

慢性间歇低氧对 SD 大鼠心房电重构的影响*

张凯^{1,2}, 马敬霞³, 马作旺⁴, 杨禹², 李广平^{1,2Δ}

(1. 首都医科大学附属北京世纪坛医院心血管内科, 北京 100038; 2. 天津医科大学第二医院心脏科 天津心血管病离子与分子机能重点实验室 天津心脏病学研究所, 天津 300211; 3. 滨州医学院附属医院神经内科, 滨洲 256603; 4. 天津市胸科医院心内科, 天津市心血管病研究所, 天津 300222)

【摘要】 目的: 探究慢性间歇低氧(CIH)对SD大鼠心房电重构的影响,阐释CIH促进心房颤动(AF)发生发展的可能机制。**方法:** 80只雄性SD大鼠随机分为对照组(Control)、慢性间歇低氧组/模型组(CIH)每组各40只。模型组大鼠每日接受间歇低氧8h,持续30d。行超声心动图、血流动力学检查之后,进行体外心脏电生理学实验、病理学实验及分子生物学实验。电生理实验检测心房AF易感性,Masson染色观察心房肌组织纤维化程度,Western blot检测心房组织中 $\text{Na}_v1.5$ 、 $\text{Ca}_v1.2$ 及 $\text{K}_v4.3$ 的蛋白表达水平。全细胞膜片钳实验中,电流钳模式下记录心房肌细胞动作电位(AP),并计算比较动作电位时程(APD)。电压钳模式下记录比较 I_{Na} 、 $I_{\text{Ca-L}}$ 、 I_{to} 电流密度及通道动力学参数。**结果:** 与对照组相比,模型组大鼠心房纤维化程度增加($P<0.01$)、AF易感性升高($P<0.05$), $\text{Na}_v1.5$ 、 $\text{Ca}_v1.2$ ($P<0.05$)、 $\text{K}_v4.3$ ($P<0.05$)的表达水平降低,心房肌细胞的 APD_{90} 及 APD_{50} 延长, I_{Na} 、 $I_{\text{Ca-L}}$ ($P<0.01$)、 I_{to} ($P<0.01$)电流密度降低。**结论:** CIH导致离子通道亚基表达水平、离子流强度及APD的改变,进而AF诱发率升高,这些变化可能是其促进AF发生发展的机制。

【关键词】 心房颤动; 慢性间歇低氧; 心房重构; 离子通道; 大鼠

【中图分类号】 R541.7

【文献标识码】 A

【文章编号】 1000-6834(2024)01-001-007

【DOI】 10.12047/j.cjap.6279.2022.072

Effects of chronic intermittent hypoxia on atrial electrical remodeling in rats

ZHANG Kai^{1,2}, MA Jing-xia³, MA Zuo-wang⁴, YANG Yu², LI Guang-ping^{1,2Δ}

(1. Department of Cardiology, Beijing Shijitan Hospital, Beijing 100038; 2. Tianjin Key Laboratory of Ionic-Molecular Function of Cardiovascular disease, Department of Cardiology, Tianjin Institute of Cardiology, Second Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300211; 3. Department of Neurology, Affiliated Hospital of Binzhou Medical College, Binzhou 256603; 4. Department of Cardiology, Tianjin Chest Hospital, Tianjin Cardiovascular Institute, Tianjin 300222, China)

【ABSTRACT】 Objective: The aim of this study was to investigate the effects of chronic intermittent hypoxia (CIH) on atrial electrical remodeling in Sprague-Dawley (SD) rats, which provide the explication for the mechanisms of CIH promoting atrial fibrillation (AF). **Methods:** Eighty SD rats were randomly divided into 2 groups: control group and CIH group ($n=40$). CIH rats were subjected to CIH 8 h/d for 30 days. After the echocardiography and hemodynamics examination, cardiac electrophysiological experiments, histological experiments, and molecular biological experiments were executed. AF susceptibility was measured by isolated heart electrophysiological experiments. Masson's trichrome stain was used to assess the degree of atrial fibrosis. The protein expression levels of sodium voltage-gated channel alpha subunit 5 ($\text{SCN5A}/\text{Na}_v1.5$), calcium voltage-gated channel subunit alpha C ($\text{CACNA1C}/\text{Ca}_v1.2$) and potassium voltage-gated channel subfamily D member 3 ($\text{KCND3}/\text{K}_v4.3$) were measured by Western blot. In whole-cell patch clamp experiments, current clamp mode was used to record AP, and APD_{90} and APD_{50} were analyzed and compared between the two groups. In voltage clamp mode, I_{Na} , $I_{\text{Ca-L}}$, I_{to} and their kinetic parameters were recorded and compared between the two groups. **Results:** Compared to the control rats, atrial interstitial collagen deposition ($P<0.01$) and AF inducibility ($P<0.05$) were increased in CIH rats, whereas the expression levels of $\text{Na}_v1.5$, $\text{Ca}_v1.2$ and $\text{K}_v4.3$ were decreased ($P<0.05$). APD_{90} and APD_{50} in CIH rats' atrial myocytes were longer than those of control rats, and CIH rats showed decreased current density of I_{Na} , $I_{\text{Ca-L}}$ ($P<0.01$) and I_{to} ($P<0.01$). **Conclusion:** CIH-induced changes in the protein expression levels of ion channel subunits, current intensity, APD, and AF susceptibility, which may be the mechanisms of CIH promoting AF.

