

咪达普利对扩张型心肌病钙电流的跨室壁不均一性的影响

李 泱^{1*}, 邱 萍¹, 王 琳¹, 王士雯¹, 钟江华², 张存泰², 陆再英²(1. 解放军总医院老年心血管病研究所, 北京 100853; 2. 华中科技大学
附属同济医院心内科, 湖北 武汉 430030)

摘要: 目的 揭示咪达普利(imidapril)抑制扩张型心肌病(DCM)患者发生室性心律失常的机制。方法 用多柔比星制备家兔 DCM 模型,咪达普利 1.25 mg·kg⁻¹·d⁻¹ po, 连续 8 周进行干预。取心脏分离左室游离壁三层心肌细胞,全细胞膜片钳技术记录 L-型钙电流(I_{Ca-L})。结果 由于 DCM 模型心肌细胞的膜电容增加,所以 I_{Ca-L} 密度明显减少,心外膜下心肌、中层心肌和心内膜下心肌分别为(6.7 ± 1.0), (10.6 ± 0.5)和(7.4 ± 0.7) pA·pF⁻¹,各层细胞间电流密度差异加大。咪达普利处理后可逆转心肌的病变, I_{Ca-L} 的密度明显高于 DCM 组($P < 0.05$),心外膜下心肌、中层心肌和心内膜下心肌分别为(10.3 ± 1.0), (12.7 ± 0.6)和(11.1 ± 1.6) pA·pF⁻¹,使三层细胞间电流密度差异减小。结论 咪达普利可逆转 DCM 后心肌细胞 I_{Ca-L} 的改变,减少跨室壁差异。提示可能是其减少 DCM 后发生快速心律失常的机制之一。

关键词: 咪达普利; 心肌病, 充血性; 心肌; 钙通道; 膜片钳技术, 全细胞

中图分类号: R972

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2004)03-0194-05

扩张型心肌病(dilated cardiomyopathy, DCM)易诱发心律失常甚至导致猝死^[1]。有证据表明,在 DCM 时三层心肌细胞电生理发生明显改变,使心肌细胞电异质性增加,而 L-型钙电流(I_{Ca-L})在跨室

壁复极异质性的形成方面起着重要的作用^[2,3]。长期口服血管紧张素转换酶抑制剂不仅能改善 DCM 患者的症状,还可抑制 DCM 患者室性心律失常的发生,降低猝死的危险发生^[4]。本实验通过应用咪达普利(imidapril, Imi)干预家兔的 DCM 模型,探讨其对 DCM 动物左心室跨室壁 I_{Ca-L} 分布异质性的影响,以期揭示 Imi 抑制 DCM 患者发生室性心律失常的机制。

1 材料和方法

1.1 试剂与溶液

I 型胶原酶、蛋白酶 E、牛血清白蛋白、MgATP、HEPES, CaCl₂, Na₂ATP, CsCl、硝苯地平(nifedipine, Nif)均为 Sigma 产品; EGTA 购自 Fluka Biochemika Co.; 河鲀毒素(tetrodotoxin, TTX)为河北水产研究所产品,其他试剂均为国产分析纯。

台氏液成分(mmol·L⁻¹): NaCl 135, KCl 5.4, CaCl₂ 1.8, MgCl₂ 1, NaH₂PO₄ 0.33, HEPES 10, 葡萄糖 10, 用 NaOH 调 pH 至 7.4; 无 Ca²⁺ 台氏液和 0.2 mmol·L⁻¹ Ca²⁺ 的台氏液分别为台氏液中不加 CaCl₂ 或仅加 0.2 mmol·L⁻¹ CaCl₂。

测定 Ca²⁺ 电流的电极内液(mmol·L⁻¹): CsCl 120, CaCl₂ 1, MgCl₂ 5, Na₂ATP 5, EGTA 11, HEPES 10, 葡萄糖 11; 用 CsOH 调 pH 至 7.3; 细胞外液用台氏液并加 50 μmol·L⁻¹ 的 TTX 阻断钠电流(I_{Na})。

1.2 模型的制备

健康家兔 30 只(由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供), 体重 1.5 ~ 2.0 kg, 雌雄不限, 按体重随机分成 3 组, 每组 10 只。DCM 组: 依照文献^[5]报道将盐酸多柔比星(doxorubicin)注射剂(上海华联制药厂生产, 批号 010201)按 1.0 mg·kg⁻¹ 经兔耳缘静脉注射, 每周 2 次, 连续 8 周; Imi + DCM 组: 模型制备同 DCM 组, 同时口服 Imi 片(天津田边制药有限公司生产, 批号 0102001)1.25 mg·kg⁻¹·d⁻¹, 连续 8 周; 正常对照组: 经兔耳缘静脉注射与多柔比

