

褪黑激素抑制心室肌细胞晚钠电流增大所诱发的心律失常

文杰¹, 刘汗峰², 杨岩岩², 张泽夫¹, 罗岸涛¹, 曹珍珍¹, 马季骅^{1,2*}

(1. 武汉科技大学医学院, 湖北 武汉 430070; 2. 武汉科技大学生命科学与健康学院, 湖北 武汉 430070)

摘要: 褪黑激素 (melatonin, Mel) 已有研究表明其具有心脏保护作用, 但对离子通道作用尚不清楚。本实验探究了 Mel 对小鼠心室肌细胞晚钠电流 (late-sodium current, $I_{Na,L}$) 的抑制作用、在器官水平上的抗心律失常作用及其机制。采用膜片钳技术全细胞模式记录离子电流和动作电位 (action potential, AP), 利用多通道采集分析系统同步记录小鼠心电图 (electrocardiogram, ECG) 和单相动作电位 (monophasic action potential, MAP)。结果显示, Mel 抑制瞬时钠电流 (transient-sodium current, $I_{Na,T}$) 和特异性 $I_{Na,L}$ 开放剂 $2 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 海葵毒素 II (anemone toxins II, ATX II) 诱导增大的 $I_{Na,L}$, 其 IC_{50} 值分别为 686.615 和 $7.37 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 且 Mel 不影响 L 型钙电流 (L-type calcium current, $I_{Ca,L}$)、瞬时外向钾电流 (transient outward current, I_{to}) 和 AP。此外, $16 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Mel 可缩短 ATX II 延长的动作电位时程 (action potential duration, APD), 并消除了由 ATX II 诱导的早发后除极 (early afterdepolarizations, EADs)。在 Langendorff 灌流的小鼠心脏上, $16 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Mel 显著降低了室速 (ventricular tachycardia, VT) 和室颤 (ventricular fibrillation, VF) 的发生率。综上所述, Mel 主要通过阻断 $I_{Na,L}$ 发挥抗心律失常作用, 为 Mel 的临床新应用提供了重要的理论基础。本研究动物福利和实验过程均遵循武汉科技大学实验动物伦理委员会的规定 (批准号: 2023130)。

关键词: 褪黑激素; 晚钠电流; 动作电位; 心律失常; 膜片钳

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)01-0143-09

Melatonin inhibits arrhythmias induced by increased late sodium currents in ventricular myocytes

WEN Jie¹, LIU Han-feng², YANG Yan-yan², ZHANG Ze-fu¹, LUO An-tao¹,
CAO Zhen-zhen¹, MA Ji-hua^{1,2*}

(1. Medical College of Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430070, China; 2. College of Life Science and Health, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430070, China)

Abstract: Melatonin (Mel) has been shown to have cardioprotective effects, but its action on ion channels is unclear. In this experiment, we investigated the inhibitory effect of Mel on late sodium currents ($I_{Na,L}$) in mouse ventricular myocytes and the anti-arrhythmic effect at the organ level as well as its mechanism. The whole-cell patch clamp technique was applied to record the ionic currents and action potential (AP) in mouse ventricular myocytes while the electrocardiogram (ECG) and monophasic action potential (MAP) were recorded simultaneously in mouse hearts using a multichannel acquisition and analysis system. The results demonstrated that the half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) values of Mel on transient sodium current ($I_{Na,T}$) and specific $I_{Na,L}$ opener $2 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ sea anemone toxins II (ATX II) increased $I_{Na,L}$ were 686.615 and $7.37 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. Mel did not affect L-type calcium current ($I_{Ca,L}$), transient outward current (I_{to}), and AP. In addition, $16 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Mel shortened ATX II-prolonged action potential duration (APD), suppressed ATX II-induced early afterdepolarizations (EADs), and significantly reduced the incidence of ventricular tachycardia (VT) and ventricular fibrillation (VF) in

收稿日期: 2023-05-10; 修回日期: 2023-06-19.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81670302).

*通讯作者 Tel: 15697188050, E-mail: mjhua@wust.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0601

Langendorff-perfused mouse hearts. In conclusion, Mel exerted its antiarrhythmic effects principally by blocking $I_{Na,L}$, thus providing a significant theoretical basis for new clinical applications of Mel. Animal welfare and experimental process are in accordance with the regulations of the Experimental Animal Ethics Committee of Wuhan University of Science and Technology (2023130).

Key words: melatonin; late sodium current; action potential; arrhythmia; patch-clamp

近两年,中国的心血管疾病 (cardiovascular diseases, CVDs) 患病率处于持续上升阶段,2019年农村、城市的心血管疾病分别占死亡原因的46.74%和44.26%,由于我国人口老龄化问题日趋明显且代谢危险因素持续流行,心血管疾病的医疗负担仍将持续增加^[1]。心血管疾病主要包括心力衰竭 (heart failure, HF)、冠状动脉疾病和心律失常等,其中心律失常是由冲动产生或心脏冲动传导不规则或两者兼而有之引起的,恶性的室性心律失常会导致心源性猝死,后果十分严重。室性心律失常包括从完全无症状的室性早搏或非持续性室性心动过速 (ventricular tachycardia, VT)、前心律失常的症状表现、症状轻微的持续性室速到伴有血流动力学衰竭的持续 VT 或室颤 (ventricular fibrillation, VF)^[2]。尽管近年来在射频消融和植入型心律转复除颤器等介入治疗方面取得了重大进展,但药物干预仍然是治疗心律失常的主要手段^[3]。

目前,更新的抗心律失常药物主要通过调节 Na^+ 、 K^+ 和 Ca^{2+} 通道功能来发挥作用。传统的抗心律失常药物根据其心脏动作电位的不同成分的作用进行了分类^[4]。I类药物通过阻断 Na^+ 通道从而降低了0期斜率和超射,增加、减少或维持了动作电位时程 (action potential duration, APD) 和有效不应期^[5]。此类代表药物有利多卡因、奎尼丁等。这些药物对钠电流具有较好的抑制作用,并能够有效发挥抗心律失常作用。然而,此类药物也可过度抑制瞬时钠电流 (transient-sodium current, $I_{Na,T}$) 而导致心肌细胞动作电位 (action potential, AP) 的0期幅度变小且上升变慢,从而使兴奋传导速率减慢,造成兴奋传导阻滞,最终导致心律失常的发生。由于I类药物具有不可避免的不良副作用,目前临床上仍需要发现一种抑制晚钠 (late-sodium current, $I_{Na,L}$) 效果优于 $I_{Na,T}$ 的药物,即新型、高选择性、安全的 $I_{Na,L}$ 抑制剂。已有研究表明,心肌缺血缺氧^[6]、NO增多^[7]、过氧化氢^[8]及心肌肥大和心力衰竭等多种伤害性因素均可引起心肌细胞 $I_{Na,L}$ 增大,而增大的 $I_{Na,L}$ 可造成细胞内钠超载,随之通过反向 Na^+ - Ca^{2+} 交换导致细胞内 Ca^{2+} 超载,进而引起心律失常、细胞收缩功能异常和细胞损伤。此外,已有研究发现 $I_{Na,L}$ 在3型长QT综合征 (long QT syndrome, LQTS3) 中具有重要作

