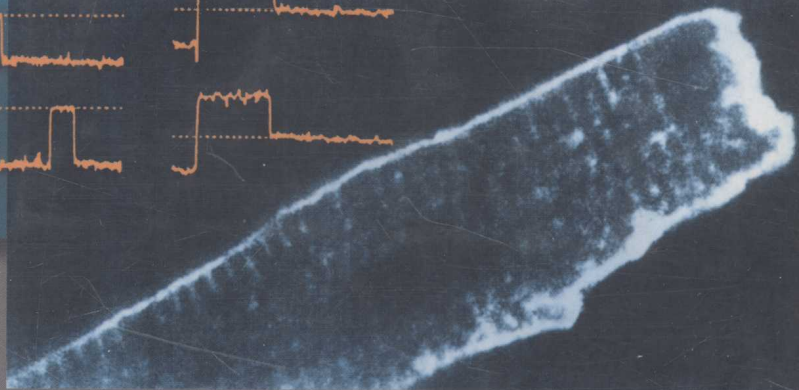
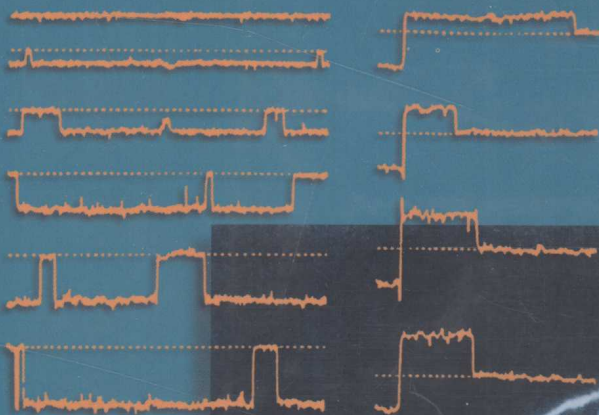


心肌细胞电生理学

刘泰樞 编著



北京大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

心肌细胞电生理学/刘泰槌著. —北京:北京大学出版社, 2000. 2

ISBN 7-301-00310-2

I. 心… II. 刘… III. ①人体—心脏—电生理学 ②心肌—细胞—电生理学
N. R531.3

中国版本图书馆CIP数据核字(1999)第73951号

书 名: 心肌细胞电生理学

著作责任者: 刘泰槌

责任编辑: 张仲鸣 赵学范

标准书号: ISBN 7-301-00310-2/Q·008

出版者: 北京大学出版社

地 址: 北京市海淀区中关村北京大学校内 100871

网 址: <http://cbs.pku.edu.cn/cbs.htm>

电 话: 出版部 62752015 发行部 62754140 编辑室 62752038

电子信箱: zpup@pup.pku.edu.cn

排 版 者: 北京高新特公司照排中心

印 刷 者: 北京大学印刷厂印刷

发 行 者: 北京大学出版社

经 销 者: 新华书店

850×1168 32开本 5.125印张 140千字

2000年2月第一版 2000年2月第一次印刷

定 价: 10.00元

序 言

心脏的力学和电学活动构成整个心脏生理学的主体,而心肌细胞的离子通道与离子流(包括各种离子转运电流)又是整个心脏电生理学(包括临床电生理学及细胞电生理学)的基石。自从电压钳制技术,特别是膜片钳制技术开展以来,心肌细胞电生理学的进展,说它是突飞猛进,一点也不夸张。两个技术的重要性,已经为它们先后得到生理学诺贝尔奖所肯定。如今翻开心脏生理学、药理学以及某些心脏病的发病机制和治疗的著作,如果离开对心脏电生理学,对心肌细胞的离子通道与离子流的理解,那将难以读懂。心脏药理学的很多章节,如果离开这些内容,就难以成为现代的药理学。由此可见这一领域的重要性。

在 10 年以前(1988 年)我曾出版了《心肌电生理学》一书,作为研究生的教材,以及有关科研人员的参考书。得到了很多同行的宝贵支持。但是出版以后不久,它作为教材就已经不太合用了。新的科研进展不断涌现,大量新内容改写了过去的结论,揭露了新的事实,提出了新的见解。这一领域已经大为改观了。在教学中,那一本书只能做为课前的预习读物,为理解新的课堂内容做准备;而新的内容只能从期刊中引用,这对学生的课堂学习造成不小困难。热心的同行也在不断催促,询问何时出版新书。在他们热情的关怀、鼓励和支持下,总算完成了这部书的写作。

