

## 低钾状态下泮托拉唑致小鼠缓慢型心律失常

李 帅<sup>1</sup>, 朱文根<sup>1</sup>, 阎 霞<sup>2</sup>, 赖 玮<sup>1</sup>, 俞建华<sup>1</sup>, 万 蓉<sup>2</sup>, 洪 葵<sup>1,2,3\*</sup>

(南昌大学 第二附属医院 1. 心血管内科; 2. 江西省分子医学重点实验室; 3. 医学遗传专科, 江西 南昌 330006)

**摘要:**目的 探讨低钾状态下泮托拉唑(PPZ)致小鼠心律失常的机制。方法 将小鼠随机分为4组:对照组、PPZ组[20 mg/(kg·d),腹腔注射5周]、低钾组[FS组,用呋塞米(FS)复制小鼠低钾模型]和低钾泮托拉唑组(FS+PPZ组),每组各20只。第5周末监测各组小鼠心电图参数(HR、PR间期、QRS间期和QTc间期)和自发性心律失常的发生。荧光定量PCR和Western blot检测超级化激活环核苷酸门控阳离子通道2和4(HCN2和HCN4)、电压门控性Na<sup>+</sup>通道α亚基(SCN5A)、L型Ca<sup>2+</sup>通道α1C亚基(CACNA1C)及T型Ca<sup>2+</sup>通道α1G亚基(CACNA1G)mRNA和蛋白表达。结果 与对照组比较,PPZ组HR降低和PR间期延长( $P<0.01$ 和 $P<0.05$ );与FS组比较,FS+PPZ组HR和PR间期均进一步降低和延长( $P<0.01$ 和 $P<0.05$ ),有4只小鼠出现窦性停搏( $P<0.05$ )。PPZ组较对照组HCN4 mRNA和蛋白水平均表达下降( $P<0.01$ ),FS+PPZ组较FS组进一步降低(均 $P<0.01$ );PPZ组较对照组HCN2仅mRNA水平表达下降( $P<0.05$ ),FS+PPZ组较FS组进一步降低( $P<0.01$ )。结论 在低钾状态下泮托拉唑可导致小鼠缓慢型心律失常,可能与HCN2和HCN4基因表达异常有关。

**关键词:**泮托拉唑;低钾血症;心律失常;机制

中图分类号:R541.7 文献标志码:A

## Pantoprazole induces bradyarrhythmia in mice with hypokalemia

LI Shuai<sup>1</sup>, ZHU Wen-gen<sup>1</sup>, YAN Xia<sup>2</sup>, LAI Wei<sup>1</sup>, YU Jian-hua<sup>1</sup>, WAN Rong<sup>2</sup>, HONG Kui<sup>1,2,3\*</sup>

(1. Department of Cardiovascular Medicine; 2. Jiangxi Provincial Key Laboratory of Molecular Medicine;

3. Department of Medical Genetics, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China)

**Abstract: Objective** To investigate the mechanism of arrhythmia induced by pantoprazole (PPZ) in mice with hypokalemia. **Methods** Mice were randomly divided into control group, PPZ group [20 mg/(kg·d), intraperitoneal injection for 5 weeks], furosemide (FS) group and FS+PPZ group. After 5 weeks, the ECG parameters (heart rate, PR interval, QRS interval, QTc interval) and spontaneous arrhythmia were monitored. The changes of the mRNA and protein expression of hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-cation channels 2 and 4 (HCN2 and HCN4), cardiac voltage-gated sodium channel alpha subunit (SCN5A), L-type calcium channel alpha subunit (CACNA1C) and T-type calcium channel alpha subunit (CACNA1G) were analysed by real-time fluorescence quantitative PCR and Western blot technology. **Results** Compared with control group, the HR was significantly decreased and PR interval was prolonged in PPZ group ( $P<0.01$ ,  $P<0.05$ ). Compared with FS group, the HR and PR interval in FS+PPZ group were further decreased and prolonged ( $P<0.01$ ,  $P<0.05$ ), and 4 mice developed sinus arrest (SA)

收稿日期:2019-01-21 修回日期:2019-06-04

基金项目:江西省科技厅自然科学基金重点项目(210171ACB20033);江西省科技厅社会发展领域(20151BBB70266);江西省研究生创新专项资金(YC2016-B022)

\*通信作者(corresponding author): hongkui88@163.com

( $P < 0.05$ ). The expressions of HCN4 mRNA and protein in PPZ group were lower than those in control group ( $P < 0.01$ ), respectively, and the expression in FS+PPZ group was lower than those in FS group ( $P < 0.01$ ). The expression of HCN2 mRNA in PPZ group was lower than that in control group ( $P < 0.05$ ), which was further decreased in FS+PPZ group compared with FS group ( $P < 0.01$ ). **Conclusions** It is found that pantoprazole may lead to bradyarrhythmia in mice under hypokalemia, which may be related to abnormal expression of HCN2 and HCN4.

