

550-552

硫酸镁对离体豚鼠心肌细胞钙通道的影响¹

R 972

R 965.1

樊济海², 杨钧国, 唐明³, 王杨淦, 刘庆华³(同济医科大学 心血管疾病研究所, ³心电生理实验室, 武汉 430022, 中国)Effect of magnesium sulfate on calcium channels in isolated cardiomyocytes of guinea pig¹

关键词 硫酸镁; 膜片钳技术; 心肌; 钙通道; 培养的细胞

FAN Ji-Hai², YANG Jun-Guo, TANG Ming³, WANG Yang-Gan, LIU Qing-Hua³ (*Institute of Cardiovascular Disease, ³Electrocardiophysiological Laboratory, Department of Physiology, Tongji Medical University, Wuhan 430022, China*)**KEY WORDS** magnesium sulfate; patch-clamp techniques; myocardium; calcium channels; cultured cells

AIM: To determine the effect of MgSO₄ on calcium channel in heart cells and its anti-arrhythmic mechanism. **METHODS:** Whole cell recording patch-clamp technique. **RESULTS:** The calcium current (*I*_{Ca}) in the ventricular cells of guinea pig was enhanced from 1.6 ± 0.6 nA to 1.9 ± 0.4 nA (*P* < 0.05) by magnesium 0.3 mmol · L⁻¹ in the extracellular solution, and recovered to 1.7 ± 0.5 nA after washout (*P* < 0.05 vs extracellular magnesium 0.3 mmol · L⁻¹, *P* > 0.05 vs normal Tyrode). *I*_{Ca} was decreased with increasing concentrations of MgSO₄ (from 0.3 to 6 mmol · L⁻¹) in the outside-cell solution. MgSO₄ 4 mmol · L⁻¹ attenuated *I*_{Ca} from 1.5 ± 0.6 nA to 0.9 ± 0.5 nA (*P* < 0.05) and gained it to 1.3 ± 0.4 nA after washout (*P* < 0.01 vs MgSO₄ 4 mmol · L⁻¹, *P* < 0.05 vs normal Tyrode). Furthermore, the current-voltage curves (*I*-*V* curves) of *I*_{Ca} was elevated without its voltage dependency being affected. **CONCLUSION:** MgSO₄ concentration-dependently regulated L-type calcium channels in ventricular myocytes.

目的: 研究硫酸镁(MgSO₄)对心肌细胞膜钙离子通道的影响, 探讨MgSO₄抗心律失常机制。**方法:** 全细胞膜片钳技术。**结果:** 细胞外液低镁(0.3 mmol · L⁻¹)使心肌细胞钙电流(*I*_{Ca})从1.6 ± 0.6 nA增至1.9 ± 0.4 nA (*P* < 0.05), 冲洗后恢复至1.7 ± 0.5 nA (*P* < 0.05 vs 镁0.3 mmol · L⁻¹, *P* > 0.05 vs 台氏液)。 *I*_{Ca}随浓度增高进行性递减; MgSO₄ 4 mmol · L⁻¹使 *I*_{Ca}从1.6 ± 0.6 nA降至0.9 ± 0.5 nA (*P* < 0.05), 冲洗后复增强至1.3 ± 0.4 nA (*P* < 0.01 vs MgSO₄ 4 mmol · L⁻¹, *P* < 0.05 vs 台氏液); MgSO₄ 4 mmol · L⁻¹使心肌细胞 *I*_{Ca}电流-电压曲线上移, 原有的电流-电压依赖特征不变。**结论:** MgSO₄浓度依赖性调节心肌细胞L-型钙通道。

Mg²⁺制剂可纠正临床多种心律失常, 如对洋地黄所致的快速心律失常有肯定疗效、预防并终止尖端扭转型室速(TDP)等^[1,2]。Mg²⁺对生理状态下的动作电位(AP)几乎无影响, 但可纠正电解质紊乱如低钙, 高钾、低钾等所引起的动作电位改变^[3,4]。Mg²⁺对某些细胞离子通道有影响^[5]; 本文旨在研究MgSO₄对心肌细胞钙通道的影响, 探讨MgSO₄抗心律失常的离子流基础。

MATERIALS AND METHODS

药物与溶液 Crystalline MgSO₄、牛磺酸(taurine) (上海化学试剂厂), HEPES (Fluka), 胶原酶 I 型(collagenase type-I), injectio 维拉帕米(verapamil), crystalline 四乙铵(tetraethylammonium)均为 Sigma 公司制品。

