

• 论 著 •

低浓度哇巴因升高豚鼠心室肌细胞内游离钙浓度可能的信号转导途径

熊 晨¹, 武彦昭², 张 哲¹, 王永利^{1*}

(1. 河北医科大学药理学教研室, 石家庄 050017; 2. 河北医科大学附属四院五官科, 石家庄 050017)

[摘要] **目的:** 观察哇巴因(ouabain, OUA)对豚鼠心室肌细胞内游离钙浓度($[Ca^{2+}]_i$)的影响, 并探讨低浓度 OUA 是否可通过 Na^+ , K^+ -ATPase 的信号转导途径升高 $[Ca^{2+}]_i$ 。**方法:** 分离豚鼠心室肌细胞, 激光共聚焦显微镜术测定单个心室肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的荧光密度, 另用不同浓度 OUA 孵育急性分离的豚鼠心室肌细胞后, 分别取其沉淀用 Western 印迹检测观察 OUA 对酪氨酸蛋白(Src)磷酸化的影响。**结果:** 在正常台氏液及无钙台氏液中, OUA(10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} mol · L⁻¹)均可浓度依赖性地升高细胞内钙浓度($P < 0.05$ 或 0.01), 且在正常台氏液中升高更为显著($P < 0.05$)。蛋白酪氨酸激酶抑制剂三羟异黄酮(genistein, GST)(1, 10, 50, 100 μmol · L⁻¹)可浓度依赖性地抑制正常台氏液中的 OUA 效应。磷酸化 Src 包括相对分子质量 120 000 和 70 000 两个条带, 各剂量 OUA(10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} mol · L⁻¹)均能使 Src 的两个磷酸化条带的密度较阴性对照组显著升高($P < 0.05$), 而 GST(100 μmol · L⁻¹)可显著抑制 OUA 的升高效应。**结论:** 低浓度 OUA 可能通过使酪氨酸蛋白磷酸化, 激活 OUA/ Na^+ , K^+ ATPase/Src 信号转导通路, 促使钙通道开放及内钙释放, 从而升高豚鼠心室肌细胞内游离钙浓度。

[关键词] Na^+ - K^+ -交换 ATP 酶; 心室肌细胞; 哇巴因; 钙

[中图分类号] R 972.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)08-0850-04

Low concentration of ouabain elevates intracellular free calcium in guinea pig ventricular myocytes: the possible signal transduction pathway

XIONG Chen¹, WU Yan-zhao², ZHANG Zhe¹, WANG Yong-li^{1*} (1. Department of Pharmacology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; 2. Department of Otolaryngology, The 4th Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017)

[ABSTRACT] **Objective:** To study the effect of low concentration of ouabain (OUA) on intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) in guinea pig ventricular myocytes and to understand whether low concentration of OUA can increase $[Ca^{2+}]_i$ through Na^+ , K^+ -ATPase channel. **Methods:** The guinea pig ventricular myocytes were obtained by enzymatic digestion and the $[Ca^{2+}]_i$ fluorescent density of individual myocytes was observed under confocal laser scanning microscope. The isolated ventricular myocytes were then incubated with different concentrations of ouabain (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} mol · L⁻¹). The sediment was subjected to Western blot analysis to assess the phosphorylation of Src by OUA. **Results:** In normal Tyrode's solution and Ca^{2+} -free Tyrode's solution, OUA (1×10^{-9} - 1×10^{-6}) mol · L⁻¹ elevated $[Ca^{2+}]_i$ in a concentration-dependent manner, with the elevation in normal Tyrode's solution more obvious ($P < 0.05$). Genistein (GST) (1, 10, 50, and 100 μmol · L⁻¹) abolished the OUA-induced increases of $[Ca^{2+}]_i$ in a concentration-dependent manner. There were two tyrosine-phosphorylated bands, with the molecular weights being 120 000 and 70 000. Compared with control group, the densities of the 2 bands in all OUA groups were significantly higher ($P < 0.05$) and GST could obviously inhibit the elevating effect of OUA. **Conclusion:** Low concentration of OUA may promote opening of Ca^{2+} channel and release of intracellular Ca^{2+} , and subsequently elevate intracellular free calcium through phosphorylation of tyrosine and activation of OUA/ Na^+ , K^+ -ATPase/Src signal transduction pathway.

