

· 实验研究 ·

## 慢性缺氧对幼鼠心肌 CaM CaMKII 及细胞内 Ca<sup>2+</sup> 活动的影响

赵鹏军, 潘骏, 李奋, 孙锬

(上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心, 上海 200127)

**[摘要]** 目的 急性缺血缺氧可致心功能受损和心律失常, 钙离子在其中起重要作用, 慢性缺氧对心功能及心肌细胞内钙离子活动同样产生影响, 但机制不同。该研究拟通过慢性缺氧动物模型, 研究慢性缺氧对心肌细胞内钙调素 (calmodulin, CaM)、钙/钙调素依赖性蛋白激酶 II (calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, CaMKII) 的表达及其对细胞内 Ca<sup>2+</sup> 活动的影响, 深入了解慢性缺氧对心脏功能及电活动的影响机制。**方法** 通过吸入低浓度含氧气体 (FiO<sub>2</sub>:10%) 建立慢性缺氧大鼠动物模型。在实验 1 周和 3 周时, 应用 RT-PCR, Western Blot 方法分别检测对照组和慢性缺氧组动物心肌细胞内 CaM 和 CaMKII $\gamma$ 、CaMKII $\delta$  mRNA 和蛋白表达; 分离并培养正常心肌细胞和缺氧 3 周细胞, 应用激光共聚焦法分别检测两种心肌细胞内 Ca<sup>2+</sup> 活动, 同时应用 CaMKII 特异性抑制剂 KN-62, 观察 CaMKII 在慢性缺氧下对心肌细胞内 Ca<sup>2+</sup> 活动的影响。**结果** 实验 1 周和 3 周时, 慢性缺氧大鼠心肌细胞内 CaM 和 CaMKII $\gamma$ 、CaMKII $\delta$  的 mRNA 和蛋白表达均较正常动物高 ( $P < 0.01$ ); 在缺氧 1 周和 3 周组动物间 CaM 和 CaMKII $\delta$  也存在差异 ( $P < 0.01$ ), 但 CaMKII $\gamma$  无差异 ( $P > 0.05$ )。激光共聚焦研究发现, 慢性缺氧心肌细胞内 Ca<sup>2+</sup> 活动其钙波振幅虽和正常心肌细胞无差异 ( $P > 0.05$ ), 但钙波时程延长 ( $P < 0.01$ ); 应用 KN-62 后, 慢性缺氧动物钙波振幅和时程改变较明显 ( $P < 0.01$ )。**结论** 慢性缺氧可使大鼠心肌细胞内 CaM 和 CaMKII 合成代偿性增加, 保持大鼠心肌细胞内钙稳态, 从而在一定时期内维持心功能稳定。但随缺氧时间延长, 心功能可受损并可致心律失常。

[中国当代儿科杂志, 2008, 10(3):381-385]

**[关键词]** 慢性缺氧; 钙调素; 钙/钙调素依赖性蛋白激酶 II 钙离子; 心律失常; 大鼠

**[中图分类号]** R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2008)03-0381-05

### Effects of chronic hypoxia on the expression of calmodulin and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and the calcium activity in myocardial cells in young rats

ZHAO Peng-Jun, PAN Jun, LI Fen, SUN Kun. Shanghai Children's Medical Center, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200127, China (Email: pjunzhao@sina.com)

