

· 实验研究 ·

ZP123 可预防右美托咪定延长心肌复极时程
所致的负性变频效应

余玉琦 高鸿 张凯强 李惠 刘艳秋 王冬婷

【摘要】 目的 探讨缝隙连接改造剂 ZP123 对右美托咪定诱发鼠离体心脏复极时程延长所致的负性变频效应。**方法** 健康成年 SD 大鼠 18 只,雌雄不拘,体重(300±30)g,制备 Langendorff 离体心脏灌注模型,K-H 液平衡灌注 15 min 后,随机分为三组,每组 6 只:空白对照组(C 组)继续灌注 37℃ K-H 液 30 min;右美托咪定组(D 组)灌注含 50 ng/ml 右美托咪定的 K-H 液 30 min,右美托咪定+ZP123 组(ZD 组)灌注含 50 ng/ml 右美托咪定+80 nmol/L ZP123 的 K-H 液 30 min。于平衡灌注 15 min(T_0)、继续灌注 15 min(T_1)、30 min(T_2)时记录 HR 和左心室心肌单相动作电位(MAP),计算 MAP 复极 50%、90%的时程(MAPD₅₀、MAPD₉₀)、单相动作电位振幅(MAPA)和最大去极化速度(V_{max})。**结果** 与 T_0 时比较, T_1 、 T_2 时 D 组 HR 明显减慢($P<0.05$), T_1 、 T_2 时 D 组 HR 明显慢于 C 组和 ZD 组($P<0.05$)。与 T_0 时比较, T_1 、 T_2 时 D 组心肌 MAPD₅₀、MAPD₉₀ 明显延长($P<0.05$); T_1 、 T_2 时 D 组心肌 MAPD₅₀、MAPD₉₀ 明显长于 C 组和 ZD 组($P<0.05$)。三组心肌内外两层膜 MAPA 和 V_{max} 组间组内差异均无统计学意义。**结论** 缝隙连接改造剂 ZP123 通过缩短心肌单相动作电位复极的时程从而拮抗右美托咪定诱发的鼠离体心脏的负性变频效应。

【关键词】 缝隙连接改造剂;右美托咪定;单相动作电位

Efficacy of rotigaptide on prevention of negative chronotropic effect caused by dexmedetomidine lengthening myocardial repolarization duration SHE Yuqi, GAO Hong, ZHANG Kaiqiang, LI Hui, LIU Yanqiu, WANG Dongting. Guizhou Graduate Workstation of Anesthesiology Professional Degree Anesthesiology College, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China
Corresponding author: GAO Hong, Email: 2169617@qq.com

【Abstract】 Objective To evaluate efficacy of rotigaptide ZP123 on prevention of negative chronotropic effect caused by dexmedetomidine lengthening repolarization duration of the isolated rat hearts. **Methods** Eighteen healthy adult SD rats of either gender, weighing (300±30) g, were prepared isolated heart perfusion model by Langendorff. After 15 min perfusion and balance of K-H fluid, the isolated hearts were randomly divided into 3 groups ($n=6$ each): The hearts were continuously perfused for 30 min with 37℃ K-H solution in control group (group C), with dexmedetomidine 50 ng/ml in dexmedetomidine group (group D), or with rotigaptide 80 nmol/L combined with dexmedetomidine 50 ng/ml in rotigaptide combined with dexmedetomidine group (group ZD). In the whole Langendorff-perfused hearts, at the end of balanced infusion for 15 min (T_0) and at 15(T_1), 30(T_2) min of continued perfusion with K-H solution, the monophasic action potential (MAP) and heart rate (HR) were recorded from left anterior free wall, MAP duration at 50% repolarization (MAPD₅₀) and at 90% repolarization (MAPD₉₀), monophasic action potential amplitude (MAPA) and maximal velocity (V_{max}) were calculated. **Results** Compared with T_0 , HR in group D was significantly declined at T_1 , T_2 ; MAPD₉₀ and MAPD₅₀ in group D were significantly increased at T_1 , T_2 ($P<0.05$). Compared with groups C and ZD, HR in group D was significantly declined at T_1 , T_2 ; MAPD₉₀ and MAPD₅₀ in group D were significantly increased at T_1 , T_2 ($P<0.05$). There was no significant difference in MAPA and V_{max} between the three groups. **Conclusion** Rotigaptide antagonizes negative chronotropic effect induced by dexmedetomidine through shortening monophasic action potential duration in the myocardium of left ventricle of the isolated rat hearts.

