

[文章编号] 1007-3949(2004)12-03-0287-04

·实验研究·

肿瘤坏死因子 α 抑制豚鼠急性缺血心室肌细胞 L 型钙通道电流

吴黎明, 唐 闽

(福建医科大学附属协和医院急诊科, 福建省冠心病研究所, 福建省福州市 350001)

[关键词] 生理学; 肿瘤坏死因子 α 抑制钙通道电流; 膜片钳技术; 心室肌细胞, 豚鼠; Ca^{2+} 通道, L 型

[摘要] 为探讨肿瘤坏死因子 α 对正常及模拟缺血状态下豚鼠心室肌细胞 L 型钙通道电流的影响。全细胞膜片技术记录豚鼠心室肌细胞单个 L 型钙通道电流。肿瘤坏死因子 α (100、300 和 500 kU/L) 对豚鼠心室肌细胞 L 型钙通道电流峰值的影响与对照组均无明显差异 ($P > 0.05$), 但模拟急性缺血时, 同浓度的肿瘤坏死因子 α 却明显抑制豚鼠心室肌细胞 L 型钙通道电流峰值并呈浓度依赖性, 抑制率分别为 $46.5\% \pm 3.5\%$ 、 $62.7\% \pm 3.0\%$ 和 $80.7\% \pm 3.7\%$, 与对照组和单纯缺血组相比差异明显 (均 $P < 0.05$)。正常灌流液中不同浓度的肿瘤坏死因子 α 对豚鼠心室肌细胞峰值 L 型钙通道电流无明显影响; 但模拟急性缺血时其却呈浓度依赖性地增强缺血对豚鼠心室肌细胞的 L 型钙通道电流峰值抑制作用。

[中图分类号] R33

[文献标识码] A

Inhibition of Tumor Necrosis Factor- α on L-type Calcium Current in Guinea Pig Ventricular Myocytes accompany simulation of Acute Ischemia

WU Li-Ming, and TANG Ming

(Department of Emergency, the Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou, 350001, China)

[KEY WORDS] Tumor Necrosis Factor- α ; Calcium Channel; Patch Clamp; Guinea Pig

[ABSTRACT] Aim To study the effect of TNF α on L-type calcium channel current (ICa-L) in isolated guinea pig ventricular myocytes in normal Tyrode solution and with imitating acute ischemia. Methods Using the whole cell patch clamp technique in isolated guinea pig ventricular myocytes both normal Tyrode solution or simulation of acute ischemia. Results Under normal Tyrode solution, the application of TNF α (100 kU/L, 300 kU/L and 500 kU/L) did not produce any detectable alterations on peak of ICa-L, but inhibitory rate on peaks of ICa-L were decreased markedly by $46.5\% \pm 3.5\%$, $62.7\% \pm 3.0\%$ and $80.7\% \pm 3.7\%$ respectively by TNF α at the same concentration accompany simulation of acute ischemia and showed dose-dependence; there are significant difference compare with control group or simulate of acute ischemia alone group ($P < 0.05$, respectively). Conclusion TNF α would not alter peak of ICa-L in guinea pig ventricular cells under normal Tyrode solution; but increased inhibitory effects of ischemia on peaks of ICa-L accompany imitation of acute ischemia and showed concentration-dependence.

肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF) α 是由激活的巨噬细胞分泌的具多种生物学效应的细胞因子, 愈来愈多的证据表明其参与了充血性心力衰竭、急性心肌梗死、动脉粥样硬化、心肌缺血再灌注损伤和细胞凋亡等病理生理过程^[1-5]。但目前对其心肌电生理机制却所知甚少; 在模拟急性缺血状态下对于心室肌细胞 L 型钙通道电流(ICa-L)的影响尚未见国内外文献报道。本研究拟采用全细胞膜片钳技术观察 TNF α 对生理和模拟急性缺血状态下对心室肌细胞 ICa-L 的作用, 并初步探讨其可能的细胞电

生理机制。

1 材料与方法

1.1 实验用溶液的配制^[6]

