

# $\kappa$ -阿片受体激动对异丙肾上腺素诱导的乳大鼠心肌细胞肥厚的抑制作用

吴国强, 王洪新\*, 荆黎

(辽宁医学院分子生物学与新药开发重点实验室, 辽宁 锦州 121001)

**摘要:** 目的 通过观察选择性  $\kappa$ -阿片受体 ( $\kappa$ -OR) 激动剂 U50488H 抑制异丙肾上腺素 (Iso) 诱导乳大鼠心肌细胞肥厚的作用及其对细胞内游离钙离子浓度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) 瞬变及钙调素依赖蛋白激酶 II (CaMK II) 表达的影响, 研究  $\kappa$ -OR 激动抑制 Iso 诱导的大鼠心肌细胞肥厚的信号传导机制。方法 以体外培养的乳大鼠心肌细胞为模型, 应用  $\beta$  肾上腺素受体激动剂 Iso  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  诱导心肌肥大, 观察 U50488H  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的作用, 并进一步探讨在 CaMK II 特异性抑制剂 KN93  $0.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 普萘洛尔  $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  及 L-钙通道阻滞剂维拉帕米  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  存在情况下,  $\kappa$ -OR 的激活对心肌肥厚的作用。用 Lowry 法检测心肌细胞蛋白含量; 消化分离法及计算机图像分析系统检测心肌细胞体积;  $[^3\text{H}]$  亮氨酸掺入法测定心肌细胞蛋白的合成; 采用 Till 阳离子测定系统, 以 Fura-2/AM 为荧光探针, 观察心肌细胞  $[Ca^{2+}]_i$  瞬间变化; 用 Western 蛋白印迹法测定 CaMK II  $\delta\text{B}$  表达。结果 Iso  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  使心肌细胞总蛋白含量、体积和蛋白合成明显增加, U50488H  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  抑制 Iso 诱导的心肌肥大, 且抑制程度与 KN93  $0.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 普萘洛尔  $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  及维拉帕米  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  相似, 在 KN93 存在的情况下, U50488H 抑制 Iso 诱导的心肌肥大作用增强; U50488H 能降低 Iso 引起的心肌细胞  $[Ca^{2+}]_i$  瞬间变化升高; Iso 能明显增强心肌细胞内 CaMK II  $\delta\text{B}$  的表达, U50488H 能降低其表达。结论  $\kappa$ -OR 激动剂 U50488H 可能通过降低心肌细胞  $[Ca^{2+}]_i$  瞬间变化和减少心肌细胞内 CaMK II  $\delta\text{B}$  的表达, 抑制

Iso 诱导的乳大鼠心肌细胞肥厚。

**关键词:** 受体, 阿片,  $\kappa$ ; 心肌肥大; U50488H;  $Ca^{2+}$ -钙调蛋白依赖性蛋白激酶

**中图分类号:** R963

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-3002(2008)03-0186-07

**DOI:** 10.3867/j.issn.1000-3002.2008.03.006

Kappa-阿片受体 (kappa-opioid receptor,  $\kappa$ -OR) 存在于心脏<sup>[1]</sup>, 并参与心脏功能的调节。它的激活可以抑制  $\beta$  肾上腺素受体 ( $\beta$ -adrenergic receptor,  $\beta$ -AR) 激动剂异丙肾上腺素 (isoprenaline, Iso) 诱导的心肌肥厚<sup>[2]</sup> 及减少心肌细胞内游离钙离子浓度 ( $[Ca^{2+}]_i$ )<sup>[3]</sup>。本实验室曾报道,  $\kappa$  受体的激活可以抑制体外培养心肌细胞的生长<sup>[4]</sup> 以及去甲肾上腺素诱导的心肌细胞肥大<sup>[5]</sup>, 并表明选择性  $\kappa$ -OR 激动剂 U50488H 通过激活  $\kappa$ -OR 与  $\beta_1$ -AR 交互作用抑制 Iso 所诱导的心肌细胞肥大<sup>[6]</sup>。大量实验表明,  $Ca^{2+}$  信号在心肌肥厚和基因表达中发挥中心作用, 其中钙/钙调素依赖蛋白激酶 ( $Ca^{2+}$ /calmodulin dependent kinase,  $Ca^{2+}$ /CaMK) 家族中的 CaMK II 发挥重要作用, 而 CaMK II  $\delta\text{B}$  亚基是这一通路中重要的一环,  $\delta\text{B}$  在转录反应和基因表达方面发挥重要作用<sup>[7-9]</sup>。为了进一步探索  $\kappa$ -OR 激动抑制 Iso 诱导的乳大鼠心肌细胞肥厚的作用机制, 本研究在 Iso 体外诱导心肌细胞肥大的基础上, 重点观察应用选择性  $\kappa$ -OR 激动剂 U50488H 及选择性 CaMK II 阻断剂 KN93 对心肌细胞肥大的影响, 并进一步观察  $\kappa$ -OR 激动对心肌细胞  $[Ca^{2+}]_i$  及心肌细胞内 CaMK II  $\delta\text{B}$  表达的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物

