

# 钙离子在肿瘤坏死因子 $\alpha$ 诱导心肌肥大中的作用

王桂君<sup>1</sup>, 郭莲怡<sup>1</sup>, 王洪新<sup>2</sup>

(1. 辽宁医学院附属第一医院, 2. 辽宁医学院药理学教研室, 辽宁省锦州市 121000)

[关键词] 心肌肥大; 肿瘤坏死因子  $\alpha$ ; 钙离子;  $IP_3R$ ; RyR

[摘要] **目的** 研究  $Ca^{2+}$  在肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 诱导心肌细胞肥大中的作用。**方法** Lowry 法测心肌细胞蛋白含量; 计算机图像分析系统测心肌细胞体积;  $^3H$ -亮氨酸掺入法测心肌细胞蛋白合成; Till 阳离子测定系统观察胞内  $[Ca^{2+}]_i$  瞬变。**结果**  $IP_3R$  阻断剂 2-APB (30  $\mu mol/L$ ) 或 RyR 阻断剂 ryanodine (50  $\mu mol/L$ ) 能降低由 TNF- $\alpha$  (100  $\mu g/L$ ) 诱导的心肌细胞蛋白合成、蛋白含量以及细胞体积增加, 二者合用抑制作用更强。L 型  $Ca^{2+}$  通道阻断剂 nifedipine (50  $\mu mol$ ) 对上述反应无明显作用 ( $P > 0.05$ )。 $IP_3R$  阻断剂 2-APB (30  $\mu mol/L$ ) 或 RyR 阻断剂 ryanodine (50  $\mu mol/L$ ) 能降低由 TNF- $\alpha$  (100  $\mu g/L$ ) 诱导的心肌细胞内钙离子瞬变幅度增高, 二者合用作用抑制更强。L 型  $Ca^{2+}$  通道阻断剂 nifedipine (50  $\mu mol/L$ ) 对其无明显作用 ( $P > 0.05$ )。**结论** TNF- $\alpha$  通过调节心肌细胞内钙离子浓度从而诱导心肌细胞肥大。而在此过程中 TNF- $\alpha$  可能主要是通过作用  $IP_3R$  和 RyR 促使胞内钙贮库  $Ca^{2+}$  释放而引起胞内钙离子水平增高的, 而非通过打开 L 型  $Ca^{2+}$  通道。

[中图分类号] R972

[文献标识码] A

## The Role of Calcium in Cardiomyocyte Hypertrophy Induced by Tumor Necrosis Factor- $\alpha$

WANG Gui-Jun<sup>1</sup>, GUO Lian-Yi<sup>1</sup>, and WANG Hong-Xin<sup>2</sup>

(1. The First Affiliated Hospital, Liaoning Medical College; 2. Department of Pharmacology, Liaoning Medical College, Jinzhou 121000, China)

[KEY WORDS] Cardiomyocyte Hypertrophy; Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ; Calcium; Inositol 1,4,5-Triphosphate Receptor; Ryanodine Receptor

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the role of calcium in tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )-induced cardiomyocyte hypertrophy. **Methods** The protein content was assayed with Lowry's method. The cardiomyocytes volumes were measured by computer photograph analysis system. The protein synthesis was assayed with  $[^3H]$ -leucine incorporation method.  $[Ca^{2+}]_i$  transient was measured by Till image system by cell-loading Fura-2/AM. **Results** 2-APB, a selective  $IP_3R$  inhibitor, and/or ryanodine, a selective RyR inhibitor, significantly suppress the elevation of the amplitude and the rates of the spontaneous  $Ca^{2+}$  transients induced by TNF- $\alpha$  in cultured ventricular myocytes from the neonatal rat. Nifedipine, an L-type calcium channels antagonist, had little effect on it. The increase of protein content,  $^3H$ -leucine incorporation and cell size induced by TNF- $\alpha$  were significantly suppressed by 2-APB, and/or ryanodine. Nifedipine had no effect on it. **Conclusion** TNF- $\alpha$  induced cardiac hypertrophy through increasing of intracellular  $Ca^{2+}$  in cultured ventricular myocytes from the neonatal rat. It was induced by both  $IP_3R$  and RyR, not by L-type calcium channels.

肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 是一个具有多种生物学效应的致炎细胞因子, 目前已证明 TNF- $\alpha$  诱导心肌肥大性反应<sup>[1,2]</sup>。但是,

TNF- $\alpha$  诱导心肌肥大的分子机制尚不明了。

细胞内  $Ca^{2+}$  浓度增高是致心肌肥大的最基本信号。许多研究已经表明, 胞内  $Ca^{2+}$  信号的改变是

[收稿日期] 2012-02-02

[基金项目] 辽宁省教育厅项目 (L2010304, 2009A455); 辽宁省科技厅计划项目 (2010225034)

[作者简介] 王桂君, 博士, 副教授, 主要从事重症肝病及其并发症的机制研究, E-mail 为 wgj-april@163.com。通讯作者郭莲怡, 博士, 副教授, 主要从事重症肝病的基础及临床研究, E-mail 为 angel\_gly@163.com。王洪新, 博士, 教授, 主要从事心血管药理学及天然药物研究, E-mail 为 jyhxbwang@163.com。

肥大反应的首要刺激,在心脏肥大和基因表达中发挥中心作用<sup>[3]</sup>。

基于 TNF- $\alpha$  参与心肌细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  的调节以及  $\text{Ca}^{2+}$  在心肌肥大发生发展中的重要作用<sup>[4-9]</sup>,本研究旨在观察 TNF- $\alpha$  对  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  的影响,并进一步探讨  $\text{Ca}^{2+}$  在 TNF- $\alpha$  诱导心肌细胞肥大中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物

出生 1~3 天的 SD 大鼠,雌雄兼用,由辽宁医学院实验动物中心提供。动物合格证号:scxK(辽)2003-0007。

### 1.2 药品和试剂

低糖 DMEM、胰蛋白酶(Gibco 公司);胎牛血清(杭州四季青生物材料有限公司); $^3\text{H}$  亮氨酸(上海原子核研究所产品);TNF- $\alpha$ (R&D 公司);SDS、牛血清白蛋白、2-氨基乙基二苯硼酸盐(2-APB)、Fura-2/AM(Sigma 公司);ryanodine(merck 公司);Nifedipine(Calbiochem 公司)。

### 1.3 体外乳鼠心肌细胞原代培养

取出生 1~3 天的 SD 大鼠,无菌条件下开胸取出心脏。Hanks 液冲洗 3 次后剪成约  $1\text{ mm}^3$  大小碎块。加入 0.08% 胰蛋白酶消化细胞。取消化完毕细胞,加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基 10 mL 重悬细胞,200 目滤网过滤细胞悬液,转移至培养瓶中,5%  $\text{CO}_2$ 、37℃ 培养 1 h,除去贴壁的非心肌细胞。将细胞调至  $1 \times 10^9/\text{L}$  (含 84% DMEM 培养基,15% 胎牛血清及 1% 双抗液,即  $10^5\text{ u/L}$  青霉素,100 mg/L 链霉素),接种于 24 孔培养板,送入 5% 二氧化碳孵箱中培养。最初 72 h 用 0.1 mmol/L 5-溴脱氧脲苷抑制非心肌细胞生长,进一步纯化心肌细胞。一般培养 2~3 天,换无血清 DMEM 培养基(内含 5 mg/L 胰岛素、5  $\mu\text{mol/L}$  维生素 B12、10 mg/L 转铁蛋白培养 24 h,进行以下实验。

### 1.4 分组及给药

分为 9 组:第 1 组为对照组;第 2 组为 TNF- $\alpha$  (100  $\mu\text{g/L}$ ) 组;第 3 组为  $\text{IP}_3\text{R}$  阻断剂 2-APB (30  $\mu\text{mol/L}$ ) + TNF- $\alpha$  (100  $\mu\text{g/L}$ ) 组;第 4 组为 RyR 阻断剂 ryanodine (50  $\mu\text{mol/L}$ ) + TNF- $\alpha$  (100  $\mu\text{g/L}$ ) 组;第 5 组为 L 型  $\text{Ca}^{2+}$  通道阻断剂 nifedipine (50  $\mu\text{mol/L}$ ) + TNF- $\alpha$  (100  $\mu\text{g/L}$ ) 组;第 6 组为 2-APB (30  $\mu\text{mol/L}$ ) + ryanodine (50  $\mu\text{mol/L}$ ) + TNF- $\alpha$  (100  $\mu\text{g/L}$ ) 组;第 7 组为 2-APB (30  $\mu\text{mol/L}$ ) 组;第 8 组为 ryanodine (50  $\mu\text{mol/L}$ ) 组;第 9 组为 L 型  $\text{Ca}^{2+}$  通道阻断剂 nifedipine (50  $\mu\text{mol/L}$ ) 组。各

