文章编号:1000-5404(2005)21-2157-03

论著

慢性心房颤动对人心房肌钙/钙调素依赖性蛋白激酶Ⅱ表达的影响

陈劲进,肖颖彬,刘 健 (第三军医大学新桥医院心血管外科,重庆 400037)

提 要:目的 探讨慢性心房颤动对人心房肌细胞内游离 Ca^{2+} 浓度、心房肌组织钙调蛋白(calmodulin, CaM)及钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶Ⅱ(calmodulin dependent protein kinase Ⅱ, CaMKⅡ)表达的影响。**方法:** 用激光共聚焦显微镜技术,对急性分离的慢性风湿性心脏病伴慢性房颤或窦性心律患者的心房肌细胞内游离 Ca^{2+} 浓度进行测定,同时用Western blot法检测心房肌组织CaM及CaMKⅡ表达的变化。**结果:** 慢性风湿性心脏病伴慢性房颤患者心房肌细胞内游离 Ca^{2+} 浓度显著高于窦性心律患者[(276.38±38.12) nmol/L *vs* (122.28±45.63) nmol/L, ($P<0.05$)]。慢性风湿性心脏病伴慢性房颤患者心房肌CaM及CaMKⅡ的表达明显强于窦性心律患者。**结论** 慢性房颤患者心房肌细胞内存在钙超载,Ca^{2+}/CaMKⅡ通路可能是慢性房颤心房肌的信号转导途径之一。

关键词: 心房;心房颤动;钙超载
中图法分类号: R322.11; R394.2; R541.750.2 **文献标识码:** A

Effect of chronic atrial fibrillation on Ca^{2+}/calmodulin dependent protein kinase expression in human atrial myocytes

CHEN Jin-jin, XIAO Ying-bin, LIU Jian (Department of Cardiovascular Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of chronic atrial fibrillation on free calcium concentration and expression of Ca^{2+}/calmodulin dependent protein kinase Ⅱ (CaMKⅡ) in human atrial myocytes. **Methods** The intracellular free calcium concentration in rapidly isolated atrial myocytes and the expression of CaMKⅡ in atrial tissue of rheumatic heart disease patients with atrial fibrillation (AF) or with normal sinus rhythm were measured by laser scanning confocal microscopy and Western blotting respectively. **Results** The intracellular Ca^{2+} concentration of patients with atrial fibrillation was significantly higher than that of patients with normal sinus rhythm [(276.38±38.12) *vs* (122.28±45.63) nmol/L, ($P<0.05$)]. Western blotting analysis of atrial samples showed that CaM and CaMKⅡ expressions were enhanced in the patients with chronic atrial fibrillation. **Conclusion** Chronic AF could lead to intracellular calcium overload in human atrial myocytes. Ca^{2+}/calmodulin dependent protein kinase Ⅱ (CaMKⅡ) signaling cascades may play an important role in maintenance of chronic AF.

Key words: cardiac atrium; atrial fibrillation; calcium overload

房颤是一种持续进展的疾病,随着病程的进展,房颤能诱导心房发生重构,包括以心房有效不应期(atrial effective refractory period, AERP)缩短为特征的电重构及心房肌结构发生适应性及非适应性改变引起的结构重构[1],目前对心房重构的信号转导机制缺乏深入研究[2]。本研究采用激光共聚焦显微镜技术,对急性分离的慢性风湿性心脏病伴慢性房颤或窦性心律患者的心房肌细胞内游离 Ca^{2+} 浓度进行测定,同时用Western blot法检测心房肌组织钙调蛋白(calmodulin, CaM)及钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶Ⅱ(calmodulin dependent protein kinase Ⅱ, CaMKⅡ)表达的变化,探讨慢性房颤心房重构可能的钙信号转导途径,为其防治提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2003年8-12月因慢性风湿性心脏病来我院行瓣膜

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30370583, 30200108)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30370583, 30200108)
作者简介:陈劲进(1970-),男,湖北省荆门市人,博士,主治医师,主要从事房颤的信号转导方面的研究。电话:(023)68774607
通讯作者:肖颖彬,电话:(023)68755607
收稿日期:2005-01-03;修回日期:2005-04-06

置换的12例患者。分为慢性房颤组:共6例,其中男2例,女4例,年龄(39±6)岁;窦性心律组:6例,其中男1例,女5例,年龄(37±8)岁。两组患者年龄无显著差异($P>0.05$),心功能均为Ⅱ~Ⅲ级。房颤组病程为2~4年。术前均未使用钙通道阻断剂。