本书以 80 年代末到现今的进展为主,适当照顾历史的发展。因此,它是在前一书的基础上编写的,不与前书重复。这就把大量在多细胞标本上,用电压钳制技术得到的材料,省略而不再叙述。如果需要,读者可以参阅前一本书。由于分子生物学研究的快速进展,离子通道、载体的分子结构已经越来越清楚,这不能不作为本

书的重要内容之一,而分子药理学同样也不能完全回避,在本书中都做了简要介绍。为了读者查阅有关资料方便,本书在每章之后列出所引用的文献,以备查阅。

由于水平所限,引用的文献材料未必恰当,敬希读者不吝赐教。

作 者

1999年3月20日

目 录

第一章 导论	(1)
1.1 心肌细胞电活动与离子通道	(1)
1.2 离子通道及其活动特性	(2)
1.3 离子通道活动的研究方法	(3)
参考文献.....	(6)
第二章 钠通道及钠离子流	(8)
2.1 钠通道的分子结构	(8)
2.2 钠通道的电生理学特性.....	(11)
2.3 毒素与药物对 I_{Na} 的影响	(18)
参考文献	(21)
第三章 钙通道及钙离子流	(24)
3.1 钙通道的分子结构.....	(24)
3.2 心肌细胞 L-型钙通道	(27)
3.3 T-型钙通道	(34)
参考文献	(35)
第四章 钾通道及钾离子流	(38)
4.1 钾通道的分子结构.....	(38)
4.2 心肌细胞的各种钾电流.....	(42)
参考文献	(59)
第五章 氯通道	(68)
5.1 氯通道的分子结构.....	(68)
5.2 心肌细胞氯通道的电生理学特性.....	(70)
参考文献	(75)
第六章 超极化激活的离子流 I_f	(80)

6.1	I_f 的特性	(80)
6.2	I_f 的神经递质调制	(82)
6.3	I_f 的单通道电流特性	(86)
6.4	I_f 在窦房结细胞起搏活动中的作用 及起搏机制问题	(87)
6.5	I_f 的阻断剂	(89)
	参考文献	(90)
第七章	钠-钙交换电流 I_{Na-Ca}	(93)
7.1	钠-钙交换体的分子结构	(93)
7.2	I_{Na-Ca} 的电生理学特性	(95)
7.3	I_{Na-Ca} 在心肌细胞动作电位中的意义	(100)
	参考文献	(102)
第八章	钠-钾泵电流 I_{pump}	(105)
8.1	钠-钾泵的分子结构	(105)
8.2	I_{pump} 的电生理学特性	(107)
	参考文献	(112)
第九章	心肌细胞的间隙连接	(115)
9.1	间隙连接的结构	(115)
9.2	间隙连接通道的电学特性	(120)
9.3	间隙连接半通道活动的研究	(124)
	参考文献	(128)
第十章	心肌各类细胞的动作电位和膜电流	(133)
10.1	心室肌细胞动作电位及离子流	(133)
10.2	不同心肌细胞动作电位中的离子流	(139)
	参考文献	(142)
第十一章	心肌细胞的触发性活动及其离子基础	(143)
11.1	心肌细胞的早后去极化	(143)
11.2	心肌细胞的迟后去极化	(150)
	参考文献	(155)

第一章 导 论

1.1 心肌细胞电活动与离子通道

心肌细胞属可兴奋细胞。与骨骼肌细胞相似,其活动表现为收缩,而其兴奋则表现为电活动,即动作电位的发生与传播。心脏的电学活动,在整体上表现为心电图;而在心肌细胞上则为动作电位。一切正常或异常心电图的发生,均基于心肌的动作电位。因之,研究心肌动作电位是探讨心脏或心肌细胞兴奋的重要关键。关于心肌细胞的动作电位及其特性已有不少专著^[1~3]进行了较详细的叙述,本书不作重点讨论。

