

M₃ 受体激动剂对慢性心衰大鼠心肌 I_{Ca-L} 及 [Ca²⁺]_i 的影响

栾海蓉, 孙 健, 王得利, 吴 红, 董 琦

摘要 目的 研究 M₃ 受体激动剂胆碱 (choline) 对慢性心力衰竭 (CHF) 大鼠心肌的保护作用及可能的机制。方法 CHF 大鼠 II 型胶原酶消化分离单个心肌细胞, 全细胞膜片钳技术记录 L-型钙电流 (I_{Ca-L}) 变化; 激光扫描共聚焦技术观测细胞内钙 ([Ca²⁺]_i) 变化。结果 膜片钳实验结果显示, 与 CHF 组比较, choline 组 I_{Ca-L} 电流密度明显增高 (n = 6, P < 0.01); 预敷 U73122 后加入 choline, 与 choline 组比较, I_{Ca-L} 电流密度明显下降 (n = 6, P < 0.01)。共聚焦实验结果显示, 与 CHF 组比较, choline 组 [Ca²⁺]_i 明显升高 (n = 80, P < 0.01); 与 choline 组比较, U73122 与 choline 共同孵育组 [Ca²⁺]_i 升高幅度不明显 (n = 80, P < 0.01)。预先给予 4-DAMP 可部分逆转 choline 升高 I_{Ca-L} 及 [Ca²⁺]_i 的作用。结论 M₃ 受体对 CHF 大鼠的心肌保护作用可能是通过 Gq/11-PLC 途径开放 L-型钙通道, 促进 Ca²⁺ 内流, 使 [Ca²⁺]_i 增加。

关键词 胆碱; U73122; 4-DAMP; L-型钙电流; 膜片钳; 激光扫描共聚焦

中图分类号 R 331.31

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2015)10-1422-04

慢性心力衰竭 (chronic heart failure, CHF) 是由于慢性心脏病变或血流动力学负荷过重, 引起心肌损伤, 导致心室泵血或充盈功能低下的心肌疾病^[1]。细胞 L-型钙通道功能异常是导致心衰因素之一^[2], 即造成肌浆网内 Ca²⁺ 减少, 兴奋-收缩耦联过程中所需要的 Ca²⁺ 减少, 心肌收缩力降低, 最终导致心力衰竭。心脏 M₃ 受体通过介导钾电流 (I_{KM3}), 改善细胞间电信号传导, 对抗心肌缺血、减

少细胞凋亡、改善心脏功能, 在众多心脏疾病的发生发展中发挥重要的作用。研究^[3-5]显示, 病理状态下, 心肌 M₃ 受体功能性表达明显增加, 激动 M₃ 受体可能具有抗 CHF 作用。该实验运用膜片钳和激光扫描共聚焦方法探讨 M₃ 受体激动剂胆碱 (choline) 对 CHF 大鼠心肌 L-型钙电流 (I_{Ca-L}) 及细胞内钙 ([Ca²⁺]_i) 的影响及可能的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 清洁级 Wistar 大鼠, 雄性, 体重 250 ~ 300 g, 由哈尔滨医科大学公共卫生学院提供, 于屏障环境中进行饲养和实验。

1.2 药品和试剂 U73122、羟乙基哌嗪乙磺酸 (HEPES)、乙二醇四乙酸酯 (EGTA)、胶原酶 II、牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA)、咖啡因、choline 和 M₃ 受体特异性阻断剂 (4-DAMP) 等均购自美国 Sigma 公司; Fluo-3/AM、F-127 购自美国 Invitrogen 公司; DMSO、台氏液及 KB (Krebs buffer) 液试剂等均为国产分析纯。

1.3 主要仪器 BL-420E 生物机能实验系统购自成都泰盟科技公司; 膜片钳放大器 (Axopatch 200B)、膜片钳数模转换器 (Digidata 1322) 购自美国 Axon 公司; 倒置显微镜 (TE 2000-U) 购自日本 Nikon 公司; 三维液压推进器 (MHW-3) 购自日本 Narishige 公司; 气压减震台购自美国 TMC 公司; 温度控制仪 (NBD TC2bip) 购自美国 Cell Micro Controls 公司; 微电极拉制仪 (PP-830) 购自日本 Narishige 公司; FV-300 激光扫描共聚焦显微镜购自日本 Olympus 公司。

1.4 溶液 台式液 (mmol/L): NaCl 126, KCl 5.4, MgCl₂ 1, CaCl₂ 1.8, NaH₂PO₄ 0.33, 葡萄糖 10, HEPES 10, 用 NaOH 调至 pH = 7.4。无钙台氏液除没有 CaCl₂ 之外, 还需加入含 2.0 mmol/L EGTA, 其

