

卡维地洛对兔扩张型心肌病 心肌细胞电重构的影响*

贺莉¹ 李论¹ 肖杰¹ 高波¹ 肖建民² 顾晔¹

[摘要] 目的:研究卡维地洛对阿霉素心肌病兔心肌细胞晚期后除极(DADs)和触发活动(TA)发生率的影响,并探讨氧化应激与心肌电重构之间的关系。方法:40只新西兰大白兔随机分为对照组、阿霉素组、阿霉素+卡维地洛组(卡维地洛组)和阿霉素+倍他乐克组(倍他乐克组),每组10只。建立阿霉素扩张型心肌病模型(阿霉素 $1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,iv每周两次,共16次)。3周后,对照组和阿霉素组每日以 0.9% 氯化钠($5\text{ ml}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)灌胃,卡维地洛组和倍他乐克组分别给予卡维地洛($5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)和倍他乐克($5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)灌胃,两个月。超声心动图观察各组心脏结构变化,检测血浆中丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化酶(GSH-Px)和超氧化物歧化酶(SOD)的浓度,酶解法分离家兔心室肌细胞,应用全细胞膜片钳技术记录动作电位(AP),观察在快频率电刺激下DADs和TA的发生率。结果:与对照组比较,阿霉素组左室舒张末期容积(LVEDV)增大,SOD和GSH-Px降低,MDA增高,左室射血分数(LVEF)降低;与阿霉素组和倍他乐克组比较,卡维地洛组LVEDV缩小,MDA降低,SOD和GSH-Px增加,LVEF增加(均 $P<0.05$);3 Hz刺激下,对照组未诱发出DADs和TA,阿霉素组DADs和TA的诱发率显著增加,分别为18/20和11/20($P<0.05$);卡维地洛组和倍他乐克组DADs的发生率分别为10/20、16/20,TA的发生率分别为4/20、10/20,两组比较有统计学差异($P<0.05$)。结论:阿霉素心肌病兔心肌氧化应激水平增加,心肌细胞电重构,DADs和TA发生率明显增加;卡维地洛降低氧化应激水平,改善心肌细胞电重构,从而降低了DADs和TA的发生。

[关键词] 心力衰竭;卡维地洛;触发活动;晚期后除极

doi:10.13201/j.issn.1001-1439.2014.07.020

[中图分类号] R541.6 **[文献标志码]** A

Effect of carvedilol on electrical remodeling in rabbit with ADR cardiomyopathy

HE Li¹ LI Lun¹ XIAO Jie¹ GAO bo¹ XIAO Jianmin² GU Ye¹

(¹Department of Cardiology, Puai Hospital, Wuhan, 430033, China;²Department of Cardiology, Taiping Hospital in Dongguan of Guangdong Province)

Corresponding author: GU Ye, E-mail: yegu2003@yahoo.com.cn

Abstract Objective: To investigate the effect of carvedilol on triggered activity(TA) and delayed afterdepolarizations(DADs) in cardiac myocytes of rabbits with adriamycin cardiomyopathy and the relation between oxidative stress and electrical remodeling in adriamycin cardiomyopathy. **Method:** Forty New Zealand white rabbits were randomly divided into four groups ($n=10$ each): the control group, the adriamycin group, the carvedilol group and the metoprolol group. Rabbits in the adriamycin group, the metoprolol group and the carvedilol group were intravenously injected at auri-edge with adriamycin hydrochloride ($1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) twice a week for 8 weeks, and at the same timepoint those in the control group were injected with equal saline. Thereafter, rabbits in the metoprolol group and the carvedilol group were intragastric administrated with metoprolol and carvedilol ($5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) respectively, and those in the control group and the adriamycin group were intragastric administrated with equal volume of saline. Two months later, left ventricular end diastolic volume(LVEDV), left ventricular end systolic volume(LVESV) and left ventricular shortening fraction(LVFS) were measured by echocardiogram; MDA, SOD and GSH-Px were measured. By enzymatic dissociation method, single ventricular myocytes were isolated. Then by whole cell patch clamp technique, action potentials (APs) were recorded. The incidences of delayed afterdepolarizations (DADs) and triggered activity(TA) were monitored under fast frequency electrical stimulation. **Result:** Adriamycin increased MDA, LVEDV and LVESV, and decreased SOD and GSH-Px. And the incidences of DAD

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No: 30971180)

¹武汉市普爱医院心内科(武汉,430033)

