

• 论著 •

再灌注损伤大鼠心肌细胞核³H-Ryanodine 结合特性的变化

唐维平 司良毅 张乐之 周红 何华美

【摘要】 目的 观察缺血-再灌注损伤(IRI)心肌细胞核兰尼定受体(RyR)结合特性改变。**方法** 雄性 Wistar 大鼠随机分为 IRI 组和假手术(Sham)组,结扎冠状动脉左主干建立 IRI 模型,³H-Ryanodine 饱和结合法分析分离的心肌细胞核上 RyR 最大结合容量(Bmax)和解离常数(Kd)。**结果** 大鼠心肌细胞核存在高亲和力的 RyR,IRI 组较 Sham 组 Bmax 降低 29%($P < 0.01$),Kd 差异无显著性($P > 0.05$)。IRI 组和 Sham 组心肌细胞核经佛波酯(PMA)+磷脂酰丝氨酸(PS)处理后,Bmax 均显著增加(P 均 < 0.01),但 IRI 组的增加幅度较小($P < 0.01$);IRI 组和 Sham 组心肌细胞核经 Ca^{2+} -钙调素(CaM)处理后,Bmax 均降低(P 均 < 0.05),但 IRI 组降低幅度较小($P < 0.01$);上述处理对两组 Kd 均无显著影响(P 均 > 0.05)。**结论** IRI 心肌细胞核 RyR 的 Bmax 呈降低趋势;经 PMA+PS 和 Ca^{2+} -CaM 处理后,Bmax 的改变削弱,而 Kd 无改变。

【关键词】 缺血-再灌注损伤,心肌; 细胞核; 兰尼定受体

Changes in the feature of ³H-Ryanodine binding to cardiomyocyte nuclei in reperfusion injury in rat

TANG Wei-ping*, SI Liang-yi, ZHANG Le-zhi, ZHOU Hong, HE Hua-mei. * Department of Pharmacology, College of Fundamental Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

【Abstract】 Objective To investigate the changes in binding features of ³H-Ryanodine cardiomyocytic nuclei in reperfusion injury in the rat, and the effects of phosphorylation regulation on the binding characteristics. **Methods** Healthy male Wistar rats were randomly divided into ischemia/reperfusion injury(IRI) group and sham-operation group. IRI model was reproduced by ligating the left main coronary artery for 30 minutes followed by reperfusion of the heart for 3 hours, while in the sham-operation group the animals underwent a thoracotomy only for 3.5 hours. Cardiomyocytic nuclei were isolated by sucrose density gradient centrifugation. The maximum binding capacity (Bmax) and the dissociating ratio (Kd) of Ryanodine receptors(RyRs) were measured by radioligand binding analysis as well as Scatchard plot. **Results**

There was a high affinity of RyRs to bind with ³H-Ryanodine on the nuclear wall of rat cardiomyocytic nucleus. Compared with that of the sham-operation group, Bmax of RyRs of IRI cardiomyocytic nuclei was decreased by 29%($P < 0.01$), but there was no difference in Kd between two groups($P > 0.05$). With phosphorylation by activating the endogenous protein kinase C (PKC) with phorbol myristate acetate (PMA)+phosphatidyl serine(PS), Bmax of both sham and IRI groups were increased markedly($P < 0.01$), but in the latter group it was less increased($P < 0.01$). With phosphorylation by Ca^{2+} -calmodulin(CaM), Bmax was decreased in both sham-operation and IRI groups(both $P < 0.05$), but was less decreased in the latter($P < 0.01$). However, both PMA+PS and Ca^{2+} -CaM did not change the Kd of nuclear RyR in either group(both $P > 0.05$). **Conclusion** After IRI, Bmax of ³H-Ryanodine of cardiomyocytic nuclei is decreased and the impact of PMA+PS and Ca^{2+} -CaM on the Bmax is impaired, but the affinity of ³H-Ryanodine to cardiomyocytic nuclei is not altered under above circumstances.

