

[文章编号] 1007-3949(2007)15-03-0173-05

• 实验研究 •

大鼠心肌缺血再灌注损伤对心肌细胞膜 Na⁺-K⁺-ATP 酶亚基基因表达的影响与意义

储岳峰, 柯永胜, 俞国华, 杨浩

(皖南医学院弋矶山医院心内科, 安徽省芜湖市 241001)

[关键词] 病理学与病理生理学; 缺血再灌注损伤; 内洋地黄素; 钠钾依赖式 ATP 酶; 线粒体; 钙超载; 逆转录聚合酶链反应; 蛋白质斑迹法

[摘要] 目的 观察心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌组织内洋地黄素水平、ATP 酶活性、线粒体 Ca²⁺ 浓度以及 Na⁺-K⁺-ATP 酶各亚基基因表达的改变, 探讨内洋地黄素在心肌缺血再灌注损伤细胞内钙超载中的可能作用及其机制。方法 32 只雄性 SD 大鼠随机分成假手术组, 心肌缺血再灌注组, 生理盐水组, 维拉帕米组 4 组, 每组 8 只。取缺血区左心室心肌检测心肌匀浆内洋地黄素水平、心肌细胞膜 Na⁺-K⁺-ATP 酶和 Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活性、线粒体 Ca²⁺ 浓度; 分别采用 RT-PCR 及 Western blotting 方法检测心肌 Na⁺-K⁺-ATP 酶 α₁、α₂、α₃ 和 β₁ 亚基 mRNA 及蛋白水平基因表达的改变。结果 心肌缺血再灌注时, 心肌组织内洋地黄素水平明显升高, 心肌细胞膜 Na⁺-K⁺-ATP 酶和 Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活性显著下降, 线粒体 Ca²⁺ 浓度升高, Na⁺-K⁺-ATP 酶 α₁、α₂、α₃ 和 β₁ 亚基 mRNA 及蛋白水平基因表达均明显下降; 维拉帕米预处理除显示降低线粒体 Ca²⁺ 浓度外, 对其它各项指标无明显影响。结论 心肌缺血再灌注能促进心肌内洋地黄素分泌增加, 后者可能通过影响心肌细胞膜上的 Na⁺-K⁺-ATP 酶 α₁、α₂、α₃ 和 β₁ 亚基基因表达, 抑制 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性, 导致线粒体内 Ca²⁺ 超载, 从而介导心肌缺血再灌注损伤。确切的作用机制有待于更深入研究。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Significance and Effect of Myocardial Ischemia Reperfusion Injury on Gene Expression of Na⁺-K⁺-ATPase Isoforms in Rat

CHU Yue-feng, KE Yong-sheng, YU Guo-hua, and YANG Hao

(Department of Cardiology, Yijishan Hospital, Wannan Medical College, Wuhu 241001, China)

[KEY WORDS] Ischemia Reperfusion Injury; Endotoxin; Na⁺-K⁺ Exchanging ATPase; Mitochondria; Calcium Overload; RT-PCR; Western Blotting

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the mechanism of intracellular calcium overload of endotoxin mediating myocardial ischemia reperfusion(MIR) injury, the changes of endotoxin level, ATPase activities, intramitochondrial Ca²⁺ concentration and gene expression of Na⁺-K⁺-ATPase isoforms in myocardium of rats with MIR were observed. **Methods** Thirty-two male Sprague Dawley rats were randomly divided into 4 groups. Sham operation group (control group): silk suture threading the left anterior descending coronary artery without ligation; MIR group (MIR): left anterior descending coronary artery was subjected to 30 min ligation followed by 45 min reperfusion; normal saline group (NS): MIR model was given 5 mL/kg-1 normal saline; verapamil group (Ver): MIR model was given 5 mg/kg verapamil. Drug and NS were injected into vessel via femoral vein within 5 min before reperfusion. After reperfusion left ventricle myocardium samples were processed immediately in order to measure the activities of Na⁺-K⁺-ATPase and Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase, endotoxin level, intramitochondrial Ca²⁺ concentration and the changes of mRNA and protein levels of α₁, α₂, α₃ and β₁ isoforms of Na⁺-K⁺-ATPase were measured by RT-PCR and western blot technology respectively. **Results** After MIR, the level of endotoxin in myocardium was obviously increased, the activities of Na⁺-K⁺-ATPase and Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase in myocardial membrane were significantly decreased while the concentration of intramitochondrial Ca²⁺ increased, the levels of mRNA and protein of the α₁, α₂, α₃ and β₁ isoforms of Na⁺-K⁺-ATPase were reduced markedly. Verapamil had only effect of reducing the concentration of intramitochondrial Ca²⁺. **Conclusion** MIR resulted in increase of myocardial endotoxin secretion. The latter could depress the activity of Na⁺-K⁺-ATPase by changing the gene expression of α₁, α₂, α₃ and β₁ isoforms of Na⁺-K⁺-ATPase in myocardial membrane, and induce intramitochondrial Ca²⁺ overload, thereby mediate MIR injury.

