

• 基础研究 •

应用单相动作电位研究房颤模型心房电重构的发生机制

杨贵荣, 张 薇, 黎 莉, 钟 明, 朱 慧, 张 运

【摘要】 目的 应用单相动作电位(MAP)技术检测心房颤动模型电生理参数改变的特点,探讨房颤电重构发生的分子机制。**方法** 健康杂种犬 17 只,随机分为房颤组($n=11$)和对照组($n=6$)。房颤组安装固定频率起搏器,以 350~430 次/min 的频率快速心房起搏,对照组行假手术。于起搏前和 8 周后测量右房有效不应期(AERP)和单相动作电位,测量单相动作电位振幅(MAPA)、单相动作电位时限(MAPD)、复极 90%时动作电位时限(MAPD90)、复极 50%时动作电位时限(MAPD50)、复极 90%动作电位时限与复极 50%动作电位时限之差(MAPD90-50)。原子发射光电直读光谱法测定心房肌组织 Ca^{2+} 含量。RT-PCR 法检测心房肌浆网 Ca^{2+} -ATP 酶和 L 型钙通道 mRNA 转录水平。**结果** 对照组 MAP 时相明显。房颤组 MAP 形态发生改变。与对照组相比,房颤组 MAPA 有下降趋势;MAPD,MAPD90,MAPD50,MAPD90-50 分别缩短 13.79%,19.65%,13.59%和 31.25%。MAPD,MAPD90,MAPD90-50 与右房心机 Ca^{2+} 呈显著负相关;MAPD90-50 与 L 型钙通道显著正相关。上述指标与肌浆网钙 ATP 酶均无相关性。**结论** MAP 是研究房颤电重构的可靠手段,心房肌细胞膜 L 型钙通道和肌浆网 Ca^{2+} -ATP 酶 mRNA 表达改变可能是电重构的分子机制之一

【关键词】 心房颤动;电重构;单相动作电位;L 型钙通道; Ca^{2+} -ATP 酶

【中图分类号】 R331.3^① 8

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-5403(2010)05-0445-04

Mechanism of atrial electrical remodeling in atrial fibrillation model investigated by monophasic action potential

YANG Guirong, ZHANG Wei, LI Li, et al

Intensive Care Unit, General Hospital of Chinese Armed Police Forces, Beijing 100039, China

【Abstract】 Objective To investigate the molecular mechanism and characteristics of atrial electrical remodeling parameters in atrial fibrillation (AF) model using monophasic action potential (MAP). **Methods** Seventeen mongrel dogs were randomly divided into two groups. Eleven dogs were subjected to rapid right atrial pacing (350—430 beats/min) for 8 weeks (AF group), and another 6 sham-operated dogs served as controls. Before and after 8 weeks pacing, electrophysiological examinations were performed to calculate atrial effective refractory period (AERP). The MAP amplitude (MAPA), duration (MAPD), 90% repolarization duration (MAPD90), 50% repolarization (MAPD50) and MAPD90-50 were measured according to MAP recordings. The content of myocardial calcium was assayed by spectrocomparator in atrial myocardium from all dogs. The messenger ribonucleic acid (mRNA) level of sarcoplasmic reticular (SR) Ca^{2+} -ATPase and L-type calcium channel were measured by reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) and normalized to the mRNA level of β -actin. **Results** Each phase of MAP was easily discerned in control dogs. Morphology of MAP was significantly changed in AF group. Compared with control group, MAPA of AF group had a tendency to decrease. MAPD, MAPD90, MAPD50 and MAPD90-50 were shortened by 16.20%, 19.65%, 13.59% and 31.25%, respectively. MAPD, MAPD90 and MAPD90-50 were negatively correlated to the content of calcium in right atrial myocardium. MAPD90-50 was positively correlated to the mRNA level of L-type calcium channel. All parameters had no relation to mRNA level of SR Ca^{2+} -ATPase. **Conclusion** MAP provides a reliable method to investigate atrial fibrillation electrical remodeling. Changes in L-type calcium channel and SR Ca^{2+} -ATPase may be one of the mechanism of atrial electrical remodeling.