[KEY WORDS] Na^+ , K^+ -exchanging ATPase; ventricular myocytes; ouabain; calcium

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(8): 850-853]

强心苷在临床治疗充血性心力衰竭已有百年历史, 其治疗机制一直被认为是通过抑制心肌细胞膜上的 Na^+ , K^+ -ATPase 活性, 使细胞内 Na^+ 浓度($[Na^+]_i$)增加, 再通过 Na^+ / Ca^{2+} 交换升高细胞内钙($[Ca^{2+}]_i$), 进而加强心肌收缩力、增加心排出量而使心衰得以治疗^[1]。但强心苷在体外抑制 Na^+ , K^+ -ATPase 的最低浓度 $\geq 10^{-4}$ mol/L, 而几种强心

苷有效控制心衰的血浆浓度均在 $10^{-9} \sim 10^{-8}$ mol/L 之间, 均远低于体外抑制 Na^+ , K^+ -ATPase 的最低浓度^[2]。Gao 等^[3]采用膜片钳技术测定钠泵电流及

[基金项目] 河北省自然科学基金(301360). Supported by Natural Science Foundation of Hebei Province(301360).

[作者简介] 熊 晨, 硕士, 讲师. E-mail: bearmorning@sina.com

* Corresponding author. E-mail: wangyl52@heinfo.net

Hougen 等^[4]采用⁸⁶Rb摄取方法测定钠泵功能的实验结果提示低浓度的强心苷强心作用与抑制 Na^+ , K^+ -ATPase 活性无关。而来自多种组织(人和动物)和多种方法的实验资料均证实此浓度强心苷不影响甚至会兴奋 Na^+ , K^+ -ATPase 活性,而非抑制^[3-5]。那么,低浓度强心苷是否具有正性肌力作用呢?本课题组已在正常离体豚鼠心脏观察到低浓度毒毛旋花子苷原(Str,一种强心苷)可增强心脏收缩功能并能兴奋 Na^+ , K^+ -ATPase^[6]。最近研究^[7-10]发现 Na^+ , K^+ -ATPase 除具有离子泵功能外,还具有信号转导功能,其作为信号中介体与邻近膜蛋白结合并通过信号级联将信息向胞质转移,从而调节细胞生长及基因表达。Tian 等^[7]发现非毒性浓度哇巴因(OUA, 100 $\mu\text{mol/L}$, 一种强心苷)和 Na^+ , K^+ -ATPase 结合可通过 OUA/ Na^+ , K^+ -ATPase/ Src(一种蛋白酪氨酸激酶)/EGFR/RAS 信号转导途径,从而升高细胞内钙浓度。本研究拟用正常离体豚鼠心脏观察低浓度 OUA 对心室肌细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的影响,以探讨其可能的信号转导途径及强心作用机制。

1 材料和方法

1.1 药品与试剂 OUA 由美国 Sigma 公司提供,呈白色粉末状,用二甲基亚砷溶解配成 100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的母液,贮存于 -20°C 的冰箱中。胶原酶II, taurine、HEPES、EGTA、三羟异黄酮(GST)均购自 Sigma 公司。P-Tyr(PY99):sc-7020 美国 Santa 公司。无钙台氏液的配制(g/L): NaCl 8.18、KCl 0.4、 MgCl_2 0.203、HEPES 2.38、glucose 1.98, 用 NaOH 调 pH 7.4。KB 液的配制(g/L): KOH 3.366、KCl 2.982、 KH_2PO_4 3.402、 MgSO_4 0.360、glutunate acid 4.414、taurine 1.25、HEPES 2.38、EGTA 1、glucose 1.98, 用 KOH 调 pH 7.4。正常台氏液: 无钙台氏液加 CaCl_2 1.8 mmol/L 。蛋白裂解液(100 ml): 1% nonidentp-40, 1% 去氧胆酸钠, 150 mmol 氯化钠, 1 mmol EDTA, 1 mmol PMSF, 1 mmol NaF, 1 mmol 钒酸钠, 50 mmol Tris-HCl (pH 7.4), 10 $\mu\text{g/ml}$ aprotinin, 10 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin。