用^[3],因此阻断 $I_{Na,L}$ 已成为药物治疗心律失常的重要新靶点。

褪黑激素 (melatonin, Mel) 是松果体分泌的一种吲哚类神经内分泌激素,其化学名为 *N*-乙酰-5-甲氧基色胺。已知其能从坚果、蘑菇、谷物和发芽的豆类或种子等多种天然食物中获得。目前 Mel 补充剂每日剂量范围为2~10 mg, 尚未有研究报道外源性 Mel 可造成严重不良反应,安全性较高。由于受体分布广泛^[9], Mel 可影响多种生物学过程,包括昼夜节律、神经内分泌、心血管和免疫功能及抗炎抗肿瘤作用^[7,10]。越来越多的证据表明, Mel 具有心脏保护作用,如调节细胞内钙信号,减轻心肌缺血再灌注损伤。在某些情况下, Mel 可防止心肌肥厚,从而减轻 HF 的发展。Mel 作为抗氧化剂可以有效抑制药物介导的心脏损伤^[11]。目前,国内外关于 Mel 对小鼠心肌细胞动作电位及离子通道作用的影响研究甚少,本研究利用海葵毒素 II (anemone toxins II, ATX II) 建立细胞水平和器官水平病理模型,在此基础上以期更加全面地了解 Mel 对心肌细胞电生理的作用,并为 Mel 用于治疗心律失常的临床应用及有关的新型药物开发提供新的思路及理论基础。

材料与方法

动物 本研究中的所有动物实验均按照国家卫生研究院出版《实验动物的护理和使用指南》(出版号:85-23 1996年修正版)进行,由武汉科技大学动物实验中心所提供,生产许可证编号为 SCXK (鄂) 2020-0018,并经武汉科技大学动物管理和使用委员会的批准,饲养于武汉科技大学医学院心血管研究所,实验单位使用许可证编号为 SYXK (鄂) 2018-0045,实验动物为 SPF 级,采用成年雄性昆明小鼠,体重范围为28~30 g。

小鼠心肌细胞制备 小鼠腹腔注射肝素 (180 U) 抗凝5~10 min 后用氨基甲酸乙酯 ($0.1 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$) 麻醉。迅速开胸后取出心脏,置于37 °C左右无钙台氏液中逆行插管,固定于 Langendorff 灌流装置上。先用无钙台氏液灌流冲洗心脏直至无淤血,然后用含 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ II 型胶原酶和 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 的无钙台氏液消化12 min 左右后取下

心脏, 剪下左心室并置于含有 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ BSA 的 KB 液中用眼科镊撕碎, 一次性胶头滴管吹散细胞后用尼龙网过滤静置 1 h, 待使用的细胞置于 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 环境中以保持活性。

全细胞膜片钳记录准备 使用 EPC9 膜片钳放大器 (德国 HEKA 公司) 对单个心室肌细胞进行记录。使用微电极拉制仪 (PP-100, 日本 Narishige 集团) 采用两步拉制法先拉制玻璃微电极。选取贴壁稳定、横纹清晰、折光指数高、无收缩迹象的单个心室肌细胞用于实验记录。通过三维显微操作 (MP285, 美国 Sutter 公司) 控制玻璃微电极。负压吸引使尖端与细胞膜之间形成 Giga-Ohm (GO) 封接, 然后使用脉冲式负压抽吸使细胞膜破裂, 从而获得串联电阻为 $2 \sim 5 \text{ M}\Omega$ 的全细胞膜片钳模式。在电压钳设置模式下记录电流时, 需要常规补偿慢电容, 并对串联电阻进行至少 $60\% \sim 80\%$ 的补偿。

溶液配置

无钙台式液 ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 135 NaCl 、 5.4 KCl 、 1 MgCl_2 、 $0.33 \text{ NaH}_2\text{PO}_4$ 、 10 HEPES 、 10 glucose (使用 NaOH 将 pH 调至 7.4)。

有钙台式液 ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 在无钙台式液的基础上加入 1.8 CaCl_2 , 其他成分不变。

细胞保存液 (KB 液, $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 85 KOH 、 30 KCl 、 $15 \text{ KH}_2\text{PO}_4$ 、 6 MgSO_4 、 20 taurine 、 10 glucose 、 0.5 EGTA 、 10 HEPES 、 $50 \text{ L-glutamic acid}$ (使用 KOH 将 pH 调至 7.4)。

AP 电极内液 ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 5 NaCl 、 30 KCl 、 110 K-aspartate 、 5 Mg-ATP 、 1 EGTA 、 10 HEPES 、 $5 \text{ creatine phosphate}$ 、 0.5 CAMP (使用 KOH 将 pH 调至 7.4)。

AP 细胞外液 ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 145 NaCl 、 5.6 KCl 、 1.8 CaCl_2 、 1.2 MgCl_2 、 5 HEPES 、 10 glucose (使用 NaOH 将 pH 调至 7.4)。

$I_{\text{Ca,L}}$ 电极内液 ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 135 NaCl 、 5.4 CsCl 、 1 MgCl_2 、 10 glucose 、 $0.33 \text{ NaH}_2\text{PO}_4$ 、 0.3 BaCl_2 、 10 HEPES 、 1.8 CaCl_2 (使用 NaOH 将 pH 调至 7.4)。

$I_{\text{Ca,L}}$ 细胞外液 ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 135 NaCl 、 5.4 CsCl 、 1 MgCl_2 、 10 glucose 、 $0.33 \text{ NaH}_2\text{PO}_4$ 、 0.3 BaCl_2 、 10 HEPES 、 1.8 CaCl_2 (使用 NaOH 将 pH 调至 7.4)。

