

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

惡性高熱症豬骨骼肌鈣釋放之調控

The regulation of calcium release of skeletal muscle in malignant hyperthermia pigs

計畫編號：NSC 88-2313-B-002-038

執行期限：87年8月1日至88年7月31日

主持人：鍾德憲 國立台灣大學畜產學系

一、中文摘要

人與豬之惡性高熱症是由麻醉劑，如鹵已烷等所引發，主要是因為其骨骼肌中肌漿質網上鈣釋放通道（calcium release channel or ryanodine receptor, RyR）鈣釋放異常而造成。豬除了麻醉劑外，緊迫狀況也會引起病症而猝死（對豬而言，惡性高熱症與緊迫敏感是同等詞），造成畜產業界極大損失。以惡性高熱症豬之肌纖維為實驗樣本，同時測量電荷移動（charge movement）與鈣離子釋放，將可對骨骼肌之興奮—收縮耦合（Excitation-contraction coupling）機制有近一步了解。並藉此找出可能抑制病症之方法，將對畜產業界有所助益。

本計畫目的在以單一肌纖維實驗系統，探討惡性高熱症豬肌纖維中鈣釋放之調控機制。此計畫將分兩部份進行：第一部份將探討鈣釋放如何受電荷移動及肌漿內鈣離子濃度之調控。第二部份則使用已知鈣釋放抑制劑 dantrolene，探討在單一肌纖維條件下對鈣釋放抑制之效果，進一步了解其對興奮—收縮耦合機制之影響。

初步結果顯示：惡性高熱症豬肌纖維之電荷移動與正常豬相似，但對鈣釋放的減能作用，其恢復時間常數則有較長之趨勢，這可解釋部份鈣釋放異常之現象。而

dantrolene 的實驗則顯示，雖可抑制鈣釋放，但在單一肌纖維狀況下，卻無法明確定出抑制鈣釋放所需的濃度。可是，在抑制鈣釋放波形上，卻有特殊性抑制的現象，待更進一步探討。

關鍵詞：骨骼肌、興奮—收縮結合、肌漿質網、鈣釋放通道、電荷移動、惡性高熱症、緊迫敏感、鹵已烷敏感

Abstract

Malignant Hyperthermia (MH) in human and pig was triggered by anesthetics like halothane. This is caused mainly by abnormal calcium release from calcium release channel (CRC) located on sarcoplasmic reticulum (SR) of skeletal muscle. In pigs, it can be triggered by stress alone (also called Porcine Stress Syndrome), cause huge lost in pigs raising industry. The muscle fiber of MH susceptible (or stress susceptible) pig can be used as model sample in experiments to study MH. The charge movement and calcium release can be measured simultaneously to understand the mechanism of excitation-contraction coupling (E-C coupling), which is abnormal in MH muscle. We hope that this study can lead us find out ways to control the syndrome and help the industry.

This project is using single muscle fiber experimental system to study the regulation of

calcium release from SR in muscle from malignant hyperthermia pigs. This project will be conducted in two parts. The first part is to study how calcium release from SR is regulated by charge movement and calcium release. The second part is to study, under single muscle fiber conditions, the effect of muscle relaxant dantrolene on calcium release and further understand its effect on E-C coupling.

Initial results show: the charge movement of malignant hyperthermia muscle fiber is similar with normal one's. Its recovery from Ca inactivation of Ca release has longer time constant than normal one's, which can partially explain the abnormal Ca release of malignant hyperthermia muscle fiber. The dantrolene experiments show that, although it inhibit Ca release, under single muscle fiber condition, it is difficult to ensure the minimum concentration to inhibit Ca release. But on Ca release waveform, dantrolene displays specific inhibiting effect on early rising phase, its significance requires further experiments.

Keywords: Skeletal muscle, excitation-contraction coupling, sarcoplasmic reticulum, calcium release channel, ryanodine receptor, charge movement, malignant hyperthermia susceptible, dantrolene

二、緣由與目的

骨骼肌的收縮是由肌肉橫細管系統 (transverse tubular system) 薄膜的去極化 (depolarization) 導致鈣離子從肌質網內釋放至肌漿中，鈣離子與收縮蛋白 Troponin 等之結合即引發肌肉之收縮。從骨骼肌的電壓箝制實驗 (voltage-clamp) 中，發現薄膜中的電荷移動 (charge movement) (Schneider & Chandler, 1973) 在控制鈣離子釋放上扮演著重要的角色，

因此電荷移動被稱為骨骼肌興奮-收縮結合 (excitation-contraction coupling, E-C coupling) 機制的電壓感應器 (Rios & Pizarro, 1991; Schneider, 1994)。