【Key words】 atrial fibrillation; electrical remodeling; monophasic action potential; L-type calcium channel; Ca^{2+} -ATPase

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 30370564);山东省科技攻关资助项目(2005GG3202162)

作者单位:100039 北京市,武警总医院重症监护科(杨贵荣);250012 济南市,山东大学齐鲁医院心内科(张 薇,黎 莉,钟 明,朱 慧,张 运)。

Tel:010-88276660, Email:yanggr2001@163.com

研究表明,心房电重构是房颤发生和维持的关键环节,因此准确检测心房电重构的电生理参数变化、深入其机制研究,对于建立有效的以机制为基础的治疗方案具有重要意义。单相动作电位(monophasic action potential, MAP)是群细胞的平均胞外电位,被称为心肌细胞电生理和临床电生理之间的桥梁,将这一技术用于研究心房电重构有可能为心房肌电生理特性改变提供精确而重要的信息。频率相关的心房肌细胞内 Ca^{2+} 超负荷被认为是房颤电重构的始动因素。而 L 型钙通道和肌浆网 Ca^{2+} -ATP 酶在 Ca^{2+} 稳态中发挥重要作用。本研究旨在探讨房颤电重构的电生理参数改变特点及其分子机制。

1 材料与方法

1.1 动物与分组 随机选择健康杂种犬 17 只,体重 $11\sim 17(13.69\pm 2.36)$ kg,购自山东大学齐鲁医院实验动物中心。随机分为对照组($n=6$)和房颤组($n=11$)。房颤组犬经右颈内静脉植入“J”形伞状心房单极起搏电极导线(CPI4171,比利时),固定于右心耳,起搏器(复旦大学四一工厂)埋植于颈部皮下,起搏频率 $350\sim 450$ 次/min,起搏 8 周建立房颤模型。对照组仅行假手术。房颤组 8 只犬完成实验,3 只犬因死亡或起搏器故障退出,对照组全部完成实验。

1.2 电生理检查 经股静脉将 2 根 7F 四极电极导管在 X 线引导下放于高位右房和 His 束。在右房游离壁测量心房有效不应期(atrial effective refractory period, AERP)。起搏电压为 2 倍舒张期阈值,脉宽 1.0 ms。基础刺激(S1S1)的周长分别为 300 ms 和 200 ms,采用每 8 个基础刺激 S1 之后加 1 个前期刺激(S2)的方法。AERP 为不能引起心房有效除极的最长 S1S2 间期。AERP 测量完毕后,经股静脉将可操纵式 7F Ag-AgCl MAP/起搏联合电极导管(美国 EP 公司)送入右心房,使电极导管尖端与心内膜接触并施以适当的压力,稳定 $3\sim 5$ 个心动周期后,记录右房游离壁 MAP。起搏 8 周后,以磁铁控制脉冲发生器停止脉冲发放后,再次记录 AERP 和 MAP。

1.3 心房肌 Ca^{2+} 浓度 三电极直流等离子体原子发射光电直读光谱仪测定心房肌 Ca^{2+} 浓度。

1.4 心房肌 Ca^{2+} ATP 酶和 L 型钙通道 mRNA 检测 Trizol 一步法提取 RNA,紫外分光光度计检测 RNA 的纯度和浓度。取 $4.8\ \mu\text{g}$ 总 RNA 逆转录成 cDNA。引物序列:L 型钙通道 $\alpha 1\text{C}$ 亚基(280bp), 5'-ATC ATC ATC TAC GCC ATC ATC GG-3',

