

氯胺酮对人心房肌细胞瞬时外向钾电流的影响

邝素娟, 邓春玉, 李晓红, 刘晓颖, 林秋雄, 单志新, 杨敏, 余细勇*

(广东省人民医院医学研究中心, 广东省心血管病研究所, 广东省医学科学院, 广东 广州 510080)

摘要: 本研究应用全细胞膜片钳技术观察氯胺酮对人心房肌细胞瞬时外向钾电流 (transient outward potassium current, I_{to}) 的影响, 以了解其作用的部分机制。标本取自心脏瓣膜置换病人的右心耳, 采用急性酶解法消化分离人心房肌细胞, 室温下以全细胞膜片钳技术记录 I_{to} , 分别观察 30、100、300 和 1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的氯胺酮对 I_{to} 的作用。实验过程由 pCLAMP 9.0 软件程序发放刺激和采集信号并存储于计算机中。结果表明, 氯胺酮对 I_{to} 电流-电压曲线呈浓度依赖性抑制作用, 在 +50 mV 时, 30、100、300 和 1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的氯胺酮分别阻断 I_{to} 峰电流 ($13.62 \pm 0.04\%$)、($38.92 \pm 0.05\%$)、($72.24 \pm 0.10\%$) 和 ($83.84 \pm 0.05\%$), 其半数有效浓度 (IC_{50}) 为 121 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。但是 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯胺酮对 I_{to} 的激活和失活曲线以及复活曲线均无明显影响。由此得知, 氯胺酮呈浓度依赖性抑制人心房肌细胞瞬时外向钾电流。

关键词: 氯胺酮; 膜片钳技术; 人心房肌细胞; 瞬时外向钾电流

中图分类号: R963

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 07-0849-04

Effect of ketamine on transient outward potassium current of isolated human atrial myocytes

KUANG Su-juan, DENG Chun-yu, LI Xiao-hong, LIU Xiao-ying, LIN Qiu-xiong, SHAN Zhi-xin, YANG Min, YU Xi-yong*

(Medical Research Center of Guangdong General Hospital, Guangdong Provincial Cardiovascular Institute, Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China)

Abstract: The effects of ketamine on transient outward potassium current (I_{to}) of isolated human atrial myocytes were investigated to understand the mechanism of part of its effects by whole-cell patch-clamp. Atrial myocytes were enzymatically isolated from specimens of human atrial appendage obtained from patients under going cardiac valve displacing. I_{to} is recorded in voltage-clamp modes using the patch-clamp technique at room temperature. Currents signals were recorded by an Axopatch 200B amplifier with the Digidata 1322A-pClamp 9.0 data acquisition system. Ketamine decreased I_{to} of human atrial myocytes in a dose-dependent manner. The current-voltage curve was significantly lowered, 30, 100, 300, and 1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ketamine decreased respectively I_{to} current density about ($13.62 \pm 0.04\%$), ($38.92 \pm 0.05\%$), ($72.24 \pm 0.10\%$) and ($83.84 \pm 0.05\%$) at the potential of 50 mV, with an IC_{50} of 121 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. The I_{to} activation curve, inactivation curve and the recovery curve were not altered by ketamine. So, ketamine concentration-dependently decreased I_{to} of human atrial myocytes.

Key words: ketamine; patch-clamp technique; human atrial myocyte; transient outward potassium current

氯胺酮 (ketamine) 是临床常用的静脉全麻药, 其结构的特异性提示可作用于多种受体和离子通道。

近年的研究报道^[1-3], 氯胺酮对人心房肌细胞 L-型钙电流 (I_{Ca})、大鼠心室肌细胞瞬时外向钾电流 (I_{to}) 和内向整流钾电流 (I_{K1}) 有明显的阻滞作用, 从而抑制心肌收缩力, 延长动作电位时程, 导致心率减慢; 而临床使用中常可升高血压, 使心率加快、心输出量增加。存在这种差异, 是种属不同, 还是由于神经体液因素影响所致? 为进一步明确其作用机制, 排除种

收稿日期: 2010-01-12.

