

高血压与心脏病

DOI:10.11699/cyxb20130822

心力衰竭幼鼠心肌钙调素依赖性蛋白激酶 II 表达
及药物干预研究

吴 瑶, 易岂建, 计晓娟, 蒋坤凤

(重庆医科大学附属儿童医院心脏中心, 重庆 400014)

【摘要】目的:研究缬沙坦对心力衰竭(heart failure, HF)幼鼠心肌内钙调素依赖性蛋白激酶 II (calmodulin-dependent protein kinase II, CaMK II) 表达的影响。**方法:**采用腹主动脉部分缩窄(abdominal aortic constriction, AAC)的方法建立 3 周龄 SD 幼鼠的 HF 模型, 同时设假手术组; 术后 4 周将 HF 鼠随机分为 HF 组和缬沙坦治疗组, 缬沙坦组每日灌胃给药, HF 组和假手术组给予安慰剂; 术后 8 周使用高频超声检测大鼠左心室收缩和舒张末期内径(left ventricular-internal dimension systole, LVIDs; left ventricular-internal diastolic diameter, LVIDd)、左心室收缩和舒张末期容积(left ventricular end-systolic volume, LVESV; left ventricular end diastolic volume, LVEDV)、左心室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)、左心室短轴收缩率(left ventricular fractional shortening, LVFS); 左、右心室重量指数(left ventricular mass index, LVMI; right ventricular mass index, RVMI); Western blot 检测 CaMK II 及其亚型表达情况。**结果:**与假手术组($n=8$)比较, HF 组($n=10$)LVIDs、LVESV 均明显升高($F=21.082, P<0.001$; $F=14.178, P=0.001$), LVEF、LVFS 均明显降低($F=103.766, P<0.001$; $F=62.953, P<0.001$), LVIDd、LVEDV 无明显差异; LVMI 明显增加($F=13.272, P=0.01$); 心室肌细胞内 CaMK II 表达升高 1.95 倍($F=7.541, P=0.026$), CaMK II 亚型($\delta_B+\delta_\gamma$)表达升高 1.93 倍($F=7.042, P=0.029$), CaMK II δ_C 表达升高 1.93 倍($F=6.714, P=0.045$); 经缬沙坦治疗后, 缬沙坦组($n=8$)与假手术组比较, 超声结果(LVIDs、LVIDd、LVESV、LVEDV、LVEF、LVFS)、LVMI 和 CaMK II 表达差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论:**HF 幼鼠心室肌上 CaMK II 表达增高; 缬沙坦改善 HF 心脏收缩功能, 可能与其部分下调心室肌细胞内 CaMK II 的表达有关。

【关键词】缬沙坦; 心力衰竭; 钙调素依赖性蛋白激酶 II; 幼鼠; 心脏功能

【中国图书分类法分类号】R725.4

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-11-07

Expressions of calmodulin-dependent protein kinase II in juvenile rats
with heart failure and the valsartan intervention

