

· 基础研究 ·

次乌头碱对心肌细胞 Ca^{2+} 调控蛋白 mRNA 表达的影响*李志勇¹, 谭鹏², 赵晖³, 李飞², 孙建宁^{2△}

(1. 中央民族大学中国少数民族传统医学研究院, 北京 100081; 2. 北京中医药大学中药学院, 北京 100012; 3. 首都医科大学中医药学院, 北京 100069)

摘要:目的 考察次乌头碱(HA)对原代培养乳大鼠心肌细胞 L-钙通道、钙调蛋白(CaM)、肌质网雷诺定受体(RyR₂) mRNA 表达的影响。方法 体外培养乳大鼠心肌细胞,采用 RT-PCR 法测定 L-钙通道 $\alpha 1C$ 亚基、CaM 及 RyR₂ mRNA 的表达。结果 HA 作用 15 min 时,60、120 $\mu M/L$ 能提高心肌细胞膜 L-钙 $\alpha 1C$ mRNA 的表达($P < 0.05$);30、60、120 $\mu M/L$ 能使 CaM mRNA 的表达增高($P < 0.01$);60、120 $\mu M/L$ 能提高 RyR₂ mRNA 表达($P < 0.05$);60 $\mu M/L$ 作用心肌细胞 5 min 时引发 L-钙通道 $\alpha 1C$ mRNA 表达增多($P < 0.05$);30、60 $\mu M/L$ 作用 15、60 min 时可引起 CaM mRNA 表达增多($P < 0.01$)。结论 HA($\geq 60 \mu M/L$) 可通过增加心肌细胞 L-钙通道、CaM、RyR₂ mRNA 的表达,参与细胞内钙超载及心律失常的发生过程,在乌头类天然药物中毒时干预上述靶点基因改变可缓解中毒性心律失常的发生。

关键词:次乌头碱;心肌细胞;钙调控蛋白

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.25.022

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)25-2546-03

Effects of hyaconitine on expression of mRNA of calcium regulated proteins in myocardial cells*

Li Zhiyong¹, Tan Peng², Zhao Hui³, Li Fei², Sun Jianning^{2△}

(1 China Minority Traditional Medical Center of Minzu University of China, Beijing 100081 China; 2. School of Chinese Pharmacy of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102 China; 3. School of TCM of Capital Medical University, Beijing 100069, China)

Abstract: Objective To observe the effects of Hyaconitine(HA) on mRNA expression of calcium regulated proteins such as L-type calcium channel $\alpha 1C$, calmodulin(CaM) and RyR₂ in myocardial cells. **Methods** Primary neonatal rat myocardial cells were generated and cultured. L-type calcium channel $\alpha 1C$, CaM and RyR₂ mRNA were measured by transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) respectively. **Results** After co-incubating with HA for 15 min, 60, 120 $\mu M/L$ HA can improve the expression of L-type calcium channel $\alpha 1C$ mRNA in myocardial cells ($P < 0.05$), 30, 60, 120 $\mu M/L$ HA also can increase CaM mRNA in myocardial cells ($P < 0.01$), 60, 120 $\mu M/L$ HA increased the expression of RyR₂ mRNA in myocardial cells ($P < 0.05$). After co-incubation with HA for 5, 15, 60 min, 60 $\mu M/L$ HA increased the expression of L-type calcium channel $\alpha 1C$ mRNA of myocardial cells in 5 min ($P < 0.05$). The expression of CaM mRNA of myocardial cells were increased after co-incubating with 30, 60 $\mu M/L$ HA for 15, 60 min ($P < 0.01$). **Conclusion** HA($\geq 60 \mu M/L$) can induce the calcium overload in myocardial cells, which will result in arrhythmia. This action maybe relates to the increasing expression of L-type calcium channel $\alpha 1C$, CaM and RyR₂ mRNA of myocardial cells caused by HA. The clinical toxic arrhythmias can be relieved through interfering these target genes when toxic reaction happens.

