论著

文章编号:1000-5404(2006)05-0444-03

维拉帕米抑制快速起搏诱导心房肌细胞离子通道重构的研究

程 伟,肖颖彬,王学锋 (第三军医大学新桥医院心血管外科,重庆 400037)

提 要:目的 利用原代培养的心房肌细胞建立快速起搏模型,研究维拉帕米对L-型钙通道及钾通道Kv4.3在快速起搏早期的表达的影响。**方法** 原代培养大鼠心房肌细胞,并建立快速起搏细胞模型,实验分为:对照组、快速起搏组、维拉帕米+快速起搏组以及维拉帕米组,利用RT-PCR以及Western blot方法检测L-型钙通道α1c及钾通道Kv4.3在不同情况下mRNA和蛋白的表达变化。**结果** 快速起搏24 h后L-型钙通道α1c的mRNA和蛋白表达较对照组明显降低,起搏前给予维拉帕米预处理,再经24 h起搏后,L-型钙通道α1c以及钾通道Kv4.3 mRNA及蛋白表达较对照组稍降低,二者差异无显著意义,但与未经维拉帕米处理的起搏组比较差异有显著意义($P<0.05$)。**结论** 快速起搏早期,原代培养心房肌细胞L-型钙通道α1c及钾通道Kv4.3的mRNA和蛋白表达均出现不同程度的降低,提示其发生了离子通道重构,但维拉帕米能明显抑制快速起搏早期离子通道重构的发生。

关键词:维拉帕米;快速起搏;心房肌细胞;离子通道;重构

中图法分类号:R322.11;R331.38;R972.2 **文献标识码**:A

Verapamil attenuates the progression of pacing-induced ion channel remodeling in atrial myocytes

CHENG Wei, XIAO Ying-bin, WANG Xue-feng (Department of Cardiovascular Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical Univesity, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To study the potential effect of verapamil for the early changes of L-type calcium channel α1c and potassium channel Kv4.3 in a rapid paced primary cultured atrial myocyte model for atrial fibrillation. **Methods** Primary rat atrial myocytes were cultured and established a rapid paced primary cultured atrial myocyte model. Atrial cells were divided into four groups: control group, rapid pacing group, verapamil with rapid pacing group and verapamil without rapid pacing group. Durations of rapid pacing were 24 h. The mRNA and protein expressions of L-type calcium channel α1c and potassium channel Kv4.3 were measured by RT-PCR and Western blotting respectively. **Results** It was found that 24 h pacing significantly reduced mRNA and protein expressions of L-type calcium channel α1c and potassium channel Kv4.3 as compared to controls ($P<0.05$), but no significant changes in mRNA and protein expressions of L-type calcium channel α1c and potassium channel Kv4.3 in the cells pretreated with verapamil before 24-hour pacing were found as compared to controls ($P>0.05$). **Conclusion** Expressions of L-type calcium channel α1c and potassium channel Kv4.3 were reduced in the rapid pacing atrial myocytes, suggesting ion channel remodeling of atrial myocytes. However, verapamil can attenuate the progression of ion channel remodeling of atrial myocytes at least in early phase.

Key words: verapamil; rapid pacing; atrial myocardial cells; ion channel; remodeling

心房纤颤(房颤)是临床上最常见的心律失常之一,30%的阵发性房颤病人最终可以发展为持续性或永久性房颤[1],所以对房颤早期的病理生理机制研究对于房颤的防治有重要意义。本研究利用原代培养的心房肌细胞建立快速电场起搏模型,研究维拉帕米在抑制快速起搏诱导原代培养心房肌细胞早期离子通道重构中的作用。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30370583)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30370583)

作者简介:程 伟(1974-),男,河南省社旗县人,博士研究生,主治医师,讲师,主要从事心房纤颤电重构方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)68774876,E-mail:yjchw@126.com

通讯作者:肖颖彬,E-mail:xiaoyb@vip.sina.com

收稿日期:2005-09-22;**修回日期**:2006-01-04

1　材料与方法

1.1　材料

实验动物选择 2 周左右大乳鼠,雌雄不拘,由第三军医大学实验动物中心提供。主要仪器与试剂:二氧化碳孵箱,倒置显微镜,BL-420E$^+$生物机能实验系统(成都泰盟科技有限公司);低温高速离心机;PCR 仪;凝胶成像仪;紫外光分光光度计;DMEM 培养基、胎牛血清(Hyclone 公司);Ⅱ型胶原酶及 5-溴脱氧尿核苷(Brdu,Sigma 公司);兔抗 L-型钙通道 α1c 以及兔抗钾通道 Kv4.3 (Chemicon 公司)。

