

文章编号: 1000-5013(2008)03-0395-04

氯苄基四氢小檗碱对大鼠肥厚心肌 中 K_{ATP} 通道表达的影响

刘 青¹, 戴德哉²

(1. 华侨大学 材料科学与工程学院, 福建 泉州 362021; 2. 中国药科大学 药理研究室, 江苏 南京 210009)

摘要: 观察心梗诱导的大鼠肥厚心肌中三磷酸腺苷(ATP) 敏感性钾离子通道(K_{ATP}) 的表达, 并探讨其影响因素. 将雄性大鼠随机分为 5 组, 分别是假手术组, 手术组, 普萘洛尔组, 氯苄基四氢小檗碱组及内皮素受体拮抗剂组. 手术组及药物组的大鼠结扎冠脉左前降支, 术后饲养 10 d, 药物组于术后第 6 天开始给药, 共给药 5 d, 由反转录-多聚酶链式反应(RT-PCR) 方法确定 K_{ATP} 通道的 mRNA 表达. 实验结果表明, 心梗诱导的大鼠肥厚心肌中的 K_{ATP} 通道的 mRNA 表达明显上调, 经药物干预后有不同程度的降低. 心梗诱导的大鼠肥厚心肌中的 K_{ATP} 通道的 mRNA 的表达上调, 其表达上调除与 β 受体有关外, Ca^{2+} 离子可能参与对 K_{ATP} 通道表达的影响.

关键词: 心肌肥厚; 心梗; ATP 敏感性钾离子通道; 反转录-多聚酶链式反应

中图分类号: R 972; R-332

文献标识码: A

ATP 敏感性钾离子通道(K_{ATP}) 属于内向整流型钾通道, 是由两个亚基组成的异源多聚体^[1]. 生理情况下心血管 K_{ATP} 通道处于关闭状态, 但在某些病理情况下该通道被激活, 开放的 K_{ATP} 通道通过影响细胞的兴奋性而参与细胞诸多功能的调节. 目前, 有关 K_{ATP} 通道与心肌缺血、缺血预适应的研究报道较多^[2-3]. K_{ATP} 通道在众多心血管系统疾病如心肌缺血、缺血预适应、心律失常、高血压等的病理生理过程中起重要作用^[2-6]. 心梗后心肌组织可发生肥厚, 肥厚的心肌有心肌缺血的倾向, 并可导致多种心血管疾病的发生. K_{ATP} 通道表达变化情况在国内研究中未见报道. 本文通过 RT-PCR 方法测定 K_{ATP} 通道 mRNA 表达变化, 并探讨引起变化的因素.

1 材料与方法

1.1 材料

(1) 试剂. dNTP, Oligo(dt) 18, Taq DNA Polymerase, AMV Reverse Transcriptase, RNAase Inhibitor (美国 Promega 公司); Trizol(美国 Gibco 公司); DEPC(上海生物工程有限公司); 琼脂糖(江苏南京创瑞生物技术公司); PCR 引物(上海生物工成公司); MDA, SOD 试剂盒(江苏南京建成试剂公司); 其他均为市售分析纯试剂.

(2) 仪器. 电泳仪、电泳槽(北京六一仪器厂), 低温冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司), GDS 8000 型凝胶成像分析系统(英国 Syngene 公司).

(3) 实验用动物. 雄性(Sprague-Dawley, SD) 大鼠, 70 只, 体质量 220~250 g(上海中科院实验动物中心, 许可证号 SCXK(沪));

(4) 药物. 氯苄基四氢小檗碱(CPU-86017, 中国山东新华制药股份公司), 普萘洛尔(Propranolol, 江苏无锡第四制药厂), 内皮素受体拮抗剂(CPU-0213, 中国药科大学新药中心合成的非肽类内皮素受体拮抗剂, 白色结晶, 水溶性较差, 相对分子质量为 525).

收稿日期: 2007-11-17

作者简介: 刘 青(1970-), 女, 讲师, 博士, 主要从事心血管药理学研究. E-mail: liuq@hqu.edu.cn.

