

β_2 受体对心肌梗死大鼠心肌细胞钠钙交换电流调控的信号转导途径

杨 蕙¹, 伍 卫^{2*}, 邓春玉³

(1.广州市第一人民医院鹤洞分院心内科, 广东广州 510380; 2.中山大学附属第五医院心内科, 广东 珠海 510000;
3 广东省人民医院心血管病研究所膜片嵌室, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】研究 β_2 肾上腺素受体(β_2 受体)对心肌梗死大鼠心肌细胞钠钙交换电流(I_{NCX})调控作用的信号转导途径。【方法】雄性健康 Wistar 大鼠 30 只, 随机分为正常对照和心肌梗死(MI)组, 制作 MI 模型。采用经典的酶分离心肌细胞方法, 应用全细胞膜片钳技术记录 I_{NCX} , 予以 β_2 受体激动剂 salbutamol、cAMP 激动剂 forskolin、抑制性 cAMP 类似物 Rp-cAMPS、PKA 抑制剂 H89 及 Gi 蛋白抑制剂后记录 I_{NCX} 的变化。【结果】在正常和梗死后 4 周心肌细胞, forskolin 可使 I_{NCX} 电流密度升高 108.9%和 70.3%($P < 0.05$), 抑制性 cAMP 类似物 Rp-cAMPS 可抑制 salbutamol 升高 I_{NCX} 电流密度的作用($P < 0.05$), PTX 能增大 salbutamol 的作用, I_{NCX} 电流密度较单独予以 salbutamol 升高 36.8%和 50.6%($P < 0.05$), H89 可抑制 salbutamol 升高 I_{NCX} 电流密度的作用($P < 0.05$)。【结论】 β_2 受体激动可能通过 Gi-cAMP-PKA 途径参与调节 I_{NCX} 。

关键词: β_2 肾上腺素受体; 心肌梗死; 钠钙交换电流; 信号转导; 全细胞膜片钳技术

中图分类号: R54 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2011)04-0454-04

Signal Transduction Pathway of β_2 -Adrenergic Receptor Regulating I_{NCX} in Myocytes of Infarcted Rats

YANG Hui¹, WU Wei^{2*}, DENG Chun-yu³

(1.Department of Cardiology, Hedong Branch, The First People's Municipal Hospital of Guangzhou 510380, China; 2.Department of Cardiovascular Medicine, The Fifth Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Zhuhai 519000, China; 3.Department of Membrane, The Provincial Hospital of Guangdong, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the signal transduction pathway of β_2 -adrenergic receptor (β_2 -AR) regulating I_{NCX} in myocytes from infarcted rats. 【Methods】 Thirty adult Wistar rats were divided into two groups at random; the control group ($n = 15$) and the post-myocardial infarction (post-MI) group ($n = 15$). The chest of rats were opened and ligature were placed around the left anterior descending coronary artery. Rats in control group were sham-operated without coronary artery ligation. Myocytes were enzymatically disassociated by Langedorff perfusion. Whole cell-patch clamp recording technique was used to record I_{NCX} in specific pipette solution and superfusion according to specific holding potential and command potential program. 【Results】 In the control group and the post-MI group, treatment with forskolin increased inward I_{NCX} in ventricular myocytes by 108.9% and 70.3% ($P < 0.05$), respectively. An inhibitory cAMP analog (Rp-cAMPS) and H89 attenuated the rise of I_{NCX} induced by salbutamol (a selective beta2-AR agonist) ($P < 0.05$); pertussis toxin enlarged the rise of I_{NCX} by 36.8% and 50.6% ($P < 0.05$), respectively. 【Conclusion】 Beta 2-AR might regulate I_{NCX} through the pathway of Gi-cAMP-PKA.