1.2　方法

1.2.1　原代心房肌细胞培养　　参考 Benardeau 等[2]的原代心房肌细胞培养方法并加以改良。取大鼠心脏并置于D-hanks 液清洗、去血,取左、右心房,用无血清培养基洗涤,将心房修剪成直径约 1 mm 大小的肌粒,采用胰酶结合胶原酶的消化方法,调整细胞数为 1×10^5 个/ ml,将单细胞悬液接种于培养瓶中。将培养瓶置于 37 ℃、5 % CO_2孵箱中培养 2 h 后,采用差速贴壁分离技术,吸收培养瓶中的细胞悬液,将细胞悬液滴加在盖玻片上培养板中,滴入 Brdu 使其终浓度为 0.1 mmol/L,并继续培养。24 h 后换液,加不含 Brdu 的 DMEM 培养液,并用倒置显微镜观察。

1.2.2　快速电场起搏心房肌细胞模型建立　　倒置显微镜观察细胞贴壁 80% 左右时,在 37 ℃、5 % CO_2孵箱中将培养板置于电场中用 BL-420E$^+$生物机能实验系统给予起搏,起搏频率 600 次/min,强度 1.5 V/cm,连续起搏 24 h。实验分 4 组:对照组、起搏组(给予连续起搏 24 h)、维拉帕米 + 起搏组(起搏前 1 h 给予维拉帕米 10 μmol/L,然后连续起搏 24 h)、维拉帕米组(给予维拉帕米 10 μmol/L 但不给予起搏)。

1.2.3　逆转录-聚合酶链反应　　①引物设计:检索基因文库中大鼠目的基因 L-型钙通道 α1c 以及钾通道 Kv4.3、内参照基因 β-actin 的 cDNA 序列,分别设计合成其扩增引物。L-型钙通道 α1c 上游引物:5′-AGATGGAGAACGCCGCAGACAACA-3′,下游引物:5′-TCCCGACAGCAGTGAATGAAGACG-3′,扩增片段长度 324 bp,退火温度 61℃;钾通道 Kv4.3 上游引物:5′-GCAGCAACCTGAAATCTGAAACT-3′,下游引物:5′-GATAAGCAATGAACCCATCTCCA-3′,扩增片段长度 386 bp,退火温度 57℃;β-actin 上游引物:5′-TGAGAGGGAAATCGTGCGTGAC-3′,下游引物:5′-ATCTGCTGGAAGGTGGACAGTGAG-3′,扩增片段长度 453 bp,退火温度 54 ℃。②总 RNA 提取:取各组培养心房肌细胞用 Tripure 法提取,经紫外线分光光度计检测 RNA 纯度与浓度。③ cDNA 合成与基因扩增:取 1.5 μg 总 RNA 用 M-MLV 逆转录酶和 olig(dt)引物逆转录成 cDNA。PCR 反应体系(20 μl):cDNA 2μl,20 pmol/ L 目的基因和 β-actin 的上、下游引物各 1 μl,*Taq* 酶 0.3 μl 等。反应条件:94 ℃ 预变性 2.5 min ,然后进入 PCR 循环,94 ℃变性 45 s,退火 45 s ,72 ℃延伸 60 s,35 个循环后 72 ℃再延伸 10 min。④ PCR 产物分析:PCR 产物经凝胶成像及分析系统扫描后,以 β-actin 为参照,求出其相对值。

1.2.4　蛋白提取与 Western 印迹方法　　取各组细胞于细胞裂解缓冲液中,冰上静置 30 min,离心 20 000 × *g*,4 ℃,离心 30 min,10 % 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白质,电转膜 60 ~ 120 min,5 % TBST 脱脂牛奶封闭 1 h,分别加兔抗 L-型钙通道 α1c 以及兔抗钾通道 Kv4.3 多克隆抗体,GAPDH 抗体。4 ℃过夜,加入辣根过氧化物酶标记二抗孵育 1 h 后,DAB 显影,生物凝胶图像分析系统扫描定量,计算各样本目的基因与 GAPDH 的相对吸光度值作为各蛋白表达的相对含量。