【KEY WORDS】 atrial fibrillation; chronic intermittent hypoxia; atrial remodeling; ion channels; rat

*【基金项目】国家自然科学基金(81570304);天津市卫生健康委科技项目(TJWJ2022QN071)

【收稿日期】2022-02-26【修回日期】2022-08-12

Δ【通讯作者】Tel: 13820289800; E-mail: tic_tjcardiol@126.com

心房颤动(atrial fibrillation, AF)是最常见的心律失常之一,其可导致血栓形成、恶化心功能,是心脑血管疾病的主要危险因素^[1]。相关研究表明,长期的慢性间歇低氧(chronic intermittent hypoxia,

CIH)是促进AF发生、发展的重要因素^[2],其一定程度上与阻塞性睡眠呼吸暂停(obstructive sleep apnea, OSA)类似,据研究估计,全世界30至69岁的人群中,约10亿人罹患OSA,而AF患者合并OSA的概率可高达50%,此外两种疾病的发病率仍逐年增加^[3,4]。目前AF的病理生理机制尚未完全明确,但心房重构可能是AF发生、发展、维持的重要基质,心房重构主要涉及心房的结构重构和电重构,以胶原沉积增加为主要变化的结构重构和以心房离子通道状态变化为主要变化的电重构是心房重构最主要的表现形式^[5],进一步探究心房重构的分子及离子机制是AF研究的重点,可为进一步治疗AF提供切入点。

细胞层面的电活动是生物电现象的基础,其在机体的各种生理、病理活动中具有重要调控作用,离子通道状态改变是多种疾病的发生、发展的重要原因,通道状态的改变会导致胞内外离子活动变化,继而影响信号通路的转导及各项生理活动,因而离子通道是电生理学最重要的研究对象^[6]。电压门控性/依赖性钠通道(voltage-gated sodium channel, Na_v)、钙通道(voltage-gated calcium channel, Ca_v)及钾通道(voltage-gated potassium channel, K_v)作为基础离子通道,是细胞产生电活动的基础,其形成的离子流 I_{Na} 、 I_{Ca} 、 I_{K} 的变化是多系统疾病的病因,尤其在心律失常的病理生理过程中具有重要作用^[7],心脏中,快钠通道、钙通道、瞬时外向钾通道分别由 $\text{Na}_v 1.5$ 、 $\text{Ca}_v 1.2$ 、 $\text{K}_v 4.3$ 构成,对应离子流分别为 I_{Na} 、 $I_{\text{Ca-L}}$ 、 I_{to} ,其在AF的发生发展中扮演着重要角色^[8]。AF中心房的电、结构重构的病理生理过程尚待进一步明确,我们拟通过CIH方式建立大鼠心房重构模型^[9],探讨CIH对SD大鼠心房电重构的影响,进而探究CIH促进AF发生、发展的分子及离子机制,为AF上游防治提供思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雄性SD大鼠,共80只,14周龄,(250 ± 20)g,购自北京华阜康股份有限公司,许可证号:SCXK(京)2014-000。所有大鼠均被安置于环境受控的动物房中,低氧时间外可自由获取食物和水,呼吸正常的室内空气。

1.2 实验仪器和试剂

自动调节式乏氧仪(南京新飞),小动物彩超仪(SONICS, USA),血流动力学分析仪(上海ADINSTRUMENTS),TOP-2001多导电生理系统(上海宏

桐),倒置显微镜(Olympus, Japan),MP-285显微操作仪(SUTTER, USA),玻璃微电极拉制仪(SUTTER, USA),膜片钳放大器/数模转换器(Axon CNS, USA),Masson染色试剂盒(南京建成公司),RIPA裂解液(南京KeyGEN BioTECH),蛋白酶抑制剂PMSF(南京KeyGEN BioTECH),抗大鼠 β -actin抗体(Proteintech, USA, 1:4 000),抗大鼠 $\text{Ca}_v 1.2$ 抗体(Abcam, USA, 1:1 000),抗大鼠 $\text{K}_v 4.3$ 抗体(Affinity, USA, 1:1 000),抗大鼠 $\text{Na}_v 1.5$ 抗体(Abcam, USA, 1:1 000)。氯化胆碱(SIGMA, USA),HEPES(北京Genthold),牛磺酸(SIGMA, USA),L-谷氨酸(广州Biosharp),EGTA(北京Genthold),II型胶原酶(Worthington, USA),胎牛血清BSA(Roche, Switzerland),其余试剂为国产分析纯。

1.3 分组及模型建立方法

80只雄性SD大鼠按随机数字法分为对照组(Control)和模型组(CIH),每组40只,使用专用笼将模型组大鼠放置于乏氧仪的低压氧舱中,通过循环充入氧气与氮气,使舱内的氧浓度缓慢波动于8~21%之间,设定程序一次循环共300s,其中氮气充入时间为210s,维持8%低氧浓度50s,氧气充入时间为90s,维持21%常氧浓度20s,模型组大鼠每日接受间歇低氧8h,共30d。动物饲养、实验操作遵循天津医科大学动物伦理委员会规定。