【Key words】 Rotigaptide; Dexmedetomidine; Monophasic action potentials

基金项目:贵阳市科技计划项目(筑科合同[20151001]社 31 号)

作者单位:550004 贵阳市,贵州省麻醉学专业学位研究生工作站 贵州医科大学麻醉学院(余玉琦、张凯强、李惠、王冬婷);贵州医科大学附属医院麻醉科(高鸿、刘艳秋)

通信作者:高鸿,Email: 2169617@qq.com

右美托咪定是临床上常用的麻醉辅助药,前期研究表明,右美托咪定可导致心动过缓,其负性变频作用可能与延长动作电位时程有关^[1]。据文献报道,缝隙连接蛋白 Cx43 的表达降低是动作电位时程延长的可能机制之一^[2]。缝隙连接改造剂 ZP123 是一种新颖的、高度稳定的类似天然抗心律失常肽,它可改善药物引起的 Cx43 表达的降低,加快传导速度^[3],其是否也能改善右美托咪定延长动作电位时程所致的心率减慢,目前未见相关报道。因此,本研究以单相动作电位技术为研究方法,观察 ZP123 对右美托咪定延长心肌复极时程所致的负性变频效应的影响,为临床提供参考。

材料与方 法

动物选择及动物模型的制备 健康成年 SD 大鼠,雌雄不拘,体重(300±30)g,由贵州医科大学实验动物中心提供。以 3% 戊巴比妥钠溶液 50 mg/kg 行腹腔注射麻醉,开胸迅速取出心脏,置于 4℃ K-H 液[成分(mmol/L): NaCl 118.0、KCl 4.7、MgSO₄·7H₂O 1.2、NaHCO₃ 25.0、KH₂PO₄ 1.2、CaCl₂ 2.5、葡萄糖 10.0]中修剪,显露主动脉并插管,连接 Langendorff 装置,用 95% O₂-5% CO₂ 混合气体平衡的 K-H 液于 37℃ 下进行非循环式逆行灌注(注意:所有动物均给予普通 K-H 液灌流,灌流液保持 37℃ 恒温,灌流速度 6~8 ml/min,从取出心脏到实现灌流在 2 min 内完成),心脏恢复灌注后数秒内复跳,灌注约 10 min 心跳恢复正常为模型制备成功^[4]。

动物分组及给药 取 Langendorff 离体心脏灌注模型制备成功的心脏 18 个,采用随机数字表法分为三组:对照组(C 组)、右美托咪定组(D 组)和右美托咪定+ZP123 组(ZD 组)。采用 37℃ K-H 液平衡灌注 15 min 后, C 组继续灌注 37℃ K-H 液 30 min; D 组灌注含 50 ng/ml 右美托咪定(批号: 14070232)的 K-H 液 30 min; ZD 组灌注含 50 ng/ml 右美托咪定 + 80 nmol/L ZP123 (批号: KB495014)的 K-H 液 30 min。通过恒温槽及热交换器控制 K-H 液温度为 37℃。

指标检测 采用 BL-420 生物机能实验系统测定左心室前壁外膜层、内膜层心肌单相动作电位(monophasic action potential, MAP),时间常数为 0.1 s,滤波常数为 450 Hz,增益值为 1 000。用外壳包被有聚四氟乙烯的银丝(直径 0.3 mm)参照文献[1]自制非极化 Ag-AgCl MAP 心外膜-心内膜复合

电极,心脏复跳后立即在左心室前游离壁置入 MAP 心外膜-心内膜复合电极,本实验所选大鼠左室前壁厚度约为 2 mm,因此心外膜-心内膜复合 MAP 记录电极的两个电极尖端的垂直长度约相差 2 mm(心内膜记录电极长于心外膜记录电极),即当心外膜电极触及心外膜时,心内膜电极触及心内膜,参考电极固定于主动脉根部。分别于平衡灌注 15 min(T₀)、继续灌注 15 min(T₁)、30 min(T₂)时记录 HR 和 MAP,每 5 分钟连续测定 5 次,取其平均值,计算 MAP 复极 50%、90% 的时程(MAPD₅₀、MAPD₉₀)、单相动作电位振幅(MAPA)和最大去极化速度(V_{max})。记录早期后除极、延迟后除极及心律失常的发生情况。

统计分析 采用 SPSS 22.0 统计学软件进行数据分析。正态分布的计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,组内两两比较采用 LSD 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