基金项目: 国家自然科学基金重点资助项目(30230170); 华侨大学科研启动基金资助项目(05BS301)

1.2 方法

1.2.1 动物模型 将70只体质量为220~250 g的雄性SD大鼠随机分为5组,分别是假手术组(Control)、手术组(Model)、药物干预组普萘洛尔组(Propranolol,皮下注射8 mg·(kg·d)⁻¹)、氯苄基四氢小檗碱组(CPU-86017,皮下注射8 mg·(kg·d)⁻¹)及内皮素受体拮抗剂组(CPU-0213,皮下注射30 mg·(kg·d)⁻¹).除假手术组的大鼠不结扎外,手术组和药物干预组大鼠结扎冠脉左前降支,术后饲养10 d.药物干预组的大鼠于术后第6天开始给药,共干预5 d.

1.2.2 心脏质量指标的测定 开胸后迅速取出心脏,称量小鼠心脏质量 m_H ,然后沿室间隔剔除心房和右心室,称量左心室的质量 m_{LV} (含室间隔).以 m_H/m_B 为心脏指数, m_{LV}/m_B 为心室指数.其中, m_B 为小鼠体质量.标本称量后迅速置于液氮中3 h,然后放入-70℃冰箱存贮备用.

1.2.3 K_{ATP} 的mRNA表达确定 采用半定量RT-PCR方法,确定 K_{ATP} 的mRNA表达.

- (1) 总RNA提取及检测.
- (2) 提取第1链cDNA.
- (3) K_{ATP} 引物序列^[4].上游引物:5'-CGA TCA CCA GAA CTC AGC AA-3',下游引物:5'-GAG TGA ACT GTC GCA CCA GA-3',其产物大小为209 bp.以GAPDH mRNA为内参,引物序列为上游引物:5'-GCT GGG GCT CAC CTG AAG G-3',下游引物:5'-GGA TGA CCT TGC CCA CAG CC-3',其PCR产物大小为343 bp.循环变性:94℃,30 s;退火:62℃,30 s;延伸:72℃40 s;循环30次;终末延伸72℃,10 min.
- (4) PCR扩增产物用质量分数为1.7%的琼脂糖凝胶电泳,并经凝胶成像系统(UVP)扫描处理仪(美国)分析,以目的基因mRNA扩增后产物的紫外光密度 D 值与内对照GAPDH mRNA扩增后产物紫外 D 值的比值,作为目的基因的mRNA相对值.

1.3 统计学处理

采用 t 检验,所有数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示, $P<0.05$ 及 $P<0.01$ 为有显著性统计学差异.

2 实验结果

2.1 心脏指数及心室指数结果

心梗后心脏指数增大,心室指数增大($P<0.05$).心脏指数、心室指数增大的原因是,一方面术后大鼠体质量 m_B 下降,另一方面心脏质量 m_H 增加.给予药物Propranolol和CPU-86017后,大鼠心脏指数及心室指数明显下降($P<0.05$);给予药物CPU-0213后,大鼠心室指数明显下降而心脏指数有下降的趋势,但无统计学差异,结果如表1所示.表1中,^b $P<0.05$,^c $P<0.01$ (相对于假手术组);^e $P<0.05$,^f $P<0.01$ (相对于手术组).

表 1 大鼠心室指数与心脏指数的变化

Tab.1 Changes of left ventricular weight index and heart weight index of rats

实验组	n	m_B/g	m_H/g	m_{LV}/g	$m_H\cdot m_B^{-1}/mg\cdot g^{-1}$	$m_{LV}\cdot m_B^{-1}/mg\cdot g^{-1}$
假手术组	7	275.42±17.54	0.90±0.05	0.68±0.04	3.27±0.11	2.48±0.00
手术组	6	256.50±15.55	0.94±0.09	0.69±0.04	3.69±0.49 ^b	2.70±0.25 ^b
药物干预组普萘洛尔组	6	316.01±28.49 ^f	0.99±0.08	0.75±0.08	3.14±0.11 ^e	2.38±0.11 ^e
氯苄基四氢小檗碱组	7	276.57±25.06	0.90±0.09	0.66±0.08	3.27±0.12 ^e	2.39±0.14 ^e
内皮素受体拮抗剂组	7	319.00±37.94 ^f	1.05±0.11	0.76±0.10	3.30±0.11	2.40±0.10 ^e

2.2 心肌组织中SOD及MDA的测定

心梗后大鼠心肌组织中的SOD(超氧化物歧化酶)活性明显降低($P<0.05$),MDA(丙二醛)质量浓度增高.药物干预后SOD活性升高,第3、4组SOD活性升高显著($P<0.05$),第5组大鼠血清中SOD的活性有升高的趋势,但无统计学差异.药物干预后,心肌组织中氧化脂质产物MDA的质量摩尔浓度 $m(MDA)$ 有不同程度的降低,如表2所示.表2中,^b $P<0.05$,^c $P<0.01$ (相对于假手术组);^e $P<0.05$,^f $P<0.01$ (相对于手术组).