心肌细胞动作电位的发生是一个复杂过程。在它的发生中,有许多离子流参与。因而,要解决动作电位的发生机制问题,就必须清楚各种离子流的特性及其发生规律。从60年代中期到80年代,用电压钳制技术在多细胞心肌标本上,对各种离子流进行了大量而有意义的工作。对于动作电位发生的离子基础,有了深入的了解。这使心肌电生理学的发展到了一个新阶段。开辟了一个新领域。在这方面也有许多专门著作和综述^[4,5]。

然而,在多细胞标本中,细胞间隙的存在给研究带来一些麻烦。在电压钳制过程中,由于反复钳制于一定电压,使细胞间隙积累某种离子而影响结果。另外,由于方法学的限制,难以研究单个离子通道的电流。80年代开始,由于单个心肌细胞分离的成功,以及单通道研究方法的成熟^[6],有了关于心肌细胞单通道电流的报道。此后,基于膜片钳制技术而进行的单通道电流的研究,如雨后春笋,大量涌现。与此相应,出现不少著作^[7~11]。近来由于分子生

物学的工作进展,对离子通道的分子结构有了大量报道,其中,有关心肌细胞膜上的离子通道及载体的研究,已经出现较系统的成果。因而也有这方面的著作问世^[12]。由此可见,心肌细胞离子通道的研究,不仅受到广泛重视,而且进展很快。

目前,由于研究工作的进展,无论从心脏的临床研究或基础理论研究,若想了解心脏兴奋及其传导的生理学、病理学以及药理学,如果离开对离子通道特性的理解,将无法深入。而从基础研究的角度来看,避开离子通道的研究进展,则工作难以进行,至少无法深入。因此对离子通道及其特性的了解是十分重要的。

1.2 离子通道及其活动特性

细胞膜是由双层脂质膜所构成,膜的两侧,即膜的细胞外与细胞内两侧均为疏水性。因此,亲水性离子不能自由通过细胞膜而进出细胞。细胞膜上有蛋白质性质物质嵌在膜上,或贯穿细胞膜,而在蛋白质三维结构内部,形成一个亲水性通道。这就是离子通道。

由于细胞膜内外的离子浓度差而形成的电位差,是推动离子运动的驱动力。而通道的开放是实现离子运动的不可缺少的条件。目前已知心肌细胞膜上的离子通道有 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 及 Cl^- 通道等。对它们的化学结构也研究得越来越清楚。

每种离子通道均有对一定离子通过的选择性。有时虽然可以有其他离子通过,但其通透性与该通道选择性的离子相比相差很大。与此同时,各种离子通道也都有一些特异性的及非特异性的阻断剂,能阻断有关离子通过。因此,离子通道的阻断剂,特别是特异性(或称为选择性)阻断剂,在研究该离子通道活动中有重要意义。

离子通道并非一直开放,而是处于开放或不开放状态,后者又包括关闭及失活状态(图 1.1)。

只有处于开放(或激活)状态的离子通道,有关离子才能通过。因此,研究离子通道的各种活动状态及其条件是掌握该离子通道

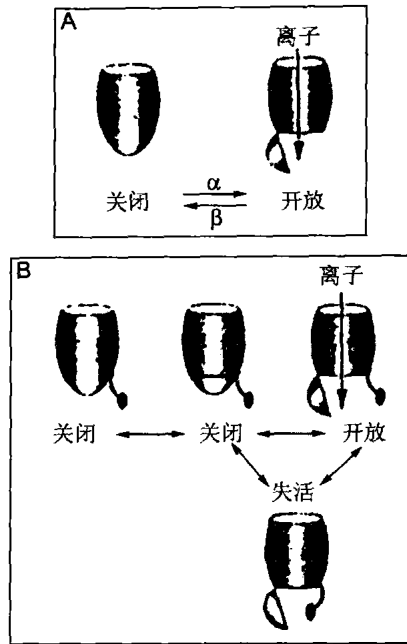


图 1.1 离子通道的各种状态

A. 一种离子通道可以存在关闭或开放两种状态;B. 许多离子通道有更为复杂的状态。图示两种关闭状态,一种开放状态,另一种为失活状态。

活动特性的主要内容,同时了解离子通道活动的调节也是很重要的。离子通道按其门控方式,可以分为几种类型:电压门控,背景通道及配体门控。此外,各种门控通道还受磷酸化所调制(图 1.2)。