²广东省东莞太平医院心内科

通信作者:顾晔, E-mail: yegu2003@yahoo.com.cn

sand TA (18/20, 11/20) were significant higher than those in the control group (0/20, 0/20) ($P < 0.05$). Carvedilol increased SOD and GSH-Px, decreased MDA, LVEDV and LVESV, and inhibited the increase of incidences of DADs and TA (10/20, 4/20) ($P < 0.05$). There were no significant different in LVESV, LVEDV and the incidences of DADs and TA between the metoprolol group and the adriamycin group. **Conclusion:** Carvedilol can inhibit the occurrence of DADs and TA in rabbits with adriamycin cardiomyopathy and protect adriamycin-induced cardiotoxicity, which relate to oxygen free radical production.

Key words heart failure; carvedilol; trigger action; delayed afterdepolarizations

阿霉素是一种蒽环类广谱抗肿瘤药物,虽具有良好的临床疗效,但对心脏有明显不良反应,呈剂量依赖性,故限制了其在临床上的广泛应用^[1]。阿霉素所致心肌病以顽固性心力衰竭、恶性心律失常、心源性猝死为临床特征^[2]。目前,阿霉素导致心律失常的机制尚不清楚,有研究表明心肌细胞发生脂质过氧化是阿霉素心肌毒性的主要原因之一,而氧化应激与细胞内钙离子超载密切相关^[3-4]。研究表明,第3代 β 受体阻滞剂卡维地洛除了 β 受体抑制的药理作用之外,还具有抗氧化的作用^[5]。因此,本实验建立慢性阿霉素心肌病模型,在此基础上比较各组氧化应激水平和电重构的变化,并探讨氧化应激与细胞内钙离子超载的关系,及二者在阿霉素心肌病心肌细胞电重构中的地位。

1 材料与方法

1.1 试剂和溶液

超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)和丙二醛(malondialdehyde, MDA)测定试剂盒购自南京建成生物研究所;I型胶原酶购自Gibco公司,美托洛尔(倍他乐克)购自阿斯利康制药有限公司;盐酸卡维地洛和阿霉素购自武汉远成公司;其他试剂均为分析纯,购自Sigma公司。正钙台氏液成分($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$): NaCl 135, CaCl_2 1.8, KCl 5.4, MgCl_2 1.0, NaH_2PO_4 0.33, 葡萄糖 10, HEPES 10, pH 值调至 7.30。0.2 mmol/L 钙台氏液和无钙台氏液分别为台氏液中加 0.2 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ CaCl_2 和不加 CaCl_2 。KB 液成分($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$): L-谷氨酸 50, KH_2PO_4 20, KCl 70, KOH 70, EGTA 0.5, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5, HEPES 10, 牛磺酸 20, 葡萄糖 10, pH 值调至 7.20。电极内液成分($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$): MgCl_2 1, KCl 20, Na_2ATP 4, HEPES 10, GTP 0.1, 葡萄糖 10, 天冬氨酸钾 12, PH 值调至 7.20。记录单细胞 AP 的电极内液成分($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$): NaCl 5, KCl 120, CaCl_2 1, Na_2ATP 5, EGTA 11, HEPES 10, MgCl_2 5, pH 值调至 7.30。电极外液为台氏液^[6-7]。

1.2 制备动物模型和分组

新西兰大白兔 40 只,雄性,体重(1.5~2.5) kg,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供,随机分为对照组、阿霉素组、阿霉素+卡维地洛

组(卡维地洛组)和阿霉素+倍他乐克组(倍他乐克组),各组 10 只。阿霉素加 0.9%氯化钠配成 $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。阿霉素组、卡维地洛组和倍他乐克组兔阿霉素耳缘静脉注射,每次 $1 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1}$,每周 2 次,对照组兔耳缘静脉注射等量 0.9%氯化钠,每周 2 次,共 16 次。注射结束 3 周后,卡维地洛组给予卡维地洛($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)灌胃,倍他乐克组给予倍他乐克($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)灌胃,对照组和阿霉素均给予等量 0.9%氯化钠灌胃,两个月^[8-9]。

1.3 超声检查

实验开始及动物处死前分别行超声心动图检查。以耳缘静脉注射乌拉坦($1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)麻醉,脱毛,固定。常用二维切面超声心动图检查,通过 M 型超声获得左室间隔厚度(interventricular septal thickness, IVST)、左室舒张末期容积(left ventricular end-diastolic volume, LVEDV)、左室收缩末期容积(left ventricular end-systolic volume, LVESV)、左室短轴缩短分数(left ventricular shortening fraction, LVFS)和左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)。