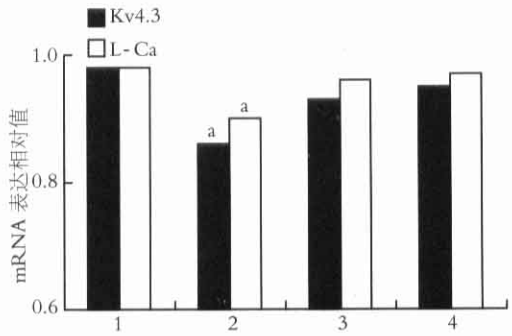
1.3　统计学方法

计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 软件进行 t 检验。

2　结果

2.1　L-型钙通道 α1c 以及钾通道 Kv4.3 mRNA 在不同条件下的表达

L-型钙通道 α1c 以及钾通道 Kv4.3 各目的基因和内参照 β-actin 的扩增条带位置与引物设计的目的片段大小完全相符。对照组、起搏组、起搏 + 维拉帕米组以及维拉帕米组 L-型钙通道 α1c mRNA 表达的相对值分别为:(1.02 ± 0.11)、(0.91 ± 0.09)、(0.98 ± 0.12)、(0.99 ± 0.08)。经统计分析显示经快速电场起搏 24 h 后,L-型钙通道 α1c mRNA 的表达较起搏前明显下调($P<0.01$),但是起搏前给予维拉帕米预处理后再起搏 24 h,L-型钙通道 α1c mRNA 的表达下调明显减轻(与起搏前比较 $P>0.05$)。对照组、起搏组、起搏 + 维拉帕米组以及维拉帕米组钾通道 Kv4.3mRNA 表达相对值分别为:(0.98 ± 0.10)、(0.90 ± 0.07)、(0.96 ± 0.09)、(0.97 ± 0.12),统计分析结果显示变化趋势和 L-型钙通道 α1c 一致(图 1)。

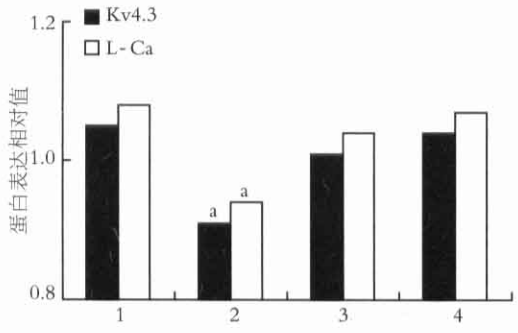


L-Ca:L-型钙通道 α1c;1:对照组;2:快速起搏组;3:维拉帕米 + 快速起搏组;4:维拉帕米组; a: $P<0.05$,与对照组比较

图 1　L-型钙通道 α1c 和 Kv4.3 mRNA 的表达

2.2　Western 印迹检测 L-型钙通道 α1c 以及钾通道 Kv4.3 蛋白表达

对照组、起搏组、维拉帕米 + 起搏组和维拉帕米组 L-型钙通道 α1c 蛋白表达相对值分别为(1.08 ± 0.15)、(0.94 ± 0.11)、(1.04 ± 0.08)、(1.07 ± 0.13)。经统计分析显示经快速电场起搏 24 h 后,L-型钙通道 α1c 蛋白的表达较起搏前明显下调($P<0.01$),但是起搏前给予维拉帕米预处理后再起搏 24 h,L-型钙通道 α1c 蛋白的表达下调与起搏前比较明显减轻($P>0.01$)。钾通道 Kv4.3 蛋白表达相对值分别为:(1.05 ± 0.12)、(0.91 ± 0.07)、(1.02 ± 0.10)、(1.05 ± 0.12),变化趋势和 L-型钙通道 α1c 相似(图 2)。



L-Ca:L-型钙通道 α1c;1:对照组;2:快速起搏组;3:维拉帕米+快速起搏组;4:维拉帕米组; a: $P<0.01$,与对照组比较

图2 L-型钙通道 α1c 和 Kv4.3 蛋白的表达

3 讨论

近年来房颤电重构的研究表明,电重构的发生是阵发性房颤容易发展为持续性房颤或永久性房颤而难以治疗的重要原因,分析其原因可能与 L-型钙通道、钾通道 Kv4.3 等离子通道的表达下调有关,这些改变有利于房颤反复发作并持续下去。

通过对动物实验以及慢性房颤病人的研究结果表明:快速的心房激动能引起心房肌细胞 L-型钙通道和外向 K^+ 流的 Kv4.3 钾通道表达下调。在房颤的电重构过程中,早期主要是由于离子通道自身功能性的反馈调节引起动作电位周期和心房有效不应期的缩短,后期则通过一系列信号传导引起 L-型钙通道、钾通道 Kv4.3 等离子通道基因转录和表达下调,导致结构的改变,最终成为维持起动作电位周期和心房有效不应期缩短的物质基础[3]。因此,离子通道的表达异常可能是房颤心房肌细胞电重构的物质基础。