5'-TCC AGT ATA GTA CGT CAG TCC-3'; 钙 ATP 酶(477bp), 5'-TTG CAT TGC AGT CTG GAT CA-3', 5'-TCC AAA GCA GAG TCA TTA CA-3'。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。PCR 反应体系($25\ \mu\text{l}$): RT 产物 $2\ \mu\text{l}$ 、 $20\ \mu\text{mol/L}$ 的上游、下游引物各 $0.5\ \mu\text{l}$ 、dNTP $5\ \mu\text{l}$ 、 $5\times\text{PCR}$ 缓冲液 $5\ \mu\text{l}$ 、Taq DNA 聚合酶 2.5U , 总反应体积 $25\ \mu\text{l}$ 。反应条件: 94°C 预变性 4 min,进入 PCR 循环, 94°C 变性 30 s, 50°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1.5 min,循环 35 次后再延伸 10 min,存于 4°C 或 -20°C 备用。应用计算机扫描(复日 FR-980A 型生物凝胶电泳图像分析系统)对 PCR 产物电泳带进行紫外光密度扫描定量,测定目的基因和内参照的电泳条带灰度积分,以两者比值代表目的基因的相对表达含量。

1.4 统计学处理 计量参数以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS10.0 软件进行分析,组间参数比较采用非配对 t 检验,变量之间相关性作直线相关分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 单相动作电位形态 对照组 MAP 上升支陡峭,各时相易于分辨,等电位线明显。房颤组 MAP 顶部较平坦,平台期缩短或消失,振幅有所下降。房颤时,MAP 心房搏动周长显著缩短,绝对不规则;MAP 图形各异,除极变慢,变形,振幅不一;连续的 MAP 彼此之间舒张间期消失(图 1,图 2)。

2.2 单相动作电位测量指标 起搏 8 周后,与对照组相比,房颤组单相动作电位振幅(MAPA)有下降趋势,但无统计意义;单相动作电位时限(MAPD)缩短 13.79%,复极 90%时动作电位时限(MAPD90)缩短 19.65%;复极 50%时动作电位时限(MAPD50)缩短 13.59%,复极 90%动作电位时限与复极 50%动作电位时限之差(MAPD90-50)缩短 31.25%(表 1)。

2.3 心房肌 Ca^{2+} 浓度、L 型钙通道和肌浆网 Ca^{2+} ATP 酶 mRNA 水平变化 与对照组比较,房颤组心房肌组织 Ca^{2+} 含量升高 36.17%;心房肌组织 L-型钙通道 mRNA 水平下降 25.92%[(0.20 ± 0.03) vs (0.27 ± 0.03), $P<0.05$],肌浆网 Ca^{2+} -ATP 酶 mRNA 水平升高,但未达到统计意义[(0.24 ± 0.07) vs (0.21 ± 0.01), $P=0.428$]。

2.4 相关性分析 MAPD, MAPD90, MAPD90-50 与 Ca^{2+} 呈显著负相关(r 分别为 -0.581 , -0.678 , -0.674 , 分别 $P<0.05$, 0.01 , 0.01),而 MAPD90-50 与 L 型钙通道呈显著正相关($r=0.595$, $P<0.05$)。所有电生理指标与 Ca^{2+} -ATP 酶均无相关性。

