

一种新的钠-钙交换电流记录方法及阿米洛利的作用

梁 勇, 张雅兰, 王晓良*

(中国医学科学院·中国协和医科大学药物研究所, 北京 100050)

摘要 目的: 研究胞外不同 Ca^{2+} 浓度对豚鼠心室肌细胞钠-钙交换电流 (Na^+ - Ca^{2+} exchange current, $I_{\text{Nr-Ca}}$) 的影响和阿米洛利 (amiloride) 对该电流的作用。方法: 建立缺血再灌时胞内 Na^+ 超载的细胞模型, 用膜片钳全细胞技术, 记录 $I_{\text{Nr-Ca}}$ 的电流-电压关系曲线。结果: 阿米洛利 10^{-5} , 3×10^{-5} 和 $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 在 $+50 \text{ mV}$ 时, 对 $I_{\text{Nr-Ca}}$ 的抑制率分别是 15.4%, 22.6% 和 40.9%; 在 -80 mV 时抑制率分别是 5.6%, 14.6% 和 23.2%。结论: 胞内 Na^+ 超载可引起 Na^+ - Ca^{2+} 交换系统激活; 阿米洛利对豚鼠心室肌细胞 $I_{\text{Nr-Ca}}$ 有抑制作用, 且对 $I_{\text{Nr-Ca}}$ 外向成分的抑制作用大于对内成分成分的抑制作用。

关键词 Na^+ - Ca^{2+} 交换电流; 阿米洛利; 心室肌细胞; 膜片钳

Na^+ - Ca^{2+} 交换系统作为调节细胞钙转运的重要机制之一已经受到广泛的重视。胞内 Ca^{2+} 作为重要的第二信使存在于许多细胞中, 而这些细胞上都有大量的 Na^+ - Ca^{2+} 交换体, 尤以哺乳动物心肌细胞中含量最多, 平均约有 250 个交换体 (μm^2)⁻¹, 转换率达 2500 次 $\cdot \text{s}^{-1}$ [1]。心肌细胞通过 Na^+ - Ca^{2+} 交换可以排出由于 Ca^{2+} 通道开放进入细胞的大量 Ca^{2+} , 调节胞内 Ca^{2+} 浓度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$); 通过 Na^+ - Ca^{2+} 交换反向转运进入细胞的少量的 Ca^{2+} , 可以触发肌浆网释放大量的 Ca^{2+} (即钙诱导的钙释放, CICR), 产生兴奋-收缩耦联[2]; 以 3 Na^+ : 1 Ca^{2+} 进行交换的 Na^+ - Ca^{2+} 交换体可以产生 Na^+ - Ca^{2+} 交换电流 ($I_{\text{Nr-Ca}}$), $I_{\text{Nr-Ca}}$ 与心肌细胞动作电位的形成和心律失常的产生有关[3]。

在心肌缺血再灌注损伤中, $I_{\text{Nr-Ca}}$ 有至关重要的作用。有关心肌缺血再灌注损伤的发生机制有很多假说, 但都离不开胞内 Ca^{2+} 超载这一重要环节, 而在缺血再灌时, 外向的 $I_{\text{Nr-Ca}}$ 与胞内 Ca^{2+} 超载的关系密不可分。长期以来, 由于缺乏有效的能直接记录到类似缺血再灌时明显增大的外向 $I_{\text{Nr-Ca}}$ 的方法, 临床上至今还没有一种能有效地作用于外向 $I_{\text{Nr-Ca}}$ 的药物。本实验, 通过增加电极内液中 Na^+ 浓度, 建立缺血再灌时胞内 Na^+ 超载的细胞模型, 研究胞内

Na^+ 超载引起的 $I_{\text{Nr-Ca}}$ 的改变。同时, 我们还观察了胞外不同 Ca^{2+} 浓度和 Na^+ - H^+ 交换抑制剂——阿米洛利 (amiloride) 对豚鼠心室肌细胞 $I_{\text{Nr-Ca}}$ 的作用。

