

## 异丙肾上腺素致大鼠心肌肥厚时心肌细胞核 $\text{Ca}^{2+}$ 转运

王培勇<sup>1\*</sup>, 刘健<sup>2</sup>, 许蜀闽<sup>1</sup>, 唐朝枢<sup>3</sup>

(1. 第三军医大学病理生理学教研室, 重庆 430038; 2. 第三军医大学新桥医院心内科, 重庆 400037; 3. 北京大学第一临床医学院心血管病研究所, 北京 100035)

**摘要:**目的 观察异丙肾上腺素(Iso)致大鼠心肌肥厚模型心肌细胞核 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 摄取、钙释放通道肌醇1,4,5-三磷酸( $\text{IP}_3$ )受体( $\text{IP}_3\text{R}$ )和 ryanodine 受体( $\text{RyR}$ )的动力学变化,以探讨细胞核 $\text{Ca}^{2+}$ 的转运是否参与心肌肥厚发生。方法 Iso(sc 20、10和 $5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )剂量递减3d, $3\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 维持7d制备大鼠心肌肥厚模型,用差速离心和蔗糖密度梯度离心提纯心肌细胞核,用 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 同位素法测定细胞核钙摄取,用 $[^3\text{H}]$ 标记配体分析心肌细胞核 $\text{IP}_3\text{R}$ 和 $\text{RyR}$ 的动力学特点。结果 与对照组相比,Iso可导致大鼠心肌显著肥大,伴有显著心肌纤维化;心肌细胞核膜 $\text{IP}_3\text{R}$ 与其配体的最大结合容量( $B_{\text{max}}$ )减少23.4%( $P < 0.05$ ),解离常数( $K_{\text{d}}$ )无明显变化( $P > 0.05$ );细胞核 $\text{RyR}$ 的 $B_{\text{max}}$ 增加59.9%( $P < 0.01$ ), $K_{\text{d}}$ 无明显变化( $P > 0.05$ ); $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 摄取显著低于对照组( $P < 0.01$ ),最大摄取与对照组相比降低62%( $P < 0.01$ ),达半数最大摄取时 $[\text{Ca}^{2+}]$ 无显著变化。结论 Iso导致大鼠心肌肥厚纤维化发生过程中,心肌细胞核 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 摄取能力降低,核上 $\text{RyR}$ 数目上调,而 $\text{IP}_3\text{R}$ 数目下调,受体亲和力无变化,提示心肌细胞核钙调节系统参与心肌肥厚的发生过程。

**关键词:**心肌肥厚;细胞核;受体,肌醇1,4,5-三磷酸;受体,ryanodine;钙;异丙肾上腺素

中图分类号:R363

文献标识码:A

收稿日期:2001-09-29 接受日期:2001-12-03

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870347);国家自然科学基金资助项目(39870392)

作者简介:王培勇(1966-),男,山东省诸城市人,理学博士,副教授,主要从事心血管病理生理学教学和科研工作;刘健(1968-),女,山东日照市人,主治医师、讲师,医学博士;唐朝枢(1945-),男,重庆市人,教授、博士生导师,从事病理生理学教学和科研工作。

\*联系作者 Tel: (023) 68752339-8213,

E-mail: pywang@mail.tmmu.com.cn

文章编号:1000-3002(2002)01-0025-06

关于心肌肥厚的发生机理,多年来一直是心血管病研究领域的热点,但是至今还没有完全阐明。 $\text{Ca}^{2+}$ 信号在心肌细胞的作用尤为重要,无论是超负荷还是神经体液因素导致的心肌肥厚,均涉及胞浆 $\text{Ca}^{2+}$ 稳态失衡<sup>[1]</sup>。近年来分子生物学研究证明,心肌缺血、心肌肥厚、心力衰竭等病理情况下,心肌细胞核功能也发生严重紊乱,但心肌肥厚时胞浆 $\text{Ca}^{2+}$ 紊乱与核反应异常的关系尚未阐明。最近基于肝细胞核的大量研究证据表明,细胞核上可能存在独立的 $\text{Ca}^{2+}$ 调节系统<sup>[2]</sup>, $\text{Ca}^{2+}$ 跨核被膜转运是核 $\text{Ca}^{2+}$ 信号转导和核 $\text{Ca}^{2+}$ 调节核功能如基因转录、DNA合成等的首要环节。某些研究显示,核钙转运功能的改变具有重要的病理生理意义,如大鼠肝细胞再生时,核钙ATP酶活性增加;我们以往的研究发现,早期败血症休克大鼠肝细胞核钙转运和钙ATP酶活性均增强<sup>[3]</sup>。我们曾经报道了大鼠和家兔心肌细胞核存在钙泵( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase),能主动摄取 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ,其活性呈钙浓度( $[\text{Ca}^{2+}]$ )和ATP浓度( $[\text{ATP}]$ )依赖,并被蛋白磷酸化调节<sup>[4]</sup>。推测心肌细胞核的钙调节系统在心肌肥厚的发病过程中具有重要的意义。因此本工作在异丙肾上腺素(isoprenaline, Iso)导致的大鼠心肌肥厚纤维化动物模型上,观察心肌细胞核 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 摄取和 $\text{Ca}^{2+}$ 释放受体[肌醇1,4,5-三磷酸受体(inositol 1,4,5-triphosphate receptors,  $\text{IP}_3\text{R}$ )和 ryanodine 受体(ryanodine receptor,  $\text{RyR}$ )]的动力学改变,以探讨体液损伤因素引起心肌肥厚时心肌细胞核功能紊乱的环节,进一步阐明心肌肥厚发生的机理。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料与试剂