溶液 1) 台氏(Tyrode)液 (mmol · L⁻¹): NaCl 112, KCl 5.4, MgCl₂ 1, CaCl₂ 1.8, NaH₂PO₄ 1, HEPES 5, glucose 10, 用 NaOH 0.1 mmol · L⁻¹调节 pH 至 7.4。 2) 无钙液 (mmol · L⁻¹): NaCl 80, KCl 10, NaH₂PO₄ 1, MgSO₄ 5, glucose 20, taurine 50, HEPES 5, 用 NaOH 0.1

¹Supported by Key Research Subject of Medicine, Ministry of Public Health, China.²Now in Department of Cardiology, No 455 Hospital of PLA, Shanghai 200052, China

Received 1995-07-17

Accepted 1996-06-03

mmol·L⁻¹调节 pH 至 7.4. 3) KB 液 (mmol·L⁻¹): KOH 85, 谷氨酸 50, KCl 30, turine 20, KH₂PO₄ 30, MgSO₄ 1, HEPES 10, glucose 10, egtazic acid 0.5, 用 KOH 0.1 mmol·L⁻¹调节 pH 至 7.4. 4) 电极内液 (mmol·L⁻¹): KCl 150, MgCl₂ 1, Na₂ATP 1, egtazic acid 10, HEPES 5, 用 KOH 0.1 mmol·L⁻¹调节 pH 至 7.4.

分离心肌细胞 取成年豚鼠, 体重 225 ± 25 g, ♀ 孕不抱, Langendorff 灌流心脏, 酶消化分离细胞^[6,7], 分离细胞全过程保持灌流液 O₂ 分压 12 ± 0.7 kPa, CO₂ 分压 5.3 ± 0.7 kPa.

心肌细胞灌流及封接监视系统 自制单细胞灌流槽, 外围有一调温夹层, 灌流台氏液 37.5 ± 0.5 °C 电视录像监视系统观察细胞及指导封接过程.

微电极 将玻璃管毛细 (中国科学院上海脑生理研究所 GG-17 型) 用微电极拉制仪 (Narshige Type PE-2) 分两步拉制成内径 1-2 μm, 外径 2-3 μm, 阻抗 3.5-4.5 MΩ 的玻璃微电极, 临用前充入电极内液.

电压箝制实验 采用全细胞膜片箝技术 (whole-cell recording patch-clamp technique) 结合细胞外液离子灌流方法. 方波刺激仪 7 (Nihon Konden 3NT-T 130) 设置刺激方波, 示波器 (Electron Co, SBR-1, Shantou) 记录电流电压波形. 膜片箝放大器 (List Co L/M-EPC7, Darmstadt, FRG), 具有高功能串连电阻补偿及膜电容补偿能力, 能对中小细胞进行有效的电流电压箝制. 当完成 GΩ 封接 (Gaga-seal) 后, 吸破细胞膜, 使保持电压 (holding potential) 为 -40 mV, 去极至 0 mV, 持续 300 ms, 刺激脉冲 0.5 Hz, 可记录到一缓慢失活的内向电流, 因此时钠电流处于失活状态^[6], 钾电流也因加入了四乙铵而失活, 且当加入维拉帕米 1 μmol·L⁻¹ 时该电流被迅速消除, 因而证实该电流为 L-型钙通道电流 (I_{Ca}) (Fig 1). 当箝制电压 -40 mV, 阶跃电压 10 mV, 从 -30 至 +60 mV, 检测各膜电压下的 I_{Ca}, 即取得该离子流的电流-电压关系曲线 (I-V 曲线).

数据处理 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, *t* 检验统计学处理.

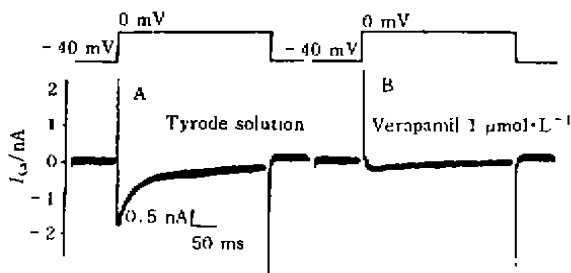


Fig 1. Slow inward Ca²⁺ current (I_{Ca}) recorded in an isolated cardiomyocyte (A) and inhibition by verapamil (B).

