

• 基础研究 •

急性胰腺炎大鼠心肌细胞瞬间外向钾电流的变化

齐书英 杨丽 胡丽叶 李育红 李洁

【摘要】 目的 探讨急性胰腺炎大鼠心肌细胞瞬间外向钾电流的变化。方法 以开腹胆总管注射牛磺胆酸钠的方法制备大白鼠急性胰腺炎实验模型,24~48h后处死动物分离单个心肌细胞,采用全细胞膜片钳技术观察心肌细胞瞬间外向钾电流(I_{to})的变化,以正常大白鼠心肌细胞的 I_{to} 为对照。结果 急性胰腺炎大鼠心肌细胞的瞬间外向钾电流受到抑制,电流密度-电压关系曲线下移,其峰值电流密度由对照组的(52.16±13.12)pA/pF下降为急性胰腺炎组的(11.83±4.20)pA/pF,+70mV的 I_{to} 电流密度较对照组下降了58.15%($P<0.001$),其失活曲线左移,半数最大失活电位对照组为(-45.2±8.3)mV,急性胰腺炎组为(-55.0±8.6)mV,与对照组比较显著减小($P<0.001$),失活速度加快;急性胰腺炎组 I_{to} 恢复速度明显减慢,恢复时程延长(与对照组比较 $P<0.001$)。结论 急性胰腺炎后心肌细胞的 I_{to} 受抑制,可能为急性胰腺炎后发生心律失常发生的机制之一。

【关键词】 大鼠;胰腺炎;肌细胞,心脏;膜片钳术

Changes of transient outward potassium currents of rat of cardiac myocytes in acute pancreatitis

QI Shuying, YANG Li, HULiye, et al

Department of Cardiology, Bethune International Peace Hospital of PLA, Shijiazhuang 050082, China

【Abstract】 Objective To determine the changes of transient outward potassium currents(I_{to}) of ventricular myocytes in rat with acute pancreatitis. Methods Rat models with acute pancreatitis were made by injection of sodium taurocholate into the pancreatic duct. After 24-48 h, The animals were sacrificed and single ventricular myocyte was isolated enzymatically. I_{to} was recorded using patch clamp technique in the whole cell configuration. Results I_{to} from cardiac myocytes in the acute pancreatitis group was significantly reduced [(11.83±4.20) pA/pF] compared with the cells from control group [(52.16±13.12)pA/pF, $P<0.001$], the peak current density decreased by 58.15%. The steady-state inactivation curve shifted to the hyperpolarizing direction, the half-maximal voltage-dependent inactivation($V_{1/2}$) was (-55.0±8.6) mV in cardiac cells from pancreatitis group and (-45.2±8.3)mV in the control cells. I_{to} recovered more slowly in cardiac cells from pancreatitis group than in normal cells. Conclusion Inhibition of I_{to} was found in ventricular myocytes of rats with acute pancreatitis and it might be important in the development of arrhythmias.

【Key words】 rats; pancreatitis; myocyte, cardiac; patch-clamp techniques

急性胰腺炎可通过胰-心反射引起心脏损害,发生室性心律失常^[1]、心脏功能抑制甚至诱发急性冠脉综合征,严重者可引起心源性猝死,影响患者的预后^[2]。关于急性胰腺炎后心肌细胞离子通道的研究国内外尚未见文献报道。本研究以开腹胆总管注射牛磺胆酸钠的方法制备大白鼠急性胰腺炎实验模型,24~48h后处死动物分离单个心肌细胞,采用全细胞膜片钳技术观察心肌细胞瞬间外向钾通道电

流(I_{to})的变化,分析急性胰腺炎后发生心律失常的离子通道机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物及急性胰腺炎动物模型的制备 Wistar 大白鼠 12 只(白求恩国际和平医院实验动物中心提供),雌雄不拘,体质量 150~250g,动物随机分为两组,即急性胰腺炎组和正常对照组各 6 只。