1.2 人单个心房肌细胞的分离[3]

1.2.1 标本采集 右心耳组织块取材时间为体外循环建立前即刻(经本院伦理委员会同意),部分组织迅速浸入4℃100%氧饱和的无钙Tyrode液中,5~10 min内送到实验室进行酶消化。部分组织迅速浸入液氮中保存。

1.2.2 单个人心房肌细胞分离 先用眼科剪将右心耳组织块在氧饱和无钙Tyrode液中剪成1 mm^3小块,用无钙Tyrode液在37℃下洗涤3次,每次5 min,以洗除组织中残存血液和钙离子;然后将其置入含有蛋白酶XXIV(4 U/ml)、Ⅱ型胶原酶(200 U/ml)的无钙Tyrode液中消化40 min后,换成只含有Ⅱ型胶原酶(200 U/ml)的无钙Tyrode液进行第二步消化;30 min后,将组织块在KB液中轻轻吹打,获得心房肌细胞;细胞悬液用200目滤网过滤。离心(1 000 r/min, 5 min),弃上清液,加入适量无钙Tyrode液,吹打,制成细胞悬液。整个实验过程温度始终保持在37℃,并且在充氧条件下完成。试剂和溶液的配制:无钙Tyrode液(mmol/L):NaCl 126, KCl 5.4, $MgCl_2$ 1.0, NaH_2PO_4 0.33, glucose 10.0, HEPES(Sigma公司)10.0,用NaOH调pH至7.4。KB液(mmol/L):KCl 20.0, NaH_2PO_4 10.0, glucose 10.0,谷氨酸70.0,牛磺酸(Sigma公司)10.0, EGTA(Sigma公司)10.0,牛血清白蛋白(Sigma公司)10 g/L,用KOH调pH至7.4。Ⅱ型胶原酶(Sigma公司),蛋白酶XXIV(Sigma公司)。

1.3 人心房肌细胞内游离钙离子浓度的测定[4]

1.3.1 Fluo-4/AM的负载 向细胞悬液加入Fluo-4/AM(终浓度为4 μmol/L)、20%的F-127(2 μl/ml)在37℃的二氧化碳孵箱内孵育30 min,然后用不含Fluo-4/AM的无钙Tyrode液洗涤细胞2次,洗去细胞外液残余染料,最后加入适量无钙Tyrode液。

1.3.2 细胞内Ca^{2+}浓度的测定 在激光共聚焦显微镜(LeicaTCS,Germany)下,以Fluo-4/AM为游离钙荧光探针,用氪氩离子激光激发(激发波长494 nm,发射波长516 nm),观察负载Fluo-4/AM的人心房肌细胞内游离钙的分布及强度。由Leica TCS图像分析系统进行细胞内荧光强度测定。细胞内游离钙离子浓度$[Ca^{2+}]free$由下公式得出:$[Ca^{2+}]free = K_d[(F-F_{min})/(F_{max}-F)]$,$K_d$是Fluo-4与$Ca^{2+}$反应解离常数,$K_d$ = 345nmol/L,荧光强度F(fluorescence intensity)为所测得的荧光强度值,F_{max}为加入Ca^{2+} ionophore 4-bromo-A_{23187}(10^{-5} mol/L)和$CaCl_2$ 2.0 mmol/L后测得的最大荧光强度值,F_{min}为加入EGTA(5.0 mmol/L)后测得的最小荧光强度值。每例患者测定3个心房肌细胞,取其平均值作为该患者的心房肌细胞内游离Ca^{2+}浓度。

1.4 免疫印迹分析检测心房肌组织CaMKⅡ的水平

按蛋白质从SDS聚丙烯酰胺凝胶转移至固相支持体的免疫学测定方法进行[5]。提取所保存心房肌组织蛋白,Lowry法蛋白定量,采用10% SDS聚丙烯酰胺电泳(SDS-PAGE)进行分离,硝酸纤维素膜电转印,分别用抗CaM、抗CaMKⅡ(Santa Cruz Biotechnology)1∶1 000、辣根过氧化物酶标记二抗1∶1 000进行Western blot分析,采用二氨基联苯胺(DAB)进行显色,计算机扫描。用图像分析系统(美国Alphalmager™公司)对蛋白条带进行半定量分析。