材 料 与 方 法

细胞制备 δ 豚鼠, 体重 250 ~ 280 g, 击昏, 颈动脉放血后, 迅速开胸, 取出心脏, 在 4 °C 无钙液中去脂肪及心包膜, 进行 Langendorff 灌流。用无钙液经主动脉逆行灌流 6 min, 再用含链霉蛋白酶 E (pronase, E. Merck) $0.1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, 牛血清白蛋白 (BSA, Sigma) $0.5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, $[\text{Ca}^{2+}]$ 为 $0.15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的无钙液灌流 2 min。整个灌流过程中压力维持在约 70 cm 水柱, 37 °C 恒温, 持续通 95% O_2 和 5% CO_2 混合气。将心肌剪碎, 用酶液 37 °C 温孵搅拌 5 ~ 10 min, 倒出上清液, 用无钙液稀释 5 倍, 其中含 BSA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, $[\text{Ca}^{2+}]$ 为 $1.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 室温下静置 1 h 备用。

药品与溶液 阿米洛利 (amiloride)、氯化镍 (NiCl_2)、氯化铯 (CsCl)、氢氧化铯 (CsOH)、维拉帕米 (verapamil)、氯化钡 (BaCl_2)、氯化钙 (CaCl_2)、哇巴因 (ouabain)、牛磺酸 (taurine), 均为美国 Sigma 公司产品; 其余试剂均为国产分析纯。无钙液成分 ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$): NaCl 90, KCl 10, KH_2PO_4 1.2, MgSO_4 5, NaHCO_3 15, taurine 30, glucose 20, pH 7.4; 台氏液成分 ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$): NaCl 140, MgCl_2 2.0, Hepes 5, glucose 10, CaCl_2 1.8, 用 CsOH 调至

收稿日期: 1998-07-16

基金项目: 国家杰出青年科学基金资助项目 (39425014)

* 联系人 Tel: (010) 63165193, Fax: (010) 63017757,

E-mail: wangxie@public.bta.net.cn

pH 7.4; 记录电流的电极内液 ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$): NaCl 15, EGTA 42, CaCl_2 29, MgCl_2 13, Aspartic acid 42, TEA 20, Hepes 5, Na_2ATP 5, 用 CsOH 调至 pH 7.4。为了减少其它电流成分的干扰, 实验时细胞外液中加入: ouabain $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 阻断 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ 泵, BaCl_2 $1 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 CsCl $2 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 阻断钾通道, verapamil $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 阻断 L-型钙通道。电极内液中 $20 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 TEA 可以阻断钾通道; 高浓度的 EGTA 和 CaCl_2 根据 Fabiato & Fabiato 公式计算得游离 Ca^{2+} 浓度为 $153 \text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ [4]。

全细胞记录 选取横纹清晰、膜良好的细胞进行实验。细胞池体积约 1 ml, 平放在连有微操纵器 (MO-303, Narishige Co., Japan) 的倒置显微镜 (Olympus IMT-2, Japan) 上, 取几滴细胞悬液加入细胞池中, 静置 5 min 使细胞充分贴壁后, 用台氏液灌流, 速度约为 $1 \sim 2 \text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ 。电极用玻璃毛细管 (中国科学院上海脑研究所) 经微电极拉制仪 (PB-7 Narishige Co., Japan) 分两步控制, 充灌电极液后电阻为 $1 \sim 3 \text{M}\Omega$ 。全细胞记录过程中, 刺激脉冲的产生和信号采集均由 pCLAMP 5.5.1 软件 (Axon Instrument, USA) 完成, 离子电流通过膜片钳放大器 (L/M EPC-7, Germany) 放大, 经 AD/DA 转换板 (Axon TL-1, USA) 输入 IBM-PC 机硬盘中。记录 $I_{\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}}$ 时, 细胞钳制在 -40mV , 给予从 $+60 \text{mV}$ 复极化至 -100mV , 速度为 $80 \text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$ 持续 2 s 的斜坡