**Abstract: Objective** Calcium plays an important role in the impairment of heart function and arrhythmia under the condition of acute hypoxia, but the mechanism is different from that of chronic hypoxia. This study aimed to evaluate the effect of chronic hypoxia on the expression of calmodulin (CaM) and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) and the calcium activity in myocardial cells through an animal model of chronic hypoxia in order to get a deeper sight into the mechanism. **Methods** A chronic hypoxia model of the rat was prepared by hypoxia exposure (FiO<sub>2</sub> = 10%). The expression of mRNA and protein of CaM and CaMKII $\gamma$  and CaMKII $\delta$  in myocardial cells were measured by RT-PCR and Western Blot in normal rats and hypoxia rats 1 and the 3 weeks after exposure. The cardiac cells of the rats from the control group and the 3-week hypoxia group were cultured. Then the intracellular calcium activity was detected using laser confocal equipment. The effect of CaMKII on the calcium activity in myocardial cells was evaluated by the application of KN-62 (CaMKII specific inhibitor). **Results** The expression of CaM, CaMKII $\gamma$  and CaMKII $\delta$  mRNA in myocardial tissues increased in hypoxia rats compared with that in normal controls ( $P < 0.01$ ). The CaM and CaMKII $\delta$  mRNA expression was different between the 1-week and the 3-week hypoxia groups ( $P < 0.01$ ). The laser confocal demonstrated that the amplitude of calcium wave in hypoxic myocardial cells was not different from that in normal controls, but the duration of calcium wave in hypoxic myocardial cells was longer than that in normal controls ( $P < 0.01$ ). After KN-62 use, the amplitude of calcium wave decreased and the duration of calcium wave prolonged significantly. **Conclusions** The contents of CaM and CaMKII in myocardial cells increased under condition of chronic hypoxia as a compensation to

[收稿日期]2007-05-09; [修回日期]2007-12-04

[作者简介]赵鹏军,男,博士,主治医师。主攻方向:小儿先天性心脏病发病机制的分子生物学研究。

[通讯作者]孙锬,教授,上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心,邮编:200127。

keep calcium homeostasis in a certain time. With more prolonged hypoxia time, abnormal electric activities of heart occurred and the heart function may be impaired. [Chin J Contemp Pediatr, 2008, 10 (3):381-385]

**Key words:** Chronic hypoxia; Calmodulin; Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II; Arrhythmia; Rats

慢性缺氧对心、肺的损伤是许多疾病发展过程中重要的病理改变,在成人主要见于冠心病、慢性阻塞性肺病和高原病<sup>[1]</sup>;儿童则主要见于先天性支气管肺发育不良、严重的哮喘、睡眠呼吸暂停和某些青紫型先天性心脏病如法洛四联症、单心室等<sup>[2,3]</sup>。慢性缺氧可通过直接和间接作用影响心脏功能。缺氧可直接作用于血管平滑肌细胞,使其收缩造成肺血管阻力增加;其次,缺氧使一些介质如血管紧张素、白介素和内皮素(ET)等表达增高,作用肺实质和肺血管,使血管内皮增厚、平滑肌增生,最终形成肺高压和肺心病,从而影响心脏功能。

慢性缺氧对心脏的影响表现多样,机制复杂,缺氧后心脏形态和功能改变及其生物学机制尚不明了。心脏维持正常的功能与心肌细胞内Ca<sup>2+</sup>循环以及细胞内外的钙稳态有直接关系。心肌细胞内Ca<sup>2+</sup>循环主要由CaM和CaMKII调节。有研究表明<sup>[4]</sup>,通过环缩肺动脉,增加心脏后负荷可使心肌细胞CaMKII的量增加和活性增强。同样,慢性缺氧可造成心肌细胞内CaMKII的活性增加,但慢性缺氧导致CaMKII活性增加的机制尚不清楚。目前国内对CaMKII的研究仅局限于神经系统,对心脏组织中CaMKII功能的研究尚缺乏<sup>[5]</sup>。

本研究通过吸入低氧浓度气体建立缺氧大鼠动物模型,模拟临床低张性慢性缺氧疾病的病理改变,应用RT-PCR、Western Blot等方法分别研究慢性缺氧情况心肌细胞CaM和CaMKII改变,并通过激光共聚焦法检测心肌细胞内Ca<sup>2+</sup>活动,以观察慢性缺氧对心功能造成的影响并进一步探讨其影响机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