(1)无钙液(mmol/L): NaCl 116、KCl 5.4、 NaH_2PO_4 1.4、 NaHCO_3 15、 MgSO_4 1、葡萄糖 1.5, 用 1 mol/L NaOH 调 pH 至 7.3~7.4。(2)酶液(mmol/L): 无钙液 100 mL, 含 Pronase E 10 mg, 1 mmol/L CaCl_2 15 μL , 牛血清白蛋白 50 mg。(3)台氏液(mmol/L): NaCl 137、KCl 4、 CaCl_2 1.8、 MgCl_2 0.5、 NaHCO_3 18、 NaH_2PO_4 0.9、葡萄糖 5.5, 以 HCl 调 pH 至 7.4。(4)钙电流记录外液: 氯化胆碱 120、 CaCl_2 2、 MgCl_2 2、 CsCl_2 4、HEPES 10、葡萄糖 10, 以 CsOH 校正 pH 至 7.4 ± 0.1 。(5)电极内液成分(mmol/L): CsCl 120、 MgCl_2 2、 CaCl_2 1、 Na_2ATP 5、

[收稿日期] 2003-10-25 [修回日期] 2004-04-04

[基金项目] 福建省医学创新课题项目(2003-CX-18)资助

[作者简介] 吴黎明, 硕士, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为心脏电生理和心肌缺血再灌注, 已发表论著、综述、译文 30 余篇。唐闽, 中国医学科学院阜外心血管病医院博士研究生。

EGTA 11、HEPES 10,以 CsOH 校正 pH 至 7.4 ± 0.1 。

1.2 实验动物和细胞分离过程^[6]

健康成年豚鼠,体重为 300~350 g,雌雄不拘,由北京大学医学部实验动物中心提供;分为(1)对照组($n=15$);(2)模拟急性缺血组($n=14$);(3)不同浓度的 TNF α (分别为 100 kU/L、300 kU/L、500 kU/L,均 $n=14$);(4)模拟急性缺血状态+不同浓度 TNF α (分别为 100 kU/L、300 kU/L 和 500 kU/L,均 $n=14$)。

室温 20~25℃下取豚鼠心脏放入无钙液中,置于 Langendorff 灌流架上,经主动脉逆行灌流心脏 5 min,灌流压为 70 cm H₂O,灌流速度约为 5 mL/min;然后改用低钙液(蛋白酶 E 0.1 g/L,去脂肪酸的牛血清白蛋白 0.5 g/L,氯化钙 0.15 mmol/L)灌流 3~5 min,剪碎心室肌后放入上述低钙液中,温孵和轻微磁力搅拌 5 min,取细胞悬液稀释至无钙液中,室温储存备用。

1.3 膜片钳全细胞记录^[7,8]

细胞悬液加于倒置显微镜(Olympus IX-70,日本)工作台上的灌流槽中,细胞贴壁后用台氏液以 2 mL/min 灌流,取纹理清晰、表面干净、柱状无收缩、附壁良好的心室肌细胞,调节三维操纵器(Rarishige,日本)将充满电极内液的玻璃微电极(尖端直径 1~2 μ m,电极电阻 2~6 M Ω)移近细胞且轻压于其表面,施予轻微负压吸引后形成高阻抗封接(>1 G Ω),进一步负压破膜并调节电容电流及电阻补偿,形成全细胞记录模式,信号经 Ag/AgCl 电极引导,由 pClamp(Axon Instrument,美国)程序控制膜片钳放大器(Axopatch 200B,美国)将细胞电位钳制在 -40 mV,指令电压为 -30~+60 mV,阶跃 +10 mV,刺激频率 0.5 Hz,持续 250 ms 的阶跃脉冲激活并记录 L 型钙通道电流,经模-数和数-模转换(DigiData 1200-1,美国)控制连续刺激发放和信号采集和数据分析,并存于硬盘。玻璃微电极(北京大学物理所)由电极控制仪 PP-830(日本 Narishige 公司)分两步拉制而成。

异丙基肾上腺素和地尔硫卓验证 I_{Ca-L};模拟急性缺血抑制豚鼠心室肌 I_{Ca-L}、及对照组 I_{Ca-L}、与钳制电压关系曲线图(I-V)均见我们先前报道^[9]。

1.4 模拟急性缺血^[8]

通过 95% N₂ + 5% CO₂ 持续充灌无糖台式液以模拟急性缺血,并在细胞槽表面用 95% N₂ + 5% CO₂ 形成气封层,使 P_{O₂} < 90 mm Hg pH 7.2~7.35。TNF α 为 Merck 公司产品。