在此結合機制中扮演重要角色的兩個薄膜蛋白質 (dihydropyridine receptor, DHPR & ryanodine receptor, RyR) 已分別被分離及複製出來 (Tanabe et al., 1987; Takeshima et al., 1989)。由分離並純化的蛋白質進行人工雙膜實驗更證實 RyR 即是肌質網上之鈣釋放通道 (CRC) (Lai et al., 1988)，而 DHPR 則是產生電荷移動的電壓感應器 (Rios & Brum, 1987, Tanabe et al., 1988)。但兩者之間在生理狀態下的交互作用，並無法由此類實驗中得知。

單一肌纖維實驗近年來發展至可以同時測量電荷移動及鈣離子釋放，結果發覺這兩者有極密切的相關性，唯有從單一肌纖維實驗中才能探討，兩者之間在生理狀態下的交互作用。

豬惡性高熱症 (malignant hyperthermia, MH) 已被證實為一種遺傳疾病，具有此基因突變的豬在緊迫狀況下，易引起症狀而猝死，所以又稱為緊迫敏感 (stress susceptible)，其結果導致養豬業重大的經濟損失。惡性高熱症的發生與肌纖維鈣離子釋放之異常有關，經基因的研究發現 MH 的突變基因與 CRC (RyR) 的突變基因連鎖。這個 RyR 的突變是由單一基因造成 (Fuji et al., 1991)。由分離的 RyR 在人工雙脂膜的實驗發現，MH 的 RyR 對各種激發物如 Ca, Caffeine, ATP, ryanodine 等的反應較正常 RyR 敏感 (Fill et al., 1990)。另外，更有實驗發現，MH 肌纖維的電荷移動量較正常者為小 (Lamb et al., 1989)。從基因研究可知，在 MH 肌肉中沒有第二個突變，所以可判斷 DHPR 電荷移動的變化可能是因為與 RyR 的交互作用而造成。

因此，MH 肌肉可成爲一個研究 DHPR 與 RyR 交互作用及 E-C coupling 機制的極佳實驗模式。

MH 的發生，除了人類以外在豬身上是個很好的實驗模式，所以建立豬單一肌纖維實驗系統爲從事肌肉生理實驗必經之途。國內在 MH 上的研究僅著重於基因的篩檢與屠體肉質的檢試，並沒有在細胞階層從事生理方面的研究。建立單一肌纖維的實驗系統，除了可提供肌肉生理機制的研究外，可由鈣釋放機制的瞭解，設法找出阻止鈣異常釋放的方法，其結果將可在現場對發病的豬做有效的急救。

本計畫打算從比較正常與異常肌纖維鈣釋放特性著手，進一步檢查兩者在鈣釋放減能作用之差別，以找出鈣釋放異常之生理機制。而由對肌纖維鈣釋放機制的瞭解，加上肌肉鬆弛劑 dantrolene (Snyder et al. 1967) 對鈣釋放之調控，可藉此設法找出阻止鈣異常釋放的方法，其結果將可應用在現場，減少畜產管理上的損失。

三、結果與討論

實驗分兩部份進行：第一部份是探討肌纖維中鈣釋放之生理調控，其中包括：電荷移動與鈣釋放對電位依賴之比較、鈣釋放對電荷移動之影響、鈣釋放減能作用對鈣釋放之影響。第二部份是探討 dantrolene 對肌纖維鈣釋放之影響。其中包括：dantrolene 對電荷移動之影響、dantrolene 對鈣釋放抑制之效果、比較 dantrolene 對正常豬與惡性高熱症豬肌纖維影響之差異。

1. 豬單一肌纖維之取得

豬單一肌纖維由於樣本取得不易，且希望實驗中不須犧牲豬隻太多，所以麻醉後採其肋骨間肌束約三公分見方，然後縫合使其恢復。取得之肌束再進一步分離，由

於肌纖維短小且易斷裂，成功的機會頗小。後經採取酵素分離法，取得較完整的肌纖維。然後經一般電性的測試，發現所得肌纖維有 60% 以上可用於電生理實驗。計畫中實驗的進行，至少需要一至二小時，所以肌纖維必須能成功地存活至少二小時，實驗結果才可信賴。幾個重要因子已陸續發現，如氧氣的供應、溫度的控制和 ATP 的供應等。但狀況仍待改進。

2. 豬隻基因型之篩檢

此計畫之最終目標是比較正常與緊迫敏感豬肌纖維之生理狀態。樣本的取得必須先確定其基因型，才能正確地解釋實驗結果。此計畫以基因篩檢爲根據判定豬隻的基因型，採取的方法是使用 Lockley et al. (1996) 描述的突變點拆離式聚合酶連鎖反應 (Mutagenically Separated Polymerase Chain Reaction, MS-PCR) 來檢測豬隻的遺傳型。簡單來說，以 Hal-1843 附近已知的核甘序列，設計三種引子，一爲針對正常基因、一爲針對突變基因、另一爲上述兩引子共用的逆向引子。將此三種引子與從豬隻血液中分離的 DNA 混合，然後進行 PCR 反應。其產物經電泳呈相，若僅有 114 bp 片段者，則爲正常型；若僅有 134 bp 片段者，則爲突變型；而雜合型則有兩個片段。