1.4 彩超及血流动力学检查

模型建立周期结束后,所有大鼠进行称重,之后进行超声心动图检查,异氟烷(2L/min)麻醉大鼠,麻醉满意后将大鼠固定于超声仪的动物平台上,检测两组大鼠的左心房内径(left atrial diameter, LAD)、左心室舒张末期内径(left ventricular end diastolic diameter, LVEDD)、左心室收缩末期内径(left ventricular end systolic diameter, LVESD)、肺动脉血流加速时间(pulmonary artery acceleration time, PAT),并根据LVEDD、LVESD及PAT分别计算左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)和平均肺动脉压力(mean pulmonary artery pressure, MPAP)。超声心动图检测结束后,沿大鼠颈中线剪开皮肤并分离一侧颈总动脉,结扎上端后向心方向插入Millar压力导管,血流动力学分析仪用于检测两组大鼠的血压,根据收缩压和舒张压计算平均动脉压(mean arterial blood pressure, MABP)。

1.5 病理学实验

每组随机选取5只大鼠留取心房组织用于病理学研究,剪取心房组织,台式液冲洗后于4%的中性甲醛固定3d,之后对心房组织进行脱水、石蜡包埋、

冷冻、切片、贴片、脱蜡、水化、染色、透明、封片等操作。Masson 染色后计算胶原分数,用于比较两组大鼠心房纤维化程度,Image-pro plus 6.0 软件用于图像的分析与计算。

1.6 体外心脏电生理

每组随机选取 5 只大鼠用于整体心脏电生理研究,麻醉满意后迅速分离大鼠心脏,将主动脉根部与 Langendorff 灌流系统连接,使用生理台式液对心脏进行逆向灌流,通入含 95% O₂ 和 5% CO₂ 的混合气体,心脏稳定搏动 15 min 后,于高位右心房、高位左心房及右心室分别连接 1 对电极,测量、比较两组大鼠的 AF 诱发率,AF 诱发定义为给予右房电极 3 s 的 Burst 刺激后,左房及心室电极记录到快速、紊乱的心电图,持续时间 > 1 s,宏桐多导电生理系统用于 AF 的诱发与记录。

1.7 Western blot 实验

每组随机选取 10 只大鼠留取心房组织用于分子生物学实验。使用 RIPA 裂解液、PMSF 萃取左心房组织中的总蛋白,加入 SDS 缓冲液后煮沸 10 min 使蛋白变性,蛋白定量后,将蛋白(10 μg)加入到预制的聚丙烯酰胺凝胶的凹槽中,80 V 电压下进行电泳,之后 200 mA 的条件下将凝胶中蛋白分子电转至 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶封闭 1 h,之后 4℃ 条件下孵育一抗(β-actin、Na_v1.5、Ca_v1.2、K_v4.3)过夜, TBST 清洗 3 次后孵育二抗 1 h, TBST 清洗 3 次后显影,Image lab software 软件用于检测与分析目的条带的净光密度,之后比较两组目的条带的净光密度的比值,内参为 β-actin。

1.8 全细胞膜片钳实验

每组剩余 20 只大鼠用于全细胞膜片钳实验,使用精密天平称取相应质量的化学制剂以配制相应体积(ml)和浓度(mmol/L)的电极内液、细胞外液、KB 液和酶液:(1) 100 ml 钙电流电极内液(CsCl 20, TEA-Cl 20, Aspartic acid 80, CsOH · H₂O 80, MgCl₂ · 6H₂O 1, HEPES 10, EGTA 10, Mg₂ATP 5, Na₃GTP 0.1, Na₂phosphocreatine · 4H₂O 5),使用 CsOH 将 pH 调至 7.25,低温储存备用;(2) 100 ml 钠、钾电流电极内液(KCl 20, K-Aspartate 110, MgCl₂ · 6H₂O 0.5, HEPES 10, EGTA 10, Mg₂ATP 5, Na₃GTP 0.1, Na₂phosphocreatine · 4H₂O 5),使用 KOH 将 pH 调至 7.30,低温储藏备用;(3) 500 ml 无钙台式液(KCl 5.4, MgCl₂ · 6H₂O 0.8, NaH₂PO₄ · 2H₂O 0.33, NaCl 136, HEPES 10, Glucose 10),使用 NaOH 将 pH 调至 7.40 后备用;(4) 500 ml 生理台式液(KCl 5.4, MgCl₂ · 6H₂O 0.8, NaH₂PO₄ · 2H₂O

0.33, NaCl 136, HEPES 10, Glucose 10, CaCl₂ 1.8),使用 NaOH 将 pH 调至 7.40 后备用;(5) 500 ml 低钠外液(Choline-Cl 110, CsCl 20, MgCl₂ · 6H₂O 1.0, HEPES 10, Glucose 10, NaCl 10, CaCl₂ 1.0),使用 NaOH 将 pH 调至 7.40 后备用;(6) 100 ml KB 液(KCl 20, KH₂PO₄ 10, 牛磺酸 10, L-谷氨酸 70, EGTA10, Glucose 10),使用 KOH 将 PH 调至 7.40,滴定后再加入 0.5 g BSA 后备用;(7) 酶液:称取 0.12 g BSA、0.03 g II 型胶原酶,加入 50 mmol/L 的 CaCl₂ 溶液 0.1 ml,使用滴定好的无钙台式液定容至 60 ml 备用。预留 100 ml 无钙台式液置于 4℃ 冰箱中,以备短暂承接心脏。按随机数字法选取大鼠后迅速分离心脏,置于预冷的无钙台式液中,使用 Langendorff 灌流系统逆向灌流心脏,使用无钙台式液的压力灌注大鼠心脏约 5 min 后使用酶液灌流大鼠心脏约 22 min,待心房壁呈现斑驳透明状态后剪下心房组织,置于 37℃ 的 KB 液中。将心房组织剪碎后吸管吹打 1 min 以进一步分离单个心房肌细胞。尼龙细胞筛网过滤掉组织碎块后将心房肌细胞转移至 60×15 mm 的培养皿中,沿培养皿壁滴入细胞外液,置换成相应的细胞外液后静置 1 h,进行后续膜片钳实验,环境温度维持在 24℃ 左右。

