

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.17.001

## M<sub>3</sub> 受体激动剂对急性缺血性心肌的保护作用\*

栾海蓉, 孙 健, 王得利, 李 丽, 吴 红<sup>△</sup>

(牡丹江医学院机能学教研室/黑龙江省高校肿瘤疾病防治重点实验室, 黑龙江牡丹江 157011)

**[摘要]** **目的** 研究 M<sub>3</sub> 受体激动剂胆碱对大鼠急性缺血性心肌的保护作用其可能的机制。**方法** 用低 pH 值(pH 6.8)乏氧液来模拟缺血环境,全细胞膜片钳技术记录 L-型钙电流(I<sub>Ca-L</sub>)变化;激光扫描共聚焦技术观测细胞内钙变化,探讨胆碱对细胞内钙及钙库的影响。**结果** 在膜片钳实验结果显示,与正常组比较,缺血组 I<sub>Ca-L</sub> 电流密度明显增高,应用胆碱后 I<sub>Ca-L</sub> 下降,差异有统计学意义(P<0.01);共聚焦实验结果显示,与正常组比较,缺血组细胞内钙升高明显(P<0.01),胆碱组细胞内钙升高幅度不明显;预先给予 4-DAMP 可部分逆转胆碱抑制细胞 I<sub>Ca-L</sub> 及细胞内钙升高的作用。**结论** M<sub>3</sub> 受体参与保护缺血心肌的可能机制为通过抑制缺血心肌细胞 I<sub>Ca-L</sub>,从而抑制细胞内钙超载。

**[关键词]** 心肌缺血;胆碱;L-型钙电流;膜片钳;激光扫描共聚焦**[中图分类号]** R331.31**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)17-2305-03

### Protective effects of choline on myocardial ischemic rat heart and its potential mechanisms\*

Luan Hairong, Sun Jian, Wang Deli, Li Li, Wu Hong<sup>△</sup>

(Department of Functional Medicine, Mudanjiang Medical College/Key Laboratory of Cancer Prevention and Treatment of Heilongjiang Province, Mudanjiang, Heilongjiang 157011, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the protective effects of choline on myocardial ischemia rat heart and its potential mechanisms. **Methods** Ischemia hypoxia environment was simulated with low value of pH (pH 6.8) and lack of oxygen. Calcium currents were recorded by whole cell patch under the voltage clamp configuration. The alternations in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> induced by KCl was detected by laser scanning confocal microscope in ventricular myocytes, then discuss the effects of choline on calcium and calcium store in cells. **Results** The normalized peak currents of I<sub>Ca-L</sub> in ventricular myocytes were larger in pH 6.8 group than those in pH 7.4 group, which can be attenuated by choline. The [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> induced by KCl in ventricular myocytes were significantly increased in pH 6.8 Tyrode solution and its increasing can be suppressed by choline. 4-DAMP can inhibit the suppressing effect of choline. **Conclusion** The possible mechanism of M<sub>3</sub> receptor involved in the protection of ischemic myocardium by inhibiting myocardial cells in I<sub>Ca-L</sub>, inhibiting intracellular calcium overload.

**[Key words]** myocardial ischemia; choline; I<sub>Ca-L</sub>; patch clamp technique; laser scanning confocal microscope

心脏是人的重要器官,维持全身血液的供应,心肌缺血及梗死都存在局部供血和代谢障碍,缺血时的细胞外体内微环境改变主要是酸性代谢产物排出困难,从而造成堆积,形成酸中毒,进而导致心律失常发生<sup>[1-2]</sup>。心律失常尤其是缺血梗死后心律失常,其病理过程中细胞内钙超载是心肌损伤的主要分子基础。

研究发现,心肌 M<sub>3</sub> 受体在病理状态下,功能性表达明显增加<sup>[3-5]</sup>。这提示,心肌 M<sub>3</sub> 受体可能在疾病状态下发挥更重要的作用。本研究探讨 M<sub>3</sub> 受体激动剂胆碱对缺血性心肌保护的可能机制,对心脏 M<sub>3</sub> 受体做进一步的研究与探讨,以利于寻求合理的治疗策略和开发更安全有效的心肌保护药物。

