times [(LVDd + SW + LVPW)^3 - LVDd^3]$ ^[5]。

1.4 兔单个左室心肌细胞的分离

兔喂养 8 周后称重, 予以 3% 戊巴比妥钠 (30 mg/kg) 和 30% 乌拉坦 (300 mg/kg) 静脉麻醉, 肝素 (1 000 U/kg) 抗凝处理, 开胸迅速取出心脏, 置于 4℃ 无钙台氏液中, 使心脏立即停跳, 行主动脉逆行插管, 在 37℃ 和通氧条件下行 Langendorff 灌流。首先用无钙台氏液灌流 3~5 min, 然后用含 30 mg II 型胶原酶、3 mg 蛋白酶和 10 mg 牛血清白蛋白的无钙台氏液 (70 ml) 灌流 30 min 消化心肌。剪去心房肌及右室, 留左室游离壁心肌组织剪碎后过滤, 将细胞保存于含 200 U/ml 庆大霉素的 KB 液中, 室温孵育 1 h。吸取保存液加于 1 ml 灌流槽中, 待细胞贴壁后, 于倒置显微镜下选择边缘整齐、表面无颗粒、横纹清晰、静止无收缩的杆状心肌细胞在室温 (25℃) 下进行膜片钳实验。

1.5 实验分组与灌流方案

设假手术组、LVH 组、LVH+KN-93 组 (KN-93 组) 及 LVH+兰尼碱组 (兰尼碱组), 每组 20 个细胞 (LVH 组、KN-93 组及兰尼碱组为随机选取的肥厚心肌细胞)。①假手术组和 LVH 组: 用正钙台氏液孵育 10 min, 然后灌流含异丙肾上腺素 ($1 \mu mol/L$) 的正钙台氏液; ②KN-93 组: 先用含 KN-93 ($1 \mu mol/L$) 的正钙台氏液孵育 10 min, 然后灌流含异丙肾上腺素 ($1 \mu mol/L$) 和 KN-93 ($1 \mu mol/L$) 的正钙台氏液;

③兰尼碱组:先用含兰尼碱($10 \mu\text{mol/L}$)的正钙台氏液孵育 10 min,然后灌流含异丙肾上腺素($1 \mu\text{mol/L}$)和兰尼碱($10 \mu\text{mol/L}$)的正钙台氏液。

1.6 单细胞动作电位记录与观察指标

采用全细胞膜片钳记录方法,在电流钳模式下记录单细胞动作电位(AP)。使用 EPC-9 膜片钳放大器(HEKA,德国)通过 12 位 A/D 和 D/A 数据转换器与计算机连接,刺激信号及电流输入细胞的采集均由软件(Pulse+Plusefit 8.5)控制。微电极采用微电极拉制仪(PP2830,日本)两步拉制而成,微电极内充电极内液,入水时阻抗为 $2.5 \sim 3.5 \text{ M}\Omega$,调节三维操纵器使电极尖端与细胞膜表面形成 $>1 \text{ G}\Omega$ 封接,再施加一负压吸破细胞膜形成全细胞记录,对液接电位和电容电流予以补偿,最终形成全细胞记录模式。实验前先给予 900 pA 、 10 ms 、 1 Hz 的外向电流刺激 5 min,选择静息膜电位小于 -70 mV 的细胞进行实验,记录稳定后心肌细胞的动作电位时程(APD)。灌流 15 min 后,给予细胞 5 Hz 的刺激 20 次,观察各组细胞 APD 的变化,以及 DAD 和触发活动的发生率。

1.7 统计学处理

采用 SPSS16.0 软件进行统计学分析。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 t 检验及单因素方差分析;计数资料使用 Fisher 精确检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 心肌肥厚时超声心动图的变化

与假手术组相比, LVH 组腹主动脉局部明显狭窄(图 1a),术后 8 周左室室壁明显增厚、左室重量增加($P < 0.05$),但 LVDd 无显著变化(图 1b,表 1),