显微镜下选择贴壁状态良好、形态完整、无自发收缩的心房肌细胞,操控微操仪使填充电极内液的电极尖端缓慢接近目的细胞,负压吸引形成高阻封接,在此基础上予一定的负压使细胞破膜,之后记录心房肌细胞各项电生理参数。利用一系列方波阶梯式电压刺激程序可引发 I_{Na}、I_{Ca-L}、I_{to},根据记录到的峰值电流强度 I(pA)及膜电容 C_m(pF)计算电流密度(pA/pF),以钳制电压为横坐标,以不同电压下峰值电流强度为纵坐标,绘制 Na_v1.5、Ca_v1.2、K_v4.3 的 I-V 曲线,选用相应的脉冲刺激程序记录 Na_v1.5、Ca_v1.2、K_v4.3 的激活、失活及恢复,以电流最大峰值为基值 1,对各电压下的峰值电流行标准化处理(I/I_{MAX}),并以此为纵坐标,以相应钳制电压为横坐标,绘制激活、失活曲线。Boltzmann 方程拟合激活、失活曲线: $I/I_{MAX} = G/G_{MAX} = \{1 + \exp[(V_{1/2} - V_m)/k]\}^{-1}$, $I/I_{MAX} = G/G_{MAX} = \{1 + \exp[(V_m - V_{1/2})/k]\}^{-1}$, V_m 为各钳制电压, V_{1/2} 为 50% 通道激活或失活时的膜电位, k 为斜率因子, 1/k 为方程的斜率,反映通道的激活、失活速率。双脉冲电压刺激程序用于记录各通道的失活后恢复,即先后给予细胞两个相同的去极化脉冲刺激,通过改变间隔时间(Δt)记录所诱发的电流。以 Δt 为横坐标,以不同间隔时间脉冲刺激诱发的峰值电流与后脉冲刺激所诱发的峰值电流

的比值(I/I_{MAX})为纵坐标,绘制恢复曲线,单指数方程拟合曲线: $I/I_{MAX} = 1 - \exp(-t/\tau)$, τ 为恢复时间常数,反映通道失活后的恢复速率。电流钳模式下记录心房肌细胞的APD,并计算、比较APD₉₀及APD₅₀。膜片钳放大器的调控使用MultiClamp700B系统,Clampex10.3软件用于脉冲刺激输出和记录心房肌细胞的膜电位、膜电容、离子流等数据,参数的测量、计算使用Clampfit10.3软件。

1.9 统计学处理

计量资料以均值±标准差($\bar{x} \pm s_x$)表示,SPSS 20.0、Excel2016、prism5.0、Origin8.5软件用于数据的统计分析,两组比较采用独立样本 t 检验。

2 结果

2.1 基础参数、超声与AF诱发率比较

与对照组比较,模型组大鼠心脏质量明显增加,MPAP显著升高,MABP升高,AF诱发率明显增加(表1)。

Tab. 1 Basic characteristics, echocardiographic parameters and AF susceptibility ($\bar{x} \pm s_x$, $n=20$)

Parameters	Control	CIH
Body weight (g)	398.38±8.87	388.95±9.22
Heart weight (g)	1.20±0.03	1.38±0.04**
LAD (mm)	3.53±0.10	3.71±0.08
LVEDD (mm)	6.36±0.29	6.49±0.17
LVESD (mm)	3.97±0.23	3.96±0.19
PAT (ms)	37.55±0.86	26.41±0.88**
LVEF (%)	69.49±2.02	68.99±2.55
MPAP (mmHg)	62.10±0.39	67.10±0.40**
MABP (%)	103.60±8.15	120.30±8.12
AF susceptibility (%)	24.00±4.52	36.00±3.40*

LAD: Left atria diameter; LVEDD: Left ventricular end diastolic dimension; LVESD: Left ventricular end systolic dimension; PAT: Pulmonary artery acceleration time; LVEF: Left ventricular ejection fraction; MPAP: Mean pulmonary artery pressure; MABP: Mean arterial blood pressure; AF: Atrial fibrillation

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control

2.2 两组大鼠心房胶原沉积分数比较

如表2、图1所示,与对照组相比,模型组大鼠的心房组织胶原沉积分数明显增加,两组大鼠左心房胶原分数分别为(1.50±0.23)%和(6.40±0.84)%,右房的胶原分数分别为(1.58±0.22)%和(7.38±1.02)%。

Tab. 2 Atrial collagen volume fraction ($\bar{x} \pm s_x$, $n=5$)

Parameters	Control	CIH
LA CVF (%)	1.50±0.23	6.40±0.84**
RA CVF (%)	1.58±0.22	7.38±1.02**