拮抗剂预先孵育 30 min 后再加入 TNF- $\alpha$ 。给药 72 h 后进行肥大指标测定。

### 1.5 培养心肌细胞蛋白质含量的测定

吸去培养板各孔中的培养液,用 D-Hanks 液快速冲洗 3 次后,加入 1% SDS 0.5 mL 溶解细胞,根据计数,每孔细胞数约为  $5 \times 10^5$  个,Lowry 法测每孔细胞蛋白质含量。

### 1.6 培养心肌细胞蛋白质合成的测定

将生长在 24 孔培养板上无血清静止培养了 48 h 的细胞培养液倒掉,代之以含有  $3.7 \times 10^4\text{ Bq } ^3\text{H}$ -亮氨酸及各种浓度的试剂,另备一组无任何细胞的单纯培养基组,同样加入  $3.7 \times 10^4\text{ Bq } ^3\text{H}$ -亮氨酸与其他组一起培养 72 h。倒掉培养液,用冷 Hanks 液快速洗 3 遍,每孔加入 1 mL 1% 的 SDS 溶解细胞,用 2 mL 20% 的三氯醋酸沉淀蛋白,2 mL 95%~99% 乙醇抽滤,烘干滤膜,用液闪仪(Paillard, Tri-card 2200 CA)测量 $^3\text{H}$ -亮氨酸的结合,进行蛋白合成的分析。

### 1.7 培养心肌细胞体积的测定

细胞体积是通过测量细胞直径获得的。用 D-Hanks 液快速冲洗长满细胞的培养孔 3 次,每孔加入 0.3 mL 0.1% 胰蛋白酶,放入 37℃ 恒温箱中 30 min 后,再加入 0.2 mL 含有 10% 血清的培养基终止消化。收集细胞注入一细胞室内(该细胞室底部是一经硅化的盖玻片,以防心肌细胞贴壁),在放大 400 倍的倒置显微镜下观察细胞,几乎均呈球形,用计算机 CIAS 大恒细胞图县图像分析系统测量单个细胞的直径,进而计算出细胞体积。每孔随机选择 4 个视野,每个视野测 20 个细胞。

### 1.8 培养心肌细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 瞬间变化的测定

将长有自发性搏动的心肌细胞的盖玻片从培养皿中取出,置于含有 Fura-2/AM (3  $\mu\text{mol/L}$ ) 的 DMEM 培养基中,其中含有白蛋白 0.2%,在 37℃ 水浴中孵育 30 min。取出盖玻片,用 HEPES 缓冲液冲洗后,放于荧光显微镜下的灌流槽中,恒温 37℃,用 HEPES 缓冲液灌流,灌流速度为 1 mL/min,所有药物均在指定时间加入灌流液中。所用的测定仪器为 Till 阳离子测定系统(德国)采用 DM3000 软件。激发光波长分别为 340 nm 及 380 nm,发射光波长为 505 nm,采样间隙为 300 ms。每次选取 5~10 个细胞,测量心肌细胞  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  的瞬间变化,连续记录心肌细胞在给药前后的荧光强度。根据文献[10]方法计算心肌细胞  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ,计算  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  前应减去细胞自身的荧光。

1.9 统计学分析

采用 SPSS13.0 统计软件进行数据统计。数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用析因设计的方差分析进行统计学检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TNF- $\alpha$  对心肌细胞内钙离子瞬变的影响

TNF- $\alpha$  (100  $\mu\text{g/L}$ ) 能使心肌内钙离子瞬变幅度增高,但不影响基线水平及心肌细胞自发搏动频率;IP<sub>3</sub>R