[收稿日期] 2006-11-13 [修回日期] 2007-03-01

[基金项目] 安徽省自然科学基金资助(050430707); 安徽省教育厅自然科学基金资助(2005kj299)

[作者简介] 储岳峰, 硕士, 主治医师, 主要从事心血管药理学研究, 现在安徽省六安市人民医院心血管内三科。通讯作者柯永胜, 硕士, 主任医师, 硕士研究生导师, 安徽省学术与技术带头人, 主要从事冠心病介入治疗与心血管药理, 联系电话为 0553-5739313, E-mail 为 keyongsheng@163.com。俞国华, 主任医师, 硕士研究生导师, 主要从事心血管药理学研究。

心肌缺血再灌注 (myocardial ischemia reperfusion, MIR) 损伤主要与氧自由基、炎症细胞浸润、细胞凋亡和细胞内 Ca^{2+} 超载有关, 其中细胞内钙超载是再灌注心肌损伤的重要机制之一。 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶是真核生物细胞膜上的多功能蛋白多聚体, 是维持细胞正常生理功能所必需的。它通过水解一个 ATP, 能转运 3 个 Na^+ 出胞和 2 个 K^+ 进入细胞, 所引起的电化学梯度是维持细胞静息电位和肌肉与神经组织的兴奋性所必需的, 而且一些细胞膜转运功能包括钠钙通过钠钙交换体配对转运和营养素的摄取等也是以这种离子梯度的存在为前提的。 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶是一个由 α 和 β 亚基组成的异源二聚体, α 亚基包含有三个不同基因编码的亚型: 即 α_1 、 α_2 和 α_3 , 含有 ATP 和糖苷的结合位点, 与酶的催化活性有关; β 亚基也有三个亚型: 即 β_1 、 β_2 和 β_3 , 与 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶的成熟和在细胞膜上的定位等有关^[1-3]。作者既往的研究表明, MIR 大鼠心肌组织内洋地黄素 (endogenous digitalis-like substances or endoxin) 水平升高, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性明显受抑, 线粒体内 Ca^{2+} 含量明显增高, 出现再灌注损伤表现如心功能抑制、发生再灌注心律失常等^[4-6]。提示内洋地黄素在介导 MIR 损伤细胞内钙超载中发挥关键作用。本研究探讨大鼠 MIR 损伤对心肌细胞膜 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶各亚基基因表达的影响, 旨在进一步明确内洋地黄素介导 MIR 损伤细胞内钙超载的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

普通级雄性 Sprague Dawley 大鼠 32 只, 体重 260 ± 50 g, 购于南京青龙山实验动物养殖厂, 合格证号: SCXK(苏)2003-0004。

1.2 在体 MIR 模型建立^[7]