1.3 离子通道活动的研究方法

自从 Sakmann 和 Neher^[13]开创膜片箝制技术,并经 Hamill 等人^[6]的改进以来,膜片箝制技术一直是研究细胞膜离子通道活动

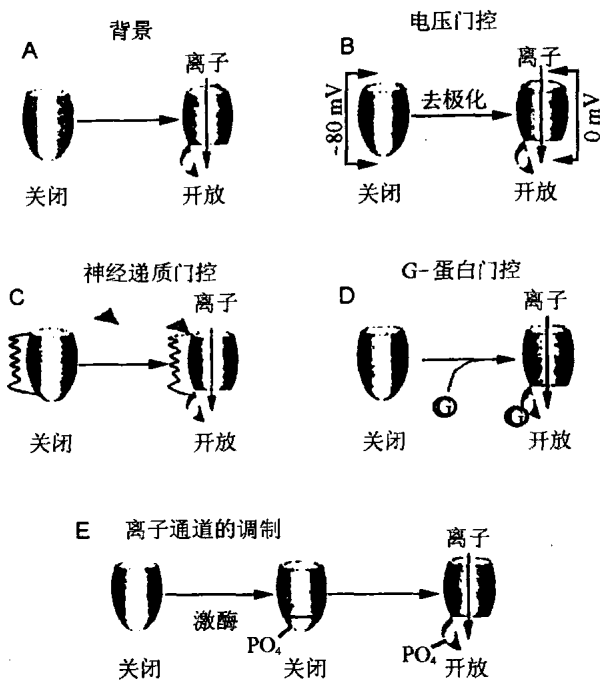


图 1.2 离子通道的各种调节机制

- A. 背景通道,其开放与关闭自发进行;B. 电压门控通道,由电压的变化控制其开关;C. 神经递质(配体)门控通道;D. G-蛋白质门控通道;E. 离子通道的调制。

的主要方法。欲知其详,请阅 Sakmann 与 Neher 的专著^[14]。在这里,仅简单叙述其研究方法。

膜片箝制的原理,与电压钳制相似,并由其发展而来。电压钳制是将细胞电位钳制在某一电压而不改变。由此可以得到在此电压下某一离子流活动。关于电压钳制的方法及其测定指标,请参阅作者所著《心肌电生理学》^[15]。

膜片箝制技术是用一个玻璃微电极或微管,将其尖端加热而使之光滑。将此光滑的微管尖端,在显微镜下接触到细胞膜表面。

此时,可以测得微管与细胞膜之间电阻变大,可达约 $50\text{ M}\Omega$,称之为低阻封接(low resistance seal)。早期膜片箝制工作,在骨骼肌细胞上就是用这种封接。在此基础上给微管以负压,则一小部分细胞膜被吸入微管口内,使微管与细胞膜之间封接更紧,其间电阻可达千兆($\text{G}\Omega$),称之为千兆封接(giga ohm seal)。由于微管口内的细胞膜片仍与细胞联在一起,是整个细胞膜的一部分,细胞内成分并无变化,因之这种标本称之为细胞贴附(cell attached)标本。大部分在不改变细胞内成分的研究中,都使用这种标本。能得到在正常