阻断剂 2-APB (30  $\mu\text{mol/L}$ ) 或 RyR 阻断剂 ryanodine (50  $\mu\text{mol/L}$ ) 能抑制由 TNF- $\alpha$  (100  $\mu\text{g/L}$ ) 诱导的心肌细胞内钙离子瞬变幅度增高,二者合用抑制作用更显著 ( $P < 0.01$ )。nifedipine (50  $\mu\text{mol/L}$ ) 对 TNF- $\alpha$  (100  $\mu\text{g/L}$ ) 诱导的心肌细胞内钙离子瞬变幅度增高无明显影响 ( $P > 0.05$ )。2-APB (30  $\mu\text{mol/L}$ )、ryanodine (50  $\mu\text{mol/L}$ ) 及 nifedipine (50  $\mu\text{mol/L}$ ) 均不明显改变正常心肌细胞的  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  瞬变幅度、静息水平及搏动频率,无统计学意义 (图 1 及表 1)。

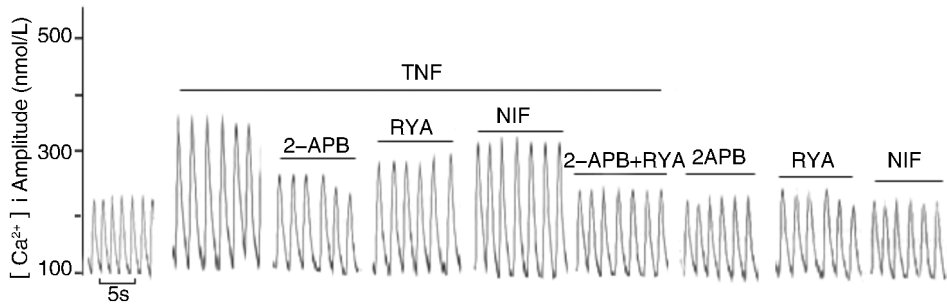


图 1. TNF- $\alpha$  对培养心肌细胞内钙离子瞬变的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 4$ )

Figure 1. Effects of TNF- $\alpha$  on the spontaneous  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  transient in the cultured ventricular myocyte from the neonatal rat ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 4$ )

2.2 2-APB、ryanodine 以及 nifedipine 对 TNF- $\alpha$  诱导的心肌细胞蛋白含量增加的影响

与对照组相比, TNF- $\alpha$  (100  $\mu\text{g/L}$ ) 组心肌细胞蛋白含量增加了 46.82% ( $P < 0.05$ ); 2-APB (30  $\mu\text{mol/L}$ ) 组、ryanodine (50  $\mu\text{mol/L}$ ) 组及 nifedipine (50  $\mu\text{mol/L}$ ) 组的蛋白含量未见明显改变,说明 2-APB、ryanodine 及 nifedipine 对正常心肌细胞的蛋白含量无影响。与 TNF- $\alpha$  组相比, TNF- $\alpha$  (100  $\mu\text{g/L}$ ) + 2-APB (30  $\mu\text{mol/L}$ ) 组、TNF- $\alpha$  + ryanodine (50  $\mu\text{mol/L}$ ) 组、TNF- $\alpha$  (100  $\mu\text{g/L}$ ) + 2-APB (30  $\mu\text{mol/L}$ ) + ryanodine (50  $\mu\text{mol/L}$ ) 组心肌蛋白含量均有降低 ( $P < 0.01$ ), 分别降低了 29.56%、22.4%、40.66%, 说明 2-APB 及 ryanodine 均能抑制 TNF- $\alpha$  诱导的心肌细胞蛋白含量的增加, 且 2-APB 与 ryanodine 合用抑制作用更强。TNF- $\alpha$  (100  $\mu\text{g/L}$ ) + nifedipine (50  $\mu\text{mol/L}$ ) 组蛋白含量未见明显减少 ( $P > 0.05$ ), 说明 nifedipine 对 TNF- $\alpha$  诱导的心肌细胞蛋白含量增加无明显影响 (表 2)。

2.3 2-APB、ryanodine 以及 nifedipine 对 TNF- $\alpha$  诱导的心肌细胞蛋白合成增加的影响

与对照组相比, TNF- $\alpha$  (100  $\mu\text{g/L}$ ) 组心肌细胞蛋白合成增加了 47.11% ( $P < 0.05$ ); 2-APB (30  $\mu\text{mol/L}$ ) 组、ryanodine (50  $\mu\text{mol/L}$ ) 组及 nifedipine