【Key words】 myocyte ischemia/reperfusion injury; cell nucleus; Ryanodine receptor

Ca^{2+} 是细胞核内重要的信号分子,其参与并刺激 DNA 合成、基因激活以及细胞增殖、分化乃至凋亡等调节^[1],因此核内钙稳态的精密调节对细胞核

功能调节具有至关重要的意义。缺血-再灌注损伤(ischemia/reperfusion injury,IRI)心肌细胞浆存在显著的 Ca^{2+} 超载^[2]。我们在前期的实验中发现,大鼠心肌细胞核外过高的 Ca^{2+} 浓度可以引起细胞核游离 Ca^{2+} 浓度急剧增高,提示 IRI 大鼠心肌细胞核钙稳态发生改变。我们同时还发现,IRI 心肌细胞核的 Ca^{2+} -ATP 酶活性降低^[3],而细胞核上 Ca^{2+} 通道型受体之一的 IP3 受体密度增高^[4],这些改变可能参与了 IRI 时核钙稳态的改变。细胞核钙稳态除了受上述 Ca^{2+} -ATP 酶和 IP3 受体调节外,兰尼定(Ryanodine)受体(RyR)也起着重要的作用,故本实

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30100070)

作者单位:400038 重庆,第三军医大学①西南医院老年病科(唐维平,司良毅);②基础部药理学教研室(唐维平,张乐之,周红,何华美)

通讯作者:何华美,男,博士,副教授,现在美国哈佛大学 Brigham and Women 医院心血管系生理化学实验室工作(E-mail:hmhe@rics.bwh.harvard.edu)

作者简介:唐维平(1975-),男(汉族),四川省遂宁市人,医学硕士,医师,主要从事冠心病的基础及临床研究。

验中拟观察 IRI 大鼠心肌细胞核³H-Ryanodine (³H-Ry)结合特性的改变以及磷酸化对其结合特性的影响,旨在探讨心肌细胞核 RyR 在心肌 IRI 中可能的作用。

1 材料和方法

1.1 动物模型制备与分组:大鼠随机分为假手术(Sham)组和 IRI 组,按 Maulik 等^[5]方法略作改进:IRI 组穿线并结扎冠状动脉左侧主干致心肌缺血 30 min,拉松并解除结扎线致心肌再灌注 3 h;Sham 组穿线但不结扎,总时间仍为 3.5 h。实验结束后,从心底部剪取心脏,立即用 50 ml 冰冷 TKM 溶液(Tris-HCl 50 mmol/L, KCl 25 mmol/L, MgCl₂ 5 mmol/L, pH 7.5)洗去红细胞。根据被结扎冠状动脉左侧主干走行并结合 IRI 区颜色较苍白的特点确定损伤区域,剪下损伤区心肌,吸干水分后称重。

1.2 心肌细胞核的分离和鉴定:心肌细胞核分离操作按文献^[6]略作改进:心肌剪碎后加入 5 倍体积的匀浆介质[含蔗糖 250 mmol/L、乙二醇四乙酸酯(EGTA)1 mmol/L、二硫苏糖醇(DTT)1 mmol/L、苯甲基磺酰氟(PMSF)1 mol/L、亮氨酸 1 mmol/L、抑肽酶 1 mmol/L、胃酶抑素 1 mg/L 的 TKM 液],用玻璃十字匀浆器匀浆至无肉眼可见组织块为止,200 目尼龙网过滤后离心($\times 1\,500\text{ g}$, 10 min),弃上清。将沉淀用 5 倍体积的匀浆介质悬浮后再次匀浆 15 次,然后离心($\times 1\,500\text{ g}$, 10 min),弃上清。将沉淀加入 1 倍体积的离心介质 A(含蔗糖 1 mol/L 的匀浆介质)充分混匀后,再加入 3 倍体积的离心介质 B(含蔗糖 2.5 mol/L 的匀浆介质)充分混匀,所得混悬液超速离心($\times 110\,000\text{ g}$, 60 min),沉淀即为心肌细胞核。上述操作均在 0~4 °C 下进行。采用 Lowry 法行蛋白质定量,二苯胺法行 DNA 定量,定磷法测定肌质膜标志酶 5'-核苷酸酶活性和肌浆网标志酶葡萄糖-6-磷酸酶活性,还原产物比色法测定线粒体标志酶琥珀酸脱氢酶活性。

1.3 心肌细胞核³H-Ry 饱和结合分析^[7]:结合反应于反应液中 37 °C 下孵育 90 min。反应缓冲液组成如下:25 mmol/L 二咪唑, pH 7.4; 1.0 mol/L KCl; 1.013 mmol/L CaCl₂; 0.95 mmol/L EGTA (20 $\mu\text{mol/L}$ Ca²⁺), ³H-Ry 0.5~16.0 nmol/L。待反应完毕以后,加入终止液(含 166.6 mmol/L KCl, 33.3 mmol/L 二咪唑, 16.7 mmol/L NaN₃)稀释 10 倍,再用双层玻璃纤维滤膜(孔径 0.45 μm)进行抽滤,以 5 ml 冰冷的缓冲液(含 25 mmol/L 二咪唑; 1.0 mol/L KCl; 1.013 mmol/L CaCl₂;

