文章编号:1000-5404(2010)12-1275-03

论著

钙/钙调素依赖性蛋白激酶Ⅱ抑制剂对新生大鼠心房肌细胞钙超载的干预作用

丁 翔,仝识非,秦 瑶,宋治远 (400038 重庆,第三军医大学西南医院心血管内科)

[摘要] **目的** 观察钙/钙调素依赖性蛋白激酶Ⅱ(calcium/calmodulin-dependent protein kinaseⅡ, CaMKⅡ)抑制剂KN93对新生大鼠心房肌细胞钙负荷的影响,并对细胞CaMKⅡ的表达变化进行检测。**方法** 新生大鼠心房肌细胞原代培养96 h,应用钙离子导入剂ionomycin(1.0 μmol/L)建立心房肌细胞钙超载模型,并在KN93 3种浓度(0.25、0.5、1.0 μmol/L)的干预下,以钙离子指示剂Fluo-3/AM负载心房肌细胞,激光共聚焦显微镜观察心房肌细胞内游离钙的变化;应用Western blot法检测CaMKⅡ表达的变化。**结果** ①细胞培养至第4天,免疫组织化学染色90%以上细胞α-肌动蛋白抗体阳性。②与对照组比较,钙离子导入剂ionomycin明显增加细胞内钙离子荧光值[(660.16±108.47) *vs* (376.12±57.57),$P<0.01$];KN93对细胞内钙离子荧光值无明显影响($P>0.05$)。③预先加入3种不同浓度KN93可显著降低ionomycin导致的细胞内钙离子荧光强度的增加幅度($P<0.01$),与对照组比较差异也有统计学意义($P<0.01$)。④钙超载组细胞CaMKⅡ表达较对照组明显增加($P<0.01$);而KN93对细胞CaMKⅡ表达影响不明显。⑤不同浓度KN93预处理后,钙超载组细胞CaMKⅡ的表达显著降低($P<0.01$)。**结论** CaMKⅡ抑制剂KN93可降低ionomycin引发的大鼠心房肌细胞钙负荷,并下调细胞CaMKⅡ表达。

[关键词] 钙-钙调素依赖性蛋白激酶2型;肌细胞, 心脏;钙;大鼠
[中图法分类号] R-332;R541.75;R453 **[文献标志码]** A

Interventional effect of inhibitor of calcium/calmodulin-dependent protein kinase Ⅱ on calcium overloading of atrial muscle cells in neonatal rats

Ding Xiang, Tong Shifei, Qin Yao, Song Zhiyuan (Department of Cardiology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of calcium/calmodulin-dependent protein kinase Ⅱ (CaMKⅡ) inhibitor, KN93 on calcium overloading of atrial muscle cells in neonatal rats and detect the expression of CaMKⅡ. **Methods** The atrial muscle cells from neonatal rats were primarily cultured for 96 h and then divided into 6 group, control, calcium overloading group, KN93 group (0.5 μmol/L), low-, moderate- and high-dose of KN93 + calcium overloading group. A model of calcium overloading for atrial muscle cells was established by using calcium ionophore (ionomycin, 1.0 μmol/L). For the later 3 groups, KN93 at doses of 0.25, 0.5 and 1.0 μmol/L was added into the culture medium for 30 min followed by 1.0 μmol/L ionomycin treatment for another 30 min. The identification of α-actin was performed by immunofluorescence staining. In the present of Fluo-3/AM (an indicator of calcium), intracellular calcium and the expression of CaMKⅡ were detected under the intervention of KN93 with laser cofocal microscopy and Western blotting respectively. **Results** More than 90% of cultured cells were positive to α-actin antibody. Compared with the control group, the fluorescence intensity of intracellular Ca^{2+} was increased significantly by ionomycin (660.16±108.47 *vs* 376.12±57.57, $P<0.01$), but KN93 alone had no effect on it (389.00±64.01, $P<0.05$). In presence of KN93 pretreatment (0.25, 0.5 and 1.0 μmol/L), the fluorescence intensity of intracellular Ca^{2+} induced by ionomycin was significantly decreased (558.00±102.56, 499.58±64.99, 494.25±78.77 *vs* 660.16±108.47, $P<0.01$). The expression of CaMKⅡ was increased in calcium overloading group compared with control ($P<0.01$) and KN93 alone had no effect on it. But KN93 pretreatment significantly reduced the expression of CaMKⅡ compared with in cells of calcium overloading group ($P<0.01$). **Conclusion** KN93, an inhibitor of CaMKⅡ, can reduce the calcium loading of atrial muscle cells induced by ionomycin, and downregulate the expression of CaMKⅡ.

