DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.12.012
第22卷第12期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 12
2000年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2000

文章编号:1000-5404(2000)12-1151-04

论著

钙激动剂对心肌肥大有关信号转导的作用

杨永健[1],祝善俊[1],祝之明[2],胡厚祥[2],钟 键[2], 丁刚[2] (第三军医大学:[1]附属新桥医院心血管内科,重庆 400037;[2]附属大坪医院野战外科研究所高血压中心,重庆 400042)

提 要:目的 探讨钙激动剂对心肌细胞丝裂素活化蛋白激酶(MAPK)活性,c-fos、c-myc 蛋白核转位表达,及蛋白核酸合成的影响。方法 应用血管紧张素Ⅱ(AngⅡ,10^{-7} mol/L)刺激原代培养的心肌细胞钙内流,雷尼丁(RY,10^{-7} mol/L)刺激胞内钙释放;刺激5 min时测MAPK活性,免疫组化方法检测刺激5、10、20、30 min时c-fos、c-myc蛋白定位表达;^{3}H-Leu和^{3}H-TdR掺入法检测刺激24 h心肌细胞蛋白核酸合成。结果 AngⅡ和RY刺激心肌细胞5 min时MAPK活性均明显增高,与对照心肌细胞相比差异显著($P<0.01$)。免疫组化结果显示,RY刺激心肌细胞c-fos、c-myc蛋白核转位表达早于AngⅡ。AngⅡ和RY刺激24 h,心肌细胞蛋白核酸合成显著增高,与对照组心肌细胞相比差异显著($P<0.01$)。结论 刺激钙内流及钙释放均在早期激活心肌细胞MAPK。钙释放导致的心肌细胞c-fos、c-myc蛋白核转位表达早于钙内流,同时引起心肌细胞蛋白核酸合成明显增加。本研究为通过干预细胞内钙变化来改善心肌肥大提供了实验依据。

关键词:钙激动剂;丝裂素活化蛋白激酶;c-fos、c-myc;心肌细胞
中图法分类号:R35;R542.2 文献标识码:A

Effect of calcium activators on signaling transduction of myocardium hypertrophy in cardiac myocytes *in vitro*

YANG Yong-jian, ZHU Shan-jun, ZHU Zhi-ming, HU Hou-xiang, ZHONG Jian, DING Gang (Department of Cardiology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of calcium activators on the activity of mitogen activated protein kinase (MAPK), expression and distribution of c-fos and c-myc protein, synthese of protein and nucleic acid in cardiomyocytes. Methods Ca^{2+} influx and intracellular Ca^{2+} release in cultured neonatal rat cardiomyocytes were stimulated by Angiotensin Ⅱ (AngⅡ, 1×10^{-7} mol/L) and Ryanodine (RY, 1×10^{-7} mol/L) respectively. MAPK activity were measured at 5 min after the stimulation with γ-^{32}P-ATP substrate, local expression of c-myc and c-fos by immunohistochemical methods, and the syntheses of protein and nucleic acid 24 h later by ^{3}H-Leu/^{3}H-TdR incorporation. Results MAPK activity was increased markedly at the 5th min in the cells with both AngⅡ and RY stimulation, with a significant difference from the control cardiac myocytes ($P<0.01$). Transnuclei expressions of c-fos and c-myc protein was earlier in the cells stimulated by RY than in those by AngⅡ. In 24 h after the stimulation with AngⅡ and RY, the syntheses of protein and nucleic acid were significantly increased compared with those of control myocytes ($P<0.01$). Conclusion MAPK of cardiomyocytes can be activated by both calcium influx and intracellular release. The c-fos and c-myc proteins are expressed earlier in the cells stimulated to intracellular Ca^{2+} release than those to Ca^{2+} influx, and the syntheses of protein and nucleic acid are increased in the cells at the same time. These results gives a basis for further research on alleviating the degree of myocardial hypertrophy by altering the intracellular Ca^{2+} level.