SD 大鼠禁食 12 h, 腹腔内注射 20% 乌拉坦 5 mL/kg 麻醉, 仰位固定, 连接心电图 (E) 导联于 Medlab 生物信号记录处理系统 (NT5.5 版); 切开气管, 行气管插管, 接 WG-2000 型小动物呼吸机行机械通气 (通气频率为 60 次/分, 潮气量为 20 mL/kg)。切开胸腔, 剪开心包, 挤出心脏, 于左冠状动脉前降支距主动脉根部 2~3 mm 处用 4-0 丝线穿过动脉备用。稳定 15 min 后, 于穿线的前降支部位放一横置硅胶管打结结扎, 心电图出现 J 点抬高或为单相曲线者为成功模型建立。结扎 30 min 后, 剪开线结再灌注 45 min。

1.3 实验分组及给药

SD 大鼠 32 只, 随机分成 4 组, 每组 8 只。假手术组: 丝线穿过冠状动脉, 但不结扎, 旷置 90 min; MIR 模型组: 穿线后等心电稳定 15 min, 结扎血管, 30 min 后松开线结, 再灌注 45 min; 生理盐水组与维拉帕米组: 于再灌注前 5 min 经股静脉分别注射生理盐水或维拉帕米 5 mg/kg, 容积均为 5 mL/kg, 5 min 注射完毕, 其余同 MIR 模型组。

1.4 心肌匀浆制备

再灌注结束立即取出心脏, 于预冷的生理盐水中冲去血渍, 去除心房及右心室。留取心尖部心肌组织, 称重约 0.2 g 心室肌放入 5 mL 的小烧杯中, 与预冷的匀浆介质 (Tris 1.21 g/L、EDTA- Na_2 37.23 mg/L、蔗糖 34.2 g/L、再以 200 mmol/L HCl 滴定至 pH 值为 7.4) 1:9 配比, 剪碎后倒入玻璃匀浆器中研磨成 10% 的混悬液。于普通离心机中以 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液放置 -20 °C 冰箱中低温保存, 检测心肌组织 ATP 酶活性和内洋地黄素含量。 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶和 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP}$ 酶活性检测采用化学比色法, 以考马斯亮蓝 G250 进行蛋白定量, 试剂盒购于南京建成生物技术有限公司。内洋地黄素检测采用放射免疫法, 试剂盒购于北京北方生物技术研究所。

1.5 线粒体制备

称重约 0.1 g 心室肌放入 5 mL 的小烧杯中, 与预冷的匀浆介质 (同上) 以 1:9 配比, 剪碎后倒入玻璃匀浆器中研磨制成 10% 的混悬液。于普通离心机中以 2 000 转/分离心 10 min, 取上清液, 于低温高速离心机中以 10 000 转/分离心 15 min, 弃上清液, 沉淀物为粗制线粒体, 蛋白定量为 20 mg/mL。放置 -70 °C 冰箱中低温保存检测线粒体内 Ca^{2+} 含量。线粒体总 Ca^{2+} 含量测定采用原子吸收分光光度法。

1.6 RT-PCR 法检测 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶各亚基 mRNA 的表达^[8]

1.6.1 引物设计 采用 DNASTAR 软件设计钠泵 α_1 、 α_2 、 α_3 、 β_1 各亚基引物, 选用 β -Actin 作为内参照, 由上海生工生物工程公司合成。各引物序列如下: α_1 亚基上游引物 5'-AAG GAC GCC TTT CAG AAT GCC T-3', 下游引物 5'-TGA CCA TGA TGA CCT TAA TCC-3' (248 bp); α_2 亚基上游引物 5'-TGG GCG GCT TCT TCA CCT ACT TTG-3', 下游引物 5'-CAC CCC ATC TCC CCT GTT CTT CC-3' (523 bp); α_3 亚基上游引物 5'-CGG GGC GAT CCT TTG CTT CCT-3', 下游引物 5'-TTC CGG GTC TCC AGT GGG TTG TCG-3' (405

bp); $\beta 1$ 亚基上游引物 5'-ATC GCC GCC GTC TGT TTT ATT TAG-3', 下游引物 5'-TTC GGA GCA CAC TGG AGG ACA AG-3' (429 bp); 内参照 β -Actin 上游引物 5'-TCA TGA AGT GTG ACG TTG ACA TCC GTA AAG-3', 下游引物 5'-CCT AGA AGC ATT TGC GGT GCA CGA TGG AGG-3' (285 bp)。