测心脏射血分数均 $>60\%$ 。提示代偿期心肌肥厚模型建立成功。

2.2 心肌肥厚时左室细胞 APD 的变化及干预药物的影响

假手术组、LVH 组、KN-93 组和兰尼碱组的 APD 分别为 (435 ± 39) 、 (513 ± 45) 、 (502 ± 33) 和 $(507 \pm 35) \text{ ms}$,精细膜电位分别为 (-75.2 ± 5.3) 、 (-71.4 ± 4.0) 、 (-73.6 ± 6.3) 和 $(-74.2 \pm 5.1) \text{ mV}$ 。与假手术组相比, LVH 组、KN-93 组和兰尼碱组 APD 明显延长($P < 0.05$), KN-93 组及兰尼碱组与 LVH 组相比,差异无统计学意义,提示 KN-93 和兰尼碱对于单个肥厚心肌细胞的 APD 无明显影响。

2.3 各组心肌细胞 DAD 和触发活动的发生情况

假手术组 DAD 和触发活动的发生率均为 0; LVH 组 DAD 和触发活动(图 2)的发生率分别为 85% ($17/20$)和 45% ($9/20$); KN-93 组 DAD 和触发活动的发生率分别为 35% ($7/20$)和 20% ($4/20$),与 LVH 组相比均差异有统计学意义(均 $P < 0.05$);兰尼碱组 DAD 和触发活动的发生率分别为 20% ($4/20$)和 10% ($2/20$),与 LVH 组相比均差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。以上结果提示 KN-93 和兰尼碱可明显降低肥厚心肌细胞 DAD 和触发活动的发生率。

3 讨论

心肌肥厚是临床上常见的心脏病理改变,常见于高血压和肥厚型心肌病患者。流行病学研究显示,上述人群中室性心律失常的发生率远高于正常人群,更易出现心室颤动等恶性心律失常,导致心源性猝死,并常发生于体力活动等应激状态时^[1,6]。这些临床现象与心肌肥厚后出现的“心电重塑”密切相关,其中钙离子转运异常起非常重要的作用:



a: LVH 组腹主动脉,箭头示动脉结扎处局限性狭窄;b:假手术组术后;c:LVH 组术后。

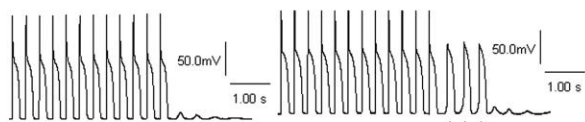
图 1 假手术组与 LVH 组超声心动图

Figure 1 Echocardiography images in sham group and LVH group

表 1 各组超声心动图结果
Table 1 Echocardiography results

组别	SW/mm	LVPW/mm	LVDd/mm	LVM/g	LVM/BW
假手术组(10 只)	3.04 ± 0.23	3.03 ± 0.28	10.90 ± 0.64	3.76 ± 0.55	1.79 ± 0.12
LVH 组(10 只)	$4.18 \pm 0.24^{1)}$	$4.06 \pm 0.23^{1)}$	11.08 ± 0.60	$6.11 \pm 0.69^{1)}$	$2.44 \pm 0.10^{1)}$

与假手术组比较,¹⁾ $P < 0.05$ 。



左图箭头示 DAD,右图箭头示触发活动。

图 2 单个肥厚心肌细胞的 DAD 及触发活动

Figure 2 DAD and triggered activity in single hypertrophic ventricular myocyte

舒张期钙渗漏可导致胞质内钙超载,继而激活位于细胞膜上的钠钙交换体(NCX)产生瞬时内向电流(I_{ti}),引起 DAD 和触发活动,最终产生触发性心律失常^[7]。本研究采用异丙肾上腺素灌流和快频率刺激模拟应激状态,发现肥厚心肌细胞的 DAD 和触发活动发生率明显增加,说明触发机制是肥厚心肌发生心律失常的重要电生理机制。

决定心肌细胞钙转运的主要因素包括:①位于胞内肌浆网上的 Ryanodine 受体和摄取通道;②位于细胞膜上的 L 型钙通道、NCX 等离子通道^[8]。目前临床应用的主要抗心律失常药物,其治疗靶点多位于包括后者在内的细胞膜离子通道,遗憾的是防治效果并不理想,例如对于肥厚型心肌病患者, β 受体阻滞剂、维拉帕米、胺碘酮均不能对猝死有效预防^[9]。因此,当前研究开始逐渐关注胞内信号途径,以期找到更有效的干预靶点。我们的研究正关注于 Ryanodine 受体——这一位于胞内的影响胞质钙水平的关键蛋白,我们发现给予其特异性阻滞剂兰尼碱处理后,肥厚心肌细胞的 DAD 和触发活动发生率显著减少,表明 Ryanodine 受体可能成为防治触发性心律失常治疗的全新重要靶点。

