

异丙肾上腺素致大鼠心肌肥大时心肌细胞核 Ca^{2+} 转运功能异常

王培勇 姚兴海 欧和生 苏静怡 汤健 唐朝枢

(北京医科大学心血管基础研究所病理生理室, 北京 100083)

Dysfunction of Myocardial Nuclear Calcium Transport in Isoproterenol Induced Rat Myocardial Hypertrophy

WANG Pei-Yong, YAO Xing-Hai, OU He-Sheng, SU Jing-Yi, TANG Jian and TANG Chao-Shu

(Laboratory of Pathophysiology, Cardiovascular Basic Research Institute, Beijing Medical University, Beijing 100083, China)

ABSTRACT

Aim Myocardial nuclear calcium transport was investigated on the model of isoproterenol (ISO) induced cardiac hypertrophy.

Methods Rats were given injections of ISO subcutaneously (20, 10 and 5 mg/kg/day for 3 days, subsequently 3 mg/kg/day for 7 days). Myocardial nuclei were purified with sucrose density centrifugation and identified zymologically, the activity of Ca^{2+} -ATPase was measured zymologically and calcium uptake was assayed with $^{45}\text{Ca}^{2+}$ isotope.

Results The ratio of heart weight to body weight in ISO group increased by 40% ($P < 0.01$), and ISO-injured heart presented typical cardiac hypertrophy and interstitial fibrosis. Collagen and calcium content in myocardial tissue increased by 81% and 41% respectively ($P < 0.05$). V_{\max} and K_m of ATPase activity decreased by about 24% and 46.1% respectively ($P < 0.05$). Significant decrease of nuclear Ca^{2+} uptake was observed and V_{\max} value was lowered by 62% compared with that of control ($P < 0.01$), but K_m value remained unchanged.

Conclusion The above results indicated a dysfunction of nuclear calcium transport in hypertrophic myocardium.

KEY WORDS Myocardial hypertrophy; Calcium transport; Nucleus; Ca^{2+} -ATPase; Isoproterenol

摘要 为观察异丙肾上腺素致大鼠心肌肥大时心肌细胞核 Ca^{2+} 转运功能的改变, 给大鼠皮下注射异丙肾上腺素制备心肌肥大模型, 采用差速离心和密度梯度离心法分离纯化心肌细胞核, 并用酶学方法鉴定核的纯度及测定 ATP 酶活性, 用 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 同位素法测定核钙摄取。结果发现, 与对照组相比, 实验组肥大心脏的心系数增加 40% ($P < 0.01$), 心肌胶原含量增加 81% ($P < 0.01$), Ca^{2+} 含量增加 41% ($P < 0.05$), 心脏组织呈显著的肥大和纤维化表现。实验组心肌细胞核 Ca^{2+} 依赖性 ATP 酶的 Ca^{2+} 浓度最大反应速度较对照组降低 35% ($P < 0.01$), 平衡常数降低 46% ($P < 0.05$), 对 ATP 浓度反应无显著改变, $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 摄取显著低于对照组 ($P < 0.01$), 其最大反应速度与对照组相比降低 62% ($P < 0.01$), 而平衡常数无显著变化。提示异丙肾上腺素所致大鼠的肥大心肌细胞核钙转运功能降低。

关键词 心肌肥大; Ca^{2+} 转运; 细胞核; Ca^{2+} 依赖性 ATP 酶; 异丙肾上腺素

在慢性充血性心力衰竭、心肌缺血等病变时, 不仅心功能降低, 还常常伴有心肌肥大、心肌纤维化等结构变化, 其发生机制尚未完全阐明^[1]。近年来研究发现, 细胞核 Ca^{2+} 是调节细胞分化、增殖、凋亡和基因表达等功能的重要信号分子^[2], 在大鼠和家兔心肌细胞核上存在对 Ca^{2+} 具有高亲和力的 Ca^{2+} 泵^[3]。本工作在异丙肾上腺素(isoproterenol, ISO)引起的心肌肥大大鼠模型上, 观察心肌细胞核被膜 Ca^{2+} 泵(Ca^{2+} -ATPase)活性和核 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 摄取的变化, 以探讨心肌肥大时心肌细胞核功能紊乱的可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