2015-05-14 接收

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (编号: 81300163); 黑龙江省教育厅科研课题 (编号: 12531731)

作者单位: 牡丹江医学院机能学教研室, 牡丹江 157011

作者简介: 栾海蓉, 女, 讲师, 硕士;

孙 健, 女, 讲师, 博士, 责任作者, E-mail: mdjsunjian@126.com

cated that the expression of HDAC2 was upregulated after SNI and downregulated after CQ injection. **Conclusion** Pain can suppress the transmitting of itching signal, and differential expression of HDAC2 contributes to co-regulation of pain and itching in spinal cord.

Key words spinal cord; sodium valproate; neuropathic pain; itch; chloroquine

余成分与台氏液相同。KB 液 (mmol/L): 谷氨酸 70, 牛磺酸 15, KCl 30, KH_2PO_4 10, MgCl_2 0.5, EGTA 0.5, HEPES 10, 葡萄糖 10, 用 KOH 调至 $\text{pH} = 7.3 \sim 7.4$ 。测钙外液 (mmol/L): Tris-Cl 136, CsCl 5.4, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1, $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2, NaH_2PO_4 40.33, 葡萄糖 10, HEPES 10, 用 Tris-OH 调至 $\text{pH} = 7.4$ 。电极液 (mmol/L): CsCl 20, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1, MgATP 5, EGTA 10, CsOH 110, 天冬氨酸 110, 用 CsOH 调至 $\text{pH} = 7.2$ 。

1.5 CHF 模型的建立^[6] 大鼠称重后腹腔麻醉。进胸腔, 在右心室流出道与左心房之间距主动脉根部 2~3 mm 处, 丝线穿过左冠状动脉主干, 连同一小束心肌一起结扎, 以缝线下方心肌色泽变浅、变苍白, 同时心电监护肢导 R 波振幅明显升高, 随后 I、AVL 导联 ST 段明显升高为结扎成功。术后 8 周, 行左冠状动脉结扎大鼠进行血流动力学检测。以左心室舒张末压 ≥ 2 kPa 判断 CHF 模型构建成功。

1.6 CHF 大鼠心肌细胞急性分离 大鼠麻醉后迅速开胸取出心脏, 置于预冷的 4℃ 台式液中。快速游离主动脉并逆行插管连接于 Langendorff 灌流装置上。先用正常台氏液以约 8 ml/min 的速度连续灌流约 3~5 min, 心脏复跳后洗去心脏内残血。然后换用无钙台氏液以 12 ml/min 速度灌流约 20 min 至心脏停止搏动后, 换用含胶原酶 II 和 BSA 的无钙台氏液继续灌流消化胶原组织以获得单个心肌细胞。当心脏变软、色泽变浅时, 开始剪取少量心肌组织, 每隔 2 min 剪取 1 次。将不同时间剪下的心肌组织置于装有 KB 液的试管中, 用吸管轻轻吹打, 使单个心肌细胞从组织块上分离下来。去除残余的大块组织后置于 KB 液中放到 4℃ 冰箱稳定 1 h 待用。所有液体使用前, 用 95% O_2 + 5% CO_2 饱和, 用于灌流液体的温度应始终控制在 $(37 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 。

1.7 全细胞膜片钳电生理记录^[7-8] 应用全细胞膜片钳技术记录单细胞离子电流。将分离好的单细胞置于浴槽中, 待贴底壁后, 用测钙外液以 5 ml/min 恒速灌流冲洗细胞至表面清洁, 选择静止、杆状、横纹清晰、折光性良好的单个心肌细胞进行封接实验。微电极充灌电极液后接触细胞并给于负压使电极尖端和细胞膜间形成高阻封接 (>10 G Ω) 后用脉冲式负压抽吸破膜, 形成全细胞构型, 用电压钳模式下进行刺激和记录。在浴槽中加入相应药品, 并记录给药 3 min 后的电流。电极液和细胞外液之间的液接

电位 ($10 \sim 11$ mV) 形成全细胞构型前归零。数据采集前进行膜电容和串联电阻补偿, 信号输入经过 1 000 Hz 的滤波, 数据存于计算机硬盘以便分析。

