

# 牵张刺激对乳大鼠心房肌细胞瞬时外向钾电流和动作电位的影响\*

胥亚楠<sup>1</sup> 杨龙<sup>1,2</sup> 邓春玉<sup>3</sup> 杨天和<sup>1</sup> 罗淋<sup>1</sup> 覃智芳<sup>2</sup> 唐倩<sup>1</sup> 杨君<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的:探究牵张刺激对乳大鼠心房肌细胞瞬时外向钾电流(Ito)和动作电位时程(APD)的影响。方法:1 d龄SD乳鼠,采用胰酶消化法分离获得心房肌细胞。于细胞牵引装置培养24 h分组:对照组:不予牵张刺激;牵张组:牵张增加12%硅胶膜面积24 h。采用膜片钳全细胞记录方法记录两组细胞膜Ito和APD的变化。结果:在+20~+60 mV刺激电压水平,牵张组Ito电流密度与对照组相比明显降低[(1.6±0.4)pA/pF:(12.1±2.9)pA/pF, P<0.01, n=9];牵张组动作电位复极50%(APD<sub>50</sub>)、复极90%(APD<sub>90</sub>)均明显缩短[(10.5±1.4)ms:(15.5±2.4)ms, (30.0±2.8)ms:(56.3±3.6)ms;均P<0.01, n=9]。结论:牵张刺激可降低乳鼠心房肌细胞Ito电流密度,缩短APD,这可能是压力负荷增大致心房电重构的基础之一。

**[关键词]** 牵张;心房肌细胞;全细胞膜片钳技术;瞬时外向钾电流;动作电位  
doi:10.13201/j.issn.1001-1439.2014.07.022  
[中图分类号] R541.4 [文献标志码] A

## Effects of stretch on transient outward potassium and action potential of cultured atrial neonatal myocytes

XU Yanan<sup>1</sup> YANG Long<sup>1,2</sup> DENG Chunyu<sup>3</sup> YANG Tianhe<sup>1</sup> LUO Lin<sup>1</sup>  
QIN Zhifang<sup>2</sup> TANG Qian<sup>1</sup> YANG Jun<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Department of Cardiology, Guizhou Provincial People's Hospital, Affiliated to Guiyang Medical College, Guiyang, 550002, China; <sup>2</sup>the Third Affiliated Hospital, Zunyi Medical College; <sup>3</sup>People's Hospital in Guangdong Province)

Corresponding author: YANG Long, E-mail: yanglong1001@163.com

**Abstract Objective:** To investigate stretch on transient outward potassium current (Ito) and action potential (AP) of cultured atrial neonatal myocytes. **Method:** Neonatal rat atrial cardiomyocytes were isolated and cultured on silicone sheeting for 24 hours. One group with silicone membrane area increased by 12% was cultured for 24 hours, samples without stretched were regarded as controls. Ito and AP were recorded by whole-cell patch clamp technique. **Result:** With the +20-+60 clamp potential, compared with control group, the density of Ito was significantly reduced in stretched myocytes [(1.6±0.4)pA/pF vs (12.1±2.9)pA/pF, P<0.01, n=9]. The AP duration (APD) at 50% and 90% level of repolarization (APD<sub>50</sub> and APD<sub>90</sub>) of stretched group were visibly shorter than control group [(10.5±1.4)ms vs (15.5±2.4)ms, (30.0±2.8)ms vs (56.3±3.6)ms, P<0.01, respectively]. **Conclusion:** The stretch can reduce density of Ito and shorten the APD of atrial myocytes of rat, which is attributed to atrial electrical remodeling induced by pressure overload.

**Key words** mechanical stretch; atrial myocytes; whole-cell patch clamp technique; transient outward potassium current; action potential

心房颤动(房颤)是临床常见心律失常,高发于高血压、心力衰竭患者<sup>[1-2]</sup>。此类基础疾病促使心房容量或压力负荷增加,对心房产生牵张刺激,引起并促进心房重构<sup>[3-5]</sup>。心房离子通道重构是电重构的基础,在房颤发生、发展和维持中起着重要作用。对房颤离子通道重构的研究涉及多种离子通