Sprague-Dawley大鼠(上海西普尔-必凯动物实验中心提供)21只,雄性,出生20d。随机分为3组,分别为正常对照组,缺氧1周和3周组。

### 1.2 实验方法

1.2.1 慢性缺氧动物模型的建立 Sprague-Dawley大鼠,生长在自制缺氧箱中,吸入气体FiO<sub>2</sub>:10%,10~12h/d,持续1周及3周。箱内放钠石灰和氯化钙以吸收CO<sub>2</sub>和水;对照组动物吸入正常气体,其余喂养条件相同。

1.2.2 RT-PCR检测心肌细胞CaM、CaMKII mRNA的表达 利用TRIzol (Invitrogen Life Technologies, California USA)法提取组织总RNA,然后通过常规反转录-扩增法检测目的基因的mRNA表达。CaMI上游引物5'GTCAGAACCCAACAGAGGCT3'下游引物5'GCAGGACCACCAACCAATAC3'其PCR产物为519bp;CaMKII $\gamma$ 上游引物5'TTTTCAGTTG-GCAGGCAGAG3'下游引物5'GGTTTGTGGCTC-CATTAGGTG3'其PCR产物为159bp;CaMKII $\delta$ 上游引物5'AACTGGCAGACTTCGGCTTAG3'下游引物5'GTTTCGGTGGGACATAAGGTT3'其PCR产物为1093bp。内参基因均为 $\beta$ actin上游引物5'CCTG-TACGCCAACACAGTGC3'下游引物5'ATACTCCT-GCTTGCTGATCC3'其PCR产物为211bp。用MMLV逆转录酶(Promega)在37℃1h逆转录合成cDNA。CaMKII $\delta$ 的PCR扩增顺序为95℃,5min预变性,94℃,1min;56℃,1min;72℃,1min,循环30次,最后72℃延伸5min。CaMI、CaMKII $\gamma$ 和 $\beta$ -actin的退火温度分别为57℃,54℃和55℃,其余均相同。PCR产物与100bp DNA Ladder(华美生物工程公司)在2%琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,紫外光度仪观察结果,电泳结果保存系统保存。并用定量分析软件(Tanon GIS 1D图像分析软件Ver. 3.73上海天能科技有限公司)进行分析,两条带强度比(目的基因/ $\beta$ -actin)为基因表达的相对值。

1.2.3 Western Blot检测心肌细胞CaM、CaMKII的蛋白合成 刀片将组织切小块,加入冰浴的RIPA缓冲液(1×PBS,1% Nonidet P-40,0.5% sodium deoxycholate,0.1% SDS),并加入10mg/mL PMSF(Santa Cruz Biotechnology, California, USA),研磨裂解,冰浴30min,放离心管中4℃下10000r/min离心10min,所得上清液为细胞裂解液。BCA法进行蛋白质浓度测定(Pierce Biotechnology, Inc. IL, USA),每个样品取50 $\mu$ g加等体积的2×SDS(125mM Tris-HCl(pH 6.8,25℃),4% W/V SDS,20%甘油,100mM DTT,0.02% W/V溴酚蓝)上样缓冲液并煮沸4min。然后,每个样品以及生物素结合的蛋白质标准(Cell Signaling Technology, MA, USA)各取10 $\mu$ L点样。以12%非连续Tris2 SDS聚丙烯酰胺凝胶垂直平板电泳系统(SE 250,美国Hoefer公司)电泳3~5h后取下凝胶,将胶及硝酸

纤维素膜(美国 Sigma 公司) 夹于滤纸之间放入电转移槽中,电转印 8 ~ 12 h;将硝酸纤维素膜漂洗后分别羊抗大鼠 CaMIgG、羊抗大鼠 CaMK II  $\gamma$  IgG 或羊抗大鼠 CaMKII $\delta$ IgG(1:1 000,美国 Santa Cruz Biotechnology) 室温反应 1 h,漂洗后再在辣根过氧化物酶标记的兔抗山羊二抗(1:1 500) 中各反应 1 h,在 SuperSignal West Pico 化学发光试剂盒(Pierce Biotechnology, Inc. IL, USA) 中反应 5 min, X 线胶片曝光、显影、定影。将 X 线胶片置于凝胶扫描成像分析系统(Tanon GIS 1D 图像分析软件 Ver. 3.73 上海天能科技有限公司) 测定目标带单位密度,和内参蛋白 GAPDH 条带比较后统计分析。

