

• 基础研究 •

高胆固醇血症家兔心脏单相动作电位及钙电流的特征

高玉玲¹, 马晶¹, 陈玉娟¹, 杨潇洋², 李泱¹

[摘要] 目的 观察高胆固醇血症对家兔心脏单相动作电位及钙电流的影响。方法 24 只家兔分为高胆固醇饮食组和对照组各 12 只, 分别给予高胆固醇饲料和标准饲料饲养 10 周后, 检测血脂、心电图和室颤阈值, 记录离体灌流心脏单相动作电位, 并记录心室肌细胞的 L 型钙通道电流。结果 高胆固醇饮食组兔的血脂水平明显高于对照组 ($P < 0.01$); 室颤阈值 (10.2 ± 1.7) V, 低于对照组的 (13.9 ± 1.3) V ($P < 0.05$); 单相动作电位复极 90% 的时程 (MAPD₉₀) 较对照组延长并呈更明显的逆频率依赖性, 在 1500 ms 起搏时 MAPD₉₀ 为 (348 ± 21) ms, 而对照组为 (271 ± 16) ms; 心室肌细胞的 L 型钙通道电流密度为 (14.7 ± 0.8) pA/pF, 明显高于对照组的 (10.9 ± 1.1) pA/pF ($P < 0.01$)。结论 高胆固醇血症家兔的心脏单相动作电位及心肌细胞 L 型钙通道电流明显改变, 复极时程延长, 室颤阈值降低。

[关键词] 高胆固醇血症; 家兔; 室颤阈值; 单相动作电位; 钙电流

Characteristics of Monophasic Action Potential and Calcium Current of Heart in Rabbit with Hyperlipidemia GAO Yu-ling, MA Jing, CHEN Yu-juan, et al. The Institute of Geriatric Cardiology, the General Hospital of PLA, Beijing 100853, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of hyperlipidemia on monophasic action potential and calcium current of heart in rabbits. **Methods** 24 rabbits were divided into the high cholesterol group (n=12) and control group (n=12) and fed with high cholesterol forage and standard forage respectively for 10 weeks. Electrocardiograph, ventricular fibrillation threshold and the level of serum lipid were examined. Whole-cell patch clamp technique was used to record I_{CaL}. **Results** In high cholesterol group, the serum cholesterol level was higher than the control group ($P < 0.01$), ventricular fibrillation threshold (10.2 ± 1.7 V) lower than that of the control group (13.9 ± 1.3 V) ($P < 0.05$), MAPD₉₀ displayed more significant rate-dependent prolongation. At cycle lengths of 1500 ms, MAPD₉₀ was 358 ± 18 ms in the high cholesterol group, while it was 277 ± 20 ms in the control group. The densities of I_{CaL} were larger in the high cholesterol group (14.7 ± 0.8 pA/pF) than that in the control group (10.9 ± 1.1 pA/pF) ($P < 0.01$). **Conclusion** Hypercholesterolemia can produce cardiac electrical remodeling, including increased I_{CaL}, prolonged repolarization and decreased ventricular fibrillation thresholds.

Key words: hypercholesterolemia; rabbit; ventricular fibrillation threshold; monophasic action potential; calcium current

[中图分类号] R589.2 [文献标识码] A [文章编号] 1006-9771(2006)08-0685-02

[本文著录格式] 高玉玲, 马晶, 陈玉娟, 等. 高胆固醇血症家兔心脏单相动作电位及钙电流的特征[J]. 中国康复理论与实践, 2006, 12(8): 685-686.