Key words: beta2-adrenergic receptor; I_{NCX} ; signal transduction; myocardial infarction; whole cell patch clamp recording technique

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2011, 32(4):454-457, 526]

收稿日期: 2011-01-19

基金项目: 广东省医学科学技术研究基金(A2007494)

作者简介: 杨蕙, 医学博士, 副主任医师, 主要研究方向为心脏起搏与电生理, E-mail: yangniu03@21cn.com; * 通信作者: 伍卫, E-mail: wu.wei@medmail.com.cn

正常状态下,交感神经激动主要经 β_1 受体传导,但在心力衰竭等病理条件下更依赖于 β_2 受体。交感神经激动可引发心肌细胞内钙超载,可能是通过钠钙交换导致内向电流增高,形成迟发后除极电位(DAD),诱发心室颤动。钠钙交换电流(I_{NCX})是诱发DAD的主要内向电流^[1-2]。因此,如果研究清楚交感兴奋时 β_2 受体激动是如何调控 I_{NCX} 的,将为找到治疗心力衰竭和心肌梗死等病理条件下恶性心律失常的新靶点提供理论依据。目前关于 β_2 受体对 I_{NCX} 调控作用尤其是病理状态下的作用研究罕见报道,对其调控作用的中间信号转导途径的研究更罕见。本实验研究 β_2 受体激动心肌梗死后大鼠心肌细胞 I_{NCX} 调控的信号转导途径。

1 材料与方 法

1.1 实验动物及实验分组

雄性健康 Wistar 大鼠 30 只,体质量 150~200 g,随机分为正常对照组和心肌梗死组。

1.2 主要实验仪器及药物浓度

三维微电极操纵器(Narishige 公司,日本),倒置生物显微镜(Olympas 公司,日本),膜片钳放大器(Axon 公司,Axopatch 200B,美国),AD/DA 转换器(Axon 公司,DigiData1200 美国),Pclamp8.2 软件(Axon 公司,美国)。 β_2 受体激动剂 salbutamol (10 $\mu\text{mol/L}$),cAMP 合成激动剂 forskolin (3 $\mu\text{mol/L}$),抑制性 cAMP 类似物 Rp-cAMPS (100 $\mu\text{mol/L}$),Gi 蛋白抑制剂百日咳毒素 (PTX, 2 $\mu\text{g/mL}$),PKA 抑制剂 H89 (10 $\mu\text{mol/L}$),括号内为心肌细胞悬液中药物终浓度^[3]。

1.3 建立心肌梗死模型

制作大鼠心肌梗死模型,正常对照组进行假手术,动物模型制作详细参见文献^[4]。存活的心肌梗死大鼠饲养 4 周后行心肌细胞分离。

1.4 心肌细胞分离

采用经典的酶分离心肌细胞方法。大鼠断头后取出心脏,套于 Langendorff 灌流装置上,以 Ca^{2+} -free Tyrode solution (成分 mmol/L : NaCl 136, KCl 5.4, MgCl_2 1.0, NaH_2PO_4 0.33, HEPES 10.0, glucose 10.0) 循环灌流 15 min, 温度 37 $^\circ\text{C}$, 连续通体积分数 5% CO_2 +95% O_2 混合气体, pH 7.4。然后用含 I 型胶原酶(0.5 g/L), 牛血清白蛋白(1 g/L)

的 Ca^{2+} -free Tyrode solution 30 mL 循环灌流 30 min, 取左心室组织(心肌梗死组取梗死边缘区心室肌组织)^[5]。

1.5 全细胞膜片钳记录

取细胞悬液加入细胞池中。当电极与细胞膜形成高阻抗封接后,轻轻吸破细胞膜形成全细胞模式。刺激脉冲的产生和信号采集及分析过程由计算机 Pclamp8.2 软件设置和操控。 I_{NCX} 记录:钳制电压 -40 MV, 指令电压从 60 ~ -120 MV, 斜率为 90 MV/s。记录电流后,给予 NiCl_2 5.0 mmol/L , 再记录电流,两者差值即 I_{NCX} 。电极内液成分(mmol/L): Aspartate 70.0, CsCl 40.0, HEPES 10.0, KH_2PO_4 2.5, NaCl 20.0, CaCl_2 1.0, TEA-Cl 20.0, BAPTA 10.0, MgATP 4.0, pH 7.2(用 CsOH 调节)^[6]。细胞外灌流液成分 (mmol/L): NaCl 140.0, CaCl_2 2.5, MgCl_2 1.0, HEPES 5.0, glucose 10, Nicardipine 0.001, Ouabain 0.02, pH 7.4(用 NaOH 调节)^[7]。离子通道电流大小用电流密度表示,即单位细胞面积的电流密度,单位为 pA/pF。 $I-V$ 曲线:以膜电位为 X 轴,电流密度值为 Y 轴,记录各指令电位下的电流密度值的曲线图。