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目 (30900610); 广东省自然科学基金博士启动项目 (9451008002003467); 广东省医学科研项目 (A2008010).

*通讯作者 Tel: 86-20-83827812-51156, Fax: 86-20-83769487, E-mail: yuxycn@hotmail.com

属差异,本研究直接以人心肌细胞为模型,使用全细胞膜片钳技术,观察氯胺酮对单个人心肌细胞 I_{to} 的影响,旨在从细胞离子通道水平阐明其作用机制,更好地指导临床用药。

材料与方 法

主要溶液、试剂与仪器 无钙台氏液 ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$): NaCl 136, KCl 5.4, CaCl_2 1.0, NaH_2PO_4 0.33, 葡萄糖 10.0, *N*-2-羧基哌嗪-*N*-2-乙磺酸 (HEPES) 10.0, 用 NaOH 调 pH 至 7.4。KB 液 ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$): KCl 40, KH_2PO_4 20, 谷氨酸钾 (K-glutamate) 50, 牛磺酸 (taurine) 20, 葡萄糖 10, 乙二醇-双四乙酸 (EGTA) 0.5, HEPES 10.0, $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 3.0, 用 KOH 调 pH 至 7.4。细胞外液 ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$): NaCl 136, KCl 5.4, $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.0, NaH_2PO_4 0.33, HEPES 10.0, 葡萄糖 10.0, $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.0, 氯化镉 (CdCl_2) 0.3, 氯化钡 (BaCl_2) 0.5, 用 NaOH 调 pH 至 7.4。电极内液 ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$): KCl 140, $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.0, HEPES 10.0, EGTA 5.0, $\text{Na}_2\text{-ATP}$ 5.0, 用 KOH 调 pH 至 7.2。

II 型胶原酶 (collagenase II)、牛血清白蛋白 (BSA) EGTA、HEPES 和牛磺酸均为上海生工生物工程有限公司产品;蛋白酶 X X IV (Proteinase X X IV)、 BaCl_2 、 CdCl_2 、三磷酸腺苷钠盐 ($\text{Na}_2\text{-ATP}$) 及谷氨酸钾均为美国 Sigma 公司产品。其余试剂均为国产分析纯。

PP830 型电极控制仪 (Narishige 公司, 日本); IX 70 型倒置显微镜 (Olympus 公司, 日本); Axopatch 200B 膜片钳放大器及 DIGIDATA1322A 数模转换器 (Axon 公司, 美国)。

实验标本与单个人心房肌细胞的制备 体外循环下行心脏瓣膜置换的病人,术前心电图显示为窦性心律,年龄 18~65 岁 (男 6 例、女 5 例)。经广东省人民医院医学伦理委员会批准,并与患者签署知情同意书。取上腔静脉插管时切下的右心耳组织约 $4\text{ mm}\times 4\text{ mm}\times 4\text{ mm}$,立即放入预冷 ($4\text{ }^\circ\text{C}$) 高钾心脏停搏液中保存,尽快送回实验室 (约 5~10 min)。迅速将心房肌组织切碎成约 $1\text{ mm}\times 1\text{ mm}\times 1\text{ mm}$ 小块,置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 无钙台氏液中,以磁力搅拌洗涤 4 次,每次 5 min,以除去组织中残存的血液。采用急性两步酶解法分离单个心肌细胞。先用含 II 型胶原酶 ($0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)、蛋白酶 X X IV ($0.1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 BSA ($1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) 的无钙台氏液 10 mL 消化约 40~50 min,待组织块变松软,颜色变淡,再改用含 II 型胶原酶 ($0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 BSA ($1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) 的无钙台氏液 10 mL 消化约 10~20 min,将组织块放入高钾 KB 液 5 mL 中,轻柔吹打至

细胞分散脱落,细胞悬液于 $500\sim 800\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,弃上清液,加入 KB 液 3 mL 重新悬浮细胞,置 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用^[4],4 h 后进行实验。分离细胞的整个过程在 $36.5\text{ }^\circ\text{C}$ 恒温条件下进行。