雄性 Wistar 大鼠(体重 100~150 g)为北京医科大学实验动物中心提供,异丙肾上腺素(isoproterenol, ISO)、ATP- Na_2 、二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)、苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)、磷酸二羟丙酮酸(phosphoenolpyruvate, PEP)、丙酮酸激酶(pyruvate kinase, PK)以及标志酶活性测定试剂均购自 Sigma 公司, $^{45}\text{CaCl}_2$ 为 Amersham 产品。其余试剂均为国产 GR 或 AR 级产品,所用各溶液均以超纯水配制。

1.2 方法

1.2.1 异丙肾上腺素心肌肥大大鼠模型制备

将大鼠随机分为两组。①实验组:按 Rona 等^[4]方法略作改良,皮下注射 ISO,以每天 20、10 和 5 mg/kg 的递减剂量注射 3 天,再以每天 3 mg/kg 的剂量注射 7 天。②对照组:以生理盐水代替 ISO 处理 10 天。全部动物停药 24 h 后,以 20%乌拉坦(5 mL/kg)麻醉,开胸取心脏,称重,取心尖部位作组织学观察,其余心肌用于以下实验。

1.2.2 心肌细胞核分离 参照文献[5]方法改进:大鼠心脏用冷缓冲液(mmol/L: Tris/HCl 50.0, KCl 25.0, MgCl_2 5.0, EGTA 1.0, DTT 1.0, PMSF 1.0, Leupeptin 0.001, pH7.4)冲洗,剪碎后按 1:5(重量/体积)加入等渗匀浆介质(含 0.25 mol/L 蔗糖和 1.0 mmol/L EGTA),内切式匀浆器低速(8 000 r/min)匀浆 2.5 min,再经玻璃匀浆器匀浆,纱布过滤后离心(3 000 r/min, 10 min),弃上清,将沉淀再匀浆和离心一次,加入 1 倍体积的含 1.0 mol/L 蔗糖缓冲液混匀,再加入 3 倍体积含 2.5 mol/L 蔗糖的缓冲液,混匀离心(45 000 r/min, 60 min)后,收集沉淀即为心肌细胞核,于-70℃储存备用。采用 Lowry 法行蛋白质定量分析,二苯胺法行 DNA 定量分析^[6]。用原子吸收分光光度法测定 Ca^{2+} 含量。按文献[7~9]方法测定下述亚细胞成分标志酶的活性:5'-核苷酸酶(肌质膜)、葡萄糖-6-磷酸酶(肌浆网)和琥珀酸脱氢酶(线粒体)。心肌细胞核的获得率以 mg/g 湿重心肌表示,用分离纯化的心肌细胞核进行下述实验。

1.2.3 心室胶原含量测定 ISO 实验组和对照组心脏各 6 只,取出后置烤箱脱水,称重,按 Woessner^[10]的方法测定羟脯氨酸含量,乘以系数 7.46 即为胶原含量,以 mg/g 干重表示。

1.2.4 核钙依赖性 ATP 酶活性测定^[8] 反应液为(mmol/L): KCl 100.0, Histidine 50.0, MgCl_2 5.0, EGTA 0.1, pH7.0。加入 50 μg 蛋白质的细胞核,终反

应体积为 1.0 mL。通过 EGTA 与 Ca^{2+} 的缓冲体系控制反应液中游离 Ca^{2+} 浓度为 100~3 200 nmol/L。根据 Bartifi^[11]的多元缓冲对计算方法确定,然后用 Fura-2 (10 $\mu\text{mol/L}$) 荧光测定法核对。37℃预温 5 min 后,加入 2.0 mmol/L 的 ATP 始动反应,孵育 10 min。加入 2.5 mL 终止液终止反应,测定无机磷产量。 Ca^{2+} -ATPase 活性为总 ATPase 活性与 Mg^{2+} -ATPase 活性之差。酶活性单位为每分钟 mmol/g 蛋白。