1.6.2 RNA 提取和 RT-PCR 反应 缺血区心尖心肌组织样品总 RNA 提取采用 Trizol 试剂盒 (promega, USA), 操作按试剂盒说明书进行。提取的总 RNA 经 753BI 型紫外分光光度计 (上海) A260/A280 测定其纯度与含量, 取 2 μ g 逆转录成 cDNA, 进行 PCR 扩增 (按 promega RT-PCR kit 操作说明进行)。

1.6.3 各目的基因扩增条件 钠泵 α_1 亚基: 95 $^{\circ}$ C 5 min, 预变性 \rightarrow 变性 95 $^{\circ}$ C 1 min, 退火 52 $^{\circ}$ C 1 min \rightarrow 延伸 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共循环 32 次; 72 $^{\circ}$ C 10 min 最后延伸。钠泵 α_2 亚基: 95 $^{\circ}$ C 5 min, 预变性 \rightarrow 变性 95 $^{\circ}$ C 1 min \rightarrow 退火 58 $^{\circ}$ C 1 min \rightarrow 延伸 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共循环 33 次; 72 $^{\circ}$ C 10 min 最后延伸。钠泵 α_3 亚基: 95 $^{\circ}$ C 5 min, 预变性 \rightarrow 变性 95 $^{\circ}$ C 1 min \rightarrow 退火 52 $^{\circ}$ C 1 min \rightarrow 延伸 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共循环 35 次; 72 $^{\circ}$ C 10 min 最后延伸。钠泵 β_1 亚基: 95 $^{\circ}$ C 5 min, 预变性 \rightarrow 变性 95 $^{\circ}$ C 1 min \rightarrow 退火 58 $^{\circ}$ C 1 min \rightarrow 延伸 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共循环 32 次; 72 $^{\circ}$ C 10 min 最后延伸。 β -actin: 95 $^{\circ}$ C 5 min, 预变性 \rightarrow 变性 95 $^{\circ}$ C 1 min \rightarrow 退火 55 $^{\circ}$ C 1 min \rightarrow 延伸 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共循环 25 次; 72 $^{\circ}$ C 10 min 最后延伸。

取各目的基因扩增产物 10 μ L, 经琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, 紫外灯下观察并拍照, 采用 Bio-1D 图象分析系统 (USA) 进行产物灰度图象分析, 以各亚基与 β -Actin 的电泳条带光密度值的比值作为各亚基基因的相对表达量。

1.7 Western blot 法检测 Na^+ - K^+ -ATP 酶各亚基蛋白的表达

取 0.1 g 缺血区心尖心肌组织制备胞膜蛋白, 蛋白含量测定采用 Folin 酚试剂法, 将各样品调定至

等蛋白浓度, -80 $^{\circ}$ C 储存备用。采用垂直平板式、不连续性、SDS-PAGE 后, 考马斯亮蓝染色、脱色至背景清晰。Western blot 检测: 电泳结束后, 进行电转移, 转移后的 PVDF 膜切取标准蛋白泳道进行膜染色。其余用洗膜缓冲液洗 5 min, 用含 5% 脱脂奶粉的封闭液封闭, 洗膜, 分别浸入 20 μ L 一抗 (α_1 、 α_2 、 α_3 、 β_1 亚基单克隆抗体, 1: 1 000, Santa Cruz, USA), 4 $^{\circ}$ C 过夜。液膜浸入 20 μ L 二抗 (辣根过氧化物酶标记的鼠抗羊 IgG 抗体, 1: 1 000), 定温孵育 2 h, 洗膜, ECL 试剂显色。采用 Image-Pro plus 图象处理系统 (USA) 进行产物灰度分析, 以各亚基与 β -Actin 的灰度比值作为半定量测定。

1.8 统计学处理

所有数据采用 SPSS13.0 软件包处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组数据间比较采用单因素方差分析 (ANOVA), 多样本均数间两两比较用 SNK-q 检验, 两因素相关关系采用简单直线回归分析, $P < 0.05$ 为差异存在显著性统计学意义。