收稿日期: 2003-07-21 接受日期: 2004-01-08

作者简介: 李 泱(1962-), 男, 河北省沧州人, 副主任医师, 医学博士, 主要从事心血管药理研究; 王士雯(1933-), 女, 山东省峰县人, 教授, 中国工程院院士, 博士生导师, 主要从事老年心脏病学与老年急救医学。

* 联系作者 E-mail: liyang40@hotmail.com Tel: (010) 66936762

星等量的生理盐水,连续8周。

1.3 心脏特征指数的测定

8周后动物取心脏称全心重、左室重、体重,测量左、右心室腔内径,测左、右心室壁厚。计算心重/体重指数。

1.4 左心室游离壁三层心肌单个细胞分离

8周后,采用文献报道的酶解法制备家兔左心室三层肌单细胞^[6]。兔经戊巴比妥钠($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, iv)麻醉,迅速取其心脏,在 37°C 和通氧条件下行 Langendorff 灌流。用无 Ca^{2+} 台氏液灌流 $3 \sim 5 \text{ min}$,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 Ca^{2+} 台氏液灌流 (40 mL) 10 min 以消化心肌。除心房,取左室游离壁,用剃须刀平行于心室游离壁分别切取心外膜下肌条和心内膜下肌条,余下部分为中层心肌,将上述三层心肌切碎并分别置于含有上述双酶的无 Ca^{2+} 台氏液中灌流,继续消化 $10 \sim 15 \text{ min}$,取上清液,即可分别获得三层心肌单个细胞。将细胞存放于含 0.025% 牛血清白蛋白和 $200 \text{ kU} \cdot \text{L}^{-1}$ 氨苄西林的台氏液中,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,在 37°C 下进行实验。

另取健康家兔,按上述方法分离左心室游离壁三层心肌单个细胞,以备观察 Imi 直接作用。

1.5 通道电流的记录

采用全细胞膜片钳记录方法,膜片钳放大器 (HEKA, Germany) 与计算机连接。刺激信号及电压输入信号的采集均由软件 (Pslue + Psluefit) 控制。玻璃毛坏 (GG-17) 经微电极控制仪 (Narishige, pp-83) 拉制成电阻为 $2.5 \sim 3.5 \text{ M}\Omega$ 的电极。调节三维操纵器进行封接,使封接电阻达 $1 \text{ G}\Omega$ 以上,吸破细胞膜形成全细胞记录模式。电容测定时,施以 $0.4 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$ 的

斜坡刺激,测电流并按方程 $C_m = I / (dV \cdot dt^{-1})$ 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 ($\text{pA} \cdot \text{pF}^{-1}$) 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 。

1.6 数据处理

测量结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计分析用 t 检验。

2 结果

2.1 心脏特征指标的改变

DCM 组与对照组相比,心重/体重指数增加,左右心室腔内径增大,左右心室壁变薄,而 Imi 可明显逆转上述改变,对 DCM 家兔则能明显降低心重/体重、增加左右室壁厚度,缩小左右室腔内径,改善 DCM 心室重构(表 1)。

2.2 三层心肌单细胞 $I_{\text{Ca-L}}$ 的改变及咪达普利的影响

保持电位 -40 mV , 施予 150 ms , 阶跃为 10 mV , $-30 \text{ mV} \sim +50 \text{ mV}$ 的系列去极化脉冲,可记录到一缓慢失活的内向电流,该电流被 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Nif 阻断。DCM 组心肌细胞的 $I_{\text{Ca-L}}$ 电流幅值增加,但由于细胞膜电容增大使得心肌细胞上 $I_{\text{Ca-L}}$ 密度明显减少(图 1)。以各激活电位下电流密度对相应电位作图得 $I-V$ 曲线,与对照组相比 DCM 使峰值附近的电流降低较为明显,从而改变钙电流 $I-V$ 曲线的形状(图 2)。将测试电压为 $+10 \text{ mV}$ 时三组心室肌细胞上的 $I_{\text{Ca-L}}$ 密度进行统计,可见在 DCM 组三层心肌的 $I_{\text{Ca-L}}$ 密度均减小,而应用 Imi 后这种改变得到纠正(表 2)。