**1.2.4 激光共聚焦检测心肌细胞内  $Ca^{2+}$  活动**  
加入混合酶解液(0.25% 胰酶 + 0.1% 胶原酶等体积混合)10 mL,37.0 $^{\circ}$ C 水浴恒温振荡器(100 r/min) 中消化 15 min,自然沉淀,弃上清。采用分次消化法进行组织消化,直至组织完全消化完,收集细胞并逐步复钙,放入培养皿中培养 24 h,细胞鉴定后做激光共聚焦实验。取出细胞贴壁较好的玻片,放入孵育皿中,加入 1 mL DMEM 培养液和 10  $\mu$ L Furo-3-AM 荧光探针,37.0 $^{\circ}$ C 恒温箱中孵育 30 min。弃去上清液,用 DMEM 液洗涤 3 次,然后加入 1 mL 培养液。将标本放在激光共聚焦细胞分析仪的载物台上,每个视野下取 10 ~ 15 个细胞同时进行图像扫描,扫描设置:3 s 一帧,连续扫描 100 帧。在扫描 10 帧图像时加入 5  $\mu$ L 去甲肾上腺素,使终浓度达  $10^{-5}$ 。实验组,取出细胞贴壁较好的玻片,放入孵育皿中,加入 1 mL DMEM 培养液和 10  $\mu$ L Furo-3-AM 荧光探针,37.0 $^{\circ}$ C 恒温箱中孵育 30 min,然后加入 KN-62,使浓度达到 0.01  $\mu$ M/mL,恒温箱中孵育 20 min,进行扫描测定,其余设定同对照组。用 Carl Zeiss LSM5 Image browser 软件对扫描图像进行量化分析。

### 1.3 统计学处理

用 SPSS for windows 11.5 进行数据处理,数据由均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,组内差异比较采用 *t* 检验,组间差异性比较采用方差分析。

## 2 结果

### 2.1 RT-PCR 结果

慢性缺氧对大鼠心肌细胞 CaMI 及 CaMKII mRNA 表达的影响(表 1)。CaMI, CaMKII $\delta$  mRNA 在正常组和缺氧 1 周组,缺氧 3 周组之间,以及缺氧 1

周和 3 周之间比较:差异均有显著性( $P < 0.01$ ); CaMKII $\gamma$  的 mRNA 表达却不同,正常组和缺氧 1 周组、缺氧 3 周组比较,差异有显著性( $P < 0.01$ );但缺氧 1 周组与缺氧 3 周组之间差异无显著性。

### 2.2 Western Blot 结果

慢性缺氧对大鼠心肌细胞 CaM、CaMKII 蛋白合成的影响(表 2)。CaMI 和 CaMKII  $\delta$  正常组和缺氧 1,3 周组以及缺氧 1,3 周组之间差异有显著性(均  $P < 0.01$ ),而 CaMKII $\gamma$  则只是正常组和缺氧组有差异,缺氧组之间差异无显著性。

### 2.3 激光共聚焦实验结果

正常组和慢性缺氧组心肌细胞内  $[Ca^{2+}]_i$  的变化趋势见表 3,图 1,2。实验发现,在去甲肾上腺素(NA)作用下两组心肌细胞钙波幅度无明显差异;但缺氧组钙波变化时程较正常大鼠明显延长( $P < 0.05$ )。用 KN-62 处理的正常组和慢性缺氧组心肌细胞在 NA 作用下,慢性缺氧心肌细胞钙波振幅下降较明显,两组细胞钙波幅度差异有显著性( $P < 0.05$ );但慢性缺氧组钙波变化时程较正常大鼠延长,两者差异有显著性( $P < 0.05$ )。