2 结果

结扎大鼠左冠状动脉前降支, 结扎瞬间立即出现心电图 J 点抬高, 缺血 5~25 min J 点与 QRS 波及 T 波融合形成单相曲线; 同时, 心电图 QRS 波振幅降低; 再灌注后, 心电变化与缺血期相似, 只在再灌注后期出现抬高的 J 点逐渐回降。

2.1 MIR 对大鼠心肌组织内洋地黄素水平、ATP 酶活性、线粒体总钙含量的影响

MIR 时, 心肌组织内洋地黄素水平明显升高, 心肌细胞膜 Na^+ - K^+ -ATP 酶、 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶活性显著下降, 心肌线粒体总 Ca^{2+} 浓度明显升高, 维拉帕米预处理可以明显降低心肌细胞线粒体内总钙水平, 但对心肌组织内洋地黄素水平和 ATP 酶活性无影响 (表 1)。

表 1. MIR 对大鼠心肌组织内洋地黄素水平、ATP 酶活性、线粒体总钙含量的影响 ($n=8$)

分 组	内洋地黄素 ($\mu\text{g/g}$)	Na^+ - K^+ -ATP 酶 ($\text{mmol/g}\cdot\text{h}$)	Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶 ($\text{mmol/g}\cdot\text{h}$)	总 Ca^{2+} (mmol/L)
假手术组	414.68 \pm 26.40	3.86 \pm 0.23	3.89 \pm 0.44	0.135 \pm 0.049
MIR 组	454.18 \pm 17.84 ^b	2.88 \pm 0.26 ^b	2.62 \pm 0.31 ^b	0.206 \pm 0.039 ^b
生理盐水组	451.92 \pm 21.68 ^a	2.95 \pm 0.17 ^b	2.66 \pm 0.34 ^b	0.193 \pm 0.047 ^b
维拉帕米	447.66 \pm 36.89 ^a	2.99 \pm 0.33 ^b	2.90 \pm 0.27 ^b	0.140 \pm 0.041 ^c

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与假手术组比较; c 为 $P < 0.01$, 与 MIR 组和生理盐水组比较。

经相关性分析发现心肌组织内洋地黄素水平与心肌细胞 ATP 酶及线粒体 Ca^{2+} 含量之间具有明显的相关性, 与 $Na^+ - K^+ - ATP$ 酶和 $Ca^{2+} - Mg^{2+} - ATP$ 酶活性呈负相关, r 分别为 -0.483 和 -0.397 , 均 $P < 0.01$; 与线粒体 Ca^{2+} 含量呈正相关, $r = 0.889$, $P < 0.01$ 。

2.2 MIR 对大鼠心肌细胞膜 $Na^+ - K^+ - ATP$ 酶各亚基 mRNA 表达的影响

与假手术组相比, MIR 大鼠心肌细胞膜 $Na^+ - K^+ - ATP$ 酶 α_1 、 α_2 、 α_3 及 β_1 亚基的 mRNA 表达水平均明显下降, 维拉帕米预处理对各亚基的 mRNA 表达无明显影响(表 2 和图 1)。

表 2. MIR 对大鼠心肌细胞膜 $Na^+ - K^+ - ATP$ 酶各亚基 mRNA 表达影响的半定量分析 ($n = 8$)

分 组	α_1 亚基	α_2 亚基	α_3 亚基	β_1 亚基
假手术组	0.46 ± 0.04	0.53 ± 0.02	0.61 ± 0.02	0.57 ± 0.02
MIR 组	0.24 ± 0.03^b	0.19 ± 0.02^b	0.24 ± 0.02^b	0.23 ± 0.03^b
生理盐水组	0.26 ± 0.04^b	0.22 ± 0.03^b	0.26 ± 0.05^b	0.22 ± 0.04^b
维拉帕米	0.22 ± 0.02^b	0.24 ± 0.02^b	0.23 ± 0.03^b	0.24 ± 0.04^b