收稿日期:2006-09-11

作者单位:050082 石家庄市,白求恩国际和平医院心内科

作者简介:齐书英,女,1969年4月生,河北临城人,医学博士,副主任医师,Tel:0311-87978304,13722793545

按文献报道的方法以5%牛磺胆酸钠(1.0ml/kg)胆管内注射制备急性胰腺炎实验模型^[3],以胰腺组织病理结果判定模型成功。正常对照组不进行任何干预。

1.2 液体配制 无钙台氏液(mmol/L):NaCl 140, NaHCO₃ 11.9, KCl 5.40, MgCl₂ 0.53, HEPES 5, NaH₂PO₄ 0.33, 葡萄糖 10, 用NaOH调节pH值至7.4。含酶液:无钙台氏液中加入0.4g/L胶原酶I和0.7g/L的牛血清白蛋白(BSA)。KB液(mmol/L):KOH 70, L-谷氨酸 50, KCl 40, 牛磺酸 20, KH₂PO₄ 20, HEPES 10, 葡萄糖 10, EGTA 0.5, 用KOH调pH至7.4。I_{Ca}记录电极内液(mmol/L):KCl 140, MgCl₂ 0.53, EGTA 10, HEPES 10, 用KOH调节pH至7.3。I_{Ca}记录电极外液(mmol/L):无钙台氏液, 加入BaCl₂ 1mmol/L和CoCl₂ 2mmol/L。胶原酶、HEPES、BSA等由Sigma公司生产,余为国产分析纯。

1.3 单细胞分离 参照文献报道的方法^[4],用酶解法分离单个心室肌细胞。整个灌流系统温度保持在35~37℃,所有液体均用纯氧饱和。

1.4 膜片钳全细胞记录^[5] 吸几滴细胞悬液加入细胞池中,并置于倒置显微镜(Olympus 1×70,日本)工作台上,细胞贴壁后在室温下用台氏液灌流,流速2ml/min。选择杆状、表面光滑、纹理清晰的心肌细胞,利用三维操纵器(Narishige,日本)移动电极,并轻压在被选细胞表面,稍加负压即可形成1GΩ水平以上的高阻抗封接,再用较大负压吸破细胞膜,补偿电容电流和电极串联电阻,形成全细胞记录形式。实验过程由PULSE+PULSEFIT 8.53软件(德国HEKA公司)控制,脉冲信号经数/模转换后由放大器输出,电流信号经Ag/AgCl电极引导,由膜片钳放大器(EPC-9,德国)放大,通过模数转换采集数据,存放于计算机硬盘,并进行数据分析。信号经截止频率为1kHz的四介贝塞尔低通滤波器,采样频率4kHz。实验用玻璃微电极由PP-83电极拉制仪(Narishige,日本)分两步拉制而成,其尖端阻抗为2~5MΩ。实验在室温(20~25℃)下进行,细胞破膜后稳定5min开始记录电流。

1.5 I_{Ca}记录方法 (1)电流-电压曲线:从维持电压(holding potential, HP) -40mV,阶跃10mV,脉宽250ms,给予从-40~+60mV的除极化脉冲,刺激频率0.5Hz。I_{Ca}幅值为其峰值与刺激结束稳态值的差值。为消除细胞间误差,电流值以电流幅值与膜电容相比即电流密度(pA/pF)表示,以不同钳制电压下的I_{Ca}电流密度绘成电流密度-电压(I-V)曲线。

