

高糖对心房肌钙信号的影响及机制

赵 灿, 吴永全

(首都医科大学附属北京友谊医院心内科, 北京 100050)

摘要:目的: 探讨高糖对大鼠心房肌钙信号的影响及机制。方法: 分离雄性 SD 大鼠心房肌细胞并行原代培养。分成两部分: 第一部分分为 4 组, 1) 左旋葡萄糖组 (LG 组); 2) 正常葡萄糖组 (NG 组); 3) 高葡萄糖组 (HG 组); 4) HG+尿酸 (HG+U) 组。第二部分分为 3 组, 1) ONOO⁻组; 2) DC-ONOO⁻组; 3) ONOO⁻+U 组。观察钙信号、钙通道 *RYR2* mRNA 及其上游调控因子 *FKBP12.6* mRNA 的表达。结果: HG 组的钙瞬变幅度高于 NG 组, ONOO⁻可促进钙的释放。尿酸可减弱 ONOO⁻对钙释放的促进作用。HG 组 *RYR2* mRNA 的表达较 NG 组明显下降。HG+U 组 *RYR2* mRNA 的表达较 HG 组明显上升。ONOO⁻组降低 *RYR2* mRNA 的表达。HG 组 *RYR2* 调控因子 *FKBP12.6* mRNA 的表达明显下降。结论: 高糖可促进心房肌细胞钙的释放, 其机制可能与高糖氧化应激影响钙通道有关。

关键词: 内科学; 钙信号; 高糖; 氧化应激

中图分类号: R54 文献标识码: A 文章编号: 1674-2850(2015)05-0437-06

Effects and mechanism of high glucose on calcium signaling in atrial myocytes

ZHAO Can, WU Yongquan

(Department of Cardiology, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China)

Abstract: Objective: To investigate the effect of high glucose on calcium signals of atrial myocytes and its mechanism. Methods: The experiment based on isolated primary cultured SD atrial myocytes rats were divided into two parts, the first section was divided into four groups: 1) L-glucose (LG) group; 2) normal group (NG); 3) high glucose (HG) group; 4) HG+uric acid (HG+U) group. The second section was divided into three groups: 1) ONOO⁻ group; 2) DC-ONOO⁻ group; 3) ONOO⁻+U group. We observed the change of calcium signaling, calcium channel *RYR2* mRNA and the expression of its upstream regulatory gene *FKBP12.6* mRNA. Results: Calcium transient amplitude was larger in the HG group compared with the NG group. Application of uric acid significantly decreased the calcium transient amplitude whereas exposure of myocytes to ONOO⁻ markedly increased. The expression of *RYR2* mRNA in the HG group was decreased when compared to the NG group. Incubation in uric acid increased the expression of *RYR2* mRNA, whereas ONOO⁻ decreased the amount of *RYR2* mRNA. The expression of *FKBP12.6* mRNA was decreased in the HG group compared to NG treated cells. Conclusion: High glucose increases the release of calcium, the mechanism may be associated with high glucose-induced oxidative stress on calcium channel.

Key words: internal medicine; calcium signaling; hyperglycemia; oxidative stress

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金 (20121107110003)

作者简介: 赵灿 (1985—), 男, 住院医师, 主要研究方向: 心律失常的机制

通信联系人: 吴永全, 主任医师, 主要研究方向: 心律失常介入治疗. E-mail: wuyongquan67@126.com

0 引言

糖尿病是临床上非常常见的疾病,它可以改变心脏的电机特性,是导致房颤的独立危险因素^[1]。房颤具有很高的致死及致残性,其一个重要特征就是心脏电生理及结构的重构^[2]。研究表明,糖尿病与房颤密切相关^[3],即使排除年龄等常见危险因素的影响,糖尿病患者房颤的发生率仍远高于非糖尿病患者^[4]。尽管研究表明糖尿病致房颤的风险与血糖调节的异常程度相关^[3],但糖尿病致房颤的机制并不清楚。

糖尿病可以引起心肌收缩功能的改变^[5],而心肌收缩与钙信号密切相关^[6],房颤也与钙信号密切相关,钙信号调控异常在房颤的发生发展过程中发挥着重要作用,甚至可以成为治疗房颤的新靶点^[7]。心脏钙通道雷诺定受体(ryanodine receptor, RYR)是重要的钙离子通道,含有活性氧自由基及硝基物质的作用靶点,而高糖可以产生氧化应激,因此糖尿病高血糖可能通过氧化应激影响细胞内钙通道,从而促发心律失常^[6,8]。这里从分子水平研究高糖对心房肌钙信号的影响及机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与细胞培养