b 为 $P < 0.01$, 与假手术组比较。

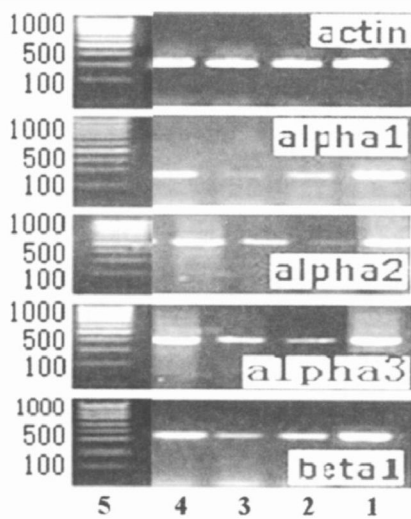


图 1. $Na^+ - K^+ - ATP$ 酶 α_1 、 α_2 、 α_3 、 β_1 亚基及内参照 β -actin PCR 扩增结果 1 为假手术组, 2 为 MIR 组, 3 为生理盐水组, 4 为维拉帕米组, 5 为 Marker。

2.3 MIR 对大鼠心肌细胞膜 $Na^+ - K^+ - ATP$ 酶各亚基蛋白表达的影响

与假手术组相比, MIR 大鼠心肌细胞膜 $Na^+ - K^+ - ATP$ 酶 α_1 、 α_2 、 α_3 及 β_1 亚基的蛋白水平均显著下降, 维拉帕米预处理对各亚基的蛋白水平表达无明显影响(表 3 和图 2)。

与假手术组相比, MIR 大鼠心肌细胞膜 $Na^+ - K^+ - ATP$ 酶各亚基蛋白表达影响的半定量分析 ($n = 8$)

表 3. MIR 对大鼠心肌细胞膜 $Na^+ - K^+ - ATP$ 酶各亚基蛋白表达影响的半定量分析 ($n = 8$)

分 组	α_1 亚基	α_2 亚基	α_3 亚基	β_1 亚基
假手术组	0.48 ± 0.03	0.55 ± 0.03	0.62 ± 0.03	0.57 ± 0.08
MIR 组	0.21 ± 0.03^b	0.22 ± 0.03^b	0.23 ± 0.03^b	0.21 ± 0.04^b
生理盐水组	0.23 ± 0.06^a	0.21 ± 0.02^b	0.22 ± 0.06^b	0.23 ± 0.01^b
维拉帕米	0.22 ± 0.03^b	0.23 ± 0.06^b	0.22 ± 0.02^b	0.24 ± 0.04^b

b 为 $P < 0.01$; a 为 $P < 0.05$, 与假手术组比较。

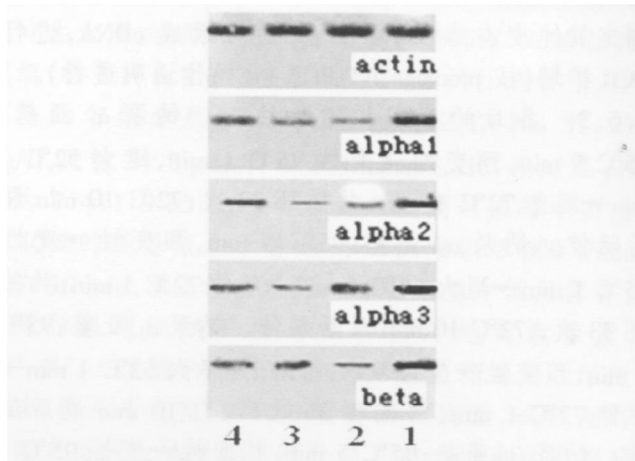


图 2. $Na^+ - K^+ - ATP$ 酶 α_1 、 α_2 、 α_3 、 β_1 亚基及内参照 β -actin 蛋白水平表达结果 1 为假手术组, 2 为 MIR 组, 3 为生理盐水组, 4 为维拉帕米组。