1.2.5 核 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 转运测定^[8] 反应液为(mmol/L): KCl 125.0, HEPES 20.0, MgCl_2 5.0, pH7.0, ATP 2.0, EGTA 0.1, $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 18.5 kBq。游离 Ca^{2+} 浓度同 Ca^{2+} -ATPase 的测定,终反应体积为 0.5 mL。37℃预温 5 min 后,通过加入 0.2 mg 蛋白质的细胞核始动反应,孵育 20 min 后加入 1 mL 0.2 mol/L MgCl_2 终止反应,在 Millipore 抽滤器上以 0.45 μm 微孔滤膜抽滤,用 0.1 mol/L MgCl_2 冲洗三次。滤膜干燥后加入闪烁液,在 β -液体闪烁计数器上测定 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 放射强度。同时做非特异摄入管,操作同上,但反应液中不含 ATP。以 nmol/g 蛋白表示核 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 转运量,按下式计算:

$$\text{核}^{45}\text{Ca}^{2+}\text{转运} = \text{总摄入} - \text{非特异摄入}$$

1.3 统计学处理

结果以均值士标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验作两组间比较分析。

2 结果

2.1 大鼠异丙肾上腺素肥大心肌和心肌细胞核的特征

实验组大鼠心脏发生明显肥大,心室壁明显增厚,心脏重量和体重比值较对照组增加 40% ($P < 0.01$)。镜下观察到,心内膜下层有大片纤维化区域和散在的局部心肌坏死灶,其余的心肌纤维增粗,排列紊乱,具有明显的心肌肥大纤维化表现。从表 1(Table 1)可见实验组心肌胶原含量较对照组增加 81% ($P < 0.01$), Ca^{2+} 含量较对照组增加 41% ($P < 0.05$)。

在显微镜下观察本实验制备的心肌细胞核无细胞碎片污染,核蛋白质含量较匀浆低 40 倍,蛋白质与 DNA 含量比值为 10~12,核回收率约为 17%~20%,各亚细胞组分标志酶的活性均低于 5%。

2.2 异丙肾上腺素肥大心肌细胞核钙 ATP 酶活性的变化

从表 2(Table 2)可见,异丙肾上腺素心肌肥大细胞核 Ca^{2+} -ATPase 的 Ca^{2+} 最大反应速度(V_{\max})较对照组降低 34.8% ($P<0.01$),平衡常数(K_m)降低 46% ($P<0.05$)。在 Ca^{2+} 浓度为 400 nmol/L 时,实验组心肌细胞核 ATP 反应的 V_{\max} 较对照组低 18.7%,但无统计学意义。

Table 1. Alterations of calcium ion and collagen content in ISO-induced hypertrophic myocardium ($\bar{x}\pm s$, $n=6$).

Groups	NY (mg/g)	Collagen (mg/g)	Ca^{2+} (mmol/g)	H/B (mg/g)
Control	1.44 ± 0.1	2.25 ± 0.3	12.6 ± 2.5	3.87 ± 0.4
ISO	0.97 ± 0.1	4.07 ± 0.4^b	17.7 ± 3.3^a	5.40 ± 0.7^b

NY: nucleus yield; H/B: heart weight/body weight. a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, compared with control group.

Table 2. V_{\max} and K_m of myocardial nuclear Ca^{2+} -ATPase ($\bar{x}\pm s$, $n=6$).

Groups	[Ca^{2+}]		[ATP]	
	V_{\max} ($\mu\text{mol/g}$)	K_m (nmol/L)	V_{\max} ($\mu\text{mol/g}$)	K_m (nmol/L)
Control	107 ± 9	475 ± 170	55 ± 13	0.22 ± 0.05
ISO	70 ± 8^b	256 ± 49^a	44 ± 16	0.24 ± 0.16

a: $P<0.05$. b: $P<0.01$, compared with control group.

2.3 异丙肾上腺素肥大心肌细胞核⁴⁵Ca²⁺摄取的变化

如图(Figure)所示,在 ATP 存在下心肌细胞核⁴⁵Ca²⁺摄取具有 Ca^{2+} 浓度依赖性,随 Ca^{2+} 浓度增加而升高,在 400 nmol/L 游离钙离子浓度范围内呈线性增加,以后逐渐饱和。ISO 肥大心肌细胞核在 Ca^{2+} 各浓度点的⁴⁵Ca²⁺摄取均显著低于对照组 ($P<0.01$)。其最大反应速度与对照组相比降低 62%(分别为 718 ± 123 nmol/g 和 1891 ± 559 nmol/g, $P<0.01$),平衡常数无显著变化(分别为 351 ± 49 nmol/L 和 332 ± 55 nmol/L, $P>0.05$)。