电极制备 电极拉制前,采用超声波法对玻璃毛胚进行清洗。先用无水乙醇浸泡玻璃电极毛胚,经超声波洗涤约 20 min,再用蒸馏水彻底冲洗干净,最后置于烤箱内烘干备用。使用前于室温下分两步垂直式拉制。电极内液的充灌是先利用毛细作用由电极尖端吸入细胞内液,再用注射器连接微小针头由电极粗端插入尖端作反向充灌,并注意排出电极尖端的气泡。电极充灌后电阻为 2~4 M Ω 。

膜片钳全细胞记录 室温 (25 ± 1) $^\circ\text{C}$ 下吸取数滴分离好的心房肌细胞悬液加入容积约 1.5 mL 的浴池中,平放于倒置显微镜上,约 15 min 待细胞沉底贴壁后,用记录钾电流的细胞外液以 $1.5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速率灌流,洗去细胞碎片及死亡细胞。选取大小适中、横纹清晰无颗粒、长杆状无收缩的单个细胞,进行全细胞膜片钳实验^[5]。利用三维操纵器移动电极并轻压在细胞表面,稍施负压使电极与细胞表面形成高阻封接后破膜,给予电容和串联电阻补偿,形成全细胞记录。实验过程由 pCLAMP 9.0 软件程序发放刺激和采集信号。电流信号经 Ag/AgCl 电极引导,由膜片钳 AXON 200B 放大器放大通过 AD/DA 转换板,存储于计算机内。

数据分析与统计学处理 单个全细胞记录图形用 pCLAMP 9.0 软件进行数据和图形转换;采用 Prism 3.0 软件进行曲线拟合,绘制 I_{to} 电流-电压曲线、激活曲线、失活曲线以及复活曲线,电流密度 (pA/pF) = 电流强度/电容;采用 SPSS10.0 统计学软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,药物作用前、后比较采用自身配对 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1 不同浓度的氯胺酮对 I_{to} 电流-电压曲线的影响

为观察不同浓度的氯胺酮对 I_{to} 电流-电压 ($I-V$) 曲线的影响,形成全细胞模式后,在电压钳模式下记录 I_{to} 电流。钳制电压为 -50 mV ,给予细胞 $-40\sim +50\text{ mV}$,步阶电压为 10 mV 的系列去极化刺激脉冲,脉冲持续时间 300 ms,频率 0.2 Hz,引导出 I_{to} 。记录细胞用药前的电流幅值。然后分别给予含不同浓度氯胺酮 (30、100、300 及 $1\ 000\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的细胞外液灌流细胞,灌流时间约 3 min,记录各用药浓度的电流幅值。计算 I_{to} 抑制率 [I_{to} 抑制率 = (给药前 I_{to} - 给药

后 I_{to} / 给药前 I_{to}]。用电流峰值与去极脉冲末端电流的差值表示 I_{to} , I_{to} 与膜电容的比值得出相对密度。以 I 为 Y 轴, V 为 X 轴, 作出 $I-V$ 曲线。在 +50 mV 时, 30、100、300 和 1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的氯胺酮分别使峰电流从 (10.09 ± 2.17) pA/pF ($n = 5$) 减少到 (8.77 ± 2.26) pA/pF ($n = 5, P > 0.05$)、 (6.23 ± 1.84) pA/pF ($n = 5, P < 0.05$)、 (2.90 ± 1.61) pA/pF ($n = 5, P < 0.05$)、 (1.69 ± 0.84) pA/pF ($n = 5, P < 0.01$); 与给药前相比, 各浓度的氯胺酮分别抑制了 I_{to} 峰电流 $(13.62 \pm 0.04)\%$ 、 $(38.92 \pm 0.05)\%$ 、 $(72.24 \pm 0.10)\%$ 和 $(83.84 \pm 0.05)\%$, 其 IC_{50} 值为 $121 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (图 1)。