Key words: hyaconitine; myocardial cells; calcium regulated proteins

含有乌头碱、中乌头碱、次乌头碱(hyaconitine, HA)等生物碱的天然药物主要包括附子、川乌、草乌、雪上一枝蒿等药材,因含有上述毒性成分在临床应用中极易发生中毒,损伤机体神经系统与心血管系统,最突出的体征为心律失常^[1-4]。有研究显示,HA 在附子炮制品及中成药中都有存在^[5-8],且附子的毒-效表达与乌头碱、中乌头碱、HA 在炮制过程中的差异配比存在相关性^[9],HA 在正常大鼠及离体心脏、原代培养乳鼠心肌细胞上都能引发严重心律失常^[10-11]。现将 HA 对心肌细胞 L-钙通道 $\alpha 1C$ 亚基、细胞内钙调蛋白(CaM)及肌质网上雷诺定受体(RyR₂) mRNA 表达的影响报道如下。

1 材料与方

1.1 动物与药品 3 d 乳大鼠(北京维通利华实验动物技术有限公司)雌雄不拘,动物许可证号:SCXK(京)2002-0003。HA:(中国食品药品检定研究院),批号:200404,纯度大于或

等于 98%,用二甲基亚砜(DMSO)溶解,制成贮备液。

1.2 试剂与仪器 达氏修正依氏培养基/F12 (DMEM/F12) 购自美国 sigma 公司,批号 086K83521;胰蛋白酶、胶原酶 II 型(Co II)、四噻唑兰(MTT)、乙二胺四乙酸二钠(EDTA Na₂) 购自美国 Amresco 公司;5-溴-2-脱氧尿核苷购自 BrdU, Roche 公司;胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司,批号 071031;First Strand cDNA Synthesis Kit 购自 Fermentas 公司,批号 00020634;SYBR Green PCR Master Mix 购自 Applied Biosystems 公司,批号 43049155。CJT 型超净工作台购自北京昌平长城空气净化设备公司;RCO-3000T-5V 型 CO₂ 恒温培养箱购自美国 G. S. 公司;DMILHC 倒置相差显微镜购自德国 Leica 公司;YXOGO2 型电热式蒸汽消毒器购自山东新华医疗器械股份有限公司;400R 低温离心机购自德国 Heraeus 公司;GeneAmp 5700 TaqMAN PCR 仪购自美国 Applied

表 1 引物序列

名称	扩增片段	引物序列	扩增片段长度(bp)
-actin	-actin-EP	5'-GAG ACC TTC AAC ACC CCA GCC-3'	263
	-actin-RP	5'-AAT GTC ACG CAC GAT TTC CC-3'	
L 钙通道- α 1C	L 钙通道- α 1C-EP	5'-CCT CAG TGC AGA CAC ATT TGC-3'	253
	L 钙通道- α 1C-RP	5'-CCG TTA CAG CAG CAC CCC ACA-3'	
CaM	CaM-EP	5'-GGC ATC CTG CTT TAG CCT GAG-3'	328
	CaM-RP	5'-ACA TGC TAT CCC TCT CGT GTG AC-3'	
RyR ₂	RyR ₂ -EP	5'-ACT GCT AAA GTG ACC AAC AG-3'	430
	RyR ₂ -RP	5'-TTG CAT CGC TGA AAT CTA GT-3'	

Biosystems 公司;凝胶图像分析仪、ImageMaster VDS 购自美国 pharmacia Biotech 公司;OYY-III-5 型电泳仪购自北京六一仪器厂;YLD-2000 电热恒温鼓风干燥箱购自黄石市恒丰医疗器械有限公司;HZQ-C 空气浴振荡器购自哈尔滨市东明医疗仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 心肌细胞制备与培养 超净工作台下无菌条件下取出乳鼠心脏,在预冷 D-Hank's 液中清洗 3~4 次。将心肌组织剪为 1 mm³ 大小,加入 3 倍体积量的消化酶(终浓度 0.04% 的胰酶和终浓度 0.04% 的 Co II 混合液,用前混匀),放于 37 °C,每分钟 30~40 转空气浴振荡 10~20 min,反复至消化完全,除第 1 次外,收集各次消化后的上清液,加入等体积含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 终止消化,于 4 °C,1 000 r/min 离心 10 min,收集所有细胞,加入含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液,吹打成单细胞悬液,经 200 目尼龙网过滤去除未消化的组织块。接种于 25 cm² 的卡式培养瓶中,置于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度孵箱中,用差速贴壁法分离非心肌细胞,每次 90 min,共 2 次。所得未贴壁细胞(心肌细胞)计数,按 8 × 10⁵ cell/mL 接种于 6 孔培养板。培养液中加入终浓度为 0.1 mmol/L BrdU 抑制成纤维细胞增殖,添加双抗(100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素)预防细菌污染,37 °C、5% CO₂、91% 湿度环境中培养,约每 36~48 小时换 1 次培养液,培养 3~4 d 后使用。