**Key words:** pantoprazole; hypokalemia; arrhythmia; mechanism

质子泵抑制剂 (proton pump inhibitor, PPI) 是一类抑制胃内  $H^+/K^+$ -ATP 酶的抑酸药物。目前,常用的有奥美拉唑 (omeprazole)、泮托拉唑 (pantoprazole)、兰索拉唑 (lansoprazole)、雷贝拉唑 (rabeprazole) 和埃索美拉唑 (esomeprazole)。PPI 类药物副作用小,但长期和大剂量使用可引起诸多不良反应,严重者可危及生命<sup>[1]</sup>。急性冠脉综合征和经皮冠状动脉介入治疗患者在双联抗血小板 (阿司匹林和氯吡格雷) 治疗时常常接受 PPI 以预防消化道出血。但氯吡格雷联合使用 PPI 治疗的患者,可出现更高的心血管事件 (如卒中、心肌梗死、心律失常及心血管死亡)<sup>[2]</sup>。也有报道一般人群长期使用 PPI 也具有较高的心血管风险<sup>[3]</sup>。泮托拉唑可能导致心律失常的发生<sup>[4-5]</sup>,但缺乏动物实验的验证。低钾血症可导致自律性心脏细胞兴奋性和传导性异常,诱导多种心律失常<sup>[6]</sup>。本研究旨在观察低钾状态使用泮托拉唑致小鼠心律失常及其机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 动物:SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 80 只,体质量 18~25 g [湖南斯莱克景达实验动物有限公司,合格证号 SCXK(湘)2016-0002]。

1.1.2 主要试剂和引物:泮托拉唑钠 (pantoprazole, PPZ) 和呋塞米 (furosemide, FS) (Sigma-Aldrich 公司); PCR 反转录试剂盒和 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II 试剂盒 (TaKaRa 公司); 蛋白检测抗体包括一抗超极化激活核苷酸门控阳离子通道 2 和 4 (hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels, HCN2 和 HCN4)、Nav1.5、Cav1.2 和 Cav3.1 (Alomone Labs 公司); 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG ( $H^+L$ ) 和山羊抗小鼠 IgG ( $H^+L$ ) 抗体 (北京全式金生物公司)。荧光定量 PCR 检测目的基因所需引物由上海生工生物工程有限公司合成。

### 1.2 方法

1.2.1 小鼠的分组和处理:将小鼠随机分为对照组;给予等量 0.9% 氯化钠溶液;PPZ 组:泮托拉唑 20 mg/(kg·d) 连续腹腔注射 5 周;低钾泮托拉唑组 (FS+PPZ 组) 和低钾组 (FS 组) 分别在泮托拉唑和 0.9% 氯化钠溶液连续处理第 4 周末同时给予呋塞米 [FS 30 mg/(kg·d)] 连续腹腔注射 1 周,以构建低钾血症模型,每组  $n=20$  只。

1.2.2 小鼠心电图和心脏超声检测:采用异氟烷麻醉剂 (1% v/v) 吸入式麻醉,将小鼠植入式生理信号遥测系统 (TA10-ETA-F10 植入子) 埋植于小鼠右侧胸肌和左侧上腹皮下,术后恢复 3~5 d,进行心电图记录,每只小鼠记录 30~60 min,重复 3 次。观察小鼠心律失常发生情况,采用 Dataquest ART 4.0 系统分析相关心电参数 [心率 (heart rate, HR)、PR 间期 (PR interval, PR)、QRS 间期 (QRS interval, QRS) 及 QTc 间期 (QTc interval, QTc)]。通过 vevo2100 小动物高分辨率超声影像系统评价各组小鼠的心脏结构及心功能,测定收缩末/舒张末左室内径 (LVIDs/d)、室间隔厚度 (IVS)、左心室后壁收缩厚度 (LVPW)、左室射血分数 (EF%) 和左室短轴缩短率 (FS%)。连续测量 3 个心动周期并取平均值。

1.2.3 血清电解质检测:取麻醉小鼠下腔静脉血,用自动生化分析仪 (Beckman AU5800) 测定血清中  $K^+$ 、 $Ca^{2+}$  和  $Mg^{2+}$  含量。