WU Yao, YI Qijian, JI Xiaojuan, JIANG Kunfeng

(Heart Center, the Children's Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To explore the effects of valsartan on expressions of calmodulin-dependent protein kinase II (CaMK II) in juvenile rats with heart failure (HF). **Methods:** HF animal model was established by abdominal aortic constriction (AAC) in 3 week-old SD rats while sham operation group was established. Four weeks later, rats with HF were randomly divided into 2 groups: HF group and valsartan treatment group. Rats in valsartan treatment group were given valsartan through direct gastric gavage everyday while those in HF group and sham operation group were given placebos. Eight weeks later, high frequency ultrasound was employed to measure left ventricular-internal dimension systole (LVIDs), left ventricular-internal diastolic diameter (LVIDd), left ventricular end-systolic volume (LVESV), left ventricular end diastolic volume (LVEDV), left ventricular ejection fraction (LVEF), left ventricular fractional shortening (LVFS) of rats. Left and right ventricular mass index (LVMI, RVMI) were calculated. Western blot was applied to detect the expression of CaMK II and subunits. **Results:** Compared with those in sham operation group, LVIDs and LVESV were increased ($F=21.082, P<0.001$; $F=14.178, P=0.001$), LVEF and LVFS were all significantly decreased ($F=103.766, P<0.001$; $F=62.953, P<0.001$), LVMI was increased ($F=13.272, P=0.01$), expressions of CaMK II were increased by 1.95 folds ($F=7.541, P=0.026$), expressions of CaMK II subunits ($\delta_B+\delta_\gamma$) were increased by 1.93 folds ($F=7.042, P=0.029$) and expressions of CaMK II δ_C was increased by 1.93 folds ($F=6.714, P=0.045$) in HF group. After the treatment, no significant difference in LVIDs, LVIDd, LVESV, LVEDV, LVEF, LVFS, LVMI and expressions of CaMK II was found between valsartan treatment group and sham operation group ($P>0.05$). **Conclusions:** Expressions of CaMK II in juvenile rats with HF are increased. Valsartan can improve cardiac contractile function of rats with HF, which may be associated with reduced expressions of CaMK II in ventricular myocytes.

【Key words】valsartan; heart failure; calmodulin-dependent protein kinase II; juvenile rats; heart function

作者介绍: 吴 瑶, Email: yaosmall@foxmail.com,

研究方向: 小儿心血管疾病诊治进展。

通信作者: 易岂建, Email: qiyi2003@yahoo.com.cn。

既往发现心肌细胞肌浆网(sarcoplasmic reticulum, SR)上钙调节紊乱在心力衰竭(heart failure, HF)发展中起着重要作用^[1]。随着对心肌细胞钙调节机制的研究,一种体内广泛分布的丝氨酸-苏氨酸激酶——钙调素依赖性蛋白激酶 II (calmodulin-dependent protein kinase II, CaMK II) 越来越受到人们的关注。CaMK II 的过度激活可导致 L 型钙通道(L-type Ca^{2+} channels, LTCC)、兰尼碱受体(ryanodine receptor, RyR)以及 Ca^{2+} ATP 酶(sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase, SERCA2a)的高度磷酸化,进一步影响心脏功能^[2-3]。CaMK II 具有 α 、 β 、 γ 、 δ 4 种亚型,而在心脏主要表达 CaMK II δ 以及少量的 CaMK II γ ,其中 CaMK II δ_c 分布在细胞质内,而 CaMK II δ_b 和 CaMK II γ 则存在于细胞核^[4-5]。目前, CaMK II 在 RyR 的磷酸化位点作用一直存在争议,其下游锚定蛋白不明;虽然活性氧介导的 CaMK II 活化被发现^[6], CaMK II 与 cGMP 依赖性蛋白激酶在 RyR 上的作用位点有相互作用,但 CaMK II 在 HF 发病中的作用机制远未阐明。本研究通过幼鼠腹主动脉部分缩窄术建立 HF 模型,观察 HF 时 CaMK II 的表达,以及血管紧张素受体拮抗剂(缬沙坦)治疗后的变化。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SD 雄性幼鼠, 36 只, 3 周龄, (80 ± 10) g, 清洁级动物, 由第三军医大学大坪医院实验动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 HF 动物模型的建立及分组 SD 雄性幼鼠, 3 周龄, (80 ± 10) g, 10% 水合氯醛(0.3 ml/100 g)腹腔麻醉后, 手术部位剪毛, 消毒, 作一腹部正中切口, 将肠管向腹腔右侧推开, 用眼科镊小心分离后腹膜, 充分暴露腹主动脉, 仔细分离右肾静脉上方 0.5 cm 处腹主动脉, 将去尖 6 号针头平行于腹主动脉, 传统 4 号手术丝线结扎, 抽出 6 号针头, 关腹。同时建立假手术, 仅分离腹主动脉, 不结扎。术后 3 d 肌注青霉素(8 万 U/只)抗炎治疗。术后第 4 周将行腹主动脉缩窄术的大鼠按体重编号, 根据随机表依次对应编号, 随机数字单数为: (1) HF 组: 灌胃给予安慰剂, 4 周; 随机数字双数为 (2) 治疗组: 缬沙坦 30 mg/(kg·d)^[7-8] 灌胃给药, 治疗 4 周; (3) 假手术组: 灌胃给予安慰剂, 4 周。

