

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.42.022 [http://www.crter.org/crter-2012-qikanquanwen.html]

甘天翊, 许国军, 周贤惠, 汤宝鹏, 郭霞, 李耀东, 姜涛, 张健, 李发鹏. 增龄犬左心房肌细胞动作电位和L型钙通道的变化[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(42): 7901-7908.

增龄犬左心房肌细胞动作电位和L型钙通道的变化***☆◆

甘天翊¹, 许国军¹, 周贤惠¹, 汤宝鹏¹, 郭霞², 李耀东¹, 姜涛³, 张健¹, 李发鹏¹

文章亮点: ①对犬左心房电生理学特性进行研究发现, 在增龄过程中, 左心房肌细胞动作电位平台期下降, 动作电位时程延长, L型钙通道电流密度降低。②结合细胞电生理和分子生物学技术进一步证实, 伴随增龄, 犬左心房肌细胞L型钙通道电流密度降低的分子机制主要是心房肌L型钙通道 $\alpha 1c$ 亚基 mRNA 和蛋白表达的降低。

关键词: 心房颤动; 增龄; 左心房; 肌细胞; L型钙通道; 钙电流; 动作电位; 细胞电生理; L型钙通道 $\alpha 1c$ 亚基; 成年; 老年

摘要

背景: 增龄是心房颤动发生的独立危险因素, 心房肌细胞电生理特性的变化是触发和维持心房颤动的重要因素。

目的: 观察不同年龄犬左心房肌细胞动作电位和L型钙通道的改变。

方法: 实验纳入7只成年犬和10只老年犬, 用II型胶原酶分离成年犬和老年犬的左心房肌细胞, 用全细胞膜片钳方法记录成年犬和老年犬左心房肌细胞动作电位和L型钙通道电流; 采用实时荧光定量PCR和Western blot检测左心房肌L型钙通道 $\alpha 1c$ 亚基 mRNA 和蛋白的表达。

结果与结论: 与成年犬相比, 老年犬左心房肌细胞动作电位平台期的幅度明显降低($P < 0.05$), 动作电位时程明显延长($P < 0.05$), 而最大舒张电位和动作电位幅度在老年犬和成年犬间差异无显著性意义($P > 0.05$); 同时老年犬左心房肌细胞的L型钙通道电流密度较成年犬明显降低($P < 0.05$), 而L型钙通道电流动力学参数在成年犬和老年犬间差异无显著性意义($P > 0.05$); 此外, 与成年犬相比, 老年犬左心房肌L型钙通道 $\alpha 1c$ 亚基 mRNA 和蛋白的表达明显降低($P < 0.05$)。由此认为, 左心房肌细胞电生理学特性存在增龄性改变。

Changes of action potential and L-type calcium channel of left atrial myocytes in the aging-associated rats

Gan Tian-yi¹, Xu Guo-jun¹, Zhou Xian-hui¹, Tang Bao-peng¹, Guo Xia², Li Yao-dong¹, Jiang Tao³, Zhang Jian¹, Li Fa-peng¹

Abstract

BACKGROUND: Aging is the independent risk factor of atrial fibrillation. The aging-associated changes of electrophysiological properties of atrial myocytes may play an important role in the mechanisms of atrial fibrillation.

OBJECTIVE: To investigate the aging-associated changes of action potential and L-type calcium channel of left atrial myocytes.

METHODS: Seventeen canines were allocated to two groups, including seven adult canines and 10 old canines. The left atrial myocytes were separated from the adult and old canines by collagenase-II. We used whole-cell patch-clamp to record action potential and L-type calcium current in left atrial myocytes of adult and older canines. The $\alpha 1c$ subunit mRNA and protein expression of L-type calcium channel were assessed by real-time quantitative PCR and Western blotting respectively.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the adult canines, the amplitude of left atrial myocytes action potential plateau in old canines was significantly decreased ($P < 0.05$), and the action potential duration was significantly prolonged ($P < 0.05$), while there was no significant difference of the maximum diastolic potential and action potential amplitude ($P > 0.05$); the L-type calcium channel current density of the left atrial myocytes in the old canines was lower than that in the adult canines ($P < 0.05$), while there was no significant difference of the current kinetic parameters of L-type calcium channel between old and adult canines ($P > 0.05$); compared with the adult canines, the $\alpha 1c$ subunit mRNA and protein expression of L-type calcium channel in the old canines was significantly decreased ($P < 0.05$). There are different aging-associated cell electrophysiological changes in the left atrial myocytes.

新疆医科大学第一附属医院,¹起搏电生理科,³医学研究中心,新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市830054;²新疆医科大学地方病重点实验室,新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市830000

甘天翊☆, 男, 1980年生, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市人, 汉族, 博士, 主治医师, 主要从事心律失常的研究。
taog666@sina.com

通讯作者: 汤宝鹏, 博士, 主任医师, 教授, 博士生导师, 新疆医科大学第一附属医院起搏电生理科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市830054
tangbaopeng@hotmail.com

中图分类号:R318
文献标识码:B
文章编号:2095-4344
(2012)42-07901-08

收稿日期:2012-08-01
修回日期:2012-08-27
(20120313018/
WLM·C)

¹Department of Cardiology, ²Medical Research Center, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China; ²Key Laboratory of Endemic Disease, Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Gan Tian-yi, Doctor, Attending physician, Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China taog666@sina.com.cn

Corresponding author: Tang Bao-peng, Doctor, Chief physician, Professor, Doctoral supervisor, Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China tangbaopeng@hotmail.com

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No.30860299*; Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region, No.200821143*; Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China, No.200807600004*

Received: 2012-08-01
Accepted: 2012-08-27

Gan TY, Xu GJ, Zhou XH, Tang BP, Guo X, Li YD, Jiang T, Zhang J, Li FP. Changes of action potential and L-type calcium channel of left atrial myocytes in the aging-associated rats. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2012;16(42): 7901-7908.