1.2.4 mRNA 和相关蛋白检测:取小鼠左右心房及周围结缔组织,用实时荧光定量 PCR 和 Western blot 检测目的基因的 mRNA 和相关蛋白的表达。所用引物序列如下:HCN2 上游引物:5'-TCGGATGGCTCCTATTTC-3', 下游引物:5'-TTCCTCCAGCACCTCGTT-3'; HCN4 上游引物:5'-CGGACACCGCTATCAAAG-3', 下游引物:5'-CATCGTCAGGTCCCAGTAAA-3'; GAPDH 上游引物:5'-TGTTTCCTCGTCCCGTAG-3', 下游引物:5'-CAATCTCCACTTTGCCACT-3'。反

应条件为:95 ℃ 15 s → 60 ℃ 30 s → 95 ℃ 15 s,40个循环。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达量,使用Image Lab软件分析条带吸光度值,每个反应或样本重复3次。

### 1.3 统计学分析

采用GraphPad Prism 6.0软件进行分析。连续型变量数据采用均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,组间比较采用两因素方差分析(two way-ANOVA)进行分析。计数资料用率表示,采用Fisher精确检验比较。

## 2 结果

### 2.1 低钾模型小鼠血 $K^+$ 变化及PPZ对各组小鼠电解质的影响

FS组较对照组,FS+PPZ组较PPZ组小鼠血 $K^+$ 含量均降低( $P<0.01$ ),提示造模成功(表1)。在基础和低钾状态下,PPZ组较各自对照组的血 $K^+$ 、 $Ca^{2+}$ 和 $Mg^{2+}$ 无明显变化。

### 2.2 PPZ对小鼠心电图及超声心动图的影响

与对照组比较,PPZ组小鼠HR降低( $P<0.01$ )和PR间期延长( $P<0.05$ );与FS组比较,FS+PPZ组小鼠HR和PR间期均进一步降低和延长( $P<0.01$ )

和 $P<0.05$ ),有4只小鼠出现窦性停搏(sinus arrest,SA)( $P<0.05$ )(表2)。

表1 各组小鼠血清电解质的比较

Table 1 Comparison of serum electrolyte levels in mice ( $\bar{x}\pm s$ , mmol/L)

group	n	$K^+$	$Ca^{2+}$	$Mg^{2+}$
control	20	5.56±0.80	2.28±0.12	1.00±0.23
PPZ	20	5.50±0.68	2.26±0.18	1.04±0.16
FS	17	4.13±0.79*	2.23±0.25	1.05±0.14
PPZ+FS	16	4.09±0.71#	2.21±0.36	1.06±0.18

\* $P<0.01$  compared with control group; # $P<0.01$  compared with PPZ group; PPZ. pantoprazole; FS. furosemide.

在基础和低钾状态下,PPZ组较各自对照组的的心脏结构和功能参数无明显变化。

### 2.3 PPZ对小鼠心房HCN2、HCN4 mRNA和蛋白表达的影响

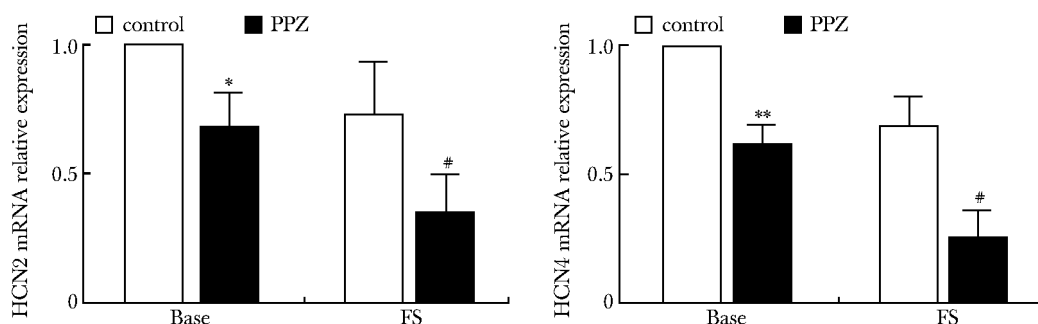
PPZ组较对照组小鼠心房HCN2和HCN4 mRNA表达水平均下降( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),HCN4蛋白水平表达下降( $P<0.01$ );FS+PPZ组较FS组的HCN2、HCN4 mRNA和HCN4蛋白进一步降低( $P<0.01$ )(图1,2)。

表2 各组小鼠心电图参数和窦性停搏发生率的比较

Table 2 Comparison of ECG parameters and SA in mice( $\bar{x}\pm s$ )

group	n	HR/(beats/min)	PR/ms	QRS/ms	QTc/ms	SA/(number)
control	20	613±26	33.0±3.1	13.9±0.6	59.1±9.2	0
PPZ	20	525±65**	38.2±5.5*	14.4±0.8	57.5±9.0	0
FS	17	539±46	37.9±4.8	14.4±1.2	68.4±8.4	0
PPZ+FS	16	459±67##	43.4±7.2#	15.0±1.1	70.9±9.6	4#

