论著

文章编号:1000-5404(2010)11-1192-03

BRL-37344 对豚鼠心肌细胞 I_{Ca-L}、I_{to}的影响

修 芸[1],孔祥如[2],吴兰香[1] (400016 重庆,重庆医科大学生命科学研究院[1];400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院肿瘤科[2])

[摘要] **目的** 为研究β3肾上腺素能受体介导的心脏生物学效应——β3肾上腺素能受体激活后心肌细胞电生理活动的变化。**方法** 以原代培养的豚鼠心肌细胞为对象,采用全细胞膜片钳技术记录心肌细胞孵育β3肾上腺素能受体激动剂4-[-[2-hydroxy-(3-chlorophenyl)ethyl-amino]propyl]phenoxyacetate(BRL-37344; BRL)5~10 min前后 I_{Ca-L},I_{to}(L型钙离子通道和瞬时外向钾通道)的变化。**结果** 显示 10^{-6} mol/L 的BRL显著增强豚鼠心肌细胞的 I_{to},上移I-V曲线;去极化刺激到+80 mV时,电流密度从(6.11±1.03) pA/pF上升到(8.46±2.07) pA/pF($n=6$,$P=0.013064$)。10^{-6} mol/L的BRL显著增强豚鼠心肌细胞的 I_{Ca-L},为对照组的(2.30±0.75)倍($n=5$,$P=0.0063$);去极化刺激到+10 mV时,电流幅度从(89.25±17.83) pA上升到(205.00±72.24) pA。**结论** BRL-37344可增强豚鼠心肌瞬时外向钾电流和L型钙电流,进而调控心脏的活动。

[关键词] β3肾上腺素能受体; 瞬时外向钾电流 ; L型钙通道; 膜片钳

[中图法分类号] R322.11; R329.25; R329.27 **[文献标志码]** A

Effect of BRL-37344 on ion channel in guinea pig cardiac myocytes

Xiu Yun[1], Kong Xiangru[2], Wu Lanxiang[1] ([1]Institute of life science, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; [2]Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

[Abstract] **Objective** To study the biological effect of β3 adrenoceptor-activated electrophysiological activities in cardiac myocytes. **Methods** Changes of transient outward potassium (I_{to}) and L-type calcium current (I_{Ca-L}) in primary cultured guinea pig cardiacmyocytes were detected with the standard whole-cell patch clamp technique about 5 – 10 min before and after administration of β3 adrenoceptor agonist, 4-[-[2-hydroxy-(3-chlorophenyl)ethyl-amino] propyl] phenoxyacetate (BRL-37344; BRL). **Results** BRL could significantly increased the I_{to} in guinea pig cardiac myocytes with the I-V curve up-moved. When the membrane potential reached to +80 mV, the density current increased from 6.11±1.03 pA/pF to 8.46±2.07 pA/pF ($n=6$, $P=0.013\,064$). BRL (10^{-6}mol/L) could significantly increase the I_{Ca-L} in guinea pig cardiac myocytes, which was (2.30±0.75)-fold higher than in control group($n=5$,$P=0.0063$). When the membrane potential increased to +10 mV , the current, increased from 89.25±17.83 pA to 205.00±72.24 pA ($n=5$,$P=0.006\,3$). **Conclusion** BRL-37344 can increase the transient I_{to} and I_{Ca-L}, thus further regulating the cardiac activities.