2.3 三层心肌单细胞 $I_{\text{Ca-L}}$ 稳态激活曲线的改变及咪达普利的影响

按上述刺激模式引出 $I_{\text{Ca-L}}$ 电流,标准化各电流

Tab 1. Effect of imidapril (Imi) on the characteristics of rabbit hearts with dilated cardiomyopathy (DCM)

Group	HW/BW / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	TLVW / mm	IDLVC / mm	TRVW / mm	IDRVC / mm	CMC / pF
Control	2.76 ± 0.15	5.84 ± 0.48	5.60 ± 0.40	2.34 ± 0.18	0.95 ± 0.20	154 ± 12
DCM	$2.95 \pm 0.11^*$	$5.21 \pm 0.36^*$	$7.15 \pm 0.52^{**}$	$2.08 \pm 0.20^*$	$1.20 \pm 0.16^*$	$213 \pm 21^{**}$
Imi + DCM	$2.81 \pm 0.12^\#$	$5.76 \pm 0.46^\#$	$6.18 \pm 0.54^\#\#$	$2.32 \pm 0.22^\#$	$1.01 \pm 0.14^\#$	$168 \pm 15^\#\#$

DCM model in rabbit was induced with doxorubicin $1.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, iv, twice a week for 8 weeks. Imidapril $1.25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ was orally administered at the same time. HW/BW: heart weight/body weight. TLVW: thickness of left ventricular wall. IDLVC: inside diameter of left ventricular cavity. TRVW: thickness of right ventricular wall. IDRVC: inside diameter of right ventricular cavity. CMC: cell membrane capacitance. $\bar{x} \pm s$, $n = 10$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, compared with DCM group.

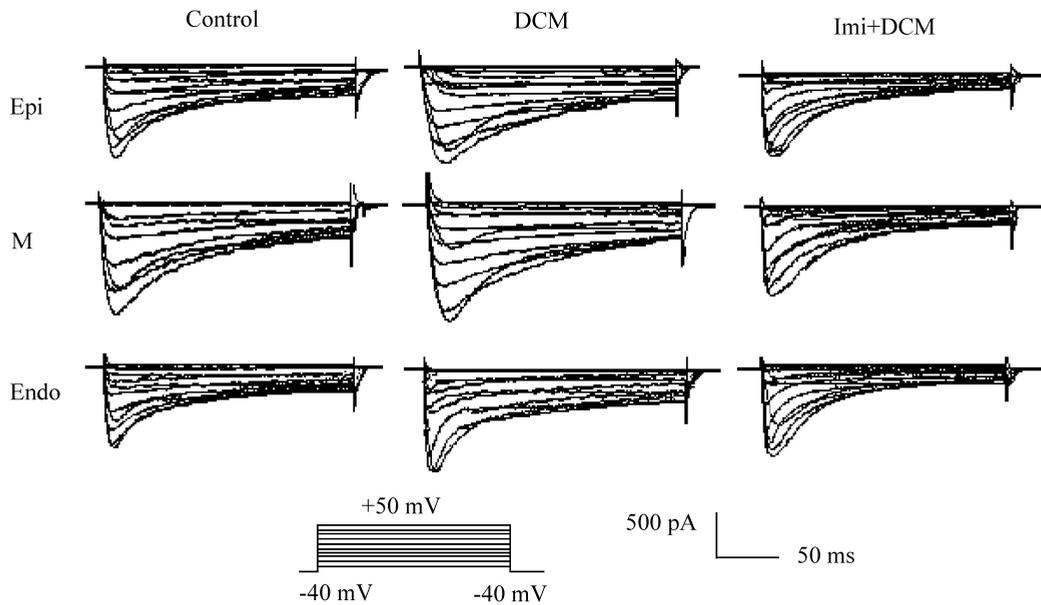


Fig 1. I_{Ca-L} of left ventricular myocytes in three groups. See Tab 1 for rabbit treatments. The cells were depolarized from a holding potential of -40 mV, subsequently, to different test potentials with a 10 mV step from -30 mV to $+50$ mV with the 150 ms pulses. The typical I_{Ca-L} tracings from subepicardium(Epi), midmyocardium(M) and subendocardium(Endo) in three groups were showed.