脉冲。所有实验均在 $32 \sim 35 \text{ }^\circ\text{C}$ 下进行。

数据分析与统计 电流的测量分析用 pCLAMP 5.5.1 和 pCLAMP 6.0.1 软件, 所有数据均为平均数 $\pm S_x$; 配对和非配对 *t* 检验, $P < 0.05$ 认为差异有显著性。

结 果

1 钠-钙交换电流的记录

细胞钳制在 -40mV , 先去极化至 $+60 \text{mV}$, 再给以持续 2 s 速度为 $80 \text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$ 的斜坡刺激, 复极化至 -100mV , 频率为 0.05 Hz。在该刺激条件下, 用正常台氏液灌流时, 记录到一个由外向到内向的电流, 由于其它时间依赖性的电流都被阻断, 因此记录到的电流几乎呈线性, 该电流可被 $5 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Ni^{2+} 阻断。如图 1 所示, 用 Ni^{2+} 前后记录到的电流相减, 即 $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ 交换电流 ($I_{\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}}$) [1, 4, 5]。由于 Na^+ 和 Ca^{2+} 的交换比是 3:1, 因此, 以 Na^+ 的转运方向作为 $I_{\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}}$ 的方向。 $I_{\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}}$ 的反转电位在 -20mV 左右, 当膜电位大于反转电位, 该电流为外向, 即胞内 Na^+ 与胞外 Ca^{2+} 之间进行交换, 结果造成胞内 Ca^{2+} 浓度增加; 当膜电位小于反转电位时, 该电流为内向, 即胞外 Na^+ 与胞内 Ca^{2+} 之间交换, 使胞内 Ca^{2+} 排出, 细胞内 Ca^{2+} 浓度降低。

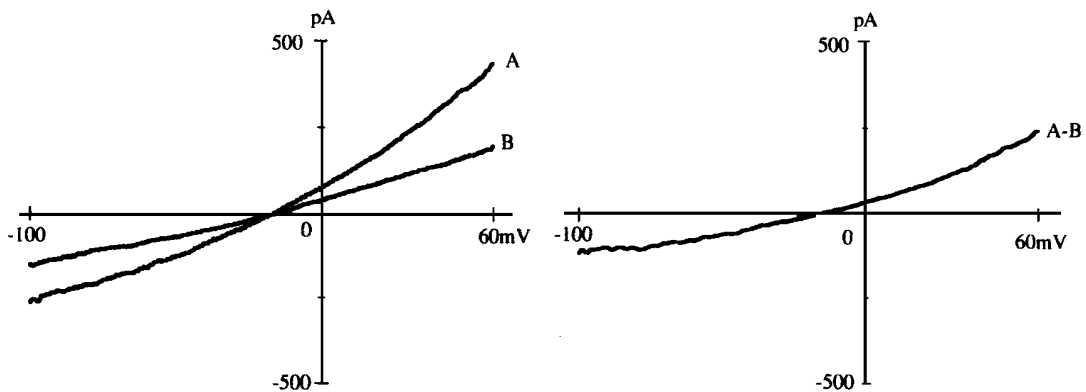


Fig 1 $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ exchange currents in guinea pig ventricular myocytes. Currents were elicited by a declining ramp pulse depolarized immediately from holding potential of -40mV to 60mV , then repolarized to -100mV at a speed of $80 \text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$ and returned to the holding potential. A: Currents before $\text{Ni}^{2+} 5 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; B: Currents after $\text{Ni}^{2+} 5 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; A-B: $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ exchange current.