0 引言

心房颤动是临床最常见的心律失常之一,心房颤动的持续存在容易引起心力衰竭、心房内血栓、脑栓塞等严重并发症,具有较高的致残率和致死率。流行病学研究显示,人群中总心房颤动发病率为0.15%~1.00%。有研究表明年龄每增长10岁,心房颤动的发病率增加1倍。40岁以后,无论男性还是女性,每4个人中就有1个人会发生心房颤动^[1]。随着年龄的增加,心房颤动的发病率升高,<40岁为0.1%,>65岁达6%,>75岁者发病率达10%。多项研究证实增龄是心房颤动的独立危险因素^[2-4]。增龄可能引起心房肌电生理特性改变、电传导异常等,从而易致心房颤动,但具体机制尚不清楚,需要进一步研究。

随着心脏电生理学及细胞电生理学在心房颤动研究领域中的广泛应用发现,心房颤动与心房肌细胞电生理变化密切相关。从20世纪80年代以来,人们对心脏不同病理情况下心肌细胞电活动的变化进行了深入了解,对心肌细胞的电生理特性有了深刻认识。研究证明,心肌细胞动作电位各时相产生是由,各时相内电压依赖离子通道或受体依赖离子通道,选择性引起通过相应离子通道激活失活所形成的离子流所调控。心脏离子通道的电生理特性,离子通道特性及相应调控机制发生了改变,可以引起心肌细胞动作电位时程和动作电位频率自适应性变化,进一步导致心律失常^[5-6]。近年来研究发现心房肌细胞电生理特性的变化是心房颤动触发和维持的重要因素。主要包括心房肌细胞动作电位时程缩短,动作电位传导速度减慢;心肌细胞膜上L型钙通道电流、瞬间外向性钾电流明显减弱及内向整流钾电流增大等^[7-8]。但是增龄过程中心房肌细胞的动作电位以及相关的离子通道是否存在变化,目前研究较少。因而研究与增龄相关的心房肌细胞电生理改变具有重要意义。直接在人体验证增龄相关的心房肌细胞的改变有一定困难,因此在动物实验方面

进行了初步的验证。有国外学者发现,与成年犬相比,老年犬右心房肌细胞动作电位时程延长,平台期下降,L型钙通道电流密度的减低可能是增龄相关性心房颤动的基础^[9-10],但未从分子生物学方面做进一步的阐述。

目前的临床和基础研究均证实,左心房在心房颤动发生和维持的机制中起决定性作用^[11],而目前有关增龄相关性左心房细胞电生理改变的研究较少,并且缺乏增龄过程中相关离子通道分子基础的研究。细胞电生理结合分子生物学技术能够较全面的阐释病理机制。因此,实验的目的是研究犬左心房肌细胞电生理学特性是否存在增龄性改变,并结合分子生物学技术进一步阐释细胞电生理学改变的分子基础。

实验拟用全细胞膜片钳的方法记录成年犬和老年犬左心房肌细胞动作电位和L型钙通道电流,用实时荧光定量PCR和Western blot方法检测左心房肌L型钙通道 $\alpha 1c$ 亚基mRNA和蛋白的表达;比较成年犬和老年犬左心房肌动作电位、L型钙通道电流以及L型钙通道 $\alpha 1c$ 亚基mRNA和蛋白表达的差异。以期增龄相关性心房颤动的病因、发病机制提供新的思路和理论依据。

1 材料和方法

设计: 增龄对照动物实验及细胞学对比观察研究。

时间及地点: 于2011年3月至8月在新疆医科大学第一附属医院医学研究中心完成。

材料:

实验动物: 健康杂种犬17只,雌雄兼有,体质量(19.64±5.87) kg,其中成年犬7只,年龄2~2.5岁,平均(2.2±0.3)岁;老年犬10只,年龄7~12岁,平均(8.8±1.8)岁。均由新疆医科大学第一附属医院实验动物中心提供,许可证号:FYXK(新)2003-0001。每只犬的年龄以购买记录年龄为依据,由2名经验丰富的兽医独立作出验证。根据犬的牙齿、眼睛、皮毛、骨骼等进

行综合判定。所有犬实验前经12导联同步心电图检查证实为窦性节律, 经超声心动图检查证实无明显结构性心脏病。实验设计及实施均经新疆医科大学第一附属医院动物伦理委员会的审核批准。

溶液配制:

无钙台式液(mmol/L): NaCl 137, KCl 5.4, MgCl₂ 1.0, NaH₂PO₄ 0.33, HEPES 10, 葡萄糖10 (pH 7.4, 用NaOH调整pH值)。

高钾台式液(mmol/L): NaCl 135, KCl 8, CaCl₂ 1.0, MgCl₂ 3.0, NaH₂PO₄ 1.0, HEPES 15, 葡萄糖10.1 (pH 7.4, 用NaOH调整pH值)。

动作电位记录细胞外液为含1.8 mmol/L CaCl₂的台式液。

动作电位记录细胞内液(mmol/L): KCl 140, MgCl₂ 2.0, 依他酸2.0, HEPES 5.0, EGTA 5, Na₂ATP 4.0 (pH 7.4, 用KOH调整pH值)。

L型钙通道电流记录细胞外液(mmol/L): 氯化胆碱137, CaCl₂ 2.0, MgCl₂ 1.0, HEPES 5, 葡萄糖10, CsCl 4.6, 氯化四乙胺10, 4-氨基吡啶5 (pH 7.30, 用CsOH调整pH值)。