$I_{\text{Na,T}}$ 电极内液、 $I_{\text{Na,L}}$ 电极内液 ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 3 NaCl 、 133 CsCl 、 2 MgCl_2 、 $2 \text{ Na}_2\text{ATP}$ 、 2 TEACl 、 2 EGTA 、 5 HEPES (使用 CsOH 将 pH 调至 7.4)。

$I_{\text{Na,T}}$ 细胞外液 ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 15 NaCl 、 1 CaCl_2 、 125 CsCl 、 1.2 MgCl_2 、 5 HEPES 、 11 glucose 、 1.8 CaCl_2 (使用 CsOH 将 pH 调至 7.4)。

$I_{\text{Na,L}}$ 细胞外液 ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 在 $I_{\text{Ca,L}}$ 灌流液的基础上

加入 $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ nifedipine 以阻断 $I_{\text{Ca,L}}$, 其他成分不变。

I_{o} 电极内液 ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 20 KCl 、 110 K-aspartate 、 $5 \text{ Na}_2\text{-phosphocreatine}$ 、 $5 \text{ Mg}_2\text{ATP}$ 、 0.1 GTP 、 5 EGTA 、 10 HEPES 、 1 MgCl_2 (使用 KOH 将 pH 调至 7.2)。

I_{o} 细胞外液 ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 137 NaCl 、 5.4 KCl 、 1.8 CaCl_2 、 1 MgCl_2 、 $0.33 \text{ NaH}_2\text{PO}_4$ 、 10 HEPES 、 10 glucose (使用 NaOH 将 pH 调至 7.4)。

除此之外, 为保证实验中电流记录的准确性, 在 I_{o} 细胞外液中加入 $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硝苯地平 ($I_{\text{Ca,L}}$ 阻滞剂)、 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ BaCl}_2$ (内向整流钾电流阻滞剂)、 $1 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 阿托品 (乙酰胆碱敏感性钾电流阻断剂) 以减小其他电流的参与引起的测量误差。

褪黑激素 (纯度 $\geq 98\%$) 溶于乙醇, 购买自成都德思特生物技术有限公司。ATX II 和河豚毒素 (tetrodotoxin, TTX) 购买自以色列 Alomone 公司。II 型胶原酶购买自美国 Worthington Biochemical 公司。CsCl 和 KH_2PO_4 购买自美国 Amresco 公司。EGTA 和 HEPES 购买自合肥白鲨生物科技有限公司。N-(2-羟乙基)-4-甲氧基苯磺酰胺磷酸盐 (KN-93) 等其他药品均购买自美国 Sigma-Aldrich 公司。为排除溶剂影响, 本实验中的有机溶剂在细胞外液中浓度均控制在 1% 以内, 未经特殊说明溶剂的药品均由“三蒸水”溶解, 药物配置至目标浓度待用。

脉冲设置 记录 AP 时, 在形成全细胞模式后, 需要将电压钳设置模式切换至电流钳设置模式。通过超过阈强度 $1.2 \sim 1.5$ 倍、持续 7 ms 、频率为 1 Hz 的电流脉冲经 Ag-AgCl 电极丝连续刺激细胞以诱导 AP 的产生。记录 $I_{\text{Ca,L}}$ 时, 将钳制电位保持在 -40 mV 。单根 $I_{\text{Ca,L}}$ 的记录由从 -40 mV 至 0 mV 、持续 300 ms 的去极化脉冲引出。电流-电压 ($I-V$) 关系曲线中 $I_{\text{Ca,L}}$ 的记录从 -40 mV 至 $+60 \text{ mV}$ 、以 5 mV 的阶跃 (两次刺激之间膜电位的变化值)、持续 300 ms 的去极化脉冲引出。记录 $I_{\text{Na,T}}$ 和 $I_{\text{Na,L}}$ 时, 将钳制电位保持在 -90 mV 。单根 $I_{\text{Na,T}}$ 和 $I_{\text{Na,L}}$ 的记录分别由 -90 mV 至 -30 mV 和至 -20 mV 、持续 300 ms 的去极化脉冲引出。记录 $I_{\text{Na,T}}$ $I-V$ 关系曲线时, 钳制电压为 -90 mV , 通过从 -70 mV 至 $+40 \text{ mV}$ 、以 5 mV 为阶跃、持续 2 s 的去极化脉冲引出。记录 $I_{\text{Na,L}}$ $I-V$ 曲线关系时, 通过从 -80 mV 至 $+60 \text{ mV}$ 、以 10 mV 的阶跃、持续 2 s 的去极化脉冲引出。记录 I_{o} 时, 将钳制电位保持在 -80 mV , 去极化至 -40 mV , 持续 100 ms , 再由 -40 mV 阶跃至 $+50 \text{ mV}$ 。

离体小鼠心电图 (electrocardiogram, ECG) 和单相动作电位 (monophasic action potential, MAP) 记录 将小鼠心脏取出, 置于有钙台式液中。行主动脉逆行插管固定于 Langendorff 灌流装置上冲洗干净, 然

后将心脏置于自制心脏池中,加入 25 mL 台式液后打开恒流泵 (D 100B, 上海青浦沪仪器厂) 使液体循环。使用多通道信息采集分析系统 (BL-420F, 成都泰盟软件有限公司) 进行 ECG 的记录。通过连接 3 个铂电极, 分别置于心尖部、右心房和主动脉根部附近以记录离体心脏 ECG。连接弹簧负载铂头段电极, 将电极置于心室上方以记录 MAP。本实验中的 ECG 和 MAP 记录分为两组: ATX II 组和 ATX II + Mel 组, 两组均记录 60 min。ATX II 组将 62.5 μL 浓度为 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ATX II 加入定容的 25 mL 台式液中, 使终浓度为 5 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 然后灌流心脏, ECG 与 MAP 同步记录 60 min。ATX II + Mel 组 ECG 与 MAP 先同步记录 10 min 后, 往 25 mL 台式液中同时加入 62.5 μL 浓度为 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ATX II 和 8 μL 浓度为 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Mel, 使终浓度分别为 5 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 将液体混匀并使液体充分灌注心脏, 然后 ECG 与 MAP 继续进行同步记录 50 min。

统计学分析 通过使用 Fitmaster、Excel、Origin2021 软件分别对实验记录进行数据测量、整理分析和图形拟合。实验所测电流数据通过标准化 (电流/电容) 处理后均用电流密度表示。两组间参数检验通过 *t* 检验进行两组间 Bonferroni 比较法, 多组间参数检验使用单因素方差分析 (ANOVA) 进行多重比较, 实验数据以均数 \pm 标准差表示。非参数检验使用 Fisher 确切概率法进行比较, $P < 0.05$ 被认为差异具有统计学意义。使用 Hill 方程拟合浓度效应曲线 $Y = B_{\text{max}} / [(IC_{50}/D)^n]$, 式中 Y 为电流抑制率, n 为 Hill 系数, B_{max} 为电流最大抑