2 胞外钙对 $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ 交换电流的作用

分别用 3 种不同 Ca^{2+} 浓度的台氏液灌流细胞, 观察胞外 Ca^{2+} 对 $I_{\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}}$ 的影响。胞外 Ca^{2+} 浓度

($[\text{Ca}^{2+}]_o$) 从 $1.0 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 增加到 1.8 和 $3.6 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, $I_{\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}}$ 的外向和内向成分都明显增加 (图 2)。在 $+50 \text{mV}$ 和 -80mV 时, $I_{\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}}$ 分别从

1.0 mmol·L⁻¹时的 1.50 ± 0.12 pA·pF⁻¹, - 0.69 ± 0.09 pA·pF⁻¹到 1.8 mmol·L⁻¹时的 2.07 ± 0.16 pA·pF⁻¹ (P < 0.01, n = 5), - 1.17 ± 0.19 pA·

pF⁻¹ (P < 0.05, n = 5) 和 3.6 mmol·L⁻¹时的 2.84 ± 0.14 pA·pF⁻¹ (P < 0.001, n = 11), - 2.02 ± 0.18 pA·pF⁻¹ (P < 0.001, n = 11) 。

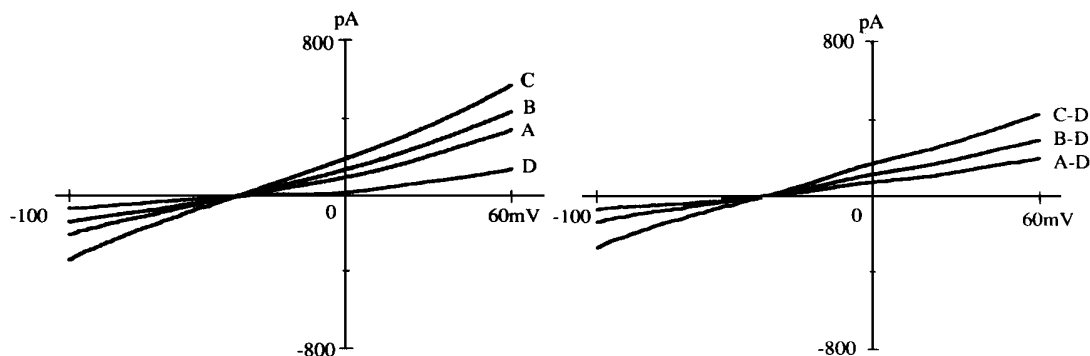


Fig 2 Original Na⁺-Ca²⁺ exchange currents at various external Ca²⁺ concentration. A, B, C, D: represent [Ca²⁺]_o 1.0, 1.8, 3.6 and 0 mmol·L⁻¹, respectively; A-D, B-D, C-D represent Na⁺-Ca²⁺ exchange current at three different [Ca²⁺]_o.

3 阿米洛利对 Na⁺-Ca²⁺ 交换电流的抑制作用

当电极内液中 Na⁺ 的浓度为 25 mmol·L⁻¹ 时, 形成全细胞记录后电极内液与细胞内液发生离子交换, 电极内液中的 Na⁺ 进入细胞内, 使胞内形成高 Na⁺ 状态。胞内 Na⁺ 增加, 可激活 Na⁺-Ca²⁺ 交换体的反向转运方式, 使 I_{Na-Ca} 的外向成分显著增加, 于 3 min 左右达到最大, 持续较长时间。+50 mV 时, 外向 I_{Na-Ca} 由刚破膜时的 (2.31 ± 0.24) pA·pF⁻¹ 增大到 (5.38 ± 0.37) pA·pF⁻¹ (P < 0.001, n = 14); -80 mV 时, 内向 I_{Na-Ca} 由 -0.51 ± 0.13 增大到 -1.80 ± 0.20 (P < 0.001, n = 14)。此时在灌流液中分别加入阿米洛利 10⁻⁵, 3 × 10⁻⁵ 和 10⁻⁴ mol·L⁻¹, I_{Na-Ca} 逐渐减小, 结果见表 1。在 +50 mV 时, 阿米洛利对 I_{Na-Ca} 的抑制率分别是 15.4%, 22.6% 和 40.9%; -80 mV 时分别是 5.6%, 14.6% 和 23.2%。