Wistar大鼠,♂,体重100~150g,由本校实验动

物中心提供, Iso、ryanodine (Ry)、肌醇 1, 4, 5-三磷酸 (inositol 1, 4, 5-triphosphate,  $IP_3$ )、 $ATPNa_2$ 、二硫苏糖醇 (dithiothreitol, DTT)、苯甲基磺酰氟 (phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF) 和标志酶测定试剂购自 Sigma 公司 (美国); 亮肽素 (leupeptin)、抑肽酶 (aprotinin)、胃酶抑素 (pepstatin) 购自 Molecular Probes 公司 (美国);  $^{45}CaCl_2$  ( $1.48 TBq \cdot g^{-1} Ca$ )、 $D$ -myo- $^{3}H$   $IP_3$  ( $^{3}H$   $IP_3$ ,  $1.78 PBq \cdot mol^{-1}$ ) 和  $[9, 21(n)-^3H]$  Ry ( $^{3}H$  Ry,  $3.145 TBq \cdot mol^{-1}$ ), 购自 Amersham Pharmacia Biotech (美国)。其余试剂均为国产 GR 或 AR 级。

### 1.2 异丙肾上腺素致大鼠心肌肥厚模型制备

大鼠分为 2 组, 心肌肥厚组: 按 Rona 等<sup>[5]</sup>方法略作修改, sc Iso, 以 20、10 和 5  $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$  剂量递减 3 d, 再以 3  $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$  连续 7 d。对照组: 以生理盐水代替 Iso 处理。大鼠常规饲养, 于停药 24 h 后称体重 (BW), 以 20% 乌拉坦 (5 mL  $\cdot kg^{-1}$ , ip) 麻醉, 开胸取出心脏, 用 4℃ 预冷生理盐水冲洗后, 剔除左右心房, 称左右心室重量 (VW)。心肌肥厚程度以心室重量指数 (VW/BW) 表示。取心尖部位作常规病理检查。其余心肌用于以下实验。

### 1.3 心室胶原含量测定

Iso 实验组和对照组心脏各 6 只, 置烤箱脱水, 称重, 按 Woessner<sup>[6]</sup>的方法测定羟脯氨酸含量, 乘以系数 7.46 即为胶原含量。

### 1.4 心肌细胞核的提纯<sup>[4]</sup>

所有操作在 0~4℃ 下进行。将大鼠心脏用 50 mL 冰冷 TKM 液 ( $mmol \cdot L^{-1}$ : Tris-HCl 50, KCl 25,  $MgCl_2$  5, pH 7.5) 洗去红细胞, 剪碎后加入 5 倍体积等渗匀浆液 ( $mmol \cdot L^{-1}$ : 蔗糖 250, EGTA 1.0, DTT 1.0, PMSF 1.0, 和 ( $mg \cdot L^{-1}$ ): 亮肽素 1, 抑肽酶 1, 胃酶抑素 A 1 的 TKM 液) 中, 用内切式匀浆器低速匀浆 2.5 min (30 s  $\times$  5 次), 200 目尼龙网过滤, 离心 ( $1400 \times g$ , 10 min) 2 次, 弃上清, 将沉淀加入 1 倍体积的含  $1.0 mol \cdot L^{-1}$  蔗糖-TKM 液中, 充分混匀加入 3 倍体积的  $2.5 mol \cdot L^{-1}$  蔗糖-TKM, 混匀后超速离心 ( $120000 \times g$ , 60 min), 沉淀即为纯化的心肌细胞核。采用 Lowry 法行蛋白质定量, 二苯胺法行 DNA 定量, 用原子吸收分光光度法测定钙含量。按文献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)<sup>[2]</sup>。用分离纯化的心肌细胞核进行下述实验。