制率, D 为 Mel 浓度, IC_{50} 为半数抑制浓度。

结果

1 Mel 对小鼠心室肌细胞 $I_{\text{Na,T}}$ 、ATX II 诱导增大的 $I_{\text{Na,L}}$ 的影响

在 250、500、750、1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 不同浓度 Mel 下, Mel 使 $I_{\text{Na,T}}$ 分别下降了 12.5%、35.3%、54.1%、67.7% (图 1A) 且其对 $I_{\text{Na,T}}$ 的抑制作用随浓度增加而增强 (图 1B)。如图 1C、D 所示, Mel 的抑制作用呈浓度依赖性, 通过 Hill 方程拟合浓度-效应关系曲线计算得出 $I_{\text{Na,T}}$ 的 IC_{50} 值为 686.615 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。用 $I_{\text{Na,T}}$ 细胞外液灌流, $I_{\text{Na,T}}$ 恢复至药物干预前水平的 79.5%, 这表明 Mel 对 $I_{\text{Na,T}}$ 的抑制作用是可逆的 (图 1E)。

在本实验中, 结果显示在 2、4、8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 不同浓度下, Mel 使由 ATX II 增大的 $I_{\text{Na,L}}$ 减小, 且抑制作用随浓度增加而增强 (图 2A), 拟合得出的 $I-V$ 曲线关系图显示 Mel 对 $I_{\text{Na,L}}$ 的抑制作用呈浓度依赖性 (图 2B)。利用 Hill 方程拟合浓度-效应关系曲线计算得出 $I_{\text{Na,L}}$ 的 IC_{50} 值为 7.37 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (图 2C)。2、4、8、16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 不同浓度的 Mel 使 ATX II 增大的 $I_{\text{Na,L}}$ 分别减小了 10.3%、27.8%、63.6%、77.8% (图 2D)。2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TTX 可有效抑制 ATX II 诱导增大的 $I_{\text{Na,L}}$, 使 $I_{\text{Na,L}}$ 的幅度降低了 68.2% (图 2E、F)。16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Mel 可使 ATX II 诱导增大的 $I_{\text{Na,L}}$ 幅度降低 65.6%。在用浓度为 2 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ATX II 复灌后, 被 Mel 抑制的 $I_{\text{Na,L}}$ 恢复至其干预前的 89.8% (图 2G、H)。

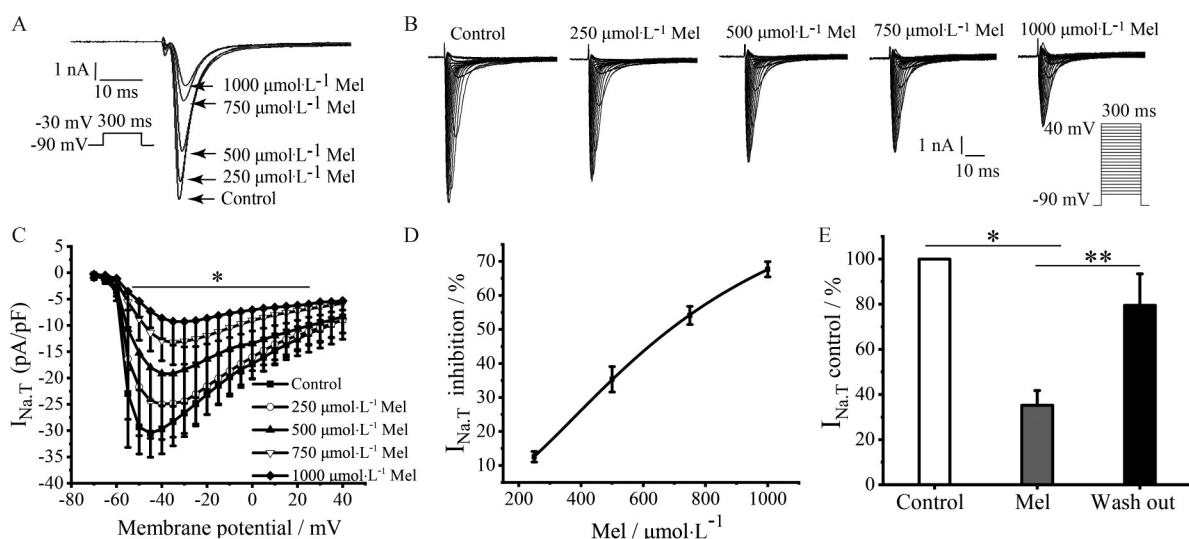


Figure 1 The effects of melatonin (Mel) on late sodium current ($I_{\text{Na,T}}$) in mouse ventricular myocytes. A: Example records of the single $I_{\text{Na,T}}$ of control group and Mel (250, 500, 750 and 1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) groups; B: Transient-sodium current ($I_{\text{Na,T}}$) in the control group and at different concentrations (250, 500, 750, 1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) under the effect of Mel; C: The $I-V$ relationship curves of melatonin action on $I_{\text{Na,T}}$ $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs control; D: The concentration-effect curves fitted by Hill's equation using the percentage inhibition of $I_{\text{Na,T}}$ by Mel; E: The comparison of $I_{\text{Na,T}}$ percentile values among the control, 1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Mel, wash out group. $n = 10$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