2.3 大鼠心肌组织中 K_{ATP} 的mRNA表达结果

表 2 大鼠心肌组织中 SOD 活性及 MDA 浓度的变化

Tab. 2 Changes of myocardial SOD activity and MDA content in myocardial rats

实验组	<i>n</i>	<i>u</i> (SOD) / pkat • g ⁻¹	<i>m</i> (MDA) / μmol • g ⁻¹
假手术组	7	3. 36 ± 0. 30	37. 17 ± 3. 83
手术组	6	1. 17 ± 0. 48 ^b	43. 34 ± 7. 33 ^b
药物干预组普萘洛尔组	6	3. 30 ± 0. 20 ^e	37. 34 ± 6. 50
氯苄基四氢小檗碱组	7	3. 76 ± 0. 90 ^e	39. 51 ± 8. 67
内皮素受体拮抗剂组	7	3. 01 ± 0. 69	41. 34 ± 13. 00

图 1 为心肌中 K_{ATP} mRNA 和 GAPDH 的电泳图. 由图 1 可知, 模型组大鼠心肌中 K_{ATP} 的 mRNA 表达上调, 经药物干预后, 普萘洛尔组、氯苄基四氢小檗碱组和内皮素受体拮抗剂组的 K_{ATP} 的 mRNA 的表达下调. 其中, *n* = 4, ^b*P* < 0. 05(相比假手术组). 以 GAPDH 的表达为内参, 各实验组的扩增条带的光密度值经与 GAPDH 扩增条带的光密度值校正后进行比较, 相对的 K_{ATP} mRNA 的表达结果统计值(*x*), 如图 2 所示. 其中, *n* = 4, ^b*P* < 0. 05, ^c*P* < 0. 01(相比假手术组), ^e*P* < 0. 05, ^f*P* < 0. 01(相比手术组).

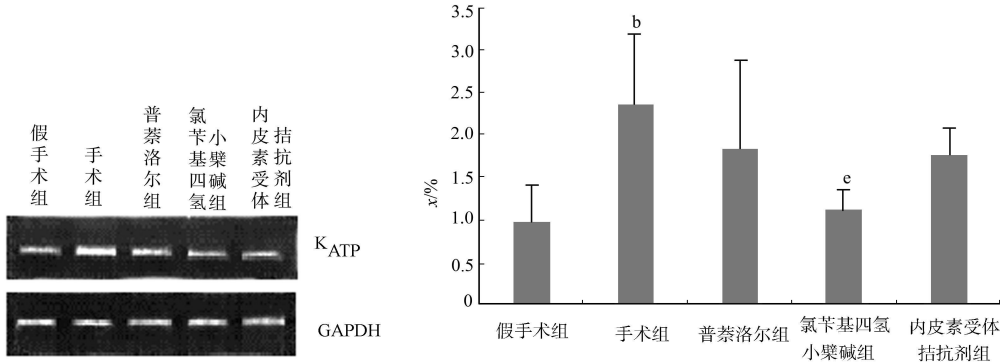


图 1 K_{ATP} mRNA 和 GAPDH 的电泳图

Fig. 1 RT-PCR products of KATP mRNA and GAPDH

图 2 相对的 K_{ATP} mRNA 的表达结果统计

Fig. 2 The relative expression date of KATP mRNA was summarized

3 讨论

心梗可导致心肌肥厚, 冠脉结扎 10 d 后, 大鼠心脏指数、心室指数明显增大, 心梗诱导的心肌肥厚模型是成功的. 心肌肥厚模型中脂质过氧化产物 MDA 的质量分数增大, SOD 的活性显著降低, 提示肥厚心肌中自由基增多. RT-PCR 结果显示, 心梗诱导的心肌肥厚模型中 K_{ATP} 通道的 mRNA 表达的表达式上调, K_{ATP} 通道的 mRNA 表达上调可能与肥厚心肌存在缺血倾向. 自由基增多导致钙超载, 能量代谢障碍有关, ATP 不足激活 K_{ATP} 通道.