Tab 1 The inhibitory effects of amiloride on I_{Na-Ca} measured at +50 mV and -80 mV in guinea pig ventricular myocytes. All data are means ± SE (n = 4 ~ 11)

Amiloride / mol·L ⁻¹	Na ⁺ -Ca ²⁺ exchange current / pA·pF ⁻¹	
	+50 mV	-80 mV
Control	5.38 ± 0.37	-1.80 ± 0.22
10 ⁻⁵	4.55 ± 0.57	-1.70 ± 0.10
3 × 10 ⁻⁵	4.16 ± 0.48 [*]	-1.54 ± 0.36
10 ⁻⁴	3.18 ± 0.28 ^{**}	-1.38 ± 0.24

* P < 0.05, ** P < 0.01 compared with control.

讨 论

本实验用来测量 Na⁺-Ca²⁺ 交换电流方法的优越性在于: 电极内液用高浓度的 Ca²⁺ 缓冲剂 EGTA 来防止胞内游离 Ca²⁺ 浓度的增加, 使之维持在 153 nmol·L⁻¹ 的水平。通过使用各种特异性通道阻断剂, 排除其它膜电流对 I_{Na-Ca} 的干扰, 使记录到的 I_{Na-Ca} 的电流-电压关系曲线呈线性^[5]。

实验中, 通过改变 [Ca²⁺]_o 和 [Na⁺]_i, 证明胞外 [Ca²⁺]_o 和胞内 [Na⁺]_i 的增加都可使 I_{Na-Ca} 增大, 胞外无 Ca²⁺ 或胞内无 Na⁺ 条件下, 均记录不到 I_{Na-Ca}, 与文献报道^[6]一致。

在正常状态下, I_{Na-Ca} 以内向为主, 是胞内 Ca²⁺ 排出, 维持 [Ca²⁺]_i 的重要机制之一。心肌缺血时, 胞内 H⁺ 增加, 通过 Na⁺-H⁺ 交换使胞内 Na⁺ 增加, 而此时由于能量供应不足, Na⁺-K⁺ 泵活性降低, 胞内 Na⁺ 不能充分泵到胞外, 发生胞内 Na⁺ 超载, 高浓度的 Na⁺ 激活细胞膜上的 Na⁺-Ca²⁺ 交换体; 此时若发生再灌注, 能量恢复, Na⁺ 便从胞内向胞外转移, 与此同时通过 Na⁺-Ca²⁺ 交换机制, Ca²⁺ 便从胞外向胞内转移发生 Ca²⁺ 超载, 从而引起一系列病理生理损伤, 甚至细胞死亡。

本实验电极内液用高浓度 Na⁺, 通过离子扩散使胞内形成高 Na⁺ 状态, 模拟缺血-再灌时的胞内 Na⁺ 超载。胞内 Na⁺ 增加可激活 Na⁺-Ca²⁺ 交换体的反向转运机制, 使胞内 Na⁺ 与胞外 Ca²⁺ 发生交换, I_{Na-Ca} 的外向成分显著增加; 同时胞内 Ca²⁺ 浓度

也相应增加,导致胞内 Ca^{2+} 超载。由此可以推测, Na^+ - Ca^{2+} 交换体的反向转运可能是心肌缺血再灌注损伤中形成 Ca^{2+} 超载的机制之一。阿米洛利是较强的 Na^+ - H^+ 交换抑制剂,已有研究显示,阿米洛利对 $I_{\text{Na-Ca}}$ 有抑制作用^[7]。在本实验条件下发现它对 $I_{\text{Na-Ca}}$ 的外向成分有明显的抑制作用,即抑制胞内 Na^+ 与胞外 Ca^{2+} 之间的交换,防止胞内 Ca^{2+} 超载,起到心肌保护的作用。实验中已形成胞内高 Na^+ 状态, $I_{\text{Na-Ca}}$ 的外向成分显著增加,此时阿米洛利对 $I_{\text{Na-Ca}}$ 的抑制可能是它的直接作用,而不是通过抑制 Na^+ - H^+ 交换,减轻胞内 Na^+ 超载,间接抑制 Na^+ - Ca^{2+} 交换体的反向转运。但是,阿米洛利可以通过对 $I_{\text{Na-Ca}}$ 的直接和间接作用,促进心肌缺血后功能的恢复。由于缺少特异性的 Na^+ - Ca^{2+} 交换和 Na^+ - H^+ 交换抑制剂,二者之间的关系有待进一步实验证明。