与 T₀ 时比较, T₁、T₂ 时 D 组 HR 明显减慢($P < 0.05$), T₁、T₂ 时 D 组 HR 明显慢于 C 组和 ZD 组($P < 0.05$)(表 1)。

表 1 三组大鼠不同时点 HR 的比较(次/分, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	T ₀	T ₁	T ₂
C 组	6	219±18	216±22 ^b	213±24 ^b
D 组	6	220±17	190±14 ^a	185±18 ^a
ZD 组	6	235±17	222±15 ^b	217±13 ^b

注:与 T₀ 比较,^a $P < 0.05$;与 D 组比较,^b $P < 0.05$

与 T₀ 时比较, T₁、T₂ 时 D 组心肌 MAPD₅₀、MAPD₉₀ 明显延长($P < 0.05$); T₁、T₂ 时 D 组心肌 MAPD₅₀、MAPD₉₀ 明显长于 C 组和 ZD 组($P < 0.05$)。三组心肌内外两层膜 MAPA 和 V_{max} 组间组内差异均无统计学意义(表 2)。

讨 论

临床研究显示,当右美托咪定血浆浓度达 5.1 ng/ml 时,可明显降低心脏每搏输出量。静脉注射治疗剂量右美托咪定后,心率呈剂量依赖性下降^[5]。人体能耐受的最大血药浓度约为 10~15 ng/ml,前期研究发现,根据动物离体灌注实验剂量 3 倍递增设置原则,高浓度 50 ng/ml 右美托咪定可对家兔心脏电生理产生较大影响,致心率明显减慢。结合前

表 2 三组大鼠不同时点 MAPD₅₀、MAPD₉₀、MAPA 和 V_{max} 的比较 ($\bar{x} \pm s$)

部位	指标	组别	只数	T ₀	T ₁	T ₂
外膜	MAPD ₅₀ (ms)	C 组	6	23.1 ± 1.0	22.7 ± 1.1 ^b	23.1 ± 1.2 ^b
		D 组	6	23.4 ± 1.8	28.4 ± 3.5 ^a	29.2 ± 3.5 ^a
		ZD 组	6	23.4 ± 4.8	22.4 ± 5.4 ^b	22.9 ± 3.7 ^b
	MAPD ₉₀ (ms)	C 组	6	53.4 ± 3.2	54.5 ± 3.8 ^b	54.8 ± 3.7 ^b
		D 组	6	51.9 ± 4.8	62.5 ± 4.3 ^a	64.7 ± 3.5 ^a
		ZD 组	6	51.1 ± 4.8	53.9 ± 6.1 ^b	50.1 ± 5.7 ^b
	MAPA (mV)	C 组	6	7.5 ± 0.8	6.5 ± 1.6	6.4 ± 1.5
		D 组	6	9.3 ± 5.8	6.0 ± 2.8	5.9 ± 2.5
		ZD 组	6	9.3 ± 3.6	7.4 ± 1.8	6.5 ± 2.1
	V _{max} (mV/ms)	C 组	6	2.5 ± 0.3	2.1 ± 0.4	2.2 ± 0.2
		D 组	6	2.6 ± 1.2	2.1 ± 0.7	1.9 ± 0.8
		ZD 组	6	2.6 ± 1.0	2.4 ± 0.7	2.1 ± 0.7
内膜	MAPD ₅₀ (ms)	C 组	6	22.8 ± 2.4	23.1 ± 1.8 ^b	23.0 ± 1.9 ^b
		D 组	6	24.1 ± 2.1	28.3 ± 2.8 ^a	28.6 ± 4.9 ^a
		ZD 组	6	23.4 ± 4.5	23.8 ± 2.8 ^b	21.4 ± 4.8 ^b
	MAPD ₉₀ (ms)	C 组	6	50.1 ± 3.9	49.9 ± 3.2 ^b	50.8 ± 2.7 ^b
		D 组	6	50.7 ± 5.2	60.7 ± 3.2 ^a	63.4 ± 4.3 ^a
		ZD 组	6	51.7 ± 7.1	51.9 ± 7.6 ^b	49.6 ± 5.8 ^b
	MAPA (mV)	C 组	6	8.1 ± 0.9	7.4 ± 2.0	7.2 ± 1.5
		D 组	6	8.7 ± 3.8	6.2 ± 2.9	5.4 ± 2.7
		ZD 组	6	8.5 ± 2.6	7.1 ± 3.2	6.5 ± 2.4
	V _{max} (mV/ms)	C 组	6	2.5 ± 0.7	2.3 ± 0.4	2.4 ± 0.6
		D 组	6	2.3 ± 1.1	1.9 ± 0.6	1.6 ± 0.4
		ZD 组	6	2.5 ± 0.7	2.3 ± 0.6	2.2 ± 0.7