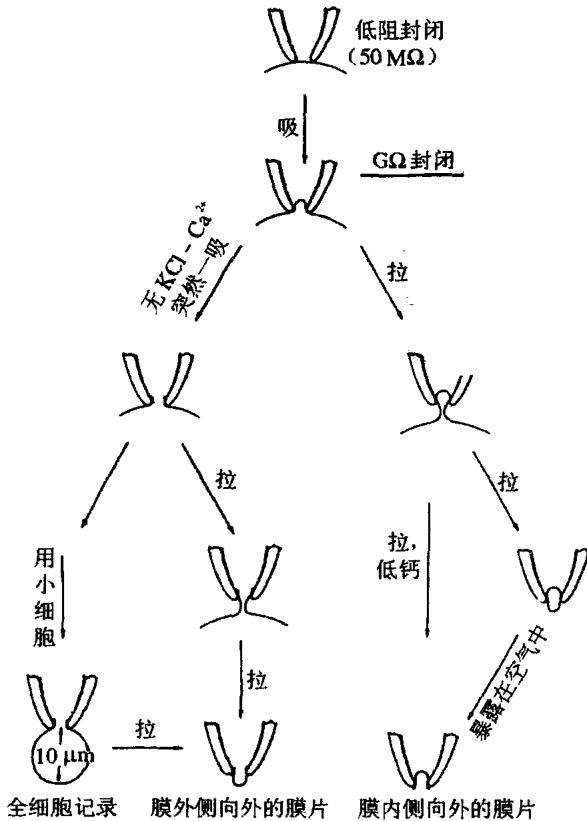


图 1.3 膜片钳制技术示意图

细胞上,单个离子通道的活动。如果在此基础上,将微管向上拉,就会把微管内的膜片从整个细胞膜拉开而形成细胞膜内表面向外的膜片 (inside out patch)。其用途是可以任意改变灌流液成分,模拟细胞内液的变化,而得到某一离子通道的活动情况。有的离子通道就是这样发现并进行研究的。若在千兆封接基础上突然一吸,加大负压,则微管口内细胞膜片破裂,就形成全细胞钳制。它可以钳制整个细胞,就像电压钳制一样,称之为全细胞钳制 (whole cell patch), 所得的结果是整个细胞的膜电流。若在此基础上,将微管向上拉,使微管内薄片与细胞的其余部分分开,则由于膜的黏性,被拉开的膜片又在微管口外粘合在一起,形成一个外表面向外的膜片 (outside out patch)。这时改变微管内液,就可以模拟细胞内液的变化而研究某一离子通道的活动(图 1.3)。

由于有些细胞膜难以被吸破,或者不希望细胞内成分由于微管内液而改变太多,近来在微管尖端吸入极少量 nystatin 或 amphotericin^[16]然后做细胞贴附。此时上述结构可插入细胞膜,形成类似离子通道样的低阻电流通路,而类似于全细胞钳制。这种膜片钳制称之为穿孔钳制(perforated patch)。此外,还有各式各样的改进方法,在这里不作详细介绍。

参 考 文 献

- [1] Hoffamn B F and Cranefield P F. Electrophysiology of the heart. McGraw-Hill, New York. 1960.
- [2] Vassalle M. Cardiac Physiology for the Clinician. Academic Press, New York 1976.
- [3] Rosen M R, Janse M J, Wit A L. Cardiac Electrophysiology. A textbook. Futura Publishing Co. Inc. Mount Kisco, New York. 1990.
- [4] Noble D. The initiation of the heartbeat. 2nd Ed. Oxford, Clarendon 1979.

- [5] Caremiet E, Vereecke J. Electrogenesis of the action potential and automaticity. In "Handbook of Physiology; The cardiovascular System 1". 269~334, 1979.
- [6] Hamil O P, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth F J. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recordings from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* 1981, 391: 85~100.
- [7] Noble D, Powell T. *Electrophysiology of single cardiac cells.* Academic Press, New York. 1987.
- [8] Piper H M, Isenberg G; *Isolated adult cardiomyocytes.* CRC Press Inc. Boca Raton, Florida. 1989.
- [9] Fozzard H A, et al. *The heart and cardiovascular system.* 2nd Ed. Raven Press LTD, New York. 1992.
- [10] Spooner P M, et al. *Ion channels in the cardiovascular system. Function and dysfunction.* Futura Publishing Co. Inc. New York. 1994.
- [11] Zipes D P, Jalife J. *Cardiac Electrophysiology: From cell to bedside.* 2nd Ed. W B Saunders Co. London. 1995.
- [12] Morad M, et al. *Molecular Physiology and pharmacology of cardiac ion channels and transporters.* Kluwer Academic Publishers. Boston. 1996.
- [13] Nehr E, Sakmann B. Single channel current recorded from membrane of denervated frog muscle fibers. *Nature.* 1976, 260: 799~802.
- [14] Sakmann B, Nehr E. *Single-channel recording.* Plenum Press, New York 1983.
- [15] 刘泰槿. *心肌电生理学.* 北京大学出版社. 1988.
- [16] Rae J, Cooper K, Gates P, Watsky M. Low access resistance perforated patch recordings using amphotericin B. *J Neurosci Methods.* 1991, 37: 15~26.