[Key words] β3-adrenoceptor; transient outward potassium current; L-type calcium current; patch clamp

Corresponding author: Xiu Yun, Tel: 86-23-68486875, E-mail xingyunxiuyun_007@126.com

β肾上腺素能受体广泛存在于心血管系统中,调控心血管的生物学效应[1]。1989年首次在脂肪组织发现了肾上腺素能受体的新亚型——β3AR,该受体在心脏组织也有表达并广泛调控离子通道,对高血压、心衰等疾病的发生、发展起重要作用[2-4]。近年来对β3AR介导的离子通道研究越来越多[5-9],包括 I_{Ca-L}、I_{Ks}等,又以对 I_{Ca-L}的研究居多,但研究结果不一:有研究表明,BRL37344可介导负性肌力作用,且该作用与L型钙离子通道功能下调有关[5];在心衰大鼠中BRL37344降低L型钙离子电流的作用更明显。但是2008年Skeberdis等[6]以人心房组织作为研究材料时,发现BRL37344能增强 I_{Ca-L}电流并可增加心肌收缩力。BRL对 I_{Ca-L}的作用到底是增强还是抑制,是本研究探讨的一个方向。同时β3AR对瞬时外向钾电流和钠电流的调控研究较少,本研究以BRL-37344干预,探讨β3AR对豚鼠心肌细胞 I_{Ca-L}、I_{to}的影响。

[通信作者] 修 芸,电话:(023)68486875,E-mail: xingyunxiuyun_007@126.com

1 材料与方法

1.1 实验动物

豚鼠由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,1 ~ 3 d 龄乳鼠,雌雄不拘。

1.2 心肌组织块原代培养

乳鼠断颈处死,迅速取心,D-Hanks 液漂洗,并剥除脂肪血管等部分,用 D-Hanks 液漂洗心肌组织 2 次,随后将心肌组织剪成 1 mm^3 左右的小块,放入 D-Hanks 液的试管中,吸管吹打待组织沉淀后吸出上清液,重复 3 次尽量去除红细胞,然后把心肌组织块放入直径 35 mm 培养皿中贴牢,开始时加极少量培养基以免细胞块漂浮,放入 37 ℃、5% CO_2 孵箱。15 ~ 20 min 后小心加入少量培养基,孵箱中绝对静置培养 24 h 后补加 2 ml 培养基,以后每 2 天更换培养基。

1.3 膜片钳全细胞记录

用 0.25% 的胰蛋白酶和含少量 PVP 的Ⅱ型胶原酶对组织块中爬出的细胞进行消化,倒置显微镜下观察,细胞回缩即终止消化,将消化下的细胞离心(1 000 r/min)5 min,弃上清并将得到的细胞团块重新悬于台式液中,选取镜下边缘整齐,表面光滑的细胞进行实验。电极入液后电阻在 2 ~ 5 MΩ 间,三维控制电极缓慢移向镜下细胞,当电极接触到细胞,通过负压系统给出适当的负压使封接达到 GΩ 后,让细胞恢复几分钟,此时细胞有的会自行破膜,若未破则给予负压破膜,若封接电阻值仍然在 GΩ 或几百兆 Ω,则全细胞记录模式形成,此时可运行事先设计好的 PROTOCOL 记录 $I_{Ca\text{-}L}$、I_{to}。

电极外液(台氏液)(mmol/L):NaCl 136.9 、KCl 5.4、$MgCl_2$ 0.5、NaH_2PO_4 0.33、HEPES 5.0、Glucose 10.0、$CaCl_2$ 1.8,用 NaOH 调节 pH 至 7.4。I_{to} 电极内液(mmol/L):KCl 110、$MgCl_2$ 1、K_2 ATP 5、HEPES 10,用 KOH 调 pH 至 7.2,最终胞内液钾离子浓度接近 145 mmol/ml。$I_{Ca\text{-}L}$ 电极内液(mmol/L):CSCl 130、$MgCl_2$ 2、EGTA 15、MgATP 3、HEPES 10、Glucose 10,以 CSOH 调 pH 至 7.2。