最新研究显示,Ryanodine 受体的功能不仅与表达数量有关,还与自身的磷酸化状态密切相关^[10]。近年逐渐受到重视的 Ca^{2+}/CaM 依赖的 CaMK II,可以磷酸化多种与钙转运相关的蛋白底物,包括 Ryanodine 受体、L 型钙通道、NCX 等,继而改变其功能^[11]。因此,心肌肥厚时表达上调的 CaMK II,不仅可过度磷酸化 Ryanodine 受体导致其钙释放功能异常,还可增强 L 型钙电流与 I_{ti} ,通过影响钙转运的多个环节引起钙稳态失衡。我们发现,给予 CaMK II 的特异性阻滞剂 KN-93 后,肥厚心肌细胞的 DAD 和触发活动发生率同样明显减少,但抑制效果逊于用兰尼碱直接阻断 Ryanodine 受体,这提示 Ryanodine 受体在触发性心律失常的发生中更为重要。

经典的蛋白激酶 A(PKA)途径也能够磷酸化 Ryanodine 受体,引起钙渗漏增加,这可能是产生上述效应差别的一个原因^[12]。KN-93 虽能抑制 CaMK II 对 Ryanodine 受体的过度磷酸化,却不能阻断 PKA 的磷酸化作用;而兰尼碱直接抑制 Ryanodine 受体,因此减少钙渗漏的作用可能更强。

这也提示我们,围绕 Ryanodine 受体的干预可能存在多个潜在的靶点,需深入研究寻找最安全有效的防治方案。

恶性心律失常的防治和心源性猝死的预防一直是临床关注的重点和难点,本研究显示,Ryanodine 受体可能成为胞内信号转导水平上防治心律失常的新靶点,与国外的研究一致。接下来尚需进一步量化分析钙离子在胞内各个时期的分布和转运情况,才能真正探明病理心肌的钙稳态失衡,为突破性的治疗提供全新思路和正确指导。

参考文献

- [1] HAIDER A W, LARSON M G, BENJAMIN E J, et al. Increased left ventricular mass and hypertrophy are associated with increased risk for sudden death [J]. *J Am Coll Cardiol*,1998,32:1454-1459.
- [2] COLOMER J M, MAO L, ROCKMAN H A, et al. Pressure overload selectively up-regulates Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II in vivo [J]. *Mol Endocrinol*,2003,17:183-192.
- [3] FERRERO P, SAID M, SANCHEZ G, et al. Ca^{2+} /calmodulin kinase II increases ryanodine binding and Ca^{2+} -induced sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release kinetics during beta-adrenergic stimulation [J]. *J Mol Cell Cardiol*,2007,43:281-291.
- [4] JUN K, XING X, FENG C, et al. Function of the CaMKII-Ryanodine receptor signaling pathway in rabbits with left ventricular hypertrophy and triggered ventricular arrhythmia [J]. *World J Emerg Med*, 2012,3:65-70.
- [5] 柯俊,张存泰,马业新,等. 钙调蛋白激酶 II 抑制剂对心肌肥厚兔室性心律失常的影响 [J]. *中华心血管病杂志*,2007,35(1):33-36.
- [6] 薛令辉,刘义. 肥厚型心肌病 36 例临床分析 [J]. *临床心血管病杂志*,2012,28(2):114-115.
- [7] 吴钢,程冕,黄从新,等. 醛固酮对心肌细胞钙稳态及电生理特性的影响 [J]. *临床心血管病杂志*,2012,28(1):74-75.
- [8] BERS D M. Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes [J]. *Annu Rev Physiol*,2008,70:23-49.
- [9] MARON B J. Hypertrophic cardiomyopathy: A systematic review [J]. *JAMA*,2002,287:1308-1320.
- [10] MACKRILL J. Ryanodine receptor calcium channels and their partners as drug targets [J]. *Biochem Pharmacol*,2010,79:1535-1543.
- [11] MAIER L S, ZHANG T, CHEN L, et al. Role of CaMKII for signaling and regulation in the heart [J]. *Front Biosci*,2009,14:486-496.
- [12] MARX S O, REIKEN S, HISAMATSU Y, et al. PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): Defective regulation in failing hearts [J]. *Cell*,2000,101:365-376.