2 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯胺酮对 I_{to} 激活和失活曲线的影响

为观察 I_{to} 的激活动力学特征, 将 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯胺酮的 I_{to} 电流-电压 ($I-V$) 曲线结果, 根据公式 $G = I/(V-V_r)$ 转换成膜电导 (其中 G 为电导, V 为膜电位, V_r 为反转电位)。对条件刺激电压作图, 然后采用 Boltzmann 方程 $G/G_{\text{max}} = 1/[1 + \exp(V_{1/2} - V)/k]$ 进行拟合, 得到 I_{to} 激活曲线, 计算半数激活电压 ($V_{1/2}$) 和斜率因子 (k)。给药前 $V_{1/2}$ 为 (22.37 ± 3.42) mV, k 为 (11.48 ± 1.00) mV; 给药后 $V_{1/2}$ 为 (18.20 ± 3.96) mV, k

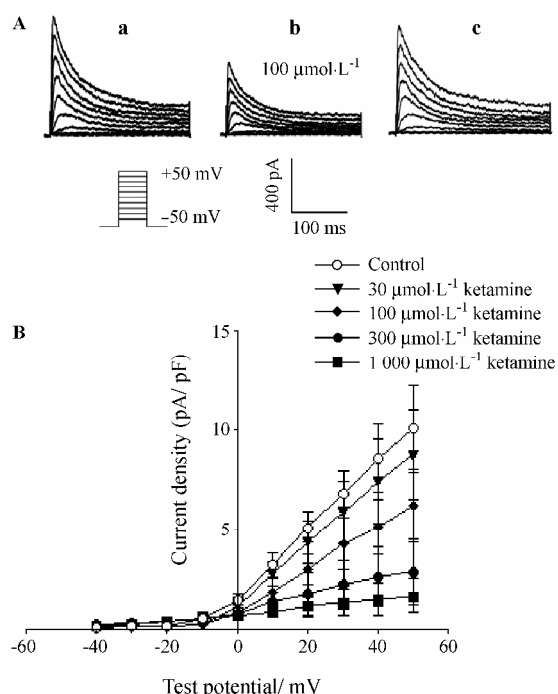


Figure 1 Effect of ketamine on I_{to} of human atrial myocytes. A: I_{to} was elicited by a 300 ms voltage step between -40 and +50 mV from -50 mV, as shown in the inset. Representative voltage-dependent I_{to} recorded with the voltage protocol shown in the inset in an atrial myocyte under control conditions (a), in the presence of $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ketamine (b), and washout of the drug (c). B: Current-voltage ($I-V$) relationships of I_{to} density ($n = 5$) in the absence and presence of ketamine

为 (11.82 ± 1.34) mV。给药前、后激活曲线的 $V_{1/2}$ 和 k 比较, 差异无统计学意义 ($n = 5, P > 0.05$), 见图 2。

采用双脉冲刺激法观察 I_{to} 失活动力学, 保持电压 -80 mV, 给予指令电位从 -100~0 mV, 步阶电压为 10 mV, 脉冲持续时间 1 000 ms 的条件刺激, 然后再给予一个固定到 +50 mV、脉冲持续时间 300 ms 的测试刺激。用 I/I_{max} 与条件刺激电压作图, 并对所得数据用 Boltzmann 方程 $I/I_{\text{max}} = 1/[1 + \exp(V - V_{1/2})/k]$ 进行拟合, 得到 I_{to} 失活曲线, 计算半数失活电压 ($V_{1/2}$) 和 k 。100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯胺酮对失活曲线的影响没有明显的变化。失活曲线给药前 $V_{1/2}$ 为 (-22.66 ± 1.56) mV, k 为 (-4.91 ± 0.57) mV; 给药后 $V_{1/2}$ 为 (-24.82 ± 1.30) mV, k 为 (-6.28 ± 1.58) mV, 给药前、后的变化没有显著性差异 ($n = 5, P > 0.05$), 见图 2。