#### 1 材料与方

**1.1 材料** 健康清洁级 Wistar 大鼠,成年雄性,体质量 250~300 g,购自哈尔滨医科大学,动物生产许可证号:SCXK(黑)2011006,动物使用许可证号:SYXK(黑)2011007。

**1.2 仪器和试剂** HEPES(N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid)、乙二醇四乙酸酯(EGTA)、胶原酶 II (type II)、牛血清清蛋白(BSA)、咖啡因(Caffeine)均购自于 Sigma 公司;Fluo-3/AM, F-127 购自美国 Invitrogen 公司,用二甲基

亚砷(DMSO)配制 888 μmol/L 原液, -20 °C 冻存备用。DMSO、戊巴比妥钠(sodium pentobarbital)、肝素(heparin)均为国产分析纯。采用 BL-420E 生物功能实验系统,成都泰盟科技公司;pH 计(P-240 型),Corning 公司,德国;膜片钳放大器, Axopatch 200B, Axon 公司,美国;膜片钳数模转换器, Digidata 1322, Axon 公司,美国;倒置显微镜, TE 2000-U, Nikon, 日本;三维液压推进器, MHW-3, Narishige 公司,日本;气压减震台, TMC, 美国;温度控制仪, NBD TC2bip, Cell Micro Controls, 美国;微电极电极拉制仪, PP-830, Narishige, 日本; FV-300 激光扫描共聚焦显微镜, Olympus 公司, 日本。溶液:细胞保存液(KB液)谷氨酸 70 mmol/L、氨基乙磺酸 15 mmol/L、KCl 30 mmol/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mmol/L、MgCl<sub>2</sub> 0.5 mmol/L、EGTA 0.5 mmol/L、羟乙基哌嗪乙磺酸(Hepes)10 mmol/L、葡萄糖 10 mmol/L,用 KOH 调 pH 至 7.3~7.4 mmol/L。台氏液 NaCl 126 mmol/L、KCl 5.4 mmol/L、MgCl<sub>2</sub> 1 mmol/L、CaCl<sub>2</sub> 1.8 mmol/L、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.33 mmol/L、葡萄糖 10 mmol/L、Hepes 10 mmol/L,用 NaOH 调 pH 至 7.4 mmol/L。无钙台氏液除没有 CaCl<sub>2</sub> 之外,其余成分与台氏液相同。缺血台氏液 NaCl 126 mmol/L、KCl 5.4 mmol/L、MgCl<sub>2</sub> 1 mmol/L、

\* 基金资助项目:国家自然科学基金青年基金资助项目(81300163);黑龙江省教育厅科研课题(12531731);牡丹江医学院科学技术研究项目(ZS201321)。作者简介:栾海蓉(1978-),讲师,硕士,主要从事心血管药理学方面研究。△ 通讯作者, Tel:13820404677; E-mail: whmed@126.com。

CaCl<sub>2</sub> 1.8 mmol/L、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.33 mmol/L、葡萄糖 10 mmol/L、Hepes 10 mmol/L,用 NaOH 调 pH 至 6.8。无钙缺血台氏液除没有 CaCl<sub>2</sub> 之外,其余成分与台氏液相同。测钙外液: Tris-Cl 136 mmol/L、CsCl 5.4 mmol/L、MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 1.0 mmol/L、CaCl<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O 2.0 mmol/L、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.33 mmol/L、葡萄糖 10 mmol/L、Hepes 10 mmol/L,用 Tris-OH 调 pH 至 7.4。缺血测钙外液 Tris · Cl 136 mmol/L、CsCl 5.4 mmol/L、CaCl<sub>2</sub> 2.0 mmol/L、MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 1.0 mmol/L、Hepes 10 mmol/L、葡萄糖 5 mmol/L,用 Tris · OH 调至 pH 6.8。测钙内液 CsCl 20 mmol/L、MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 1 mmol/L、MgATP 5 mmol/L、EGTA 10 mmol/L、CsOH 110 mmol/L、天冬氨酸盐 110 mmol/L,用 CsOH 调至 pH 7.2。

### 1.3 方法

**1.3.1 大鼠心肌细胞急性分离**<sup>[6]</sup> 大鼠腹腔注射麻醉后迅速开胸取出心脏,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 速度灌流大约 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 °C 冰箱稳定 1 h 待用。

**1.3.2 全细胞膜片钳电生理记录**<sup>[7]</sup> 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,待贴壁后,用正常台氏液以 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。电极接触细胞并给予负压使电极尖端和细胞膜间形成高阻封接(>10 GΩ)后用脉冲负压抽吸破膜,形成全细胞构型,用电压钳模式下进行刺激和记录正常组(pH 7.4)、缺血组(pH 6.8)、胆碱组(pH 6.8,预敷 1.0 mmol/L 胆碱 3 min)和 4-DAMP 组(pH 6.8,预敷 5 nmol/L 4-DAMP 3 min 后加入胆碱)的 I<sub>Ca-L</sub>。电极液和细胞外液之间的液接电位(10~11 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 kHz 的滤波,数据存于计算机硬盘以便分析。