0.95 mmol/L EGTA, pH 7.2)冲洗。滤膜干燥后加入闪烁液,用液闪计数器(Beckman, LS6500)测定放射强度。非特异性结合在 20 $\mu\text{mol/L}$ 的非标记 Ryanodine 存在下进行测定,为总结合量的 15%~30%。³H-Ry 购自 Perkin Elmer 公司, Ryanodine 购自 Sigma 公司。

1.4 佛波酯(PMA)+磷脂酰丝氨酸(PS)、Ca²⁺-钙调素(CaM)对³H-Ry 结合特性的影响^[8]:取分离的心肌细胞核蛋白质 200 μg , 加入缓冲液(30 mmol/L Tris-HCl, pH 7.2, 10 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L NaF, 1.5 mmol/L EGTA, 0.3 mmol/L ATP)中,在含有或不含有①5 $\mu\text{mol/L}$ PMA, 40 $\mu\text{g/ml}$ PS, 0.1 mmol/L CaCl₂; ②1 $\mu\text{mol/L}$ CaM, 0.1 mmol/L CaCl₂, 20 °C 孵育 5 min, 用含有冰冷终止缓冲液(1 mmol/L NaF, 1.5 mmol/L EGTA, 10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.2)稀释 10 倍以终止反应。离心($\times 5\,000\text{ g}$)30 min, 收集沉淀的细胞核用于³H-Ry 结合实验。CaM、PMA、PS 均购自 Sigma 公司。

1.5 饱和曲线及 Scatchard 作图:采用 GraphPad Prism 4 edition 软件对放射性计数值进行处理,程序自动生成饱和曲线,给出相应的最大结合容量(Bmax)和解离常数(Kd)值,进行 Scatchard 作图。

1.6 统计学处理:结果以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,用 Student's *t* 检验进行统计学处理。

2 结果

2.1 分离的心肌细胞核特征(表 1):蔗糖密度梯度超速离心分离的心肌细胞核在显微镜下呈椭圆形或长椭圆形,无细胞碎片污染;细胞核蛋白含量为匀浆的 1/40~1/35,蛋白质与 DNA 含量比值为 6~8,核回收率 25%~35%;细胞核各亚细胞组分标志酶的活性均低于匀浆的 5%。

表 1 心肌匀浆与细胞核标志酶活性测定($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 1 Activities of marker enzymes in myocardial homogenate and nuclei($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组织	葡萄糖-6-磷酸酶 (nmol·mg ⁻¹ ·h ⁻¹)	5'-核苷酸酶 (nmol·mg ⁻¹ ·h ⁻¹)	琥珀酸脱氢酶 (nmol·mg ⁻¹ ·h ⁻¹)
心肌匀浆(H)	93.6 $\pm$ 6.0	278.5 $\pm$ 77.8	5 102 $\pm$ 1 088
细胞核(N)	3.7 $\pm$ 1.9**	7.9 $\pm$ 2.7**	66 $\pm$ 54**
N/H(%)	<4	<3	<2

注:与心肌匀浆比较:** $P<0.01$;上述 3 项指标均为 1 mg 蛋白质含量;前两个为 nmol Pi,后一个为 nmol Formazon

2.2 IRI 心肌细胞核³H-Ry 结合特性的改变(图 1,表 2):³H-Ry 结合分析显示,大鼠心肌细胞核膜上存在高亲和力的 RyR,其 Kd 为 nmol/L 级;IRI 组与 Sham 组比较, RyRs 的 Bmax 降低 29%;而

Kd 差异无显著性。

2.3 PMA+PS 及 Ca^{2+} -CaM 对心肌细胞核 ^3H -Ry 结合特性的影响(表 2):IRI 组和 Sham 组心肌细胞核经 PMA+PS 处理后, RyR 的 Bmax 分别增加 0.8 倍和 1.5 倍, 处理前后 Bmax 增加非常显著; 但 IRI 组 Bmax 增加幅度相对 Sham 组明显减小。IRI 组和 Sham 组心肌细胞核经 Ca^{2+} -CaM 处理后 Bmax 分别降低 14% 和 30%, 磷酸化前后 Bmax 降低显著, 但 IRI 组 Bmax 降低幅度较 Sham 组明显减小。两种处理方式对 IRI 组和 Sham 组心肌细胞核 RyR 的 Kd 均无明显影响。