(2)稳态失活曲线:采用双脉冲刺激法,HP = -40mV,条件脉冲-100~+20mV,钳制时间250ms,阶跃10mV,每次条件脉冲后紧跟一固定的除极化到+60mV的测试脉冲,持续时间250ms,刺激频率0.5Hz。将记录的I_{Ca}与最大激活时的I_{Ca}之比,与相应的条件脉冲膜电位作图得I_{Ca}失活曲线,并通过PULSE+PULSEFIT软件用Boltzmann方程自动计算出I_{Ca}半数最大失活电压(V_{1/2})。(3)失活后再恢复曲线:采用双脉冲刺激法,条件脉冲HP = -40mV,除极化到+60mV,持续时间250ms,在条件脉冲回到HP后不同时间间隔给予测试脉冲除极化到+60mV,持续时间250ms,测试脉冲与条件脉冲的间隔开始为30ms,增量为15ms逐级递增至195ms,刺激频率0.5Hz。以测试脉冲与条件脉冲的I_{Ca}之比与相应的时间间隔作图,得I_{Ca}失活后再恢复过程曲线。

1.6 统计学分析 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用SPSS 10.0软件包进行统计学处理,组间比较用t检验,以P<0.05为差异有统计学意义。以Origin 7.0版软件对I_{Ca}失活后再恢复曲线进行单指数方程拟合计算出时间常数。

2 结果

2.1 对I_{Ca} I-V曲线的影响 图1为正常对照组与急性胰腺炎组心室肌细胞的原始I_{Ca}形态曲线。图2示两组细胞I_{Ca}的I-V曲线,均呈线性电压依赖性。急性胰腺炎组与对照组相比,I-V曲线上移,但对I_{Ca}的激活电位、电压依赖性及其I-V曲线的形态轨迹均无影响。测试电压+70mV时的I_{Ca}电流密度对比显示:对照组为(52.16±13.12)pA/pF (n=12),急性胰腺炎组为(11.83±4.20)pA/pF (n=8),较对照组下降了58.15%(P<0.001)。

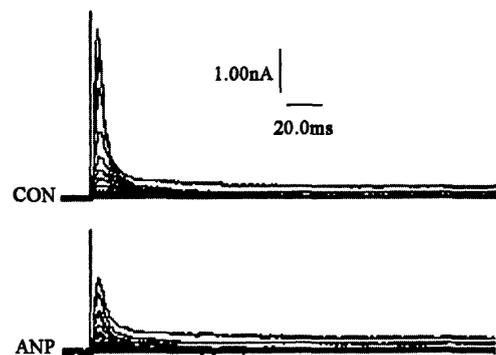


图1 对照组(CON)和急性胰腺炎组(ANP)的典型I_{Ca}图

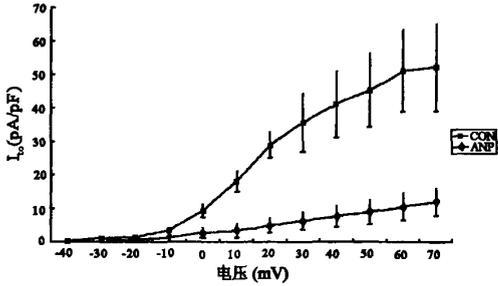


图2 两组 I_{to} 电流密度-电压曲线

2.2 对 I_{to} 稳态失活曲线的影响 图3示 I_{to} 电压依赖性失活曲线,急性胰腺炎组与对照组相比,失活曲线明显左移(即向超极化方向移动),对照组半数失活电压为(-45.2±8.3)mV (n=10 cells),急性胰腺炎组 V_{1/2} 为(-55.0±8.6)mV (n=6 cells),与对照组比较显著减小(P<0.001)。

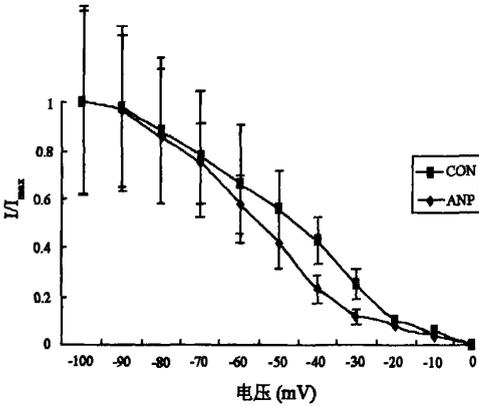


图3 两组 I_{to} 稳态失活曲线

2.3 对 I_{to} 失活后恢复曲线的影响 图4示 I_{to} 失活后恢复曲线,在两个脉冲间隔时间为 60ms 时,对照组 I_{to} 恢复 63%,急性胰腺炎组恢复仅 29%;当两个脉冲间隔时间为 120ms 时,对照组 I_{to} 恢复 95%,急性胰腺炎组恢复仅 61%;当两个脉冲间隔时间为