循证医学的证据表明, 血浆胆固醇水平的下降能明显降低冠心病的发病率, 减少相关心血管事件的发生。研究显示, 心脏性猝死与高脂血症相关, 因此, 降脂治疗可显著降低室性心律失常和心脏性猝死的发生率^[1,2]。关于高脂血症对心肌电生理的影响及其机制尚存在争议, 部分报道显示高脂血症可能对心肌电生理有直接的影响, 但也有研究者认为高脂血症通过冠状动脉粥样硬化引起心肌缺血导致心律失常^[3,4]。为进一步明确高脂血症是否对心肌的电生理产生影响, 本实验对高脂血症兔的心肌电生理指标进行了初步探讨。

1 材料与方

1.1 实验动物和模型制备 健康家兔 24 只, 体重 2.0 ~ 2.4 kg, 购自解放军总医院实验动物中心。动物适应性饲养 2 周后, 随机分为正常饮食组和高脂饮食组, 每组 12 只。正常饮食组给予标准兔料。高脂饮食组每日给予含 2 g 胆固醇的兔料。动物单笼饲养, 每天进食总量相等 (约 120 g), 饮水不限, 喂满 10 周。

1.2 血脂测定 高脂饲养前与实验第 10 周, 经耳中央动脉采血, 用 AU-1000 型全自动生化分析仪 (Olympus, Japan), 酶法测

定血清总胆固醇 (total cholesterol, TC)、甘油三酯 (triglycerides, TG) 和高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)。

1.3 室颤阈值测定 饲养 10 周后, 戊巴比妥钠 30 mg/kg 静脉麻醉动物, 行气管插管接呼吸机, 开胸暴露心脏并缝制心包吊床, 心电监护, 记录肢体 II 导联心电图。起搏电极由两支针形电极组成 (除针尖外均涂有聚四氟乙烯), 直径 0.3 mm, 两针相距 0.3 cm, 在左心室游离壁同一部位刺入 2 mm 深, 用 GF-99 A 型心脏电生理刺激仪 (开封华南仪器有限公司) 取间断刺激 (100 Hz, 每次持续刺激 1 s), 强度从 1.0 V 开始, 按 0.5 V 递增的方法通过起搏电极刺激心脏, 引起心室颤动的最低强度为室颤阈值。

1.4 离体试验 将心脏快速剪下, 放入 4℃ 台氏液中停搏, 行主动脉插管进行 Langendorff 台氏液灌流。热烙术捣毁房室结和希氏束直到出现缓慢的室性逸搏心律, 周期达 1500 ms 以上。将单相动作电位 (monophasic action potential, MAP) 起搏导管置于左室心尖部记录内膜 MAP, 并依次在 400、800、1000、1200、1500 ms 周期起搏。电极连接 GY-2000B 生物工作站 (开封华南仪器有限公司), 时间参数为 0.1 s, 滤波为 0.5 ~ 1.0 kHz。记录单相动作电位复极 90% 的时程 (MAPD₉₀)。

1.5 单个心室肌细胞分离 动物经戊巴比妥钠 (30 mg/kg) 静脉麻醉, 迅速取心脏, 在 37℃ 和通氧条件下行 Langendorff 灌流。用无 Ca²⁺ 台氏液灌流 3 ~ 5 min, 再用含 I 型胶原酶 16 mg、蛋白酶 E 5.0 mg 和牛血清白蛋白 5.0 mg 的无 Ca²⁺ 台氏液

作者单位: 1. 解放军总医院老年心血管病研究所, 北京市 100853; 2. 中国科学技术大学少年班系, 安徽合肥市 230026。作者简介: 高玉玲 (1963-), 女, 河南洛阳市人, 主管护师, 主要从事老年心血管病护理。通讯作者: 李泱 (1962-), 男, 河北沧州市人, 研究员, 主要从事心脏电生理研究。

40 ml 灌流 35 min 以消化心肌。单个细胞存放于含 0.025 % 牛血清白蛋白和 200 kU/L 氨苄青霉素的台氏液中, 室温保存 1 h。取保存液加于 1 ml 灌流槽中, 待细胞贴壁后, 于倒置显微镜下选择边缘整齐, 表面无颗粒, 横纹清晰, 无收缩的细胞进行实验。