1.2 急性分离豚鼠心室肌细胞 豚鼠,雌雄不拘,体质量 300~500 g,由河北医科大学实验动物中心提供(合格证号:DK0509068),依 Wang 等^[11]的方法酶解分离心室肌细胞。10 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 戊巴比妥钠(40 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)腹腔注射麻醉,取心脏留有 2~3 mm 直径的主动脉,移入无钙台氏液中,迅速挂于 Langendorff 装置上,行主动脉逆行灌流,灌流液中以纯氧饱

和,保温 37°C 左右,灌流速度为 6~8 ml/min 。适当调整速度。以无钙台氏液灌流 5 min 后,用含胶原酶 0.33 mg/ml 的无钙台氏液反复灌流,至心脏变软,取下置于 KB 液中,剪碎后,用吸管吹打,以 200 目尼龙网过滤,保留上清。分离的细胞在 KB 液中于 4°C 保存备用。所有实验均灌流给药,在细胞分离后 16 h 完成。

1.3 Fluo3-AM 负载 分离的豚鼠心室肌细胞用含有 0.03% pluronic F127 的 Fluo3-AM 负载(终浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$),室温 37°C 60 min。负载后用无钙台氏液洗涤 2 次以除去细胞外的 Fluo3-AM。

1.4 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的检测 负载 Fluo3-AM 后,细胞移入容积约 0.2 ml 的灌流槽中,只有横纹清晰、边界清楚的长杆状细胞用于实验。激光信号由激光共聚焦显微镜系统发出(Biorad Laserssharp MRA2, Oxfordshire, UK)氩激光,发射波长为 488~533 nm。结果用相对荧光密度 $(\text{FI}-\text{FI}_0)/\text{FI}_0 \times 100\%$ 表示,其中 FI_0 表示用药前的荧光密度,FI 表示用药后的荧光密度。所有的实验每 5 s 扫一张,共 50~120 张。

1.5 豚鼠心室肌细胞蛋白提取 急性分离正常豚鼠心室肌细胞如前,给予不同浓度(10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的 OUA 及 10^{-8} $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ OUA+GST (100 $\mu\text{mol/L}$)孵育 2~5 min 后取沉淀,于 1 ml 管中,每管给予 250 μl 裂解液,冰浴放置 15 min,期间轻摇振荡, 4°C 10 000 $\times g$ 离心 10 min,小心吸取上清液 -20°C 保存。

1.6 Western 印迹检测 将蛋白样品与上样缓冲液混匀, 100°C 水浴 4 min,冷却至室温,SDS-PAGE 电泳分离样品蛋白,将已分离区带凝胶切下,置于电泳转移液中浸泡 30 min, PVDF 膜在甲醇中浸泡 2 min,蒸馏水洗涤 2 次后,置于电转移液中浸泡 20~30 min,将 PVDF 膜平铺在凝胶上,放入转移电泳槽中, 4°C 进行 Western 印迹分析(90 V, 180 min)将 PAGE 中的蛋白转移到 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 37°C 1 h,加入 5% 脱脂奶粉稀释 PY99 抗体(工作液浓度为 1:200), 4°C 过夜。TTBS 洗膜 3 次,加入生物素标记的二抗(山羊抗小鼠 IgG), 37°C 1 h, TTBS 洗膜 3 次, DAB 显色试剂盒进行显色,扫描仪扫描记录。

1.7 统计学处理 实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 不同浓度的 OUA 对离体豚鼠心室肌细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的影响 用激光共聚焦技术检测 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的

结果显示,OUA($1\times 10^{-9}\sim 1\times 10^{-6}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)在正常台氏液及无钙台氏液中均可不同程度地升高心室肌细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (表 1、图 1)。

表 1 不同浓度的 OUA 对离体豚鼠心室肌细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的影响

Tab 1 Effect of different concentrations of OUA on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in isolated guinea pig ventricular myocytes