出生 2~3 d 的 SD 乳大鼠, 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)

收稿日期: 2007-11-09 接受日期: 2008-01-21

基金项目: 辽宁省自然科学基金项目(20042170)

作者简介: 吴国强(1981-), 男, 辽宁省朝阳市人, 药理学硕士, 主要从事心血管药理学研究; 王洪新(1964-), 男, 辽宁省锦州市人, 教授, 医学博士, 主要从事心血管药理学及天然药物研究。

\* 联系作者 E-mail: jyhwxwang@163.com Tel: 13304169343

2003-0007。

## 1.2 药品和试剂

Iso、胰蛋白酶、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)、KN93、普萘洛尔(propranolol)、维拉帕米(verapamil)和低糖 DMEM 培养基均为美国 Sigma 公司产品;U50488H 购自美国 Tocris Cookson 公司;牛血清白蛋白为北京化学试剂公司产品;小牛血清为杭州四季青生物材料研究所产品; [ $^3\text{H}$ ]亮氨酸为上海原子核研究所产品;CaMK II  $\delta\text{B}$  一抗购自美国 Santa Cruz 公司;其他试剂均为分析纯。

## 1.3 体外乳大鼠心肌细胞培养

在无菌条件下,取出生 2~3 d 的 SD 乳大鼠,开胸取出心脏,*D*-Hanks 液冲洗 3 次后剪成约  $1\text{ mm}^3$  大小的碎块,加入  $0.8\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  胰蛋白酶消化细胞,取消化完毕的细胞,加入体积分数为 0.15 的小牛血清、0.84 的 DMEM 培养基及 0.01 的含双抗液( $100\text{ kU}\cdot\text{L}^{-1}$ 青霉素, $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 链霉素)的培养基,吹打均匀后以  $5\times 10^7\text{ L}^{-1}$  接种于 24 孔培养板,送入 5%  $\text{CO}_2$  及 95% 空气的孵箱中培养。

## 1.4 分组及给药

常规培养心肌细胞 2 d 后,换液,为了减少血清成分对实验结果的影响,换液时更换含体积分数为 0.0004 的小牛血清的培养基及各种浓度的试剂。设对照组,其他组分别加入 Iso  $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; Iso  $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  + U50488H  $1\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; Iso  $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  + KN93  $0.2\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; Iso  $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  + U50488H  $1\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  + KN93  $0.2\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; KN93  $0.2\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; Iso  $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  + 普萘洛尔  $2\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; Iso  $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  + 维拉帕米  $1\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。给药 48 h 后进行各项指标的测定。

## 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  $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  SDS  $0.5\text{ mL}$  溶解细胞,根据计数,每孔细胞数约为  $5\times 10^5$  个,Lowry 等<sup>[10]</sup>方法测定每孔细胞蛋白质含量。

## 1.6 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  $0.3\text{ mL}$  胰蛋白酶( $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),放入  $37^\circ\text{C}$  恒温箱中 30 min 后,再加入  $0.2\text{ mL}$  含有体积分数为 0.1 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 大恒细胞图像分析系统测量单个细胞的直径,进而计算出细胞的体积。每孔随机选择 4 个视野,每个视野测 20 个细胞。