RESULTS

记录正常豚鼠 (*n* = 10) 心肌细胞 (*n* = 16) I_{Ca}, 均值为 1.6 ± 0.6 nA, 与文献^[8]报道值近似.

灌注低浓度 Mg²⁺ 0.3 mmol·L⁻¹ 细胞外液 5 min, 记录 I_{Ca} 值, 统计豚鼠心室肌细胞 (*n* = 16), I_{Ca} 从 1.7 ± 0.5 nA 升高至 1.9 ± 0.4 nA (*P* < 0.05) 灌洗 3 min 后恢复至 1.7 ± 0.5 nA (*P* < 0.05 vs MgSO₄ 0.3 mmol·L⁻¹ 细胞外液, *P* > 0.05 vs Tyrode) (Fig 2).

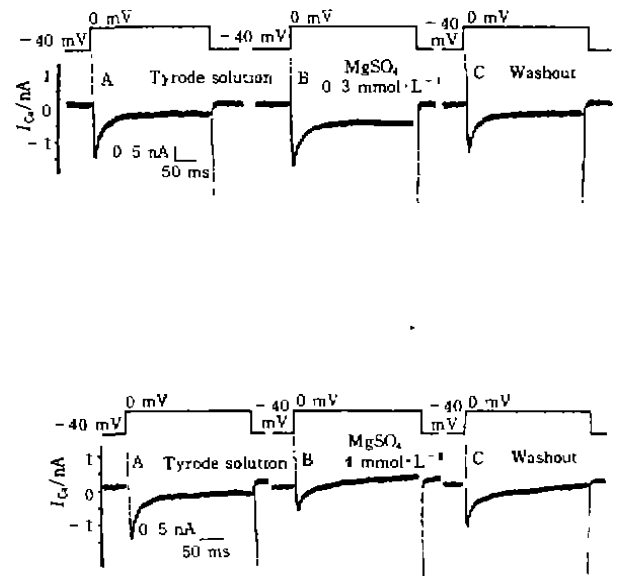


Fig 2. I_{Ca} in a cardiomyocyte. A) In Tyrode; B) 5-min perfusion with MgSO₄; C) 3-min washout with Tyrode.

灌注高浓度 MgSO₄ 4 mmol·L⁻¹ 细胞外液 5 min, 记录 I_{Ca} 从灌注前 1.5 ± 0.6 nA 降至 0.9 ± 0.5 nA (*P* < 0.05), 继以正常台氏液冲洗 3 min 后恢复至 1.3 ± 0.4 nA (*P* < 0.01 vs MgSO₄ 4 mmol·L⁻¹ 细胞外液, *P* < 0.05 vs 台氏液中) (Fig 2).

依次灌注 Mg²⁺ 0.3, 1, 2, 3, 4, 5, 6 mmol·L⁻¹ 细胞外液各 2 min, I_{Ca} 随 MgSO₄ 浓度升高而递减 (Tab 1).

记录正常台氏液灌注状态下的电流-电压曲线 (I-V 曲线) 后, 灌注 MgSO₄ 4 mmol·L⁻¹ 浓度 Tyrode 5 min, 取得此时 I-V 曲线, 统计豚鼠心室肌细胞 (*n* = 4) 灌注前后的 I-V 曲线变化. 发

Tab 1. Effect of extracellular Mg^{2+} on I_{Ca} in cardiomyocytes perfused for 2 min. $n = 8$ cells. $\bar{x} \pm s$. ^a $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$ vs control (Tyrode) ^{*}.

Mg^{2+} /mmol·L	I_{Ca} /nA
0.3	1.8 ± 0.4
1 ^a	1.6 ± 0.5
2	1.4 ± 0.4
3	1.2 ± 0.3 ^b
4	0.7 ± 0.4 ^c
5	0.4 ± 0.2 ^b
6	0.1 ± 0.1 ^b

现 $MgSO_4$ 抑制任何一膜电压下的 I_{Ca} , 其最大激活电压仍为 0 mV, 1-V 曲线显著上移, I_{Ca} 原有的电流电压依赖特征无明显改变(Fig 3).