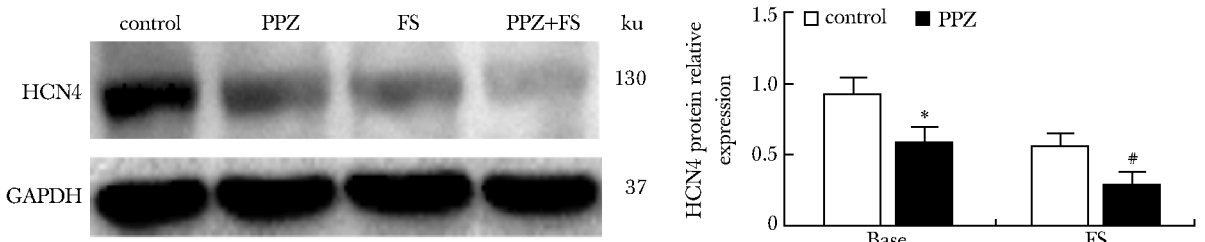
\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  compared with control group; # $P<0.05$ , ## $P<0.01$  compared with FS group; PPZ. pantoprazole; FS. furosemide.



\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  compared with control group; # $P<0.01$  compared with FS group; PPZ. pantoprazole; FS. furosemide; base. baseline

图1 各组小鼠心肌组织HCN2和HCN4基因的mRNA相对表达水平

Fig 1 Relative expression of HCN2 and HCN4 mRNA in myocardium of each group mice( $\bar{x}\pm s$ , n=8)



\* $P < 0.01$  compared with control group; # $P < 0.01$  compared with FS group; PPZ, pantoprazole; FS, furosemide; Base, baseline

图2 各组小鼠心肌组织 HCN4 基因的蛋白相对表达水平

Fig 2 Relative expression of HCN4 protein in myocardium of each group mice ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 7$ )

### 3 讨论

本研究观察到泮托拉唑可导致缓慢型心律失常。已知 HCN2、HCN4、SCN5A、CACNA1C 及 CACNA1G 等基因编码的心脏离子通道对心脏节律有重要影响<sup>[7-9]</sup>。本研究还发现泮托拉唑所致 HCN2 及 HCN4 表达障碍可能导致缓慢型心律失常。

HCN 有 4 种亚型 (HCN1-4), 其中 HCN4 在窦房结高表达, HCN2 表达较少, 由其介导的起搏离子流  $I_f$  是一种超极化激活的内向离子流, 主要对  $\text{Na}^+$  和  $\text{K}^+$  通透, 可限制窦房结起搏细胞的过度超极化并影响窦房结细胞舒张期自动除极化, 具有调控起搏和心率的作用<sup>[10]</sup>。HCN2 和 HCN4 可被细胞内的 pH 值调节, 从而阻滞通道的激活<sup>[11]</sup>。 $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATP 酶可能参与调节心肌细胞内 pH 值和  $\text{K}^+$  浓度<sup>[12]</sup>。提示 PPI 可能通过抑制心肌  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATP 酶而影响心肌细胞内 pH 值, 调控 HCN2 和 HCN4 通道的活性和表达, 导致 HCN2 和 HCN4 功能障碍而减慢心率和延长 PR 间期。

本文还发现 FS 组心率较慢, PPZ 合并 FS 可出现窦性停搏。已知低钾引起的心肌细胞内 pH 值降低对 HCN4 通道具有调节作用。血  $\text{K}^+$  浓度持续过低可导致电流幅度显著降低, 影响 HCN 通道的活化<sup>[13-14]</sup>, 延缓传导和减慢心率。这可能是 PPZ 合并低钾更明显减慢心率及更易诱发缓慢型心律失常的原因。

兰索拉唑显著延长大鼠离体心房肌细胞动作电位持续时间, 主要与  $\text{K}^+$  电流抑制有关, 动作电位持续时间的延长也是通过增加心动周期时间来降低心率的原因<sup>[15]</sup>。本研究中 PPI 可能通过改变心肌细胞的电生理特性而导致体表心电图变化甚至临床上发生心律失常。

本结果提示, 长期使用 PPI 的患者应该注意心率减慢和 PR 间期的延长; 若同时服用其他减慢心率或可能导致电解质紊乱的药物, 需要严密注意心律失常的发生风险。进一步需观察 PPI 对窦房结细胞的具体电生理机制, 为药源性缓慢型心律失常的治疗提供新的依据。

