DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.12.001
第23卷第12期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 12
2001年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2001

文章编号:1000-5404(2001)12-1383-03

论著

K_{ATP}通道开放剂对培养乳鼠窦房结细胞模拟缺血时L-型钙电流的影响

仝识非,宋治远 (第三军医大学附属西南医院心血管内科,重庆 400038)

提 要:目的 观察ATP敏感性钾(K_{ATP})通道开放剂对原代培养的乳鼠窦房结细胞模拟缺血时L型钙电流($L\text{-}I_{Ca}$)的影响以探讨其保护作用机制。方法 取培养2 d的原代窦房结细胞,运用常规全细胞膜片钳技术,采用灌流方法研究K_{ATP}通道开放剂Pinacidil和Diazoxide对缺血窦房结细胞$L\text{-}I_{Ca}$的作用。结果 模拟缺血4 h可使窦房结细胞$L\text{-}I_{Ca}$密度显著减小($P<0.01$),电流密度-电压曲线下移;Pinacidil及Diazoxide则能使缺血的窦房结细胞$L\text{-}I_{Ca}$密度明显增加($P<0.01$),电流密度-电压曲线上移,但两组间无明显的统计学差异;选择性线粒体K_{ATP}通道阻断剂5-HD能消除Pinacidil及Diazoxide的上述作用。结论 Pinacidil和Diazoxide可能通过开放缺血窦房结细胞线粒体K_{ATP}通道来增加$L\text{-}I_{Ca}$密度从而对细胞产生保护作用。

关键词:K_{ATP}通道;L型钙电流;窦房结细胞;缺血
中图法分类号:R329.25 文献标识码:A

Effects of ATP-sensitive potassium channel openers on L-type calciumcurrent in cultured neonatal rat sinoatrial node cells during simulated ischemia

TONG Shi-fei, SONG Zhi-yuan (Department of Cardiology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the effects of ATP-sensitive potassium (K_{ATP}) channel activators, pinacidil and diazoxide, on L-type calcium current ($L\text{-}I_{Ca}$) in primary cultured sinoatrial node cells during simulated ischemia. Methods The sinoatrial node cells were isolated from newborn rats and purified. The 48 h cultured cells were cultivated in following mediums, Tyrode's solution as normal control (C), ischemic solution (I), pinacidil+I (P+I), diazoxide+I (D+I), 5-HD (a selective blocker of mitochondrial K_{ATP} channels)+pinacidil+I (5-HD+P+I), 5-HD+diazoxide+I (5-HD+D+I). The whole-cell patch clamp technique and multiple superfusion lines were used to record the effects of the 2 activators on $L\text{-}I_{Ca}$ of the cells. Results Four hours' ischemia significantly reduced the $L\text{-}I_{Ca}$ densities of sinoatrial node cells ($P<0.01$), and shifted the current density-voltage curves to more positive values; But pinacidil and diazoxide made significant increase in the $L\text{-}I_{Ca}$ densities of ischemic sinoatrial node cells ($P<0.01$), and shifted the curves to more negative values. There were no significant difference in the $L\text{-}I_{Ca}$ densities between P+I and D+I. 5-HD inhibited the effects of pinacidil and diazoxide. Conclusion Pinacidil and diazoxide can increase the $L\text{-}I_{Ca}$ densities of ischemic sinoatrial node cells and protect the ischemic lesion, which may depend on their opening the mitochondrial K_{ATP} channels.

Key words: ATP-sensitive potassium channel; L-type calcuim current; sinoatrial node cells; ischemia

病窦综合症是临床常见病,其发病机制目前尚不完全清楚。鉴于该病常伴随缺血性心脏病而出现,故窦房结区缺血导致细胞调亡可能为其原因之一。近年来对缺血心肌的保护性研究日益受到人们的重视,也取得了令人鼓舞的结果。已有研究表明,K_{ATP}通道对缺血心肌有保护作用[1],但其对窦房结细胞有无保护作用及与离子通道之间的关系如何尚不清楚。本研究采用常规全细胞膜片钳技术,应用灌流方法观察K_{ATP}通道开放剂在模拟缺血过程中对原代培养的乳鼠窦房结细胞$L\text{-}I_{Ca}$的影响,以探讨其对缺血窦房结细胞的保护机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 出生24 h内的Wistar乳鼠,雌雄不拘,由第三军医大学实验动物中心提供。