1.4 MDA、SOD 和 GSH-Px 测定

处死动物时,取血,分离,血清-80℃保存。采用硫代巴比妥酸法测定血清中 MDA 浓度,DTNB 直接法测定血清中 GSH-Px 浓度,黄嘌呤氧化酶测定血清中 SOD 浓度。

1.5 家兔单个心室肌细胞的分离

兔喂养 20 周后,称重,3%戊巴比妥钠($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)耳缘静脉全身麻醉,肝素钠($1000 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$),剪毛,固定,取出心脏,置于 4℃无钙台氏液中停跳心脏,轻柔挤出瘀血,行主动脉逆行插管,心脏固定在 Langendorff 灌流系统上,在通氧、37℃条件下,先用无钙台氏液灌流 5~10 min 左右,再用 70 ml 无钙台氏液(含蛋白酶 E 3 mg、牛血清白蛋白 10 mg 和 33 mg I 型胶原酶)灌流 30 min 左右,消化心肌组织^[8]。镜下可见大量存活杆状心肌细胞,用无钙台氏液冲洗残余酶液,取左室游离壁心肌,剪碎组织,放入无钙台氏液中,过滤,取上清液,缓慢复钙,将单细胞保存于正常台氏液(含 0.025%牛血清白蛋白和 $200 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$ 氨苄青霉素)中,室温孵育 1 h。在室温下,取细胞液加于灌流槽中,静置,选择横纹清晰、表面无颗粒、静止无收缩、边缘

整齐的杆状心肌细胞进行实验^[6-7]。

1.6 单细胞动作电位记录

取细胞液适量加于灌流槽中,放置在倒置显微镜下,静置待细胞贴壁后,在25℃室温下进行实验。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,通过数据转换器连接计算机,刺激信号、电流输入细胞(Pulse+Plusefit 8.5软件控制)^[6]。微电极由中性玻璃毛坏为材料,通过两步拉制法,使用微电极拉制仪制备玻璃微电极。玻璃微电极内注入电极内液,入水时其阻抗为2.0~3.5 MΩ。选择边缘整齐、表面无颗粒、静止无收缩、横纹清晰的杆状心肌细胞,调节三维操纵器,使细胞膜表面与电极尖端形成大于1 G封接,心肌细胞膜被吸破后,形成全细胞记录,然后进行补偿,形成全细胞记录模式。先给予封接的心肌细胞10 ms,900 pA,1 Hz的刺激5 min,如细胞静息膜电位大于-70 mV,则将其剔除,记录稳定后心肌细胞的动作电位时程(action potential duration,APD)。给予细胞10 ms,900 pA,3 Hz的刺激20次,观察各组心肌细胞DADs、TA的发生率。4组分别取20个心肌细胞^[6-7]。

1.7 统计学处理

统计学分析采用SPSS16.0软件进行,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料使用Fisher精确检验(Fisher's Exact Test),计量资料使用配对 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 心脏超声结构变化

与对照组比较,阿霉素组兔的心脏明显受损,表现为心室壁变薄,LVESV和LVEDV增加,LVFS缩小,LVEF降低(表1, $P < 0.05$)。倍他乐克组LVEDV有所缩小,LVEF有所增加,但与阿霉素组比较无显著性差异。卡维地洛组模型心脏结构和功能明显改善,表现为LVEDV和LVESV明显降低,LVFS增加,LVEF显著增加,与阿霉素组和倍他乐克组比较,有统计学差异(表1)。

2.2 MDA、GSH-Px和SOD的改变

与对照组比较,阿霉素组的MDA明显升高,SOD和GSH-Px显著性降低;卡维地洛干预后,血

清SOD和GSH-Px活性升高,MDA浓度减低,与阿霉素组和倍他乐克组比较有统计学差异;与阿霉素比较,倍他乐克组上述3项指标无明显差异(见表2)。

表2 各组氧化应激指标比较

组别	MDA/ (nmol·ml ⁻¹)	SOD/ (U·ml ⁻¹)	GSH-Px/ (U·ml ⁻¹)
对照组(10只)	3.0±0.3	339.0±28.0	77.9±13.3
阿霉素组(10只)	7.3±0.9 ¹⁾³⁾	238.0±18.9 ¹⁾³⁾	34.1±10.7 ¹⁾³⁾
卡维地洛组(10只)	3.5±0.3 ¹⁾²⁾	316.7±17.3 ¹⁾²⁾	62.8±18.3 ¹⁾²⁾
倍他乐克组(10只)	6.8±0.8 ¹⁾	254.3±17.7 ¹⁾	37.5±11.7 ¹⁾