## 1.7 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 48 h 的细胞培养液倒掉,代之以含有  $37\text{ TBq}\cdot\text{L}^{-1}$  [ $^3\text{H}$ ]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  $37\text{ TBq}\cdot\text{L}^{-1}$  [ $^3\text{H}$ ]亮氨酸与其他组一起培养 72 h。吸掉每孔的培养液,用冷 *D*-Hanks 液快速冲洗 3 次,加  $1\text{ mL}$  SDS ( $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 溶解细胞,应用 49 型玻璃纤维滤膜过滤,之后用  $2\text{ mL}$  三氯醋酸( $0.2\text{ kg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 沉淀蛋白, $2\text{ mL}$  体积分数 0.95~0.99 乙醇抽滤,烘干滤膜,用液闪仪(Packard, Tricard 2200 CA, 美国)测量 [ $^3\text{H}$ ]亮氨酸的结合,进行蛋白合成的分析。根据计数,每孔的细胞数大致为  $5\times 10^4$  个,实验结果以每孔的 cpm 值计算。

## 1.8 培养心肌细胞 [ $\text{Ca}^{2+}$ ]<sub>i</sub> 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 ( $3\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 的 DMEM 培养基中,其中含有白蛋白 0.2%,在  $37^\circ\text{C}$  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  $37^\circ\text{C}$ ,用 HEPES 缓冲液灌流,灌流速度为  $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,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 及 380 nm,发射光波长为 505 nm,采样间隔为 300 ms。每次选取 5~10 个细胞,测量心肌细胞 [ $\text{Ca}^{2+}$ ]<sub>i</sub> 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[11]方法计算心肌细胞 [ $\text{Ca}^{2+}$ ]<sub>i</sub>,计算 [ $\text{Ca}^{2+}$ ]<sub>i</sub> 前应减去细胞自身的荧光。

## 1.9 Western 蛋白印迹法测定心肌细胞内 CaMK II $\delta\text{B}$ 蛋白表达

细胞加药作用 48 h 后,用细胞刮刀刮下细胞,用 PBS 冲洗下来, $90\times g$  离心 15 min,弃上清,把细胞沉淀置于  $-70^\circ\text{C}$  冰箱备用,测定指标时,取出样品放入 RIPA 缓冲液,并加入  $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  PMSF,超声裂解后离心提取上清液。BCA 法进行蛋白浓度测定。分取  $50\text{ }\mu\text{g}$  加等体积的  $2\times\text{SDS}$  上样缓冲液并煮沸,然后各取  $10\text{ }\mu\text{L}$  样品以及蛋白质标准品点样。Tris-SDS 聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳 3~5 h,转膜 8~12 h;封闭,洗膜,然后以稀释后的羊抗大鼠 CaMK II  $\delta\text{B}$  抗体(1:1000)室温反应 2 h,再与二抗(1:1500)各

反应 1 h, Supel' Signal West Pico 试剂盒中反应 5 min。显影条带经 1200Pro 型图像扫描仪扫描, CAMIAS008 图像分析系统处理, 根据积分吸光度值对比分析条带的强弱。以  $\beta$ -肌动蛋白为内参照, 显影条带经 1200Pro 型图像扫描仪扫描, CAMIAS008 图像分析系统进行半定量分析, 即以 CaMK II  $\delta$ B/ $\beta$ -肌动蛋白的吸光度比值表示 CaMK II  $\delta$ B 的相对表达水平。

### 1.10 统计学分析

数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用单因素方差分析及 LSD 法进行统计学处理。

## 2 结果

### 2.1 在 Iso 存在下, 不同处理因素对心肌细胞蛋白含量的影响

表 1 结果显示, 与对照组相比, Iso 组心肌细胞蛋白含量增加了 49.5%, KN93 组蛋白含量未见明显改变, 表明 KN93 对正常心肌细胞蛋白含量无影响。与 Iso 组相比, Iso + U50488H 组、Iso + KN93 组、Iso + 普萘洛尔组和 Iso + 维拉帕米组的心肌蛋白含量均降低, 分别降低了 32.1%, 34.9%, 28.1% 及 32.5%, 表明 U50488H、KN93、普萘洛尔及维拉帕米均能抑制 Iso 诱导的心肌细胞蛋白含量的增加, 且 U50488H 的抑制作用与其他抑制剂的作用相似; 与 Iso + KN93 组相比, Iso + KN93 + U50488H 组蛋白含量降低了 22.8%。

**Tab 1. Effects of different agents on protein content of cultured ventricular myocytes from neonatal rats**

Drug/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Protein content/ $\mu\text{g}$ (in $5 \times 10^5$ cells)
Control	17.03 $\pm$ 2.74
Iso 10	24.93 $\pm$ 2.72*
KN93 0.2	15.53 $\pm$ 1.18
Iso 10 + U50488H 1	16.92 $\pm$ 2.42#
Iso 10 + KN93 0.2	16.20 $\pm$ 0.98#
Iso 10 + KN93 0.2 + U50488H 1	13.54 $\pm$ 1.04## $\Delta$
Iso 10 + propranolol 2	17.98 $\pm$ 2.11#
Iso 10 + verapamil 1	16.83 $\pm$ 1.42#

The cells were treated with different drugs for 48 h. Iso: isoprenaline.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ . \*  $P < 0.05$ , compared with control; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , compared with Iso group;  $\Delta P < 0.05$ , compared with Iso + KN93 group.