**1.3.3 心肌细胞内钙测定**<sup>[8]</sup> 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,然后分别用无钙液按体积比稀释成 1/8、1/4、1/2 和 1 倍体积的含有 BSA(100 mg/L)的正常台氏液各敷钙 1 次,每次 10 min,然后放在 37 °C 恒温箱中用终浓度为 5 μmol/L Fluo-3/AM 染色 30 min,1 000 r/min 离心 1 min 去除染色液后,用无钙液稀释至所需的浓度(10 倍物镜视野中 30~40 个细胞),加入预先粘有刀豆蛋白(0.25%)的浴槽中(250 μL)中贴壁,待用,所用正常台氏液充 O<sub>2</sub> 饱和,缺血台氏液不充氧。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,预扫描获得基础值后于第 2 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<sub>i</sub>),以 F<sub>i</sub> 代表 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>。以 F<sub>max</sub>(给药后最高荧光强度)与 F<sub>0</sub>(给药前荧光强度)的比值(F<sub>max</sub>/F<sub>0</sub>)代表 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 的荧光强度变化。

**1.4 统计学处理** 采用 SPAA17.0 统计软件分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  方式表示,各组间均数比较采用单因素方差分析(ANOVA),组间有意义的两两比较采用 LSD-*t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。应用 SigmaPlot 进行统计作图。

## 2 结果

**2.1 胆碱对缺血性心肌细胞 I<sub>Ca-L</sub> 的影响** 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<sup>+</sup> 被 Cs<sup>-</sup> 所取代,以阻断钾电流<sup>[9]</sup>,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。缺血组 I<sub>Ca-L</sub> 电流密度(11.02 ± 0.78) pA/pF,比正常组(5.12 ± 0.15) pA/pF 明显升高( $n=10$ ,  $P < 0.01$ )。胆碱组电流密度降至(7.52 ± 0.39) pA/pF,明显低于缺血组( $n=6$ ,  $P < 0.01$ ),4-DAMP 组 I<sub>Ca-L</sub> 电流密度升至(± 0.65),与胆碱组比较差异有统计学意义( $n=6$ ,  $P < 0.01$ ),结果见图 1。

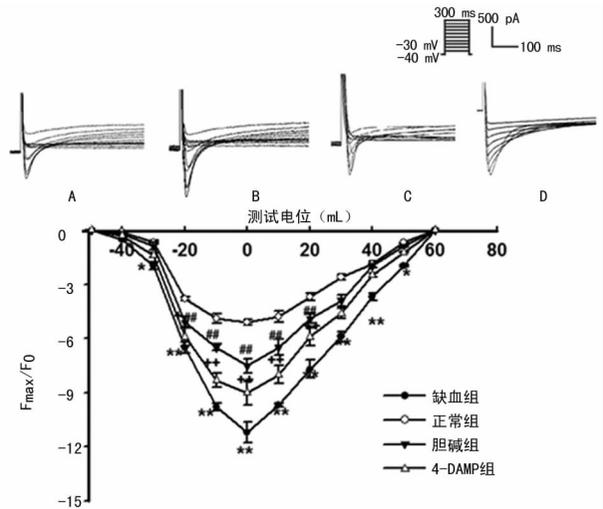


图 1 M<sub>3</sub> 受体激动剂胆碱对缺血心肌细胞 I<sub>Ca-L</sub> 的影响  
A: 正常组; B: 缺血组; C: 胆碱组; D: 4-DAMP 组; E: 各组心肌细胞 I<sub>Ca-L</sub> 比较。\* :  $P < 0.05$ , \*\* :  $P < 0.01$ , 与正常组比较; # :  $P < 0.05$ , ## :  $P < 0.01$ , 与缺血组比较; + :  $P < 0.05$ , ++ :  $P < 0.01$ , 与胆碱组比较。