1.1.2 仪器与试剂 Ⅱ型胶原酶,K_{ATP}通道开放剂Pinacidil,Diazoxide,K_{ATP}通道阻断剂5-HD(Sigma),Axopatch 200B膜片钳放大器(美国,Axon)。含钙台氏液(mmol/L):NaCl 145、KCl 5.4、$MgCl_2$ 0.5、$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 3.0、HEPES 5、glucose 5.5、$CaCl_2$ 1.8,pH 7.4(以NaOH调整)。模拟缺血液(mmol/L):NaCl 98.5、KCl 10、$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 0.9、$NaHCO_3$ 6.0、$MgSO_4$ 1.2、HEPES 20、乳酸钠40、$CaCl_2$ 1.8,pH 6.8(以NaOH调整)。电极内液(mmol/L):NaCl 6.0、$MgCl_2$ 1、HEPES 5、CsCl 140,pH7.2(以CsOH调整)。

1.2 方法

1.2.1 窦房结细胞培养 按本实验室建立的窦房结细胞纯化培养与鉴定方法[2],进行乳鼠窦房结细胞培养,并取培养2 d的窦房结细胞进行试验。

1.2.2 试验分组 将细胞分为:①对照组(C):灌注充氧含钙台氏液。②模拟缺血组(I):先灌注充氧含钙台氏液,后换为模拟缺血液。③Pinacidil+模拟缺血组(P+I):先灌注充氧含钙台氏液并加Pinacidil(50 μmol/L),15 min后换为Pinacidil(50 μmol/L)+模拟缺血液。④Diazoxide+模拟缺血组(D+I):先灌注充氧含钙台氏液并加Diazoxide(30 μmol/L),15 min后换为Diazoxide(30 μmol/L)+模拟缺血液。⑤5-HD+Pinacidil+模拟缺血组(5-HD+P+I):先灌注充氧含钙台氏液并加

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39770324)
作者简介:仝识非(1973-),男,河南省洛阳市人,硕士,医师,主要从事心脏电生理方面的研究。电话:(023)65387310
收稿日期:2001-04-04;修回日期:2001-06-22

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

5-HD(100 μmol/L),5 min后加 Pinacidil(50 μmol/L),再过 15 min 后换为 Pinacidil+5-HD+模拟缺血液(Pinacidil 50 μmol/L,5-HD 100 μmol/L)。⑥5-HD+Diazoxide+模拟缺血组(5-HD+D+Ⅰ):先灌注充氧含钙台氏液并加5-HD(100 μmol/L),5 min后加 Diazoxide(30 μmol/L),再过15 min后换为Diazoxide+5-HD+模拟缺血液(Diazoxide 30 μmol/L,5-HD 100 μmol/L)。

1.2.3 窦房结细胞L型钙电流的记录 模拟缺血4 h时,使电极与细胞形成巨阻抗封接(>1.0 GΩ),负压抽吸配合脉冲电压打破封接的膜片,在电流钳模式(I=0)下记录到窦房结细胞动作电位后向细胞外液中加TEA 30 mmol/L以阻断钾流,再换为电压钳模式记录 $L\text{-}I_{Ca}$。膜电容由放大器面板读出。脉冲发放由计算机通过 Pclamp 软件包(6.04版本,Axon 公司)控制。数字信号经数/模(D/A)转换器转成电信号,由膜片钳放大器放大,经电极丝和充入电极液的微电极导入细胞,产生的电信号由模/数(A/D)转换器变成数字信号,经 Pclamp 软件采集数据。测定过程中持续通入低流量氧或低流量95% N_2 和5% CO_2混合气。微电极尖端阻抗为6~8 MΩ。滤波频率2 kHz。试验温度控制在(35±1)℃。灌流槽容积0.5 ml,灌流速度为3.0 ml/min。

1.3 数据整理与统计学分析

为消除细胞体积差异导致的通道电流变化,依照膜电容计算细胞单位面积上的电流强度,即电流密度(pA/pF),结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用医用统计程序包 SPLM 软件做 t 检验。