### 2.2 在 Iso 存在下, 不同处理因素对心肌细胞体积的影响

表 2 显示, 与对照组相比, Iso 组心肌细胞体积增大了 93.5%, KN93 组未见明显改变, 表明 KN93 对正常心肌细胞体积无影响。而与 Iso 组相比, Iso + U50488H 组、Iso + KN93 组、Iso + 普萘洛尔组和 Iso + 维拉帕米组心肌细胞体积均减小, 分别减小了 50.5%, 51.2%, 52.1% 及 51.1%, 表明 U50488H、KN93、普萘洛尔及维拉帕米均能抑制 Iso 诱导的心肌细胞体积的增大, 且 U50488H 的抑制作用与其他抑制剂的作用相似; 与 Iso + KN93 组相比, Iso + KN93 + U50488H 组的细胞体积减小了 12.6%。

**Tab 2. Effects of different agents on cell size of cultured ventricular myocytes from neonatal rats**

Drug/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Cell size/ $\mu\text{m}^3$
Control	1192 $\pm$ 133
Iso 10	2305 $\pm$ 189*
KN93 0.2	1177 $\pm$ 123
Iso 10 + U50488H 1	1141 $\pm$ 115#
Iso 10 + KN93 0.2	1125 $\pm$ 214#
Iso 10 + KN93 + U50488H 1	983 $\pm$ 108## $\Delta$
Iso 10 + propranolol 2	1103 $\pm$ 158#
Iso 10 + verapamil 1	1126 $\pm$ 140#

See Tab 1 for the treatment.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 80$  cells. \*  $P < 0.05$ , compared with control; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , compared with Iso group;  $\Delta P < 0.05$ , compared with Iso + KN93 group.

### 2.3 在 Iso 存在下, 不同处理因素对心肌细胞蛋白质合成的影响

表 3 结果显示, 与对照组相比, Iso 组心肌细胞蛋白合成增加了 62.8%, KN93 组未见明显改变, 表明 KN93 对正常心肌细胞蛋白合成无影响。而与 Iso 组相比, Iso + U50488H 组、Iso + KN93 组、Iso + 普萘洛尔组、Iso + 维拉帕米组心肌蛋白合成均降低, 分别降低了 35.5%, 42.9%, 42.3% 及 38.1%, 表明 U50488H、KN93、普萘洛尔及维拉帕米均能抑制 Iso 诱导的心肌细胞蛋白含量的增加, 且 U50488H 的抑制作用与其他抑制剂作用相似; 与 Iso + KN93 组相比, Iso + KN93 + U50488H 组蛋白合成减少了 17.5%。

**Tab 3. Effects of different agents on [<sup>3</sup>H]leucine uptake of cultured ventricular myocytes from neonatal rats**

Drug/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Protein synthesis( <sup>3</sup> H]leucine incorporation/cpm in $5 \times 10^4$ cells)
Control	1102 $\pm$ 176
Iso 10	1794 $\pm$ 165 *
KN93 0.2	1048 $\pm$ 166
Iso 10 + U50488H 1	1158 $\pm$ 217 <sup>#</sup>
Iso 10 + KN93 0.2	1024 $\pm$ 271 <sup>#</sup>
Iso 10 + KN93 + U50488H 1	844 $\pm$ 127 <sup>##</sup> $\Delta$
Iso 10 + propranolol 2	1039 $\pm$ 198 <sup>#</sup>
Iso 10 + verapamil 1	1110 $\pm$ 175 <sup>#</sup>