[Key words] calcium-calmodulin-dependent protein kinase type 2; myocytes, cardiac; calcium; rats

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30700315). Corresponding author: Song Zhiyuan, E-mail: zysong@public.cta.cq.cn

[基金项目] 国家自然科学基金(30700315)
[通信作者] 宋治远, E-mail:zysong@public.cta.cq.cn

心房纤维颤动(简称为房颤)是最常见的心律失常,其中70岁以上人群发生率高达10%,已经成为威

胁人类健康和生活质量的重要疾病之一。房颤能诱导心房发生以心房有效不应期缩短为特征的电重构和心房肌结构发生适应性及非适应性改变引起的结构重构。“钙超载”是细胞电重构的关键,也可能是房颤发生并持续的重要基础[1-3]。钙/钙调素依赖性蛋白激酶Ⅱ(calcium/calmodulin-dependent protein kinase Ⅱ,CaMK Ⅱ)作为 Ca^{2+}/CaM 调节蛋白家族中的一个主要成员,其在细胞的病理生理过程中发挥重要的生物学作用[4]。研究[5]表明房颤时 CaMK Ⅱ蛋白含量明显增加,其中在左房增加更为明显,而且随着房颤时间的延长 CaMK Ⅱ蛋白含量也逐渐增多。因此,探讨房颤、细胞钙超载和 CaMK Ⅱ三者之间的关系可能有助于房颤的预防及治疗。本研究观察 KN93 对新生大鼠心房肌细胞钙负荷的影响,并对细胞 CaMK Ⅱ的变化进行检测,为 CaMK Ⅱ抑制剂对房颤预防及治疗的可行性研究奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

新生 SD 大鼠 2 d 龄,雌雄不拘,由第三军医大学实验动物中心提供。主要仪器与试剂:二氧化碳孵箱,倒置显微镜,激光共聚焦显微镜(Zeiss LSM 510 META,德国)。DMEM 培养基、D-hanks 液(Hyclone 公司),新生牛血清(PAA 公司),胰蛋白酶、Ⅰ型胶原酶、5-溴脱氧尿核苷(Brdu)、FLUO-3/ AM、Pluronic-F127、伊屋诺霉素(ionomycin)、KN93 均购自 Sigma 公司,小鼠抗大鼠 Sarcomerie actin 单抗、FITC 标记山羊抗小鼠 IgG、DAB 显色试剂盒(博士德公司),抗 CaMK Ⅱ多克隆抗体(Santa Cruz Biotechnology 公司)。

1.2 实验分组

取纯化培养 96 h 的大鼠心房肌细胞,实验分为①对照组:DMEM 孵育 1 h;②钙超载组:DMEM 孵育 30 min,ionomycin 1.0 μmol/L 孵育 30 min;③KN93 组:KN93 0.5 μmol/L 孵育 1 h;④实验组 1:KN93 0.25 μmol/L 预先孵育 30 min,后加入 ionomycin 1.0 μmol/L 孵育 30 min;⑤实验组 2:KN93 0.5 μmol/L 预先孵育 30 min,后加入 ionomycin 1.0 μmol/L 孵育 30 min;⑥实验组 3:KN93 1.0 μmol/L 预先孵育 30 min,后加入 ionomycin 1.0 μmol/L 孵育 30 min。

1.3 心房肌细胞的培养及免疫组化鉴定

参考 Benardeau 等[6]的原代心房肌细胞培养方法并加以改良。采用差速贴壁分离技术,纯化培养 96 h 开始实验。观察细胞形态大小、生长密度、细胞贴壁时间及单细胞出现搏动时间。免疫组化鉴定:取培养 96 h 细胞用 4% 多聚甲醛固定 20 min,封闭后加小鼠抗大鼠 α-肌动蛋白(4 ℃过夜),PBS 洗 5 min×3 次,加大鼠抗小鼠 IgG-FITC(37 ℃,1 h),DAPI 标记细胞核 5 min,激光共聚焦显微镜下观察并摄片。