### 1.5 心肌细胞核 $^{3}H$ $IP_3$ 放射配体-受体结合分析<sup>[7]</sup>

分离纯化的细胞核用含 ( $mmol \cdot L^{-1}$ ) Tris-HCl 50, EDTA 2.0, pH 8.3 的低渗液悬浮, 进行  $^{3}H$   $IP_3$  结合反应, 分别加浓度递增的  $^{3}H$   $IP_3$  ( $0.8 \sim 15 nmol \cdot L^{-1}$ ), 反应体积 100  $\mu L$ , 加入核蛋白每管 0.1 mg, 0℃ 下反应 10 min。结合与游离的  $^{3}H$   $IP_3$  用离心法 ( $5000 \times g$ , 5 min) 分离, 沉淀洗涤后用滤纸充分吸净离心管的残留液体, 加 50  $\mu L$   $1 mol \cdot L^{-1}$  的 NaOH 溶解, 转至 10 mL 水溶性闪烁液中, 用  $\beta$ -液体闪烁计数仪测定  $^{3}H$   $IP_3$  放射活性。非特异结合通过加  $10 \mu mol \cdot L^{-1}$  的  $IP_3$  测定。重复 4 次实验, 每次各组细胞核取自 5 只大鼠。用 Prism 3.0 软件 (Graphpad Software, 美国) 作饱和和曲线拟合分析, 计算出解离常数 ( $K_d$ ) 和最大结合量 ( $B_{max}$ )。采用单点结合饱和分析,  $Y = B_{max} \times X / (K_d + X)$ 。

### 1.6 心肌细胞核 $^{3}H$ ryanodine 放射配体-受体结合分析<sup>[8,9]</sup>

取制备的纯化细胞核 100  $\mu g$ , 加入缓冲液 [ $(mmol \cdot L^{-1})$ : HEPES 50, pH 7.4, KCl 1000, ATP 1.0, EGTA 1.0,  $CaCl_2$  0.953, PMSF 0.1, 苯甲脒 0.2 和 ( $mg \cdot L^{-1}$ ): 亮肽素 1, 抑肽酶 1, 胃酶抑素 A 1, BSA 100], 终反应体积为 100  $\mu L$ ,  $^{3}H$  Ry 浓度为  $0.5 \sim 48 nmol \cdot L^{-1}$ , 非特异结合加非标记 Ry 30  $\mu mol \cdot L^{-1}$ 。根据 Chris Patton 的软件 WinMAXC (<http://www.stanford.edu/cpatton/maxc.html>) 多元缓冲对方法计算缓冲液中自由  $[Ca^{2+}]$  约为  $1.0 \mu mol \cdot L^{-1}$ , 确定恒温摇床 (每分 60 次) 37℃ 温育 120 min, 在 Millipore 滤器上经双层玻璃纤维膜抽滤, 以 5 mL 冰冷的缓冲液冲洗 4 次, 滤膜干燥后加入闪烁液, 在  $\beta$ -液体闪烁计数仪上测  $^{3}H$  Ry 放射活性。每份样品均作双管, 非特异性结合为总结合的 5%~10%。重复 5 次实验, 每次各组细胞核取自 5 只大鼠。由 5 次实验的均值作饱和曲线拟合分析得到  $K_d$  和  $B_{max}$  值 (分析方法同上)。

### 1.7 心肌细胞核 $^{45}Ca^{2+}$ 转运测定<sup>[10]</sup>

参照文献的方法, 并作改进。反应液为 ( $mmol \cdot L^{-1}$ ): KCl 125.0, HEPES 20.0,  $MgCl_2$  5.0, pH 7.0, ATP 2.0, EGTA 0.1,  $^{45}Ca^{2+}$  18.5 kBq, 终体积 0.5 mL。反应液中的游离  $[Ca^{2+}]$  为  $0.1 \sim 3.2 \mu mol \cdot L^{-1}$ , 通过 EGTA 与  $CaCl_2$  的缓冲体系控制, 根据 Bartifi<sup>[11]</sup> 的多元缓冲对计算方法确定所加入的总钙量, 然后