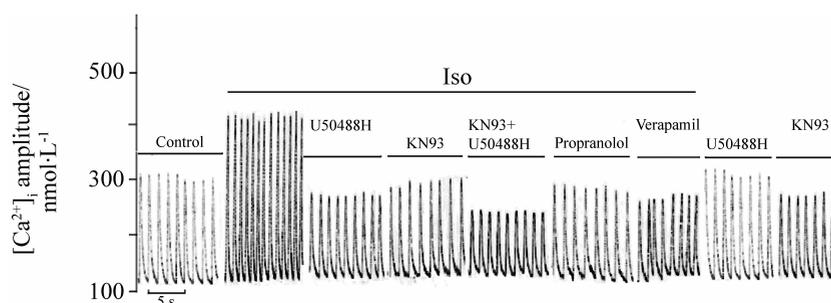
See Tab 1 for the treatment.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ . \*  $P < 0.05$ , compared with control; <sup>#</sup> $P < 0.05$ , <sup>##</sup> $P < 0.01$ , compared with Iso group;  $\Delta P < 0.05$ , compared with Iso + KN93 group.

**2.4 不同处理因素对心肌细胞[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>瞬间变化的影响**

U50488H  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 及KN93  $0.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 未明显改变正常心肌细胞[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>瞬间变化(图1,表4)。Iso  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 能使心肌内钙离子瞬间变化幅度增高,但不影响基线水平,使心肌细胞自发搏动频率加快;U50488H能降低由Iso诱导的心肌内钙离子瞬间变化幅度增高,且减慢由Iso诱导心肌细胞自发搏动频率加快作用,其作用与普萘洛尔  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、KN93  $0.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和维拉帕米  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的作用效果相似,四者对心肌细胞内静息钙负荷均无影响。在KN93预处理的情况下,U50488H能继续降低由Iso诱导的心肌[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>瞬间变化水平。

**2.5 不同处理因素对Iso作用的心肌细胞CaMK II  $\delta\text{B}$ 表达的影响**

与对照组相比,Iso组CaMK II  $\delta\text{B}$ 表达明显增



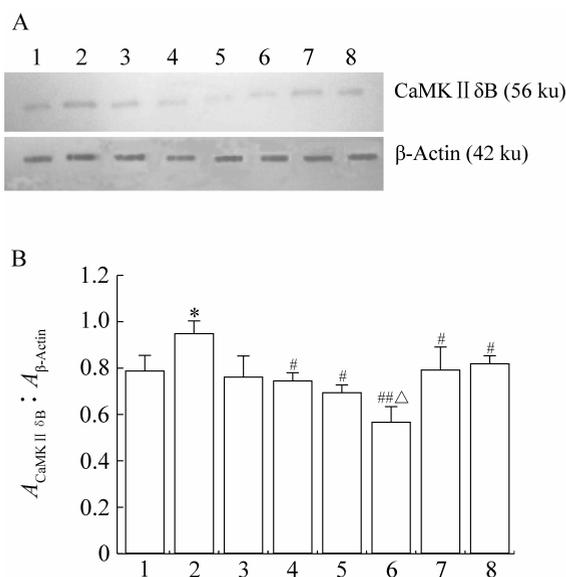
**Fig 1. Effects of different agents on spontaneous [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> transient in cultured ventricular myocytes from neonatal rats.** See Tab 1 for the treatment.

**Tab 4. Effects of different agents on [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> transient amplitude and frequency in cultured ventricular myocytes from neonatal rats**

Drug/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>		Frequency /min <sup>-1</sup>
	Peak amplitude/nmol·L <sup>-1</sup>	Resting/nmol·L <sup>-1</sup>	
Control	192.6 $\pm$ 10.0	114.6 $\pm$ 11.7	58.5 $\pm$ 1.3
Iso 10	291.8 $\pm$ 9.5 *	121.2 $\pm$ 6.4	89.5 $\pm$ 2.6 *
U50488H 1	191.8 $\pm$ 10.6	110.2 $\pm$ 3.9	57.3 $\pm$ 3.7
KN93 0.2	186.7 $\pm$ 11.8	113.9 $\pm$ 5.4	58.0 $\pm$ 2.3
Iso 10 + U50488H 1	185.7 $\pm$ 9.9 <sup>#</sup>	116.8 $\pm$ 10.5	56.6 $\pm$ 1.5 <sup>#</sup>
Iso 10 + KN93 0.2	191.5 $\pm$ 12.3 <sup>#</sup>	106.7 $\pm$ 3.7	57.0 $\pm$ 2.4 <sup>#</sup>
Iso 10 + KN93 + U50488H 1	165.6 $\pm$ 9.9 <sup>##</sup> $\Delta$	116.5 $\pm$ 11.4	55.8 $\pm$ 2.2 <sup>##</sup> $\Delta$
Iso 10 + propranolol 2	193.6 $\pm$ 10.0 <sup>#</sup>	112.0 $\pm$ 12.5	56.0 $\pm$ 3.2 <sup>#</sup>
Iso 10 + verapamil 1	188.2 $\pm$ 12.7 <sup>#</sup>	115.2 $\pm$ 5.8	58.8 $\pm$ 3.3 <sup>#</sup>