1.2.2 术后观察与高频超声检测 术后每日观察幼鼠呼吸、毛色、活动量、体质量等发育情况。术后第 8 周通过超声心动图监测大鼠心功能, 探头频率为 12.5 MHz, 扫描速度 100 mm/s, 取左心室长轴切面和左乳头水平测量 M 型曲线, 连续测 3 个心动周期的左心室舒张末期内径(left ventricular-internal di-

astolic diameter, LVIDd), 左心室收缩末期内径(left ventricular-internal dimension systole, LVIDs), 左心室舒张末期容积(left ventricular end diastolic volume, LVEDV), 左心室收缩末期容积(left ventricular end-systolic volume, LVESV), 左心室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF), 左心室短轴缩短率(left ventricular fractional shortening, LVFS), 取其均值。

1.2.3 心室重量测定 麻醉后, 迅速开胸取出大鼠心脏, 准确称取左心室(包括室间隔)、右心室重量, 并分别计算其与体质量之比。心脏标本置于 -80 °C 冰箱保存。

1.2.4 Western blot 分析 取出保存的左心室心肌组织, 称取约 100 mg 组织, 于液氮中研磨充分后, 加入预冷蛋白裂解液 500 μ l (按全蛋白提取试剂盒说明每 1 ml 冷裂解液(Lysis Buffer)加入 10 μ l 磷酸酶抑制剂, 1 μ l 蛋白酶抑制剂和 5 μ l 100 mmol/L PMSF) 匀浆, 再以 10 000 r/min, 4 °C 离心 5 min 后收集上清液。BCA 法测定蛋白浓度。

采用 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶, 蛋白等量上样, 约 70 μ g, 垂直电泳分离, 半干转膜至 0.22 μ m 聚偏二氟乙烯膜上, 室温封闭 1 h, 用含 3% 牛血清白蛋白的 Tris 酸缓冲盐液(tris-buffered saline and tween, TBST) 稀释 CaMK II 一抗(1:1 000), 冰盒内 4 °C 摇床过夜, TBST 室温下洗膜 10 min × 3 次, 加入辣根过氧化物酶偶联的羊抗兔二抗(1:5 000), 室温下摇床 1 h, TBST 室温下洗膜 10 min × 3 次, 使用加强型 ECL 试剂曝光显色。采用 Quantity One-4.6.2 软件进行泳道/条带轨迹定量, 得到高斯模量(Gause model trace)(INT × mm), 以靶蛋白 Gause model trace/GAPDH Gause model trace 的比值反映靶蛋白的相对水平。

1.3 统计分析

使用 SPSS 19.0 统计软件进行分析。计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。3 组幼鼠心室内径、心室容积、心功能、心室重量指数、CaMK II 及其亚型的表达多组比较采用单因素方差分析, 其两两比较采用 LSD-*t* 法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 一般状态观察

共 36 只幼鼠行腹主动脉缩窄术, 其中 26 只幼鼠存活到实验终点, 死亡率为 28%。缬沙坦组与假手术组无死亡。HF 组大鼠毛色发黄, 易脱毛, 活动量减少, 抓取时挣扎力气小, 饮食少, 体质量较假手术显著减轻($P<0.05$)(表 2)。在实验过程中, HF 组大鼠逐渐出现呼吸急促和劳力性呼吸困难, 腹部膨隆等情况, 死亡的大鼠鼻周可观察到粉红色泡沫, 解剖发现存在胸水, 肺部点状充血, 肺部握雪感以及腹水等体征。

2.2 高频超声检测

术后 8 周, 与假手术组($n=8$)相比, HF 组($n=10$) LVIDs、LVESV 均明显增高($F=21.082, P<0.001; F=14.178, P=0.001$), LVEF, LVFS 均明显降低($F=103.766, P<0.001; F=62.953, P<0.001$), 而 LVIDd, LVEDV 无明显差异; 缬沙坦组($n=8$)与假手术组比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)(表 1、图 1)。