表 1 正常组和慢性缺氧组心肌细胞 CaM、CaMKII 基因扩增相对值

分组	CaMI	CaMKII $\delta$	CaMKII $\gamma$
实验 1 周 正常组	0.11 $\pm$ 0.01	0.501 $\pm$ 0.07	0.391 $\pm$ 0.04
实验 1 周 慢性缺氧组	0.192 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.814 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.594 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>
实验 3 周 正常组	0.125 $\pm$ 0.02	0.532 $\pm$ 0.12	0.387 $\pm$ 0.02
实验 3 周 慢性缺氧组	0.312 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	1.525 $\pm$ 0.28 <sup>a</sup>	0.563 $\pm$ 0.06

a:与同期正常组、实验 1 周组与实验 3 组比较,均  $P < 0.01$

表 2 正常和慢性缺氧大鼠心肌细胞中 CaM 和 CaMKII 蛋白含量相对值

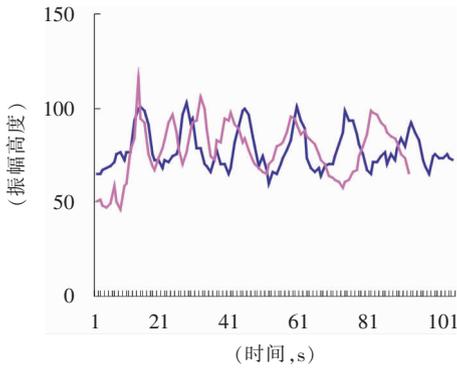
分组	CaMI	CaMKII $\delta$	CaMKII $\gamma$
实验 1 周 正常组	0.074 $\pm$ 0.02	0.316 $\pm$ 0.03	0.289 $\pm$ 0.05
实验 1 周 慢性缺氧组	0.121 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.601 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	0.726 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>
实验 3 周 正常组	0.082 $\pm$ 0.02	0.376 $\pm$ 0.02	0.341 $\pm$ 0.04
实验 3 周 慢性缺氧组	0.174 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.760 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	0.807 $\pm$ 0.07

a:慢性缺氧 1 周组和正常组,缺氧 1 周组和缺氧 3 周组两者比较,均  $P < 0.01$

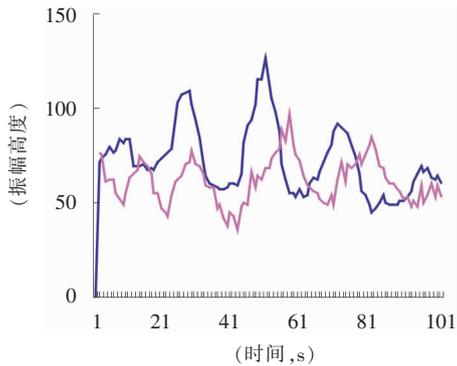
表 3 对照组和实验组中正常和慢性缺氧心肌细胞内  $Ca^{2+}$  变化参数

分组	未用 KN-6 处理		用 KN-62 处理	
	振幅	时程(s)	振幅	时程(s)
正常组	33.63 $\pm$ 1.58	75.85 $\pm$ 7.22	34.06 $\pm$ 2.34	74.4 $\pm$ 4.74
慢性缺氧组	32.91 $\pm$ 2.41	89.56 $\pm$ 12.45 <sup>a</sup>	29.82 $\pm$ 3.41 <sup>a</sup>	93.86 $\pm$ 12.7 <sup>a</sup>

a:正常组和慢性缺氧组之间比较, $P < 0.05$



**图1 两组心肌细胞在NA作用下,细胞内[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>的变化趋势** 实验发现,缺氧组钙波变化时程较正常大鼠明显延长。黑色代表正常组,灰色代表慢性缺氧组。



**图2 用KN-62处理的正常组和慢性缺氧组心肌细胞在NA作用下,细胞内[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>变化趋势** 实验发现,用KN-62处理后,慢性缺氧心肌细胞钙波振幅下降较明显,两组细胞钙波幅度有显著差异;慢性缺氧组钙波变化时程较正常大鼠延长,两者差异有显著性。黑色代表正常组,灰色代表缺氧组。