第二章 钠通道及钠离子流

心肌细胞的电活动是心肌细胞兴奋时各种离子流依次活动的结果,它所表现出来的电活动,就是动作电位。在每次动作电位的发生及恢复过程中,有许多不同的离子流参与。其中多数离子流是通过一定离子通道的激活与失活实现的。另一些则通过一定的载体实现离子的转运。

钠通道的开放或钠离子流的发生是引起心肌细胞快反应动作电位的第一个电生理学活动。它是引起此后各离子通道开放或离子流活动的前提条件。也就是说,没有由钠离子流的正常活动而形成的去极化状态,就不可能引发快反应动作电位后续的各离子流的正常活动,因而,也就不可能出现正常的快反应动作电位。可见钠离子流的活动在该动作电位的发生及发展中的重要作用。

到目前为止,心肌细胞膜上的离子通道共发现 4 类:钠、钙、钾及氯通道。研究工作表明,心肌细胞膜上的钠、钙与钾的电位依赖性通道,在分子结构上有共同的特点,但氯通道的结构则与之相差甚大。

2.1 钠通道的分子结构

在可兴奋细胞中,如神经、骨骼肌及心肌细胞膜上,钠通道的分子结构基本相似。经高度纯化的钠通道蛋白包含两种亚单位: α (260 kD)及 β 。 β 亚单位又依细胞不同而有 β_1 (36~38 kD)及 β_2 (33 kD)^[1]。脑神经细胞钠通道包含 α 、 β_1 及 β_2 ;骨骼肌细胞含 α 及 β_1 ,心肌细胞是否含有 β_1 目前尚有争议,而电鳗的电器官只含 α ;大鼠脑神经细胞膜含有 3 个类型(I、II及III型)的 α 亚单位属高度

同源的钠通道。后来又发现了 I A 型 α 亚单位的脑神经细胞钠通道。骨骼肌细胞钠通道的 α 亚单位称为 μ_1 ，而心肌细胞钠通道的 α 亚单位称之为 h_1 。

2.1.1 钠通道的 α 亚单位结构

Noda 等人^[2]以电鳗电器官的 mRNA 分离出 cDNA 而得到整个的 α 亚单位多肽。所推演出来的氨基酸序列表明，该蛋白质含 4 组同源的结构域(domain)，而每一个结构域是由 6 个跨膜的 α 螺旋所组成(图 2.1A)。

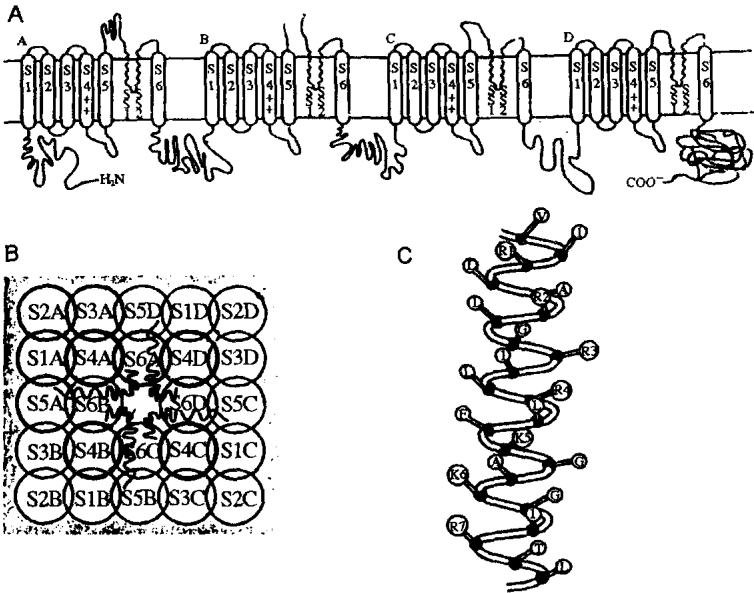


图 2.1 钠通道 α 亚单位的结构

- A. 各跨膜单位的线性排列(4 个结构域 A、B、C、D 各由 6 个跨膜螺旋 S1~S6 构成)；
- B. 各结构域的 SS1~SS2 围成孔道；
- C. 各结构域的 S4 为电压敏感区，其氨基酸排列每 3 个中有 1 个带正电荷。