See Tab 1 for the treatment.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 4$ . \*  $P < 0.05$ , compared with control group; <sup>#</sup> $P < 0.05$ , <sup>##</sup> $P < 0.01$ , compared with Iso group;  $\Delta P < 0.05$ , compared with Iso + KN93 group.

加,增加了 20.4%;与对照组相比,KN93 组表达未见改变,表明 KN93 并不影响正常心肌细胞 CaMK II  $\delta$ B 表达;与 Iso 组相比,Iso + U50488H 组、Iso + KN93 组、Iso + 普萘洛尔组、Iso + 维拉帕米组 CaMK II  $\delta$ B 表达降低,分别降低了 21.5%、26.8%、16.5% 及 13.7%。U50488H 的抑制作用与 KN93、普萘洛尔和维拉帕米的作用相似;与 Iso + KN93 组相比,Iso + KN93 + U50488H 组 CaMK II  $\delta$ B 表达降低了 18.2%,表明 U50488H 可能直接降低 CaMK II  $\delta$ B 表达,和(或)通过  $\beta$  受体降低心肌内  $Ca^{2+}$  水平而减少 CaMK II  $\delta$ B 表达,从而起到抑制心肌肥厚的作用(图 2)。



**Fig 2. Effects of different agents on CaMK II  $\delta$ B expression in cultured myocardial cells of neonatal rats.** CaMK II: calmodulin dependent kinase II. 1: control; 2: Iso  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 3: KN93  $0.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 4: Iso  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  + U50488H  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 5: Iso  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  + KN93  $0.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 6: Iso  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  + KN93  $0.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  + U50488H  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 7: Iso  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  + propranolol  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 8: Iso  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  + verapamil  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ .  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 4$ . \*  $P < 0.05$ , compared with control; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , compared with Iso group;  $\Delta P < 0.05$ , compared with Iso + KN93 group.

### 3 讨论

心肌肥大是指心肌细胞增大而无细胞分裂,是对血液动力超负荷和(或)神经体液刺激的适应性反应。疾病的初始阶段,心肌肥厚可以通过平衡应

激的增加改善心脏的功能,然而,长时间应激所致的持续性心肌肥厚最终会因心脏功能失常导致心力衰竭。目前,心肌肥厚已被公认为是猝死、心力衰竭等心血管事件强有力的独立危险因素<sup>[12]</sup>。因此,探讨其发生发展机制一直是心血管领域的重要课题<sup>[13]</sup>。

许多研究已经表明,  $[Ca^{2+}]_i$  变化是心肌肥大的一个信号。在心肌细胞被牵拉和心脏负荷增加导致的心肌肥大中,  $[Ca^{2+}]_i$  增加;各种体液因子包括血管紧张素 II、苯肾上腺素(phenylephrine)、内皮素 1 诱导的心肌细胞肥大反应中,  $[Ca^{2+}]_i$  也增加。大量实验表明,  $[Ca^{2+}]_i$  的改变能通过多种钙调节酶来传导不同信号,其中  $Ca^{2+}$ /CaMK 家族中钙调素依赖蛋白激酶发挥重要作用<sup>[7-8]</sup>。体外及体内实验均表明,  $Ca^{2+}$ /CaMK 家族中 CaMK II  $\delta$ B 是心肌肥厚发生发展通路中的重要一环,具有核定位信号,所以胞核  $\delta$ B 在转录反应和基因表达方面发挥重要作用<sup>[14-15]</sup>。