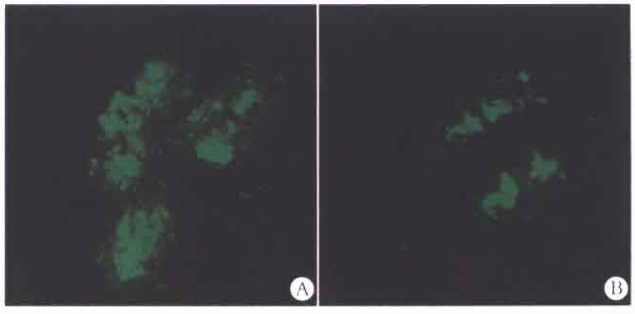
1.5 统计学分析

实验数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用t检验。

2 结果

2.1 人心房肌细胞内游离钙离子浓度

对负载Fluo-4/AM后的心房肌细胞内游离Ca^{2+}荧光强度测定显示,慢性房颤组患者心房肌细胞游离Ca^{2+}荧光强度为(24.54±9.48),明显强于窦性心律组患者心房肌细胞游离Ca^{2+}荧光强度(14.01±5.67),($P<0.05$)(图1)。慢性房颤组患者心房肌细胞游离Ca^{2+}浓度为(276.38±38.12) nmol/L,显著高于窦性心律组患者的心房肌细胞内游离Ca^{2+}浓度[(122.28±45.63) nmol/L]($P<0.05$)。



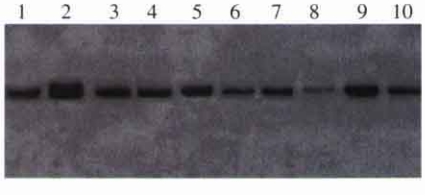
A: Chronic atrial fibrillation; B: Normal sinus rhythm

图1 Fluo-4/AM负载的心房肌细胞钙荧光图像 (Laser scanning confocal microscopy ×400)

Fig 1 Fluo-4/AM loaded atrial myocytes (Laser scanning confocal microscopy ×400)

2.2 免疫印迹分析(Western blot方法)

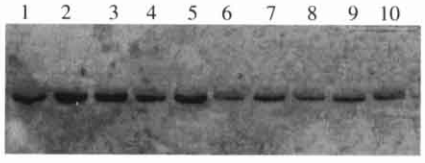
慢性房颤组及窦性心律组心房肌组织均有CaM、CaMKⅡ表达,慢性房颤心房肌组织CaM、CaMKⅡ表达较窦性心律升高($P<0.05$)(图2,3)。



1-5: Chronic AF group; 6-10: Normal sinus rhythm group

图2 蛋白质免疫印迹分析方法检测人心房肌CaM

Fig 2 CaM levels by Western blotting



1－5：Chronic AF group；6－10：Normal sinus rhythm group

图 3　蛋白质免疫印迹分析方法检测人心房肌 CaMK Ⅱ

Fig 3　CaMK Ⅱ levels by Western blotting

3　讨论

本研究采用激光共聚焦显微镜技术，以 Fluo-4/AM 作为钙指标剂，对慢性风湿性心脏病伴慢性房颤或窦性心律患者的心房肌细胞内游离 Ca^{2+} 浓度进行测定，结果证实慢性风湿性心脏病伴慢性房颤患者的心房肌细胞内确实存在 Ca^{2+} 超载。

慢性房颤心房肌细胞内钙超载的原因可能有如下几种：①心房快速除极使心房肌细胞处于收缩期的时间相对延长，使 Ca^{2+} 通过 L 型钙通道内流增加[1]；②快速心房激动激活 T 型 Ca^{2+} 通道使 Ca^{2+} 内流增加[6]；③慢性房颤 Ca^{2+}-ATP 酶表达下调使得肌浆网回吸收 Ca^{2+} 减少，导致细胞内 Ca^{2+} 浓度升高[7]；④三磷酸肌醇受体表达上调，肌浆网释放钙增加[7]。以上种种因素导致细胞内钙超载的形成。

钙超载能诱导心房发生电重构及结构重构。细胞内钙超载能反馈抑制细胞内 L-型钙通道的活性，L-型钙电流（I_{CaL}）减少，$I_{CA,L}$ 对有效不应期起决定性作用，AERP 的缩短是发生及维持房颤重要的原因[1]。房颤导致心房的结构重构包括肌原纤维的丧失、糖原的积聚、线粒体形状及大小改变、肌浆网的断裂、核染色质的分散等改变，这些均是细胞内钙超载的特征性改变[8]。