(50  $\mu\text{mol/L}$ ) 组的蛋白合成量未见明显改变, 说明 2-APB、ryanodine 及 nifedipine 对正常心肌细胞的蛋白合成无影响。与 TNF- $\alpha$  组相比, TNF- $\alpha$  (100  $\mu\text{g/L}$ ) + 2-APB (30  $\mu\text{mol/L}$ ) 组、TNF- $\alpha$  (100  $\mu\text{g/L}$ ) + ryanodine (50  $\mu\text{mol/L}$ ) 组、TNF- $\alpha$  (100  $\mu\text{g/L}$ ) + 2-APB (30  $\mu\text{mol/L}$ ) + ryanodine (50  $\mu\text{mol/L}$ ) 组心肌蛋白合成均有降低 ( $P < 0.05$ ), 分别降低了 31.8%、26.28%、37.76%, 说明 2-APB 及 ryanodine 均能抑制 TNF- $\alpha$  诱导的心肌细胞蛋白合成的增加, 且 2-APB 与 ryanodine 合用抑制作用更强。TNF- $\alpha$  (100  $\mu\text{g/L}$ ) + nifedipine (50  $\mu\text{mol/L}$ ) 组蛋白合成未见明显减少 ( $P > 0.05$ ), 说明 nifedipine 对 TNF- $\alpha$  诱导的心肌细胞蛋白合成增加无明显影响 (表 3)。

2.4 2-APB、ryanodine 以及 nifedipine 对 TNF- $\alpha$  诱导的心肌细胞体积增大的影响

与对照组相比, TNF- $\alpha$  (100  $\mu\text{g/L}$ ) 组心肌细胞体积增加了 50.94% ( $P < 0.05$ ); 2-APB (30  $\mu\text{mol/L}$ ) 组、ryanodine (50  $\mu\text{mol/L}$ ) 组及 nifedipine (50  $\mu\text{mol/L}$ ) 组细胞体积未见明显改变, 说明 2-APB、ryanodine 及 nifedipine 对正常心肌细胞体积无影响。与 TNF- $\alpha$  组相比, TNF- $\alpha$  (100  $\mu\text{g/L}$ ) + 2-APB (30  $\mu\text{mol/L}$ ) 组、TNF- $\alpha$  (100  $\mu\text{g/L}$ ) + ryanodine (50  $\mu\text{mol/L}$ ) 组、TNF- $\alpha$  (100  $\mu\text{g/L}$ ) + 2-APB (30  $\mu\text{mol/L}$ ) + ryanodine (50

μmol/L)组心肌细胞体积均有降低( $P < 0.05$ ),分别降低了21.21%、16.35%及25.07%,说明2-APB及ryanodine均能抑制TNF-α诱导的心肌细胞体积增加,且2-APB与ryanodine合用抑制作用更强。TNF-α(100 μg/L) + nifedipine(50 μmol/L)组细胞体积未见明显减少( $P > 0.05$ ),说明nifedipine对TNF-α诱导的心肌细胞体积增加无明显影响(表4)。

表 1. TNF-α 对培养的心肌细胞内钙离子瞬变峰值、静息值及频率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

**Table 1. Effects of TNF-α on the peak amplitude, the resting  $\text{Ca}^{2+}$  level and frequency of the spontaneous  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  transient in cultured ventricular myocyte from the neonatal rat. ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )**

分 组	$[\text{Ca}^{2+}]_i(\text{nmol/L})$		频率/分
	峰值	静息值	
对照组	164.2 ± 6.8	106.8 ± 3.2	58.2 ± 2.4
TNF-α	212.4 ± 7.0 <sup>a</sup>	108.7 ± 5.5	58.8 ± 4.4
TNF-α + 2-APB 组	184.6 ± 10.6 <sup>bc</sup>	106.3 ± 4.3	57.2 ± 4.2
TNF-α + RYA 组	191.1 ± 11.2 <sup>bc</sup>	110.2 ± 3.4	56.3 ± 5.0
TNF-α + NIF 组	207.4 ± 8.4	104.6 ± 3.4	56.9 ± 2.6
TNF-α + 2-APB + RYA 组	172.8 ± 8.4 <sup>b</sup>	107.5 ± 3.9	58.7 ± 2.5
2-APB 组	156.2 ± 9.4	103.2 ± 6.1	53.2 ± 5.1
RYA 组	158.7 ± 10.0	105.4 ± 4.6	55.3 ± 4.6
NIF 组	155.3 ± 8.8	101.3 ± 5.7	51.6 ± 3.9