CPU-0213 是非肽类内皮素受体拮抗剂, 其抗自由基作用和逆转心肌肥厚的作用不强, 不能改善心肌缺血的状态. CPU-0213 组的大鼠心肌组织中 K_{ATP} 通道的 mRNA 表达仅有下降趋势, 无统计学差异. CPU-86017 是中国药科大学 1986 年合成的小檗碱衍生物, 本试验显示有抗自由基作用, 能逆转心肌肥厚, 改善心肌缺血. 有报道 CPU-86017 除有较弱的 β 受体阻断作用外, 还有较强的 Ca²⁺ 离子阻断作用^[7], 给予 CPU-86017 后大鼠心肌中 K_{ATP} 通道的 mRNA 表达明显下调.

Propranolol 是非选择性的 β 受体阻断剂, 试验结果表明, 它有抗自由基作用, 能逆转心梗诱导的心肌肥厚, 改善心肌缺血. Propranolol 组的大鼠心肌中 K_{ATP} 通道的 mRNA 表达有下降趋势但不显著. 表明在心梗诱导的心肌肥厚模型中影响 K_{ATP} 通道的 mRNA 表达的因素较复杂, 除 β 受体外, Ca²⁺ 离子可能参与对 K_{ATP} 通道表达的影响, Ca²⁺ 离子对 K_{ATP} 通道的 mRNA 表达影响还需进一步研究.

参考文献:

[1] AGUILAR-BRYAN L, CLEMENT J, GONZALEZ G, et al. Toward understanding the assembly and structure of K_{ATP} channels. [J]. Physiol Rev, 1998, 78(1): 227-245.

- [2] BERNARDO N, OKUBO S, MAAIEH M, et al. Delayed preconditioning with adenosine is mediated by opening of ATP-sensitive K^+ channel in rabbit heart [J]. Am J Physiol, 1999, 277(1-2): H 128-H 135.
- [3] LIU Y, SATO T, Ó ROURKE B, et al. Mitochondrial ATP-dependent potassium channels: Novel effectors of cardioprotection [J]. Circulation, 1998, 97(24): 2463-2469.
- [4] LEE K, DIXON A, RICHARDSON P, et al. Glucose-receptive neurones in the rat ventromedial hypothalamus express K_{ATP} channels composed of Kir 6.1 and SUR 1 subunits [J]. J Physiol, 1999, 515(2): 439-452.
- [5] TAKABA H, NAGAO T, IBAYASHI S. Altered cerebrovascular response to a potassium channel opener in hypertensive rats [J]. Hypertension, 1996, 28(1): 143-146.
- [6] LIU Y, GUTTERMAN D. Oxidative stress and potassium channel function [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2002, 29(4): 305-311.
- [7] 蒋建敏, 戴德哉, 许实波. 对氯苄基四氢小檗碱对正常及甲状腺功能亢进大鼠离体主动脉环的作用 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 1999, 13(2): 131-133.

The Expression of ATP-Sensitive Potassium (K_{ATP}) Channel in Infarct Produced Myocardial Remodeling of Rats

LIU Qing¹, DAI De-zai²

(1. College of Material Science and Engineering, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China;

2. Institute of Molecular Medicine, Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract: Aim to observe the expression of ATP-sensitive potassium (K_{ATP}) channel in infarct produced myocardial remodeling and the factors were studied. Methods: male sprague-dawley rats randomly divided into five groups, sham-operated, operated and three treatment groups including propranolol, *p*-chlorobenzyltetrahydroberberine and endothelin receptor antagonist. Myocardial infarction was induced by the left anterior descending coronary artery was ligated with a silk suture. Sham-operated controls were treated likewise, except that the suture around the coronary artery was not closed. From 5 d the treatment groups were administered drugs after coronary artery ligation. All animals were killed on 10 d after ligation. The expression of mRNA for K_{ATP} channels was studied in rat hypertrophic myocardium using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Results: The expression of K_{ATP} channel in infarct produced myocardial remodeling displayed up-regulated. After treatment the expression of K_{ATP} channel shown down-regulated in different degree. Conclusion: The expression of K_{ATP} channel in infarct produced myocardial remodeling displayed up-regulated. The factors involved in Ca^{2+} except β receptor, the effect of Ca^{2+} on the expression of K_{ATP} in infarct produced myocardial need study more.

Keywords: remodeling myocardium; infarct; ATP-sensitive potassium channels; reverse transcription-polymerase chain reaction

(责任编辑: 陈志贤 英文审校: 陈国华)