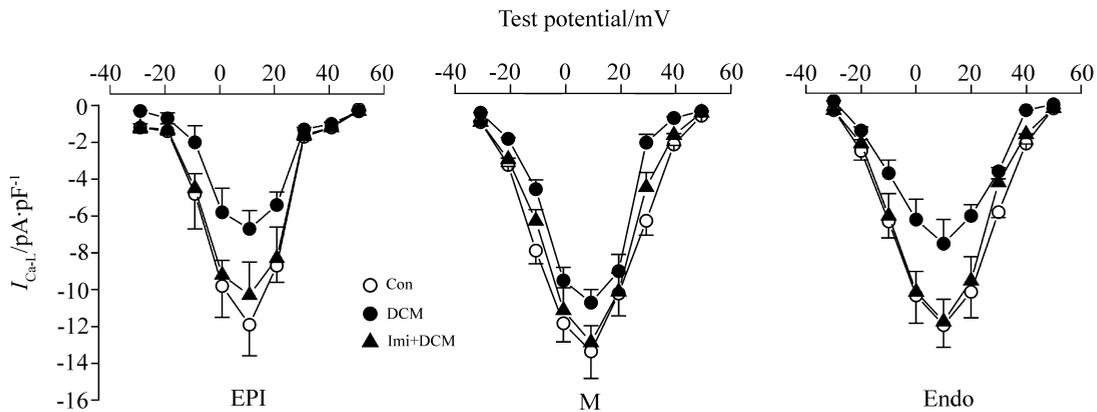


Fig 2. $I-V$ curves of I_{Ca-L} of left ventricular myocytes in three groups. See Tab 1 for rabbit treatments. The average density of I_{Ca-L} in DCM cells was significantly different from those of control and Imi treated cells. $\bar{x} \pm s$, $n = 15$.

Tab 2. Densities of myocyte I_{Ca-L} in three layers of left ventricular free wall in three groups

Group	$I_{Ca-L}/pA \cdot pF^{-1}$		
	Epi	M	Endo
Control	11.9 ± 1.6	13.2 ± 1.4	11.9 ± 1.3
DCM	$6.7 \pm 1.0^{**}$	$10.6 \pm 0.5^{**}$	$7.4 \pm 0.7^{**}$
Imi + DCM	$10.3 \pm 1.0^{##}$	$12.7 \pm 0.6^{##}$	$11.1 \pm 1.6^{##}$

See Tab 1 for rabbit treatments. Test potential $+10$ mV. $\bar{x} \pm s$, $n = 15$. $^{**} P < 0.01$, compared with control group; $^{##} P < 0.01$, compared with DCM group.

曲线,并用 Boltzmann 方程 $[I/I_{max} = 1/[1 + \exp[(V_{1/2} - V_m)/k]]]$ 进行曲线拟合,求出半激活电压($V_{1/2}$)和斜率(k)。结果发现三组各层心肌细胞间 I_{Ca-L} 的稳态激活曲线无明显差异, $V_{1/2}$ 和 k 无明显不同 ($n = 15$, $P > 0.05$),提示病理心肌细胞 I_{Ca-L} 通道的激活基本不发生改变,Imi 也不影响 I_{Ca-L} 通道的激活过程。

2.4 三层心肌单细胞 I_{Ca-L} 稳态失活曲线的改变及咪达普利的影响

保持电位 -40 mV, 施予 1000 ms, 阶跃为 10 mV, -30 mV \sim $+50$ mV 的系列去极化脉冲在每一条条件脉冲后紧跟一固定去极化至 0 mV, 150 ms 的测

幅值,以相对电流密度对各膜电位作图得稳态激活

动脉脉冲,记录 I_{Ca-L} , 标准化各电流幅值,以相对电流密度对各膜电位作图得稳态失活曲线。用 Boltzmann 方程进行曲线拟合求出半失活电压($V_{1/2}$)和曲线斜率(k)。结果发现在三组各层心肌细胞 I_{Ca-L} 的失活曲线无明显不同, $V_{1/2}$ 和 k 值无显著差异($n = 10, P > 0.05$), Imi 对 I_{Ca-L} 通道的失活过程影响不大。

2.5 三层心肌单细胞 I_{Ca-L} 复活曲线的改变及咪达普利的影响

保持电位 -40mV , 给予 0mV , 150ms 的去极化脉冲, 分别间隔 $20, 40, 80, 160, 320, 640, 1280, 2560\text{ms}$ 后再施予第二次 0mV , 150ms 的方波刺激, 将第二次方波脉冲引出的电流与条件刺激电流相比, 求出复活曲线的时间常数(τ)值。结果发现 I_{Ca-L} 复活曲线的 τ 值在三组的三层心肌细胞间无明显差异($n = 15, P > 0.05$), 即 DCM 的心肌细胞 I_{Ca-L} 通道失活后复活未受到影响, Imi 虽然对 I_{Ca-L} 通道的失活后复活有一定的作用, 但无统计学意义。

