

小鼠心房肌瘤 AT-1 细胞在心脏电生理学和药理学研究中的应用

杨 韬*

(Department of Pharmacology, School of Medicine, Vanderbilt University, Nashville, TN 37232-6602, USA)

摘要: 小鼠心房肌瘤细胞(AT-1)系从转基因小鼠体内分化出来的一种心肌样细胞。AT-1 细胞具有许多其他动物心脏细胞的典型特征,例如自发性搏动,多种离子通道和对许多药物起反应等。AT-1 细胞上的主要离子通道包括钠、钙和钾通道。钠通道对阻滞剂河豚毒高度敏感。L型和T型钙通道对典型的阻滞剂起反应。AT-1 细胞上的一种重要外向钾电流是快速激活型迟缓整流外向钾电流(I_{Kr})。 I_{Kr} 是AT-1 细胞上主要的时间依赖性复极化钾电流。研究证明,AT-1 细胞可作为心脏电生理学和药理学研究中的一种非常有用的工具。迄今为止,在AT-1 细胞上已经测试了许多心脏作用和非心脏作用药物的 I_{Kr} 阻滞作用。 I_{Kr} 阻滞药的一种严重副作用是可引起致死性的尖端扭转型室性心动过速。

关键词: 心肌;细胞,AT-1;离子通道;动作电位;药物研究

中图分类号:R965

文献标识码:A

文章编号:1000-300X(2001)02-0105-06

小鼠心房肌瘤细胞(mouse atrial tumor myocytes, AT-1 细胞)系从转基因小鼠体内分化出来的一种心肌样细胞^[1]。这种小鼠心脏细胞上携带着一种转化基因,该基因上的SV40大分子抗原的表达是由心房肽促进子而促发的。最初,原代小鼠身上生长出来的右心房肌瘤细胞在温箱内孵化时并不生长。然而,若将其原代细胞注入宿主小鼠皮下组织,数月后便可长出继发性皮下心房肌瘤。这种良性肌瘤在皮

下可产生节律性波动现象。再将继发性皮下心房肌瘤取出并分离出肌瘤细胞,置入温箱中孵化数周后,便可用于电生理学、药理学和分子生物学等方面的研究。

AT-1 细胞与动物心房肌细胞(尤其是小鼠胚胎心脏)相比,无论是在形态学,还是在组织化学和生物化学等方面均极为相似。这种细胞也可产生自发性动作电位^[1]。作者于1994年起,在美国Vanderbilt大学对AT-1 细胞进行了系列研究,检测出与其他动物心脏细胞上相同的许多离子通道电流,为AT-1 细胞在电生理学、药理学、分子生物学和药物研究上的应用提供了充分的科学依据^[2~7]。在本文中,作者结合自己近年来的工作作一简介。

1 AT-1 细胞上存在着多种心脏细胞样的动作电位和离子通道电流

作者发现,AT-1 细胞在温箱孵化的过程中,除了可产生自律性动作电位外,其动作电位的形状与细胞孵化的时间有关。图1中列举出4种不同形态的AT-1 细胞动作电位。

研究发现,AT-1 细胞的动作电位时程和第2相平台期幅度与L型钙通道电流(下述)大小有明显关系。随着细胞孵化的时间延长,细胞体积逐渐增大,细胞膜上钙通道的密度也增加,使得与动作电位平台期形成有关的L型钙电流幅度增大。在AT-1 细胞上,存在着多种内外向离子通道电流。其中最主要的离子电流成分是内向钠电流,两种钙电流及一种外向钾电流。现分述如下。

1.1 钠离子通道电流(I_{Na})

采用膜片钳全细胞记录技术,在AT-1 细胞上可清楚地记录到一种内向离子电流^[5]。这种电流对经典的钠通道阻滞剂河豚毒(TTX)极为敏感,说明属于钠电流成分(图2)。进一步研究发现,AT-1 细胞上的这种钠电流具有两种与其他动物心脏细胞钠电