在隨機取得豬隻樣本中，五十隻中僅有一隻爲雜合型，其餘均爲正常型。可見突變型在一般市場中已不易見，所以採購突變型公豬精液爲雜合型母豬進行配種，得出突變型後代。以求得不同基因型之豬隻，進行計畫中之實驗。

3. 比較電荷移動對電位之依賴

骨骼肌之興奮-收縮耦合機制受肌膜電位之嚴格控制，正常肌纖維中電荷移動及鈣離子釋放之電位依賴性，早已確定。而惡性高熱症豬之肌纖維電荷移動之電位依

賴性則須確實以實驗證實。我們曾證實，在正常肌纖維中鈣釋放會影響電荷移動之反應速率 (Jong et al. 1995b)。因此，唯有在無鈣釋放情況下測量之電荷移動，才能真正顯出其電位依賴性。惡性高熱症肌纖維之鈣釋放異常，若欲探討其電荷移動之電位依賴性，亦必須在無鈣釋放狀況下測量。實驗條件為胞外與胞內溶液之鈣離子濃度均改為零，並施以連續刺激以耗盡肌質網內之鈣離子。待無任何鈣釋放，則測量其電荷移動之電位依賴性。其結果顯示，惡性高熱症豬肌纖維之電荷移動的電位依賴性與正常豬並沒有明顯差異。進一步以正常肌纖維內鈣離子濃度 (60nM) 為實驗條件，測量發現惡性高熱症肌纖維鈣釋放之異常電位依賴，是源自鈣釋放通道。

4. 鈣釋放減能作用 (Ca inactivation of Ca release) 對鈣釋放之影響。

由鈣釋放通道釋出之鈣離子，除了影響電荷移動外，也會影響鈣釋放通道本身，此種抑制進一步鈣釋放之機制稱為鈣釋放減能作用。我們以已發表正常肌纖維之鈣釋放減能作用之特性及檢驗方法 (Jong et al. 1995a) 檢測鈣釋放通道。初步實驗結果發現，惡性高熱症肌纖維鈣釋放之減能作用在恢復時間上，其時間常數較正常肌纖維為長，由於實驗樣本仍少，其量化值，待有較多樣本時才能證實。由此可見，惡性高熱症肌纖維之鈣釋放異常，很可能是鈣釋放通道之減能作用異常，導致鈣釋放無法受肌漿中鈣濃度之調控，以致產生其病理現象。

5. dantrolene 的影響

Dantrolene 為至目前為止，在臨床上唯一能有效減低人類惡性高熱症狀之藥物 (Snyder et al. 1967)。dantrolene 可抑制骨骼肌中鈣離子從鈣釋放通道釋出 (van

Winkle, 1976)。此實驗將以此藥對豬骨骼肌單一肌纖維之作用做探討，以建立活體應用之基準。Dantrolene 於水溶液之最大溶解度大約為 50 μM ，可直接加於胞外溶液使用。

此部份實驗在單一肌纖維狀況下，確立 dantrolene 的作用機制，並建立其濃度對鈣釋放之抑制曲線。首先，進行 dantrolene 對電荷移動的影響，實驗結果得知，dantrolene 使電荷移動對電位的依賴性向右位移，此結果與青蛙肌纖維實驗類似 (Jong et al. 1997)，並可解釋部份 dantrolene 的抑制效果，可是主要部份應是作用於鈣釋放通道。

接著是 dantrolene 對鈣釋放之作用。由於 dantrolene 的溶解度很小，可變化範圍小，且在單一肌纖維實驗狀況下，無法確知細胞內濃度，所以其濃度對鈣釋放的抑制曲線的取得並不可信賴。因此，轉而探討 dantrolene 對鈣釋放抑制的機制。骨骼肌之鈣釋放波形有兩個部份，一為起始高峰狀波形，二為接下來之較低平緩波形。初步實驗結果發現，dantrolene 只對起始波形產生抑制而對隨後的平緩波形沒有作用。此結果之意義，須待進一步實驗才能確定，或許與 dantrolene 的作用部位有關，或者可以此解釋鈣釋放波形的生理意義。

四、成果自評

研究內容與原計畫的相符程度約為百分之七一。原計畫預定成果包括豬隻基因型之篩檢、豬隻單一肌纖維電生理實驗、dantrolene 對電荷移動與鈣釋放的影響以及正常與緊迫敏感豬之實驗結果之比較。