Key words: calcium activator; mitogen activated protein kinase; c-fos, c-myc; cardiomyocytes

---

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970304,39725013);重庆市科委资助项目
作者简介:杨永健(1965-),男,重庆市万州区人,博士研究生,主治医师,主要从事心肌重构有关信号转导方面的研究。电话:(023)68757745
收稿日期:2000-03-15;修回日期:2000-08-17
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

心肌细胞内钙的变化是触发心肌肥厚相关信号转导的始动因素[1]，引起心肌细胞内钙增高的血管活性物质较多，如血管紧张素Ⅱ(Angiotensin Ⅱ，AngⅡ)和雷尼丁(Ryanodine，RY)等，但两者导致胞内钙增加的机制不同，前者与受体结合通过激活钙通道和三磷酸肌醇(IP_3)受体引起钙内流，而后者则与肌浆网RY受体结合，使内贮钙释放[2,3]。丝裂素活化蛋白激酶(Mitogen activated protein kinase，MAPK)存在于胞浆内，是细胞生长和分化的重要信号转导成份[4]，但与细胞内钙变化的关系知之甚少。因此，本研究以培养的心肌细胞为研究对象，用AngⅡ刺激钙内流，RY刺激钙释放，观察刺激后MAPK活性变化、胚胎型心脏基因c-fos、c-myc蛋白定位表达，及对心肌细胞蛋白核酸合成的影响，以明确钙激动剂对心肌重构的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

M199，AngⅡ，RY，髓样磷脂碱性蛋白(MBP)(Sigma公司)；c-fos，c-myc抗体(Santa Cruz公司)；ABC试剂盒(包括山羊血清、生物素标记二抗等)(武汉博士德公司)；氚-亮氨酸(^{3}H-Leu，中科院上海核技术开发公司)；氚-胸腺嘧啶(^{3}H-TdR，北京原子能科学研究院)；Wistar大鼠乳鼠由附属大坪医院实验动物中心提供。

1.2 心肌细胞培养及实验分组

取新生1～3 d Wistar大鼠乳鼠的心脏，按Scott法原代培养。本实验AngⅡ、RY刺激浓度均为10^{-7} mol/L，分为正常对照心肌细胞(对照组)，AngⅡ刺激心肌细胞(AngⅡ刺激组)，RY刺激心肌细胞(RY刺激组)3组。

1.3 MAPK活性测定

原代培养心肌细胞48 h后，用无血清培养基培养24 h，再分别用AngⅡ、RY刺激5 min，取细胞提取液，按李田昌[5]的方法，用γ-^{32}P-ATP磷酸化底物MBP测心肌细胞MAPK活性，重复3次。

1.4 免疫组化

原代培养的心肌细胞48 h后，用无血清培养基培养24 h，再分别用AngⅡ、RY刺激5、10、20、30 min，用4%多聚甲醛固定30 min，作免疫组化。ABC免疫组化法：①PBS漂洗15 min×3次；②二抗(1∶200)在37 ℃孵育24 h，PBS漂洗15 min×3次；③二抗37 ℃孵育1 h，PBS漂洗15 min×3次；④S-P复合物37 ℃孵育1 h，PBS漂洗15 min×3次；⑤DAB显色10 min。

1.5 ^{3}H-Leu和^{3}H-TdR掺入

将消化的乳鼠心肌细胞配制成3×10^5个/ml的细胞悬液，接种于24孔板，每孔1 ml，24 h后加入无血清M199培养24 h。分为对照组、AngⅡ刺激组、RY刺激组，分别加入^{3}H-Leu或^{3}H-TdR 18.5 kBq/孔，每组重复3孔，24 h后用0.25%的胰酶消化细胞，多管细胞收集器将细胞吸附于玻璃纤维纸上，烘干后加入闪液进行液闪计数。

1.6 统计学处理

数据以$\bar{x}\pm s$表示，组间比较进行t检验。

2 结果

2.1 MAPK活性

AngⅡ刺激心肌细胞5 min时MAPK活性为(117±11)Bq/well，RY刺激5 min为(124±4)Bq/well，正常对照为(33±3)Bq/well。AngⅡ和RY刺激组与对照组MAPK活性相比差异非常显著($P<0.01$)。

2.2 免疫组化

AngⅡ刺激组10 min时，c-fos、c-myc蛋白主要表达于胞浆，见图1、2；30 min时，c-fos、c-myc蛋白主要表达于胞核，见图3、4；随AngⅡ刺激时间延长即c-fos、c-myc蛋白表达由胞浆向胞核内转移，完成核转位。