与对照组比较,¹⁾ $P < 0.05$;与倍他乐克组比较,²⁾ $P < 0.05$;与卡维地洛组比较,³⁾ $P < 0.05$ 。

2.3 心肌细胞静息电位和APD比较

在电流钳模式下,给予外向电流(900 pA、15 ms、1 Hz),诱发单个左心室心肌细胞AP和静息膜电位,对照组、阿霉素组、倍他乐克组及卡维地洛组静息膜电位分别为(76.3±4.4)mV、(78.5±4.8)mV、(79.1±4.4)mV和(78.7±4.3)mV。4组比较无统计学差异($P > 0.05$)。对照组、阿霉素组、倍他乐克组及卡维地洛组心肌细胞APD分别为(312±9)ms、(358±19)ms、(367±16)ms和(326±11)ms。与对照组相比,阿霉素组APD明显延长($P < 0.05$);倍他乐克组同阿霉素组比较则无明显差异。与对照组比较,卡维地洛组APD显著性延长,但与阿霉素组比较,APD明显缩短($P < 0.05$)。

2.4 不同β受体阻滞剂对阿霉素心肌病兔DADs和TA的影响

将膜片钳置于电流钳模式下,予以10 ms、900 pA、1 Hz的外向电流(静息膜电位大于-70 mV的细胞弃去),刺激稳定后,给与3 Hz的外向电流20次,记录各组DADs和TA发生率。对照组未诱发出DADs和TA,阿霉素组DADs和TA发生率(18/20,11/20)明显增加($P < 0.05$);倍他乐克组与阿霉素组比较,DADs和TA发生率(16/20,10/20)有所下降,但无显著性差异($P > 0.05$)。与对照组比较,卡维地洛组DADs和TA发生率(10/20,4/20)明显增加,但与阿霉素组和倍他乐克组比较

表1 各组兔心脏形态结构参数比较

组别	IVST/mm	LVESV/ml	LVEDV/ml	LVFS/%	LVEF/%
对照组(10只)	3.99±0.26	1.93±0.17	6.51±0.75	36.8±5.1	77.8±4.4
阿霉素组(10只)	3.00±0.26 ¹⁾	4.90±0.47 ¹⁾³⁾	9.52±1.16 ¹⁾³⁾	21.8±5.9 ¹⁾³⁾	49.7±5.2 ¹⁾³⁾
卡维地洛组(10只)	3.17±0.31 ¹⁾	2.63±0.46 ¹⁾²⁾	7.78±1.25 ¹⁾²⁾	30.8±6.1 ¹⁾²⁾	63.5±8.2 ¹⁾²⁾
倍他乐克组(10只)	3.08±0.32 ¹⁾	4.08±0.37 ¹⁾	8.89±1.13 ¹⁾	24.5±5.2 ¹⁾	53.7±6.1 ¹⁾

与对照组比较,¹⁾ $P < 0.05$;与倍他乐克组比较,²⁾ $P < 0.05$;与卡维地洛组比较,³⁾ $P < 0.05$ 。

显著性降低($P < 0.05$)。

3 讨论

随着人口老龄化增加,肿瘤发病率越来越高。阿霉素是临床上最常用的抗肿瘤药物之一,但研究发现单次或多次给药后长期观察,出现慢性心肌毒性,且呈剂量依赖性,心力衰竭、心源性猝死发生率极高,严重限制该药的广泛使用^[1,3]。目前,研究该药物心脏毒性中发现其氧化和抗氧化水平紊乱^[3,10-11]。机体氧化应激系统包括氧化系统和抗氧化系统,抗氧化系统防止自由基连锁反应损伤,主要包括SOD和GSH-Px等^[3,11]。SOD是以超氧化自由基为底物的金属蛋白酶;GSH-Px可催化过氧化氢和过氧化氢的还原,故SOD和GSH-Px反映机体抗氧化能力。细胞受自由基的攻击导致细胞膜脂质受损,主要产物为MDA,该物质血清浓度反映脂质过氧化和自由基损伤的细胞的严重程度^[5,11]。本研究制备阿霉素心力衰竭模型,停止静脉给药3周后,排除阿霉素对心脏急性损害,再开始药物干预。结果发现阿霉素组IVST变薄、容量负荷(LVEDV、LVESV)明显增大,LVEF显著性降低,提示阿霉素扩张型心肌病模型成功。并观察了氧化应激指标,发现血清SOD和GSH-Px活性降低,MDA浓度升高,在快频率的刺激下,DADs和TA明显增加,显著高于对照组。因此认为静脉使用阿霉素后,心肌病模型血清中氧化自由基增多,MDA浓度升高,心肌抗氧化能力下降,表现为SOD和GSH-Px活性降低,二者功能紊乱,因此心肌受损,出现结构损害,容量负荷增加,心功能降低,表现为心力衰竭,快频率刺激时引起心肌细胞钙代谢异常,舒张期钙渗漏,胞内钙超载,DADs发生率增加,达阈值产生TA。连续TA表现为恶性心律失常。另外,本实验室其他相关研究也证明,阿霉素心肌病心肌块在快频率刺激时恶性心律失常的发生明显增加。