本研究发现,U50488H  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  能够抑制 Iso 诱导的心肌肥大,并发现特异性 CaMK II 抑制剂 KN93、 $\beta$  受体阻断剂普萘洛尔及 L-型钙通道阻滞剂维拉帕米也能抑制 Iso 诱导的心肌肥大,且四者的作用相似,提示  $Ca^{2+}$  及 CaMK II 参与了  $\kappa$ -OR 激动抑制心肌肥厚的过程。本研究观察到 U50488H 及 KN93 不仅对 Iso 诱导的心肌肥厚具有抑制作用,还发现二者对细胞内钙离子瞬间变化有明显的影响,提示二者对心肌肥厚的作用可能通过调节细胞内钙稳态来达到。为了证明这一观点,本研究应用了维拉帕米,发现其对 Iso 诱导的心肌肥厚同样具有抑制作用,证实了钙稳态在  $\kappa$ -OR 激动抑制心肌肥厚的过程中发挥了重要作用。Western 蛋白印迹法结果表明, $\kappa$ -OR 激动抑制 CaMK II  $\delta$ B 表达增加从而抑制心肌肥厚,其对 CaMK II  $\delta$ B 表达的影响的机制还不是很清楚。普萘洛尔能够抑制 Iso 诱导的心肌肥大,且 U50488H 与其作用具有相似性,提示可能是通过  $\kappa$ -OR 激动抑制兴奋性鸟苷酸结合蛋白受体,进而抑制细胞内钙离子水平,从而降低 CaMK II  $\delta$ B 表达,或存在其他信号机制,尚待进一步研究。

本研究发现,在应用 KN93 的基础上,U50488H 对心肌肥厚的抑制作用更为显著,提示  $\kappa$ -OR 激动抑制心肌肥厚可能还存在其他的信号传导通路,具体机制还需进一步研究。

## 4 参考文献:

- [1] Barron BA. Opioid peptides and the heart[J]. *Cardiovasc Res*, 1999, **43**(1):13-16.
- [2] Pei JM, Chen M, Bi H, Wang YM, Zhu YL. The inhibitory effects of  $\kappa$ -opioid receptor on cardiac hypertrophy[J]. *Chin Heart J*(心脏杂志), 2002, **14**(6):465-468.
- [3] Yu XC, Li HY, Wang HX, Wong TM. U50,488H inhibits effects of norepinephrine in rat cardiomyocytes-cross-talk between kappa-opioid and beta-adrenergic receptors[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1998, **30**(2):405-413.
- [4] Wang G, Wang H, Yang Y, Wong TM. Kappa-opioid receptor stimulation inhibits growth of neonatal rat ventricular myocytes [J]. *Eur J Pharmacol*, 2004, **498**(1-3):53-58.
- [5] Yang YL, Wang HX, Yang L, Yang YH. Inhibitory effects of  $\kappa$ -opioid receptor stimulation on NE-induced cardiac hypertrophy of the cultured myocardial cells [J]. *Chin Pharmacol Bull*(中国药理学通报), 2002, **18**(1):91-94.
- [6] Shan D, Wang H, Su Y, Jing Y, Wong TM. Kappa-opioid receptor stimulation inhibits cardiac hypertrophy induced by  $\beta_1$ -adrenoceptor stimulation in the rat [J]. *Eur J Pharmacol*, 2007, **555**(2-3):100-105.
- [7] Zhou Q, Liu J, Xiao YB. The effect of  $Ca^{2+}$  and CaMK II in the cardiac hypertrophy and heart failure [J]. *J Cardiovasc Pulm Dis*(心肺血管病杂志), 2006, **2**(25):57-59.
- [8] Passier R, Zeng H, Frey N, Naya FJ, Nicol RL, McKinsey TA, et al. CaM kinase signaling in duces cardiac hypertrophy and activates the MEF2 transcription factor *in vivo* [J]. *J Clin Invest*, 2000, **105**(10):1395-1406.
- [9] Zhu W, Zou Y, Shiojima I, Kudoh S, Aikawa R, Hayashi D, et al.  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent kinase II and calcineurin play critical roles in endothelin-1-induced cardiomyocyte hypertrophy [J]. *J Biol Chem*, 2000, **275**(20):15239-15245.
- [10] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with Folin phenol reagent [J]. *J Biol Chem*, 1951, **193**(1):265-275.
- [11] Wang HX, Kwan CY, Wong TM. Electrically induced intracellular  $Ca^{2+}$  transient in single ventricular myocytes: a useful parameter for the study of cardiac drugs [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 1999, **26**(10):835-836.
- [12] Messerli FH, Aristizabal D, Soria F. Reduction of left ventricular hypertrophy: how beneficial [J]? *Am Heart J*, 1993, **125**(5 Pt 2):1520-1524.
- [13] Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study [J]. *N Engl J Med*, 1990, **322**(22):1561-1566.
- [14] Bayer KU, De Koninck P, Schulman H. Alternative splicing modulates the frequency-dependent response of CaMK II to  $Ca^{2+}$  oscillations [J]. *EMBO J*, 2002, **21**(14):3590-3597.
- [15] Hagemann D, Bohlender J, Hoch B, Krause EG, Karczewski P. Expression of  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II delta-subunit isoforms in rats with hypertensive cardiac hypertrophy [J]. *Mol Cell Biochem*, 2001, **220**(1-2):69-76.