用 Fura-2( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 荧光测定法核对。37°C 预温 5 min 后通过加入 0.2 mg 蛋白质的核, 始动反应, 温育一定时间后加入 1 mL  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$  终止反应, 在 Millipore 抽滤器上以  $0.45 \mu\text{m}$  微孔滤膜抽滤, 用  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$  冲洗 3 次。滤膜干燥后加入闪烁液, 在  $\beta$ -液闪计数仪上测定  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  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。核  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  转运 = 总摄入 - 非特异摄入。重复 6 次实验, 每次各组细胞核取自 5 只大鼠。

### 1.8 统计学方法

实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组比较采用 Welch  $t$  检验, 多组间比较采用方差分析, 组间  $q$  检验。

## 2 结果

### 2.1 异丙肾上腺素致大鼠心肌肥厚的特征和分离心肌细胞核特征

实验组大鼠 sc Iso 10 d 内, 死亡率为 5/44。存活大鼠心脏发生明显肥大, VW/BW 较对照组增加 41% [(4.84 ± 0.42) vs (3.43 ± 0.24)  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$  湿重,  $P < 0.01$ ]。取心尖部位经石蜡切片, HE 染色, 显微镜下观察到, 心室壁明显增厚, 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, 具有明显的心肌肥厚纤维化表现。Iso 组心室肌胶原含量较对照组增加 81% [(40.7 ± 4.1) vs (22.5 ± 2.7)  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$  干重,  $P < 0.01$ ], 钙含量较对照组增加 41% [(17.73 ± 3.3) vs (12.6 ± 2.5)  $\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1}$  蛋白质,  $P < 0.05$ ]。本实验采用密度梯度离心所制备的心肌细胞核在显微镜下观察呈长卵圆形, 无细胞碎片污染; 核蛋白质含量为匀浆的 1/40, 蛋白质与 DNA 含量比值仅为 10~12, 核

回收率约为 17%~20%, Iso 组的核产出率较对照组低 33% [(0.97 ± 0.08) vs (1.44 ± 0.13)  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$  湿重,  $P < 0.01$ ], 各亚细胞器组分标志酶的活性均低于 5%。

### 2.2 心肌肥厚大鼠心肌细胞核 $\text{IP}_3$ 受体动力学的改变

图 1A, 1B 分别为  $[^3\text{H}]\text{IP}_3$  与分离纯化的大鼠心肌细胞核结合的饱和曲线和 Scatchard 作图。结果显示 Iso 致大鼠心肌肥厚组  $\text{IP}_3$  与核膜结合的  $B_{\text{max}}$  较对照组减少 23.4% [(301 ± 14) vs (393 ± 24)  $\text{pmol} \cdot \text{g}^{-1}$  蛋白,  $P < 0.05$ ],  $K_d$  在两组之间无明显差异 [(6.5 ± 0.7) vs (6.2 ± 0.8)  $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $P > 0.05$ ]。

### 2.3 心肌肥厚大鼠心肌细胞核 ryanodine 受体特征的变化

放射配体-受体结合分析结果显示, Iso 致心肌肥厚大鼠  $[^3\text{H}]\text{Ry}$  与心肌细胞核的  $B_{\text{max}}$  较对照组增加 59.9% [(106.0 ± 3.5) vs (66.3 ± 4.0)  $\text{pmol} \cdot \text{g}^{-1}$  蛋白,  $P < 0.01$ ],  $K_d$  无明显变化 [(1.88 ± 0.22) vs (1.92 ± 0.41)  $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $P > 0.05$ ], 如图 2 所示。

### 2.4 肥厚心肌细胞核 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 摄取的变化

在 ATP 存在下, 心肌细胞核对  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  摄取具有  $[\text{Ca}^{2+}]$  依赖性, 随  $[\text{Ca}^{2+}]$  增加而升高, 在  $0.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $[\text{Ca}^{2+}]$  范围内呈线性增加, 以后逐渐饱和。Iso 肥厚心肌细胞核在  $[\text{Ca}^{2+}]$  各浓度点  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  摄取均显著低于对照组。其  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  摄取的最大量与对照组相比降低 62% [分别为 (0.72 ± 0.12) vs (1.89 ± 0.56)  $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$  蛋白,  $P < 0.01$ ], 两组间  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  摄取达半数最大量时  $[\text{Ca}^{2+}]$  无显著差别 [分别为 (0.35 ± 0.05) vs (0.33 ± 0.05)  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $P > 0.05$ ], 结果如图 3 所示。