L型钙通道电流记录细胞内液(mmol/L): CsCl 120, MgCl₂ 1.0, MgATP 5.0, 1, 2-氨基苯氧乙烷-乙二醇双乙胺醚10, HEPES 10, 氯化四乙胺10 (pH 7.30, 用CsOH调整pH值)。

检测左心房肌细胞动作电位和L型钙通道变化所用的主要试剂和仪器:

试剂及仪器	来源
膜片钳、EPC-10 Double 放大器、PatchMaster 软件	HEKA 公司
Trizol	Invitrogen 公司
反转录试剂盒(A3500)	Promega 公司
SybrGreen qPCR Master Mix、 BIO-RAD 凝胶成像系统	上海睿安生物
组织总蛋白提取试剂盒、兔抗 L 型钙通道 α 1c 亚基抗体、兔抗 β -actin 抗体	北京索莱宝

实验方法:

心房肌细胞的分离: 建立静脉通路, 静脉缓慢注射体积分数3%戊巴比妥钠(20 mg/kg), 麻醉起效后迅速开胸取出心脏, 取200 mg左心耳组织备用, 其余置于预先氧饱和的冷高钾液(8 mmol/L)中冲洗。将心脏悬挂于自制的Langendorff灌流装置中, 调整插管位于左冠状动脉回旋支, 灌注高钾液, 使心脏停止机械搏动; 结扎左、右

冠状动脉心室分支, 剪除左、右侧心室肌, 见图1。换用无钙台式液灌注5-10 min, 冲去残留的高钾液后, 用含135 U/mL II型胶原的无钙台式液循环灌注35-40 min至心房肌疏松, 吸管吸取少量酶液置于显微镜下观察, 若见酶液中有多个心肌细胞时, 即可换用无钙台式液终止消化过程。将疏松的心房肌剪入细胞保存液中, 剪碎, 吹打, 过滤, 静置1.0-2.0 h后使用。用前逐步复钙至1.8 mmol/L。所有灌注液均保持在(38±0.5) °C、体积分数100%O₂饱和、灌注压力6.86-7.84 kPa条件下灌注。



Figure 1 The self-made Langendorff perfusion device
图1 自制的Langendorff灌流装置

膜片钳记录: 将适量心房肌细胞混浊液置于0.5 mL的预加温的细胞灌流槽内静置10-15 min, 细胞沉底附壁后, 将细胞外液经体积分数100%O₂饱和后进行表面灌注5-10 min, 保持灌流流速为2.0-3.0 mL/min。选择细胞边缘清楚, 细胞膜光滑, 贴壁良好, 横纹相对清晰, 稳定无收缩的细胞进行全细胞膜片钳实验。将选定的细胞置于视野的正中央, 便于操作。用冲灌针将电极内液小心的灌注于电极, 避免气泡进入。如有气泡进入需要小心的轻弹电极侧壁, 将气泡赶出。电极充灌电极内液后, 加持在三维操纵仪上, 正压0.098-0.196 kPa入水以防止液体中颗粒物堵塞电极尖端, 同时由电子刺激器经膜片钳放大器向微电极发放电压为1 mV, 波宽为40 ms的方波脉冲信号用于观察封接过程。电极入水阻抗为3-5 M Ω , 解除正压。电极入液后补偿液接电位, 然后在显微镜低倍镜(10×10)下找到电极, 然后换用高倍镜(10×100), 找寻电极尖端。将电极尖端小心的放置于选定的细胞表面, 用微螺旋杆操作, 小心将电极尖端与细胞膜表面尽量紧密接触, 避免将细胞膜刺破。给电极施予负压, 形成高阻封接, 封接电阻达1 G Ω 以上。当封接电阻达到1 G Ω 以上时, 快电容补偿, 3-5 min后负压吸破细胞膜, 慢电容及串联电阻补偿, 形成全细胞记

录模式。在电压钳制下记录电流。信号经铂金电极引导, 由膜片钳放大器放大, 通过A/D和D/A数据转换器将膜片钳放大器同计算机进行连接。为保证细胞内液和电极内液间的离子交换达到平衡, 电信号记录在破膜后3 min 开始进行。数据采集在EPC-10 Double放大器上由PatchMaster软件通过放大器上的16通道数模转换器完成。

实时荧光定量PCR检测左心房肌L型钙通道 $\alpha 1c$ 亚基mRNA的表达: 取100 mg左心耳组织, 用Trizol一步法提取总RNA。取2 μg 总RNA参照反转录试剂盒进行操作反转录成cDNA。引物由TaKaRa公司合成, 序列如下: L型钙通道 $\alpha 1c$ 亚基F: 5'-GAC GCT ATG GGC TAT GAG TTA C-3', R: 5'-AGT CCA GGT AGC CCT TTA GGT-3', β -actin F: 5'-AAG GAC CTG TAT GCC AAC ACA-3', R: 5'-ATC CAC ACA GAA TAC TTG CGT T-3'。PCR体系25 μL : 待测样品cDNA稀释5倍, 然后取cDNA 2 μL , SybrGreen qPCR Master Mix 12.5 μL , 上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各0.5 μL , ddH₂O 9.5 μL 。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性2 min, 随后进入PCR循环, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性10 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸40 s, 40个循环。实验结束后测得每个样本的Ct值(PCR扩增过程中, 扩增产物的荧光信号达到设定的阈值时所经过的扩增次数), 根据Ct值计算 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 得出L型钙通道 $\alpha 1c$ 亚基的mRNA相对表达量。