表 1 3 组幼鼠心室内径、心室容积、心功能比较 ($\bar{x} \pm s$)Tab.1 Ventricular diameter, ventricular volume and cardiac function in three group ($\bar{x} \pm s$)

分组	例数 (n)	LVIDd (cm)	LVIDS (cm)	LVEDV (ml)	LVESV (ml)	LVEF (%)	LVFS (%)
缬沙坦组	8	0.56 ± 0.13	0.22 ± 0.10	0.46 ± 0.27	0.04 ± 0.04	92.39 ± 5.51	61.58 ± 10.48
HF 组	10	0.61 ± 0.12	0.39 ± 0.09 ^a	0.58 ± 0.33	0.16 ± 0.12 ^a	72.10 ± 5.02 ^a	36.50 ± 3.95 ^a
假手术组	8	0.54 ± 0.09	0.20 ± 0.07	0.41 ± 0.21	0.03 ± 0.03	93.94 ± 2.95	63.37 ± 6.97
F 值		1.630	21.082	1.604	14.178	103.766	62.953
P 值		0.214	<0.001	0.218	0.001	<0.001	<0.001
P ₁ 值		0.339	0.001	0.397	0.003	<0.001	<0.001
P ₂ 值		0.797	0.652	0.718	0.712	0.512	0.632
P ₃ 值		0.224	<0.001	0.225	0.001	<0.001	<0.001

注:与假手术组比较 a, $P < 0.01$; 缬沙坦组与假手术组比较, $P > 0.05$; 两两比较结果, P_1 值: 缬沙坦组与 HF 组比较; P_2 值: 缬沙坦组与假手术组比较; P_3 值: HF 组与假手术组比较

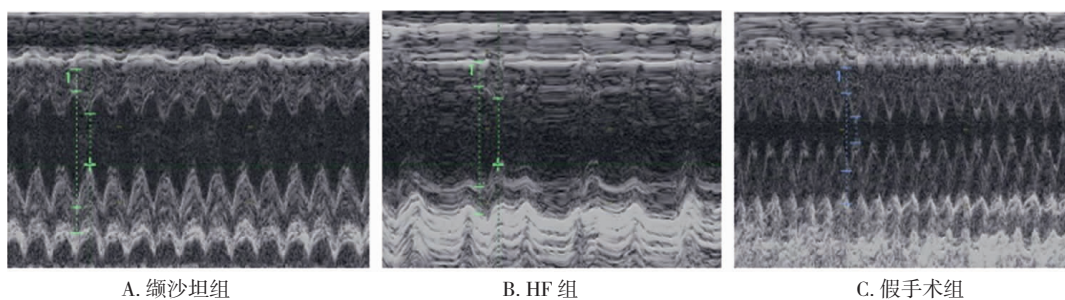


图 1 术后 8 周各组大鼠 M 型超声图

Fig.1 Representative M-mode images of transthoracic echocardiography in rats at 8 weeks after operation

2.3 心室重量指数测量

HF 组左心室重量指数(left ventricular mass index, LVMI)在术后 8 周较缬沙坦组及假手术组显著增加 ($F=13.272$, $P=0.046$; $P=0.001$)。右心室重量指数(right ventricular mass index, RVMI)无明显差异 ($P > 0.05$)。缬沙坦组与假手术组比较, LVMI、RVMI 差异均无统计学意义 (表 2)。

表 2 3 组幼鼠心室重量指数 ($\bar{x} \pm s$)Tab.2 Ventricular mass index in three group ($\bar{x} \pm s$)