收稿日期 2000-12-21 接受日期 2001-01-12

作用简介:杨 韬(1957-),男,湖北武汉市人,高级讲师,研究员,医学博士和哲学博士,主要从事药理学与分子生物学研究。

* 联系作者。Fax:615-322-4707,

E-mail:tao.yang@mcm.vanderbilt.edu

孵化时间为 3 d 以内时,这种钠电流幅度很小,而且其激活与失活过程均很慢,呈现一种未成熟型(im-mature)钠电流.随着孵化时间延长,AT-1 细胞的钠电流幅度增大,其动力学呈现为成熟型(mature),即电流的激活与失活均很快,与其他动物心脏细胞钠电流相似.说明 AT-1 细胞钠电流的变化与其离子通道蛋白质在细胞膜上的发生及表达有关,也可能与细胞在发育生长过程中某些其他因素(如 β 亚单位)的参与影响有关^[8]. (2)AT-1 细胞的钠电流,无论是未成熟型还是成熟型,均对 TTX 的阻滞作用极为敏感.阻滞 AT-1 钠电流所需的 TTX 半数有效浓度仅为 $100 \sim 200 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$.这种浓度比 TTX 阻滞神经细胞上钠电流所需的浓度高 $50 \sim 100$ 倍,但只是阻滞其他动物心脏细胞钠电流所需浓度的约 1%.提示 AT-1 细胞钠通道蛋白质分子结构中对 TTX 敏感的部分与其他组织细胞有所不同,有待进一步研究.

1.2 钙离子通道电流(I_{Ca})

在 AT-1 细胞上,作者也记录到两种激活与失活动力学过程不同的钙通道电流^[4](图 3).一种钙电流激活与失活过程较为缓慢,称为长时间激活型钙电流(L型, I_{Ca-L}).这种钙电流与其他动物细胞上的 I_{Ca-L} 一样,可被经典钙通道阻滞剂,如硝苯地平(nifedipine)和维拉帕米(verapamil)等所阻滞.另一种钙电流是瞬时激活型(T型, I_{Ca-T}),其激活与失活

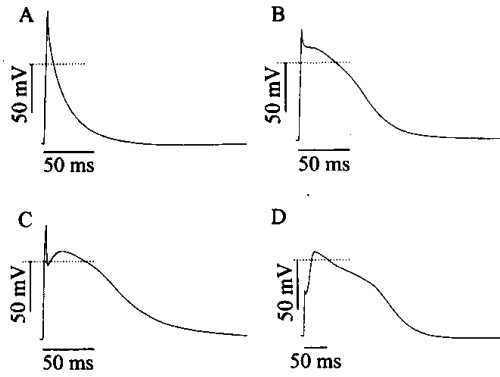


Fig 1. Cardiac action potentials in cultured AT-1 cells. A. rat-like action potential(d 2); B. guinea pig-like action potential(d 4); C. canine-like action potential(d 10); D. canine midmyocardial-like action potential. In AT-1 cells, the action potential duration and the plateau magnitude are associated with the size of L-type calcium current. The dashed line indicates zero potential.

流不同的现象 (1)AT-1 细胞的钠电流动力学(如激活和失活)可随细胞孵化时间长短而不同.当细胞

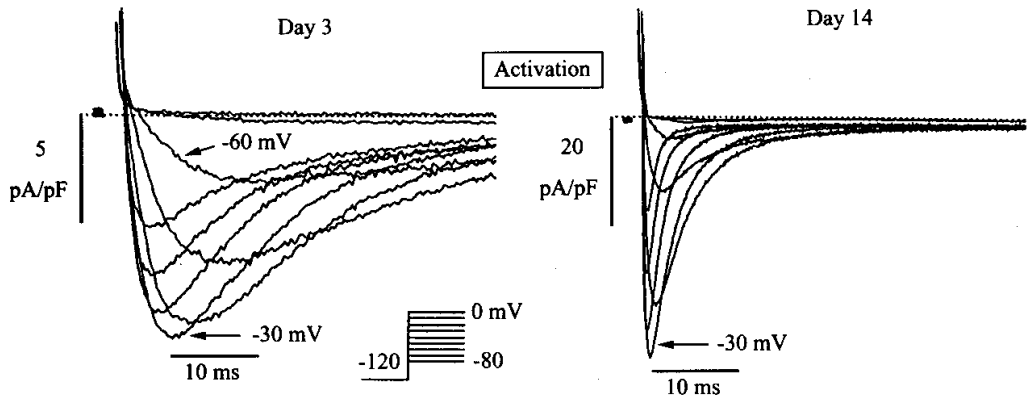


Fig 2. Sodium currents with different kinetics of activation and inactivation. Left panel shows the inward sodium current recorded in an AT-1 cell at d 3 in culture. The current activates and inactivates slowly. Right panel is the current recorded in a cell at d 14 in culture. The current shows fast activation and inactivation with an increased density. The activation threshold for sodium currents with different kinetics is around -60 mV . The currents reach to the maximal level during depolarization to -30 mV . The inward sodium currents are blocked by low concentrations of tetrodotoxin. The whole-cell voltage clamp protocol is shown also.