我们在实验中,通过增加电极内液中 Na^+ 的浓度,使胞内形成高 Na^+ 状态,而显著增加外向 $I_{\text{Na-Ca}}$ 的方法,为寻找能特异地作用于外向 $I_{\text{Na-Ca}}$,防止心肌缺血再灌时的 Ca^{2+} 超载,开发具有心肌保护作用

的新型药物,提供了一种新的方法和手段。

参 考 文 献

- 1 Niggli E, Lederer WJ. Molecular operation of the sodium-calcium exchanger revealed by conformation currents. *Nature*, 1991, **349**: 621
- 2 Lipp P, Niggli E. Sodium-current induced calcium signals in isolated guinea pig ventricular myocytes. *J Physiol*, 1994, **474**: 439
- 3 Benardeau A, Halem SN, Martin CR, et al. Contribution of Na^+ / Ca^{2+} exchange to action potential of human atrial myocytes. *Am J Physiol*, 1996, **271**: H1151
- 4 Ehara T, Matsuoka S, Noma A. Measurement of reversal potential of Na^+ - Ca^{2+} exchange current in guinea pig ventricular cells. *J Physiol*, 1989, **410**: 227
- 5 Kimura J, Miyamae S, Noma A. Identification of sodium-calcium exchange current in single ventricular cells of guinea pig. *J Physiol*, 1987, **384**: 199
- 6 Kimura J, Noma A, Irisawa H. Na^+ - Ca^{2+} exchange current in mammalian heart cells. *Nature*, 1986, **319**: 596
- 7 Doering AE, Lederer WJ. The mechanism by which cytoplasmic protons inhibit the sodium-calcium exchanger in guinea pig heart cells. *J Physiol*, 1993, **466**: 481

A NOVEL METHOD OF RECORDING Na^+ - Ca^{2+} EXCHANGE CURRENT AND EFFECT OF AMILORIDE ON THE CURRENT IN GUINEA PIG VENTRICULAR MYOCYTES

Liang Yong(Liang Y), Zhang Yalan(Zhang YL) and Wang Xiaoliang(Wang XL) *

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050)

ABSTRACT **AIM:** To study the effects of various extracellular Ca^{2+} concentration and a miloride on Na^+ - Ca^{2+} exchange current ($I_{\text{Na-Ca}}$) in guinea pig ventricular myocytes. **METHODS:** Through setting up the model of intracellular Na^+ -overload during myocardial ischemia and reperfusion, the current-voltage relationship of $I_{\text{Na-Ca}}$ was recorded using whole-cell patch clamp technique with a declining ramp pulse protocol. **RESULTS:** Amiloride can block the $I_{\text{Na-Ca}}$ significantly. At potential of +50 mV, a miloride 10^{-5} , 3×10^{-5} and 10^{-4} mol·L⁻¹ inhibited the $I_{\text{Na-Ca}}$ by 15.4%, 22.6% and 40.9%, respectively; at potential of -80 mV a miloride inhibited $I_{\text{Na-Ca}}$ by 5.6%, 14.6% and 23.2%, respectively. **CONCLUSION:** Intracellular Na^+ -overload can activate Na^+ - Ca^{2+} exchange system which can be affected by extracellular Ca^{2+} . Amiloride can block $I_{\text{Na-Ca}}$ in guinea pig ventricular myocytes. Its inhibition effects on outward currents were greater than those on inward currents.

KEY WORDS Na^+ - Ca^{2+} exchange current; a miloride; ventricular myocytes; whole-cell patch clamp technique