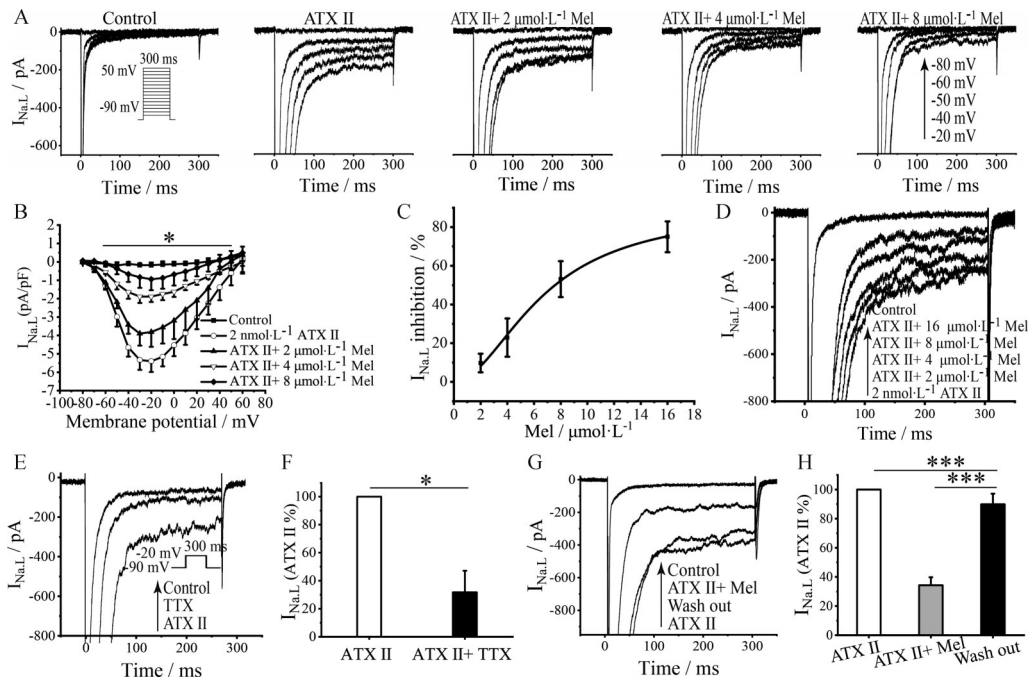


Figure 2 The effects of Mel on I_{NaL} in mouse ventricular myocytes. A: Example records of anemone toxins II (ATX II) increased- I_{NaL} at membrane potentials of -80, -60, -50, -40, and -20 mV from the same cell for the control group, ATX II group, and Mel groups (2, 4, and 8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); B: The I - V relationships curves for the effects of Mel on ATX II-increased I_{NaL} . $n = 11$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs control; C: The concentration-response relationship curve of Mel on the single basal ATX II-increased I_{NaL} ; D: Example plots of the inhibitory effect of Mel at different concentrations (2, 4, 8, 16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on ATX II-increased I_{NaL} in the same ventricular myocytes; E: Example records of I_{NaL} of control, 2 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ATX II, and 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TTX group; F: The comparison of I_{NaL} percentile values among the 2 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ATX II, and 2 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ATX II + 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TTX group. $n = 8$, $\bar{x} \pm s$. G: Example plots of 16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Mel on 2 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ATX II-increased I_{NaL} before and after intervention and reperfusion; H: The comparison of I_{NaL} percentile values among the 2 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ATX II, 2 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ATX II + 16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Mel, wash out group. $n = 9$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$

综上所述, Mel对 I_{NaL} 的 IC_{50} 明显低于对 I_{NaT} 的 IC_{50} , Mel作用于 I_{NaT} 和 I_{NaL} 的 IC_{50} 比值为93.16, 即表明Mel对 I_{NaL} 的抑制效果更佳, 其效果为 I_{NaT} 的93.16倍。

2 Mel对小鼠心室肌细胞 I_{CaL} 、 I_{to} 、AP的影响

在给予浓度为50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Mel前后, 与对照组相比, I_{CaL} 、 I_{to} 电流未发生明显改变(图3A、B)。分别给予20、50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Mel后, 动作电位轨迹图几乎完全重合(图3C), 在不同浓度Mel下, 小鼠心室肌细胞动作电位复极50%时程(action potential duration at 50%, APD_{50})和电位复极90%时程(action potential duration at 90%, APD_{90})均未产生显著影响(图3D、E)。

3 Mel对ATX II诱导的早期后除极(early afterdepolarizations, EADs)的影响

在本实验中, 给予2 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ATX II诱导APD的延长和EADs的发生。如图4A、B所示, 2 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ATX II能有效延长APD和引发EADs。结果显示, 给予16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Mel能有效缩短由ATX II延长的APD并使EADs消失(图4C)。此外, 再用2 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ATX II的细胞外液充分复灌, 如图4D所示, APD重新延长且

EADs再次发生, 结果显示Mel对产生EADs的拮抗作用是可逆的。16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Mel可使 APD_{90} 缩短95.1%且消除EADs。在复灌2 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ATX II后, 恢复至给药前的71.5%, EADs重新出现(图4E、F)。

4 Mel对ATX II诱导的小鼠离体心脏心律失常的影响

将小鼠分为两组, 分别为ATX II组和ATX II + Mel组, 每组各10只。在ATX II组中(图5A), 小鼠心脏首先出现节律不齐, 然后出现传导阻滞, 随后频繁出现早搏, 演变为VT后迅速发生了VF。在ATX II + Mel组中, 小鼠心脏仅出现节律减缓(图5B)。在10例ATX II离体心脏中, 所有心脏均出现VT和VF。在ATX II + Mel组中(图5C), 有5例发生VT, 3例发生VF。通过比较两组VT和VF的平均首发时间, 与ATX II组相比, ATX II + Mel组使首次发作时间延后(图5D)。

5 Mel通过抑制CaMKII的活性降低 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高引起的 I_{NaL} 增强

在全细胞记录模式中, 将钙调蛋白激酶II(calmodulin-dependent protein kinases II, CaMKII)抑制剂(10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KN-93)加入细胞外液中。在同一个细

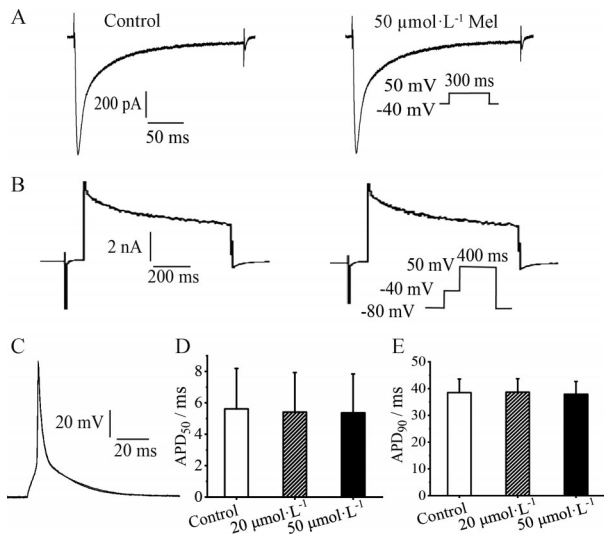


Figure 3 The effects of Mel on L-type calcium current ($I_{Ca,L}$), transient outward current (I_{to}) and action potential (AP) in mouse ventricular myocytes. A, B: The representative traces of $I_{Ca,L}$, I_{to} in the absence and presence of Mel $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; C: Example records of APs from the control group, Mel group, and wash out group in the same ventricular myocyte; D, E: The comparisons of the average action potential duration at 50% (APD_{50}) and action potential duration at 90% (APD_{90}) percentage values of the control group, Mel group at 20 and $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. $n = 7, \bar{x} \pm s$