TNF 为 TNF-α(100 μg/L),2-APB 为 2-APB(30 μmol/L),RYA 为 ryanodine(50 μmol/L),NIF 为 nifedipine(50 μmol/L)。a 为  $P < 0.05$ ,与对照组比较;b 为  $P < 0.05$ ,与 TNF-α 组比较;c 为  $P < 0.05$ ,与 2-APB + RYA + TNF-α 组比较。

表 2. 2-APB 和/或 ryanodine 以及 nifedipine 对 TNF-α 诱导的心肌细胞蛋白含量增加的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

**Table 2. Effects of ryanodine and/or 2-APB, nifedipine on protein content of cultured ventricular myocytes from neonatal rats treated with TNF-α ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )**

分 组	蛋白浓度(μg/5 × 10 <sup>5</sup> cells)
对照组	30.18 ± 1.50
TNF-α 组	44.31 ± 1.29 <sup>a</sup>
TNF-α + 2-APB 组	35.39 ± 0.67 <sup>bc</sup>
TNF-α + RYA 组	37.55 ± 1.32 <sup>bc</sup>
TNF-α + NIF 组	42.49 ± 1.05
TNF-α + 2-APB + RYA 组	32.04 ± 1.63 <sup>b</sup>
2-APB 组	30.88 ± 1.98
RYA 组	31.04 ± 2.31
NIF 组	29.82 ± 2.03

TNF-α 组为 TNF-α(100 μg/L),2-APB 为 2-APB(30 μmol/L),RYA 为 ryanodine(50 μmol/L),NIF 为 nifedipine(50 μmol/L)。a 为  $P < 0.05$ ,与对照组比较;b 为  $P < 0.05$ ,与 TNF-α 组比较;c 为  $P < 0.05$ ,与 2-APB + RYA + TNF-α 组比较。

表 3. 2-APB 和/或 ryanodine 以及 nifedipine 对 TNF-α 诱导的心肌细胞蛋白合成增加的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

**Table 3. Effects of ryanodine and/or 2-APB, nifedipine on  $[\text{}^3\text{H}]$ leucine incorporation of cultured ventricular myocytes from neonatal rats treated with TNF-α ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )**

分 组	<sup>3</sup> H-亮氨酸掺入量 (cpm/5 × 10 <sup>5</sup> cells)
对照组	1176 ± 78
TNF-α 组	1730 ± 99 <sup>a</sup>
TNF-α + 2-APB 组	1 356 ± 96 <sup>bc</sup>
TNF-α + RYA 组	1 421 ± 187 <sup>bc</sup>
TNF-α + NIF 组	1 689 ± 70
TNF-α + 2-APB + RYA 组	1 206 ± 112 <sup>b</sup>
2-APB 组	1 164 ± 133
RYA 组	1 152 ± 129
NIF 组	1 159 ± 137

TNF-α 为 TNF-α(100 μg/L),2-APB 为 2-APB(30 μmol/L),RYA 为 ryanodine(50 μmol/L),NIF 为 nifedipine(50 μmol/L)。a 为  $P < 0.05$ ,与对照组比较;b 为  $P < 0.05$ ,与 TNF-α 组比较;c 为  $P < 0.05$ ,与 2-APB + RYA + TNF-α 组比较。

表 4. 2-APB 和/或 ryanodine 以及 nifedipine 对 TNF-α 诱导的心肌细胞体积增大的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 80$ )

**Table 4. Effects of ryanodine and/or 2-APB, nifedipine on cell size of cultured ventricular myocytes from neonatal rats treated with TNF-α ( $\bar{x} \pm s, n = 80$ )**

分 组	细胞体积(μm <sup>3</sup> /单个细胞)
对照组	1 009 ± 131
TNF-α 组	1 523 ± 165 <sup>a</sup>
TNF-α + 2-APB 组	1 309 ± 130 <sup>bc</sup>
TNF-α + RYA 组	1 358 ± 119 <sup>bc</sup>
TNF-α + NIF 组	1 437 ± 132
TNF-α + 2-APB + RYA 组	1 170 ± 153 <sup>b</sup>
2-APB 组	996 ± 110
RYA 组	1 116 ± 132
NIF 组	1 123 ± 146