道的表达和功能改变。瞬时外向钾电流(Ito)主要参与心肌细胞动作电位(AP)复极相1期,其电流的大小决定了AP1相电位幅度和时程。本研究通过体外牵张模型拉伸培养的心房肌细胞,应用膜片钳全细胞记录方法探讨牵张刺激对Ito及动作电位时程(APD)的影响。

### 1 材料与方法

#### 1.1 试剂和溶液

高糖DMEM培养基(Gibco)、胎牛血清(FBS;特优级,Gibco)、0.25%胰蛋白酶(Gibco)、II型胶原酶(Invitrogen)、辣根过氧化酶抗兔抗体(Santa

\* 基金项目:国家自然科学基金项目(No:81060018)  
<sup>1</sup> 贵州省人民医院心内科,贵阳医学院附属人民医院(贵阳, 550002)  
<sup>2</sup> 遵义医学院第三附属医院  
<sup>3</sup> 广东省人民医院  
通信作者:杨龙, E-mail: yanglong1001@163.com

Cruz)、封闭专用脱脂奶粉(普利莱公司)、4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI, Biobox)。硅胶膜购于美国 SMI 公司。5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-Brdu)、4-氨基吡啶(4-AP)、兔抗大鼠  $\alpha$ -横纹肌肌动蛋白抗体( $\alpha$ -SCA)、聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100)购自于 Sigma,其余试剂均为国产分析纯。

记录钾电流的细胞外液(mmol/L):NaCl 136, HEPES 10.0, KCl 5.4,  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  1.0, Glucose  $H_2O$  10.0,  $NaH_2PO_4$  0.33,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  2, pH 用 NaOH 调至 7.4。记录  $I_{to}$  时,在细胞外液中加入 0.5 mmol/L  $BaCl_2$  和 0.3 mmol/L  $CdCl_2$ , 分别阻断 L-型钙电流( $ICa-L$ )和内向整流钾电流( $I_{kl}$ )。电极内液(mmol/L): $Na_2 \cdot ATP$  5.0, KCl 140, HEPES 10.0,  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  1.0, EGTA 5.0, pH 用 KOH 调至 7.2。含钙台氏液(mmol/L):  $NaH_2PO_4$  0.33, NaCl 136, KCl 5.4, Glucose 10.0, HEPES 10.0,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , pH 用 NaOH 调至 7.4。

## 1.2 动物与仪器

1 d 龄 SD 乳鼠,由中山大学医学部动物中心提供,雌雄不限,许可证号[SCXK(粤)2011-0029]。倒置显微镜(德国 ZEISS AXIO 型)。电极拉制仪(日本 Narishige PP830 型)。膜片钳放大器(Axopatch700B)及附件均为美国 Axon 公司生产。

## 1.3 方法

乳鼠心房肌细胞分离与培养见本课题组发表文献<sup>[6]</sup>。心房肌细胞免疫荧光染色鉴定见本课题组发表文献<sup>[6]</sup>。

细胞牵张刺激:采用静态等双轴牵张装置对心房肌细胞施加定量力学拉伸。牵引装置依据国外同类研究提供方案(Ann A. Lee, et al. An equibiaxial strain system for cultured cells. Am J Physiol. 1996),由北京航空航天大学加工。牵张刺激可使细胞肥大、蛋白/DNA 比值增大。本课题前期实验中,给予培养 24 h 的心房肌细胞增加 12% 硅胶膜面积牵张刺激 24 h,细胞蛋白质/DNA 比值增大,证实该牵张刺激的有效性<sup>[7]</sup>。

细胞干预分组:细胞培养于牵张装置 24 h,更换 5% FBS-DMEM 培养基分组。①对照组:不予牵张刺激;②牵张组:牵张增加 12% 硅胶膜面积培养 24 h。

心房肌细胞  $I_{to}$  测定:预温的 0.125% 胰酶消化心房肌细胞,制成单细胞悬液。于直径 35 mm 培养皿中调整细胞数约为  $1 \times 10^2$ ,  $37^\circ C$  95%  $CO_2$  培养 2~3 h 使细胞贴壁。选择立体感强,大小适中的细胞进行实验。玻璃微电极充灌电极液后电阻为 2~4  $M\Omega$ 。施加负压使电极与细胞表面形成 1  $G\Omega$  以上高阻抗封接。破膜,给予慢电容补偿,形成全细胞记录。设置钳制电压为 -50 mV,给予指