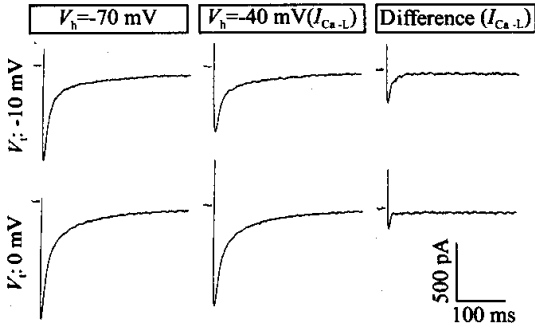


Fig 3. Two types of calcium currents in cultured AT-1 cells. To record calcium currents, sodium current in AT-1 cells was blocked by tetrodotoxin. Two holding potentials (V_h) were used. At V_h of -70 mV, a large inward current was recorded at various testing potentials (V_t); At V_h of -40 mV (to inactivate sodium and T-type calcium currents), L-type calcium current (I_{Ca-L}) was recorded. T-type calcium current (I_{Ca-T}) is the difference between the current recorded at V_h of -70 mV and I_{Ca-L} at V_h of -40 mV.

比 I_{Ca-L} 快, 可被 T 型钙通道阻滞剂(如镍离子(Ni^{2+}) 和米贝地尔(mibefradil))所阻滞. AT-1 细胞的 I_{Ca-L} 在细胞孵化过程中, 其电流幅度可逐渐增大, 与动作电位时程和平台期幅度有关(上述). 与钠电流相比, AT-1 细胞上的钙电流除幅度以外, 在电流动力学上与细胞孵化的时间长短无明显关系. 提示 AT-1

细胞的钙离子通道电流的激活与失活过程很少有发生学上的变化. 有人发现, AT-1 细胞的 L 型钙通道与现已克隆出来的 L 型钙通道 α 亚单位几乎相同, 而 AT-1 细胞的 T 型钙通道则与现已克隆出来的 α_1G 亚单位相似, 其动力学参数比另一克隆 α_1H 略快⁹.

1.3 快速激活型迟缓整流外向钾离子通道电流 (I_{Kr})

I_{Kr} 是 AT-1 细胞上主要的时间依赖性外向钾电流, 它是一种重要的动作电位复极化电流(图 4)²¹. 在 AT-1 细胞上, 当 I_{Na} 和 I_{Ca-T} 通过采用 -40 mV 的膜指令电位 (V_h) 被失活后, 或者分别用 TTX 和 Ni^{2+} 阻滞, 可记录到明显的 I_{Kr} . 与多种动物心脏细胞的 I_{Kr} 一样, AT-1 细胞的 I_{Kr} 也具有内向整流现象, 可被强效 I_{Kr} 阻滞药, 如多非利特(dofetilide)和 E-4031 所消除. 在 AT-1 细胞上, 没有记录到迟缓型外向钾电流的慢成分 (I_{Ks}). 现已知, 与人体心脏细胞 I_{Kr} 通道形成有关的基因位于细胞的第 7 对染色体上, 称为 HERG 基因¹⁰. 当 HERG 基因发生遗传学突变时, 便可引起第 2 型先天性心脏长 Q-T 间期综合征 (LQT2), 即一种心脏复极化过程异常延长现象, 可以致死. 若将 HERG 克隆进行体外细胞表达, 可以产生一种类似 I_{Kr} 的外向钾电流(如图 4 所示), 也可被 I_{Kr} 阻滞剂所阻滞. 除了 HERG 基因突变与先天性心脏长 Q-T 间期综合征有关外, 心脏的一种钠通道基因 SCN5A 突变与第 3 型长 Q-T 间期综合征