### 3 讨论

心脏正常的收缩和舒张功能依赖于心肌细胞内Ca<sup>2+</sup>及时增加和减少而得以实现。心肌细胞除极后, Ca<sup>2+</sup>通过胞膜上L型钙通道进入细胞,激活肌浆网(SR)上钙释放通道 Ryanodine 受体(RyR),使储存的钙大量释放入胞浆引起细胞收缩<sup>[6]</sup>;复极时,通过SR上ATP酶将Ca<sup>2+</sup>被重新摄入SR,使胞浆浓度减少,导致细胞舒张。这一过程进出细胞的Ca<sup>2+</sup>量均较少,细胞内Ca<sup>2+</sup>浓度的改变主要是由于SR对Ca<sup>2+</sup>释放和重吸收所致,而细胞内Ca<sup>2+</sup>循环主要由CaM和CaMKII调节。

CaM由148个氨基酸组成,是心肌细胞内主要的钙结合蛋白,平时无活性。当心肌细胞内Ca<sup>2+</sup>增多时, CaM和Ca<sup>2+</sup>结合形成复合物而被激活,然后作用于腺苷环化酶等,起到调节细胞钙转运、离子通道活性和基因表达、细胞增殖等作用。其对Ca<sup>2+</sup>的调节主要通过两者途径:①作用于胞膜上的L型钙

通道,起易化作用,使其开放能力增加,大量Ca<sup>2+</sup>得以进入细胞<sup>[7]</sup>,②通过作用于底物蛋白CaMKII,调节Ca<sup>2+</sup>在细胞内的循环。

CaMKII是一种色氨酸/丝氨酸激酶,有四个同工酶分别是:α、β、γ和δ,心脏主要为δ<sup>[8]</sup>,它可将底物的丝氨酸/苏氨酸磷酸化而改变其活性。CaMKII主要通过作用于心肌细胞SR上的RyR、受磷蛋白(Phospholamban, PLB)和浆膜上L型钙通道来调节钙活动<sup>[9,10]</sup>。Ca<sup>2+</sup>/CaM复合物激活CaMKII,作用于RyR,延长其开放时间,导致SR内Ca<sup>2+</sup>释放增加;PLB和SR上Ca<sup>2+</sup>/ATP酶结合并抑制其功能,减少钙重摄取,当PLB磷酸化后,这种抑制作用被解除,细胞内增高的Ca<sup>2+</sup>迅速恢复到正常水平,使心肌细胞得以及时舒张<sup>[11,12]</sup>。心脏快速收缩和及时舒张就依赖于这种酶对Ca<sup>2+</sup>调节<sup>[13,14]</sup>。此次研究发现,大鼠心肌细胞内CaM、CaMKII mRNA的表达随缺氧时间处长而逐渐升高,实验末期和实验初期其表达的差异有显著性。蛋白合成的表达也有相同趋势。表明在机体缺氧时,为应对缺氧和酸中毒对细胞内Ca<sup>2+</sup>循环的影响,主要通过代偿性增加CaM和CaMKII合成,从而稳定细胞内Ca<sup>2+</sup>循环,维持细胞功能稳定。