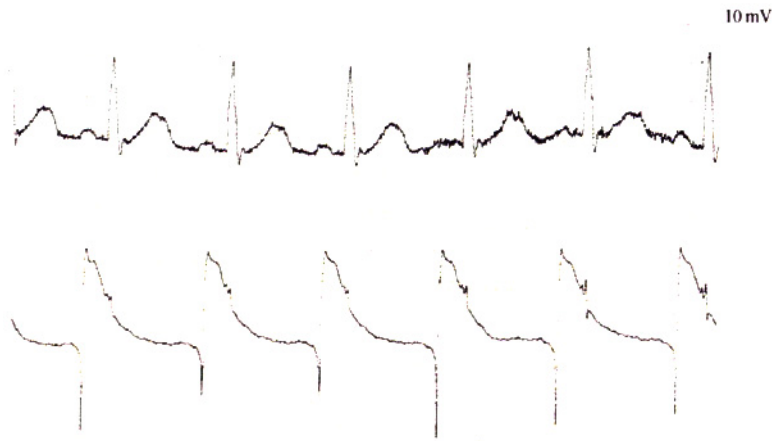


图 1 对照组单相动作电位

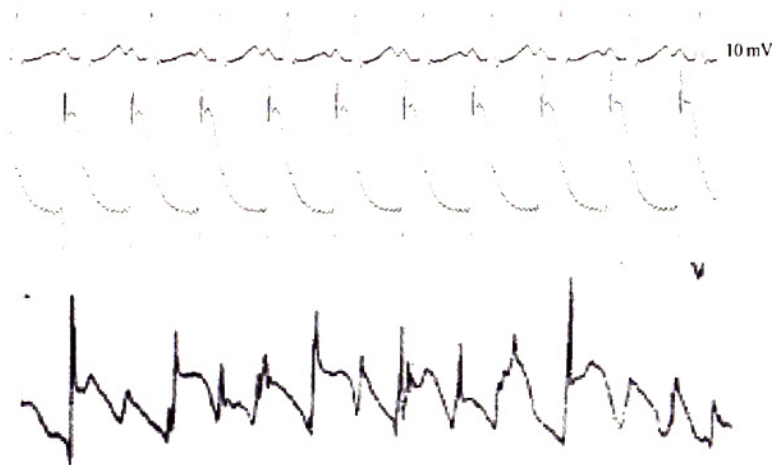


图 2 房颤组单相动作电位和房颤时单相动作电位

表 1 单相动作电位参数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	MAPA(mV)	MAPD(ms)	MAPD90(ms)	MAPD50(ms)	MAPD90-50(ms)	AERP(ms)
房颤组	8	2.8±0.5	125±16*	94±13**	66±7*	28±7*	91±14***
对照组	6	3.1±0.5	145±14	117±8	77±10	40±3	115±20

注:MAPA:单相动作电位振幅;MAPD:单相动作电位时限;MAPD90:复极 90%时动作电位时限;MAPD50:复极 50%时动作电位时限;MAPD90-50:复极 90%动作电位时限与复极 50%动作电位时限之差;AERP:右房有效不应期。与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$

3 讨论

自从 Wijffels 等^[1]在山羊房颤模型上证明快速心房率诱发心房电重构以来,许多动物实验和临床研究证明快速心房激动使 AERP 缩短^[2]。基础研究证实心肌动作电位较 AERP 更能精确地反映心房肌的电生理特性。MAP 是能够在形态和时程上准确反映跨膜动作电位(transmembrane action po-

tential, TAP)的细胞外电位,可用于完整搏动的心脏上,尤其重要的是能够从患者心脏上记录到。记录群细胞平均胞外电位的 MAP 与用微电极技术记录的 TAP 相比较,可以逼真地反映 TAP 的形态和时程变化^[3],能够精确显示局部心肌细胞动作电位的整个复极时相,并能提供准确的局部激动情况。因此应用 MAP 记录技术研究房颤电重构更能准确反映心房肌的电生理特性。

本研究表明,房颤组 MAP 的形态发生显著改变,主要是平台期的缩短或消失,另一个特征是振幅降低。发生房颤时 MAP 绝对不规则,图形各异,振幅不一。进一步分析表明,房颤组 MAPD, MAPD90, MAPD50 较对照组显著下降,房颤组 AERP 较对照组极显著下降。同本研究结果相似, Bode 等^[4]也发现可以用动作电位时程来估算 ERP, ERP 与 APD90 的相关系数为 0.98。提示房颤导致 AERP 缩短的可能机制之一是频率依赖性的动作电位时程缩短。与 AERP 相比, MAP 能更准确、直观、形象地反映电重构的发生情况。

心肌细胞 Ca^{2+} 超载是心房肌电生理特性改变的始动因素。本次研究表明房颤组心房肌 Ca^{2+} 浓度显著升高。细胞内 Ca^{2+} 的平衡取决于细胞外 Ca^{2+} 通过细胞膜上的 L 型钙通道进入细胞内和心肌细胞肌浆网对 Ca^{2+} 的释放、摄取和储存。心脏 L-型钙通道的 $\alpha 1\text{C}$ 亚基是 Ca^{2+} 流阀门处的功能亚基,主要介导 Ca^{2+} 进入心肌细胞,产生 L 型钙通道电流(I_{CaL}),与外向钾电流(I_{to})一起构成动作电位平台期,参与复极过程^[5]。本研究用 RT-PCR 的方法发现房颤犬右房心肌组织 L 型钙通道 $\alpha 1\text{C}$ 亚基 mRNA 表达下降 25.92%,结果导致平台期 I_{CaL} 下降, MAPD、AERP 缩短。L 型钙通道分子重构可能是 I_{CaL} 下降的分子基础^[6]。其发生机制可能是细胞内 Ca^{2+} 超载负反馈机制作用的结果,以抑制细胞内 Ca^{2+} 超载,避免心肌细胞受高浓度 Ca^{2+} 的损伤。