TNF-α 为 TNF-α(100 μg/L),2-APB 为 2-APB(30 μmol/L),RYA 为 ryanodine(50 μmol/L),NIF 为 nifedipine(50 μmol/L)。a 为  $P < 0.05$ ,与对照组比较;b 为  $P < 0.05$ ,与 TNF-α 组比较;c 为  $P < 0.05$ ,与 2-APB + RYA + TNF-α 组比较。

### 3 讨 论

心肌肥大失代偿期可导致扩张性心肌病、心力衰竭和猝死等疾病,严重危及人类生命<sup>[11]</sup>。心肌肥大刺激因素多种多样,每种刺激信号引起的传导通路不尽相同,但从细胞水平可分三个环节:胞外的



肥大刺激信号、胞内的信号传导及核内基因转录的活化,最终诱导细胞发生肥大表型变化。胞内的信号传导是胞外刺激信号与核内基因转录活化的偶联环节,对心肌肥大的发生发展起重要作用。细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度增高是致心肌肥大的最基本信号,是引起初级和次级应答基因变化的一个始动因素和媒介。

本研究发现  $\text{TNF-}\alpha$  (100  $\mu\text{g/L}$ ) 能使心肌细胞内钙离子瞬变幅度增高,基线水平及心肌细胞自发搏动频率无明显变化。 $\text{IP}_3\text{R}$  阻断剂 2-APB (30  $\mu\text{mol/L}$ )、 $\text{RyR}$  阻断剂 ryanodine (50  $\mu\text{mol/L}$ ) 以及 2-APB (30  $\mu\text{mol/L}$ ) + ryanodine (50  $\mu\text{mol/L}$ ) 能降低由  $\text{TNF-}\alpha$  (100  $\mu\text{g/L}$ ) 诱导的心肌细胞内钙离子瞬变幅度增高, L 型  $\text{Ca}^{2+}$  通道阻断剂 nifedipine (50  $\mu\text{mol/L}$ ) 对  $\text{TNF-}\alpha$  (100  $\mu\text{g/L}$ ) 诱导的心肌细胞内钙离子瞬变幅度增高无明显降低作用,说明  $\text{TNF-}\alpha$  诱导的心肌细胞内钙离子增高可能是通过激活  $\text{IP}_3\text{R}$  和  $\text{RyR}$  使胞内钙贮库储存钙释放而引起,而与 L 型  $\text{Ca}^{2+}$  通道开放所致胞外钙离子内流的关系不大。

$\text{TNF-}\alpha$  (100  $\mu\text{g/L}$ ) 明显诱导心肌细胞蛋白含量、蛋白合成及细胞体积的增加。证实了  $\text{TNF-}\alpha$  诱导心肌肥大的作用。 $\text{IP}_3\text{R}$  阻断剂 2-APB (30  $\mu\text{mol/L}$ )、 $\text{RyR}$  阻断剂 ryanodine (50  $\mu\text{mol/L}$ ) 以及 2-APB + ryanodine 能降低由  $\text{TNF-}\alpha$  (100  $\mu\text{g/L}$ ) 诱导的心肌细胞蛋白合成、蛋白含量以及细胞体积增加。L 型  $\text{Ca}^{2+}$  通道阻断剂 nifedipine (50  $\mu\text{mol/L}$ ) 对  $\text{TNF-}\alpha$  (100  $\mu\text{g/L}$ ) 诱导的心肌细胞蛋白含量、蛋白合成、细胞体积无明显抑制作用。