既往有研究表明缺氧和酸中毒使SR上的RyR和Ca<sup>2+</sup>/ATP酶受影响,导致Ca<sup>2+</sup>在细胞内蓄积,此时, CaMKII活性增加,可加速Ca<sup>2+</sup>循环,维持心肌细胞功能稳定<sup>[15]</sup>。本实验采用Furo-3-AM作为Ca<sup>2+</sup>敏感荧光指示剂来标测心肌细胞内游离Ca<sup>2+</sup>,研究慢性缺氧下细胞内Ca<sup>2+</sup>循环,并选用NA作为刺激因子<sup>[16]</sup>,以模拟缺氧对心肌细胞的影响。为进一步探讨CaMKII对心肌细胞内Ca<sup>2+</sup>循环的影响情况,我们用KN-62(CaMKII特异性抑制剂)来处理细胞,观察处理组和对照组之间Ca<sup>2+</sup>循环的异同。实验结果发现,正常心肌细胞和缺氧细胞未用KN-62处理时,用NA刺激后,其钙波的振幅变化值无明显差异;但缺氧细胞钙波时程延长,两者有差异。用KN-62处理后,缺氧心肌细胞钙波振幅下降明显,和正常细胞比较两者有差异;其钙波时程更加延长,和正常细胞比较差异更显著。慢性缺氧时,组织内无氧代谢增加,造成乳酸堆积。细胞内酸中毒可使SR上RyR开放减少,使Ca<sup>2+</sup>释放降低<sup>[17]</sup>。本次实验发现,用NA刺激缺氧的心肌细胞后,其细胞内Ca<sup>2+</sup>振幅和正常细胞比较无明显差异,与以前研究有所不同。应用KN-62后,慢性缺氧心肌细胞Ca<sup>2+</sup>振幅才降低,和正常组有差异。原因可能是当外界刺激因素作用于心肌细胞后, Ca<sup>2+</sup>通过胞膜上L型通道

进入细胞,使细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度增高,随后激活 CaMKII, CaMKII 作用于 SR 上 RyR,使 SR 内  $\text{Ca}^{2+}$  释放。慢性缺氧使 CaMKII 合成增加,  $\text{Ca}^{2+}$  增多后,激活的 CaMKII 也相应增加,这可使 SR 上更多的 RyR 激活,解除酸中毒对 SR 上 RyR 的抑制,使  $\text{Ca}^{2+}$  释放增加。但由于慢性缺氧时心肌细胞 SR 内  $\text{Ca}^{2+}$  含量减少,所以即使较多的 RyR 激活,SR 释放的  $\text{Ca}^{2+}$  量和正常相比亦无太大差异。应用 KN-62 后, CaMKII 活性受抑制,代偿作用消失,从而使缺氧细胞钙波振幅明显减小。

NA 刺激心肌细胞后,慢性缺氧心肌细胞钙波时程延长,和正常细胞比较有差异;应用 KN-62 后,时程延长更明显。钙波时程主要反映细胞内升高的  $\text{Ca}^{2+}$  恢复到正常水平的的时间,其时程延长表明细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度恢复时间延长。细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度降低主要由 SR 重摄取所致,钙波时程延长说明 SR 重摄取  $\text{Ca}^{2+}$  速度减慢。Pei 等<sup>[18]</sup> 研究发现,体外培养的缺氧心肌细胞,虽然 SR 通过 RyR 释放  $\text{Ca}^{2+}$  减少,由于 SR 重摄取减少,所以细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  仍能维持在正常水平。原因是慢性缺氧时,SR 上 SCERA 表达下调,从而使 SR 对  $\text{Ca}^{2+}$  重摄取速度减慢,导致  $\text{Ca}^{2+}$  在细胞内蓄积。本次研究发现,缺氧心肌细胞在 NA 作用下,其钙波时程延长,较正常细胞有明显差异;应用 KN-62 后,延长更明显可能与此有关。慢性缺氧时,虽然心肌细胞内 CaMKII 量增加、活性增强,作用于 PLB 后,使 SR 重摄取  $\text{Ca}^{2+}$  增多,但由于缺氧时 SCERA 的减少,这种代偿作用有限,从而使缺氧心肌细胞钙波时程延长,应用 KN-62 抑制 CaMKII 活性后,时程延长更加明显则充分说明这点。

慢性缺氧造成心肌细胞内 CaM、CaMKII 增加,可稳定细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  循环,有利于维持病理条件下心脏正常的收缩-舒张活动;但长期慢性缺氧导致心肌肥厚,易诱发心律失常应引起足够的重视。

### [参 考 文 献]

[1] Milano G, Corno AF, Lippa S, von Segesser LK, Samaja M. Chronic and intermittent hypoxia induce different degrees of myocardial tolerance to hypoxia-induced dysfunction [J]. *Exp Biol Med* (Maywood), 2002,227(6):389-397.  
[2] Talmaciu I, Ren CL, Kolb SM, Hickey E, Panitch HB. Pulmonary function in technology-dependent children 2 years and older with bronchopulmonary dysplasia [J]. *Pediatr Pulmonol*, 2002, 33(3):181-188.