肌浆网 Ca^{2+} -ATP 酶称为钙泵,可将胞浆中的 Ca^{2+} 重新摄取到肌浆网中,对心肌细胞 Ca^{2+} 平衡起重要作用。本研究房颤组右房心肌组织 Ca^{2+} -ATP 酶 mRNA 表达较对照组显著升高,与以往研究结果不同^[7,8]。 Ca^{2+} -ATP 酶 mRNA 表达升高的原因可能为心房肌细胞内 Ca^{2+} 超载。 Ca^{2+} 超载一方面通过负反馈使 L 型钙通道 mRNA 表达下调,细胞 Ca^{2+} 内流减少,另一方面通过正反馈使 Ca^{2+} -ATP 酶 mRNA 表达升高,加强肌浆网对 Ca^{2+} 的摄取,以减轻细胞内 Ca^{2+} 超载的损伤。 Ca^{2+} -ATP 酶 mRNA 反应性上调力图减轻 Ca^{2+} 超载,但在快频率心房刺激持续存在的情况下,心房快速去极化使细胞的收缩时间延长,细胞外 Ca^{2+} 通过 L 型钙通道大量进入胞浆内以及诱导 Ca^{2+} 从肌浆网向胞浆内释放,引起胞浆内 Ca^{2+} 负荷加重, Ca^{2+} 超载持续存在。

总之,房颤时心房肌发生电重构,以 AERP 和 MAPD 缩短和频率适应不良为特征。钙超载是电重构发生的重要环节之一和始动因素。心房肌细胞膜 L 型钙通道、 Ca^{2+} -ATP 酶等钙调蛋白在 mRNA 水平发生变化,是电重构的分子机制之一。MAP 技术可安全用于研究房颤电重构,能提供更准确的电生理改变的信息。

【参考文献】

- [1] Wijffels MC, Kirchhof CJ, Dorland R, *et al.* Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats[J]. *Circulation*, 1995, 92(7):1954-1968.
- [2] Santini M, Pandozi C. Repolarization and refractoriness in patients with persistent atrial fibrillation[J]. *Ann Ist Super Sanita*, 2001, 37(3):435-441.
- [3] Franz MR, Burkhoff D, Spurgeon H, *et al.* *In vitro* validation of a new cardiac catheter technique for recording monophasic action potentials[J]. *Eur Heart J*, 1986, 7(1): 34-41.
- [4] Bode F, Kilborn M, Karasik P, *et al.* The repolarization-excitability relationship in the human right atrium is unaffected by cycle length, recording site and prior arrhythmias[J]. *JACC*, 2001; 37(3): 920-925.
- [5] Yue L, Feng J, Li GR, *et al.* Transient outward and delayed rectifier currents in canine atrium: properties and role of isolation methods[J]. *Am J Physiol*, 1996, 270(6 Pt 2): H1257-H1268.
- [6] Nishida K, Fujiki A, Sakamoto T, *et al.* Bepridil reverses atrial electrical remodeling and L-type calcium channel downregulation in a canine model of persistent atrial tachycardia [J]. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 2007, 18(7):765-772.
- [7] Ohkusa T, Ueyama T, Yamada J, *et al.* Alterations in cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} regulatory proteins in the atrial tissue of patients with chronic atrial fibrillation[J]. *J Am Coll Cardiol*, 1999, 34(1): 255-263.
- [8] Hoit BD, Takeishi Y, Cox MJ, *et al.* Remodeling of the left atrium in pacing-induced atrial cardiomyopathy[J]. *Mol Cell Biochem*, 2002, 238(1-2):145-150.

(收稿日期:2009-01-04; 修回日期:2010-01-09)