1.4 激光扫描共聚焦显微镜检测细胞内 Ca^{2+}

将 Fluo-3/ AM(终浓度为 4 μmol/L)和 Pluronic-F127(终浓度为 1 μl/ml)加于培养有心房肌细胞的盖玻片上,然后置于 37 ℃ 培养箱避光孵育 45 min。负载的心房肌细胞与实验各组按要求作用 60 min 后在 488 nm 波长激光激发下观察并摄片(40×),每张样本取 15~20 个视野,待实验结束后对图像进行数据化分析。每组检测 100 个细胞,以平均荧光强度代表细胞内游离钙浓度。抑制率 =(钙超载组荧光值 - KN93 干预钙超载组荧光值)/钙超载组荧光值×100%。

1.5 Western blot 检测 CaMK Ⅱ表达的变化

称质量按 100 mg/500 μl 蛋白提取液(RIPA),冰浴中匀浆。提取膜蛋白,考马斯亮蓝法定蛋白。SDS-PAGE 电泳,采用半干转印仪(BIO-RAD 公司),以 15 V 恒压转印 40 min,将凝胶中的蛋白质转移至 PVDF 膜上。PVDF 膜以含 5% 脱脂奶粉的 TBST 50 mmol/L Tris 150 mmol/L NaCl HCl(pH=7.5, 0.1% Tween-20)室温封闭 2 h ,CaMKⅡ抗体(工作浓度为 1∶1 000)室温反应过夜,辣根过氧化物酶标记的羊 IgG (工作浓度为1∶2 000)室温反应 2 h。DAB 显色。用 Bio-Rad 公司 Quantity one 凝胶扫描分析系统扫描 X 光片,并用其附带的图像分析模块进行图像分析,测定各条带光密度值,结果以积分光密度值表示。

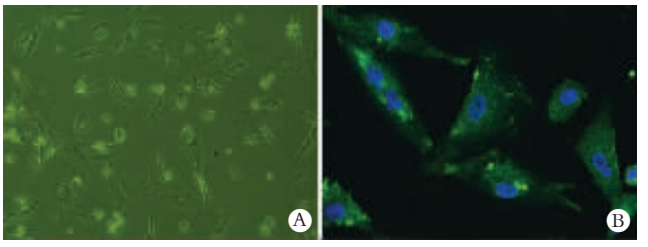
1.6 统计学分析

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS13.0 统计软件,组间比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 心房肌细胞培养及免疫组化鉴定

培养第 4 天,在倒置显微镜下观察心房肌细胞有多种形态,以梭形、三角形与不规则形为主(图 1A)。部分心房肌细胞在贴壁后 24~48 h 开始出现规律搏动,搏动频率为(93±15)/min。免疫组化结果显示 90% 以上培养细胞 α-肌动蛋白抗体染色阳性,DAPI 标记细胞核为圆形或椭圆形,少数为双核(图 1B)。



A:倒置显微镜下观察心房肌细胞形态特征(×20);B:免疫组织化学鉴定结果(免疫荧光 ×40)

图 1 大鼠原代心房肌细胞形态特征

2.2 细胞内游离钙的测定

每组检测 100 个细胞,与对照组相比,各实验组和钙超载组细胞内钙离子荧光值明显增加($P<0.01$)。KN93 组与对照组相比细胞内钙离子荧光值无明显差异($P<0.05$),3 种不同浓度 KN93(0.25、0.5、1.0 μmol/L)干预钙超载组后细胞内钙离子荧光值较钙超载组均明显下降($P<0.01$),抑制率分别达到 15.5%、24.3%、25.1%,但与对照组相比荧光值仍明显升高($P<0.01$)。见表 1。

表 1 各组心房肌细胞内游离钙、CaMK Ⅱ表达比较($\bar{x} \pm s$)