实验动物:清洁级雄性SD大鼠乳鼠,1~3 d龄,体重(1.75±0.03)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

细胞培养:无菌条件下,取出大鼠心房组织,然后用PBS将此组织块清洗2次,将组织剪成1 mm³左右大小;向组织块中加入4 mL酶消化液(0.1%胰酶和0.1% I型胶原酶),混悬10 s,置37℃条件下消化10 min,之后用滴管吹打制成单细胞悬液,自然沉淀并收集上清,用含10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)培养基终止消化后4℃放置;剩下的组织再加入3~4 mL酶消化液,混悬10 s,置37℃消化10 min后,按上述方法收集上清并终止消化后4℃放置,重复此步骤2~3次,直至组织完全被消化;用200目不锈钢筛网过滤细胞消化液,1 200 r/min离心10 min,弃去上清,沉淀细胞用含有10%FBS DMEM/F12培养基混悬,接种于25 cm²培养瓶,放置于37℃,5%CO₂培养箱;差速贴壁1 h后,吸出培养基,按实验需要接种于6孔板中继续培养。

1.2 主要试剂

荧光染料Fluo-4AM由中国科学院生物物理研究所提供, LG、胰酶、I型胶原酶、尿酸均购自美国Sigma公司; α -actin一抗购自美国Santa公司; α -actin二抗购自华安生物公司, dNTPs、随机引物、逆转录酶购自美国Invitrogen公司; RT-PCR试剂盒购自北京中杉金桥公司。

1.3 实验分组

第一部分分为4组: LG组, 5.5 mmol/L D-葡萄糖+17.5 mmol/L LG; NG组, 5.5 mmol/L D-葡萄糖; HG组, 23 mmol/L D-葡萄糖; HG+U组, 给予尿酸100 μ mol/L。

第二部分分为3组: ONOO⁻组(NG 5.5 mmol/L D-葡萄糖孵育48 h后, 给予5 μ mol/L ONOO⁻刺激2 min); DC-ONOO⁻组(NG 5.5 mmol/L D-葡萄糖孵育48 h后, 给予5 μ mol/L DC-ONOO⁻刺激2 min); ONOO⁻+尿酸组(NG 5.5 mmol/L D-葡萄糖孵育48 h后, 给予100 μ mol/L尿酸预处理2 h, 再给予5 μ mol/L ONOO⁻刺激2 min)。

1.4 大鼠心房肌细胞鉴定

待心房肌细胞生长至80%融合时, 弃去培养基, 用温育的PBS冲洗细胞2次, 然后用4%多聚甲醛在室温下固定细胞15 min; PBS洗涤细胞然后在4℃条件下, 用0.1% Triton X-100透膜15 min; 再次洗

涤细胞后,用4%牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)封闭细胞30 min;加入 α -actin一抗,4℃冰箱中孵育细胞过夜;洗涤细胞后加入 α -actin的二抗,37℃条件下放置1 h;最后在倒置荧光显微镜下观察图像并拍照。

1.5 钙瞬变测定

心肌单细胞与钙荧光指示剂Fluo-4 AM (10 μ mol/L)共同孵育,细胞外液灌流除去胞外多余的荧光染料,将孵育好的心肌细胞置入Zeiss, LSM-Pascal型激光扫描共聚焦显微镜的载物台上,用温育好的细胞外液覆盖,然后镜下进行观察。注意挑选搏动较好的心房肌细胞进行实验。调节激光共聚焦显微镜为线扫描的成像方式,观察钙瞬变,得到的荧光染色后钙瞬变的图片在Matlab 7.0软件下分析,得出钙瞬变的特征。

1.6 RT-PCR 测定 RYR2 mRNA, FKBP12.6 mRNA

提取心房肌细胞总RNA,用北京全式金试剂盒逆转录合成cDNA,行RT-PCR循环,以 β -actin为内参照,采用比较法Ct定量分析。基因引物序列如下:

RYR2 F: TAACCTACCAGGCCGTGGAT;

RYR2 R: GCTGCGATCTGGATAAGTTCAA; FKBP12.6: CTGGAATTCATGGGCGTGGAGATCGAG;

FKBP12.6 R: GACTCGAGTCACTCTAAGTTGAGCAGCTC;

β -actin F: GACGGTCAGGTCATCACTATCG;

β -actin R: ACGGATGTCAACGTCACACTTC.