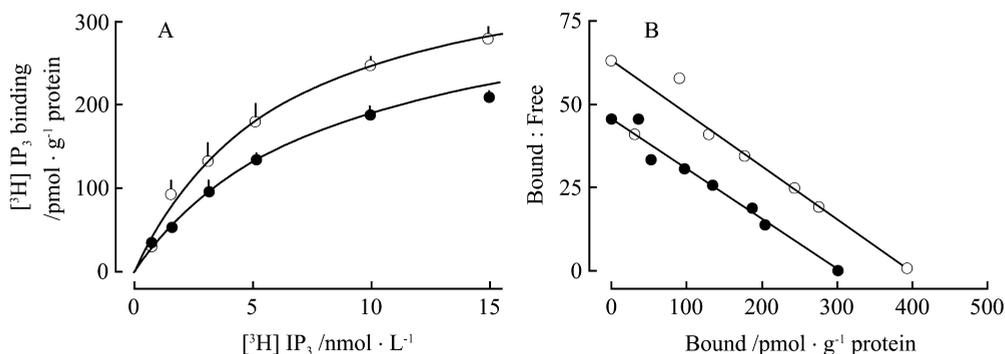


Fig 1. Saturation curve (A) and Scatchard plot (B) for *D*-myo- $[^3\text{H}]$ inositol 1,4,5-triphosphate ( $[^3\text{H}]\text{IP}_3$ ) binding to cardiac myocyte nuclei taken from isoprenaline treated rats (●) and control rats (○).  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 4$ .

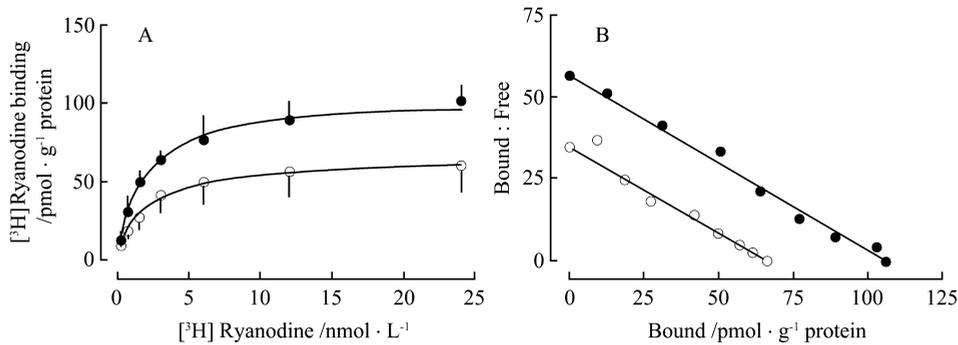


Fig 2. Saturation curve (A) and Scatchard plot (B) for  $[^3\text{H}]$  ryanodine binding to myocyte nuclei isolated from normal (○) and isoprenaline treated (●) rat heart.  $\bar{x} \pm s, n = 5$ .

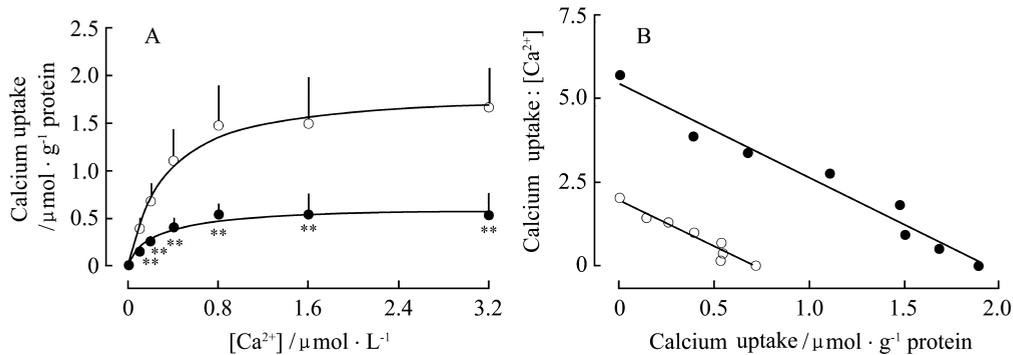


Fig 3. Changes in myocardial nuclear  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake in isoprenaline-induced rat myocardial hypertrophy (●). A:  $[\text{Ca}^{2+}]$ -response curve; B: Eadie-Hofstee plot.  $\bar{x} \pm s, n = 6$ . \*\*  $P < 0.01$ , compared with control (○).