3 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯胺酮对 I_{to} 复活曲线的影响

选择 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯胺酮, 采用双脉冲刺激法观察失活后再激活的恢复过程。方波脉冲保持电压为 -80 mV, 给予两个相同的测试刺激 (P_1 和 P_2) 去极至 +50 mV, P_1 和 P_2 的间隔时间从 2 ms 开始, 以 10 ms 的步长递增, 以 P_2 峰电流与 P_1 峰电流的比值对应 $P_1 \sim P_2$ 的时间间隔作图, 得出 I_{to} 失活后再激活曲线, 然后求得时间常数 (τ)。给药前 τ 为 (55.82 ± 4.16) ms,

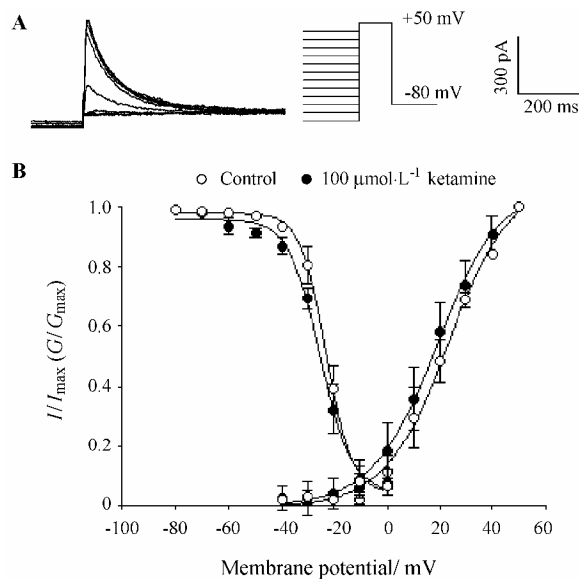


Figure 2 Effect of ketamine ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on the steady-state activation and inactivation of I_{to} of human atrial myocytes. A: Representative current recordings used to determine voltage-dependence of I_{to} inactivation. Cell was conditioned with 1 000 ms prepulses from holding potential of -80 mV to between -100 and 0 mV, then subjected to 300 ms test pulse to 50 mV. B: Mean data for voltage dependence of I_{to} inactivation and activation in the absence (\circ) and presence (\bullet) of $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ketamine. The mean of data shown are fitted with Boltzmann distribution function

给药后 τ 为 (61.93 ± 0.91) ms, 给药前、后变化没有显著性差异 ($n = 5, P > 0.05$), 见图 3。

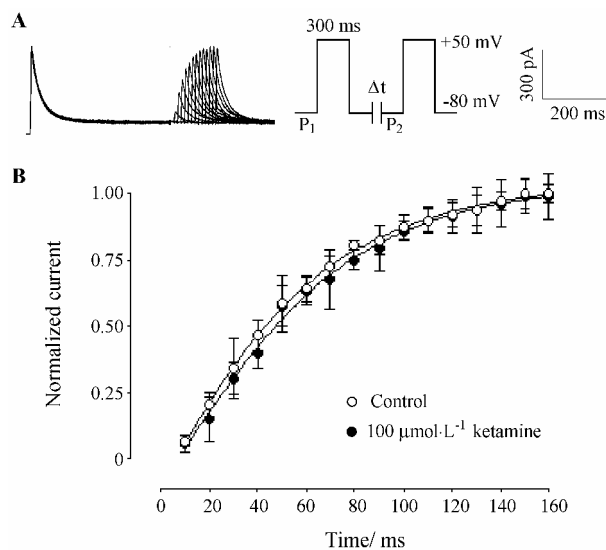


Figure 3 Effect of ketamine ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on the steady-state recovery of I_{to} currents of human atrial myocytes. **A:** Typical currents are superimposed. Kinetics of recovery was assessed with paired 300 ms pulses to 50 mV from a holding potential of -80 mV with various intervals. **B:** Mean data for time course of recovery of I_{to} from inactivation in the absence (\circ) and presence of $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ketamine (\bullet). Data are best-fit to monoexponential function