取目标基因(L型钙通道 $\alpha 1c$ 亚基)及内参照基因(β -actin)PCR产物各5 μL , 行含溴化乙锭的2%琼脂糖凝胶电泳, 在BIO-RAD凝胶成像系统上扫描获得目标基因产物的电泳图像。

Western blot检测左心房肌L型钙通道 $\alpha 1c$ 亚基蛋白的表达: 组织总蛋白提取按试剂盒说明操作, 用干净的剪刀将200 mg组织尽量剪碎。按每100 mg加100 μL 细胞裂解液于匀浆器中, 在冰上进行匀浆。置于冰上裂解30 min后, 然后在4 $^{\circ}\text{C}$ 下14 000 r/min离心5 min, 取上清分装后置于-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。总蛋白含量按BCA法测定^[12]。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离总蛋白, 每孔上样量为50 μg , 电泳条件: 浓缩胶80 V, 分离胶100 V, 时间90-120 min。然后将胶上的蛋白通过电转印迹到硝酸纤维素膜上。体积分数5%脱脂奶粉/TBS液封闭、洗脱后, 加入兔抗L型钙通道 $\alpha 1c$ 亚基抗体或 β -actin抗体(工作浓度1:2 000)进行杂交, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 经辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG(工作浓度1:2 000)二抗孵育1 h, 进行DAB显色, 所有杂交信号在BIO-RAD凝胶成像系统进行扫描定量。测L型钙

通道 $\alpha 1c$ 亚基蛋白条带的吸光度值, 用 β -actin蛋白条带的吸光度作为内参照, 计算L型钙通道 $\alpha 1c$ 亚基蛋白的相对表达含量。

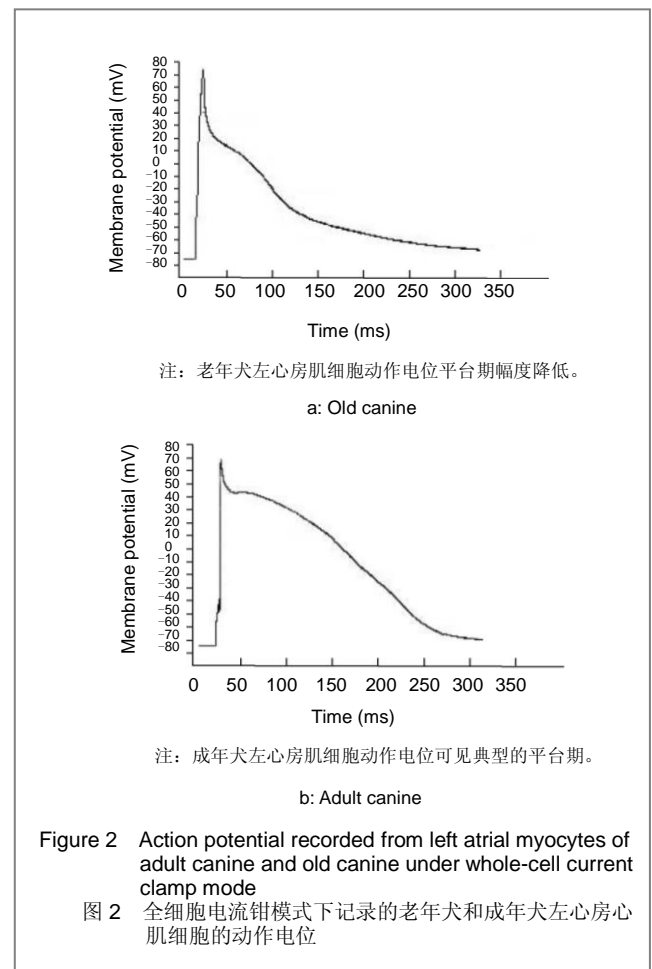
主要观察指标: 不同年龄犬左心房肌细胞动作电位和L型钙通道 $\alpha 1c$ 亚基mRNA及蛋白的表达。

统计学分析: 计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间比较采用t检验, 统计分析采用SPSS 18.0统计软件包完成, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 实验共纳入7只成年犬和10只老年犬, 均进入结果分析。

2.2 老年犬与成年犬左心房肌细胞动作电位的比较 全细胞电流钳模式下, 记录两组犬左心房肌细胞动作电位, 见图2。



与成年犬相比, 老年犬左心房肌细胞动作电位时程延长($P < 0.05$), 平台期幅度明显降低($P < 0.05$), 而最大舒张电位和动作电位幅度的差异无显著性意义, 见表1。