1.3.2 实验分组 实验分为空白对照组、HA 30 μM/L 组、HA 60 μM/L 组及 HA 120 μM/L 组。

1.3.3 检测心肌细胞 L-钙通道 α 1C、CaM 及 RyR₂ mRNA 的表达 给药前 12 h 更换无血清 DMEM/F12 培养液,分别将 30、60、120 μM/L HA 与心肌细胞共同孵育 15 min 后弃含药培养液,用 D-Hank's 液清洗 2~3 次。同时,将 HA 30、60 μM/L 组心肌细胞与 HA 共同孵育的时间增设 15、60 min 两个时间点,以期观察 HA 对心肌细胞 L-钙通道 α 1C、CaM 及 RyR₂ mRNA 表达的动态变化。分别在培养板内加入 Trizol 提取细胞总 RNA,紫外分光光度计 A260 nm 处测定吸光度,定量 RNA 浓度。根据美国基因生物库的基因核酸序列,选取鸟嘌呤加胞嘧啶(G+C)含量约 50% 的无发卡结构,相互间无同源序列两段特异性保守序列,用 Primer Premier5.0 软件设计引物(北京赛百盛生物技术公司进行合成),引物序列见表 1。参照 Fermentas 公司逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)一步法试剂盒说明书操作。取适量 PCR 反应产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶,100 V/cm 凝胶的电压下电泳。生物电泳图像分析仪测定扩增大曲线下的吸光度值,计算各样品的 L-钙通道 α 1C/-actin、CaM/-actin、RyR₂/-actin。

1.4 统计学处理 应用 SAS8.1 软件进行统计学数据分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组数据进行单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

HA 对心肌细胞 L-钙通道 α 1C、CaM 及 RyR₂ mRNA 表达的影响见图 1 及表 2、3。

表 2 HA 对心肌细胞 L-钙通道 α 1C、CaM 及 RyR₂ mRNA 表达的影响(15 min)

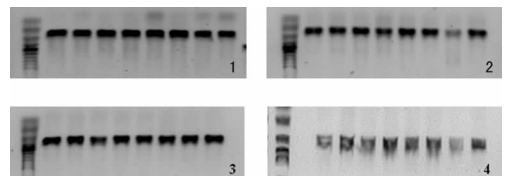
组别	n	L-钙通道 α 1C/-actin	CaM/-actin	RyR ₂ /-actin
空白对照组	6	1.87 ± 0.38	1.92 ± 0.39	1.77 ± 0.43
HA 30 μM/L 组	6	1.59 ± 0.33	1.43 ± 0.17**	1.52 ± 0.15
HA 60 μM/L 组	6	1.33 ± 0.24*	1.37 ± 0.13**	1.29 ± 0.25*
HA 120 μM/L 组	6	1.30 ± 0.16*	1.41 ± 0.17**	1.35 ± 0.13*

** : $P < 0.01$,与空白对照组比较;* : $P < 0.05$,与空白对照组比较。

表 3 HA 对心肌细胞 L-钙通道 α 1C、CaM 及 RyR₂ mRNA 表达的动态影响

组别	时间(min)	n	L-钙通道 α 1C/-actin	CaM/-actin	RyR ₂ /-actin
空白对照组	—	6	1.87 ± 0.38	1.92 ± 0.39	1.77 ± 0.43
HA 30 μM/L 组	5	6	1.65 ± 0.34	1.74 ± 0.47	1.54 ± 0.16
HA 30 μM/L 组	15	6	1.59 ± 0.33	1.43 ± 0.17**	1.52 ± 0.15
HA 30 μM/L 组	60	6	1.61 ± 0.33	1.53 ± 0.17**	1.55 ± 0.16
HA 60 μM/L 组	5	6	1.49 ± 0.34*	1.57 ± 0.31	1.47 ± 0.27
HA 60 μM/L 组	15	6	1.33 ± 0.24*	1.37 ± 0.13**	1.29 ± 0.25*
HA 60 μM/L 组	60	6	1.38 ± 0.20	1.34 ± 0.14**	1.43 ± 0.15