LA: Left atrial; RA: Right atrial; CVF: Collagen volume fraction

** $P<0.01$ vs control

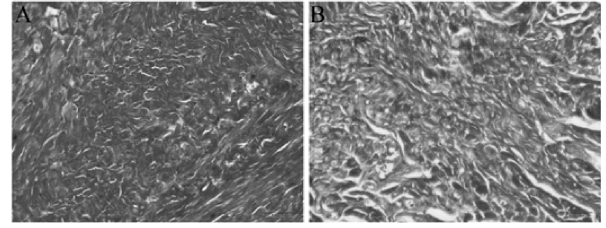


Fig. 1 Representative photomicrographs of Masson's trichrome stained atrial sections from rats in Control (A) and CIH (B) groups

2.3 两组大鼠心房组织Na_v1.5、Ca_v1.2及K_v4.3蛋白表达水平比较

如表3、图2所示,与对照组相比,模型组大鼠Ca_v1.2及K_v4.3蛋白表达水平降低,Na_v1.5的表达水平呈现降低趋势,未达到统计学差异。

Tab. 3 Ratio of target proteins to reference β -actin ($\bar{x} \pm s_x$, $n=10$)

Parameters	Control	CIH
Na _v 1.5/ β -actin (LA)	0.95±0.31	0.85±0.46
Na _v 1.5/ β -actin (RA)	0.87±0.41	0.85±0.39
Ca _v 1.2/ β -actin (LA)	1.21±0.57	0.77±0.39*
Ca _v 1.2/ β -actin (RA)	1.14±0.55	0.72±0.43*
K _v 4.3/ β -actin (LA)	0.89±0.42	0.63±0.20
K _v 4.3/ β -actin (RA)	0.98±0.47	0.54±0.24*

LA: Left atrial; RA: Right atrial

* $P<0.05$ vs control

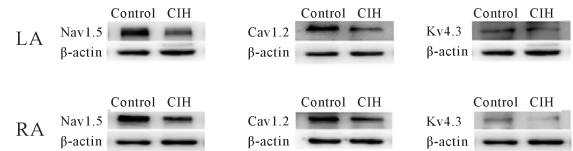


Fig. 2 Protein levels of Na_v1.5, Ca_v1.2, K_v4.3 confirmed by Western blot in two groups

LA: Left atrial; RA: Right atrial

2.4 两组大鼠心房肌细胞I_{Na}电流密度及通道动力学参数比较

如表4、图3所示,细胞外液为低钠外液,与对照组相比,模型组大鼠心房肌细胞I_{Na}峰值电流密度降低,Na_v1.5激活曲线无明显偏移,失活曲线左移,恢复曲线右移,电流密度及动力学参数的变化无统计学差异。

2.5 两组大鼠心房肌细胞I_{Ca-L}电流密度及通道动力学参数比较

如表5、图4所示,与对照组相比,模型组大鼠心房肌细胞I_{Ca-L}电流密度明显降低。Ca_v1.2激活曲线右移,失活曲线左移,恢复曲线右移,动力学参数的变化无统计学差异。

Tab. 4 Current density and kinetics of $I_{Na_v1.5}$ ($\bar{x} \pm s_x$, $n = 30$)

Parameters	Control	CIH
C_m (pF)	70.95±4.62	74.17±3.86
-60mV peak current density (pA/pF)	-40.05±2.45	-38.84±2.71
-50mV peak current density (pA/pF)	-41.55±1.62	-38.76±1.79
$V_{1/2act}$ (mV)	-68.68±0.20	-68.71±0.22
k_{act}	2.14±0.16	2.10±0.22
$V_{1/2inact}$ (mV)	-74.13±1.84	-76.34±1.65
k_{inact}	8.56±0.33	8.17±0.35
τ (ms)	9.53±1.12	10.30±1.03

C_m : Membrane capacitance; $V_{1/2act}$: Half maximum activation potential; $V_{1/2inact}$: Half maximum inactivation potential; k_{act} : Slope factor of activation curve, k_{inact} : Slope factor of inactivation curve; τ : Recovery time constant; n : The number of detected cells

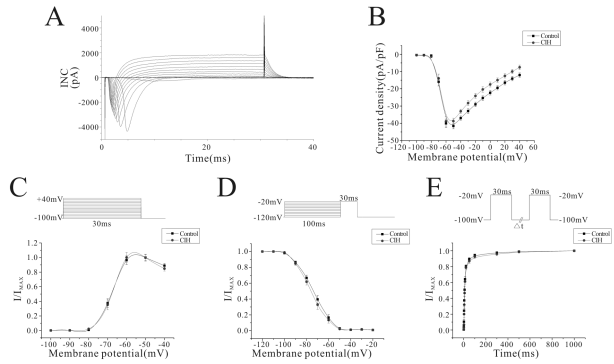


Fig. 3 Effects of CIH on $I_{Na_v1.5}$ in Low Na^+ extracellular solution

A: Representative example of recorded I_{Na} curves; B: Comparison of I-V curves of I_{Na} between two groups; C: Comparison of activation curves of I_{Na} between two groups; D: Comparison of inactivation curves of I_{Na} between two groups; E: Comparison of recovery curves of I_{Na} between two groups. The dual-pulse stimulation interval (Δt) is 0.3, 0.5, 1, 2, 3, 5, 8, 12, 20, 50, 100, 300, 500, 1000 ms, respectively