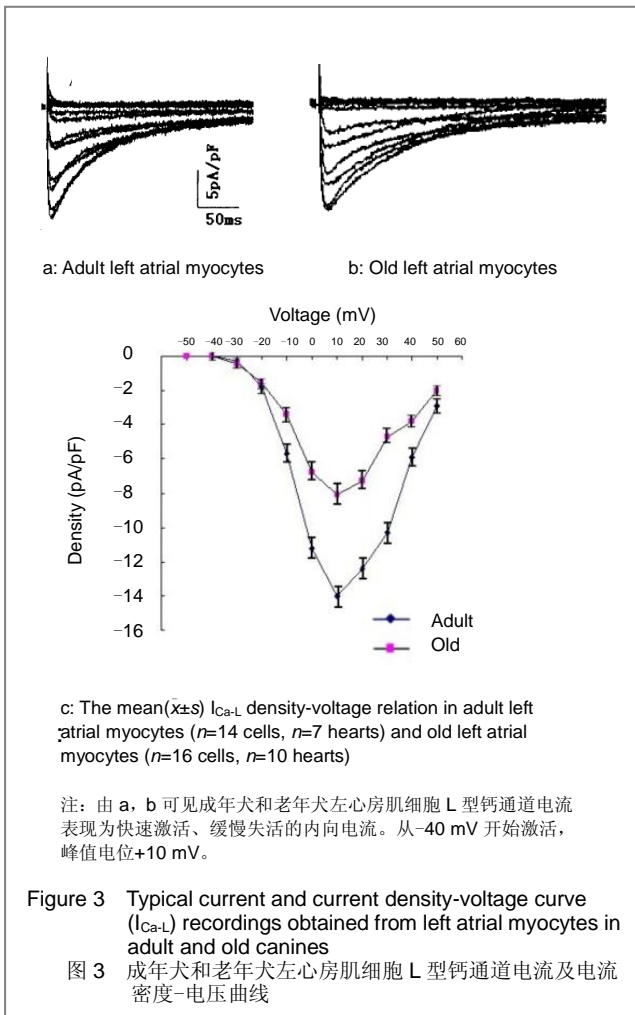
表1 老年犬和成年犬左心房肌细胞动作电位的比较
Table 1 Comparison of the action potential characteristics recorded from adult and old left atrial myocytes ($\bar{x}\pm s$)

Group	n	MDP (mV)	APA (mV)	Plateau (mV)	APD90 (ms)
Adult	12	-78.8±0.8	109.8±1.4	-6.4±1.1	320.0±7.9
Old	18	-79.2±1.4	110.5±4.9	-9.5±1.7 ^a	340.5±10.1 ^a

n: cell number; MDP: maximum diastolic potential; APA: action potential amplitude; APD90: action potential duration to 90% repolarization; ^aP < 0.05, vs. adult group

注: t 检验结果显示: 与成年犬相比, 老年犬左心房肌细胞动作电位时程延长(P < 0.05), 平台期幅度明显降低(P < 0.05), 而最大舒张电位和动作电位幅度的差异在两组间无显著性意义(P > 0.05)。

2.3 老年犬与成年犬左心房肌细胞L型钙通道的比较见图3。



使用L型钙通道电流细胞内外液和L型钙通道电流的电流密度-电压关系刺激方案在犬心房肌细胞上能记录到一快速激活、缓慢失活的内向电流。从-40 mV开始激活, 峰值电位+10 mV, 电流在10 ms左右达到高峰, 250 ms基本完全失活。其激活和失活过程均呈电压和时

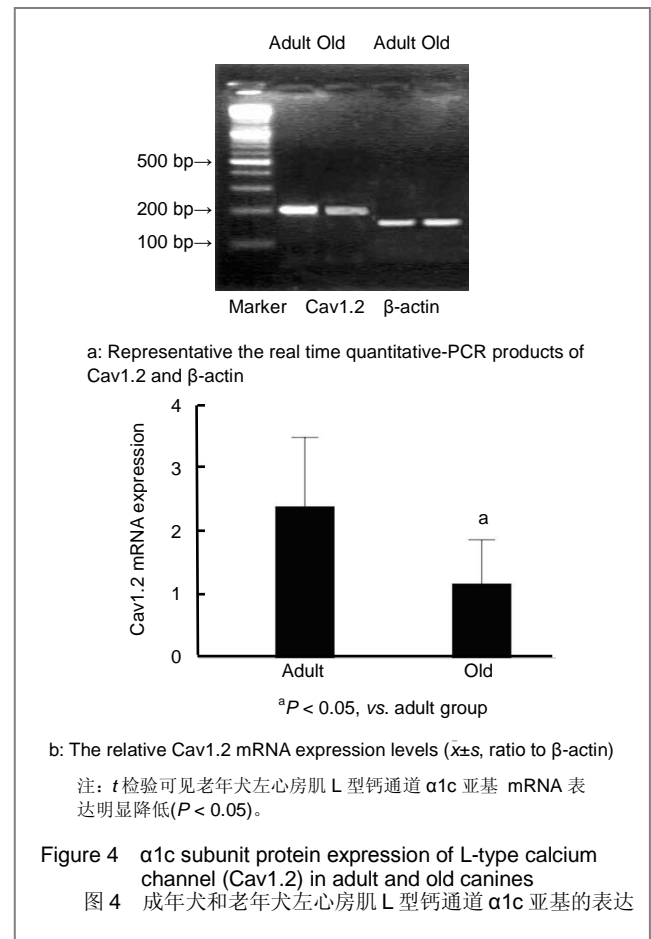
间依赖性。该电流能被20 $\mu\text{mol/L}$ 钙通道阻断剂硝苯地平阻断, 表明该电流为L型钙通道电流。两组犬左心房肌细胞L型钙通道见图3a, b。以测试电压为+10 mV时的电流密度作为观测指标, 与成年犬相比, 老年犬左心房肌细胞L型钙通道的电流密度明显降低[(-14.1±0.8) pA/pF vs. (-8.1±0.5) pA/pF, P < 0.05], 电流密度-电压曲线如图3c示。两组细胞间L型钙通道动力学参数差异无显著性意义(P > 0.05), 见表2。

表2 老年犬和成年犬左心房肌细胞 L 型钙通道电流通道动力学参数的比较
Table 2 Comparison of the current kinetic parameters of L-type calcium current between adult and old left atrial myocytes ($\bar{x}\pm s$)

Group	n	Steady-state activation		Steady-state inactivation		Monoexponential recovery time constants (ms)
		$V_{0.5}$ (mV)	K (mV)	$V_{0.5}$ (mV)	K(mV)	
Adult	14	-7.1±1.5	5.7±0.4	-23.1±2.1	6.2±0.3	51.9±3.3
Old	16	-6.7±2.8	5.5±0.5	-22.9±3.3	6.4±0.5	53.1±3.1