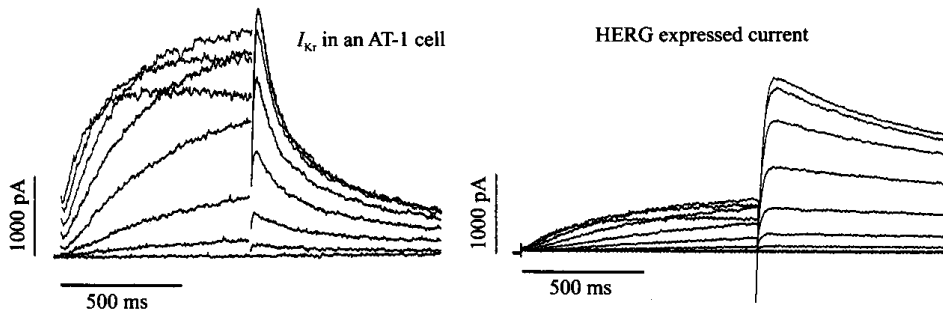


Fig 4. I_{Kr} And HERG currents. Left panel is I_{Kr} current recorded in an AT-1 cell at d 8 in culture. I_{Kr} Activates around -30 mV and reaches to its maximal level during depolarization to $+10$ to $+20$ mV. As depolarizing potentials increase, the current magnitudes gradually decline, showing an inward rectification phenomenon. Right panel represents HERG current recorded in a Chinese hamster ovary(CHO) cell which is transiently transfected with HERG cDNA. Both I_{Kr} and HERG currents share similar features, except different kinetics.

(LQT3)有关^[11],心脏的另一种钾通道基因(LQT1)突变也与长Q-T间期综合征有关^[12].其中,HERG和LQT1基因突变,造成心脏细胞复极化过程中的外向钾电流 I_{Kr} 和 I_{Ks} 幅度减小,而SCN5A基因突变则使钠通道失活延缓,这些影响的最终结果均是延长心脏复极和动作电位时程,临床心电图上表现为明显的Q-T间期延长,甚至出现一种称为尖端扭转型室性心动过速(torsade de pointes).

1.4 其他钾通道电流成分

在AT-1细胞上除了以 I_{Kr} 为主以外,尚可在5%~10%细胞上记录到其他两种外向钾电流^[2]:一种类似于大鼠心脏的 $K_V 1.5$ 电流,表现为快速激活和缓慢失活现象,可被奎尼丁(quinidine)所阻滞;另一种类似于 $K_V 2.1$ 电流,表现为快速激活和中速失活,可被4-氨基吡啶(4-aminopyridine)阻滞.另外,在AT-1细胞上,可以检测到某些钾通道的mRNA(如 $K_V 1.4$ 和minK).但是,并没有记录到有关的电流成分^[2].值得一提的是,AT-1细胞上没有测到与LQT1有关的mRNA,仅有minK mRNA.因此,不存在 I_{Ks} 电流成分. I_{Ks} 的表达必须具有LQT1和minK同时存在^[12].另外,虽然AT-1细胞是一种小鼠样心脏细胞,但并无瞬时外向钾电流(I_{to})成分的存在,也无背景外向钾电流(I_{K1}).

2 I_{Kr} 阻滞药的研究与应用

由于AT-1细胞上没有其他钾电流(如 I_{to} , I_{Ks} 和 I_{K1} 等)的“污染”, I_{Kr} 是主要的时间依赖性外向钾电流,而且电流幅度较大(可达2000 pA),使得AT-1细胞成为一种较为理想的 I_{Kr} 药物研究模型.虽然HERG克隆所表达的钾电流也被广泛使用,但是,AT-1细胞的 I_{Kr} 动力学更接近于人体或动物心脏细胞的内源性 I_{Kr} 成分.因此,多年来,作者所在的实验室一直与美国、英国、德国、瑞士和日本的多家公司合作,研究新药对AT-1细胞 I_{Kr} 的影响.

鉴于 I_{Kr} 是心脏细胞的一种极为重要的复极电流成分,凡是能部分或全部阻滞该电流的药物,均可使心脏复极过程减慢而引起动作电位延长.从治疗学角度来看,适当延长心脏复极和动作电位时程,可以产生第三类抗心律失常作用,达到治疗某些类型心律失常的目的.动物研究和临床初步证明, I_{Kr} 阻滞药对缺血性室颤动和某些房性和室性心律失常可起到治疗作用.可是,若阻滞 I_{Kr} 的作用过

强,使心脏复极和动作电位时程过度延长,则可诱发一种称为早后除极的异常电活动,引起触发性电变化而发生尖端扭转型室性心动过速.现已发现,不仅许多作用于心脏的药物(如抗心律失常药和钙通道阻滞药等),而且许多非心脏活性药(如抗精神病药、抗过敏药、抗生素、抗真菌药、解痉药和降压药等)也有较强的心脏 I_{Kr} 阻滞作用^[13].在临床上,往往有些原因不明的心律失常甚至死亡,可能就是由于药物阻滞心脏 I_{Kr} 所致.因此,美国食品和药品管理局(FDA)及欧洲药物管理局均已明文规定,自1998年起,凡是研究开发用于人体的任何类型新药,在上报审批时均必须提供该药是否阻滞心脏细胞 I_{Kr} ,延长动作电位与心电图Q-T间期的实验数据,以确保新药在人体上应用的安全性.在此,作者结合自己近些年在AT-1细胞上对药物阻滞 I_{Kr} 的研究结果,列于表1,供读者参考.