2.6 咪达普利对三层心肌单细胞 I_{Ca-L} 的直接作用

另取未经 DCM 模型制备的正常家兔, 分离左心室游离壁三层心肌细胞。保持电位 -40mV , 施予 150ms , 阶跃为 10mV , $-30\text{mV} \sim +50\text{mV}$ 的系列去极化脉冲, 记录 I_{Ca-L} 。在 $+10\text{mV}$ 时心外膜下心肌、中层心肌和心内膜下心肌的 I_{Ca-L} 密度用药前分别为 $(7.2 \pm 0.8), (11.8 \pm 0.4)$ 和 $(7.4 \pm 0.5)\text{pA} \cdot \text{pF}^{-1}$, 于细胞外液直接加入终浓度为 $100\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Imi 后, 分别为 $(7.0 \pm 0.4), (11.5 \pm 1.0)$ 和 $(7.2 \pm 0.3)\text{pA} \cdot \text{pF}^{-1}$, 接入 $300\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Imi 后, 分别为 $(7.1 \pm 0.6), (11.5 \pm 0.5)$ 和 $(7.0 \pm 0.2)\text{pA} \cdot \text{pF}^{-1}$, 结果显示 I_{Ca-L} 在给药前后基本无变化($n = 7, P > 0.05$), 提示 Imi 对正常心肌细胞 I_{Ca-L} 直接作用较小。

3 讨论

临床上 DCM 常伴有快速室性心律失常, 易发生心源性猝死。研究发现 DCM 的室颤阈值较正常明显降低。DCM 时心肌细胞过度伸展且异常生长, 导致心肌重构, 各种神经内分泌激素特别是血管紧张素 II 浓度增高^[7], 这些异常的病理生理过程使心肌电生理发生改变。

本实验结果提示兔 DCM 三层心肌细胞的 I_{Ca-L} 幅值虽然增加, 但用细胞膜电容标准化后, 电流密度明显降低, 其中以心外膜下心肌细胞降低最为显著。

对 L 型钙通道的电压依赖性激活、失活降低和恢复等门控机制的研究发现, 在 DCM 模型中 L 型钙通道门控动力学机制并未改变, Imi 对于 L 型钙通道门控机制也无明显影响。提示 DCM 模型中 I_{Ca-L} 的改变并非通道本身的特征变化, 而可能是通道蛋白的密度减少, 从而导致电流密度降低。并且由于三层心肌细胞 L 型钙通道蛋白密度下降不均匀导致 I_{Ca-L} 的密度降低幅度呈现出差异性, 进一步造成跨室壁复极异质性增加, 易诱发后除极和壁内折返而发生心律失常^[8,9]。

传统抗心律失常药物虽然能有效地减少 DCM 伴室性心律失常的发生, 但许多研究认为, 大多传统的抗心律失常药并不能保护 DCM 病人免于心源性猝死, 甚至由于这类药物可以导致新的心律失常而增加猝死率^[10]。

本实验结果显示, Imi 处理组 I_{Ca-L} 的密度明显高于 DCM 模型组, 且与正常对照组相比无明显差异, 提示 Imi 能逆转 DCM 后心肌细胞 I_{Ca-L} 的异常改变。Imi 是新一代血管紧张素 II 转换酶抑制剂, 从本实验结果可见, 该药物对于三层心肌的 I_{Ca-L} 均无直接作用, 提示 Imi 抑制 DCM 心律失常的作用可能是间接的, 它可能主要通过阻滞血管紧张素 II 转换酶的作用, 减少血液中和心肌细胞局部血管紧张素 II 水平, 逆转 DCM 心肌细胞的组织重构, 从而减少跨室壁复极异质性, 发挥间接抗心律失常作用^[11,12]。这也可能是其降低 DCM 伴快速室性心律失常猝死的原因之一。

4 参考文献:

- [1] Aiba T, Inagaki M, Shimizu W, Matsuo K, Taguchi A, Suyama K, *et al.* Recovery time dispersion measured from 87-lead body surface potential mapping as a predictor of sustained ventricular tachycardia in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy [J]. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 2000, **11**(9):968-974.
- [2] Adachi K, Ohnishi Y, Shima T, Yamashiro K, Takei A, Tamura N, *et al.* Determinant of microvolt-level T-wave alternans in patients with dilated cardiomyopathy [J]. *Am Coll Cardiol*, 1999, **34**(2):374-380.
- [3] Roden DM. Early after-depolarizations and torsade de pointes: implications for the control of cardiac arrhythmias by prolonging repolarization [J]. *Eur Heart J*, 1993, **14** (Suppl H):56-61.
- [4] Spinale FG, Holzgrefe HH, Mukherjee R, Hird RB, Walker JD, Amim-Barker A, *et al.* Angiotensin-converting en-