1.6 膜片钳全细胞记录 采用全细胞膜片钳记录方法, 膜片钳放大器 (AXON, USA) 与计算机连接, 刺激信号及电压输入信号的采集均由软件 (Pulse + Pulsefit) 控制。玻璃毛坏 (GG17) 经微电极拉制仪 (Narishige, pp83) 拉制成电阻为 2.5 ~ 3.5 MΩ 的电极。调节三维操纵器进行封接, 使封接电阻达 1 GΩ 以上, 吸破细胞膜形成全细胞记录模式。电容测定时, 施以 0.4 V/s 的斜坡刺激, 测电流并按方程 $C_m = I / (dV/dt)$ 计算。其中 C_m 为膜电容, I 为电流值, dV/dt 即电压斜率。为消除细胞间误差, 电流值以电流密度 (pA/pF) 表示。信号经截止频率为 1 kHz 的四阶贝塞尔低通滤波器, 采样率为 5 kHz。记录 L 型钙通道电流从破膜形成全细胞记录模式稳定 5 min 开始至 20 ~ 25 min 结束, 以防止钙电流衰减。

1.7 诱发 L 型钙通道电流刺激参数的设定 在电压钳方式下, 保持电位 -40 mV, 施以 150 ms 阶跃 10 mV 从 -40 ~ +60 mV 的方波脉冲刺激, 得到一系列不随时间改变的稳态电流。将各电压下的电流密度对相应刺激电位作图, 即得 L 型钙通道电流的 I-V 曲线。

1.8 统计学处理 数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 10.2 统计软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 血脂检测 造模期间, 动物体重渐增, 第 10 周时两组间体重无显著性差异 ($P > 0.05$)。高脂饲养前, 两组间各项血脂指标无显著性差异 ($P > 0.05$); 第 10 周时, 高脂饮食组动物血清 TC、TG 较正常饮食组分别增高约 31.4 倍和 3.3 倍 ($P < 0.01$)。实验期间所有动物的血浆 HDL-C 均保持在正常范围, 无显著性变化 ($P > 0.05$), 见表 1。

表 1 两组动物的血脂检测 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	体重 (kg)		TC (mmol/L)		TG (mmol/L)	
	0 周	12 周	0 周	12 周	0 周	12 周
对照组	2.2 ± 0.2	3.1 ± 0.2	1.2 ± 0.2	1.3 ± 0.1	0.8 ± 0.2	1.0 ± 0.2
高脂饮食组	2.2 ± 0.1	2.7 ± 0.3	1.1 ± 0.3	35.2 ± 3.9 ^a	0.9 ± 0.1	3.4 ± 0.3 ^a

注: a. 与高脂饮食组比较, $P < 0.01$ 。

2.2 心电图及室颤阈值 高脂饮食组兔的心率和 QT 间期与对照组比较无显著性差异 ($P > 0.05$), 但 QTc 间期长于对照组 ($P < 0.05$), 室颤阈值低于对照组 ($P < 0.05$), 见表 2。

表 2 两组动物的心电图和室颤阈值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	心率 (次/min)	QTc 间期 (ms)	室颤阈值 (V)
对照组	180 ± 12	194 ± 17	13.9 ± 1.3
高脂饮食组	197 ± 10	332 ± 16 ^a	10.2 ± 1.7 ^a

注: a. 与正常饮食组比较, $P < 0.05$ 。

2.3 心脏单心动作电位 在 400 ms 起搏时, 高脂饮食组兔的心内膜 MAPD₀ 为 (253 ± 12) ms, 长于正常饮食组的 (205 ± 16) ms ($P < 0.05$)。随着起搏周期的延长, 高脂饮食组兔的心内膜 MAPD₀ 延长较正常饮食组更明显, 在 1500 ms 起搏时, 两组动物分别为 (358 ± 18) ms 和 (277 ± 20) ms (见中插二图 1.1)。

2.4 心肌细胞的 L 型钙通道电流 高脂血症兔心肌细胞的膜电容为 (187 ± 23) pF, 较对照组的 (112 ± 16) pF 明显增加 (P

< 0.01)。保持电位为 0 mV 时, 高脂血症兔心肌细胞 L 型钙通道电流峰值密度为 (14.7 ± 0.8) pA/pF, 对照组为 (10.9 ± 1.1) pA/pF, 两者有非常显著性差异 ($P < 0.01$) (见中插二图 1.2)。从 I-V 曲线可见, 高脂血症组兔心脏的 L 型钙通道电流在各个电压下均有降低, 其中以峰值时降低最为明显, 但不改变峰值的位置 (0 mV) 和形状特征 (见中插二图 1.3)。