3 讨论

自 1979 年 Hauport 等^[9]第一次从哺乳动物的下丘脑中分离出内洋地黄素开始, 人们对内洋地黄素的研究已近 40 年。目前已确认内洋地黄素是一种钠泵抑制物, 具有强心、利尿和缩血管作用, 它能显著抑制细胞膜上 $Na^+ - K^+ - ATP$ 酶的活性。和地高辛抗体有交叉免疫性, 是洋地黄受体的内源性递质^[10]。研究发现, 高血压、心肌肥厚、充血性心功能衰竭、心律失常、心肌梗死等许多心血管疾病的病理生理过程中都有内洋地黄素的变化^[11]。

三磷酸腺苷酶对维持细胞的正常功能极为重要。 $Na^+ - K^+ - ATP$ 酶在细胞静息状态时通过水解一个 ATP 获得能量, 逆电化学梯度向细胞外转运 3 个 Na^+ , 同时向细胞内转运 2 个 K^+ , 维持细胞内高 K^+ 低 Na^+ 状态。 $Ca^{2+} - Mg^{2+} - ATP$ 酶也是一种膜转运蛋白, 对维持细胞内 Ca^{2+} 稳态有重要作用, 它主要分布在骨骼肌和心肌细胞内部的肌浆网上, 在心肌细胞肌浆网中含量最为丰富, 约占其总蛋白的 90% 以上, 激活时可将胞浆中的 Ca^{2+} 迅速集聚到肌浆网内部, 使胞浆中 Ca^{2+} 浓度在短时期内下降到原来的

1/100。Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活性和 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性对调节细胞内离子平衡和心肌兴奋收缩耦联有重要作用^[12]。

本研究发现, MIR 时, 大鼠心肌内洋地黄素水平显著升高, 细胞膜 Na⁺-K⁺-ATP 酶和 Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活性显著下降, 与此同时, 心肌线粒体内 Ca²⁺ 水平显著升高。经相关分析发现, 内洋地黄素水平与 Na⁺-K⁺-ATP 酶和 Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活性呈显著负相关关系, 与心肌细胞线粒体内 Ca²⁺ 水平呈显著正相关。提示内洋地黄素在介导 MIR 细胞内特别是线粒体内钙超载的机制中可能发挥重要作用。而钙通道阻滞剂维拉帕米虽然能显著降低再灌注大鼠心肌线粒体内 Ca²⁺ 水平, 但对内洋地黄素水平和心肌细胞膜 ATP 酶的活性无明显影响, 表明内洋地黄素并非通过钙通道引起线粒体内钙超载。

Na⁺-K⁺-ATP 酶是一个由 α 和 β 亚单位组成的异源二聚体, α 亚基的分子量为 112 kD, β 亚基为 35 kD。 α 亚基有四种亚型即 α_1 、 α_2 、 α_3 和 α_4 。 α_1 亚基占心肌总 α 亚基的 75%, 动物实验表明, 缺乏 α_1 亚基基因的小鼠心肌和骨骼肌收缩力降低, 但心肌细胞收缩初期钙变化未受影响, 说明 α_1 亚基在收缩期调节初期钙变化中不起主要作用, α_1 亚基主要影响强心甙的毒性作用而不是疗效^[13]。 α_2 和 α_3 亚基对哇巴因的敏感性比 α_1 亚基强, 缺乏 α_2 亚基基因的小鼠心肌和骨骼肌收缩性增强, 使心肌细胞的 α_2 亚基表达减少 50% 也可导致细胞的收缩性升高, 此亚基可能与其调节收缩期初期钙变化的功能有关^[14]。本研究观察到, MIR 时, 心肌细胞膜 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性下降同时伴有酶的亚基构型改变, α_1 、 α_2 、 α_3 和 β_1 亚基在 mRNA 和蛋白质水平表达均明显下降。而钙通道阻滞剂维拉帕米对心肌细胞膜 Na⁺-K⁺-ATP 酶各亚基表达均无明显影响。说明 MIR 损伤时, 除钙通道参与细胞内钙超载外, 心肌细胞膜 Na⁺-K⁺-ATP 酶亚基构型改变也是细胞内钙超载的重要机制之一。本实验的初步结果表明, 大鼠 MIR 时, 刺激心肌内洋地黄素分泌水平增加, 升高的内洋地黄素可与心肌细胞膜上的 Na⁺-K⁺-ATP 酶结合, 使 α_1 、