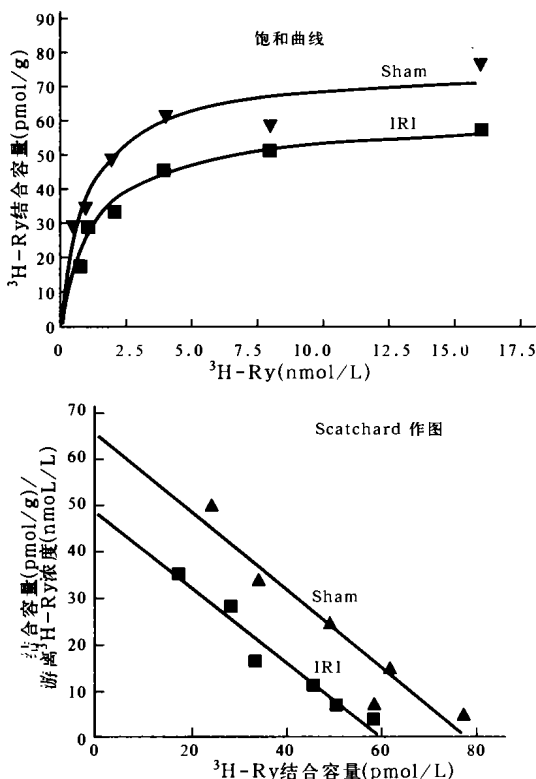


图 1 心肌细胞核 ^3H -Ry 结合分析饱和曲线及 Scatchard 图例

Figure 1 A typical saturation curve and Scatchard plot for

^3H -Ry binding to nuclear RyRs

表 2 大鼠心肌细胞核 ^3H -Ry 结合特性及 PMA+PS、 Ca^{2+} -CaM 的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 2 Characteristics of ^3H -Ry binding to rat cardiomyocytic nuclei and the effects of PMA+PS and Ca^{2+} -CaM($\bar{x} \pm s, n=5$)

指标	组别	心肌细胞核		
		缓冲液	PMA+PS	Ca^{2+} -CaM
Kd(nmol/L)	Sham 组	0.8 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.2
	IRI 组	0.9 $\pm$ 0.3	1.0 $\pm$ 0.4	0.9 $\pm$ 0.4
Bmax(pmol/g)	Sham 组	73.0 $\pm$ 5.9	184.6 $\pm$ 15.2 $\Delta\Delta$	51.2 $\pm$ 6.1 $\Delta\Delta$
	IRI 组	56.5 $\pm$ 5.3**	99.5 $\pm$ 10.2 $\Delta\Delta$	48.5 $\pm$ 4.9 Δ

注:与 Sham 组比较:** $P<0.01$;与同组缓冲液比较:

$\Delta P<0.05, \Delta\Delta P<0.01$

3 讨论

细胞核钙稳态调节机制十分复杂,主要由位于

核内膜的 RyR 及 IP₃ 受体以及位于核外膜的 Ca^{2+} -ATP 酶及 IP₄ 受体构成,其中 RyR 及 IP₃ 受体被认为是将核周间隙内 Ca^{2+} 释放入核内的通道^[1]。本实验中发现,IRI 心肌细胞核 ^3H -Ry 的 Bmax 较 Sham 组明显降低,提示通道数目减少,从而在通道开放频率(probability of opening, Po)不变时钙释放能力将降低。但 RyR 的 Po 受多种因素的调节,如 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、ATP、CaM 和环化二磷酸腺苷核糖(cADPr)等,例如 RyR 的通道 Po 在不同游离 Ca^{2+} 浓度下呈钟型曲线,即 RyR 的钙释放活性具有最佳游离 Ca^{2+} 浓度范围,过低或过高的游离 Ca^{2+} 浓度均降低 RyR 的通道 Po; Mg^{2+} 和 CaM 通过不同机制减小 RyR 的 Po。可见,RyR 的 Ca^{2+} 释放能力决定于通道数目和 Po 两个因素。虽然本实验未研究 Po 的改变,但初步排除了 IRI 时 RyR 数目增加而增强 Ca^{2+} 释放能力。