- zyme inhibition and the progression of congestive cardiomyopathy. Effects on left ventricular and myocyte structure and function[J]. *Circulation*, 1995, **92**(3):562 – 578.
- [5] Deroubaix E, Thuringer D, Coulombe A, Mercadier JJ, Coraboeuf E. Dilation and action potential lengthening in cardiomyopathic Syrian hamster heart[J]. *Basic Res Cardiol*, 1999, **94**(4):274 – 283.
- [6] Dinerman JL, Berger R, Haigney MC, Lawrence JH, Tomaselli GF, Calkins H. Dispersion of ventricular activation and refractoriness in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy[J]. *Am J Cardiol*, 1997, **79**(7):970 – 974.
- [7] Brachmann J, Hilbel T, Grunig E, Benz A, Haass M, Kubler W. Ventricular arrhythmias in dilated cardiomyopathy[J]. *Pacing Clin Electrophysiol*, 1997, **20**(10 Pt 2):2714 – 2718.
- [8] Lodge NJ, Normandin DE. Alterations in Ito1, IKr and Ik1 density in the BIO TO-2 strain of Syrian myopathic hamsters [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1997, **29**(12):3211 – 3221.
- [9] Stankovicova T, Szilard M, De Scheerder I, Sipido KR. M cells and transmural heterogeneity of action potential configuration in myocytes from the left ventricular wall of the pig heart[J]. *Cardiovasc Res*, 2000, **45**(4):952 – 960.
- [10] Hilleman DE, Bauman AL. Role of antiarrhythmic therapy in patients at risk for sudden cardiac death; an evidence-based review[J]. *Pharmacotherapy*, 2001, **21**(5):556 – 575.
- [11] Matsui S, Fu M, Hayase M, Katsuda T, Yamaguchi N, Teraoka K, et al. Beneficial effect of angiotensin-converting enzyme inhibitor on dilated cardiomyopathy induced by autoimmune mechanism against beta1-adrenoceptor [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2000, **36**(Suppl 2):S43 – S48.
- [12] Ansalone G, Giannantoni P, Santini M. The stratification and prevention of the arrhythmia risk in nonischemic dilated cardiomyopathy G [J]. *G Ital Cardiol*, 1998, **28**(11):1288 – 1302.

Effect of imidapril on transmural variations of calcium current of ventricular myocytes in rabbits with dilated cardiomyopathy

LI Yang^{1*}, QIU Ping¹, WANG Lin¹, WANG Shi-Wen¹, ZHONG Jiang-Hua², ZHANG Cun-Tai², LU Zai-Ying²
(1. Institute of Geriatric Cardiology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China; 2. Department of Cardiology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract: **AIM** To explore the mechanism of imidapril inhibition on ventricular arrhythmia in patients with dilated cardiomyopathy (DCM). **METHODS** DCM model in rabbits was induced with doxorubicin, and imidapril 1.25 mg·kg⁻¹·d⁻¹ was orally administered for 8 weeks. Subendocardium (Endo), midmyocardium (M) and subepicardium (Epi) were isolated from the left ventricular free wall in rabbits. I_{Ca-L} was recorded with whole-cell patch clamp technique. **RESULTS** With the increment of cellular membrane capacitance in DCM cells, I_{Ca-L} densities decreased markedly. The average I_{Ca-L} densities of Epi, M and Endo in DCM cells were (6.7 ± 1.0), (10.6 ± 0.5) and (7.4 ± 0.7) pA·pF⁻¹. The difference of I_{Ca-L} densities from three

layer cells was obviously increased. After treatment with imidapril, the I_{Ca-L} densities of Epi, M and Endo increased to (10.3 ± 1.0), (12.7 ± 0.6) and (11.1 ± 1.6) pA·pF⁻¹. Furthermore, the diversity of I_{Ca-L} densities of Epi, M and Endo was reduced. **CONCLUSION** Imidapril can decrease transmural variations of calcium current of ventricular in rabbits of DCM, which may be one of the mechanisms of antiarrhythmias.

Key words: imidapril; cardiomyopathy, congestive; myocardium; calcium channels; patch clamp technique, whole-cell

* Corresponding author.