執行計畫一年下來，豬隻基因型之篩檢，已能充分掌握。所需豬隻之不同基因型樣本都以自行配種的方法取得。

哺乳動物單一肌纖維的實驗，以酵素分

解法取代機械式分離法，得出較佳狀態之單一肌纖維。但分離後肌纖維的保持，仍有待改善。在此情況下，大部份計畫中之實驗仍能進行。

單一豬肌纖維之電荷移動實驗結果發現，惡性高熱症豬與正常豬並無明顯差異，可見其異常發生於鈣釋放通道。進一步鈣釋放通道減能作用實驗，發現惡性高熱證豬其減能作用有較弱之趨勢，其恢復時間常數較正常豬為長，但還待更多實驗結果才能確定。

dantrolene 的實驗，除了確定對電荷移動影響不大（對電位依賴些許右移）以外，在單一肌纖維狀況下，對鈣釋放確有抑制效果。而其對鈣釋放的影響仍屬初步結果，似乎對鈣釋放波形有特定的抑制波形，其意義仍待探討。

五、參考文獻

1. Fill, M., R. Coronado, J. R. Mickelson, J. Vilven, J. Ma, B. A. Jacobson, and C. F. Louis. Abnormal ryanodine receptor channels in malignant hyperthermia. *Biophysical Journal*. 50:471-475.
2. Fuji, J., K. Otsu, F. Zorzato, S. de Leon, V. K. Khanna, J. E. Weiler, P. J. O'Brien, and D. H. MacLennan. 1991. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science*. 253:448-451.
3. Jong, D.-S., P. C. Pape, S. M. Baylor, and W. K. Chandler. 1995a. Calcium inactivation of calcium release in frog cut muscle fibers that contain millimolar EGTA or fura-2. *Journal of General Physiology*. 106:337-388.
4. Jong, D.-S., P. C. Pape, and W. K. Chandler. 1995b. Effect of sarcoplasmic reticulum calcium depletion on intramembranous charge movement in frog cut muscle fibers. *Journal of General Physiology*. 106:559-704.
5. Jong, D.-S., K. Stroffekova, and J. A. Heiny. 1997. A surface charge in the membrane of frog skeletal muscle is associated with excitation-contraction coupling. *Journal of Physiology*. 499:787-808.
6. Lai, F. A., H. P. Erickson, E. Rousseau, Q.-Y. Liu, and G. Meissner. 1988. Purification and reconstitution of the calcium release channel from skeletal muscle. *Nature*. 331:315-319.
7. Lamb, G. D., K. C. Hopkinson, and M. A. Denborough. 1989. Calcium currents and asymmetric charge movement in malignant hyperpyrexia. *Muscle and Nerve*. 12:135-140.
8. Lockley, A. K., J. S. Bruce, S. J. Franklin and F. G. Bardsley. 1996. Use of mutagenically separated PCR for the detection of the mutation associated with porcine stress syndrome. *Meat Science*. 43(2): 93-97.
9. Rios, E., and G. Brum. 1987. Involvement of dihydropyridine receptors in excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Nature*. 325:717-720.
10. Rios, E. and G. Pizarro. 1991. Voltage sensor of excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Physiological Reviews*. 71:849-908.
11. Schneider, M. F. 1994. Control of calcium release in functioning skeletal muscle fibers. *Annual of Reviews of Physiology*. 56:465-484.
12. Schneider, M. F., and W. K. Chandler. 1973. Voltage-dependent charge movement in skeletal muscle: a possible step in excitation-contraction coupling. *Nature*. 242:244-246.
13. Snyder, H. R. Jr., C. S. Davis, R. K. Bickeron, and R. P. Halliday. 1967. 1-[(5-arylfururylidine)amino] hydantoins A new class of muscle relaxants. *Journal of Medical Chemistry*. 10:807-810.
14. Tanabe, T., K. G. Beam, J. A. Powell, and S. Numa. 1988. Restoration of excitation-

contraction coupling and slow calcium current in dysgenic muscle by dihydropyridine receptor complementary DNA. *Nature*. 336:134-139.

15. Tanabe, T., H. Takeshima, A. Mikami, V. Flockerzi, H. Takahashi, K. Kangawa, M. Kojima, H. Matsuo, T. Hirose, and S. Numa. 1987. Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature*. 328:313-318.

16. Takeshima, H., S. Nishimura, T. Matsumoto, H. Ishida, K. Kangawa, N. Minamino, H. Matsuo, M. Ueda, M. Hanaoka, T. Hirose, and S. Numa. 1989. Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. *Nature*. 339:439-445.

17. van Winkle. 1976. Calcium release from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum: site of action of dantrolene sodium. *Science*. 193:1130-1131.