讨论

本研究结果表明, 氯胺酮呈浓度依赖性抑制人心房肌细胞的 I_{to} 电流, 但对 I_{to} 的激活、失活及复活曲线没有明显的影响。

有研究表明, 在临床诱导麻醉时, 静脉注射 $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 氯胺酮, $2\sim 4$ min 血浆浓度峰值为 $20\sim 110 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ [6]。但由于氯胺酮的蛋白结合率比较低, 游离的血浆浓度可达到 $10\sim 80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 而某些使用常用麻醉剂量后的病人血浆中的浓度也达到 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。为了选择适当的实验浓度, 预实验发现, $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯胺酮对 I_{to} 的抑制作用不太明显, 而在 $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时抑制作用达到最大。因此, 本研究选择 $30\sim 1000 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯胺酮观察对 I_{to} 电流-电压 (I - V) 曲线的影响, 选择抑制 I - V 曲线有统计学意义且接近 IC_{50} 的浓度 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 观察对 I_{to} 稳态激活、失活及复活动力学的影响。实验结果显示, 氯胺酮呈浓度依赖性抑制人心房肌细胞的 I_{to} 钾电流, 并随着浓度增加阻断作用增强。此结果与文献 [2] 报道的氯胺酮抑制大鼠心室肌细胞 I_{to} 实验结果相一致, 证明氯胺酮对心肌有直接抑制作用。而在临床应用中引起的心血

管系统兴奋症状, 可能是通过兴奋交感神经中枢以及抑制血管平滑肌细胞的门控钾通道, 使细胞膜静息电位去极化 [7], 间接发挥兴奋心血管作用, 临床上的表现正是这两方面作用的综合结果。当交感神经活性减弱时如危重病人, 使用氯胺酮则主要表现为心血管系统抑制作用、血压下降、心肌收缩力减弱等。另外, 作者也发现氯胺酮对 I_{to} 的激活、失活及复活曲线均无明显影响。由于目前对其机制的探讨较少, 作者推测可能是分子塞子作用, 其效应是堵住通道, 并不是与其通道本身结合而改变其门控机制。

综上所述, 本研究采用离体单个心肌细胞, 排除了神经体液等因素的影响, 在细胞离子通道水平上, 证实了临床麻醉诱导相关及更高浓度的氯胺酮可呈浓度依赖性抑制单个心肌细胞的外向钾电流 I_{to} , 导致外向钾电流减少, 从而延长动作电位的时程, 对心肌具有直接的抑制作用。

References

- [1] Deng CY, Yu XY, Kuang SJ, et al. Electrophysiological effects of ketamine on human atrial myocytes at therapeutically relevant concentrations [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2008, 35: 1465–1470.
- [2] Huang AJ, Li LH, Chen L, et al. Effect of ketamine on transient outward potassium currents in rats ventricle myocytes [J]. *J Clin Anesthesiol* (临床麻醉学杂志), 2006, 22: 528–530.
- [3] Huang AJ, Li LH, Chen L, et al. Effect of ketamine on inward rectifier potassium currents in isolated rat ventricular myocytes [J]. *Chin J Anesthesiol* (中华麻醉学杂志), 2006, 26: 46–48.
- [4] Wang X, Wu BW, Wu DM. Action of AMP579 and adenosine on potassium or sodium ionic channels in isolated rat and guinea pig ventricular myocytes [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2006, 41: 716–720.
- [5] Qi ZP, Shi SS, Zhao XL, et al. Effect of sophocarpine on HERG K^+ channels [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2008, 43: 44–49.
- [6] Friederich P, Dybek A, Urban BW. Stereospecific interaction of ketamine with nicotinic acetylcholine receptors in human sympathetic ganglion-like SH-SY5Y cells [J]. *Anesthesiology*, 2000, 93: 818–824.
- [7] Kim SH, Bae YM, Sung DJ, et al. Ketamine blocks voltage-gated K^+ channels and causes membrane depolarization in rat mesenteric artery myocytes [J]. *Pflugers Arch-Eur J Physiol*, 2007, 454: 891–902.