### 3 讨论

心肌肥厚纤维化是多种心血管病共同的病理过程,其发生机理尚未完全阐明。近年来的研究证明,胞内  $\text{Ca}^{2+}$  信号途径与心肌肥厚的发生密切相关。然而,胞浆  $\text{Ca}^{2+}$  如何通过影响核  $\text{Ca}^{2+}$  进一步参与心肌肥厚信号的转导尚不清楚。已有研究表明  $\text{Ca}^{2+}$  并非被动地自由的进出细胞核,而是通过细胞核上的相对独立的  $\text{Ca}^{2+}$  转运系统所主动调节<sup>[2]</sup>。这一系统可能由  $\text{Ca}^{2+}$  摄取贮存和释放等成分组成,其中  $\text{IP}_3\text{R}$  和  $\text{RyR}$  是一类配基操纵的  $\text{Ca}^{2+}$  释放通道,最早发现它们存在于内质网、肌浆网和线粒体上,而最新的研究表明心肌细胞核膜上也存在这一系统<sup>[12]</sup>,参与调节细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  信号的幅度和频率,而  $\text{Ca}^{2+}$  信号频率和幅度的差异是  $\text{Ca}^{2+}$  特异调控细胞内不同生理过程的内在机理<sup>[13]</sup>。缺血或超负荷的心脏,发生

心肌肥大、纤维化和心肌细胞排列异常等结构重塑变化。对于心肌重塑时钙通道、 $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$  交换以及肌浆网钙摄入、释放的稳态调节失衡改变,目前已有较清楚阐明。然而, Iso 如何通过影响细胞核  $\text{Ca}^{2+}$  信号转导进一步参与心肌肥厚的发生尚不清楚。因而,细胞核  $\text{Ca}^{2+}$  释放和摄取在心肌肥厚发生中起重要作用值得探讨。

大量研究表明,胞浆  $\text{Ca}^{2+}$  信号异常是心肌重塑的重要环节。多种体液因子包括血管紧张素 II、去甲肾上腺素、苯肾上腺素和内皮素-1 等除能引起心肌细胞肥大反应外,都能增加胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度,另外导致心肌肥厚的牵张和机械负荷刺激也可引起心肌细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  的增加<sup>[1]</sup>。心肌重塑时肌浆网钙释放和摄取的研究,报道较多。如 Aria 等<sup>[14]</sup>在压力负荷大鼠心肌肥大模型上的研究发现,  $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$  和  $\text{RyR}$  的 mRNA 水平在轻度肥大的心肌表达增加,而

在严重的肥大心肌表达降低,呈典型的双向变化,而肌浆网的  $\text{Ca}^{2+}$  摄取也出现类似的改变。Rannou 等<sup>[15]</sup>观察到代偿腹主动脉缩窄大鼠心肌肥大,心肌在严重肥大时 RyR mRNA 降低 50%,而肌浆网该受体蛋白水平和高亲和力位点均降低 25%,降低的程度与心肌肥大程度呈正相关。Milnes 等<sup>[16]</sup>在腹主动脉缩窄 6 周家兔左室肥大模型上也观察到类似的结果,肌浆网 RyR 密度降低 34%,而二氢吡啶受体密度无显著改变。另外的研究发现心衰时肌浆网  $\text{IP}_3\text{R}$  mRNA 表达增加 2 倍,同时伴 RyR mRNA 表达下降 30%<sup>[17]</sup>。从某种意义上说,心肌重塑的功能和结构的改变是各种刺激通过信号转导引起基因表达改变的结果。细胞  $\text{Ca}^{2+}$  稳态失衡是心肌重塑发生的共同信号转导通路之一,但迄今有关心肌重塑时,心肌细胞核钙调节系统如何变化尚未见文献报道。

本工作给大鼠连续 10 d sc Iso,首先用较大剂量 Iso 造成心肌局灶性损伤,随后在小剂量 Iso 作用下逐渐发生纤维化和心肌肥厚,其心脏增大、心肌胶原和钙含量显著增加,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。Iso 组心肌组织细胞核得率降低,即单位重量心肌组织的细胞核含量减少,提示由于心肌肥厚,单位重量的心肌细胞数目降低。这些结果说明心肌肥大纤维化模型制备成功。