研究表明,RyR 与激酶[如蛋白激酶 A(PKA)]以及蛋白磷酸酶(如 PP1 和 PP2A)通过适配器(adaptor)蛋白构成大分子,说明 RyR 的钙释放活性受到磷酸化/去磷酸化的密切调节。本实验中采用的是添加 PMA+PS 以激活内源性的蛋白激酶 C(PKC)及添加 Ca^{2+} -CaM 观察磷酸化调节对细胞核 ^3H -Ry 结合特性的影响。结果添加 PMA+PS 后两组心肌细胞核 RyR 的 Bmax 均显著增加,但 IRI 组增加幅度明显小于 Sham 组;而添加 Ca^{2+} -CaM 后两组的 Bmax 均显著降低,但 IRI 组降低幅度明显小于 Sham 组。可见 IRI 心肌细胞核 RyR 无论对 PMA+PS 导致的内源性 PKC 激活,还是对 Ca^{2+} -CaM 介导的调节反应都削弱。本实验结果还提示,IRI、PMA+PS 或 Ca^{2+} -CaM 处理均不改变心肌细胞核 RyR 的 Kd,即 RyR 与 ^3H -Ry 亲和力不变。

IRI 心肌细胞核 RyR 的 Bmax 降低原因尚需要进一步研究。内质网与细胞核膜在结构上是延续的,在功能上也是密切相关的,故其他基于心肌细胞内质网的研究也许可以提供某些借鉴。有研究发现,IRI 兔心肌细胞 RyR mRNA 早期即可出现降低^[8],由于核膜 RyR 的分布量同样也受 RyR 表达量的影响,故 IRI 心肌细胞核 RyR 的 Bmax 降低可能与 RyR 表达下调有关。大量研究证明,IRI 心肌细胞伴随有氧自由基的生成增加及清除能力降低,氧自由基可以破坏细胞蛋白质、脂质等大分子物质,使大分子物质发生交联,甚至一级结构的破坏,如蛋白质肽链断裂。故 IRI 心肌细胞核 RyR 的 Bmax 降低的另外一个原因可能涉及到氧自由基导致的受体蛋白

间、受体蛋白与核膜脂质间发生交联,甚至可能发生受体蛋白肽链断裂^[9]。可见,IRI 时可能同时存在 RyR 表达量的降低及 RyR 破坏量的增加,二者均会导致 IRI 心肌细胞核 RyR 的 Bmax 降低。本实验发现,在添加 PMA+PS 及 Ca²⁺-CaM 后,IRI 心肌细胞核³H-Ry 结合特性变化较 Sham 组明显减小,其机制有待研究。有文献报道,不同的氧化还原状态可影响到 Ca²⁺-CaM 与 RyR 的结合和对通道活性的调节^[10],在氧化应激时,Ca²⁺-CaM 与 RyR 的结合能力降低,从而削弱 Ca²⁺-CaM 对 RyR 通道活性的抑制。IRI 心肌细胞存在明显氧化应激,可影响到 Ca²⁺-CaM 与 RyR 的结合和对通道活性的调节,这也许从某个角度可以解释为何 IRI 时 Ca²⁺-CaM 对心肌细胞核 RyR 的 Bmax 降低较 Sham 组小。

总之,IRI 心肌细胞核³H-Ry 的 Bmax 降低、PMA+PS 激活内源性 PKC 及 Ca²⁺-CaM 对心肌细胞核³H-Ry Bmax 的影响削弱,Kd 无明显改变。

参考文献:

- 唐维平,司良毅.细胞核钙信号[J].国外医学老年医学分册,2004,25:49-51.