Concentration of OUA ($\text{cB}/\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	Normal Tyrode's solution		Ca^{2+} -free Tyrode's solution	
	<i>n</i>	$(\text{FI}-\text{FI}_0)/\text{FI}_0(\%)$	<i>n</i>	$(\text{FI}-\text{FI}_0)/\text{FI}_0(\%)$
10^{-9}	6	$16.7\pm 6.8^{**}$	10	$9.19\pm 4.73^{**\Delta}$
10^{-8}	9	$26.0\pm 4.7^{**}$	11	$20.75\pm 5.2^{**\Delta}$
10^{-7}	6	$183.0\pm 101.0^{**}$	10	$85.79\pm 64.7^{**\Delta}$
10^{-6}	6	$295.0\pm 172.0^{**}$	9	$231.00\pm 26.0^{**\Delta}$
Control	9	0	9	0

The change in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ is represented by ratio of $(\text{FI}-\text{FI}_0)/\text{FI}_0$. $^{**}P<0.01$ vs control; $^{\Delta}P<0.05$ vs normal Tyrode's solution

2.2 在正常台氏液中加 GST 对 OUA 升高心室肌细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的影响 GST(genistein,一种特异性蛋白酪氨酸酶的抑制剂^[12])孵育细胞 30 min 后,可看到 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 GST 孵育的细胞可完全阻断 OUA(10^{-8} mol/L)的升钙效应 $[-1.9\pm 6.7)\%$ vs

($25.3\pm 5.7)\%$, $P<0.01$],而 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 GST 孵育的细胞可部分阻断 OUA(10^{-8} mol/L)的升钙效应 $[(0.8\pm 7.6)\%$, $P<0.05$],10 $\mu\text{mol/L}$ 、1 $\mu\text{mol/L}$ 的 GST 则对 OUA(10^{-8} mol/L)的升钙效应无明显影响 $[(14.2\pm 8.9)\%$ 和 $(17.5\pm 3.1)\%$]

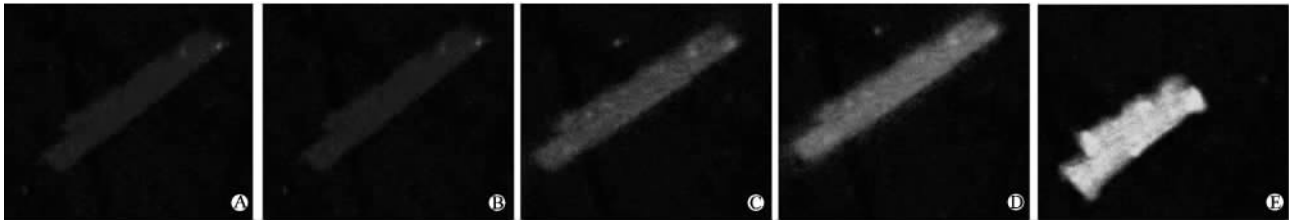


图 1 同一豚鼠心室肌细胞在不同浓度 OUA 下荧光密度的比较

Fig 1 Fluroscent intensities of control(A) and OUA 10^{-9} (B), 10^{-8} (C), 10^{-7} (D), and 10^{-6} mol/L (E) group in normal Tyrode's solution in ventricular myocytes of guinea pig

2.3 低浓度 OUA 对豚鼠心室肌细胞内酪氨酸蛋白磷酸化的影响 磷酸化的酪氨酸蛋白在电泳上可出现相对分子量为 120 000 和 70 000 的两条泳带,其 120 000 泳带密度:阴性对照组($5\,175\pm 1\,516$)与 10^{-4} mol/L OUA 组 ($7\,584\pm 1\,839$)、 10^{-6} mol/L OUA 组 ($7\,229\pm 1\,704$)、 10^{-8} mol/L OUA 组 ($7\,006\pm 1\,362$)有显著差异($P<0.01$),而与 10^{-4} mol/L GST+ 10^{-8} mol/L OUA 组($5\,563\pm 1\,262$)无统计学差异。其 70 000 泳带密度:阴性对照组