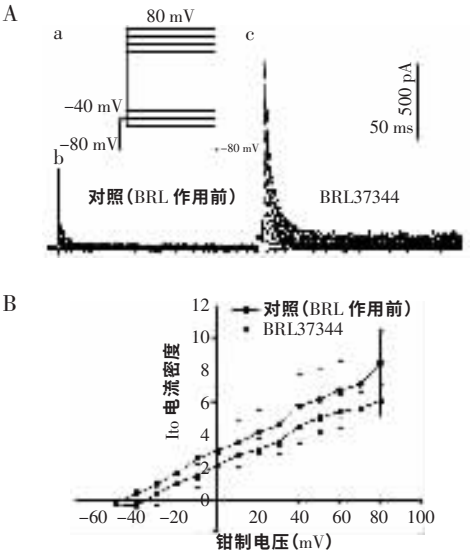
1.4 数据处理

实验结果以 Pulse 软件 、IGOR 软件、ORIGIN 软件等处理,I_{to} 离子流的大小以钳制电压下的电流峰值与膜电容的比值表示,$I_{Ca\text{-}L}$ 直接以原始电流的峰值来表示,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间采用 t 检验。

2 结果

2.1 BRL 对豚鼠心肌细胞 I_{to}[10] I-V 曲线的影响

为减少 TTX 不敏感电流对 I_{to} 对影响,采用预脉冲刺激[11]的方法,即阶跃脉冲刺激前先给出一个 25 ms 的从保持电位 −80 mV 至 −40 mV 的预刺激,随后再给出去极化脉冲刺激,阶跃步幅为 10 mV,去极化刺激以 −50 mV 起始,逐步阶跃至 +80 mV,钳制时间为 300 ms。用于统计的 I_{to} 数值取电流峰值与脉冲刺激结束时的电流值之差。可以看到豚鼠心肌细胞的 I_{to} 在 −30 mV 开始激活,随膜去极化幅度增加而增加。在细胞外液中加入 10^{-6} mol/L 的 BRL,作用 5 ~ 10 min 后,I_{to} 明显增加(图 1)。去极化刺激到 +80 mV 时,电流幅度从(6.11 ± 1.03) pA/pF 上升到(8.46 ± 2.07) pA/pF($n = 6$, $P = 0.013064$),两者间有显著性差异($P < 0.05$)。以各脉冲下电流密度幅值对应膜电位作图得 I-V 曲线,10^{-6} mol/L 的 BRL37344 使各膜电位水平的 I_{to} 上升,I-V 曲线上移(图 1)。



A:BRL 作用细胞后的 I_{to} 电流变化　a 为 I_{to} 的刺激方案;b、c 为典型的 I_{to} 电流,BRL 作用细胞后 I_{to} 显著增大

B:BRL 上移 I_{to} 的 I-V 曲线。随钳制电压的增强,BRL 上调 I_{to} 电流的现象更明显

图 1　BRL-37344 对豚鼠心肌细胞 I_{to} 的影响

2.2 BRL 对豚鼠心肌细胞 $I_{Ca\text{-}L}$ 的影响

钳制电位于 −50 mV,以阶跃步幅为 10 mV,给出去极化刺激,从 −50 mV 起始逐步阶跃至 +60 mV,钳制时间为 300 ms。用于统计的 $I_{Ca\text{-}L}$ 数值取电流峰值与脉冲刺激结束时的电流值之差。可以看到豚鼠心肌细胞的 $I_{Ca\text{-}L}$ 在自 −30 mV 开始激活,膜去极化至 +10 mV 时电流最大。在细胞外液中加入 1 μmol/L 的 BRL 作用 5 ~ 10 min 后,$I_{Ca\text{-}L}$ 明显增加(图 2)。去极化刺激到 +10 mV 时,电流幅度从(89.25 ± 17.83) pA 上升到(205.00 ± 72.24) pA,将对照组电流幅度进行归一的标准化处理,则电流增加为对照组的(2.30 ± 0.75)倍($n = 5$, $P = 0.0063$),二者间有显著性差异。