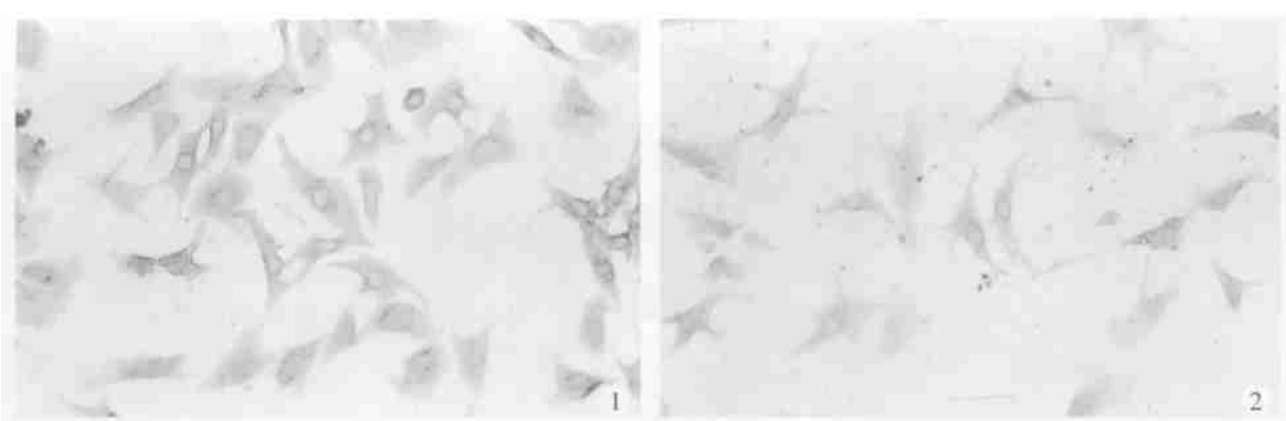


图1 AngⅡ刺激10 min心肌细胞c-fos蛋白表达 (ABC×200)

Fig 1 Expression of c-fos protein in cardiomyocytes stimulated by AngⅡ for 10 min (ABC×200)

图2 AngⅡ刺激10 min心肌细胞c-myc蛋白表达 (ABC×200)

Fig 2 Expression of c-myc protein in cardiomyocytes stimulated by AngⅡ for 10 min (ABC×200)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

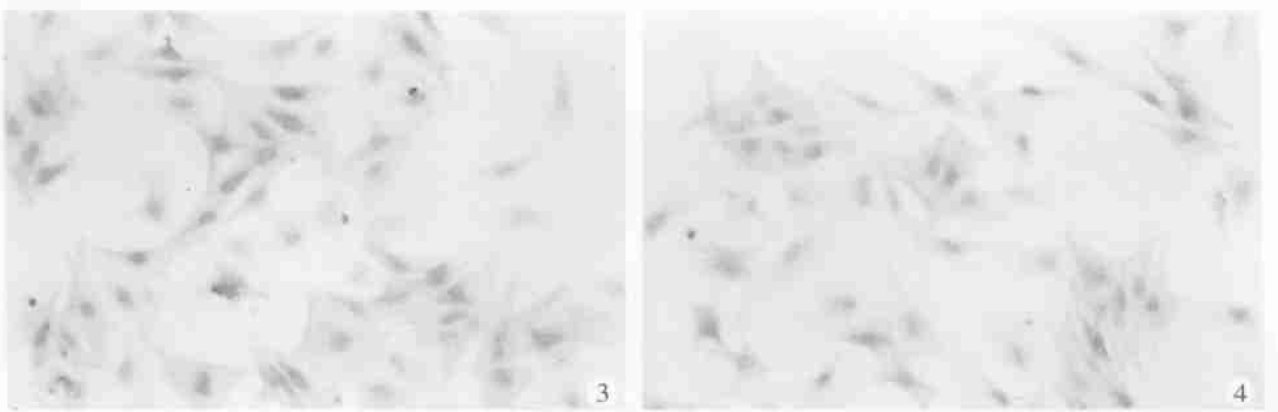


图 3　AngⅡ刺激 30 min 心肌细胞 c-fos 蛋白表达　(ABC× 200)

Fig 3　Expression of c-fos protein in cardiomyocytes stimulated by AngⅡ for 30 min　(ABC× 200)

图 4　AngⅡ刺激 30 min 心肌细胞 c-myc 蛋白表达　(ABC× 200)

Fig 4　Expression of c-myc protein in cardiomyocytes stimulated by AngⅡ for 30 min　(ABC× 200)

RY 刺激组 5 min c-fos、c-myc 蛋白主要表达于胞浆内; 20 min 时, c-fos、c-myc 蛋白表达以胞核为主, 完成核转位。RY 刺激心肌细胞后 c-fos、c-myc 蛋白表达早于 AngⅡ, 完成核转位的过程也较 AngⅡ早。