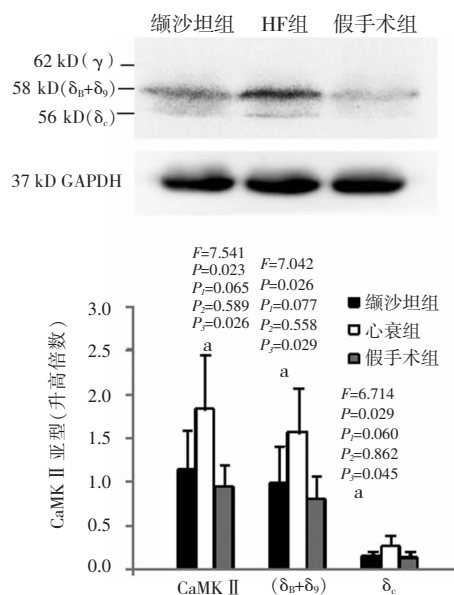
分组	例数 (n)	心室重量 (g)	LVMI (mg/g)	RVMI (mg/g)
缬沙坦组	8	355.89 ± 43.92	1.89 ± 0.19 ^a	0.86 ± 0.15
HF 组	10	350.39 ± 29.42	2.11 ± 0.29	1.04 ± 0.19
假手术组	8	384.31 ± 21.57 ^a	1.73 ± 0.12 ^a	0.92 ± 0.10
F 值		4.588	13.272	3.469
P 值		0.043	0.001	0.075
P ₁ 值		0.726	0.046	0.019
P ₂ 值		0.095	0.166	0.464
P ₃ 值		0.039	0.001	0.094

注:与 HF 组比较, a, $P < 0.05$; 缬沙坦组与假手术组比较, $P > 0.05$; 两两比较结果, P_1 值: 缬沙坦组与 HF 组比较; P_2 值: 缬沙坦组与假手术组比较; P_3 值: HF 组与假手术组比较

2.4 Western blot 检测 CaMK II 及其亚型表达

心衰组心室内总 CaMK II、CaMK II 亚型 ($\delta_B + \delta_\gamma$)、 δ_C 表达较假手术组分别升高 1.95、1.93、1.93 倍 ($F=7.541$, $P=0.026$;

$F=7.042$, $P=0.029$; $F=6.714$, $P=0.045$)。缬沙坦组与假手术组相比, CaMK II 表达差异没有统计学意义 ($P > 0.05$) (图 2)。



a, 与假手术组比较 $P < 0.05$ ($n=4$)。两两比较结果, P_1 值: 缬沙坦组与 HF 组比较; P_2 值: 缬沙坦组与假手术组比较; P_3 值: HF 组与假手术组比较

图 2 Western blot 检测各组幼鼠心室肌细胞内 CaMK II 及其亚型的表达

Fig.2 Expressions of CaMK II and its subunits in ventricular myocytes in three groups measured by Western blot

3 讨论

心肌收缩时少量的钙流通过LTCC进入心肌细胞内,通过触发肌浆网(sarcoplasmic reticulum,SR)上的RyR释放大量的钙离子。释放的钙离子结合肌丝上的肌钙蛋白C引起心肌收缩。在舒张期心肌通过SR上的SERCA2a和跨细胞膜的钠钙交换体($\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ exchange, NCX)回收细胞质中的钙离子。已有研究证明,蛋白激酶A通路和CaMK II通路在调节心肌细胞钙循环局部磷酸化反应上起着重要的作用^[2]。

CaMK II通过磷酸化作用的介导LTCC和RyR的激活在正常的心肌兴奋收缩偶联中非常重要。当心肌受到动作电位的刺激,钙离子进入细胞内与钙调素结合,启动钙调素结合到CaMK II调节区上,引起CaMK II构象改变而活化,然后,作用于LTCC、RyR、SERCA2和受磷蛋白(phospholamban, PLN)调节心肌钙循环^[3]。

研究发现,心肌细胞CaMK II的过度激活导致LTCC、RyR以及SERCA/PLN的高度磷酸化,也将影响心脏功能^[9]。因为过度磷酸化的LTCC使进入细胞内的钙离子增多,易导致早期后除极(发生在动作电位的2、3期)的概率增多;SR的过度磷酸化使SR内储存的钙耗竭,导致细胞内钙瞬变的功能受到损害,进一步导致心肌的收缩和舒张功能受损;而且SR过度磷酸化导致的钙漏使通过NCX进入细胞内的净钠流增多,增加了晚期后除极(发生在动作电位的复极化)的发生概率;PLN的过度磷酸化后,对SERCA2a抑制作用消失,细胞内的钙离子被回吸收。而HF临床及动物实验采用药物或者基因敲除的方法抑制CaMK II的可防治心律失常、心肌肥大、提高心脏的射血功能、抗心肌细胞凋亡和纤维化^[10]。