注:与 T₀ 比较,^aP<0.05;与 D 组比较,^bP<0.05

期研究以及预实验,故本研究选择右美托咪定浓度为 50 ng/ml。ZP123 根据药物量效关系参照文献[6,7]设为 80 nmol/L。

ZP123 是一种新颖的、高度稳定的类似天然抗心律失常的肽,可以预防自发性室性心律失常和心肌缺血-再灌注损伤以及延迟毒毛旋花苷介导的传导阻滞,同时它可加快传导速度,抑制电交替的发生,改善低温诱发的室性心律失常^[3,8]。Ni 等^[6]离体细胞酸中毒研究表明,正常情况下 ZP123 并不影响动作电位时程。在右美托咪定所致的负性变频情况下,ZP123 是否对右美托咪定延长心肌复极时程可起到逆转作用,未见报道。本研究以单相动作电位为研究手段,结果显示了 ZP123 对右美托咪定延长心肌复极时程所致的负性变频的拮抗作用。Langendorff 离体心脏灌注模型排除神经、体液因素和心脏前后负荷的影响,可评价药物对心脏的直接作用^[9]。MAP 是群细胞的平均细胞胞外电位,在

形态和时程上准确反映跨膜动作电位,可灵敏反映心肌细胞的除极和复极过程。MAPA、V_{max} 反映动作电位 0 期,主要代表心肌去极化过程中快钠通道开放的程度以及 Na⁺ 内流的速度。本研究结果显示,三组各时点心肌内外两层膜 MAPA 和 V_{max} 差异均无统计学意义,表明 ZP123 复合右美托咪定对心肌细胞去极化过程并无明显影响。

MAPD 反映动作电位 0~3 相,MAPD₅₀ 为复极化达到 50% 的一点到 MAP 上升支的水平距离,主要反映动作电位 2 相平台期,当 Ca²⁺ 内流增加及 K⁺ 外流降低时,动作电位时程 MAPD₅₀ 延长。MAPD₉₀ 为复极化达到 90% 的一点到 MAP 上升支的水平距离,主要反映动作电位 3 相快速复极期,当 I_{Kr} 和 I_{Kl} 受到抑制时会使得 K⁺ 外流减慢,从而延长动作电位时程。本研究结果显示,和 C 组比较,T₁、T₂ 时 D 组 MAPD₅₀、MAPD₉₀ 明显延长,HR 明显减慢。顾春英^[10] 研究显示延长动作电位时程可引起

HR 减慢,本研究结果与其一致。因此,右美托咪定所致的负性变频作用可能与动作电位时程延长有关。但是动作电位时程与 Ca^{2+} 、 K^{+} 等多种因素有关,这些离子可以通过缝隙连接来传递,不排除右美托咪定通过缝隙连接来改变离子通透性,进而促进 Ca^{2+} 内流和抑制 K^{+} 外流,从而延长动作电位时程,减慢 HR。本研究中复合应用 ZP123 与右美托咪定后,MAPD₅₀、MAPD₉₀ 较 D 组缩短,HR 增快;C、ZD 组 MAPD₅₀、MAPD₉₀ 和 HR 差异无统计学意义,结合本研究结果,显示 ZP123 能够逆转右美托咪定引起的动作电位时程延长所致的负性变频效应。据文献报道,细胞内 Ca^{2+} 降低,缝隙连接传导增快,是心率增快的机制之一^[11]。 $\text{I}_{\text{Ca-L}}$ 、 I_{ks} 及 I_{kr} 是 2 相重要电流,ZP123 可能通过激活 I_{ks} 及 I_{kr} ,使 K^{+} 外向电流增加;通过抑制 L 型钙通道,使 Ca^{2+} 内向电流减少,缩短 MAPD₅₀,降低细胞内钙超载,从而缝隙连接传导增快,心率增快。Han 等^[12] 研究显示,当细胞内钙离子浓度超过 320~560 nmol/L 时,缝隙连接开始失偶联,细胞内 Ca^{2+} 浓度降低,缝隙连接偶联增强,心率增快。 I_{ks} 通道又受肾上腺素神经 β 受体调节^[13],当激活 I_{ks} 时,MAPD₅₀ 缩短,HR 增加,在右美托咪定所致的负性变频情况下,ZP123 引起电生理的逆转是否与肾上腺素神经 β 受体有关,有待进一步研究。 I_{kr} 和 I_{kl} 是动作电位 3 相电流,ZP123 缩短 MAPD₉₀ 可能与 I_{kr} 和 I_{kl} 外流增加有关。据文献报道,动作电位时程延长与 Cx43 蛋白的表达减少有关^[2],而 ZP123 又可改善 Cx43 表达的降低,ZP123 对右美托咪定电生理逆转是否与 Cx43 有关,有待进一步研究。