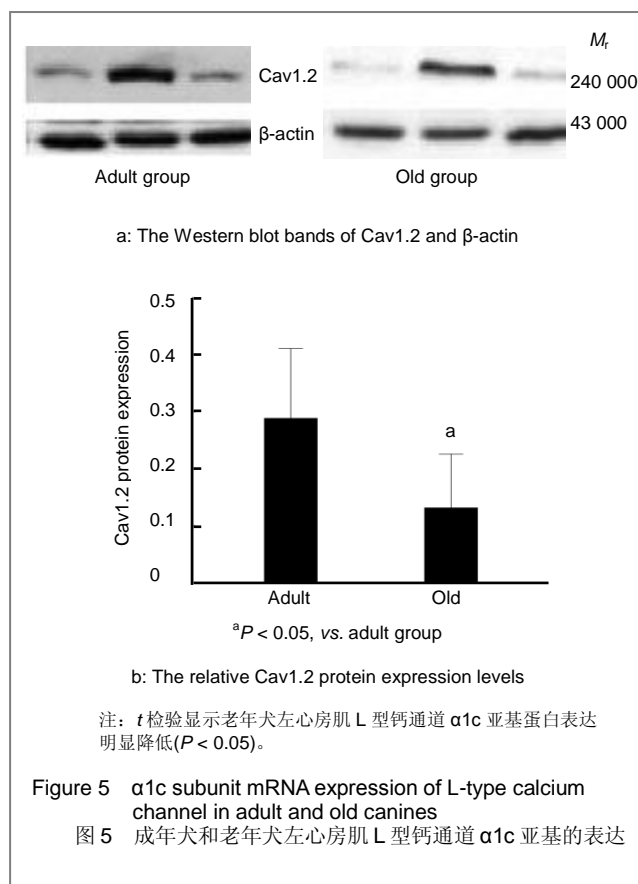
n: cell number; $V_{0.5}$: half-activation voltage or half-inactivation voltage; K: slope factor.
经 t 检验发现两组细胞间 I_{Ca-L} 动力学参数差异无显著性意义(P > 0.05)。

2.4 老年犬与成年犬左心房肌L型钙通道 $\alpha 1c$ 亚基mRNA的表达 见图4。



以100 bp DNA分子量为标志作为Marker, 分别于152 bp和199 bp处可见清晰的扩增条带, 分别为内参照基因 β -actin和L型钙通道 α 1c亚基, 见图4a; 与成年犬相比, 老年犬左心房肌L型钙通道 α 1c亚基mRNA表达明显下调($P < 0.05$), 见图4b。

2.5 老年犬与成年犬左心房肌L型钙通道 α 1c亚基蛋白的表达 两组犬左心房肌 β -actin和L型钙通道 α 1c亚基的蛋白条带经BIO-RAD凝胶成像仪扫描结果见图5a。与成年犬相比, 老年犬左心房肌L型钙通道 α 1c亚基蛋白的表达明显下降($P < 0.05$), 见图5b。两组犬左心房肌L型钙通道 α 1c亚基蛋白表达趋势与基因转录水平一致。



3 讨论

Dun等^[13]研究发现犬右心房肌细胞动作电位时程随年龄的增长而延长, 有利于心房内折返, 是心房颤动发生和维持的基础。但是关于增龄对左心房动作电位影响的研究较少。实验发现, 犬左心房肌细胞的动作电位也呈现增龄性的改变。主要变化包括动作电位平台期幅度的降低, 动作电位时程的延长。Anyukhovskiy等^[14]研究发现心肌细胞动作电位平台期幅度的降低会延缓

局部心肌对早搏刺激的传导, 使心肌传导的不均一性增加。对于阵发性心房颤动患者, 心房肌对房性早搏传导的延缓是十分常见的^[15]。因而实验结果提示左心房肌动作电位平台期的下降, 延缓了左心房肌对早搏刺激的传导。当早搏出现时, 左心房肌传导不均一性增大, 因而利于心房颤动的发生和维持。而左心房肌动作电位时程延长也有助于左心房内多子波折返, 从而促进心房颤动的发生。

心房肌细胞动作电位平台期的幅度主要由L型钙通道电流和瞬时外向钾电流决定的。因此心房肌细胞膜L型钙通道电流的降低或瞬时外向钾电流的增高均能够降低心房肌细胞动作电位的平台期幅度^[16-17]。以往有研究报道犬右心房肌细胞膜L型钙通道电流随年龄的增加而减小^[9], 但对于左心房肌细胞L型钙通道电流增龄性改变的研究缺乏。实验发现, 与成年犬相比, 老年犬左心房肌细胞L型钙通道电流的电流密度明显降低, 而L型钙通道的稳态激活、稳态失活以及失活后恢复时间等与成年犬无明显差异。因此认为L型钙通道电流电流密度的降低是老年犬左心房肌细胞动作电位平台期幅度降低的离子基础。Spach等^[18-19]研究发现随着年龄的增加, 心肌间质不均一纤维化导致电传导延缓, 传导不连续性增加。而多项试验研究均证实L型钙通道电流对维持心肌正常的电传导, 克服不连续性电传导具有重要作用^[20-21]。因此实验结果提示老年犬左心房肌细胞L型钙通道电流的电流密度降低将有助于左心房肌局部慢传导以及不连续性传导的发生。提示在增龄过程中, 无论是右心房还是左心房L型钙通道电流均是减小的, L型钙通道电流的降低可能导致心房传导异常。