心肌重塑从本质上可能是胞浆  $\text{Ca}^{2+}$  信号异常导致核  $\text{Ca}^{2+}$  调节紊乱而引起核反应异常的过程,而  $\text{Ca}^{2+}$  跨核膜转运是心肌核  $\text{Ca}^{2+}$  信号转导的关键环节。本研究观察到肥大心肌细胞核与 [ $^3\text{H}$ ]  $\text{IP}_3$  的最大结合容量显著减少,与 [ $^3\text{H}$ ] Ry 的最大结合容量显著增加,解离常数均无明显变化,表明细胞核上的  $\text{IP}_3\text{R}$  下调,而 RyR 上调,受体亲和力不变。由于 RyR 上调的程度比  $\text{IP}_3\text{R}$  大,提示肥大心肌细胞核的  $\text{Ca}^{2+}$  释放能力可能增加。此外,本研究发现肥大心肌细胞核钙摄取最大容量显著降低,而到达半数最大摄取的  $\text{Ca}^{2+}$  浓度无显著变化,说明核的钙摄取活性受到抑制,这一现象可能是由于细胞内钙超载造成核钙增加从而引起反馈调节,也可能与 RyR 上调  $\text{Ca}^{2+}$  释放增加有关。心肌重塑时细胞核上  $\text{Ca}^{2+}$  释放摄取系统的变化与其他作者对肌浆网  $\text{Ca}^{2+}$  释放摄取系统的变化不相同。这种变化的不一致性可能反映了细胞核钙调节系统与肌浆网钙调节系统的功能差异。目前已知,肌浆网  $\text{Ca}^{2+}$  摄取和释放的改变是心肌肥大时心肌舒缩功能异常的重要环节。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,由此推测,心肌细胞核  $\text{Ca}^{2+}$  调节系统可能参与了心肌肥大发生时的核功能改变。当然要完全证明这一观点,心肌肥大时核钙调节改变与基因表达的关系还有待于进一步探讨。本实验的结果首次证明细胞核钙转运系统的改变参与 Iso 导致肥大心肌重塑。

#### 4 参考文献:

- [1] Zolk O, Flesch M, Nickenig G, Schnabel P, Bohm M. Alteration of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -handling and receptor regulation in hypertensive cardiac hypertrophy: insights from Ren2-transgenic rats[J]. *Cardiovasc Res*, 1998, **39**(1): 242 - 256.
- [2] Lui PP, Kong SK, Tsang D, Lee CY. The nuclear envelope of resting C6 glioma cells is able to release and uptake  $\text{Ca}^{2+}$  in the absence of chemical stimulation[J]. *Pflugers Arch*, 1998, **435**(3):357 - 361.
- [3] Wang PY, Ye C, Pang YZ, Su J, Tang CS. Changes of calcium transport in rat liver nuclei during sepsis[J]. *Acta Physiol Sin* (生理学报), 1997, **49**(2):191 - 196.
- [4] Wang PY, Pang YZ, Su JY, Tang CS. Study of the myocardial nuclear calcium transport of rabbit *in vitro*[J]. *Acta Biochem Biophys Sin* (生物化学与生物物理学报), 1997, **29**(6):567 - 572.
- [5] Rona G, Chappel CI, Blalazs J, Gaudry I. An infarct like myocardial lesion and other toxic manifestations produced by isoproterenol in the rat[J]. *Am Physiol*, 1959, **67**:443 - 455.
- [6] Woessner JF. The determination of hydroxy-proline in tissue and samples containing small proportions of this amino acid [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1961, **93**:440 - 447.
- [7] Humbert JP, Matter N, Artault JC, Koppler P, Malviya AN. Inositol 1,4,5-triphosphate receptor is located to the inner nuclear membrane indicating regulation of nuclear calcium signalling by inositol 1,4,5-triphosphate. Discrete distribution of inositol phosphate receptors to inner and outer nuclear membranes[J]. *J Biol Chem*, 1996, **271**(1): 478 - 485.
- [8] Needleman DH, Hamilton SL. Factors influencing [ $^3\text{H}$ ] ryanodine binding to the skeletal muscle  $\text{Ca}^{2+}$  release channel [J]. *Anal Biochem*, 1997, **248**(1):173 - 179.
- [9] Boittin FX, Macrez N, Halet G, Mironneau J. Norepinephrine-induced  $\text{Ca}^{2+}$  waves depend on  $\text{InsP}_3$  and ryanodine receptor activation in vascular myocytes[J]. *Am J Physiol*, 1999, **277**(1 Pt 1):C139 - C151.