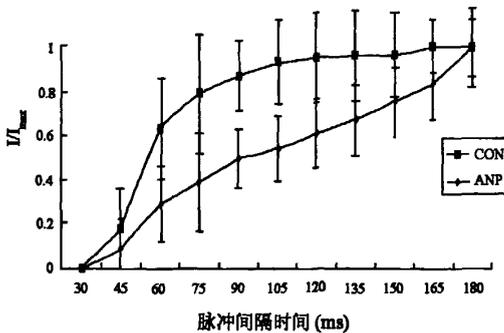


图4 两组 I_{to} 失活后再恢复曲线

165ms 时,对照组 I_{to} 恢复 100%,急性胰腺炎组恢复仅 83%。说明急性胰腺炎组 I_{to} 恢复速度明显减慢,恢复时程延长,和对照组比较有显著性差别(P<0.001)。对照组的时间常数为 33.41±0.03,胰腺炎组的时间常数为 230.40±22.93。

3 讨论

急性胰腺炎是临床急腹症中最凶险的疾病之一,死亡率高达 15%~40%,并发症高达 40%~60%,以心血管机能不全多见,常出现心律失常和心力衰竭^[1,2,6~8]。急性胰腺炎时心肌细胞本身离子通道的特性改变尚未见文献报道。

I_{to} 是心肌细胞复极过程中的重要离子流,与动作电位复极早期(1期)有关,影响动作电位的早期复极,决定动作电位平台期早期的电位,进而影响其它离子通道的活性,因此钠通道的活性对心肌细胞的功能有重要的影响^[9]。本研究结果表明,急性胰腺炎时心肌细胞的 I_{to} 电流密度明显下降,稳态失活曲线显著左移,失活后再恢复减慢,说明急性胰腺炎抑制了心肌细胞的 I_{to}。瞬间外向钾通道活性的以上变化使心肌细胞复极早期钾离子外流受抑制,心肌细胞动作电位时程和有效不应期相对延长,从而易诱发折返性室性心律失常。

参考文献

- [1] 王成友,王本忠,张小平,等. 胰-心综合征的实验研究. 安徽预防医学杂志,1997,3:72-74.
- [2] 王鸣和. 急性胰腺炎所致心血管病损. 心血管病学进展,1996,17:181.
- [3] 李军成,田斌,陈易人,等. 急性胰腺炎急性期胰腺病理与血清细胞因子的关系. 肝胆外科杂志,2003,11:457-460.
- [4] Mitra T, Morad M. A uniform enzymatic method for dissociate of myocyte from hearts and stomachs in vertebrates. Am J Physiol, 1985,249:H1056-H1068.
- [5] Hamill OP, Marty A, Neher E, et al. Improved patch clamp techniques for high resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. Pflugers Arch, 1981,391:85-97.
- [6] 姜安来. 急性胰腺炎合并心脏损害 34 例临床分析. 实用医学杂志,1998,14:26.
- [7] 杨立新,黄俊,戟朝明,等. 急性胰腺炎血液流变学改变的动态观测及与胰腺组织损害相关性研究. 中国血液流变学杂志,2000,10:132-134.
- [8] 邝子良. 急性胰腺炎的心脏损害及心电图改变分析. 广东医学院学报,1999,17:353-354.
- [9] 刘泰健. 心肌细胞电生理学. 北京:北京大学出版社 2000,27-29.