胞中先给予 $16 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Mel, 电流稳定后灌流给予 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KN-93 和 $16 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Mel。如图 6A、C 所示, 给予 Mel 后, $I_{Na,L}$ 降低了 55.37%, 灌流给予 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KN-93 和 $16 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Mel 后, $I_{Na,L}$ 无显著性改变。在同一个细胞中先灌流加入 KN-93, 待电流稳定后给予 $16 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Mel。如图 6B、D 所示, 给予 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KN-93 后, $I_{Na,L}$ 降低了 61.81%, 而再给予 $16 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

Mel 后, $I_{Na,L}$ 无明显变化。

讨论

$I_{Na,L}$ 是在心脏动作电位平台期观察到的一种持续的小的内向电流, 由于心脏 AP 的平台期是由微小的内向和外向电流流量之间的微妙平衡形成的^[12], 因此, 即使 $I_{Na,L}$ 的微小变化也可能显著改变 AP 的持续时间。 $I_{Na,L}$ 在正常心肌细胞中相对较小 (在平台电位下约为 30 pA), 但在病理条件下会显著增加^[13], 具有潜在的促心律失常作用^[14]。实验和临床研究表明, $I_{Na,L}$ 抑制剂可以预防和治疗心律失常, 改善心室泵功能, $I_{Na,L}$ 抑制剂可能为心脏缺血和心律失常的治疗提供一个有前途的新靶点^[15]。在本研究中, Mel 对 ATX II 诱导增大的 $I_{Na,L}$ 有明显的抑制作用, 可能为心律失常的治疗提供新的思路。TTX 作为 $I_{Na,L}$ 抑制剂, 确有研究报道其可降低衰老相关的应激性室性心律失常发生^[13]。本实验也发现 $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TTX 可使 $I_{Na,L}$ 幅度下降 68.2%, 但 TTX 微剂量即可致死, 具有强烈毒性, 其安全性远远不如 Mel。目前, 在临床上使用最广泛的 $I_{Na,L}$ 抑制剂是雷诺嗪, 但它对 $I_{Na,L}$ 与 $I_{Na,T}$ 的 IC_{50} 比值仅为 4.499^[16]。在本文对 Mel 的研究中, 其 $I_{Na,L}$ 与 $I_{Na,T}$ 的 IC_{50} 比值为 93.16, 说明 Mel 对 $I_{Na,L}$ 的抑制作用是 $I_{Na,T}$ 的 93.16 倍。 $I_{Na,L}$ 与 $I_{Na,T}$ 的 IC_{50} 比值远高于雷诺嗪。同时, 本实验表明在高浓度 Mel 作用下, $I_{Ca,L}$ 和 I_{to} 均未受到 Mel 影响。综上所述, 在心脏电生理方面, Mel 作为一种优先抑制 $I_{Na,L}$ 的 Na^+ 通道阻滞剂对心律失常的治疗具有重要意义, 且其对 $I_{Na,L}$ 的阻断作用具有较高的特异性, 比起以上提及的 I 类 Na^+ 通道阻滞剂和雷诺嗪可能是一种更加有效且选择性更高的安全的 Na^+ 通道阻滞剂。

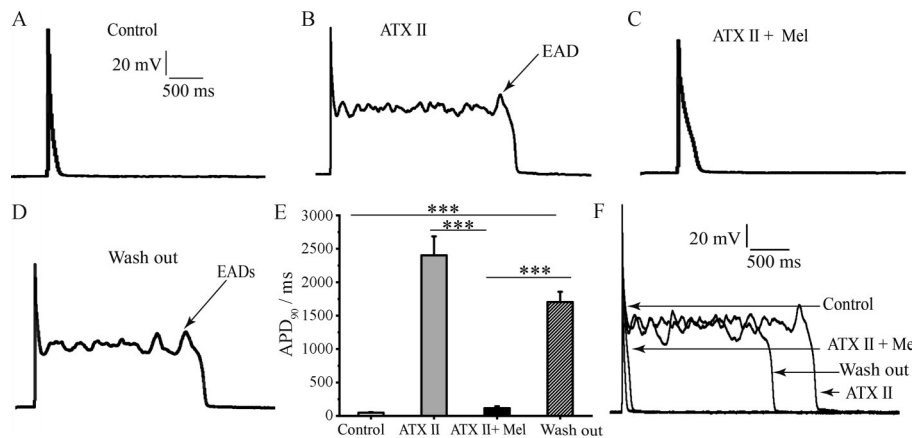


Figure 4 The effects of Mel on the prolonged APD and early afterdepolarizations (EADs) in mouse ventricular myocytes. A-D: Example records of APs from the control group, $2 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ATX II group, $16 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Mel treated group, and wash out group in the same ventricular myocyte, respectively; E: The comparison of average APD_{90} values of the control, $2 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ATX II, $2 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ATX II+ $16 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Mel, wash out group. $n = 10, \bar{x} \pm s$. $***P < 0.001$; F: Example records of single APs at a frequency of 1 Hz on the control, $2 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ATX II, $2 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ATX II + $16 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Mel, wash out group