1.6 药物灌流方法

心肌细胞与玻璃微电极封接破膜后,记录给药前的离子通道电流,先给予第一种药物灌流,2 min 后重复记录,然后再给予第二种药物灌流,2 min 后重复记录。药物组合方案包括:①单独以 forskolin 灌流;②先以 salbutamol 灌流,再以 Rp-cAMPS 灌流;③先以 salbutamol 灌流,再以 PTX 灌流;④先以 salbutamol 灌流,再以 H89 灌流。每种方案完成 6 个心肌细胞的记录。

1.7 统计学处理

计量资料以均数 \pm 标准差表示,以 SPSS 11.0 统计软件分析。配对资料比较采用配对 t 检验和单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 cAMP 合成激动剂 forskolin 对心肌细胞 I_{NCX} 的作用

在正常和梗死后 4 周心肌细胞, forskolin 可使最大内向 I_{NCX} 电流密度升高 108.9% 和 70.3% ($P < 0.05$, 表 1; 图 1)。

表 1 Forskolin, Rp-cAMPS, PTX 及 H89 对心肌细胞内向 I_{NCX} 的作用

Group	Blank	For	Sal	Sal+Rp-cAMP	Sal+PTX	Sal+H89	F	P
1 Nor($n = 6$)	0.45 ± 0.06 ¹⁾	0.94 ± 0.11					3.37	< 0.05
1 MI($n = 6$)	0.64 ± 0.15 ¹⁾	1.09 ± 0.29					3.08	< 0.05
2 Nor($n = 6$)	0.48 ± 0.06 ²⁾		0.70 ± 0.14	0.52 ± 0.13 ²⁾			3.51	< 0.05
2 MI($n = 6$)	0.57 ± 0.19 ²⁾		0.93 ± 0.26	0.64 ± 0.15 ²⁾			5.01	> 0.05
3 Nor($n = 6$)	0.51 ± 0.12 ²⁾		0.76 ± 0.16		1.04 ± 0.26 ²⁾		2.25	< 0.05
3 MI($n = 6$)	0.47 ± 0.18 ²⁾		0.81 ± 0.18		1.22 ± 0.36 ²⁾		2.28	< 0.05
4Nor($n = 6$)	0.43 ± 0.10 ²⁾		0.72 ± 0.19			0.47 ± 0.08 ²⁾	2.97	< 0.05
4 MI($n = 6$)	0.56 ± 1.03 ²⁾		0.91 ± 0.17			0.65 ± 0.12 ²⁾	2.67	< 0.05

Nor; normal; MI; myocardial infarction; For; forskolin; Sal; salbutamol; PTX; pertussis toxin; vs For group, 1) $P < 0.05$; vs Sal group, 2) $P < 0.05$

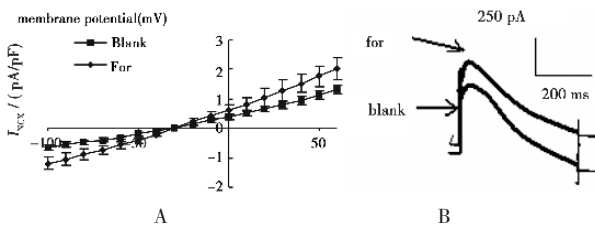


图 1 forskolin 对心肌梗死后心肌细胞 I_{NCX} 作用
Fig.1 The effects of salbutamol on I_{NCX} in infarcted myocytes influenced by forskolin

A: $I - V$ curve; B: I_{NCX}

2.2 抑制性 cAMP 类似物 Rp-cAMPS 对心肌细胞 I_{NCX} 的作用

在正常和梗死后 4 周心肌细胞, salbutamol 可使最大内向 I_{NCX} 电流密度升高 53.5% 和 65.6% ($P < 0.05$), Rp-cAMPS 可抑制 salbutamol 升高内向 I_{NCX} 电流密度的作用 ($P < 0.05$, 表 1; 图 2)。