1.7 统计学处理

全部数据均采用SPSS 13.0统计软件进行分析,实验数据均以 $\bar{X} \pm S$ 表示,各组比较采用单因素方差分析,两两比较采用 t 检验。

2 结果与分析

2.1 SD大鼠心房肌细胞培养鉴定

大鼠心房肌细胞培养48 h,倒置相差显微镜下发现单个心房肌细胞呈扁平形、梭形、杆状,也有的细胞在贴壁后形成三角形,顶部突出,采用免疫细胞化学鉴定 α -actin蛋白,结果如图1所示,确定为大

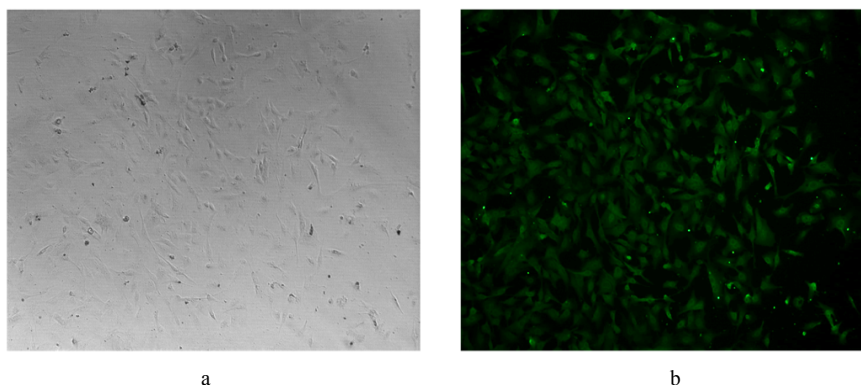


图 1 荧光显微镜下的大鼠心房肌细胞($\times 100$)

Fig. 1 Rat atrial myocytes imaged with the fluorescence microscope ($\times 100$)

a—明场; b—免疫荧光下 α -actin染色

a-Bright field; b-Immunofluorescent identification of rat atrial myocytes (α -actin positive staining)

鼠心房肌细胞。与阴性对照相比,加入 α -actin 蛋白的大鼠心房肌细胞在胞膜和胞浆中均呈绿色荧光,即 α -actin 检测呈阳性。

2.2 钙瞬变的测定

观察高糖及氧化应激对大鼠心房肌细胞钙瞬变特征的影响,结果如表 1、表 2 所示。虽然这几组在钙瞬变频率上没有统计学差异 ($P>0.05$),但 HG 组的钙瞬变幅度比 NG 组高 ($P<0.05$),氧化应激刺激因子 ONOO⁻可促进钙的释放 ($P<0.05$),DC-ONOO⁻与 ONOO⁻组相比,钙瞬变幅度明显减弱 ($P<0.05$),氧化应激抑制因子尿酸可以减弱 ONOO⁻对钙释放的促进作用 ($P<0.05$)。作为渗透压对照组的 LG 组与 NG 组相比,钙瞬变幅度无统计学差异 ($P>0.05$),说明高糖产生的渗透压不影响结果的判断。

表 1 高糖条件下钙瞬变特征 ($\bar{X} \pm S$)

Tab.1 Calcium transients under high glucose condition ($\bar{X} \pm S$)

组别	例数/例	$\Delta f/f_0$	F
LG	29	2.21±0.45	7.72±5.08
NG	31	2.12±0.50 ^a	7.48±4.82
HG	29	2.66±0.60 ^b	8.10±6.02
HG+U	38	2.22±0.53 ^{cd}	7.50±3.96

注: $\Delta f/f_0$ 为钙瞬变幅度; F 为钙瞬变频率。a 为与 NG 组比, $P>0.05$; b 为 LG 与 NG 组比, $\Delta f/f_0$ 差异 $P<0.05$; c 为与 HG 组比, $P<0.05$; d 为与 LG 和 NG 组比, $P>0.05$ 。而 F 值各组之间相比 $P>0.05$