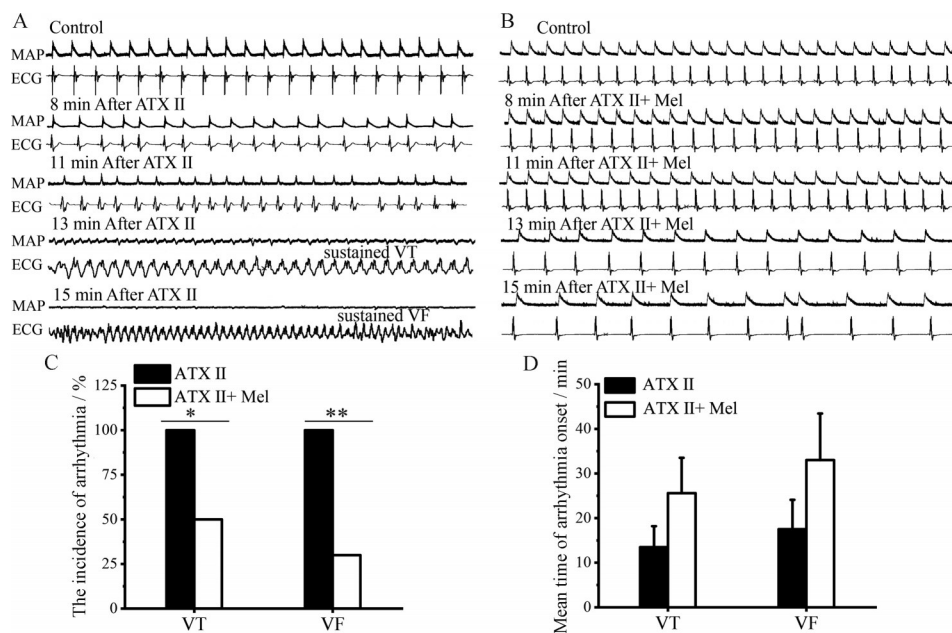


Figure 5 The effect of Mel on ATX II-induced arrhythmia in isolated mouse hearts. Representative recordings of monophasic action potential (MAP) and electrocardiogram (ECG) of the isolated hearts in the $5 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ATX II group (A) and $5 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ATX II + $16 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Mel group (B); C: The comparison of the incidence of ventricular fibrillation (VF) and ventricular tachycardia (VT) in the $5 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ATX II group and the $5 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ATX II + $16 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Mel group. $n=10$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; D: The comparison of average duration of VF and VT after reperfusion in the $5 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ATX II group and the $5 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ATX II + $16 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Mel group

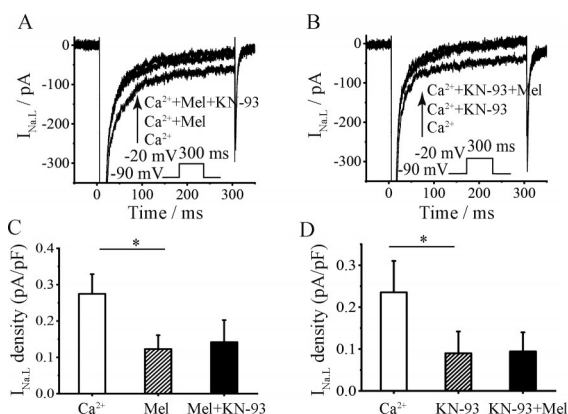


Figure 6 Effect of inhibitors of calmodulin-dependent protein kinases II (CaMKII) (KN-93) and Mel on I_{NaL} in mouse ventricular myocytes. A: I_{NaL} in cells treated with Mel ($16 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) first and then treated with KN-93 ($10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and Mel ($16 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) at $1 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $[\text{Ca}^{2+}]_i$; B: I_{NaL} in cells treated with KN-93 ($10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) first and then treated with Mel ($16 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) at $1 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $[\text{Ca}^{2+}]_i$; C, D: The mean current densities of I_{NaL} at $1 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $[\text{Ca}^{2+}]_i$ before and after drug treatment. $n = 8$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$. KN-93: *N*-[2-(*N*-(4-Chlorine cinnamoyl)-*N*-methyl amino methyl)phenyl)-*N*-(2-hydroxyethyl)-4-methoxy benzene sulfonamide phosphate

EADs主要发生在AP平台期和复极阶段,其会导致多种疾病,包括LQTS、儿茶酚胺能多形性室性心动过速和HF。众所周知,心肌细胞内 Ca^{2+} 的正常循环对心脏的正常电、机械功能至关重要,细胞内 Na^+ 浓度

($[\text{Na}^+]_i$)又与 Ca^{2+} 稳态密切相关^[17]。细胞内 Na^+ 和 Ca^{2+} 浓度之间的直接偶联是通过钠-钙交换器(Na^+ - Ca^{2+} exchanger, NCX)来调节的^[18],当细胞内 Na^+ 浓度增高时(如 I_{NaL} 增大时),反向 Na^+ - Ca^{2+} 交换模式增强使心肌细胞 Ca^{2+} 内流增多导致细胞内钙超载最终诱发多种心律失常。EADs的诱发就与上述的 Na^+ 、 Ca^{2+} 通道及反向 Na^+ - Ca^{2+} 交换电流有关。 I_{NaL} 异常增大会引起细胞内 Na^+ 内流加剧,细胞内钠超载不仅会导致APD平台期延长诱发EADs的发生,还会引起反向 Na^+ - Ca^{2+} 交换增强,最终导致胞内钙超载诱发DADs。因此, I_{NaL} 的增加对EADs的发生和发展有着重要的影响^[19]。本实验结果表明,Mel能够缩短APD并且对ATX II诱导的EADs产生拮抗作用。由此可见,Mel对 I_{NaL} 的抑制作用对于细胞水平上抗心律失常作用扮演着重要角色,具有较强的抑制EADs样心律失常活动的作用,而这种作用可能与对 I_{NaL} 的抑制作用相关,为抗心律失常新药物的研发提供了潜在的可能性。

VT和VF是心源性猝死最重要的因素,多种心血管疾病可导致这两种严重的恶性心律失常,如布鲁格达综合征、长QT综合征等^[20]。已有研究表明,LQTS3患者出现 I_{NaL} 升高,则患者发生室性心律失常和心房颤动的风险都很高^[21],这说明 I_{NaL} 可能在心律失常和机械功能障碍的发生中起重要作用^[14]。因此,本课题组推测Mel对离体心脏的抗心律失常作用与其对 I_{NaL}

的抑制有关。本实验提示, Mel对恶性心律失常的发生可能具有一定的拮抗作用, 这种拮抗作用与其对 I_{NaL} 的抑制密切相关, 可能是其抗心律失常作用的基础。

CaMKII能够磷酸化多种心肌离子通道和钙转蛋白, 所导致的细胞电生理和ECG改变可导致HF中的心律失常发生和收缩功能障碍。心脏钠通道也可通过CaMKII来调节, 且其倾向于增加向内的 Ca^{2+} 和晚期 $I_{Na}^{[22]}$ 。已有研究结果表明, CaMKII参与了 $[Ca^{2+}]_i$ 的增加从而导致 I_{NaL} 的增加。负责 Ca^{2+} 超载诱导 I_{NaL} 增加的通路抑制剂可能有助于减轻与 Ca^{2+} 超载和 I_{NaL} 增强相关的心律失常发生和机械功能障碍^[23]。本文结果提示, Mel与KN-93对晚钠电流的抑制作用不能相加, 表明KN-93与Mel抑制晚钠电流的作用可能是相同的, 且KN-93为CaMKII抑制剂, 即Mel抑制 I_{NaL} 与其对CaMKII的抑制作用相关。