心房快速激动诱发心房急性电重构的重要因素可能是细胞内钙超载。有研究表明[4]:高钙血症能加重心房快速起搏引起的心房电重构,快速而不规则的激动能增加许多种属生物的心室肌细胞内游离钙的浓度;对健康人的心脏进行研究发现高频激动能引起心房肌细胞的钙电流上调达 80%,Leistad 等[5]用荧光法还观察到,起搏 25 min 后心房肌细胞内游离钙离子含量增加 1 倍。本研究利用原代培养心房肌细胞建立快速起搏模型,观察维拉帕米在起搏前预处理对 L-型钙通道 α1c 以及钾通道 Kv4.3 表达的影响,结果显示:维拉帕米能明显抑制快速起搏引起的 L-型钙通道 α1c 以及钾通道 Kv4.3 表达下调,分析原因可能是抑制钙离子的过度内流,减轻快速起搏后的钙超载现象。有关钙超载与离子通道表达改变的关系可能与以下机制有关:去极化时,L-型钙通道开放,Ca^{2+} 进入细胞内,钙调蛋白与 Ca^{2+} 结合后构象发生改变,继而与 Ras/丝裂原激活蛋白激酶等信号分子结合,使后者活化,然后通过一系列的级联反应,最后激活核转录因子环磷酸腺苷反应元件结合蛋白(cAMP response element banding protein,CREB),使 CREB 的 Ser^{133} 磷酸化,激活后就启动相关基因的转录[6]。快速起搏时心房肌细胞的激动频率很快,从而引起 L-型钙通道的电流不断增强。这样强烈的起搏很可能激活偶联在 L-型钙通道内侧或与之邻近的信号分子,然后一方面通过反馈抑制机制减少 Ca^{2+} 的内流,另一方面通过激活类似于 Ca^{2+}/钙调蛋白依赖激酶 、Ras/ 丝裂原蛋白激活激酶等的信号传导途径,继而向核内传递转录信号,磷酸化核转录因子,从而对 L-型钙通道等离子通道基因的转录和表达起调控作用。

但也有报道显示[7]:维拉帕米仅能抑制快速起搏早期的电重构发生,对于长时间起搏、如两周以上,维拉帕米对对电重构的发生就无明显抑制作用。这也提示出了 L-型钙通道外,可能还有其他机制参与了房颤电重构的发生,比如 T-型钙通道等[8]。

参考文献:

[1] BRUNDEL B J, KAMPINGA H H, HENNING R H. Calpain inhibition prevents pacing-induced cellular remodeling in a HL-1 myocyte model for atrial fibrillation[J]. Cardiovasc Res, 2004, 62(3): 521-528.

[2] BENARDEAU A, HATEM S N, RUCKER-MARTIN C, *et al*. Primary culture of human atrial myocytes is associated with the appearance of structural and functional characteristics of immature myocardium[J]. J Mol Cell Cardiol, 1997, 29(5): 1307-1320.

[3] BRUNDEL B J, HENNING R H, KAMPINGA H H, *et al*. Molecular mechanisms of remodeling in human atrial fibrillation[J]. Cardiovasc Res, 2002, 54(2): 315-324.

[4] SUN H, CHARTIER D, LEBLANC N, *et al*. Intracellular calcium changes and tachycardia-induced contractile dysfunction in canine atrial myocytes[J]. Cardiovasc Res, 2001, 49(4): 751-761.

[5] LEISTAD E, AKSNES G, VERBURG E, *et al*. Atrial contractile dysfunction after short-term atrial fibrillation is reduced by verapamil but increased by BAY K8644[J]. Circulation, 1996, 93(9): 1747-1754.

[6] ANDERSON M E. Calmodulin kinase and L-type calcium channels; a recipe for arrhythmias[J]? Trends Cardiovasc Med, 2004, 14(4): 152-161.

[7] KINEBUCHI O, MITAMURA H, SHIROSHITA-TAKESHITA A, *et al*. Oral verapamil attenuates the progression of pacing-induced electrical and mechanical remodeling of the atrium[J]. Circ J, 2004, 68(5): 494-500.

[8] FAREH S, BENARDEAU A, NETTEL S. Differential efficacy of L- and T-type calcium channel blockers in preventing tachycardia-induced atrial remodeling in dogs[J]. Cardiovasc Res, 2001, 49(4): 762-770.

(编辑 栾 嘉)