3 讨论

缺血或超负荷时心脏会发生心肌肥大、纤维化和心肌细胞排列异常等结构重塑(remod

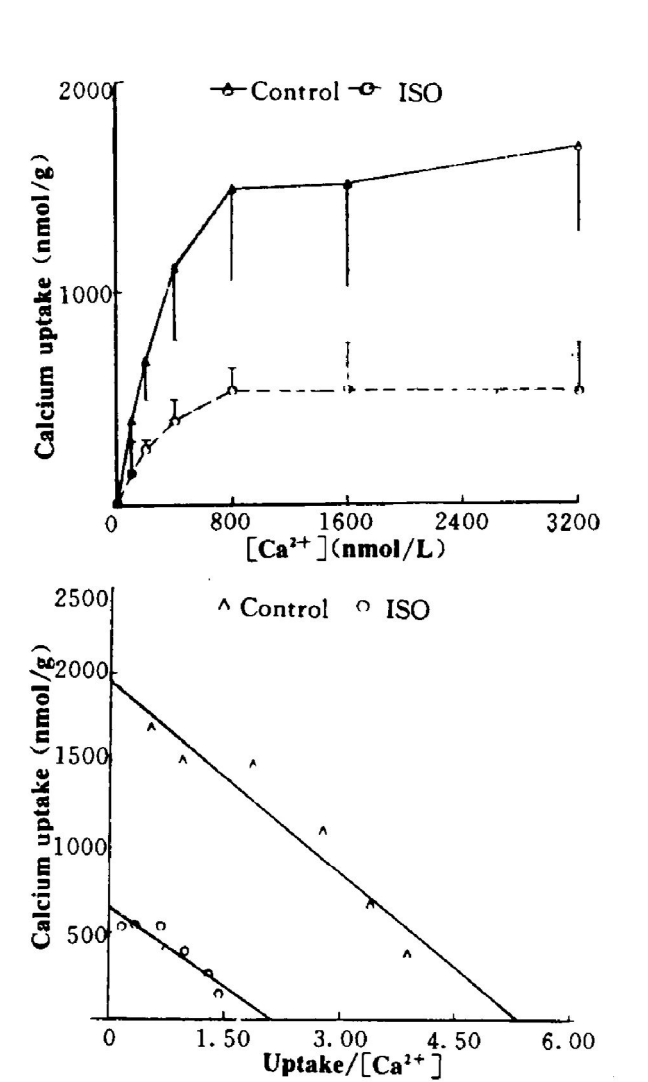


Figure. Changes of myocardial nuclear ⁴⁵Ca²⁺ uptake in ISO-induced rat myocardial hypertrophy ($\bar{x}\pm s$, $n=6$).

eling)变化。心肌重塑是心肌细胞核功能改变、基因表达重新调整的结果^[11]。大量实验资料证实肥大心肌具有胞浆 Ca^{2+} 浓度超载(overload)现象^[12]。对于心肌肥大时 Ca^{2+} 通道、 Na^{+} - Ca^{2+} 交换以及肌浆网 Ca^{2+} 摄入、释放的稳态调节失衡的改变,目前已较清楚。近年发现 Ca^{2+} 不仅调节细胞功能代谢,而且在细胞核内还参与 DNA 复制修复、基因转录、核内收缩系统及细胞程序化死亡等调节^[2]。既往认为胞浆 Ca^{2+} 向核内的转运取决于核孔的被动扩散调节,但近年在不同细胞中发现细胞核上存在 Ca^{2+} 的主动转运体系(Ca^{2+} 泵、IP₃ 受体等)^[13]。我们曾经报道了大鼠和家兔心肌细胞核存在 Ca^{2+} 泵

(Ca²⁺-ATPase),能主动摄取⁴⁵Ca²⁺,其活性呈Ca²⁺浓度和ATP浓度依赖性,并被核蛋白磷酸化调节^[3,14]。推测心肌细胞核的Ca²⁺调节功能紊乱在心肌肥大的发病过程中具有重要的意义。