- Piper H M, Garcia - Dorado D, Ovize M. A fresh look at reperfusion injury[J]. Cardiovasc Res, 1998, 38: 291 - 300.
- 付爱玲,何华美,张乐之.心肌缺血再灌注损伤时细胞核膜钙泵功能的改变[J].中国病理生理杂志,2003,19:1453-1455.
- 付爱玲,徐红梅,张乐之,等.心肌缺血再灌注损伤时细胞核内膜三磷酸肌醇受体变化的研究[J].军事医学科学院院刊,2003,27:339-341.
- Maulik N, Engelman R M, Rousou J A, et al. Ischemic preconditioning reduces apoptosis by upregulating anti - death gene Bcl - 2[J]. Circulation, 1999, 100(19 Suppl): I 369 - 375.
- 王培勇,杨军,董林旺,等.心肌肥厚大鼠心肌肌浆网和核被膜 Ryanodine 受体变化的研究[J].中国危重病急救医学,2001,13:582-586.
- Boittin F X, Macrez N, Halet G, et al. Norepinephrine - induced Ca²⁺ waves depend on InsP3 and Ryanodine receptor activation in vascular myocytes[J]. Am J Physiol, 1999, 277(1 pt1): C139 - C151.
- 李庆,李彤,杨景学,等.缺血再灌注对兔心肌肌浆网 Ryanodine 受体 2 功能的影响[J].第四军医大学学报,2002,23:1874-1876.
- Lucas D T, Szweda L I. Cardiac reperfusion injury: aging, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 510 - 514.
- Balshaw D M, Xu L, Yamaguchi N, et al. Calmodulin binding and inhibition of cardiac muscle calcium release channel (Ryanodine receptor)[J]. J Bio Chem, 2001, 276: 20144 - 20153.

(收稿日期:2004-10-21 修回日期:2005-02-25)

(本文编辑:李银平)

• 经验交流 •

急性邻甲苯胺中毒并发急性肾功能衰竭 1 例

赵莉

【关键词】 中毒; 邻甲苯胺; 肾功能衰竭

1 病历简介

患者,男,33岁,因从事邻甲苯胺粉碎工作4h后出现头痛、头晕、气短、恶心、呕吐2h而入院。入院查体:体温为37.4℃,呼吸频率为25次/min,血压为127.5/90.0 mm Hg (1 mm Hg = 0.133 kPa),脉搏为100次/min,意识清楚,精神萎靡,双瞳孔等大等圆,直径3 mm,对光反射灵敏;口唇及肢端、指甲严重紫绀,两肺底闻及少许湿啰音,双膝腱反射亢进。实验室检查:高铁血红蛋白1.46 g/L,可见红细胞异常,赫恩小体(+),嗜碱点彩红细胞及碱粒凝集实验正常。血常规:白细胞(WBC)计数 $17 \times 10^9/L$,血红蛋白(Hb)100 g/L,肝功能及生生化指标基本正常。尿常规检

作者单位:123000 辽宁省阜新市第二人民医院透析室

作者简介:赵莉(1958-),女(汉族),辽宁省阜新市人,主治医师。

查:WBC 0~2/高倍视野。心电图:窦性心律,I、II导联及aVF T波低平双向。入院后给予乙醇清洗皮肤,特效解毒剂美蓝静脉注射,高压氧仓治疗。患者紫绀明显减轻,气短缓解。发病36h后患者出现少尿、颜面部及周身水肿。血尿素氮28 mmol/L、肌酐686 μmol/L、尿渗透压600 mmol/L、高铁血红蛋白1.46 g/L;尿常规:WBC 10~14/高倍视野,红细胞(RBC)2~3/高倍视野,尿蛋白(++),上皮细胞1~2/高倍视野;血常规:WBC $17 \times 10^9/L$,Hb 100 g/L。诊断:邻甲苯胺中毒并发急性肾功能衰竭(肾衰)。患者在对症治疗基础上给予血液透析加血液灌流治疗(为德国4008B血透机,1408透析器,丽珠HA330型血液灌流器,时间2.5~3.5 h,共2次),同时给予碱性药物及肾上腺皮质激素治疗。1周后患者尿量明显增加,水肿逐渐消失,半个月后患者痊愈出院。

2 讨论

邻甲苯胺通过呼吸道、皮肤进入血液后,可迅速使血中二价铁氧化成三价铁,使血红蛋白失去对氧的亲合能力,引起高铁血红蛋白症和红细胞珠蛋白变性,从而损害红细胞膜而致溶血。溶血后血管内游离血红蛋白可在肾小管内沉积而堵塞管腔,加上急性溶血性贫血和肾血流量的减少,致使肾脏缺氧,进一步加重肾小管的损害,最终发生少尿、无尿或急性肾衰的各期改变。

邻甲苯胺中毒的特效药物首选美蓝,其次为硫代硫酸钠,它们可使高铁血红蛋白还原成正常血红蛋白。高压氧可改善机体缺氧状态。在邻甲苯胺中毒并发急性肾衰时进行血液透析加血液灌流治疗,可减轻肾脏损害和挽救生命。

(收稿日期:2004-10-03)

修回日期:2005-03-03)

(本文编辑:郭方)