2.3　^{3}H-Leu 和 ^{3}H-TdR 掺入

AngⅡ刺激和 RY 刺激组 24 h ^{3}H-Leu 和 ^{3}H-TdR 掺入量与对照组相比差异非常显著($P< 0.01$), 见图 5、6。

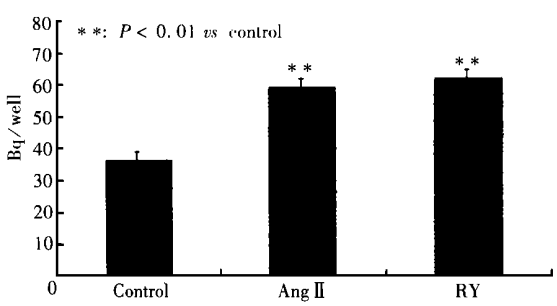


图 5　心肌细胞 ^{3}H-Leu 掺入量

Fig 5　^{3}H-Leu incorperation of cardiomycytes

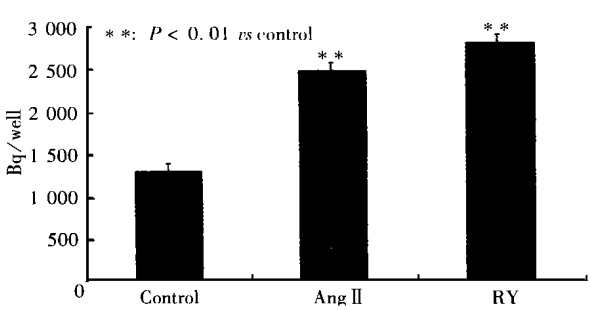


图 6　心肌细胞 ^{3}H-TdR 掺入量

Fig 6　^{3}H-TdR incorperation of cardiomycytes

3　讨论

有关心肌肥厚的临床及实验研究已有较多报道, 但对钙激动剂和心肌细胞生长信号转导之间的关系仍知之甚少。钙离子是多种信号转导的交汇点, 在多途径信号转导中起中心调节作用[1,6]。AngⅡ、RY 是心肌细胞肥大刺激因子, 也是胞内钙激动剂, AngⅡ刺激胞外钙内流, RY 刺激胞内钙释放, 它们与心肌肥大有关信号转导之间的关系一直是人们关注的问题。MAPK 在心肌重构中起重要作用, 其活性在刺激早期很快升高, 肥大形成后其活性下降甚至恢复正常水平[4]。本研究用 AngⅡ、RY(10^{-7} mol/L)刺激心肌细胞 5 min 时, MAPK 活性明显增加, 与正常对照心肌细胞相比有显差异著性。说明心肌细胞钙内流及内钙释放均可在早期促使 MAPK 活化。

AngⅡ主要与其特异受体(AT_1)结合, 通过 G 蛋白耦联的磷酯酶 C(β)和酪氨酸激酶相关的磷脂酶(γ)信号通路导致细胞内第二信使分子改变, 并介导一系列反应, 使心血管细胞重塑[2]; RY 与肌浆网和线粒体上的 RY 受体结合引起内贮钙的释放, 在介导兴奋-收缩耦联过程中发挥关健作用。本实验发现这两种钙激动剂刺激早期可活化 MAPK。激活的 MAPK 可直接刺激一系列的信号转导, 表现为胞浆胞核的初级和次级反应发生, 初级反应包括活化多种心肌肥厚的相关基因如 c-fos、c-myc 的表达[4]。c-fos、c-myc 是较早发现的癌基因, 参与正常心肌细胞的分化、发育, 在心血管疾病细胞增殖过程中起重要的调节作用[1,7]。原癌基因要实现其调控功能必须活化及完成入核过程, 通过它勾

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

通核内外信息传递[1,5,7]。本研究用Ang Ⅱ刺激细胞外钙内流、RY刺激肌浆网钙释放，同时观察c-fos、c-myc蛋白的定位表达。结果发现，10^{-7} mol/L Ang Ⅱ刺激心肌细胞10 min时，c-fos、c-myc蛋白主要表达于胞浆；刺激30 min时，c-fos、c-myc蛋白主要表达于胞核，即胞浆向胞核转移，完成核转位。10^{-7} mol/L RY刺激心肌细胞5 min c-fos、c-myc蛋白主要表达于胞浆；刺激20 min时，c-fos、c-myc蛋白主要表达于胞核，完成核转位。以上结果说明，这两种不同方式激发胞内钙离子浓度增加，刺激心脏早期基因表达的方式基本一致；但RY刺激胞内贮存钙的释放导致的c-fos、c-myc蛋白表达早于Ang Ⅱ引起的钙内流，完成核转位的过程也较早。这也提示不同的心肌肥厚刺激因子在影响心肌细胞胚胎型基因表达方面还是有所差异的。