一般说来,上述各种类型的 α 亚单位中,在其各个相应的结构域中从S1到S6的跨膜螺旋均很相似,而他们在细胞内的连接链则有相当的变化。最近在胶质细胞及心肌cDNA库中发现一种新的 α 亚单位,其4个结构域上氨基酸序列与其他的 α 亚单位依然很相似,但有许多不同。一般认为这种胶质-心肌钠通道是钠通道的一个新亚族^[3,4]。由于心肌细胞钠通道的分离及提纯较晚,因此,许多细节尚不明确。心肌细胞钠通道为240 kD伴有13 kD的碳水化合物^[5]有关详细的进展情况,已有一些综述^[6,7]。

2.1.2 钠通道的 β 亚单位

最近在大鼠脑细胞上克隆出钠通道 β_1 亚单位^[8]。它是一个分子量较小的蛋白质,含213个氨基酸,形成一个 α 螺旋,羧基端在膜内而氨基端在膜外。心肌细胞钠通道的 β_1 亚单位与之相似,然而相似的研究表明,大鼠心肌无 β_1 - α 亚单位的联合^[5]。因此, β_1 亚单位在心肌细胞钠通道上的生理作用,目前仍未解决。至于脑细胞钠通道的 β_2 亚单位,目前尚不清楚。

单纯钠通道的 α 亚单位就可以表现出电压依赖性的通道活动。实际上,电鳗的电器官就只有 α 亚单位。但在神经元及肌肉钠通道上,只有 α 亚单位时,其活动不正常,表现为失活缓慢,电压依赖性向更正的电位偏移。若与 β_1 亚单位共同活动时(在爪蟾卵上同时表达),钠通道失活加快5倍,钠电流加大2.5倍。可见 β_1 亚单位对维持钠通道的正常活动是必需的。

2.1.3 通道的分子结构与电活动的关系

构成亲水性通道的孔区是由每个结构域中S5与S6的连接区围成。这是根据钾通道的研究所确定的。在钠和钙通道中,通道的离子选择性及通透性即取决于此连接区。这一连接有一部分在细胞膜外,一部分在膜内。膜内部分分别命名为SSI及SSII区^[9](图2.1.B),最近又命名为P-环(P-loop)或H-环(H-loop)^[10,11]。改变

其中有关的残基,则其离子选择性及通透性大为降低^[12]。

对电压敏感的区域,则是每个结构域的 S4(电压敏感器)。其氨基酸排列是每 3 个残基中的第一个具正电荷,接着两个是疏水性残基(图 2.1.C)。

控制钠通道的快速失活区是在通道的细胞膜内表面。因为用蛋白酶或一种多肽的抗体作用于膜内表面均能阻止通道的失活^[13,14]。这一部位是在连接结构域 III 与 IV 之间的细胞膜内的链。图 2.2 表示与钠通道快速失活有关的链及 3 个残基团(IPM: isoleucine-phenylalmine-methionine)。改变其中的残基可导致其失活^[15]。

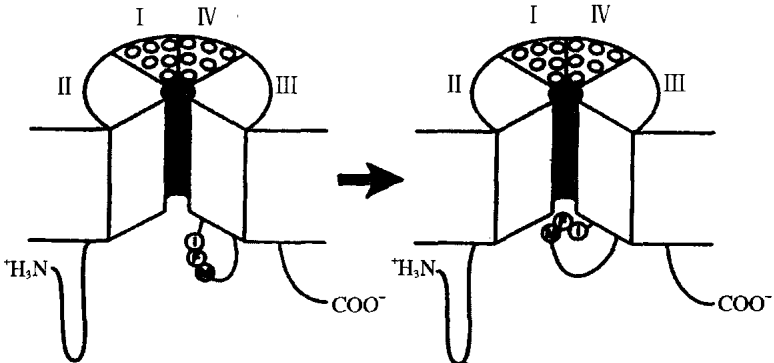


图 2.2 钠通道的失活

连接结构域 III 和 IV 的细胞内链形成一个铰链状盖,堵上内口可使孔道失活。

2.2 钠通道的电生理学特性

2.2.1 钠通道的门控电流

当细胞处于静息状态时,钠通道基本无活动,通道内 S4 电压敏感区也就处于平衡状态。但当膜去极化时,S4 电压敏感区带阳离子的残基发生活动而产生电压依赖性的阳离子外流。这种离子