钙通道是心脏收缩中重要的蛋白复合体。钙通道开放参与了起搏细胞除极, 房室传导以及动作电位平台期的形成, 而且是钙进入细胞的通道, 并将细胞外的电学信号传导到细胞内引起机械收缩^[22-23]。细胞膜上的离子通道负责和调控动作电位, 因此, 离子通道的变化导致电激动异常和心律失常发生。钙通道在心肌收缩和信号传导中起重要作用。在心肌组织中, L型钙通道电流通过L型钙通道从细胞外进入细胞内^[24]。L型钙通道由 α 1, β , α 2, δ 4个亚单位组成^[25], 其中 α 1亚单位最为重要。它由4个结构域组成, 每个结构域中含6个跨膜螺旋。它构成了L型钙通道的核心部分, 主要负责钙通道的开放以及对钙离子的选择性通透^[26-27]。迄今为止已经发现了至少10种 α 1亚单位的克隆形式, 在心肌中主要是 α 1c亚单位。Jones等^[28]发现窦房结中的L型钙通道 α 1c亚基蛋白表达随年龄增加而减少, 并认为这种变化是增

龄过程中窦房结功能减退的分子基础。实验发现, 犬左心房肌中的L型钙通道 $\alpha 1c$ 亚基的mRNA和蛋白表达随年龄增加而降低, 这与L型钙通道电流的电流密度的变化是一致的。因此课题组认为左心房肌L型钙通道 $\alpha 1c$ 亚基在基因转录水平和蛋白表达水平增龄性改变是左心房肌细胞L型钙通道电流增龄性变化的重要分子基础。但是为什么增龄过程中窦房结和左心房组织中都会呈现L型钙通道 $\alpha 1c$ 亚基表达减少的趋势, 目前原因尚不清楚。可能由于伴随增龄, 生理功能以及代谢机能的持续退化, 心肌细胞离子通道的分布和数量都发生了一定的变化。也有可能与L型钙通道 $\alpha 1c$ 亚基的调控因子有关, 或是与其相关的微小RNA有关, 需要进一步研究。

左心房在心房颤动发生和维持的过程中扮演重要角色, 但在增龄相关性心房颤动中的作用研究较少。实验发现左心房动作电位和L型钙通道电流存在增龄性的变化, 而左心房肌L型钙通道 $\alpha 1c$ 亚基表达的变化可能是作电位和L型钙通道电流增龄性改变的分子基础。

另外动作电位时程的延长有助于提高平台期晚期L型钙通道电流, 这对心肌细胞是非常重要的^[29]。晚期L型钙通道电流增高能够促使肌浆网中的钙在兴奋收缩耦联间期的释放, 同时L型钙通道电流峰电流的降低可以从晚期L型钙通道电流的增高当中得到补偿^[30]。因此动作电位时程的延长可能是代偿性的。而L型钙通道电流峰电流的减小则是左心房肌L型钙通道 $\alpha 1c$ 亚基的表达降低所致。

实验具有一定的局限性。首先, 仅研究了在生理情况下, 增龄对左心房心肌细胞动作电位、L型钙通道电流以及编码L型钙通道电流的L型钙通道 $\alpha 1c$ 亚基的影响, 对增龄伴随的心房肌细胞病理状态(如心房颤动状态下)的情况未进行全面研究。其次, 仅对编码L型钙通道电流的L型钙通道 $\alpha 1c$ 亚基进行了研究, 未对相关钙转运蛋白、钙调控蛋白等进行研究, 不够全面。最后, 实验仅研究了对心房肌细胞动作电位活动有影响的 Ca^{2+} 通道的特性, 而对动作电位形成具有重要作用的钠离子通道和钾离子通道的变化未进行观察和分析。

致谢: 衷心感谢新疆医科大学第一附属医院医学研究中心的各位老师对实验的指导。

4 参考文献

[1] Lloyd-Jones DM, Wang TJ, Leip EP, et al. Lifetime risk for development of atrial fibrillation: the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2004;110(9):1042-1046.