令电位从 -40~+60 mV,梯度 10 mV,波宽 300 ms,频率 0.2 Hz 的刺激,记录  $I_{to}$ 。5 mmol/L 的 4-AP 能阻断该电流,证实该电流为  $I_{to}$ 。为避免细胞大小所造成的误差即采用电流密度分析,电流密度( $pA/pF$ )=电流强度/电容。电流信号经 Ag/AgCl 电极引导,由膜片钳 AXON 700B 放大器放大通过 AD/DA 转换板,并存储于计算机硬盘中。实验过程由 pCLAMP10.0 软件程序刺激发放和信号采集。

心房肌细胞 AP 测定:AP 记录同膜片钳全细胞记录  $I_{to}$  相似。区别在于采用细胞贴附技术,形成高阻封接后破膜,不予补偿。并应用全细胞膜片钳技术中的电流钳模式,给予 1 nA 电流脉冲,波宽 5 ms,引发心房肌细胞 AP。记录并分析静息膜电位(RMP)、动作电位幅度(APA)、动作电位复极 50%、90% 时程( $APD_{50}$ 、 $APD_{90}$ )。

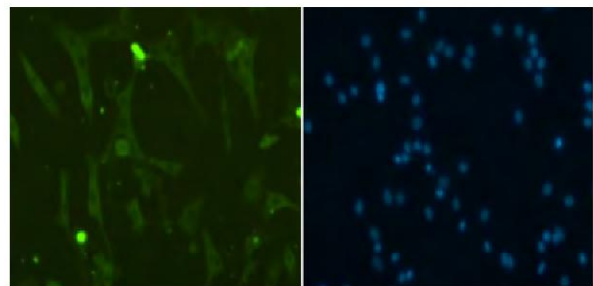
## 1.4 统计学处理

采用 pCLAMP10.0 软件进行数据和图形转换,运用 Sigma Plot 软件绘制离子通道电流密度-电压曲线。用 SPSS13.0 统计软件进行统计分析。数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间差异采用  $t$  检验。

## 2 结果

### 2.1 乳大鼠心房肌细胞鉴定

培养 48 h 的细胞兔抗大鼠 95%  $\alpha$ -SCA 抗体免疫荧光染色阳性,支持培养的细胞为心房肌细胞(见图 1)。



左图为培养 48 h 的细胞兔抗大鼠  $\alpha$ -SCA 抗体免疫荧光染色,绿色为阳性( $\times 200$ );右图为同视野细胞核 DAPI 染色( $\times 200$ )。

图 1 心房肌细胞  $\alpha$ -SCA 抗体免疫荧光染色

Figure 1  $\alpha$ -SCA antibody staining

### 2.2 牵张对乳鼠心房肌细胞 $I_{to}$ 的影响

两组心房肌细胞  $I_{to}$  在 -20 mV 激活,电流密度随去极化程度增加而增大,于 +60 mV 达最大值。与对照组相比,牵张组  $I_{to}$  峰值从 +20 mV 电压开始显著减小(图 2A、2B),且牵张组  $I_{to}$  的  $I \sim V$  曲线明显下移(2C)。表 1 所示牵张组  $I_{to}$  峰电流幅度与电流密度皆较对照组明显减小( $P < 0.05$ )。

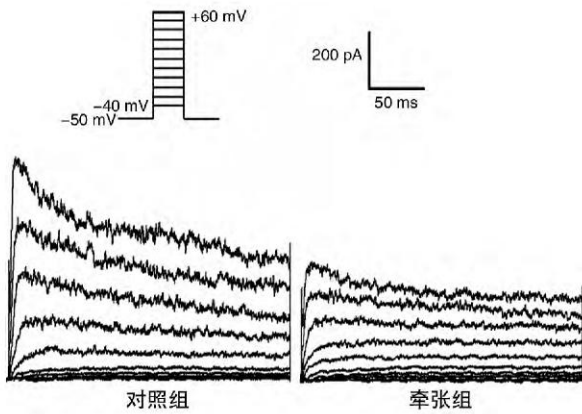


图 2 牵张对乳大鼠心房肌细胞 Ito 的影响

Figure 2 Distraction impacts on neonatal rat atrial myocytes Ito

表 1 两组 Ito 钳制电压 +60mV 时电流幅度与电流密度的差异

Table 1 Current amplitude and current density

$\bar{x} \pm s, n=9$

组别	Ito/(pA)	Ito/Cm/(pA/pF)
对照组	253.6 ± 73.6	12.1 ± 2.9
牵张组	24.9 ± 9.9 <sup>1)</sup>	1.6 ± 0.4 <sup>1)</sup>

与对照组比较, <sup>1)</sup> P < 0.01.