- [10] Chang YZ, Dong LW, Su JY. The effect of  $[Ca^{2+}]$  in reperfusion medium on  $Ca^{2+}$  uptake and content of myocardial mitochondria[J]. *Chin Sci Bull* (科学通报), 1993, **38** (12):1125 – 1128.
- [11] Bartifi T. Preparation of metal-chelate complexes and the design of steady-state kinetic experiments involving metal nucleotide complexes[J]. *Adv Cyclic Nucleotide Res*, 1979, **10**:219 – 242.
- [12] Guihard G, Proteau S, Rousseau E. Does the nuclear envelope contain two types of ligand-gated  $Ca^{2+}$  release channels[J]? *FEBS Lett*, 1997, **414**(1):89 – 94.
- [13] Dolmetsch RE, Lewis RS, Goodnow CC, Healy JI. Differential activation of transcription factors induced by  $Ca^{2+}$  response amplitude and duration[J]. *Nature*, 1997, **368** (6627):855 – 858.
- [14] Arai M, Suzuki T, Nagai R. Sarcoplasmic reticulum genes are upregulated in mild cardiac hypertrophy but downregulated in severe cardiac hypertrophy induced by pressure overload[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1996, **28**(8):1583 – 1590.
- [15] Rannou F, Dambrin G, Marty I, Carre F, Trouve P, Lompre AM, *et al.* Expression of the cardiac ryanodine receptor in the compensated phase of hypertrophy in rat heart[J]. *Cardiovasc Res*, 1996, **32**(2):258 – 265.
- [16] Milnes JT, MacLeod KT. Reduced ryanodine receptor to dihydropyridine receptor ratio may underlie slowed contraction in a rabbit model of left ventricular cardiac hypertrophy[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2001, **33**(3):473 – 485.
- [17] Go LO, Moschella MC, Watras J, Handa KK, Fyfe BS, Marks AR. Differential regulation of two types of intracellular calcium release channels during end-stage heart failure[J]. *J Clin Invest*, 1995, **95**(2):888 – 894.

## Nuclear $Ca^{2+}$ transport of isoprenaline-induced heart hypertrophy in rats

WANG Pei-Yong<sup>1</sup>, LIU Jian<sup>2</sup>, XU Shu-Min<sup>1</sup>, TANG Chao-Shu<sup>3</sup>

(1. Department of Pathophysiology, the Third Medical University, Chongqing 400038, China; 2. Department of Cardiology, Xinqiao Hospital, the Third Medical University, Chongqing 400037, China; 3. Institute of Cardiovascular Diseases, the First Clinical Medical College, Beijing University, Beijing 100035, China)

**Abstract:** **AIM** To investigate whether rat's myocardial nuclear  $Ca^{2+}$  transport system is involved in the isoprenaline (Iso)-induced cardiac hypertrophy. **METHODS** The model of rat myocardial fibrosis and hypertrophy was established by subcutaneous injections of Iso (20, 10 and 5  $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$  for 3 d, subsequently 3  $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$  for 7 d). Velocity and sucrose isopycnic gradient centrifugation were employed to fractionate rat cardiac nuclei. Myocardial nuclear calcium uptake was assayed with  $^{45}Ca^{2+}$  isotope. The maximal binding ( $B_{max}$ ) and affinity ( $K_d$ ) of  $IP_3$  and ryanodine to their nuclear receptors were measured by [ $^3H$ ] ligand binding assay. **RESULTS** Iso increased the blood pressure and the cardiac hypertrophy.  $B_{max}$  of  $IP_3$  binding to its receptors in cardiac nuclear envelopes decreased by 23.4% ( $P < 0.05$ ), and  $B_{max}$  of ryanodine binding to its receptors increased by 59.9% ( $P < 0.01$ ). Both

$K_d$  of  $IP_3$  and ryanodine binding to their receptors were not changed ( $P > 0.05$ ) in hypertrophic myocardium as compared with control. Significant decrease in nuclear  $^{45}Ca^{2+}$  uptake was observed and the maximal uptake was lowered by 62% as compared with that of control ( $P < 0.01$ ), but the half maximal [ $Ca^{2+}$ ] uptake remained unchanged. **CONCLUSION** These results indicate that the changes of nuclear  $Ca^{2+}$  transport system in myocardial nuclei may be involved in the Iso-induced myocardial hypertrophy.

**Key words:** heart hypertrophy; cell nucleus; receptors, inositol 1, 4, 5-triphosphate; receptors, ryanodine; calcium; isoprenaline

**Foundation item:** The project supported by National Natural Science Foundation of China(39870347); and by National Natural Science Foundation of China(39870392)

(本文编辑 董立春)