Mel也具有局限性, 其具备光敏性^[24], 易受到环境光照影响, 作用效果可能不稳定。关于Mel的安全性分析仅限于特定的临床适应症或低剂量Mel情况, 并未纳入所有临床条件和考虑高剂量的影响^[25], 对于高浓度治疗剂量下对全身器官的影响仍需进一步研究和探讨。

当前, Mel已经作为一种常见补剂用于治疗睡眠相关疾病^[6]。本实验结果说明, Mel对ATXII诱导的心律失常具有较好的抑制作用, 且这种抑制作用与其对 I_{NaL} 的作用有关。已有实验研究表明, Mel与其他药物联合使用可降低心血管毒性^[26], 因此本文的研究为将来Mel是否可以成为治疗心血管疾病的辅助药物提供了理论基础。

作者贡献: 文杰、刘汗峰、杨岩岩、张泽夫负责构思、设计、完成本实验、统计数据及撰写文章; 罗岸涛、曹珍珍进行论文修改; 马季骅负责论文监督。

利益冲突: 本研究内容无任何利益冲突。

References

- [1] Zhang HY, Zhou Q, Xu LH, et al. Disease burden and risk factors of cardiovascular diseases in China in 1990 and 2019 [J]. Prog Modern Biomed (现代生物医学进展), 2022, 22: 3070-3075.
- [2] Markman TM, Nazarian S. Treatment of ventricular arrhythmias: what's new? [J]. Trends Cardiovasc Med, 2019, 29: 249-261.
- [3] Huang CL, Wu L, Jeevaratnam K, et al. Update on antiarrhythmic drug pharmacology [J]. J Cardiovasc Electrophysiol, 2020, 31: 579-592.
- [4] Lei M, Wu L, Terrar DA, et al. Modernized classification of cardiac antiarrhythmic drugs [J]. Circulation, 2018, 138: 1879-1896.
- [5] Campbell TJ, Vaughan Williams EM. Voltage- and time-dependent depression of maximum rate of depolarisation of guinea-pig ventricular action potentials by two new antiarrhythmic drugs, flecainide and lorcaïnide [J]. Cardiovasc Res, 1983, 17: 251-258.
- [6] Erland LA, Saxena PK. Melatonin natural health products and supplements: presence of serotonin and significant variability of melatonin content [J]. J Clin Sleep Med, 2017, 13: 275-281.
- [7] Reiter R, Tang L, Garcia JJ, et al. Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology [J]. Life Sci, 1997, 60: 2255-2271.
- [8] Esposito S, Laino D, D'Alonzo R, et al. Pediatric sleep disturbances and treatment with melatonin [J]. J Transl Med, 2019, 17: 77.
- [9] Ekmekcioglu C. Melatonin receptors in humans: biological role and clinical relevance [J]. Biomed Pharmacother, 2006, 60: 97-108.
- [10] Chan YT, Tan HY, Lu Y, et al. Pancreatic melatonin enhances anti-tumor immunity in pancreatic adenocarcinoma through regulating tumor-associated neutrophils infiltration and NETosis [J]. Acta Pharm Sin B, 2023, 13: 1554-1567.
- [11] Tobeiha M, Jafari A, Fadaei S, et al. Evidence for the benefits of melatonin in cardiovascular disease [J]. Front Cardiovasc Med, 2022, 9: 888319.
- [12] Horvath B, Hezso T, Kiss D, et al. Late sodium current inhibitors as potential antiarrhythmic agents [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 413.
- [13] Holmuhamedov EL, Chakraborty P, Oberlin A, et al. Aging-associated susceptibility to stress-induced ventricular arrhythmogenesis is attenuated by tetrodotoxin [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2022, 623: 44-50.
- [14] Yu S, Li G, Huang CL, et al. Late sodium current associated cardiac electrophysiological and mechanical dysfunction [J]. Pflugers Arch, 2018, 470: 461-469.
- [15] Horvath B, Hezso T, Szentandrássy N, et al. Late sodium current in human, canine and guinea pig ventricular myocardium [J]. J Mol Cell Cardiol, 2020, 139: 14-23.
- [16] Guo D, Jenkinson S. Simultaneous assessment of compound activity on cardiac Nav1.5 peak and late currents in an automated patch clamp platform [J]. J Pharmacol Toxicol Methods, 2019, 99: 106575.
- [17] Clancy CE, Chen-Izu Y, Bers DM, et al. Deranged sodium to sudden death [J]. J Physiol, 2015, 593: 1331-1345.
- [18] Blaustein MP, Lederer WJ. Sodium/calcium exchange: its physiological implications [J]. Physiol Rev, 1999, 79: 763-854.
- [19] Song Y, Shryock JC, Belardinelli L. An increase of late sodium current induces delayed afterdepolarizations and sustained triggered activity in atrial myocytes [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008, 294: H2031-H2039.
- [20] Srivathsan K, Ng DW, Mookadam F. Ventricular tachycardia and ventricular fibrillation [J]. Expert Rev Cardiovasc Ther, 2009, 7:

- 801-809.
- [21] Wu L, Shryock JC, Song Y, et al. Antiarrhythmic effects of ranolazine in a guinea pig *in vitro* model of long-QT syndrome [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2004, 310: 599-605.
- [22] Anderson ME, Brown JH, Bers DM. CaMKII in myocardial hypertrophy and heart failure [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2011, 51: 468-473.
- [23] Ma J, Luo A, Wu L, et al. Calmodulin kinase II and protein kinase C mediate the effect of increased intracellular calcium to augment late sodium current in rabbit ventricular myocytes [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2012, 302: C1141-C1151.
- [24] Ostrin LA. Ocular and systemic melatonin and the influence of light exposure [J]. *Clin Exp Optom*, 2019, 102: 99-108.
- [25] Menczel Schrire Z, Phillips CL, Chapman JL, et al. Safety of higher doses of melatonin in adults: a systematic review and meta-analysis [J]. *J Pineal Res*, 2022, 72: e12782.
- [26] Li M, Zhang T, Jia Y, et al. Combined treatment of melatonin and sodium tanshinone IIA sulfonate reduced the neurological and cardiovascular toxicity induced by deltamethrin in zebrafish [J]. *Chemosphere*, 2020, 243: 125373.