α_2 、 α_3 和 β_1 亚基基因特别是 α_2 基因的表达减少, 进而使 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性受抑, 使 Na⁺-K⁺ 转运减弱, 细胞内 Na⁺ 水平增高, 促使 Na⁺-Ca²⁺ 交换增加, 引起细胞内 Ca²⁺ 水平增加。与此同时, Na⁺-K⁺-ATP 酶活性受抑又继而进一步抑制肌浆网 Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活性, 使肌浆网对 Ca²⁺ 再摄取的能力降低, 从而导致线粒体内 Ca²⁺ 超载而损伤心肌细胞。本实验提示内洋地黄素可能是介导 MIR 损伤的重要介质之一。

[参考文献]

- [1] Lingrel JB, Orłowski J, Shull MM, Price EM. Molecular genetics of Na, K-ATPase [J]. *Prog Nucl Acids Res and Mol Biol*, 1990, **38** (1): 37-89.
- [2] Sweadner KJ. Isozymes of the Na, K-ATPase [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1989, **988** (2): 185-220.
- [3] Geering K. The functional role of the β -subunit in the maturation and intracellular transport of Na, K-ATPase [J]. *FEBS Lett*, 1991, **285** (2): 189-193.
- [4] Ke YS, Wang HG, Wang DG, Zhang GB. Endoxin-mediated myocardial ischemia reperfusion injury in rats in vitro [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2004, **82** (6): 402-408.
- [5] 汪和贵, 王德国, 柯永胜, 杨尚印. 地高辛抗血清拮抗内源性洋地黄样物质介导的离体大鼠心脏再灌注心律失常的实验研究[J]. *中华心律失常学杂志*, 2004, **8** (5): 285-289.
- [6] 汪和贵, 柯永胜, 王德国, 杨尚印. 内洋地黄素介导大鼠心肌缺氧复氧损伤的实验研究[J]. *中华急诊医学杂志*, 2005, **14** (4): 289-293.
- [7] Hong CY, Huang SS, Tsai SK. Magnolol reduces infarct size and suppresses ventricular arrhythmia in rats subjected to coronary ligation [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 1996, **23** (8): 660-4.
- [8] Muller-Ehmsen J, Wang J, Schwinger RH, McDonough AA. Region specific regulation of sodium pump isoform and Na, Ca exchanger expression in the failing human heart—right atrium vs left ventricle [J]. *Cell Mol Biol*, 2001, **47** (2): 373-381.
- [9] Haupt RT, Sando JM. Sodium transport inhibitor from bovine hypothalamus [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, **76** (9): 4 658-660.
- [10] Hanly JM, Lu ZR, Manunta P, Ludens JH, Kimura K, Shah JR, et al. Observations on the nature, biosynthesis, secretion and significance of endogenous ouabain [J]. *Clin Exp Hypertens*, 1998, **20** (5-6): 523-533.
- [11] Ke YS. Endoxin: a major factor regulating cardiovascular system [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2001, **22** (3): 201-209.
- [12] 谷天祥, 张显清, 谷春久, 石玉秀, 李厚文, 姜桂娥, 等. 心肌缺血再灌注损伤亚细胞 Ca²⁺ 反常与 ATP 酶功能抑制[J]. *中华心血管病杂志*, 2001, **29** (7): 420-424.
- [13] He S, Shelly DA, Moseley AE, James PF, James JH, Paul RJ, et al. The alpha(1)- and alpha(2)-isoforms of NaK-ATPase play different roles in skeletal muscle contractility [J]. *Am J Physiol*, 2001, **281** (3): 917-925.
- [14] James PF, Grupp IL, Grupp G, Woo AL, Askew GR, Croyle ML, et al. Identification of a specific role for the Na, K-ATPase alpha 2 isoform as a regulator of calcium in the heart [J]. *Molecular Cell*, 1999, **3** (5): 555-563.

(此文编辑 李小玲)