** : $P < 0.01$,与空白对照组比较;* : $P < 0.05$,与空白对照组比较。



1: -actin; 2: L-钙通道 α 1C mRNA; 3: CaM mRNA; 4: RyR₂ mRNA [从左至右分别是空白对照组、HA 120 μM/L(15 min)、HA 60 μM/L(15 min)、HA 30 μM/L(15 min)、HA 60 μM/L(5 min)、HA 30 μM/L(5 min)、HA 60 μM/L(60 min)、HA 30 μM/L(60 min)]。

图 1 琼脂糖凝胶电泳

3 讨 论

Ca²⁺ 是心肌细胞最重要的第 2 信使,在维持心脏正常节律和兴奋-收缩偶联中发挥关键作用^[12-13]。细胞膜 L-钙通道激活, Ca²⁺ 入胞后通过 Ca²⁺/CaM 途径调节胞内 Ca²⁺ 浓度,激活肌质网 RyR₂,使肌质网内 Ca²⁺ 经 RyR₂ 大量进入胞质,引起细胞收缩^[14]。外源性药物触发 L-钙通道、CaM、RyR₂ 等相关调控蛋白的基因改变,将可能导致细胞内 Ca²⁺ 稳态失调,继而诱发严重的药源性心律失常。作者前期研究证实,HA 引起的乳大鼠心肌细胞快速性心律失常剂量为 6~60 μM/L,导致心肌细胞出现停搏的剂量大于或等于 60 μM/L,HA 与心肌细胞共同孵育 5~30 min 时细胞的搏动频率增加最显著^[11]。流式细胞检测 HA 引起的心肌细胞内游离 Ca²⁺ 升高多出现在给药后 15 min,说明心肌细胞内 Ca²⁺ 参与了 HA 所致的心律失常发生过程。

本研究发现,HA 能引起心肌细胞 L-钙通道 α1C mRNA 高表达,α1C 亚基不仅是 L-钙通道构成 Ca²⁺ 进入孔道的主要结构,也是细胞内 Ca²⁺ 浓度增高时 Ca²⁺-CaM 复合物反馈性调节 L-钙通道的位点^[15]。α1C mRNA 的高水平表达表明在 HA 作用下,L-钙通道正处于高度开放状态,亦提示细胞内游离 Ca²⁺ 正处于较高浓度。RyR₂ 是细胞肌质网钙释放入胞质的主要通道,正常生理条件下受细胞内 Ca²⁺/CaM 调控,介导心肌兴奋-收缩偶联及维持细胞内 Ca²⁺ 稳态。HA 能同时增强心肌细胞 CaM 和 RyR₂ 基因表达量,表明 CaM 和 RyR₂ 可能也参与了 HA 所致的心肌细胞内“钙超载”过程。综合不同剂量(60、30 μM/L)、不同作用时间(5、15、60 min)HA 对上述 mRNA 转录水平的影响,发现 L-钙通道、CaM 和 RyR₂ 基因的表达量增高与心肌细胞内游离 Ca²⁺ 浓度的升高相伴发生,进一步证实 HA 极有可能通过对上述钙调控基因 mRNA 表达的影响而导致心肌细胞“钙超载”及后续心律失常的发生。

在乌头碱类天然药物临床中毒所致的心律失常中,HA 的存在可能是导致其毒性反应的主要物质基础之一。心肌细胞 L-钙通道、CaM 与 RyR₂ 等钙调控蛋白可能是中毒性心律失常发生的关键环节。因此,在乌头碱类天然药物中毒解救中,干预上述靶点,调节、恢复上述基因的正常表达可达到解除中毒性心律失常的目的。

参考文献:

[1] 宋东江,陆满文,李汉青. 乌头碱类化合物毒理学研究概况[J]. 中国药理学通报,1989,5(5):272-273.