### 2.2 胆碱对缺血性心肌细胞钙库的影响

利用激光扫描共聚焦技术观察 M<sub>3</sub> 受体激动剂胆碱对缺血情况下心肌细胞钙库的影响。在无钙液中,给予咖啡因后钙 F<sub>max</sub>/F<sub>0</sub> 为 4.21 ± 0.12,预先给予 1.0 mmol/L 胆碱处理心肌细胞 5 min 后再用咖啡因激动,钙 F<sub>max</sub>/F<sub>0</sub> 为 4.02 ± 0.27,差异有统计学意义( $P > 0.05$ ),结果见图 2。

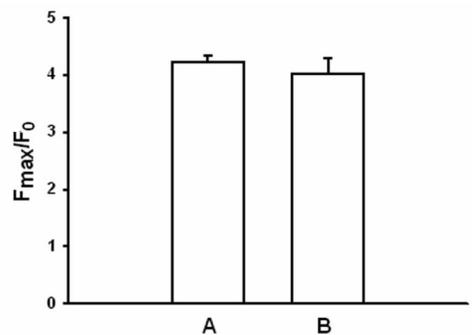
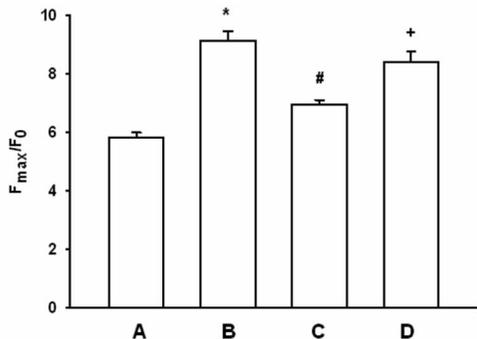


图 2 M<sub>3</sub> 受体激动剂胆碱对缺血心肌细胞钙库钙释放的影响  
A: 咖啡因; B: 胆碱。

### 2.3 胆碱对缺血性心肌细胞 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 的影响

正常情况下,细胞内钙 F<sub>max</sub>/F<sub>0</sub> 为 5.80 ± 0.18。pH 6.8 时,内钙升高幅

度较大,  $F_{max}/F_0$  为  $9.13 \pm 0.32$ , 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。预先给予  $1.0 \text{ mmol/L}$  胆碱处理的心肌细胞内钙升高幅度不明显, 与缺血组 ( $\text{pH } 6.8$ ) 相比,  $F_{max}/F_0$  为  $6.95 \pm 0.15$ , 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。给予胆碱之前预先孵育  $M_3$  受体阻断剂 4-DAMP  $5 \text{ nmol/L}$ , 则可阻断胆碱抑制细胞内钙升高的作用, 钙  $F_{max}/F_0$  为  $8.39 \pm 0.36$ , 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 结果见图 3。



A: 正常组; B: 缺血组; C: 胆碱组; D: 4-DAMP 组。\*:  $P < 0.01$ , 与正常组比较; #:  $P < 0.01$ , 与缺血组比较; +:  $P < 0.01$ , 与胆碱组比较。

图 3  $M_3$  受体激动剂胆碱对缺血性心肌细胞  $[Ca^{2+}]_i$  的影响

### 3 讨论

心肌缺血时交感神经过度兴奋, 可造成心动过速, 收缩力增强, 心肌耗氧量增多, 加重心脏血氧供需失衡。激动  $M_3$  受体可以使心率减慢, 心肌收缩力减弱, 理论上可以减少心肌的耗氧量, 对缺血心肌产生保护作用<sup>[10-11]</sup>。心肌细胞在缺血环境中内钙明显升高, 为缺血梗死后的典型损伤表现。本研究结果显示, 在缺血环境下  $M_3$  受体激动剂胆碱可抑制心室肌细胞  $I_{Ca-L}$  及降低  $[Ca^{2+}]_i$ , 从而抑制缺血时心肌细胞内钙超载发挥对缺血性心肌的保护作用。

笔者用低 pH 值 ( $\text{pH } 6.8$ ) 乏氧液来模拟缺血环境<sup>[12-13]</sup>, 在 pH 6.8 情况下,  $I_{Ca-L}$  明显增加, 胆碱可明显降低  $I_{Ca-L}$ , 减少缺血时的外钙内流, 此作用可以被  $M_3$  受体阻断剂 4-DAMP<sup>[14]</sup> 阻断, 证明胆碱可通过激动  $M_3$  受体抑制外钙内流, 从而降低心肌细胞内钙水平。