本实验结果显示,HF组幼鼠LVIDs、LVESV升高,LVEF、LVFS降低,LVMI增加,而CaMK II过表达,提示HF组幼鼠心脏扩大,心功能下降,发生心肌重构,其机制可能与CaMK II过表达后钙循环紊乱有关。CaMK II亚型($\delta_B+\delta_9$), δ_C 主要在该激酶活化早期首先表达,CaMK II γ 主要在活化晚期有表达,因此, ($\delta_B+\delta_9$)和 δ_C 过表达,提示该亚型可能在HF早期有重要作用。而CaMK II γ 表达量低,组间未发现明显差异,其在HF发展后期是否有所改变需要通过进一步的实验研究。

已知HF时肾素-血管紧张素-醛固酮系统呈过度激活。血管紧张素受体拮抗剂类药物,通过阻断血管紧张素 II 与血管紧张素受体 1 的结合而起到降压保护靶器官的作用。本实验结果显示,缬沙坦能有效抑制心肌细胞的增生和肥大,阻断心室重构的发生,恢复心功能。推测缬沙坦可能通过阻断高浓度的血管紧张素 II 对心肌上CaMK II通路的过度激活,抑制心肌CaMK II的过表达,从而恢复心肌细胞的正常钙调控。

参考文献

- [1] Ikeda Y, Hoshijima M, Chien K R. Toward biologically targeted therapy of calcium cycling defects in heart failure[J]. Physiology (Bethesda), 2008, 23: 6-16.
- [2] Couchonnal LF, Anderson M E. The role of calmodulin kinase II in myocardial physiology and disease[J]. Physiology (Bethesda), 2008, 23: 151-159.
- [3] Anderson M E. CaMK II and a failing strategy for growth in heart[J]. J Clin Invest, 2009, 119(5): 1082-1085.
- [4] Zhang T, Maier L S, Dalton N D, et al. The δ_C isoform of CaMK II is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure[J]. Circ Res, 2003, 92(8): 912-919.
- [5] Zhu W, Woo A Y, Yang D, et al. Activation of CaMK II δ_C is a common intermediate of diverse death stimuli-induced heart muscle cell apoptosis[J]. J Biol Chem, 2007, 282(14): 10833-10839.
- [6] He B J, Joiner M L, Singh M V, et al. Oxidation of CaMK II determines the cardiotoxic effects of aldosterone[J]. Nat Med, 2011, 17(12): 1610-1618.
- [7] 米青, 易岂建, 李荣, 等. 缬沙坦对心力衰竭幼鼠心功能及肌浆网 Ca^{2+} ATP 酶活性的影响[J]. 重庆医科大学学报, 2008, 33(12): 1450-1453.
- [8] Mi Q, Yi Q J, Li R, et al. Effect of valsartan on heart function and activity of myocardial sarcoplasm Ca^{2+} -ATPase in junior rat with heart failure[J]. Journal of Chongqing Medical University, 2008, 33(12): 1450-1453.
- [9] Kim S, Yoshiyama M, Izumi Y, et al. Effects of combination of ACE inhibitor and angiotensin receptor blocker on cardiac remodeling, cardiac function, and survival in rat heart failure[J]. Circulation, 2001, 103(1): 148-154.
- [10] Li B, Dedman J R, Kaetzel M A. Nuclear Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II in the murine heart[J]. Biochim Biophys Acta, 2006, 1763(11): 1275-1281.
- [11] Ai X, Curran J W, Shannon T R, et al. Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} leak in heart failure[J]. Circ Res, 2005, 97(12): 1314-1322.

(责任编辑:冉明会)