本工作给大鼠连续10天皮下注射亚致死剂量的ISO,造成心肌局灶坏死、纤维化和心肌肥大模型。其心脏增大,心肌胶原含量和Ca²⁺含量显著增加,组织学上也具有明显的心肌纤维化、肌纤维增粗、排列紊乱等重塑改变。实验组心肌组织细胞核获得率降低,即单位重量心肌组织的细胞核含量减少,提示由于心肌肥大,单位重量的心肌细胞数目减少。肥大心肌细胞核Ca²⁺-ATPase对Ca²⁺浓度反应V_{max}和K_m值显著降低,表明核Ca²⁺-ATPase对Ca²⁺的亲和力增加,而酶活性降低。这一现象在ISO损伤Ca²⁺超载的心肌细胞里可能具有适应性负反馈调节意义。实验组核Ca²⁺-ATPase对ATP浓度反应的V_{max}和K_m均无显著改变,提示ISO肥大心肌细胞核Ca²⁺泵活性对Ca²⁺浓度反应发生明显改变,而对ATP浓度反应与健康心脏并无明显不同。有意义的是心肌核钙转运的V_{max}显著降低,K_m值无显著变化,提示核的钙摄取活性可能受到非竞争性抑制,使钙调节能力下降。由于心肌细胞核的钙调节功能对心肌的核反应具有重要的意义,故推测细胞核钙转运功能降低可能是导致肥大心肌重塑的重要环节之一。

本实验观察到ISO致大鼠心肌坏死、肥大和纤维化损伤时,细胞核Ca²⁺转运系统(Ca²⁺泵、钙摄取)活性改变,⁴⁵Ca²⁺转运能力降低,这些变化的病理生理意义正在进一步研究中。

参考文献

1 Buhler FR, Laragh JH, Holzgreve H. Cardiovascular remodeling and its correction toward a comprehensive strate-

gy. *Am J Med Sci*, 1993, **94**(S4A): 4A~1S.

2 Allbitton NL, Oancea E, Kuhn MA, et al. Source of nuclear calcium signals. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**: 12 458~462.

3 王培勇, 庞永政, 苏静怡, 等. 兔心肌细胞核钙转运. *生物化学与生物物理学报*, 1997, **29**(6): 567~572.

4 Rona G, Chappel CI, Blalazs J, et al. An infarct like myocardial lesion and other toxic manifestations produced by isoproterenol in the rat. *Am Physiol*, 1995, **67**: 443~455.

5 Nicotera P, Mcconkey DJ, Jones DP, et al. ATP stimulates Ca²⁺ uptake and increases the free Ca²⁺ concentration in isolated rat live nuclei. *Pro Natl Acad Sci USA*, 1989, **86**: 453~457.

6 Burton K. A study of the conditions and mechanism of the dipenylamine reaction for the colorimetric estimation of DNA. *Biochem J*, 1956, **62**: 315~323.

7 Jones LR, Beseech HR. Isolation of canine cardiac sarcolemmal vesicles. *Meth Pharmacol*, 1984, **5**: 1~12.

8 Bartifi T. Preparation of metal-chelate complexes and the design of steady-state kinetic experiments involving metal nucleotide complexes. *Adv Cycl Nucl Res*, 1979, **10**: 219~242.

9 Dixon TG, Purdom M. Serum-5'-nucleotidase. *J Clin Pathol*, 1954, **7**: 341~343.

10 Woessner JF. The determination of hydroxy-proline in tissue and samples containing small proportions of this amino acid. *Arch Biochem Biophys*, 1961, **93**: 440~447.

11 Marban E, Koretsune Y. Cell calcium, oncongenes, and hypertrophy. *Hypertension*, 1990, **15**: 657~658.

12 Clapham DE. Calcium signalling. *Cell*, 1995, **80**: 259~268.

13 Czubryt MP, Ramjia WB, Gilchrist JSC, et al. The presence and partitioning of calcium binding proteins in hepatic and cardiac nuclei. *J Mol Cell Cardiol*, 1996, **28**: 455~465.

14 王培勇, 汤健, 庞永政, 等. 心肌细胞核Ca²⁺-ATPase活性特征的研究. *北京医科大学学报*, 1997, **29**: 329~332.

(1997-09-08收到, 1998-03-10修回)