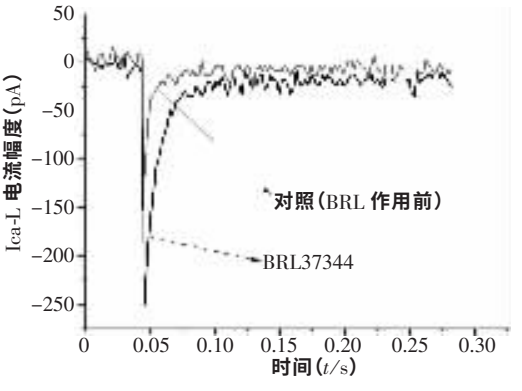


图 2　BRL-37344 对豚鼠心肌细胞 $I_{Ca\text{-}L}$ 的影响

3 讨论

β3AR 与 β1/β2 肾上腺素能受体一样都属于 G 蛋白偶联受体,可通过级联放大广泛调节生物学效应[12]。在心血管系统,β3AR 激活后可引发负性变时

变力效应,降低心肌收缩力[3],但也有研究称β3AR激活可增强心房肌的收缩力[4]。尽管本身对β1/β2AR有低亲和力,但BRL已作为β3AR特异激动剂在许多研究中被应用[5,6,13],本研究亦采用BRL研究β3AR激活后I_{to}和I_{Ca-L}的变化。

I_{to}是细胞去极化早期出现的外向钾电流,它呈现电压依赖的快速激活和迅速灭活特性,主要参与动作电位的早期快速复极,决定动作电位平台相早期的动作电位,进而影响其他离子通道的活性,其改变对动作电位的形态和时限产生较大影响。本研究中发现,给予1 μmol/L的BRL激活β3AR后,I_{to}显著增加,理论上讲,I_{to}的增加将加速1期快速复极化,从而缩短动作电位复极化时限,进而缩短整个动作电位时程。这与Gauthier等的发现相一致,即β3AR激动剂作用于人心内膜组织后,心室动作电位幅度下降,复极化过程加速[5]。但影响心室肌动作电位时程的离子通道还包含钙通道和I_{ks},例如2002年Bosch等[8]发现BRL可抑制豚鼠心肌细胞的I_{ks}进而增加动作电位时程,故本研究不对BRL增强I_{to}后动作电位的时程和形态作探讨。

β3AR激活后可引发负性变力效应与I_{Ca-L}的降低有关,但BRL对心肌I_{Ca-L}的影响研究结果不一。Zhang等[5]研究认为β3AR激活后I_{Ca-L}将受到抑制,这种抑制效应在衰竭心脏将被加强;但是2008年Skeberdis等[6]以人心房组织作为研究材料时,发现BRL37344能增强I_{Ca-L}电流并且可增加心肌收缩力,本研究中发现BRL37344可显著增强豚鼠心肌细胞的I_{Ca-L}。这种实验结果的不一致可能是物种之间的差异,也可能是心房心室间的差异。本研究中所取心肌细胞多为心室肌细胞,但也不能排除心房肌细胞。另外,BRL37344的浓度可能也是影响研究结果的因素,在本研究中我们使用10^{-7} mol/L BRL 37344作用于豚鼠心肌细胞时,并没有引起I_{to}和I_{Ca-L}的变化,故本研究中所用药物浓度为10^{-6} mol/L。此外,BRL本身对β1/β2AR也具有一定的亲和力,本研究中使用浓度较高是否对β1/β2AR有一定程度的激活有待进一步研究,不过Skeberdis等[6]的研究已经排除了BRL37344对I_{Ca-L}的增强是通过β1/β2AR发挥作用。关于心肌细胞对BRL37344的剂量依赖效应会在今后的研究中加以验证。

在心脏β3AR既与Gi/o蛋白耦联,也与Gs蛋白和Gp蛋白耦联,β3AR的激活可活化Gs蛋白,通过AC/cAMP/PKA途径发挥对离子通道的调控作用,一种称为yitiao的蛋白通过该途径对下游KvLQT1/minK钾离子通道的调控起了重要的连接作用[14]。有实验证明Gp介导的钙离子-磷脂依赖性的蛋白激酶途径也在β3AR激活后发挥作用,主要是KvLQT1/minK钾离子通道碳末端上存在4个PKC的磷酸化位点[15]。Gi/o蛋白活化后激活eNOS,生成NO,直接或通过GC/GMP间接对心脏产生效应。在不同种属同一种属的不同组织,β3AR信号途径有所不同,β3AR信号转导机制的研究将是今后研究的热点。