MAPK激活的次级反应始发于初级反应的改变，其表现在转录水平受初级反应基因c-fos、c-myc等的调控[2,4]，直接引起心肌细胞蛋白合成增加，细胞体积增大，激素分泌，间质细胞增生。本实验结果表明，两种钙激动剂刺激心肌细胞24 h后均可导致心肌细胞^{3}H-Leu和^{3}H-TdR掺入量增加，提示钙内流及钙释放均可导致心肌细胞蛋白核酸合成增加，而引起心肌细胞肥大。

本研究为通过干预细胞内钙变化来改善心肌肥大而逆转心肌重构提供了实验依据。

参考文献：

[1] Lijnen P, Petrov V. Renin-angiotensin system, hypertrophy and gene expression in cardiac myocytes[J]. J Mol Cell Cardiol, 1999, 31(5): 949—970.

[2] Meghji P, Nazir S A, Dick D J, *et al*. Regional workload induced changes in electrophysiology and immediate early gene expression in intact *in situ* porcine heart[J]. J Mol Cell Cardiol, 1997, 29(11): 3 147—3 155.

[3] Dolmetsch R E, Lewis R S, Goodnow C C, *et al*. Differential activation of transcription factors induced by Ca^{2+} response amplitude and duration[J]. Nature, 1997, 386(6 627): 855—858.

[4] Rabikin S W, Sunga P S, Sanghera J S, *et al*. Reduction of angiotensin Ⅱ-induced activation of mitogen-activated protein-kinase in cardiac hypertrophy[J]. Cell Mol Life Sci, 1997, 53(11): 955—959.

[5] Li T C, Pang Y Z, Tang C S. Determination for activaty of mitogen-activated protein kinase[J]. Bas Med Sci Clin, 1996, 16(3): 155—158.

[6] Bers D M, Perez-Reyes E. Ca^{2+} channels in cardiac myocytes: structure and function in Ca^{2+} influx and intracellular Ca^{2+} release[J]. Cardiovasc Res, 1999, 42(2): 339—360.

[7] Zucchi R, Ronca-Testoni S. The sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} channel/ryanodine receptor modulation by endogenous effectors, drugs and disease states[J]. Pharmacol Rev, 1997, 49(1): 1—51.

（编辑 汪勤俭）

（上接1150页）

2.2 各散光度数段电脑验光与人工验光之散光轴向相符率见表2

表2 电脑验光与人工验光散光轴向相符率

	＜1.00 DC	1.00~1.75 DC	2.00~4.00 DC	＞4.00 DC
例数	45眼	27眼	25眼	7眼
＜5°相符率	44%	70%	76%	100%

3 讨论

本实验表明年龄与电脑验光准确性的关系很大。这主要是调节因素的作用，年龄越小调节力越大，成年后调节能力逐渐减弱。电脑验光与人工验光相符率随年龄增大而增大，远视患者相符率远远低于近视患者。电脑验光仪在小瞳下，可以对40岁以上患者进行验光[2]，还可以对17岁以上的近视患者进行验光。40岁以下的远视患者小瞳下验光准确性稍差[1]。

本实验散光值相符率普遍较高，但轴向的差异较大，其中1.00 DC以下的散光轴向相符率只有44%，1.00~4.00 DC的均小于70%~80%，与文献[3,4]报道相符，建议试片时注意。16岁以下患者由于调节因素过大，不主张在小瞳下验光，扩瞳后可以对小儿进行验光[3,4]。远视必须扩瞳验光。所有的电脑验光都需试片。试片的原则是最低的度数，最好的视力(1.0以上)，按照患者的感受和适应能力适当调整，根据全面情况最后给处方[5]。

关键词：电脑验光；人工验光
中图法分类号：R778.2 文献标识码：B

参考文献：

[1] 计尚年. 眼科全书[M]. 北京：人民卫生出版社，1996. 2 699—2 700.

[2] 徐广第. 眼科屈光学[M]. 第2版. 上海：上海科学技术出版社，1995. 176—177.

[3] 徐世平. 电脑验光仪和角膜曲率计在小儿眼科的应用[J]. 中国斜视与小儿眼科杂志，1996，3(4)：184—185.

[4] 任华明. 自动电脑验光仪在小儿眼科的应用[J]. 中华眼科杂志，1992，28(2)：79—80.

[5] 隋建英. 电脑验光须与实践相结合[J]. 中国眼镜科技杂志，1998，38(3)：32—33.

（编辑 谢义霞）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net