Tab. 5 Current density and kinetics of $I_{Ca_v1.2}$ ($\bar{x} \pm s_x$, $n = 30$)

Parameters	Control	CIH
C_m (pF)	71.55±3.59	76.63±3.95
+10mV peak current density (pA/pF)	-6.32±0.36	-4.07±0.39**
$V_{1/2act}$ (mV)	-12.09±1.11	-10.95±0.95
k_{act}	4.82±0.22	4.98±0.19
$V_{1/2inact}$ (mV)	-28.26±1.14	-29.32±0.68
k_{inact}	4.85±0.27	4.72±0.45
τ (ms)	600.16±54.38	642.20±49.63

C_m : Membrane capacitance; $V_{1/2act}$: Half maximum activation potential; $V_{1/2inact}$: Half maximum inactivation potential; k_{act} : Slope factor of activation curve, k_{inact} : Slope factor of inactivation curve; τ : Recovery time constant; n : The number of detected cells

** $P < 0.01$ vs control

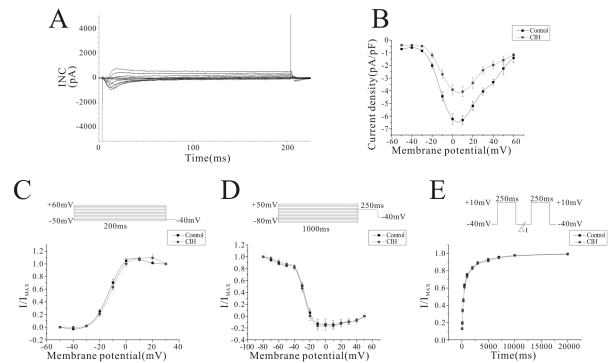


Fig. 4 Effects of CIH on $I_{Ca_v1.2}$ in Physiological Tyrode's solution

A: Representative example of recorded I_{Ca-L} curves; B: Comparison of I-V curves of I_{Ca-L} between two groups; C: Comparison of activation curves of I_{Ca-L} between two groups; D: Comparison of inactivation curves of I_{Ca-L} between two groups; E: Comparison of recovery curves of I_{Ca-L} between two groups. The dual-pulse stimulation interval (Δt) is 50, 100, 160, 300, 500, 1 000, 2 000, 3 000, 5 000, 7 000, 10 000, 20 000 ms, respectively

2.6 两组大鼠心房肌细胞 I_{to} 电流密度及 $K_v4.3$ 动力学参数比较

如表6、图5所示,与对照组相比,模型组大鼠心房肌细胞 I_{to} 峰值电流密度明显降低。 $K_v4.3$ 激活曲线左移,失活曲线左移,恢复曲线右移,动力学参数的变化无统计学差异。

Tab. 6 Current density and kinetics of $K_v4.3$ ($\bar{x} \pm s_x$, $n = 30$)

Parameters	Control	CIH
C_m (pF)	73.95±1.60	72.62±2.06
+60mV peak current density (pA/pF)	18.79±0.61	16.78±0.47**
$V_{1/2act}$ (mV)	11.21±2.31	7.84±1.78
k_{act}	14.83±1.33	13.95±0.66
$V_{1/2inact}$ (mV)	-28.47±3.02	-31.64±1.66
k_{inact}	7.99±0.82	7.43±0.54
τ (ms)	43.85±3.89	53.80±3.89

C_m : Membrane capacitance; $V_{1/2act}$: Half maximum activation potential; $V_{1/2inact}$: Half maximum inactivation potential; k_{act} : Slope factor of activation curve, k_{inact} : Slope factor of inactivation curve; τ : Recovery time constant; n : The number of detected cells

** $P < 0.01$ vs control

2.7 两组大鼠心房肌细胞 APD 比较

如表7所示,与对照组的大鼠相比,模型组大鼠心房肌细胞 APD_{90} 、 APD_{50} 呈现延长趋势,未达到统计学差异。

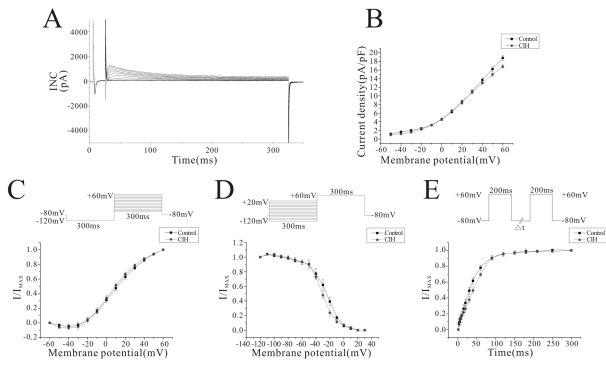


Fig. 5 Effects of CIH on $K_v4.3$ in Physiological Tyrode's solution. A: Representative example of recorded I_{to} curves; B: Comparison of I-V curves of I_{to} between two groups; C: Comparison of activation curves of I_{to} between two groups; D: Comparison of inactivation curves of I_{to} between two groups; E: Comparison of recovery curves of I_{to} between two groups. The dual-pulse stimulation interval (Δt) is 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 40, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 250, 300 ms, respectively

Tab. 7 Comparison of RMP and APD between two groups ($\bar{x} \pm s_x$, $n = 50$)