2 结果

2.1 对照组窦房结细胞L型钙电流的基本特征

窦房结细胞在不同钳制电压下所引出的 $L\text{-}I_{Ca}$ 原始曲线图,见图1。保持电位−40 mV,步阶电压10 mV,指令电压−40~+50 mV,脉宽200 ms。可见 $L\text{-}I_{Ca}$ 具有明显的时间及电压依赖性。在含钙台氏液中窦房结细胞 $L\text{-}I_{Ca}$ 的最大电流密度为−19.3±2.7 pA/pF,最大激活电压在−10 mV左右。

2.2 K_{ATP} 通道开放剂对模拟缺血窦房结细胞L型钙电流密度的影响

各组窦房结细胞在−30~+30 mV指令电压下的 $L\text{-}I_{Ca}$ 密度详见表1。

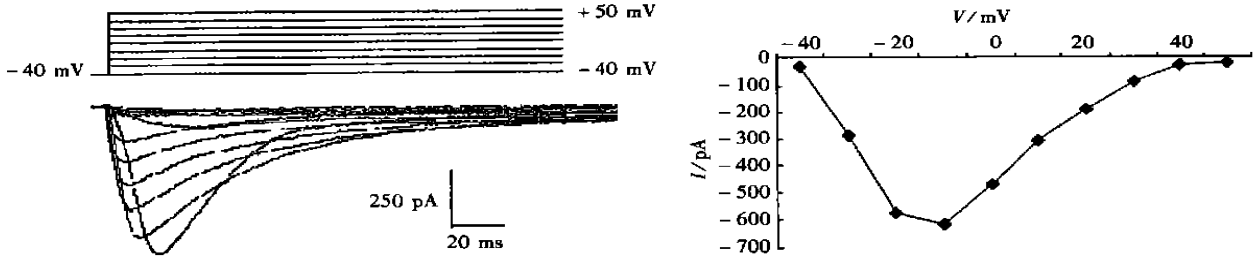


图1 窦房结细胞在−40~+50 mV指令电压下的 $L\text{-}I_{Ca}$ 曲线及I-V曲线图

Fig 1 $L\text{-}I_{Ca}$ curve of a single sinoatrial node cell of control group under voltage-clamp pulse from −40 to 50 mV

表1 K_{ATP} 通道开放剂在−30~+30 mV指令电压(mV)下对模拟缺血窦房结细胞 $L\text{-}I_{Ca}$ 密度(pA/pF)的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Effects of K_{ATP} channel openers on $L\text{-}I_{Ca}$ densities (pA/pF) in ischemic sinoatrial node cells under certain voltage-clamp pulses($\bar{x}\pm s$)

Group	n	Command potential(mV)						
		−30	−20	−10	0	10	20	30
C	4	−9.5±1.2	−18.1±3.3	−19.3±2.7	−14.8±1.7	−10.2±1.3	−6.0±1.1	−3.4±0.5
I	4	−6.2±0.9 *	−11.3±1.6 *	−13.2±1.8 *	−10.5±1.4 *	−6.6±0.9 *	−3.5±0.7 *	−2.2±0.4 *
P+I	4	−18.0±2.8 *▲	−29.3±5.7 *▲	−28.0±4.9 *▲	−22.3±3.5 *▲	−16.0±2.1 *▲	−10.2±1.6 *▲	−7.2±1.3 *▲
D+I	4	−16.8±3.0	−27.5±5.1 *▲	−31.5±6.1 *▲	−26.7±4.0 *▲	−18.3±2.0 *▲	−10.6±1.8 *▲	−6.8±0.9 *▲
5-HD+P+I	4	−5.8±1.0 *◆	−12.0±1.4 *◆	−13.8±2.0 *◆	−10.7±1.3 *◆	−5.8±0.8 *◆	−2.9±0.4 *◆	−1.9±0.2 *◆
5-HD+D+I	4	−6.0±1.1 ★	−12.2±1.6 ★	−13.1±1.8 ★	−9.8±1.2 ★	−5.7±1.1 ★	−3.3±0.6 ★	−2.1±0.3 ★