表 2 氧化应激刺激下钙瞬变特征 ($\bar{X} \pm S$)

Tab.2 Calcium transients under oxidative stress stimulation ($\bar{X} \pm S$)

组别	例数/例	$\Delta f/f_0$	F
ONOO ⁻	36	4.29±1.46	5.47±3.54
ONOO ⁻ +U	33	3.28±1.28 ^a	3.94±2.96
DC-ONOO ⁻	33	3.43±0.98 ^b	4.36±2.75

注: $\Delta f/f_0$ 为钙瞬变幅度; F 为钙瞬变频率。对于 $\Delta f/f_0$, a 为与 ONOO⁻ 组比, $P<0.05$; b 为与 ONOO⁻ 和 ONOO⁻+U 组比, $P<0.05$ 。对于 F , 各组间相比 $P>0.05$

2.3 钙通道 RYR2 mRNA, 钙通道调控蛋白 FKBP12.6 mRNA 在各组处理后的表达

与 NG 和 LG 组相比, HG 组 RYR2 mRNA 的表达明显下降 ($P<0.05$)。而 LG 与 NG 两组之间 RYR2 mRNA 的表达无显著差异 ($P>0.05$)。HG+U 组 RYR2 mRNA 的表达较 HG 组明显上升 ($P<0.05$) (如表 3 所示) ($n=3$)。DC-ONOO⁻组与 ONOO⁻组相比, RYR2 mRNA 的表达明显增多。ONOO⁻加入尿酸后, RYR2 mRNA 的表达量较 ONOO⁻组明显增加 ($P<0.05$) (如表 4 所示) ($n=3$)。

表 3 RYR2 mRNA 和 FKBP12.6 mRNA 的表达 ($\bar{X} \pm S$)

Tab.3 Expression of RYR2 mRNA and FKBP12.6 mRNA ($\bar{X} \pm S$)

组别	RYR2 mRNA	FKBP12.6 mRNA
LG	1.11±0.10	1.04±0.05
NG	1.14±0.09	1.07±0.04
HG	0.70±0.02*	0.54±0.05*
HG+U	1.05±0.08 [#] &	1.06±0.08 [#] &

注: *为与 LG 和 NG 组比较, $P<0.05$; #为 LG 和 NG 组比较, $P>0.05$; &为与 HG 组比较, $P<0.05$

表 4 RYR2 mRNA 和 FKBP12.6 mRNA 的表达 ($\bar{X} \pm S$)

Tab.4 Expression of RYR2 mRNA and FKBP12.6 mRNA ($\bar{X} \pm S$)

组别	RYR2 mRNA	FKBP12.6 mRNA
ONOO ⁻	0.61±0.02	0.64±0.06
DC-ONOO ⁻	1.01±0.03*	1.01±0.05*
ONOO ⁻ +U	1.06±0.04 [#]	0.94±0.11 [#]

注: *为与 ONOO⁻组比较, $P<0.05$; #为与 ONOO⁻组比较, $P<0.05$

3 讨论与结论

大量流行病学资料显示,糖尿病患者发生房颤的潜在可能日益增加,但其机制尚不清楚^[3,9-10]。既往糖尿病相关的研究都集中在心室肌细胞,而非心房肌细胞。糖尿病的 2 个重要特征是高血压及氧化应激,而细胞内钙信号的异常是糖尿病发生发展过程的一个重要特征,而且可能与心律失常相关^[11]。研究比较了大鼠乳鼠心房肌细胞暴露在不同血糖水平下钙信号的异常调节,并探讨了在维持心房肌钙稳态中有着

重要地位的钙通道 RYR2 的表达。

正常情况下, 心肌细胞内钙信号事件处于一种动态平衡。当 Ca^{2+} 通过 L-钙通道 (L-type calcium channels, LCC) 和/或 Na^+ - Ca^{2+} 交换体 (Na^+ / Ca^{2+} exchanger, NCX) 进入心肌细胞内时, 通过“钙致钙释放” (Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release, CICR) 机制触发“钙火花”等钙信号事件。钙信号的释放主要是内质网/肌浆网等钙库内的 Ca^{2+} , 通过基膜上的钙释放通道 RYR 释放入胞浆, 完成兴奋-收缩偶联, 而后进入胞浆的 Ca^{2+} 由内质网/肌浆网上的 Ca^{2+} -ATP 酶 (sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATP, SERCA) 回纳入钙库, 同时由质膜上的 NCX 和 SERCA 排出细胞外, 重新达到动态平衡。