Parameters	Control	CIH
RMP (mV)	-57.37 \pm 1.95	-51.52 \pm 2.25
APD ₉₀ (ms)	35.80 \pm 1.52	40.38 \pm 2.27
APD ₅₀ (ms)	10.58 \pm 0.53	11.51 \pm 0.57

RMP; Resting membrane potential; APD; Action potential duration; n; The number of detected cells

3 讨论

心脏跳动是各种心肌细胞电、机械活动协同完成的过程,心肌细胞在接受阈上刺激后,钠通道(Na_v)首先激活开放, Na^+ 内流生成0期去极化电流(I_{Na}),之后瞬时外向钾通道激活开放, K^+ 外流产生复极电流(I_{to}),即快速复极初期(1期),2期L型钙通道占据主导,内向电流 I_{Ca-L} 延缓复极形成平台期,钙通道(Ca_v)失活后延迟外向钾电流(I_{Ks} 、 I_{Kr} 、 I_{Kur})为快速复极期(3期)的主要电流。通道激活后在一定时间内接受刺激不再激活,即通道的不应期。心脏正常节律的维持依靠离子通道有序的电活动,通道状态改变是动力学、离子流失衡的重要因素, $Na_v1.5/SCN5A$ 、 $Ca_v1.2/CACNA1C$ 、 $K_v4.3/KCND3$ 分别定位于3q21、12p13、1p13,分别构成心脏中的快钠通道、L型钙通道、瞬时外向钾通道。研究表明,通道基因的突变与多种心律失常的发生密切相关,如AF、Brugada综合征、长QT综合征、病态窦房结综合征以及进行性传导障碍等^[7]。AF的机制至今尚未十分明确,但心房的结构重构和电重构是AF发生

发展的重要基质,因此干预AF的心房重构可能是其防治的重要切入点^[8]。此外,CIH促进AF进展的分子及电生理机制有待进一步探究,尤其是心肌细胞离子通道状态的改变仍需系统的研究^[9]。我们的研究表明,CIH可促进大鼠心房组织胶原纤维沉积、AF易感性增加,在此基础上,我们进一步探究CIH促进心房重构的离子及分子机制。

钠通道是可兴奋细胞产生和传导AP的基础,与跟多种离子通道疾病的发生密切相关^[10],相关研究表明,多个影响 Na_v 活性的基因与AF的发生发展相关,例如SCN1B、SCN2B、SCN3B、SCN5A, I_{Na} 的改变可促进异位电活动、增加心肌复极离散度、影响不应期,是其促进AF发生发展的重要机制^[11]。我们结果表明,模型组 $Na_v1.5$ 表达水平及 I_{Na} 峰值电流密度呈现降低趋势,可能是CIH促进AF发生、维持的原因。Wang等^[12]利用犬心房快速起搏AF模型探究心房肌细胞 I_{Na} 的变化,结果显示,快速起搏犬心房2周后,心房肌细胞 I_{Na} 电流密度明显降低。唐等^[13]通过心衰大鼠模型研究心房肌细胞 I_{Na} 的变化,结果表明 I_{Na} 峰值电流密度降低、恢复时间延长是心功能不全的重要病理生理机制,而干预药物咪达普利具有改善 I_{Na} 的作用。Henry等^[14]利用高龄大鼠模型研究松弛素对心肌细胞 I_{Na} 的影响,研究表明,松弛素可减轻心房纤维化的进展,并在此基础上增加心房肌细胞 I_{Na} 电流密度,进而AF诱发率有所改善,这些研究表明 I_{Na} 的变化参与AF的发生与维持。

心肌中主要为 $Ca_v1.2$,其内向电流时程长,呈Long型电流特征,又称“心肌L型钙通道”, $Ca_v1.2$ 激活后选择性允许 Ca^{2+} 内流(I_{Ca-L}),同时激活ryanodine receptor 2(RyR2)使肌浆网释放 Ca^{2+} ,对心肌细胞而言, I_{Ca-L} 起着兴奋-收缩耦联、信号传导等重要作用。相关研究表明, $Ca_v1.2$ 的变化使 I_{Ca-L} 改变,进而影响AP,尤其在伴有 Na^+ 、 K^+ 紊乱的情况下,易导致早期后除极(EADs)和延迟后除极(DADs),是AF及其他多种心律失常发生的机制。Liu等^[15]通过建立糖尿病兔心房重构模型探究心房肌细胞 I_{Ca-L} 、 I_{Na} 的变化情况,研究表明,心房组织的胶原沉积增加、 I_{Na} 降低、 I_{Ca-L} 增加可能是促进糖尿病促进AF的机制。我们的研究表明,心房肌细胞 I_{Ca-L} 及 $Ca_v1.2$ 表达的降低使AF易于诱发与维持,是CIH促进AF发生、维持、进展的离子及分子机制。