由于  $\text{IP}_3\text{R}$  阻断剂 2-APB 以及  $\text{RyR}$  阻断剂 ryanodine 不仅对  $\text{TNF-}\alpha$  诱导的细胞 [ $\text{Ca}^{2+}$ ]i 有显著抑制作用,还对  $\text{TNF-}\alpha$  诱导的心肌肥大具有抑制作用,提示  $\text{IP}_3\text{R}$  阻断剂 2-APB 以及  $\text{RyR}$  阻断剂 ryanodine 对  $\text{TNF-}\alpha$  诱导的心肌肥大的抑制作用可能通过调节细胞内钙稳态来达到的,而  $\text{TNF-}\alpha$  诱导心肌肥大可能与其增加胞内钙离子浓度有关。L 型  $\text{Ca}^{2+}$  通道阻断剂 nifedipine (50  $\mu\text{mol/L}$ ) 对  $\text{TNF-}\alpha$  (100  $\mu\text{g/L}$ ) 诱导的心肌细胞内钙离子水平增高无明显影响,而对  $\text{TNF-}\alpha$  (100  $\mu\text{g/L}$ ) 诱导的心肌细胞蛋白含量、蛋白合成以及细胞体积增加均无明显影响,这更进一步支持我们上面的推论,即心肌细胞内钙离子浓度的增加在  $\text{TNF-}\alpha$  诱导心肌肥大中起到重要作用。

本研究结果说明  $\text{TNF-}\alpha$  通过调节心肌细胞内

钙离子浓度从而诱导心肌细胞肥大。而在此过程中  $\text{TNF-}\alpha$  可能主要是通过作用  $\text{IP}_3\text{R}$  和  $\text{RyR}$  促使胞内钙贮库  $\text{Ca}^{2+}$  释放而引起胞内钙离子水平增高的,而非通过打开 L 型  $\text{Ca}^{2+}$  通道。对于胞浆内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度升高与核内哪些心肌肥大基因活化的偶联途径有关,是亟待解决的问题。

#### [参考文献]

- [1] Nakamura K, Fushimi K, Kouchi H, et al. Inhibitory effects of antioxidants on neonatal rat cardiac myocyte hypertrophy induced by tumor necrosis factor- $\alpha$  and angiotensin II [J]. Circulation, 1998, 98 (8): 794-799.
- [2] 李春跃, 王文礼, 薛明明, 等. 压力超负荷性心肌肥厚形成过程中细胞因子  $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$  和  $\text{IL-6}$  的变化[J]. 中国现代医学杂志, 2006, 16 (24): 3 736-750.
- [3] Sabri A, Wilson BA, Steinberg SF. Dual actions of the  $\text{G}\alpha\text{q}$  agonist pasteurella multocida toxin to promote cardiomyocyte hypertrophy and enhance apoptosis susceptibility [J]. Circ Res, 2002, 90 (8): 850-857.
- [4] 李芳, 李绍冰, 苑晓烨, 等. 钙调神经磷酸酶对钙化细胞 I 型三磷酸肌醇受体表达的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2011, 19 (12): 1 001-004.
- [5] 滕赞, 王螺, 李智. 滨蒿内酯对 ryanodine 介导哮喘豚鼠气道平滑肌细胞内钙释放的抑制作用[J]. 中国现代医学杂志, 2012, 22 (4): 24-28.
- [6] 欧妍, 牛小麟, 任付先, 等. L 型钙通道  $\alpha 1\text{C}$  亚单位在成年大鼠心脏中的表达[J]. 第一军医大学学报, 2005, 25 (11): 1 400-404.
- [7] Krown KA, Yasui K, Brooker MJ, et al.  $\text{TNF-}\alpha$  receptor expression in rat cardiac myocytes:  $\text{TNF-}\alpha$  inhibition of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current and  $\text{Ca}^{2+}$  transients [J]. FEBS Lett, 1995, 376 (1-2): 24-30.
- [8] Li XQ, Zhao MG, Mei QB, et al. Effects of tumor necrosis factor- $\alpha$  on calcium movement in rat ventricular myocytes [J]. Acta Pharmacol Sin, 2003, 24 (12): 1 224-230.
- [9] Defer N, Azroyan A, Pecker F, et al.  $\text{TNFR1}$  and  $\text{TNFR2}$  signaling interplay in cardiac myocytes [J]. J Biol Chem, 2007, 282 (49): 35 564-573.
- [10] 李香华, 王洪新, 王秋宁. 黄芪甲苷对高糖诱导的乳大鼠心肌肥大的保护作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2010, 18 (11): 845-848.
- [11] 周玉英, 边云飞, 李茂莲, 等. 不同浓度血管紧张素 (1-7) 对心肌肥厚所致内质网应激损伤的保护作用 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2011, 19 (1): 44-48.

(此文编辑 李小玲)