### 参考文献:

- [1] Eusebi LH, Rabitti S, Artesiani ML, *et al.* Proton pump inhibitors: Risks of long-term use [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2017, 32:1295-1302.
- [2] Scott SA, Owusu OA, Hulot JS. Antiplatelet drug interactions with proton pump inhibitors [J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2014, 10:175-189.
- [3] Zhu WG, Hong K. Potential cardiovascular risks of proton pump inhibitors in the general population [J]. Int Heart J, 2017, 58:163-166.
- [4] Bibawy JN, Parikh V, Wahba J, *et al.* Pantoprazole (proton pump inhibitor) contributing to Torsades de Pointes storm [J]. Circ Arrhythm Electrophysiol, 2013, 6:e17-e19.
- [5] El-Charabaty E, Saifan C, Abdallah M, *et al.* Effects of

- proton pump inhibitors and electrolyte disturbances on arrhythmias[J]. *Int J Gen Med*, 2013, 6:515-518.
- [6] Karmakar S, Padman A, Swamy MN, *et al.* Hypokalemia: a potent risk for QTc prolongation in clarithromycin treated rats[J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 709:80-84.
- [7] Verkerk AO, Wilders R. Pacemaker activity of the human sinoatrial node; effects of HCN4 mutations on the hyperpolarization-activated current [J]. *Europace*, 2014, 16: 384-395.
- [8] Lei M, Huang CL, Zhang Y. Genetic Na<sup>+</sup> channelopathies and sinus node dysfunction [J]. *Prog Biophys Mol Biol*, 2008, 98:171-178.
- [9] Zamponi GW, Striessnig J, Koschak A, *et al.* The physiology, pathology, and pharmacology of voltage-gated calcium channels and their future therapeutic potential [J]. *Pharmacol Rev*, 2015, 67:821-870.
- [10] Scicchitano P, Carbonara S, Ricci G, *et al.* HCN channels and heart rate [J]. *Molecules*, 2012, 17: 4225-4235.
- [11] Zong X, Stieber J, Ludwig A, *et al.* A single histidine residue determines the pH sensitivity of the pacemaker channel HCN2 [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276:6313-6319.
- [12] Schillinger W, Teucher N, Sossalla S, *et al.* Negative inotropy of the gastric proton pump inhibitor pantoprazole in myocardium from humans and rabbits; evaluation of mechanisms [J]. *Circulation*, 2007, 116:57-66.
- [13] Ludwig A, Zong X, Jeglitsch M, *et al.* A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels [J]. *Nature*, 1998, 393:587-591.
- [14] Frace AM, Maruoka F, Noma A. External K<sup>+</sup> increases Na<sup>+</sup> conductance of the hyperpolarization-activated current in rabbit cardiac pacemaker cells [J]. *Pflugers Arch*, 1992, 421:97-99.
- [15] Yenisehirli A, Onur R. Positive inotropic and negative chronotropic effects of proton pump inhibitors in isolated rat atrium [J]. *Eur J Pharmacol*, 2005, 519:259-266.

## 新闻点击

### 睡觉时你的床垫可能会释放出毒素

发表在《环境科学与技术》(*Environmental Sciences and Technology*)杂志上(2019-07-10)的研究报告显示,大多数人认为床是一个安全的避风港,但新的研究表明,你的体温可能会引发床垫中潜在有害化学物质的释放。

研究发现,床垫会释放微量气态化学物质,称为挥发性有机化合物(volatile organic compounds, VOCs)。研究人员表示,这些挥发性有机化合物主要来自床垫中使用的聚氨酯,也来自阻燃剂和塑料中使用的其他化学品。在这项研究中,以色列理工学院高级研究员 Yael Dubowski 和她的同事们对模拟的睡眠条件进行了8种不同类型的聚氨酯床垫进行了测试,模拟了人类睡眠甚至几个小时后体内热量、湿度和二氧化碳的升高。结果表明,人的体温会增加床垫 VOCs 的挥发。但研究人员指出,大部分挥发性有机化合物的估计剂量仍然远低于可能导致健康影响的水平。

“没有理由感到恐慌,但重要的是要了解我们的睡眠微环境中的空气质量对于我们接触各种污染物如 VOCs 非常重要,” Yael Dubowski 说。

据美国环境保护署称,与挥发性有机化合物有关的健康影响包括眼睛、鼻子和喉咙刺激,头痛和器官损伤。一些挥发性有机化合物(包括苯、乙醛和甲醛)与癌风险增加有关。

刘晓荻 译

王欣 编