[3] Gozal D, O'Brien LM. Snoring and obstructive sleep apnoea in children: why should we treat? [J]. *Paediatr Respir Rev*, 2004,5 (Suppl A):S371-376.  
[4] Colomer JM, Mao L, Rockman HA, Means AR. Pressure overload selectively up-regulates  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II in vivo [J]. *Mol Endocrinol*, 2003,17(2):183-192.  
[5] 王庆松,王正国,朱佩芳. 创伤后应激障碍样行为异常大鼠海马  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM 依赖性蛋白激酶表达的研究 [J]. *中华医学杂志*, 2002,82(11):771-774.  
[6] Wehrens XH, Lehnart SE, Reiken SR, Marks AR.  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor [J]. *Circ Res*, 2004,94(6):e61-70.  
[7] Dzhura I, Wu Y, Zhang R, Colbran RJ, Hamilton SL, Anderson ME. C terminus L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel calmodulin-binding domains are 'auto-agonist' ligands in rabbit ventricular myocytes [J]. *J Physiol*, 2003,550 (Pt 3):731-738.  
[8] Guo T, Zhang T, Mestral R, Bers DM.  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation of ryanodine receptor does affect calcium sparks in mouse ventricular myocytes [J]. *Circ Res*, 2006,99(4):398-406.  
[9] Ai X, Curran JW, Shannon TR, Bers DM, Pogwizd SM.  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  leak in heart failure [J]. *Circ Res*, 2005,97(12):1314-1322.  
[10] Mattiazzi A, Vittone L, Mundina-Weilenmann C.  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase: a key component in the contractile recovery from acidosis [J]. *Cardiovasc Res*, 2007,73(4):648-656.  
[11] Guo J, Duff HJ. Calmodulin kinase II accelerates L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current recovery from inactivation and compensates for the direct inhibitory effect of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in rat ventricular myocytes [J]. *J Physiol*, 2006,574(Pt 2):509-518.  
[12] Maier LS. CaMKII $\delta$  overexpression in hypertrophy and heart failure: cellular consequences for excitation-contraction coupling [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2005,38(9):1293-1302.  
[13] DeSantiago J, Maier LS, Bers DM. Frequency-dependent acceleration of relaxation in the heart depends on CaMKII, but not phospholamban [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2002,34(8):975-984.  
[14] Maier LS, Bers DM. Calcium calmodulin, and calcium-calmodulin kinase II: heartbeat to heartbeat and beyond [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2002,34(8):919-939.  
[15] Nomura N, Satoh H, Terada H, Matsunaga M, Watanabe H, Hayashi H. CaMKII-dependent reactivation of SR  $\text{Ca}^{2+}$  uptake and contractile recovery during intracellular acidosis [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002, 283(1):H193-203.  
[16] Calbet JA. Chronic hypoxia increases blood pressure and noradrenaline spillover in healthy humans [J]. *J Physiol*, 2003,551 (Pt 1):379-386.  
[17] Chen X, Zhang X, Kubo H, Harris DM, Mills GD, Moyer J, et al.  $\text{Ca}^{2+}$  influx-induced sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  overload causes mitochondrial-dependent apoptosis in ventricular myocytes [J]. *Circ Res*, 2005,97(10):1009-1017.  
[18] Pei JM, Kravtsov GM, Wu S, Das R, Fung ML, Wong TM. Calcium homeostasis in rat cardiomyocytes during chronic hypoxia: a time course study [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2003, 285(6):C1420-1428.

(本文编辑:吉耕中)