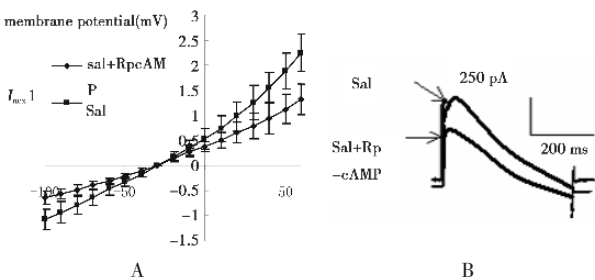


图 2 Rp-cAMPS 对心肌梗死后心肌细胞 I_{NCX} 作用
Fig.2 The effects of salbutamol on I_{NCX} in infarcted myocytes influenced by Rp-cAMPS

A: $I - V$ curve; B: I_{NCX}

2.3 Gi 蛋白抑制剂 PTX 对心肌细胞 I_{NCX} 的作用

在正常和梗死后 4 周心肌细胞, Gi 蛋白抑制

剂 PTX 能增大 salbutamol 升高内向 I_{NCX} 电流密度的作用, 最大内向 I_{NCX} 电流密度较单独给 salbutamol 分别升高 36.8% 和 50.6% ($P < 0.05$, 表 1; 图 3)。

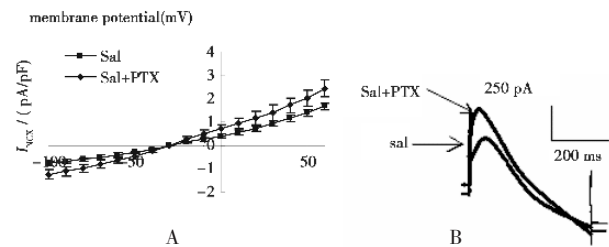


图 3 百日咳毒素对 salbutamol 作用于心肌梗死后心肌细胞 I_{NCX} 的影响

Fig.3 The effects of salbutamol on I_{NCX} in infarcted myocytes influenced by PTX

A: $I - V$ curve; B: I_{NCX}

2.4 PKA 抑制剂 H89 对心肌细胞 I_{NCX} 的作用

在正常和梗死后 4 周心肌细胞, PKA 抑制剂 H89 可抑制 salbutamol 升高内向 I_{NCX} 电流密度的作用 ($P < 0.05$, 表 1; 图 4)。

3 讨论

笔者曾报道了心肌梗死后 β_2 受体激动对 I_{NCX} 的调节作用^[8]。为了进一步研究这种调节作用的中间信号转导途径, 笔者设计了本实验。发现 cAMP 合成激动剂 forskolin 可使最大内向 I_{NCX} 电流密度显著增高, 这说明 cAMP 信号是参与 I_{NCX} 调节的中间信号。 β_2 受体激动剂 salbutamol 可使最大

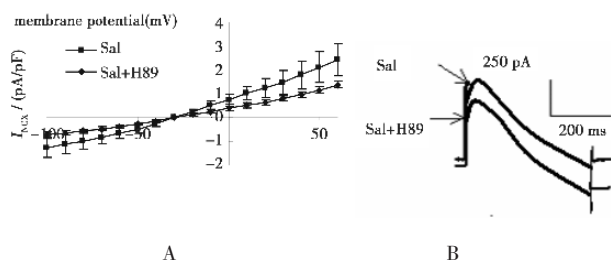


图4 H89对salbutamol作用于心肌梗死后心肌细胞 I_{NCX} 的影响

Fig.4 The effects of salbutamol on I_{NCX} in infarcted myocytes influenced by H89

A: $I-V$ curve; B: I_{NCX}

内向 I_{NCX} 电流密度显著增高,而这种增高作用可以被抑制性cAMP类似物Rp-cAMPS显著抑制,这说明cAMP途径是参与 β_2 受体调节 I_{NCX} 的中间信号转导途径中的一个环节。Nikolaev等^[9]发现成年大鼠心肌细胞中 β_1 受体诱导远程的cAMP信号,而 β_2 受体则诱导局部的cAMP信号,他们近期还发现慢性心肌衰竭大鼠心肌细胞中, β_2 受体发生再分布,可引发广泛的cAMP信号,这改变了cAMP信号的分区,从而可能改变心力衰竭的表型^[10]。既往的研究证实了cAMP信号是 β_2 受体产生效应的转导途径的关键一环,本实验证明 β_2 受体调节 I_{NCX} 也是通过cAMP途径。