第3代 β -受体阻滞剂——卡维地洛,除 β 受体抑制的药理作用之外,目前研究还具有抗氧化作用^[5]。本实验建立扩张型心肌病模型,并在此基础上给予不同 β 受体阻滞剂干预,发现卡维地洛组血清SOD和GSH-Px活性增加,心肌抗氧化能力增高,MDA浓度降低,氧化自由基减少,心肌受损减轻,心腔缩小、LVEF增加,快频率刺激时引起DADs发生率减少,从而触发活动和恶性心律失常的发生率减少。倍他乐克组心功能也有所增加,

DADs和TA发生率也有所降低,但与卡维地洛组比较仍有统计学差异,我们认为其对心脏的保护作用可能与 β -受体阻断作用有关。

总之,我们发现阿霉素心力衰竭动物模型抗氧化能力降低,氧化水平升高,表现为明显的心腔扩大、心功能降低、细胞内钙离子稳态失衡,引起DADs,触发致命性心律失常的发生。使用卡维地洛干预后,抗氧化能力升高,氧化水平降低,心功能明显改善,TA和恶性心律失常也显著性降低,因此,为药物治疗阿霉素心肌病提供理论基础。

参考文献

- [1] 唐健秀,彭志刚. 蒽环类药物心脏毒性的研究进展[J]. 内科杂志, 2008, 3(5): 746-747.
- [2] CHATTERJEE K, ZHANG J, HONBO N, et al. Doxorubicin cardiomyopathy[J]. Cardiology, 2010, 115: 155-162.
- [3] 杨辉,吴伟康. 阿霉素性心力衰竭模型与氧化应激[J]. 医学动物防制, 2004, 20: 655-657.
- [4] DUAN D D. A leakage leads to failure; roles of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} Leak via RyR2 in heart failure progression[J]. Hypertension, 2010, 55: 849-851.
- [5] 陈国雄,卜军,张存泰,等. β 受体阻滞剂对动脉粥样硬化兔体内氧化应激的影响[J]. 临床心血管病杂志, 2007, 23(12): 935-938.
- [6] 蔡少艾,刘念,张存泰,等. 钙调蛋白激酶 II 信号转导路径在儿茶酚胺敏感性室性心动过速中的作用[J]. 中国心脏起搏与心电生理杂志, 2009, 23(4): 334-336.
- [7] 柯俊,张存泰,马业新,等. 钙调蛋白激酶 II 抑制剂对肥厚心肌细胞早期后除极的影响[J]. 内科急危重症杂志, 2007, 13(6): 292-295.
- [8] 贺莉,肖建民,付晖,等. 卡维地洛对阿霉素心肌病兔氧化应激的影响[J]. 临床心血管病杂志, 2012, 28(2): 107-109.
- [9] 白永虹,沈兴,余更生,等. 兔阿霉素心衰模型的建立[J]. 重庆医科大学学报, 2006, 31(6): 818-820.
- [10] DMITRY T, INNA GYO'RKE, ANDRIY E, et al. Redox modification of ryanodine receptors contributes to sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} leak in chronic heart failure[J]. Circ Res, 2008, 103: 1466-1472.
- [11] CHAISWING L, COLE M P, ST CLAIR D K, et al. Oxidative damage precedes nitrative damage in adriamycin-induced cardiac mitochondrial injury[J]. Toxicol Pathol, 2004, 32: 536-547.

(收稿日期:2014-01-07)