## Inhibitory effect of kappa-opioid receptor stimulation on isoprenaline-induced myocardial hypertrophy of neonatal rats

WU Guo-Qiang, WANG Hong-Xin\*, JING Li

(Key Laboratory of Molecular Biology and Drug Research, Liaoning Medical College, Jinzhou 121000, China)

**Abstract:** **AIM** To observe the inhibitive effects and signal transduction by kappa-opioid receptor ( $\kappa$ -OR) stimulation on hypertrophic myocardial cells induced by isoprenaline (Iso)

in neonatal rats. **METHODS** The total protein content was assayed by the method of Lowry. The cardiomyocytes volume was measured by computer photograph analysis system and the

protein synthesis was assayed with [ $^3\text{H}$ ] leucine incorporation method. [ $\text{Ca}^{2+}$ ] $_i$  transient was measured by Till image system by cell-loading Fura-2/AM. The expression of  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin dependent kinase II (CaMK II)  $\delta\text{B}$  was determined by Western blot. **RESULTS** Iso enhanced the total protein content, the cardiomyocyte volume and the protein synthesis in myocardial cells. U50488H showed the function on reducing the previous mentioned indices induced by Iso, which were similar to KN93, propranolol and verapamil. U50488H also attenuated the hypertrophy and the expression of CaMK II  $\delta\text{B}$  induced by Iso through decreasing

the [ $\text{Ca}^{2+}$ ] $_i$ . **CONCLUSION** Kappa-opioid receptor stimulation can abolish the hypertrophic response induced by Iso, which is partially via attenuating the augment of [ $\text{Ca}^{2+}$ ] $_i$  and the high expression of CaMK II  $\delta\text{B}$  induced by Iso. **Key words:** receptors, opioid, kappa; myocardial hypertrophy; U50488H;  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin dependent kinases

**Foundation item:** The project supported by Natural Science Foundation of Liaoning Province (20042170)

\* Corresponding author.

(本文编辑 乔虹)

## 欢迎订阅《中国神经再生研究(英文版)》杂志

《中国神经再生研究(英文版)》(NRR)杂志是一本在神经再生研究领域具有国际水平的以国际通用语言英语为沟通平台的专业杂志。由卫生部主管、中国康复医学会主办,全球范围内公开发行人。CN 11-5422/R,ISSN 1673-5374,月刊。

编委会具有学术权威性。国际编委 281 名,来自全球 47 个国家的专业学者。力求高质量、高时效出版(120 ~ 150 天)。NRR 具有良好的国际影响力及学科专业影响力,已被下列国际及国内的著数据库收录:

- 美国《化学文摘》(CA)
- 荷兰《医学文摘库/医学文摘》(EM)
- 波兰《哥伯尼索引》(IC)
- 中国英文版科技期刊数据库(统计源期刊)
- 中国科学引文数据库核心库(CSCD)
- 中国学术期刊文摘

NRR 2008 年出版重点:神经发育、神经可塑性、神经信号转导研究;突触发育及可塑性、突触信号、突触生理学研究;神经环路发育、神经环路与动物行为研究;树突发育与神经环路形成、神经网络功能研究;视知觉机制、视觉神经生理学研究;感觉系统、感觉整合和行为研究;基底神经核发育及其退行性疾病研究;以及神经系统疾病的神经生物学研究。重点推出:神经干细胞研究、神经组织工程研究、中医药干预后神经元变化的分子生物学研究、神经再生的相关因子研究。

联系方式:

咨询电邮:NRR30001@163.COM

电话: +86 024 23381085

传真: +86 024 23394178

投稿电邮:sjzs101@163.com

sjzs102@163.com

国内订阅邮发代号:8-585

本社订阅:辽宁省沈阳 1234 邮政信箱

邮编:110004

定价:15 元/册。

更多信息详见 www.sjzsj.com