钾通道是目前亚型最多、作用最为复杂的离子通道,多种钾通道在心律失常的发生发展中起着重要调控作用,也是常见的干预靶点, $K_v4.3$ 在心脏组

织高表达,构成瞬时外向钾电流通道的,在 AP 1 期通道开放生成 I_{to} ,是复极过程重要的离子流,相关研究表明,抑制心房、心室肌细胞的 $K_v4.3$ 是治疗心律失常的重要靶点^[16]。Bosch 等^[17]对比窦性心律与 AF 患者心房肌细胞的 I_{Ca-L} 、 I_{to} 的变化,与窦律的患者相比,AF 患者心房肌细胞 I_{Ca-L} 、 I_{to} 明显降低,与我们的研究结果一致。葛等^[18]的研究表明,TASK-1 表达水平及电流密度的增加在 AF 的病理生理过程中起着重要作用,其通过影响 APD 使 AF 易于维持,而 DHA 可通过调节 TASK-1 的表达进而缩短 AF。此外,多种调控通道亚基的蛋白参与 AF 的病理生理过程,田等^[19]的研究表明,钙激活氯通道蛋白 ANO1 参与心肌成纤维细胞的分化过程,蛋白的表达水平参与调节心肌纤维化进程,在心房重构中起着重要作用。目前对于 AF 心房重构的机制仍待进一步研究,各项临床及基础研究探索心房肌细胞离子通道变化的结果存在异质性^[20],在 CIH 导致的大鼠心房重构中,通道亚基表达水平的变化,延缓复极的 I_{Na} 、 I_{Ca-L} 降低,促进复极的 I_{to} 降低,APD 呈延长趋势,提示 AP3 期其他 I_K 的降低,这些变化可能是 CIH 促进 AF 的机制。

【参考文献】

- [1] Weng LC, Preis SR, Hulme OL, et al. Genetic predisposition, clinical risk factor burden, and lifetime risk of atrial fibrillation[J]. *Circulation*, 2018, 137(10): 1027-1038.
- [2] Perger E, Pengo MF, Lombardi C. Hypertension and atrial fibrillation in obstructive sleep apnea: Is it a menopause issue? [J]. *Maturitas*, 2019, 124: 32-34.
- [3] Benjafield AV, Ayas NT, Eastwood PR, et al. Estimation of the global prevalence and burden of obstructive sleep apnoea: a literature-based analysis[J]. *Lancet Respir Med*, 2019, 7(8): 687-698.
- [4] Hohl M, Linz B, Böhm M, et al. Obstructive sleep apnea and atrial arrhythmogenesis [J]. *Curr Cardiol Rev*, 2014, 10(4): 362-368.
- [5] Jalife J, Kaur K. Atrial remodeling, fibrosis, and atrial fibrillation[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2015, 25(6): 475-484.
- [6] 关兵才,张海林,李之望,等. 细胞电生理学基本原理与膜片钳技术[M]. 2013 版,北京科学出版社.
- [7] Dehghani-Samani A, Madreseh-Ghahfarokhi S, Dehghani-Samani A. Mutations of voltage-gated ionic channels and risk of severe cardiac arrhythmias [J]. *Acta Cardiol Sin*, 2019, 35(2): 99-110.
- [8] Dun W, Boyden PA. Aged atria; electrical remodeling conducive to atrial fibrillation[J]. *J Interv Card Electrophysiol*, 2009, 25(1): 9-18.
- [9] Zhang K, Ma Z, Wang W, et al. Effect of doxycycline on chronic intermittent hypoxia-induced atrial remodeling in rats[J]. *Herz*, 2018, 45(7): 668-675.
- [10] Savio-Galimberti E, Argenziano M, Antzelevitch C. Cardiac arrhythmias related to sodium channel dysfunction [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2018, 246: 331-354.
- [11] Hayashi K, Tada H, Yamagishi M. The genetics of atrial fibrillation[J]. *Curr Opin Cardiol*, 2017, 32(1): 10-16.
- [12] Wang X, Li G. Irbesartan prevents sodium channel remodeling in a canine model of atrial fibrillation[J]. *J Renin Angio Aldo Syst*, 2018, 19(1): 1-8.
- [13] 唐惠芳,周斐然,邓春玉,等. 咪达普利对舒张功能不全大鼠心房肌细胞钠通道的影响[J]. 实用医学杂志, 2013, 29(9): 1403-1405.
- [14] Henry BL, Gabris B, Li Q, et al. Relaxin suppresses atrial fibrillation in aged rats by reversing fibrosis and up-regulating Na^+ channels[J]. *Heart Rhythm*, 2016, 13(4): 983-991.
- [15] Liu C, Liu R, Fu H, et al. Pioglitazone attenuates atrial remodeling and vulnerability to atrial fibrillation in alloxan-induced diabetic rabbits[J]. *Cardiovasc Ther*, 2017, 35(5): e12284-12293.
- [16] Cheng H, Cannell MB, Hancox JC. Differential responses of rabbit ventricular and atrial transient outward current (Ito) to the Ito modulator NS5806[J]. *Physiol Rep*, 2017, 5(5): e13172-13188.
- [17] Bosch RF, Zeng X, Grammer JB, et al. Ionic mechanisms of electrical remodeling in human atrial fibrillation [J]. *Cardiovasc Res*, 1999, 44(1): 121-131.
- [18] 葛敏,单锋,唐碧,等. 二十二碳六烯酸对心房颤动大鼠心房肌生理改变及双孔钾通道 TASK-1 蛋白表达的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 2016, 32(2): 128-131.
- [19] 田香勤,谭朝阳,李娜娜,等. 钙激活氯通道蛋白 ANO1 在心肌成纤维细胞分化过程中的表达及其钙激活氯通道电生理特性变化[J]. 中国应用生理学杂志, 2020, 36(4): 358-362.
- [20] Workman AJ, Kane KA, Rankin AC. Cellular bases for human atrial fibrillation[J]. *Heart Rhythm*, 2008, 5(6 Suppl): S1-6.