($5\,632\pm 1\,993$)与 10^{-4} mol/L OUA 组 ($7\,913\pm 1\,619$)、 10^{-6} mol/L OUA 组 ($6\,543\pm 2\,127$)、 10^{-8} mol/L OUA 组 ($6\,359\pm 1\,861$)有显著差异($P<0.05$),而与 10^{-4} mol/L GST+ 10^{-8} mol/L OUA 组($5\,654\pm 2\,106$)无统计学差异。表明各剂量 OUA 均能使 Src 相对分子质量为 120 000 和 70 000 的两个磷酸化条带的密度较阴性对照组显著升高($P<0.05$),而 GST 可显著抑制 OUA 的升高效应(图 2)。

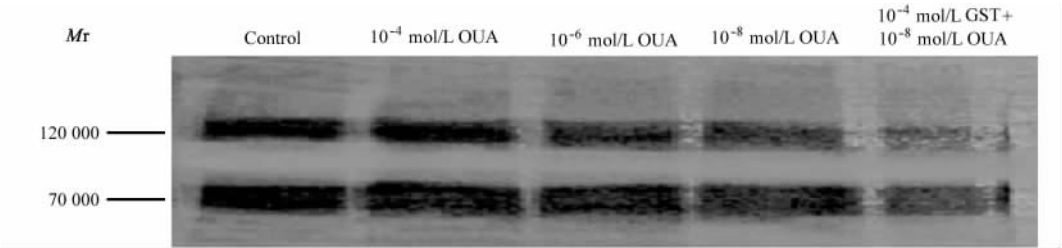


图 2 不同浓度 OUA 对酪氨酸蛋白磷酸化的影响

Fig 2 Concentration-dependent effects of ouabain on protein tyrosine phosphorylation

3 讨 论

众所周知,强心苷是通过抑制心肌细胞膜上的 Na^+,K^+ -ATPase 活性,使细胞内 $[\text{Na}^+]$ 增加,通过 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换升高细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]$,增加心肌收缩力。但此机制难以解释其治疗作用,因为强心苷有效控制心衰的血清游离药物浓度约为 $1 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 左右。本课题组尹京湘等^[13-14]采用膜片钳技术测定钠泵电流时发现, $10^{-9} \sim 10^{-8} \text{ mol/L}$ 的双氢哇巴因(DHO)可明显兴奋 Na^+,K^+ -ATPase;苏素文等^[15]在正常或心衰离体豚鼠心脏观察到,低浓度 Str 均可在增强心脏收缩功能的同时兴奋或不影响 Na^+,K^+ -ATPase 活性。但兴奋 Na^+,K^+ -ATPase 的结果是减少 $[\text{Na}^+]_i$,进而使 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 降低,收缩力下降,难以解释低浓度强心苷的正性肌力作用,即强心苷的 Na^+,K^+ -ATPase 抑制机制难以解释其对充血性心衰的治疗作用。增加 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 是心肌兴奋-收缩偶联的关键因素,那么,低浓度强心苷是通过何种途径增加心肌 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的呢? OUA 在正常台氏液及无钙台氏液中均可浓度依赖的升高 $[\text{Ca}^{2+}]_i$,但细胞在 OUA 10^{-6} mol/L 时升高 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 可伴有细胞挛缩变圆,在无钙台氏液中 OUA(10^{-8} mol/L) 升高的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 减少,提示 OUA 升高 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 既依赖于外钙池,也与内钙池有关。

Haas 等^[16]发现:非中毒浓度的 OUA ($100 \mu\text{mol/L}$) 可使酪氨酸蛋白磷酸化,由此激活 RAS,进一步激活丝裂原活化的蛋白激酶(MAPKs),而激活 MAPK 可通过改变 Na^+,K^+ -ATPase 的膜转运功能或离子通道功能而使 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高,同时升高的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 进一步激活 MAPKs,由此形成一个循环,因此认为 OUA $100 \mu\text{mol/L}$ 可通过 OUA/ Na^+,K^+ -ATPase/Src/EGFR/RAS 级联途径升高 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 且不依赖于细胞内外的 Na^+ 和 K^+ ^[17],且蛋白酪氨酸激酶抑制剂对细胞内钙无明显影响^[7]。本实验也证实蛋白酪氨酸激酶抑制剂 GST 可明显抑制 OUA 对细胞内钙的升高作用,低浓度的 OUA 可使酪氨酸蛋白磷酸化,进一步说明在低浓度的 OUA 升高 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 中,信号转导中蛋白酪氨酸激酶起重要作用。但此低浓度的 OUA 升高细胞内钙的途径是否完全是 Haas 等^[16]所说的途径,还有待进一步的实验证实。