目前,在美国仅有的两个 I_{Kr} 的选择性阻滞药,多非利特和伊布利特(ibutilide)已被批准用于临床治疗,而且只限于治疗房性或室性颤动病人,但仍要重视这两个药物可能引起的尖端扭转型室性心动过速危险性.对于未来抗心律失常药物的研究与开发,首先是要弄清心脏复极化过程中的复杂分子生物学、生理学和药理学,这不仅涉及心脏离子通道蛋白质本身,而且涉及调节离子通道在正常或病变心脏上表达的分子和细胞机理.只有这样,才有可能研制出既延长心脏复极,又不引起尖端扭转型室性心动过速的新型安全抗心律失常药.

3 参考文献:

[1] Field LJ. Atrial natriuretic factor-SV40 T antigen transgenes produce tumors and cardiac arrhythmias in mice[J]. *Science*, 1988, **239**(4843):1029-1033.

[2] Yang T, Wathen MS, Felipe A, Tamkun MM, Snyders DJ, Roden DM. K^+ Currents and K^+ channel mRNA in cultured atrial cardiac myocytes(AT-1 cells)[J]. *Circ Res*, 1994, **75**(5):870-878.

[3] Yang T, Snyders DJ, Roden DM. Ibutilide, a methanesulfonamide antiarrhythmic, is a potent blocker of the rapidly activating delayed rectifier K^+ current(I_{Kr}) in AT-1 cells. Concentration-, time-, voltage-, and use-dependent effects[J]. *Circulation*, 1995, **91**(6):1799-1806.

[4] Yang T, Kupersmidt S, Roden DM. Anti-minK antisense decreases the amplitude of the rapidly-activating cardiac delayed rectifier K^+ current[J]. *Circ Res*, 1995, **77**(6):

Tab 1. IC_{50} values for drug block of I_{Kr} or HERG in mouse atrial tumor myocytes AT-1 and mammalian transfected cells

Drug category	IC_{50} for I_{Kr} block $/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Cell type	IC_{50} for HERG block $/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Cell type
Antiarrhythmic drug				
Quinidine	1.0 ± 0.3	AT-1 cells	0.27 ± 0.06	L-cells
Disopyramide	58 ± 12	AT-1 cells	92 ± 24	L-cells
Procainamide	380 ± 218	AT-1 cells	298 ± 13	L-cells
<i>N</i> -Acetyl procainamide	92 ± 6	AT-1 cells	47 ± 16	L-cells
Amiodarone	0.7 ± 0.2	AT-1 cells	0.95 ± 0.08	L-cells
Dofetilide	0.011 ± 0.002	AT-1 cells	0.015 ± 0.003	L-cells
Ibutilide	0.020 ± 0.001	AT-1 cells		
<i>d</i> -Sotalol	> 50	AT-1 cells		
Antipsychotic drug				
Risperidone	~ 1.0	AT-1 cells		
Ziprasidone	~ 5	AT-1 cells		
Olanzapine	> 50	AT-1 cells		
Antihistamine drug				
Terfenadine	0.097 ± 0.012	AT-1 cells	0.085 ± 0.020	HEK-293
Prokinetic drug				
Cisapride	0.004 ± 0.002	AT-1 cells		
Antipasmodi drug				
Terodiline	0.0037 ± 0.0018	AT-1 cells		
Antiepileptic drug				
Valproic acid	20	AT-1 cells		
Antibiotic drug				
Erythromycin	52.4 ± 6.7	AT-1 cells	70.2 ± 9.5	CHO cells
Moxafloxacin	0.75 ± 0.31	AT-1 cells		
Sparfloxacin	0.23 ± 0.07	AT-1 cells		
Grepafloxacin	27.2 ± 11.6	AT-1 cells		
Gatifloxacin	26.5 ± 13.4	AT-1 cells		
Antifungal drug				
Ketoconazole	0.05 ± 0.01	AT-1 cells	0.07 ± 0.02	CHO cells
Hypotensive drug				
Trimethaphan	~ 10	AT-1 cells		
Ca²⁺ Blocker				
Amoldipine	3.0 ± 0.4	AT-1 cells		
Miberfradil	0.75 ± 0.14	AT-1 cells	0.82 ± 0.20	CHO cells
Verapamil	1.3 ± 0.2	AT-1 cells	0.78 ± 0.23	HEK-293
Other				
OPC-18790	0.96 ± 0.12	AT-1 cells		
Leuvasgladin E ₂	2.7 ± 1.1	AT-1 cells		