本实验同时发现 β_2 受体激动剂salbutamol使最大内向 I_{NCX} 电流密度显著增高的作用可以被PKA抑制剂H89抑制,这说明PKA也是参与 β_2 受体调节 I_{NCX} 的中间信号转导途径中的一环。Daaka等^[11]证实 β_2 受体经由PKA介导与不同G蛋白之间的耦联。Leblais等^[12]发现心肌细胞中 β_2 受体经PKA依赖途径激动PI3K,继而抑制 β_2 受体激动诱发的正性肌力作用。本实验证明 β_2 受体调节 I_{NCX} 也是通过PKA途径。

本世纪初,肖瑞平等^[13]开始对 β_2 受体信号转导途径展开系列研究,发现 β_2 受体同时激动刺激型G蛋白(Gs)和抑制型G蛋白(Gi,又名百日咳毒素敏感蛋白),在特定的亚细胞区域里, β_2 受体/Gs蛋白介导的激动信号可被Gi蛋白消除, β_2 受体/Gs蛋白和 β_2 受体/Gi蛋白介导的激动信号形成一个交互制约和代偿的系统^[14],因而推断如果抑制Gi蛋白, β_2 受体/Gs蛋白介导的激动信号将增高。为了明确 β_2 受体对 I_{NCX} 的调控是否通过Gi蛋白,本实验以PTX抑制Gi蛋白,结果显示 β_2 受

体激动对 I_{NCX} 作用可被PTX放大,说明 β_2 受体对 I_{NCX} 的调控途径中Gi蛋白是一重要靶点。肖瑞平等^[15]也曾发现 β_2 受体/Gi蛋白信号与钠钙交换密切相关。

除了经典的Gs/Gi蛋白,cAMP/PKA途径,也有少量实验对其他信号途径进行了研究,如Pavoine等^[16]曾证实Gi/cPLA2途径可替代Gs/Gi途径介导 β_2 受体激动效应。由本研究的结果推论,心肌梗死后 β_2 受体激动可能通过Gs/Gi-cAMP-PKA途径参与调节 I_{NCX} ,至于其他非经典途径如Gi/cPLA2等是否也参与中间信号转导,尚未着手研究,有待于今后继续做这方面的后续研究。有关 β_2 受体激动对 I_{NCX} 的调节作用及其中间信号转导途径的研究还很少见报道,本实验对此做了初步探讨,有助于为寻找心肌梗死或心力衰竭后抗心律失常药物作用的靶点提供新的思路。

参考文献:

- [1] Desantiago J, Ai X, Islam M, et al. Arrhythmogenic effects of beta2-adrenergic stimulation in the failing heart are attributable to enhanced sarcoplasmic reticulum Ca load[J]. Circ Res, 2008, 102(11): 1389-1397.
- [2] Armondas AA, Hobai IA, Tomaselli GF, et al. Role of sodium-calcium exchanger in modulating the action potential of ventricular myocytes from normal and failing hearts[J]. Circ Res, 2003, 93(1):46-53.
- [3] Andreka P, Aiyar N, Olson LC, et al. Bucindolol displays intrinsic sympathomimetic activity in human myocardium[J]. Circulation, 2002, 105(20):2429-2434.
- [4] 杨蕙,伍卫,方昶,等. 大鼠实验性心肌梗死后 β_2 肾上腺素受体动态变化及其阻滞剂对室颤阈值的作用[J]. 中山大学学报:医学科学版, 2004, 25(2):122-126.
- [5] 杨蕙,伍卫,方昶,等. β_2 肾上腺素受体拮抗剂对大鼠MI后心肌细胞胞浆游离 Ca^{2+} 浓度的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2005, 21(12): 2346-2349.
- [6] 邓春玉,林曙光,吴伟康,等. 缬沙坦对心力衰竭大鼠心肌细胞钙通道和钠-钙交换体电流的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2005, 21(3): 465-469.
- [7] Julio C, Sánchez TP, Henry M, et al. Electrophysiological demonstration of Na^+/Ca^{2+} exchange in bovine articular chondrocytes[J]. Biorheology, 2006, 43(1): 83-94.
- [8] 杨蕙,伍卫,邓春玉,等. 心肌梗死后 β_2 肾上腺素受体对心肌细胞钠钙交换电流的调控作用[J]. 中国心