1.8 心肌细胞内钙测定 细胞稳定好后, 取镜下观察多数为杆状且横纹清晰无颗粒的细胞用于实验, 先弃去负载液, 用含有 100 mg/L BSA 的正常台氏液预敷, 然后放在 37℃ 恒温箱中用终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ Fluo-3 /AM 染色 30 min, 离心去除染色液后, 用有钙液稀释至所需的浓度 (10 倍物镜视野中 30~40 个细胞) 后待用。取染好色的细胞置于浴槽中, 静置贴壁 5 min 后, 选取杆状、横纹清晰无颗粒的细胞进行实验。在激发波长为 488 nm, 发射波长为 526 nm, 在 Time series 程序下对细胞 XY 平面进行扫描, 间隔时间为 10 s, 共扫描 30 次, 于扫描获得基础值后于第 2 次和第 3 次扫描间隙之间加入 30 mmol/L 的 KCl。给药组孵育 10 min 后加 KCl (30 mmol/L); 对照组细胞直接加 KCl (30 mmol/L)。计算细胞 XY 平面内平均荧光强度 (F_i), 以 F_i 代表 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 。以 F_{max} (给药后最高荧光强度) 与 F_0 (给药前荧光强度) 的比值代表 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的荧光强度变化。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析, 两样本均数比较采用 t 检验。应用 SigmaPlot 进行统计作图。

2 结果

2.1 choline 和 U73122 对 CHF 大鼠心室肌细胞 $I_{\text{Ca-L}}$ 的作用比较 在形成全细胞封接状态后, 将细胞钳制在 -40 mV, 以去除钠电流的影响。测钙内外液均含 CsCl, K^+ 被 Cs^+ 所取代, 以阻断钾电流。命令电位从 -30 mV ~ +50 mV, 以 10 mV 为步阶, 波宽为 300 ms, 此时可记录到内向钙电流。choline 组 (0.5 mmol/L) $I_{\text{Ca-L}}$ 电流密度 (-8.06 ± 0.59) pA/pF 较 CHF 组 (-4.86 ± 0.57) pA/pF 明显升高 ($P < 0.01$)。给予 choline 前预敷 M_3 受体阻断剂 4-DAMP (3 nmol/L), $I_{\text{Ca-L}}$ 电流密度降至 (-5.80 ± 0.65) pA/pF, 与 choline 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。而给予 choline 前预敷 U73122 (3 $\mu\text{mol/L}$), 电流密度则降至 (-6.33 ± 0.53) pA/pF, 与 choline 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。各组间峰值比较, 差异有统计学意义 ($F = 194.448$,

$P < 0.01$)。见图 1。

2.2 choline 对 CHF 大鼠心室肌细胞钙库的影响

利用激光扫描共聚焦技术观察 choline 对 CHF 大鼠心室肌细胞钙库的影响。在无钙液中, 给予 choline (0.5 mmol/L) 后, 钙 $F_{\max}/F_0$ 升至 (3.87 ± 0.32) ($n = 70$), 提示 choline 能在去除外钙的条件下引起 CHF 大鼠心室肌细胞内钙库释放。

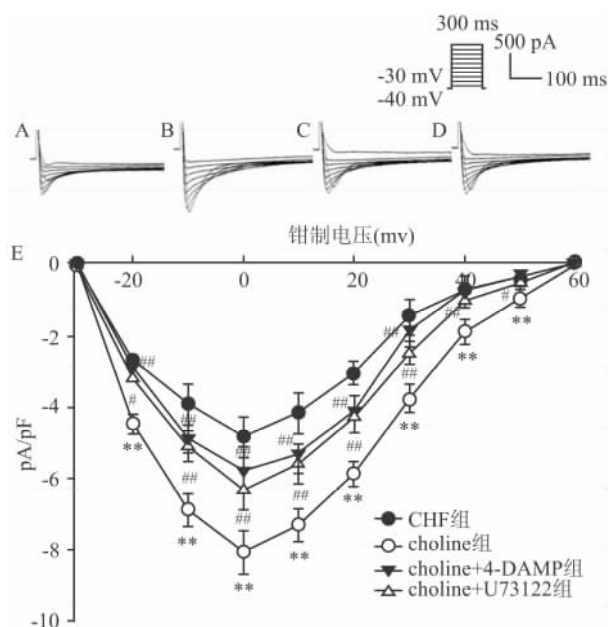


图1 choline 和 U73122 对 CHF 大鼠心室肌细胞钙电流的影响 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

A: CHF 组; B: choline 组; C: choline + 4-DAMP 组; D: choline + U73122 组; E: 各组心室肌细胞 I_{Ca-L} 比较; 与 CHF 组比较: $**P < 0.01$; 与 choline 组比较: $^{\#}P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$

2.3 choline 和 U73122 对 CHF 大鼠心室肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响