*: $P<0.01$ *vs* C; ▲: $P<0.01$ *vs* I; ◆: $P<0.01$ *vs* P+I; ★: $P<0.01$ *vs* D+I

2.3 K_{ATP} 通道开放剂对模拟缺血窦房结细胞L型钙电流密度-电压曲线的影响

2.3.1 Pinacidil对模拟缺血窦房结L型钙电流密度-电压曲线的影响 Pinacidil对模拟缺血窦房结 $L\text{-}I_{Ca}$ 电流密度-电压曲线的影响见图2,单纯模拟缺血能使曲线上移,K_{ATP} 通道开放剂 Pinacidil 则使曲线下移。K_{ATP} 通道阻断剂5-HD可消除 Pinacidil 的上述效果。

2.3.2 Diazoxide对模拟缺血窦房结L型钙电流密度-电压曲线的影响 Diazoxide对模拟缺血窦房结细胞的 $L\text{-}I_{Ca}$ 电流密度—电压曲线的影响与 Pinacidil 的作用相似,表现为使 $L\text{-}I_{Ca}$ 电流密度-电压曲线下移。K_{ATP} 通道阻断剂5-HD同样可消除 Diazoxide 的上述作用,见图3。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

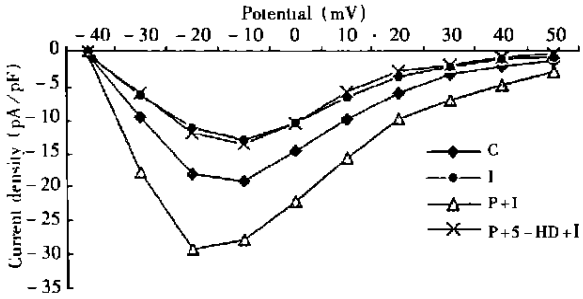


图 2　Pinacidil 对模拟缺血窦房结细胞 L-I_{Ca}密度-电压曲线的影响

Fig 2　Effects of pinacidil on L-I_{Ca} density-voltage curves in ischemic sinoatrial node cells

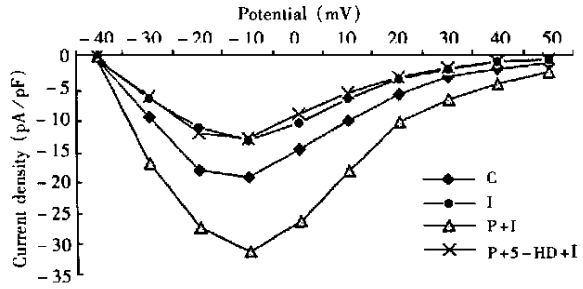


图 3　Diazoxide 对缺血窦房结细胞 L-I_{Ca}密度-电压曲线的影响

Fig 3　Effects of diazoxide on L-I_{Ca} density-voltage curves in ischemic sinoatrial node cells

3　讨论

3.1　细胞选择与实验方法的探讨

本实验室已发现培养的窦房结细胞中有 3 种不同类型的细胞, 其中数量最多、搏动频率最快的梭形细胞即为窦房结的起搏细胞[2], 因此我们在研究中采用培养 2 d 的梭形窦房结细胞作为试验对象。其贴壁良好, 胞膜的弹性较佳, 容易形成高阻抗封接, 破膜后细胞也不容易脱落, 稳定性好, 便于纪录, 但此时由于细胞贴壁紧, 增加了高阻抗封接前电极与细胞接触的难度; 且良好的胞膜弹性也使破膜的难度增加。目前, 虽穿孔膜片钳技术已被广泛应用, 但打孔药颗粒大, 不溶于水, 晰出后妨碍高阻抗封接的形成, 见光易分解失效(新配制的母液即使避光也仅能使用 3 h 左右), 从高阻抗封接到穿孔完成费时且不稳定。常规全细胞膜片钳技术操作简单, 只要电极尖端阻抗合适, 封接及破膜的成功率均很高, 稳定性也较好, 并不会出现明显的电流衰减, 不失为一种好的方法。