既往研究表明, Ca^{2+} 通过 RYR2 释放导致的钙超载, 可能与心肌细胞电机械功能异常有关^[12]。尽管有关 RYR2 的调节机制存在众多说法, 但 RYR2 在心室细胞中的作用已被广泛接受。研究认为钙信号事件受多种 Ca^{2+} 通道蛋白磷酸化的动态调节, 包括 RYR2 磷酸化; 而它们又受到 FK506 结合蛋白 12.6 (FK506 binding protein 12.6 ku, FKBP12.6) 这一钙释放通道调控蛋白的调节。通过这些钙调控蛋白的作用, 调节钙通道蛋白的活性和 Ca^{2+} 的释放与重吸收^[13-14]。

Ca^{2+} 不仅参与心肌细胞兴奋收缩偶联, 更为重要的是异常钙信号会导致钙信号事件异常, 钙负荷增加, 从而产生早期后除极 (early after depolarization, EAD) 或晚期后除极 (delay after depolarization, DAD) 等触发活动, 触发心血管功能紊乱、心律失常、心力衰竭^[15-16]。

既往的研究表明, 糖尿病早期心室肌细胞就会出现钙信号异常^[17], 这可能是因为细胞钙超载与 RYR2 磷酸化有关, 不仅如此, 这些研究进一步确认了 RYR2 及其调节蛋白 FKBP12.6 在心室肌钙信号中的作用, 值得注意的是, 心室肌细胞并不能代表心房肌细胞会出现同样的现象, 这里以心房肌细胞为研究对象, 明确高糖对钙信号的影响及机制。

实验给予高糖孵育大鼠心房肌细胞后, Ca^{2+} 的释放明显增加, HG 组 RYR2 mRNA 的表达明显下降, 表明高糖条件下钙的释放可能与钙通道 RYR2 有关。持续的高血糖刺激可引起氧化应激, 导致过量 NO 和 O_2^- 产生, 最终形成 ONOO^- ^[18]。RYR2 等“钙通道调控蛋白”含有大量的自由巯基, 是氧化应激的靶点。当给予外源性 ONOO^- 刺激后, RYR2 mRNA 的表达较 DC- ONOO^- 组明显减少, Ca^{2+} 的释放明显增多, 说明 ONOO^- 可能参与了钙通道的活化, 影响了钙信号的调节。而高糖可以不断产生内源性 ONOO^- , 是一个长时间的刺激, 更能影响钙稳态, 进而引起心肌细胞电生理的改变。

尿酸是体内天然抗氧化物质, 是 ONOO^- 的特异性清除剂。研究结果提示, 尿酸可抑制 HG 组钙的释放, 钙通道 RYR2 mRNA 也出现了相应改变, 尿酸也可抑制 ONOO^- 导致的钙释放, 这可能与尿酸的抗氧化应激作用有关。

FKBP12.6 是免疫结合蛋白家族中的一员, 是一种分子量为 12.6 ku 的能与免疫抑制药物 FK506 结合的蛋白质分子。FKBP12.6 与 RYR2 的结合可以稳定 RYR2 的闭合状态, 减少 Ca^{2+} 漏出, 增强开闭的同步协调性。在 FKBP12.6 基因敲除小鼠, Ca^{2+} 火花幅度宽度增加, 衰减时间延长^[19-20], 本实验提示 HG 组 RYR2 调控因子 FKBP12.6 mRNA 的表达明显下降 ($P < 0.05$), 表明高糖对 RYR2 的影响与其上游调控因子 FKBP12.6 相关。

既往研究已经明确糖尿病致房颤这一流行病学现象, 这是在这一现象的基础上从细胞分子水平研究了高糖对心房肌钙信号的影响及机制, 发现高糖可促进心房肌细胞钙的释放, 其机制可能与高糖氧化应激影响钙通道有关, 为糖尿病致心律失常机制提供了前期的理论基础, 同时也为未来进一步明确糖尿病致房颤的确切机制打下基础。

[参考文献] (References)