L-cells : mouse fibroblast cells ; CHO : Chinese hamster ovary cells ; HEK : human embryonic kidney cells. The tail current of I_{Kr} or HERG was measured upon repolarization to -40 mV following depolarization to $+20$ mV from a holding potential of -40 mV or -80 mV. $n = 7 - 12$ for each drug tested. $\bar{x} \pm SE$.

- 1246 – 1253.
- [5] Yang T , Roden DM. Regulation of sodium current development cultured atrial tumor myocytes(AT-1 cells [J]. *Am J Physiol* , 1996 , **271**(2 Pt 2) :H541 – H547.
- [6] Yang T , Roden DM. Extracellular potassium modulation of drug block of I_{Kr} . Implication for torsade de pointes and reverse use-dependence[J]. *Circulation* , 1996 , **93**(3) : 407 – 411.
- [7] Yang T , Snyders DJ , Roden DM. Inhibition of cardiac potassium currents by the vesnarinone analog OPC-18790 : comparison with quinidine and dofetilide[J]. *J Pharmacol Exp Ther* , 1997 , **280**(3) :1170 – 1175.
- [8] Kupersmidt S , Yang T , Roden DM. Modulation of cardiac Na^+ current phenotype by β_1 -subunit expression[J]. *Circ Res* , 1998 , **83**(4) :441 – 447.
- [9] Satin J , Cribbs LL. Identification of a T-type Ca^{2+} channel isoform in murine atrial myocytes(AT-1 cells [J]. *Circ Res* , 2000 , **86**(6) :636 – 642.
- [10] Sanguinetti MC , Jiang C , Curran ME , Keating MT. A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia : HERG encodes the I_{Kr} potassium channel[J]. *Cell* , 1995 , **81**(2) :299 – 307.
- [11] Bennett PB , Yazawa K , Makita N , George AL Jr. Molecular mechanism for an inherited cardiac arrhythmia[J]. *Nature* , 1995 , **376**(6542) :683 – 685.
- [12] Barhanin J , Lesage F , Guillemare E , Fink M , Lazdunski M , Romey G. K_v LQT1 and IsK (minK) proteins associate to form the I_{Ks} cardiac potassium current[J]. *Nature* , 1996 , **384**(6604) :78 – 80.
- [13] Roden DM. A practical approach to torsade de pointes[J]. *Clin Cardiol* , 1997 , **20**(3) :285 – 290.

Mouse atrial tumor myocytes AT-1 in cardiac electrophysiologic and pharmacologic studies

YANG Tao

(Department of Pharmacology , School of Medicine , Vanderbilt University , Nashville , TN 37232-6602 , USA)

Abstract : Atrial tumor myocytes (AT-1 cells) were derived from tumor-bearing mice in which SV40 T large antigen drives atrial natriuretic promoter. AT-1 cells possess many features typically seen in cardiac cells from other species , such as spontaneous beating , multiple ion channels and responses to drugs , etc. Major ion channels are present in AT-1 cells : sodium , calcium and potassium channels. Sodium channel in AT-1 cells is highly sensitive to blocker tetrodotoxin. L- and T-type calcium channels respond to classical blockers. An important outward potassium current in AT-1 cells is the rapidly-activating delayed rec-

tifier (I_{Kr}). I_{Kr} is the sole time-dependently repolarizing potassium current in AT-1 cells. AT-1 cells are a very useful tool for studies in cardiac electrophysiology and pharmacology. As yet , a great number of cardiac and non-cardiac drugs have been tested for their I_{Kr} blocking actions in AT-1 cells. The polymorphic ventricular arrhythmia (torsade de pointes) is a severe side effect of I_{Kr} blockers.

Key words : myocardium ; cells , AT-1 ; ion channels ; action potentials ; drug studies

(本文编辑 董立春)