本研究通过使用缝隙连接蛋白 Cx43 的改造剂 ZP123,提出了以缝隙连接 Cx43 为靶目标的预防或治疗方法,观察了其在右美托咪定致心脏负性变频中的改善作用,对临床工作有一定的启示作用,但本研究样本量较少,可能存在偏倚。尽管该结果显示 ZP123 对右美托咪定对心脏电生理具有逆转作用,但具体的机制并不清楚,需要通过分子生物学对 Cx43 蛋白及膜片钳技术对离子通道的检测以进一步验证。

综上所述,缝隙连接改造剂 ZP123 通过缩短心肌单相动作电位复极时程从而拮抗右美托咪定诱发的鼠离体心脏的负性变频效应。

参 考 文 献

- [1] 龙娟,高鸿,李惠,等.不同浓度右美托咪定对离体兔心室肌电生理学特性的影响.临床麻醉学杂志,2015,31(10):1000-1002.
- [2] Sun B, Qi X, Jiang J. Heptanol decreases the incidence of ischemia induced ventricular arrhythmias through altering electrophysiological properties and connexin 43 in rat hearts. Biomed Rep, 2014, 2(3): 349-353.
- [3] Hsieh YC, Lin JC, Hung CY, et al. Gap junction modifier rotigaptide decreases the susceptibility to ventricular arrhythmia by enhancing conduction velocity and suppressing discordant alternans during therapeutic hypothermia in isolated rabbit hearts. Heart Rhythm., 2016, 13(1): 251-261.
- [4] 李华波,陈世健,胡建华,等.儿茶酚胺对慢性心力衰竭大鼠室性心律失常的影响.中国病理生理杂志,2013,29(12):2128-2132.
- [5] Ebert TJ, Hall JE, Barney JA, et al. The effects of increasing plasma concentrations of dexmedetomidine in humans. Anesthesiology, 2000, 93(2): 382-394.
- [6] Ni M, Ruan L, Zhang C. Antiarrhythmic peptide AAP10 prevents arrhythmias induced by protein kinaseC activation in rabbit leftventricular wedges. Int Heart J, 2015, 56(2): 234-238.
- [7] Eloff BC, Gilat E, Wan X, et al. Pharmacological modulation of cardiac gap junctions to enhance cardiac conduction evidence supporting a novel target for antiarrhythmic therapy. Circulation, 2003, 108(25): 3157-3163.
- [8] Pedersen CM, Venkatasubramanian S, Vase H, et al. Rotigaptide protects the myocardium and arterial vasculature from ischaemia reperfusion injury. Br J Clin Pharmacol, 2016, 81(6): 1037-1045.
- [9] 张凯强,高鸿,刘军,等.右美托咪定对家兔离体心脏缺血-再灌注时心肌单相动作电位及跨室壁复极离散度的影响.临床麻醉学杂志,2016,32(2):161-165.
- [10] 顾春英.心肌细胞离子通道与生物电活动.心电图杂志(电子版),2013,2(2):118-121.
- [11] De Vuyst E, Wang N, Decro CK E, et al. Ca^{2+} regulation of connexin 43 hemichannels in C6 glioma and glial cells. Cell Calcium, 2009, 46(3): 176-187.
- [12] Han C, Tavi P, Weckström M. Modulation of action potential by $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in modeled rat atrial and guinea pig ventricular myocytes. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002, 282(3): H1047-H1054.
- [13] Kim SK, Pak HN, Park Y. Synergistic restoring effects of isoproterenol and magnesium on KCNQ1-inhibited bradycardia cell models cultured in microelectrode array. Cardiology, 2014, 128(1): 15-24.

(收稿日期:2016-07-15)