正常情况下, 加入 30 mmol/L KCl 后, 细胞内钙 $F_{\max}/F_0$ 为 (5.13 ± 0.21) 。与对照组比较, CHF 组钙 $F_{\max}/F_0$ 明显降低至 (3.95 ± 0.53) , 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。与 CHF 组比较, choline 组 $[Ca^{2+}]_i$ 明显升高, $F_{\max}/F_0$ 为 (6.39 ± 0.62) , 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。与 choline 组比较, U73122 与 choline 共同孵育后, $F_{\max}/F_0$ 降至 (3.85 ± 0.56) , 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。预先给予 4-DAMP 可部分逆转 choline 升高 $[Ca^{2+}]_i$ 的作用, 与 choline 组比较, $F_{\max}/F_0$ 为 (3.88 ± 0.38) , 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。U73122 组与 U73122 + choline 共同作用组差异无统计学意义。见图 2。各组间差异有统计学意义 ($F = 72.8138, P < 0.01$)。

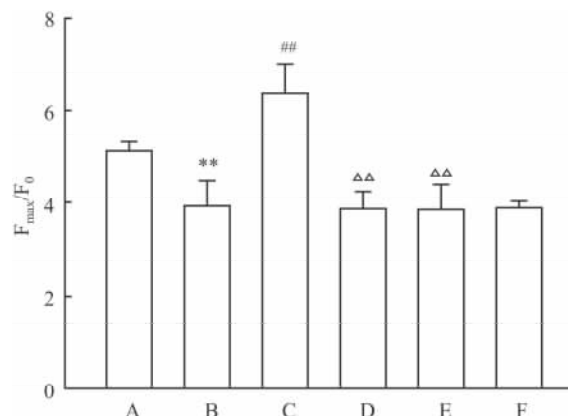


图2 choline 和 U73122 对 CHF 大鼠心室肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响 ($n = 80, \bar{x} \pm s$)

A: 对照组; B: CHF 组; C: choline 组; D: choline + 4-DAMP 组; E: choline + U73122 组; F: U73122 组; 与对照组比较: $**P < 0.01$; 与 CHF 组比较: $^{##}P < 0.01$; 与 choline 组比较: $^{\Delta\Delta}P < 0.01$

3 讨论

本研究结果表明, choline 能明显增加 CHF 大鼠心室肌细胞 I_{Ca-L} 及 $[Ca^{2+}]_i$, M_3 受体阻断剂 4-DAMP 可部分逆转 choline 的作用, 提示激动 M_3 受体可以增加外钙内流, 从而升高心肌细胞胞内钙水平。

L-型钙通道表达下调所致心肌兴奋-收缩耦联的异常是导致心衰的原因之一。 M_3 受体为 G 蛋白偶联受体, 通过 Gq/11 激活磷脂酶 C (phospholipase C, PLC), 使膜结合的 4,5-二磷酸肌醇水解为 1,3,4-三磷酸肌醇 (inositol 1,4,5-trisphosphate, IP_3) 和二酰甘油 (diacylglycerol, DAG)。 IP_3 和 DAG 作为细胞内第二信使, 分别激活 IP_3/Ca^{2+} 和 DAG/蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 两个信号转导途径, 从而开放钙离子通道, 促进内钙释放, 使细胞内钙增加。本研究显示, PLC 抑制剂 U73122 可以逆转 choline 增加 I_{Ca-L} 及升高 $[Ca^{2+}]_i$ 的作用, 提示 M_3 受体可能通过 Gq/11-PLC 途径调控 L-型钙通道, 使钙离子通道开放, 细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 增高, 肌浆网内的 Ca^{2+} 容量增多, 兴奋-收缩耦联过程中所需的 Ca^{2+} 增加, 心肌收缩力增加, 从而起到对 CHF 大鼠的心肌保护作用。

研究^[9]显示, M_3 受体介导 I_{KM_3} 间接影响细胞内 Ca^{2+} , 使其内流减少, 还能直接抑制 L-型钙通道^[10], 两者作用结果均使得细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 降低。 M_3 受体此作用可以使得心肌收缩力减弱, 减少心肌耗氧, 降低心律失常发生率, 对缺血性心肌产生保护作用。

本研究显示, M_3 受体还可以通过 Gq/11-PLC 途径开放 L-型钙通道, 促进 Ca^{2+} 内流, 使细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 增加, 与之前作用结果相反。 M_3 受体此作用可以增加心肌收缩力, 对抗长期缺血低氧所造成的 CHF。可见, 在不同病理状态下, M_3 受体对心肌 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响可能不同, 发挥的保护机制也不相同。