3 讨论

实验显示, 长期的高脂血症可延长心肌细胞的复极时程, 这可能是本实验中高脂饮食组室颤阈值更低的电生理基础。复极延缓是心肌细胞膜上外向离子电流减少或/和内向离子电流增加的结果。已有报道显示, 高脂血症兔心肌细胞上的钙电流增加^[4], 与本实验高脂血症兔心肌复极延缓与之相符。本实验还显示, 随着起搏周期的延长, 高脂血症兔的复极时程延长更明显, 显示出逆频率依赖性。高脂血症对心肌细胞电生理的直接影响机制可能如下: ①改变细胞膜的流动性, 影响细胞膜上酶的活性, 如钙镁 ATP 酶; ②高脂血症造成脂肪酸成分以及血栓素 A₂ 和前列环素之间的平衡改变, 这些物质均可对心肌细胞的电生理产生直接的影响; ③胆固醇可对心肌细胞膜上的离子通道产生直接影响^[5-7]。

心肌细胞缺血后, 细胞的 L 型钙通道电流幅值减小^[8,9], 对上述临床现象和本实验结果的合理解释是, 高胆固醇血症可影响心肌细胞电活动。本实验结果显示, 高胆固醇血症可影响心肌细胞的电重塑, 提示降脂治疗减少冠心病患者猝死的机制可能与逆转高胆固醇血症所产生的电重塑有一定关系。

[参考文献]

[1] Burke AP, Farb A, Malcom GT, et al. Coronary risk factors and plaque morphology in men with coronary disease who died suddenly [J]. N Engl J Med, 1997, 336: 1276-1282.

[2] Mehta D, Curwin J, Gomes JA, et al. Sudden death in coronary artery disease: acute ischemia versus myocardial substrate [J]. Circulation, 1997, 96: 3215-3223.

[3] De Sutter J, Tavernier R, De Buyzere M, et al. Lipid lowering drugs and recurrences of life-threatening ventricular arrhythmias in high-risk patients [J]. J Am Coll Cardiol, 2000, 36: 766-772.

[4] Liu YB, Wu CC, Lu LS, et al. Sympathetic nerve sprouting, electrical remodeling, and increased vulnerability to ventricular fibrillation in hypercholesterolemic rabbits [J]. Circ Res, 2003, 92: 1145-1152.

[5] Charnock JS, McLennan PL, Abeywardena MY. Dietary modulation of lipid metabolism and mechanical performance of the heart [J]. Mol Cell Biochem, 1992, 116: 19-25.

[6] Kang JX, Leaf A. Evidence that free polyunsaturated fatty acids modify Na⁺ channels by directly binding to the channel proteins [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 3542-3546.

[7] Kutryk MJ, Pierce GN. Stimulation of sodium-calcium exchange by cholesterol incorporation into isolated cardiac sarcolemmal vesicles [J]. J Biol Chem, 1988, 263: 13167-13172.

[8] Li X, Huang CX, Jiang H, et al. The beta-adrenergic blocker carvedilol restores L-type calcium current in a myocardial infarction model of rabbit [J]. Chin Med J (Engl), 2005, 118: 377-382.

[9] LaMonte MJ, Fitz-Gerald SJ, Church TS, et al. Coronary artery calcium score and coronary heart disease events in a large cohort of asymptomatic men and women [J]. Am J Epidemiol, 2005, 162: 421-429.