3.2　K_{ATP}通道开放剂对缺血窦房结细胞 L 型钙电流的影响及意义

在心肌细胞, Diazoxide 对线粒体 K_{ATP}通道具有很高的高选择性, 对肌浆网 K_{ATP}通道不敏感, Pinacidil 则相对缺乏这种选择性, Diazoxide 产生的线粒体钾流及缺血性保护效应可被 5-HD 阻断, 但 5-HD 却不能阻断 K_{ATP}通道开放剂产生的肌浆网 K_{ATP}电流, 故 Diazoxide 和 5-HD 分别被看作是选择性的线粒体 K_{ATP}通道开放剂和阻断剂[1~3]。本试验发现模拟缺血可明显降低窦房结细胞 L-I_{Ca}密度, 使电流密度-电压曲线上移; 在相同指令电压下, 应用 K_{ATP}通道开放剂 Pinacidil 和 Diazoxide 则能显著增加缺血窦房结细胞 L-I_{Ca}密度, 使电流密度-电压曲线下移, 但选择性的线粒体阻断剂 5-HD 可消除这种效应。说明 Pinacidil 和 Diazoxide 的这种作用与胞膜 K_{ATP}通道关系不密切, 线粒体 K_{ATP}通道可能起主要作用。

影响 L-I_{Ca}的因素很多, 既有通道自身的原因也可受细胞内外多种离子浓度的调控, 其中[Ca^{2+}]i 的影响尤为重要。缺血缺氧导致细胞内 ATP 浓度下降和 pH 上升, 胞内氢离子积聚, 依次激活 Na^+/H^+及 Na^+/Ca^{2+}交换系统, 导致细胞内钙超载, 钙离子的跨膜浓度梯度降低, 则跨膜钙电流的幅度减小; 另有资料[4]显示心肌细胞内 ATP 的降低可减少其慢通道的开放数量, 慢通道的电压激活是通过磷酸化实现的, 而 ATP 是磷酸化所必需的, 故推测低氧抑制 L-I_{Ca}也可能与 L 型钙通道的磷酸化障碍有关。本研究中缺血导致的乳鼠窦房结细胞 L-I_{Ca}密度减小很可能与上述机制类似。缺乏 K_{ATP}通道的 COS-7 细胞在缺氧复氧过程中胞内钙会明显升高, 但该种细胞共同转染了 Kir6.2/SUR2A 基因(表达心肌的 K_{ATP}通道)后, 在 Pinacidil 存在的情况下能防止缺氧复氧过程中胞内钙的超载, 保护 COS-7 细胞, 且这种效应能被 Glyburide(K_{ATP}通道阻断剂)消除[5]。因此 Pinacidil 和 Diazoxide 可能抑制缺血窦房结细胞内钙超载, 增大了钙离子的跨膜浓度梯度, 从而导致 L-I_{Ca}密度增加, 反映出对缺血窦房结细胞的保护作用。但 K_{ATP}通道开放剂对窦房结细胞 L 型钙通道有无直接作用有待对该通道动力学的进一步研究。

参考文献:

[1] Baines C P, Liu G S. Ischemic preconditioning depends on interaction between mitochondrial K_{ATP} channels and actin cytoskeleton[J]. Am J Physiol, 1999, 276(4 pt 2): H1 361—H1 368.

[2] 钟　理, 宋治远. 乳鼠窦房结取材与纯化培养方法的探讨[J]. 中国心脏起搏与心电生理杂志, 2000, 14(3): 188—190.

[3] Grover G J. Pharmacology of ATP-sensitive potassium channel openers in models of myocardial ischemia and reperfusion[J]. Can J Physiol Pharmacol, 1997, 75(4): 309—315.

[4] Wahler G M, Sperelakis N. Similar metabolic dependence of stimulated and unstimulated myocardial slow channels[J]. Can J Physiol Pharmacol, 1984, 62(5): 569—574.

[5] Jovanovic A, Jovanovic S, Lorenz E. Recombinant cardiac ATP-sensitive K^+ channel subunits confer resistance to chemical hypoxia-reoxygenation injury[J]. Circulation, 1998, 98(15): 1 548—1 555.

（编辑　郭建秀）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net