### 2.3 牵张对乳大鼠心房肌细胞 AP 的影响

与对照组相比较, 牵张组心房肌细胞 APA 降低, APD<sub>50</sub>、APD<sub>90</sub> 缩短, 动作电位形态变窄(表 2, 图 3A、3B)。

### 3 讨论

房颤病因繁多, 随着基础疾病导致心房压力负荷的不断增大, 心房肌所受机械牵张刺激增大。在

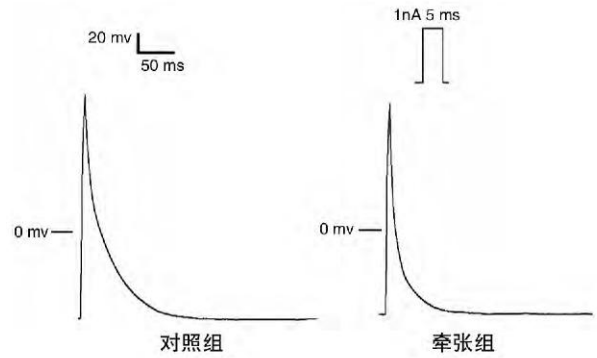


图 3 两组心房肌细胞动作电位

Figure 3 Action potentials of atrial myocytes

一些细胞牵拉模型研究中, 均表明持续的压力负荷促使心肌肥大<sup>[8-9]</sup>, 增加基质金属蛋白酶活性<sup>[10]</sup>, 钾离子通道和相应基因的表达也发生变化, 心房发生重构<sup>[8-9, 11]</sup>。可见, 牵张刺激是房颤发生的一个重要诱导因素。而目前对心房肌细胞体外牵张的研究报道还较少。

Ito 是在心肌细胞上发现较早的一种电压依赖性的离子流。它首先在蒲氏纤维上被发现, 是一种有失活特性的钾电流并在去极化的条件下被激活, 在 AP 1 期复极中起着非常重要的作用。目前的研究显示, 无论是动物快速起搏模型还是临床房颤患者<sup>[12-13]</sup>, 皆表现为 Ito 电流密度降低, APD 缩短, 这些正是心房重构的电生理特点之一<sup>[14-16]</sup>, 也可能是促进房颤持续存在的机制之一<sup>[14]</sup>。我们的研究结果显示, 牵张组 Ito 电流密度从 +20 mV 开始显著减小, 且与对照组相比心房肌细胞 Ito 的 I ~ V 曲线明显下移。与黄德胜等<sup>[13]</sup>人对房颤患者心房肌细胞研究不同的是, Ito 电流密度在 +20 mV ~ +60 mV 显著下降, 而在较低电压下对照组和牵张组相比电流密度无显著差异。出现上述差异可能有两个原因: ① Ito 具有种属差异性, 同种器官不同部位的分布也不相同<sup>[17]</sup>; ② 牵张刺激模拟心房肌细胞压力负荷增大, 并未形成房颤模型。

Ito 电流强度的降低显示心房发生电重构, 而心房电重构会引起 APD 的变化。AP 产生的原因主要是由于细胞膜两侧带电离子的不均衡分布, 以及在不同情况下细胞膜对一些离子的通透性发生改变所致。因此, AP 是由多种离子通道共同参与决定。本研究结果显示牵张组 APD<sub>50</sub>、APD<sub>90</sub> 明显缩短, 进一步证实了牵张刺激促进电重构, 由心肌

表 2 两组动作电位相关参数比较

Table 2 Action potential parameters

$\bar{x} \pm s, n=10$

组别	RMP	APA	APD50	APD90
对照组	-72.6 ± 2.4	166.7 ± 13.3	15.5 ± 2.4	56.3 ± 3.6
牵张组	-71.6 ± 2.5	139.9 ± 10.6 <sup>1)</sup>	10.5 ± 1.4 <sup>1)</sup>	30.0 ± 2.8 <sup>1)</sup>

与对照组比较, <sup>1)</sup> P < 0.01.