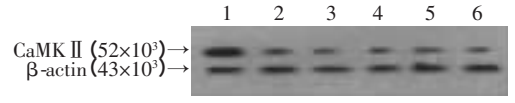
组别	$[Ca^{2+}]_i$荧光像素值	CaMK Ⅱ	β-actin	CaMK Ⅱ/β-actin
对照组	376.12±57.57	2.71±0.06	6.71±0.11	0.40±0.00
钙超载组	660.16±108.47[a]	10.58±0.13	7.12±0.11	1.49±0.01[a]
KN93 组	389.00±64.01	2.03±0.10	6.58±0.19	0.31±0.01
实验组 1	558.00±102.56[ab]	3.68±0.05	5.97±0.02	0.62±0.01[b]
实验组 2	499.58±64.99[ab]	3.32±0.09	7.46±0.16	0.45±0.00[b]
实验组 3	494.25±78.77[ab]	3.64±0.05	8.95±0.09	0.41±0.01[b]

a:$P<0.01$,与对照组比较;b:$P<0.01$,与钙超载组比较

2.3 Western blot 检测 CaMK Ⅱ表达水平

与对照组相比,钙超载组大鼠心房肌细胞 CaMK Ⅱ表达明

显增加($P<0.01$),KN93 组大鼠心房肌细胞 CaMK Ⅱ表达略低于对照组,不同浓度 KN93(0.25、0.5、1.0 μmol/L)干预钙超载组大鼠心房肌细胞 CaMK Ⅱ表达明显低于钙超载组($P<0.01$),并随 KN93 浓度增加 CaMKⅡ表达呈下降趋势,实验 1 组约为对照组 1.53 倍,实验 2、3 组已降至对照组水平(图 2,表 1)。



1:钙超载组;2:对照组;3:KN93 组;4:实验组 1;5:实验组 2;6:实验组 3

图 2　Western blot 检测各组细胞 CaMK Ⅱ表达

3　讨论

细胞内存在着一系列调节钙转运的蛋白,其与外来信号分子结合后通过对细胞膜和肌浆网膜上的钙离子通道进行调控,维持细胞内钙平衡。钙/钙调素依赖性蛋白激酶(CaMK)能磷酸化许多靶酶的磷酸化位点并使其活化,以实现众多的生理功能,被认为是钙信号转导通路中最为重要的蛋白分子。CaMK 分为 4 型,其中 CaMK Ⅱ 有 4 个同工酶分别由 4 个基因来编码:α、β、γ 和 δ,α 和 β 局限于神经系统,心脏主要为 δ[7]。CaMK Ⅱ通过细胞膜及肌浆网上钙离子通道调节细胞内钙的转运,影响细胞内钙的水平,进而调节心肌细胞的电活动和收缩活动[8]。KN93 是 CaMK Ⅱ高效特异的抑制剂,具有细胞膜穿透性,它通过与 CaM 结合位点的相互作用,阻止 CaM 与 CaMK Ⅱ的结合,使得 CaMK Ⅱ不能自身磷酸化而不被激活[9]。

新近研究[10-13]发现,CaMK Ⅱ与心律失常的发生密切相关。CaMK Ⅱ活性增高可以导致心肌肥大、心肌收缩力下降及细胞内钙的增加,并使动作电位离散度增加,导致细胞后除极,从而诱发恶性室性心律失常,并认为 CaMK Ⅱ是器质性心脏病室性心律失常发生的关键因素之一。而抑制 CaMK Ⅱ能够减轻心肌梗死后的左室扩张,并有利于维持细胞内钙的动态平衡[14]。但房颤的发生是否与心房肌细胞 CaMKⅡ活性增加有关目前尚不清楚。因某些房颤的发生与心房肌细胞的后除极有关[15],且房颤患者及房颤动物模型心房肌细胞均有钙代谢紊乱现象,表明房颤发生与某些器质性心脏病室性心律失常的发生机制有相似之处。故推测心房肌细胞 CaMKⅡ活化可能与房颤的发生密切相关,而给予 CaMKⅡ抑制剂有可能降低房颤发生的风险。