目前对慢性房颤时各种钙调节蛋白［包括 L 型钙通道、肌浆网钙 ATP 酶、IP(3)受体、理阿诺碱受体、肌集钙蛋白及受磷蛋白等］表达的变化进行了较详尽的研究[8-10]，但对细胞内钙超载致房颤诱导心房发生重构的信号转导机制缺乏深入研究[2]。

CaM 是一种重要的钙结合蛋白，其本身无活性，必须与 Ca^{2+} 结合后形成 Ca^{2+}-CaM 复合物而被激活。而钙/钙调素依赖性蛋白激酶（CaMKs）家族是极其重要的钙信号传导器，包括 CaMKI，CaMKII 及 CaMKIV，心脏中最丰富的 CaMK 是 CaMKII。CaMKII 与 CaM 结合后被磷酸化而活化，可进一步激活核内的转录因子而启动转录[11]。本研究表明慢性房颤组心房肌 CaM、CaMK Ⅱ表达均显著高于窦性心律组（$P<0.05$）；而 Tessier 等[12]研究表明 CaMK Ⅱ对细胞内游离 Ca^{2+} 浓度高度敏感，能解码出不同程度的激酶活动度。这些均提示 Ca^{2+}/CaMK Ⅱ通路可能是慢性房颤细胞内钙超载的信号通路，该通路如何介导基因转录有待于进一步的研究。

参考文献：

[1] Brundel B J, Henning R H, Kampinga H H, *et al*. Molecular mechanisms of remodeling in human atrial fibrillation[J]. Cardiovasc Res, 2002, 54(2): 315－324.

[2] Goette A, Lendeckel U, Klein H U. Signal transduction systems and atrial fibrillation[J]. Cardiovasc Res, 2002, 54(2): 247－258.

[3] Feng J, Wible B, Li G R, *et al*. Antisense oligodeoxynucleotides directed against Kv1.5 mRNA specifically inhibit ultrarapid delayed rectifier K^+ current in cultured adult human atrial myocytes[J]. Circ Res, 1997, 80(4): 572－579.

[4] Burnier M, Centeno G, Burki E, *et al*. Confocal microscopy to analyze cytosolic and nuclear calcium in cultured vascular cells[J]. Am J Physiol, 1994, 266(4 Pt 1): C1118－C1127.

[5] 萨姆布鲁克 J，弗里奇 E F，曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 北京：科学出版社，2001. 888－892.

[6] Fareh S, Benardeau A, Nattel S. Differential efficacy of L- and T-type calcium channel blockers in preventing tachycardia-induced atrial remodeling in dogs[J]. Cardiovasc Res, 2001, 49(4): 762－770.

[7] Cao K, Xia X, Shan Q, *et al*. Changes of sarcoplamic reticular Ca^{2+}-ATPase and IP(3)-I receptor mRNA expression in patients with atrial fibrillation[J]. Chin Med J (Engl), 2002, 115(5): 664－667.

[8] Ohkusa T, Ueyama T, Yamada J, *et al*. Alterations in cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} regulatory proteins in the atrial tissue of patients with chronic atrial fibrillation[J]. J Am Coll Cardiol, 1999, 34(1): 255－263.

[9] Brundel B J, Van Gelder I C, Henning R H, *et al*. Gene expression of proteins influencing the calcium homeostasis in patients with persistent and paroxysmal atrial fibrillation[J]. Cardiovasc Res, 1999, 42(2): 443－454.

[10] Schotten U, Haase H, Frechen D, *et al*. The L-type Ca^{2+}-channel subunits alpha1C and beta2 are not downregulated in atrial myocardium of patients with chronic atrial fibrillation[J]. J Mol Cell Cardiol, 2003, 35(5): 437－443.

[11] Kimura Y, Corcoran E E, Eto K, *et al*. A CaMK cascade activates CRE-mediated transcription in neurons of Caenorhabditis elegans[J]. EMBO Rep, 2002, 3(10): 962－966.

[12] Tessier S, Karczewski P, Krause E G, *et al*. Regulation of the transient outward K^+ current by Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinases II in human atrial myocytes[J]. Circ Res, 1999, 85(9): 810－819.

（编辑　薛国文）