志谢 特别感谢中国协和医科大学鲍光宏教授对实验的悉心指导

参考文献:

[1] Rozec B, Gauthier C . beta3-adrenoceptors in the cardiovascular system: putative roles in human pathologies [J]. Pharmacol Ther, 2006, 111(3): 652 – 673.

[2] Cheng H J, Zhang Z S, Onishi K, *et al*. Upregulation of functional beta(3)-adrenergic receptor in the failing canine myocardium[J]. Circ Res, 2001, 89(7): 599 – 606.

[3] 李为民, 孔一慧, 田颖, 等. β_3受体激动剂对心力衰竭大鼠β_1、β_2、β_3肾上腺素能受体mRNA表达水平影响的实验研究[J]. 中华心血管病杂志, 2003 , 31(1): 11 – 16.

[4] Zhao Q, Wu T G, Jiang Z F, *et al*. Effect of beta-Blockers on beta3-adrenoceptor expression in chronic heart failure[J]. Cardiovasc Drugs Ther, 2007, 21(2): 85 – 90.

[5] Zhang Z S, Cheng H J, Onishi K, *et al*. Enhanced Inhibition of L-type Ca2 + current by beta3-adrenergic Stimulation in failing rat heart[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2005, 315(3): 1203 – 1211.

[6] Skeberdis V A, Gendviliene V, Zablockaite D, *et al*. beta3-adrenergic receptor activation increases human atrial tissue contractility and stimulates the L-type Ca^{2+} current[J]. J Clin Invest, 2008, 118(9): 3219 – 3227.

[7] Gauthier C, Tavernier G , Charpentier F, *et al*. Functional beta3-adrenoceptor in the human heart[J]. J Clin Invest, 1996, 98(2): 556 – 562.

[8] Bosch R F, Schneck A C, Kiehn J, *et al*. beta3-adrenergic regulation of an ion channel in the heart-inhibition of the slow delayed rectifier potassium current I(ks) in guinea pig ventricular myocytes[J]. Cardiovasc Res, 2002, 56(3): 393 – 403.

[9] Vrydag W, Michel M C. Tools to study beta3-adrenoceptors[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2007, 374(5/6): 385 – 398.

[10] Li G R, Yang B, Sun H, *et al*. Existence of a transient outward K + current in guinea pig cardiac myocytes[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000, 279(1): H130 – H138.

[11] 胡丹, 黄从新, 江洪, 等. 蝎毒素BmkTXKβ对家兔心房肌细胞瞬间外向钾电流的抑制作用[J]. 生物化学与生物物理进展, 2003, 30(2): 266 – 271.

[12] 修芸, 曹济民. β3肾上腺素受体研究进展[J]. 医学研究杂志, 2007, 36(3): 80 – 83.

[13] 刘昭前, 孙红, 刘亚利, 等. 特异性β3肾上腺素能受体激动剂研究进展[J]. 中国药理学通报, 2005, 21(10): 1153 – 1157.

[14] Kathofer S, Rockl K, Zhang W, *et al* Human beta(3)-adrenoreceptors couple to KvLQT1/MinK potassium channels in Xenopus oocytes via protein kinase C phosphorylation of the KvLQT1 protein[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2003, 368(2): 119 – 126.

[15] Brixius K, Bloch W, Pott C, *et al*. Mechanisms of beta 3-adrenoceptor-induced eNOS activation in right atrial and left ventricular human myocardium[J]. Br J Pharmacol, 2004, 143(8): 1014 – 1022.

(**收稿**:2009-11-04;**修回**:2009-12-28)

(编辑 邓强庭)