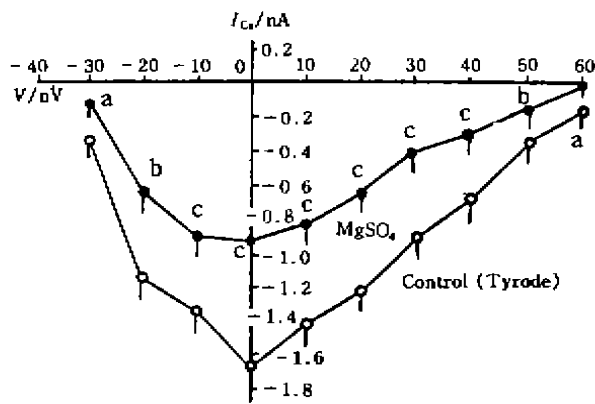


Fig 3. Effect of $MgSO_4$ 4 mmol·L⁻¹ on I_{Ca} . $n = 4$ cardiomyocytes. $\bar{x} \pm s$. ^a $P > 0.05$, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$ vs control (Tyrode).

DISCUSSION

实验结果表明, 低于生理浓度的细胞外 Mg^{2+} 可逆性地促进 L-型钙通道的开放, 增强 I_{Ca} , 内向钙电流增强时心肌细胞易于发生早期后除极 (EAD) 和延迟后除极 (DAD), 这是临床上尖端扭转型室速 (TDP) 和洋地黄所致快速性心律失常的病理生理基础^[9,10], 因而低 Mg^{2+} 引起的 I_{Ca} 增强可能是此类心律失常发生的基本机制之一. 高浓度 $MgSO_4$ 可逆性阻滞 L-型钙通道, 抑制外向 I_{Ca} ,

消除 EAD 或 DAD; $MgSO_4$ 对 I_{Ca} 的浓度效应曲线及 1-V 曲线表明 $MgSO_4$ 浓度依赖性地阻滞钙通道而不影响通道原有的电压依赖特征, 其作用与膜电压无关, 为非电压依赖性. $MgSO_4$ 对钙通道的上述调节作用, 可能是其抗心律失常作用的离子流基础.

本实验中观察到了 run-down 现象, 但同时观察到破膜稳定后 15 min 内衰减现象并不明显, 与文献^[7]结果相符. 严格地控制实验条件使我们较好地克服了 run-down 影响.

REFERENCES

- 1 Tzivoni D, Keren A. Suppression of ventricular arrhythmias by magnesium. Am J Cardiol 1990; 65: 1397-9
- 2 Thøgersen AM, Johnson O, Wester PO. Effects of intravenous magnesium sulphate in suspected acute myocardial infarction on acute arrhythmias and long-term outcome. Int J Cardiol 1995; 49: 143-51.
- 3 Arsenian MA. Magnesium and cardiovascular disease. Prog cardiovasc disease 1993; 35: 271-310.
- 4 Kraft LF, Katholi RE, Woods WY, James TN. Attenuation by magnesium of the electrophysiologic effects of hyperkalemia on human and canine heart cells. Am J Cardiol 1980;45: 1189-95.
- 5 Ritucci NA, Corbett AM. Effect of Mg^{2+} and ATP on depolarization-induced Ca^{2+} release in isolated triads. Am J Physiol 1995; 269 (1 Pt 1): C85-C95.
- 6 Beeler GW Jr, Reuter H. Voltage clamp experiments on ventricular myocardial fibres. J Physiol (Lond) 1970; 207: 165-90.
- 7 Belles B, Malecot CO, Hescheler J, Trautwein W. "Run-down" of the Ca current during long whole-cell recordings in guinea pig heart cells: role of phosphorylation and intracellular calcium. Pflügers Arch 1989; 411: 353-60.
- 8 Lee KS, Tsien RW. High selectivity of calcium channels in single dialysed heart cells of the guinea-pig. J Physiol (Lond) 1984; 354: 253-72.
- 9 Davidenko JM, Cohen L, Gooddrow R, Antzelevitch C. Quinidine-induced action potential prolongation, early afterdepolarizations, and triggered activity in canine Purkinje fibers: Effects of stimulation rate, potassium, and magnesium. Circulation 1989; 79: 674-86
- 10 Bailie DS, Inoue H, Kaseda S, Ben-David J, Zipes DP. Magnesium suppression of early afterdepolarizations and ventricular tachyarrhythmias induced by cesium in dogs. Circulation 1989; 77: 1395-402