本研究结果与之前研究存在较大差异, 原因在于: ① Gq/11-PLC 通路与其他信号传导通路可能存在交互作用, 目前的研究未考虑其它的交互因素, 可能是多条通路共同参与调控的综合结果, 也可能某种通路起主导作用, 掩盖或抑制了其他通路的作用; ② 体外实验不能完全模仿体内环境, 体内所处的环境较为复杂, 心衰细胞可能会受到多种因素调控和影响(如神经、体液因素的干扰), 而这些因素也能对其进行间接的调控。

在今后的研究中, 需要进一步阐明在各种因素交互作用下, M_3 受体对 CHF 细胞的保护作用, Gq/11-PLC 信号转导通路与其他通路之间的对话也是未来研究的重点, 阐明其调节作用的关键环节和主要交互影响因素。预期将有针对性地对慢性疾病发生发展使用 M_3 受体相关药物干预给予指导, 发现和验证新的药物作用靶点和可能的作用途径, 并为心血管疾病的防治开拓新思路 and 提供理论依据。

参考文献

[1] Aleksandrova E B. Chronic heart failure in patients with arterial

hypertension and ischemic heart disease: age and gender characteristics [J]. *Kardiologia*, 2013, 53(7): 40-4.

[2] Okuda S, Yano M. Excitation-contraction coupling and intracellular calcium cycling in failing hearts [J]. *Clin Calcium*, 2013, 23(4): 471-80.

[3] Shi H, Wang H, Li D, et al. Differential alterations of receptor densities of three muscarinic acetylcholine receptor subtypes and current densities of the corresponding K^+ channels in canine atria with atrial fibrillation induced by experimental congestive heart failure [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2004, 14(1-2): 31-40.

[4] Willmy-Matthes P, Leineweber K, Wangemann T, et al. Existence of functional M_3 -muscarinic receptors in the human heart [J]. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 2003, 368(4): 316-9.

[5] Giessler C, Wangemann T, Zerkowski H R, et al. Age-dependent decrease in the negative inotropic effect of carbachol on isolated human right atrium [J]. *Eur J Pharmacol*, 1998, 357(2-3): 199-202.

[6] 王 靓, 侯晓燕, 黄金玲, 等. 苓桂术甘汤对慢性心衰模型大鼠心肌组织 TNF- α 及血清 NF- κ B 和 IL-1 β 的影响 [J]. *中草药*, 2013, 44(5): 586-9.

[7] 李映新, 黄媛恒, 林 兴, 等. 昆明小鼠心室肌细胞分离方法及动作电位、L-型钙通道电流记录 [J]. *中国现代应用药学*, 2013, 30(6): 581-6.

[8] 魏 伟, 吴希美, 李元建. 药理学实验方法学 [M]. 4 版. 人民卫生出版社, 2011: 973-5.

[9] 岳 朋, 吕延杰, 杨宝峰. 心脏 M_3 受体作为抗心律失常药物新靶点研究的进展 [J]. *药学报*, 2006, 41(8): 702-5.

[10] 栾海蓉, 庞晓平, 周宇宏, 等. M_3 受体激动剂对豚鼠心室肌细胞 L-型钙通道的影响 [J]. *中国药理学通报*, 2009, 25(5): 573-6.

Effect of M_3 R agonist on I_{Ca-L} and $[Ca^{2+}]_i$ in myocardium of chronic heart failure rats

Luan Hairong, Sun Jian, Wang Deli, et al

(Dept of Functional Medicine, Mudanjiang Medical College, Mudanjiang 157011)

Abstract Objective To investigate the protective effects of choline on I_{Ca-L} and $[Ca^{2+}]_i$ in myocardium from rats with chronic heart failure. **Methods** The single ventricular myocytes were isolated by use of collagenase type II, I_{Ca-L} was recorded by whole-cell patch clamp technique; $[Ca^{2+}]_i$ was detected by laser scanning confocal microscope in ventricular myocytes. **Results** The normalized peak currents of I_{Ca-L} in ventricular myocytes were elevated by choline group compared with those in CHF group, which could be neutralized by U73122 and partly reverted by 4-DAMP. The $[Ca^{2+}]_i$ induced by KCl in ventricular myocytes were significantly increased by choline group, which could be suppressed by U73122 and also partly reverted by 4-DAMP. **Conclusions** The possible mechanism of protection of M_3 receptor involved in the protection of CHF rats is due to the open L type calcium channel, increased $[Ca^{2+}]_i$ via activation of Gq/11-PLC signal pathway.

Key words choline; U73122; 4-DAMP; I_{Ca-L} ; patch-clamp technique; laser scanning confocal microscope