细胞 Ito 在内的多种离子通道发生改变,导致细胞膜离子通透性发生变化,影响跨膜离子流,共同决定 APD 缩短。

本研究通过细胞牵张模型,模拟心房负荷过重对心房产生的力学作用,反映心房负荷增加对细胞离子通道重构的影响,为心房电重构和房颤疾病机制提供了一定的基础研究依据。

#### 参考文献

- [1] HEERINGA J, VAN DER KUIP D A, HOFMAN A, et al. Prevalence, incidence and lifetime risk of atrial fibrillation: the Rotterdam Study[J]. *Eur Heart J*, 2006, 27: 949-953.
- [2] BENJAMIN E J, LEVY D, VAZIRI S M, et al. Independent risk factors for atrial fibrillation in a population-based cohort. The Framingham Heart Study[J]. *JAMA*, 1994, 271: 840-844.
- [3] MEDI C, KALMAN J M, SPENCE S J, et al. Atrial electrical and structural changes associated with long-standing hypertension in humans: implications for the substrate for atrial fibrillation[J]. *JCE*, 2011, 22: 1317-1324.
- [4] KIM S J, CHOISY S C, BARMAN P, et al. Atrial remodeling and the substrate for atrial fibrillation in rat hearts with elevated afterload[J]. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 2011, 4: 761-769.
- [5] CORRADI D, CALLEGARI S, MAESTRI R, et al. Differential structural remodeling of the left atrial posterior wall in patients affected by mitral regurgitation with or without persistent atrial fibrillation: a morphological and molecular study[J]. *JCE*, 2012, 23: 271-279.
- [6] 罗淋,刘志琴,杨龙,等.大鼠乳鼠原代心房肌细胞培养的方法及鉴定[J]. *国际心血管病杂志*, 2013, 40(3): 112-115.
- [7] 杨龙,何炯红,袁正强,等.替米沙坦抑制钙调神经磷酸酶调控牵张刺激诱导乳鼠心房肌细胞 Cav1.2 mRNA 的表达[J]. *贵州医药*, 2011, 35(9): 771-775.
- [8] SAYGILI E, RANA O R, SAYGILI E, et al. Losartan prevents stretch-induced electrical remodeling in cultured atrial neonatal myocytes[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 292: H2898-2905.
- [9] RANA O R, ZOBEL C, SAYGILI E, et al. A simple device to apply equibiaxial strain to cells cultured on flexible membranes[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008, 294: H532-540.
- [10] SAYGILI E, RANA O R, MEYER C, et al. The angiotensin-calcineurin-NFAT pathway mediates stretch-induced up-regulation of matrix metalloproteinases-2/-9 in atrial myocytes[J]. *Basic Res Cardiol*, 2009, 104: 435-448.
- [11] DE JONG A M, MAASS A H, OBERDORF-MAASS S U, et al. Cyclical stretch induces structural changes in atrial myocytes[J]. *J Cell Mol Med*, 2013, 17: 743-753.
- [12] YAMASHITA T, MURAKAWA Y, HAYAMI N, et al. Short-term effects of rapid pacing on mRNA level of voltage-dependent K channels in rat atrium: electrical remodeling in paroxysmal atrial tachycardia[J]. *Circulation*, 2000, 101: 2007-2014.
- [13] 王德胜,黄从新,郑文,等.心房颤动心房肌细胞短暂外向钾电流的特点[J]. *中国心脏起搏与心电生理杂志*, 2001, 15(2): 89-91.
- [14] WIJFFELS M C, KIRCHHOF C J, DORLAND R, et al. Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats[J]. *Circulation*, 1995, 92: 1954-1968.
- [15] DOBREV D, RAVENS U. Remodeling of cardiomyocyte ion channels in human atrial fibrillation[J]. *Basic Res Cardiol*, 2003, 98: 137-148.
- [16] VAN WAGONER D R. Electrophysiological remodeling in human atrial fibrillation[J]. *Pacing Clin Electrophysiol*, 2003, 26: 1572-1575.
- [17] 周婕,谭树华,张善春.心肌瞬时外向钾电流与相关疾病的研究进展[J]. *中国心脏起搏与心电生理杂志*, 2012, 26(3): 265-267.

(收稿日期:2013-10-11)