[2] 周远鹏. 附子及其主要成分的药理作用和毒性[J]. 药学报,1983,18(5):394-400.

[3] 骆梅娟,周至安. 附子的毒性及临床应用浅析[J]. 广州中医药大学学报,2009,26(5):512-514.

[4] 陈春燕. 常用中药方剂可引起严重心律失常[J]. 重庆医学,1994,23(6):370.

[5] 王瑞,刘芳,孙毅坤,等. 不同附子炮制品中乌头碱、新乌头碱、次乌头碱含量的 HPLC 测定[J]. 药物分析杂志,2006,26(10):1361-1363.

[6] 范明威,陈炜璇,卓廉佳,等. 肾气丸“阴中求阳”配伍对方中乌头碱和次乌头碱含量的影响[J]. 时珍国医国药,2009,20(5):24-26.

[7] 刘芳,于向红,李飞,等. HPLC 测定附子及其炮制品中 3 种双酯型生物碱的含量[J]. 中国中药杂志,2006,31(14):1160-1162.

[8] 边宝林,司南,王宏洁,等. 附子单煎以及与浙贝母合煎后乌头碱、次乌头碱、新乌头碱等有毒成分的含量变化研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2006,12(4):9-10.

[9] 李志勇,张硕峰,畅洪昇,等. 不同炮制时间附子饮片双酯型生物碱含量变化与饮片安全的相关性研究[J]. 中国中药杂志,2009,34(9):1086-1089.

[10] 张硕峰. 附子中 3 种双酯型生物碱的心脏毒效关系及甘草苷的干预作用[D]. 北京:北京中医药大学,2007.

[11] 李志勇,孙建宁,张硕峰. 次乌头碱对乳大鼠原代培养心肌细胞的毒性作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2010,24(4):261-265.

[12] 杨晓宁,田宗文,黄焕斌,等. 新生大鼠心肌细胞的体外培养[J]. 解剖学杂志,2005,28(3):361-362.

[13] 丁翔,全识非,秦瑶,等. 新生大鼠原代心房肌细胞钙超载模型的建立[J]. 重庆医学,2010,39(11):1331-1333.

[14] 李宁,浦介麟. 钙离子通道基因异常与室性心律失常[J]. 中国心脏起搏与心电生理杂志,2006,20(1):8-10.

[15] Zuhlke RD, Hudmon A, Schulman H, et al. Molecular basis of calmodulin tethering and Ca²⁺ dependent inactivation of L-type Ca²⁺ channels[J]. J Biol Chem, 2001, 276(33):30794-30802.

(收稿日期:2011-04-04 修回日期:2011-06-13)

(上接第 2544 页)

[8] Brodke D, Dick J, Kunz D, et al. Posterior lumbar interbody fusion[J]. Spine, 1997, 22(1):26-31.

[9] 周炜,吴德升,赵卫东,等. 退行性腰椎滑脱的治疗[J]. 现代中西医结合杂志,2009,18(5):492-493.

[10] 李洪彬,范剑波,向登,等. 腰椎后路钉棒系统结合椎间植骨融合治疗腰椎滑脱 62 例[J]. 重庆医学,2009,38(16):2069-2070.

[11] 徐慰凯,陈芒,周敏,等. 椎弓根螺钉复位内固定、椎间植骨融合治疗腰椎滑脱症[J]. 临床骨科杂志,2008,11(3):263-264.

[12] 徐格,吴雪晖,谢肇,等. 两种椎间融合器临床疗效比较[J]. 重庆医学,2007,36(11):1023-1025.

[13] 周明全,王伟. 38 例腰椎滑脱的疗效分析[J]. 重庆医学,2007,36(23):2423-2424.

[14] 解京明,徐松,王迎松,等. 后路椎体间微粒骨打压植骨融合[J]. 临床骨科杂志,2006,9(1):13-14.

[15] 许峰,韦江波. 环锯加盖植骨法在后路腰椎椎间植骨融合中的应用[J]. 颈腰痛杂志,2009,30(6):561-562.

(收稿日期:2011-01-09 修回日期:2011-03-22)