- [2] Furberg CD, Psaty BM, Manolio TA, et al. Prevalence of atrial fibrillation in elderly subjects (the Cardiovascular Health Study). *Am J Cardiol*. 1994;74(3):236-241.
- [3] Fuster V, Rydén LE, Cannom DS, et al. ACC/AHA/ESC 2006 guidelines for the management of patients with atrial fibrillation--executive summary. *Rev Port Cardiol*. 2007;26(4):383-446.
- [4] Tsang TS, Miyasaka Y, Barnes ME, et al. Epidemiological profile of atrial fibrillation: a contemporary perspective. *Prog Cardiovasc Dis*. 2005;48(1):1-8.
- [5] Grant AO. Cardiac ion channels. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2009;2(2):185-194.
- [6] Ballijepalli RC, Kamp TJ. Caveolae, ion channels and cardiac arrhythmias. *Prog Biophys Mol Biol*. 2008;98(2-3):149-160.
- [7] Gaborit N, Steenman M, Lamirault G, et al. Human atrial ion channel and transporter subunit gene-expression remodeling associated with valvular heart disease and atrial fibrillation. *Circulation*. 2005;112(4):471-481.
- [8] Qin W, Chen X. Xinzang Zazhi. 2008;20(4):491-494. 秦卫, 陈鑫. 心房颤动电重构的离子通道研究进展[J]. 心脏杂志, 2008,20(4):491-494.
- [9] Dun W, Yagi T, Rosen MR, et al. Calcium and potassium currents in cells from adult and aged canine right atria. *Cardiovasc Res*. 2003;58(3):526-534.
- [10] Tipparaju SM, Kumar R, Wang Y, et al. Developmental differences in L-type calcium current of human atrial myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;286(5):H1963-1969.
- [11] Osranek M, Fatema K, Qaddoura F, et al. Left atrial volume predicts the risk of atrial fibrillation after cardiac surgery: a prospective study. *J Am Coll Cardiol*. 2006;48(4):779-786.
- [12] Yan J, Chen K, Xu M, et al. Effects of beta-adrenoceptor activation on metabolism in neonatal rat cardiomyocytes. *Sheng Li Xue Bao*. 2004;56(2):224-229.
- [13] Dun W, Boyden PA. Aged atria: electrical remodeling conducive to atrial fibrillation. *J Interv Card Electrophysiol*. 2009;25(1):9-18.
- [14] Anyukhovskiy EP, Sosunov EA, Plotnikov A, et al. Cellular electrophysiologic properties of old canine atria provide a substrate for arrhythmogenesis. *Cardiovasc Res*. 2002;54(2):462-469.
- [15] Podrid PJ. Atrial fibrillation in the elderly. *Cardiol Clin*. 1999;17(1):173-188.
- [16] Yue L, Feng J, Li GR, et al. Transient outward and delayed rectifier currents in canine atrium: properties and role of isolation methods. *Am J Physiol*. 1996;270(6 Pt 2):H2157-2168.
- [17] Verkerk AO, Geuzebroek GS, Veldkamp MW, et al. Effects of acetylcholine and noradrenalin on action potentials of isolated rabbit sinoatrial and atrial myocytes. *Front Physiol*. 2012;3:174.
- [18] Spach MS, Dolber PC. Relating extracellular potentials and their derivatives to anisotropic propagation at a microscopic level in human cardiac muscle. Evidence for electrical uncoupling of side-to-side fiber connections with increasing age. *Circ Res*. 1986;58(3):356-371.
- [19] Spach MS, Miller WT 3rd, Dolber PC, et al. The functional role of structural complexities in the propagation of depolarization in the atrium of the dog. Cardiac conduction disturbances due to discontinuities of effective axial resistivity. *Circ Res*. 1982;50(2):175-191.

- [20] Shaw RM, Rudy Y. Ionic mechanisms of propagation in cardiac tissue. Roles of the sodium and L-type calcium currents during reduced excitability and decreased gap junction coupling. *Circ Res.* 1997;81(5):727-741.
- [21] Rohr S, Kucera JP. Involvement of the calcium inward current in cardiac impulse propagation: induction of unidirectional conduction block by nifedipine and reversal by Bay K 8644. *Biophys J.* 1997;72(2 Pt 1):754-766.
- [22] Treinys R, Jurevicius J. L-type Ca²⁺ channels in the heart: structure and regulation. *Medicina (Kaunas).* 2008;44(7):491-499.
- [23] Bers DM, Despa S. Cardiac myocytes Ca²⁺ and Na⁺ regulation in normal and failing hearts. *J Pharmacol Sci.* 2006;100(5):315-322.
- [24] Richard S, Perrier E, Fauconnier J, et al. 'Ca(2+)-induced Ca(2+) entry' or how the L-type Ca(2+) channel remodels its own signalling pathway in cardiac cells. *Prog Biophys Mol Biol.* 2006;90(1-3):118-135.
- [25] Yamakage M, Namiki A. Calcium channels--basic aspects of their structure, function and gene encoding; anesthetic action on the channels--a review. *Can J Anaesth.* 2002;49(2):151-164.
- [26] Wang MC, Dolphin A, Kitmitto A. L-type voltage-gated calcium channels: understanding function through structure. *FEBS Lett.* 2004;564(3):245-250.
- [27] Bodi I, Mikala G, Koch SE, et al. The L-type calcium channel in the heart: the beat goes on. *J Clin Invest.* 2005;115(12):3306-3317.
- [28] Jones SA, Boyett MR, Lancaster MK. Declining into failure: the age-dependent loss of the L-type calcium channel within the sinoatrial node. *Circulation.* 2007;115(10):1183-1190.
- [29] Linz KW, Meyer R. Profile and kinetics of L-type calcium current during the cardiac ventricular action potential compared in guinea-pigs, rats and rabbits. *Pflugers Arch.* 2000;439(5):588-599.
- [30] Linz KW, Meyer R. The late component of L-type calcium current during guinea-pig cardiac action potentials and its contribution to contraction. *Pflugers Arch.* 1998;436(5):679-688.

来自本文课题的更多信息--

基金声明: 国家自然科学基金项目(30860299); 新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(200821143); 高等学校博士学科点专项科研基金项目(200807600004)。

作者贡献: 甘天翊负责实验设计, 甘天翊、许国军、周贤惠、李耀东、郭霞、姜涛、李发鹏、张健负责实验实施, 汤宝鹏负责实验评估, 甘天翊、许国军负责成文和统计处理, 汤宝鹏审校, 甘天翊对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 实验设计及实施均经过新疆医科大学第一附属医院动物伦理委员会的审核批准。符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

文章概要:

文章要点: 通过细胞膜片钳实验和分子生物学实验对不同年龄组犬的左心房肌细胞的动作电位、L 型钙通道电流及相关钙通道进行研究, 观察增龄对犬左心房肌细胞电生理的影响。

关键信息: 左心房肌细胞电生理学特性存在增龄性改变, 这些改变增加心房颤动发生的可能。

本文的创新之处: 文章从增龄角度观察左心房肌细胞电生理学特性的改变, 运用细胞膜片钳、实时荧光定量 PCR 及 Western blot 等方法进行研究, 数据充分, 理论依据充足, 为解释增龄与心房颤动的关系提供依据。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。