[参 考 文 献]

[1] Langer G A. The “sodium pump lag” revisited[J]. J Mol Cell Cardiol,1983,15:647-651.

[2] Stellner K. A new simple assay for determining digoxin serum levels[M]//Denlgered B. Cardiac glycosides. Berlin: Springer Verlag, 1978;22-27.

[3] Gao J, Wymore R S, Wang Y,et al. Isoform-specific stimulation of cardiac Na/K pump by nanomolar concentrations of glycosides[J]. J Gen Physiol, 2002,119:297-312.

[4] Hougen T J, Spicer N, Smith T W. Stimulation of monovalent cation active transport by low concentration of cardiac glycosides. Role of catecholamines[J]. J Clin Invest, 1981, 68: 1207-1214.

[5] Ghysel-Burton J, Godfraind T. Stimulation and inhibition of the sodium pump by cardiotonic steroids in relating to their binding sites and their inotropic effect on guinea pig isolated atria[J]. Br J Pharmacol, 1979,66:175-184.

[6] Su S W, Wang Y L. Effects of low concentrations of strophanthidin on cardiac function and Na^+,K^+ -ATPase activity in isolated heart of guinea pig[J]. Chin J Pharma Toxic,2003, 66: 175-188.

[7] Tian J, Gong X H, Xie Z. Signal-transducing function of Na^+,K^+ -ATPase is essential for ouabain's effect on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in rat cardiac myocytes[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol,2001, 281:H1899-H1907.

[8] Scheinet-Bobis G, Schoner W. A fresh facet for ouabain action [J]. Nat Med,2001,7:1288-1289.

[9] Lopina O D. Interaction of Na, K-ATPase catalytic subunit with cellular proteins and other endogenous regulations[J]. Biochemistry(Mosc),2001,66:1122-1131.

[10] Xie Z, Askari A. Na^+/K^+ -ATPase as a signal transducer[J]. Eur J Biochem,2002,269: 2434-2439.

[11] Wang Y, Gao J, Mathias R T, et al. α -Adrenergic effects on Na^+/K^+ pump current in guinea pig ventricular myocytes[J]. J Physiol,1998,509(Pt1):117-128.

[12] Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, et al. Genistein, a special inhibitor of tyrosine-specific protein kinases[J]. J Biol Chem, 1987,262:5592-5595.

[13] Yin J X, Wang Y L, Li Q. Effects of low concentration of dihydroouabain on intracellular calcium in guinea pig ventricular myocytes[J]. Acta Physiol Sin,2002, 54: 385-389.

[14] 尹京湘,王永利,李 清. 低浓度强心苷对豚鼠心室肌细胞 Na^+/K^+ 泵电流的激活作用[J]. 心脏杂志,2003,15:300-302.

[15] Su S W, Wang Y L, Li J X. Relationship between cardiotonic effects and inhibition on cardiac sarcolemma Na^+,K^+ -ATPase of strophanthidin at low concentration[J]. Acta Pharmacol Sin, 2003,24:1103-1107.

[16] Haas M, Askari A, Xie Z. Involvement of Src and epidermal growth factor receptor in the signal transducing function of Na^+,K^+ -ATPase[J]. J Biol Chem,2000,275:27832-27837.

[17] Liu J, Tian J, Haas M, et al. Ouabain interaction with cardiac Na^+/K^+ -ATPase independent of changes in intracellular Na^+ and Ca^{2+} concentrations [J]. Biol Chem, 2000, 275: 27838-27844.