心肌组织内钙升高的主要来源为细胞内的钙库。咖啡因是细胞钙库激动剂, 可同时激动 Ryanodine 受体和 IP3 受体<sup>[15]</sup>。在无钙液中, 给予咖啡因可观测到细胞内钙库的钙释放。本研究显示, 胆碱对于缺血情况下的钙库释放没有抑制作用, 提示胆碱抑制缺血引起的内钙超载与钙库无直接关系, 胆碱并不能直接影响钙库的释放功能。

为了更明确地证实胆碱降低缺血细胞内钙的作用, 应用激光共聚焦扫描显微镜技术研究发现, 低浓度胆碱 ( $1.0 \text{ mmol/L}$ ) 可抑制缺血引起的内钙超载现象, 降低缺血细胞  $[Ca^{2+}]_i$ 。预先孵育 4-DAMP 可大部分逆转胆碱降低缺血细胞  $[Ca^{2+}]_i$  的作用, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 进一步证实胆碱抑制细胞内钙超载, 参与缺血心肌的保护作用的主要原因是激动  $M_3$  受体。

综上所述, 胆碱对于缺血性心肌的保护作用是通过激动  $M_3$  受体抑制细胞内钙超载实现的。在酸中毒 ( $\text{pH } 6.8$ ) 情况下, 细胞内钙明显超载, 给予  $M_3$  受体激动剂胆碱治疗, 可抑制缺血心肌细胞  $I_{Ca-L}$ , 降低外钙内流, 从而抑制细胞内钙超载, 发挥抗心肌保护的作用。为进一步明确  $M_3$  受体影响细胞内钙超载的作用机制, 还需要探索其对钠钙交换体、Ryanodine 受

体及三磷酸肌醇受体的影响, 对心肌的保护作用做深层次的验证。

### 参考文献

- [1] Abdel-Aty H, Cocker M, Meek C, et al. Edema as a very early marker for acute myocardial ischemia: a cardiovascular magnetic resonance study[J]. J Am Coll Cardiol, 2009, 53(14):1194-1201.
- [2] 何滢, 黄佐贵, 杜国伟, 等. 心功能和心率减慢对急性心肌梗死心力衰竭的预后研究[J]. 中国心血管病研究, 2014, 12(9):841-844.
- [3] 刘艳, 孙宏丽, 吴红, 等.  $M_3$  受体对体外  $H_2O_2$  诱导大鼠心肌细胞凋亡的保护作用(英文)[J]. 药学报, 2004, 39(11):887-891.
- [4] Yang B, Lin H, Xu C, et al. Choline produces cytoprotective effects against ischemic myocardial injuries: evidence for the role of cardiac  $M_3$  subtype muscarinic acetylcholine receptors[J]. Cell Physiol Biochem, 2005, 16(4/5/6):163-174.
- [5] 郑淑霞, 许金森, 潘晓华, 等. 针灸对乌头碱致心律失常家兔心脏  $M_3$  受体 mRNA 表达的影响[J]. 福建中医药大学学报, 2014, 24(3):19-21.
- [6] Zhang Y, Liu Y, Wang T, et al. Resveratrol, a natural ingredient of grape skin: antiarrhythmic efficacy and Ionic mechanisms[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 340(4):1192-1199.
- [7] 张彦燕, 黄勇攀, 石刚刚. 适于膜片钳实验的心肌细胞分离方法及维拉帕米对钙电流的作用[J]. 贵阳医学院学报, 2014, 5(5):638-641.
- [8] 初文峰, 孙宏丽, 乔国芬, 等. 三磷酸肌醇信号途径参与血小板激活因子诱导豚鼠心室肌细胞钙浓度增高[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2006, 98(1):48-52.
- [9] 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):581-586.
- [10] Liu Y, Du J, Gao Y, et al. Role of  $M_3$  receptor in aconitine/barium-chloride-induced preconditioning against arrhythmias in rats[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2009, 379(5):511-515.
- [11] 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):573-576.
- [12] 刘柳, 杨海燕, 刘新伟, 等. 低 pH 液复灌对兔心肌缺血再灌注的保护作用与 Bcl-2、Bax 表达的关系[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(11):1071-1074.
- [13] 王琳, 聂晶, 滕天明, 等. Apelin-13 对大鼠缺血心室肌细胞瞬时钠电流的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2013, 29(3):413-417.
- [14] Van Zwieten PA, Doods HN. Muscarinic receptors and drugs in cardiovascular medicine[J]. Cardiovasc Drugs Ther, 1995, 9(1):159-167.
- [15] 易超然, 卫中庆. 咖啡因的药理作用和应用[J]. 医学研究生学报, 2005, 18(3):270-272.