- [1] CHOI K M, ZHONG Y, HOIT B D, et al. Defective intracellular Ca^{2+} signaling contributes to cardiomyopathy in Type 1 diabetic rats[J]. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2002, 283(4): H1398-H1408.
- [2] ALLESSIE M, AUSMA J, SCHOTTEN U. Electrical, contractile and structural remodeling during atrial fibrillation[J]. *Cardiovasc. Res.*, 2002, 54(2): 230-246.
- [3] DUBLIN S, GLAZER N L, SMITH N L, et al. Diabetes mellitus, glycemic control, and risk of atrial fibrillation[J]. *J. Gen. Intern. Med.*, 2010, 25(8): 853-858.
- [4] KANNEL W B, WOLF P A, BENJAMIN E J, et al. Prevalence, incidence, prognosis, and predisposing conditions for atrial fibrillation: population-based estimates[J]. *Am. J. Cardiol.*, 1998, 82(8A): 2N-9N.
- [5] BELL D S. Diabetic cardiomyopathy. A unique entity or a complication of coronary artery disease?[J]. *Diabetes Care*, 1995, 18(5): 708-714.
- [6] YARAS N, UGUR M, OZDEMIR S, et al. Effects of diabetes on ryanodine receptor Ca^{2+} release channel (RyR2) and Ca^{2+} homeostasis in rat heart[J]. *Diabetes*, 2005, 54(11): 3082-3088.
- [7] DOBREV D, NATTEL S. Calcium handling abnormalities in atrial fibrillation as a target for innovative therapeutics[J]. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 2008, 52(4): 293-299.
- [8] HOVE-MADSEN L, LLACH A, BAYES-GENÍS A, et al. Atrial fibrillation is associated with increased spontaneous calcium release from the sarcoplasmic reticulum in human atrial myocytes[J]. *Circulation*, 2004, 110(11): 1358-1363.
- [9] NICHOLS G A, REINIER K, CHUGH S S. Independent contribution of diabetes to increased prevalence and incidence of atrial fibrillation[J]. *Diabetes Care*, 2009, 32(10): 1851-1856.
- [10] MOVAHED M R, HASHEMZADEH M, JAMAL M M. Diabetes mellitus is a strong, independent risk for atrial fibrillation and flutter in addition to other cardiovascular disease[J]. *Int. J. Cardiol.*, 2005, 105(3): 315-318.
- [11] LEVY J. Abnormal cell calcium homeostasis in type 2 diabetes mellitus: a new look on old disease[J]. *Endocrine*, 1999, 10(1): 1-6.
- [12] DENG J X, WANG G, HUANG Q B, et al. Oxidative stress-induced leaky sarcoplasmic reticulum underlying acute heart failure in severe burn trauma[J]. *Free Radic. Biol. Med.*, 2008, 44(3): 375-385.
- [13] DOBREV D, WEHRENS X H. Calmodulin kinase II, sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} leak, and atrial fibrillation[J]. *Trends Cardiovasc. Med.*, 2010, 20(1): 30-34.
- [14] KEURS H E D J, BOYDEN P A. Calcium and arrhythmogenesis[J]. *Physiol. Res.*, 2007, 87(2): 457-506.
- [15] BERLIN J R, CANNELL M B, LEDERER W J. Cellular origin of the transient inward current in cardiac myocytes[J]. *Circ. Res.*, 1989, 65(1): 115-126.
- [16] FOZZARD H A. Afterdepolarizations and triggered activity[J]. *Basic Res. Cardiol.*, 1992, 87(Suppl. 2): 105-113.
- [17] BELKE D D, DILLMANN W H. Altered cardiac calcium handling in diabetes[J]. *Curr. Hypertens. Rep.*, 2004, 6(6): 424-429.
- [18] SOBEL B E, SCHNEIDER D J. Cardiovascular complications in diabetes mellitus[J]. *Curt. Opin. Pharmacol.*, 2005, 5(2): 143-148.
- [19] QI M Y, XIA H J, DAI D Z, et al. A novel endothelin receptor antagonist CPU0213 improves diabetic cardiac insufficiency attributed to up-regulation of the expression of FKBP12.6, SERCA2a, and PLB in rats[J]. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 2006, 47(6): 729-735.
- [20] XIN H B, ROGERS K, QI Y, et al. Three amino acid residues determine selective binding of FK506-binding protein 12.6 to the cardiac ryanodine receptor[J]. *J. Biol. Chem.*, 1999, 274(22): 15315-15319.