本实验结果显示,钙超载组心房肌细胞内钙离子荧光值明显增加,CaMK Ⅱ表达也增高,约为对照组的 3.68 倍。而预先加入 3 种不同浓度 KN93 可以显著降低 ionomycin 导致的细胞内钙离子荧光强度的增加幅度,细胞钙负荷抑制率分别达到 15.5%、24.3%、25.1%;同时钙超载细胞 CaMKⅡ的表达也有显著降低,实验 2、3 组已降至对照组水平。这说明通过 CaMKⅡ抑制剂 KN93 干预后,可以在一定程度上抑制心房肌细胞钙超载。而细胞 CaMKⅡ的表达和细胞内钙的不完全一致性也说明细胞内钙超载是个复杂的病理生理过程,CaMKⅡ信号转导途径可能只是其中重要环节之一。而 CaMKⅡ抑制剂 KN93 是否通过其他途径来降低心房肌细胞的钙负荷还有待进一步研究。KN93 显著抑制大鼠心房肌细胞钙超载的结果表明,针对 CaMKⅡ活化这一关键环节采用干预措施,可能有助于预防房颤的发生。

参考文献:

[1] Nattel S. New ideas about atrial fibrillation 50 years on[J]. Nature, 2002, 415(6868): 219-226.
[2] El-Armouche A, Boknik P, Eschenhagen T, *et al*. Molecular determinants of altered Ca^{2+} handling in human chronic atrial fibrillation[J]. Circulation, 2006, 114(7): 670-680.
[3] 陈劲进, 肖颖彬, 刘健. 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[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(21): 2157-2159.
[4] Braun A P, Schulman H. The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase; from form to function [J]. Annu Rev Physiol, 1995, 57: 417-445.
[5] 黄鑫, 李莉, 徐志云, 等. 风湿性心脏病慢性心房颤动患者钙调蛋白的表达[J]. 中国心脏起搏与心电生理杂志, 2006, 20(6): 497-499.
[6] Benardeau A, Hatem S N, Rucker-Martin C, *et al*. Primary culture of human atrial myocytes is associated with the appearance of structural and functional characteristics of immature myocardium[J]. J Mol Cell Cardiol, 1997, 29(5): 1307-1320.
[7] Wehrens X H, Lehnart S E, Reiken S R, *et al*. Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase Ⅱ phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor[J]. Circ Res, 2004, 94 (6): e61-e70.
[8] Maier L S, Bers D M. Role of Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase(CaMK) in excitation-contraction coupling in the heart[J]. Cardiovasc Res, 2007, 73(4): 631-640.
[9] Sumi M, Kiuchi K, Ishikawa T, *et al*. The newly synthesized selective Ca^{2+}/calmodulin dependent protein kinase Ⅱ inhibitor KN-93 reduces dopamine contents in PC12h cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1991, 181(3): 968-975.
[10] Maier L S, Zhang T, Chen L, *et al*. Transgenic CaMKⅡdeltaC overexpression uniquely alters cardiac myocyte Ca^{2+} handling; reduced SR Ca^{2+} load and activated SR Ca^{2+} release[J]. Circ Res, 2003, 92(8): 904-911.
[11] Guo T, Zhang T, Mestril R, *et al*. Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase Ⅱ phosphorylation of ryanodine receptor does affect calcium sparks in mouse ventricular myocytes[J]. Circ Res, 2006, 99(4): 398-406.
[12] Kirchhof P, Fabritz L, Kilic A, *et al*. Ventricular arrhythmias, increased cardiac calmodulin kinase Ⅱ expression, and altered repolarization kinetics in ANP receptor deficient mice[J]. J Mol Cell Cardiol, 2004, 36(5): 691-700.
[13] Khoo M S, Li J, Singh M V, *et al*. Death, cardiac dysfunction, and arrhythmias are increased by calmodulin kinase Ⅱ in calcineurin cardiomyopathy[J]. Circulation, 2006, 114(13): 1352-1359.
[14] Zhang R, Khoo M S, Wu Y, *et al*. Calmodulin kinase Ⅱ inhibition protects against structural heart disease[J]. Nat Med, 2005, 11(4): 409-417.
[15] Chen Y J, Chen Y C, Yeh H I, *et al*. Electrophysiology and arrhythmogenic activity of single cardiomyocytes from canine superior vena cava[J]. Circulation, 2002, 105(22): 2679-2685.

(**收稿**:2009-12-09;**修回**:2010-01-29)
(编辑　龙　亮)