(收稿日期: 2006-04-10)

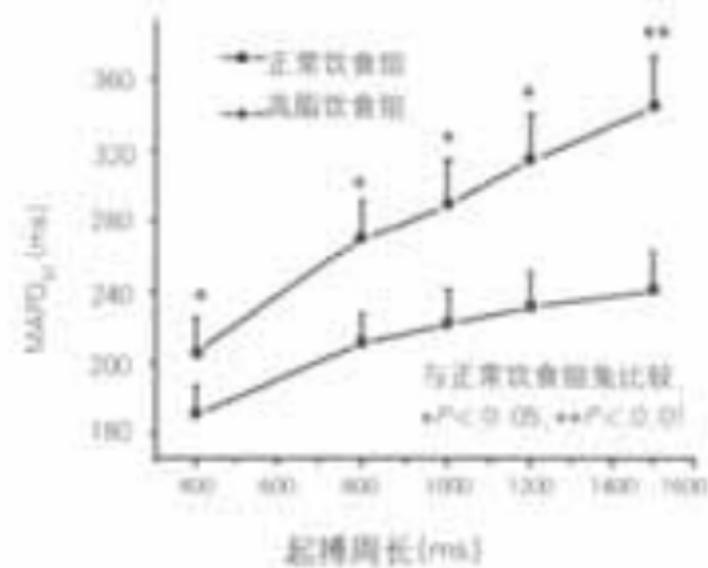


图 1.1 不同起搏周长下两组家兔心脏 MAPD₅₀

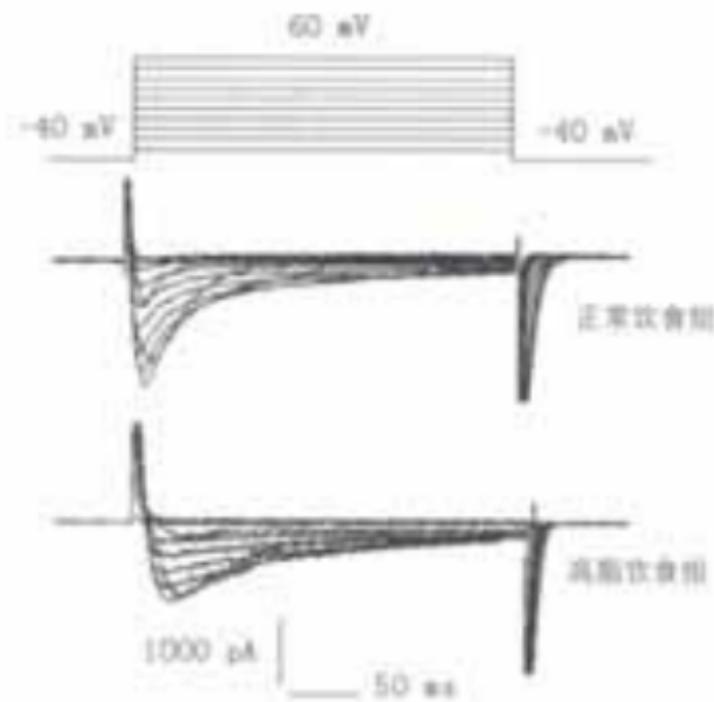


图 1.2 两组家兔心室肌细胞的 L-钙电流

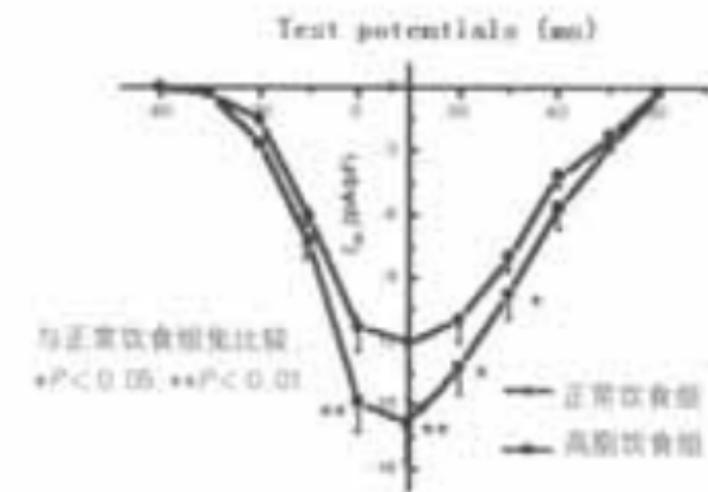


图 1.3 两组家兔心室肌细胞的 L-钙电流的 I-V 曲线