2 结果

2.1 肿瘤坏死因子 α 对正常豚鼠心室肌细胞 L 型钙通道电流的影响

豚鼠心室肌细胞 I_{Ca-L} 见图 1(Figure 1)。在记录外液中分别加入最终浓度为 100 kU/L、300 kU/L 和 500 kU/L 的 TNF α 时,豚鼠心室肌细胞 I_{Ca-L} 的峰值见图 2 和表 1(Figure 2 and Table 1)。与正常心室肌细胞相比,加入 TNF α 后 I_{Ca-L} 无明显差异($P > 0.05$)。

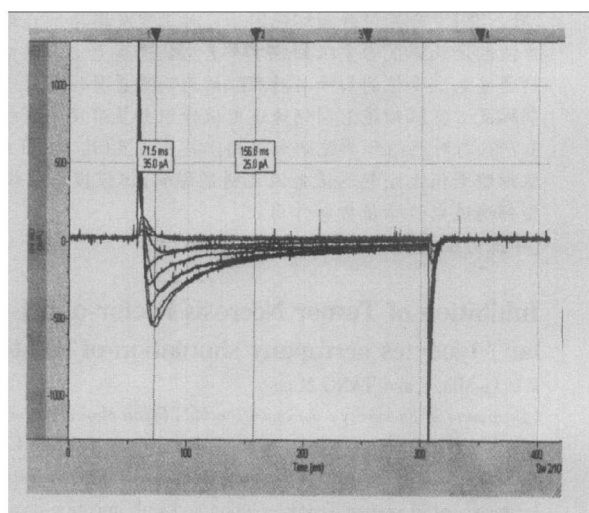


图 1. 正常豚鼠心室肌细胞 L 型钙通道电流

Figure 1. The peak of I_{Ca-L} in isolated guinea pig ventricular myocytes

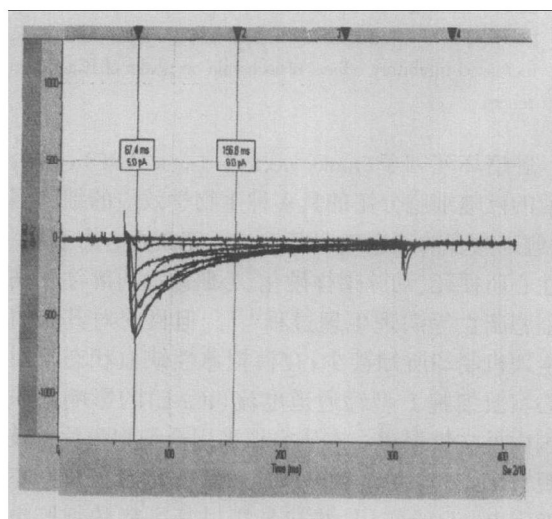


图 2. 不同浓度的肿瘤坏死因子 α 对豚鼠正常心室肌细胞 L 型钙通道电流的影响

Figure 2. Effects of TNF α with different concentration on I_{Ca-L} in isolated guinea pig ventricular myocytes

2.2 急性缺血状态下肿瘤坏死因子 α 对豚鼠心室肌细胞 L 型钙通道电流的影响

在急性缺血状态下,分别以 100 kU/L、300 kU/L 和 500 kU/L $\text{TNF}\alpha$ 灌流 20 min,能明显抑制豚鼠心室

肌细胞 ICa-L 的峰值电流并呈浓度依赖性(图 3 和表 2, Figure 3 and Table 2),抑制率分别为 $46.5\% \pm 3.5\%$ 、 $62.7\% \pm 3.0\%$ 和 $80.7\% \pm 3.7\%$ (均 $P < 0.05$)。

表 1. 不同浓度肿瘤坏死因子 α 对豚鼠心室肌细胞 L 型钙通道电流最大峰值的影响(pA)

Table 1. Effects of $\text{TNF}\alpha$ on peak of ICa-L in isolated guinea pig ventricular myocytes

浓度	n	0 min	5 min	10 min	15 min	20 min
0	15	-553 $\pm$ 180	-556 $\pm$ 272	-524 $\pm$ 325	-512 $\pm$ 316	-472 $\pm$ 307
100	15	-564 $\pm$ 170	-553 $\pm$ 218	-543 $\pm$ 138	-528 $\pm$ 315	-498 $\pm$ 297
300	15	-566 $\pm$ 372	-553 $\pm$ 218	-552 $\pm$ 172	-558 $\pm$ 190	-472 $\pm$ 367
500	15	-546 $\pm$ 321	-545 $\pm$ 277	-543 $\pm$ 153	-546 $\pm$ 225	-504 $\pm$ 397

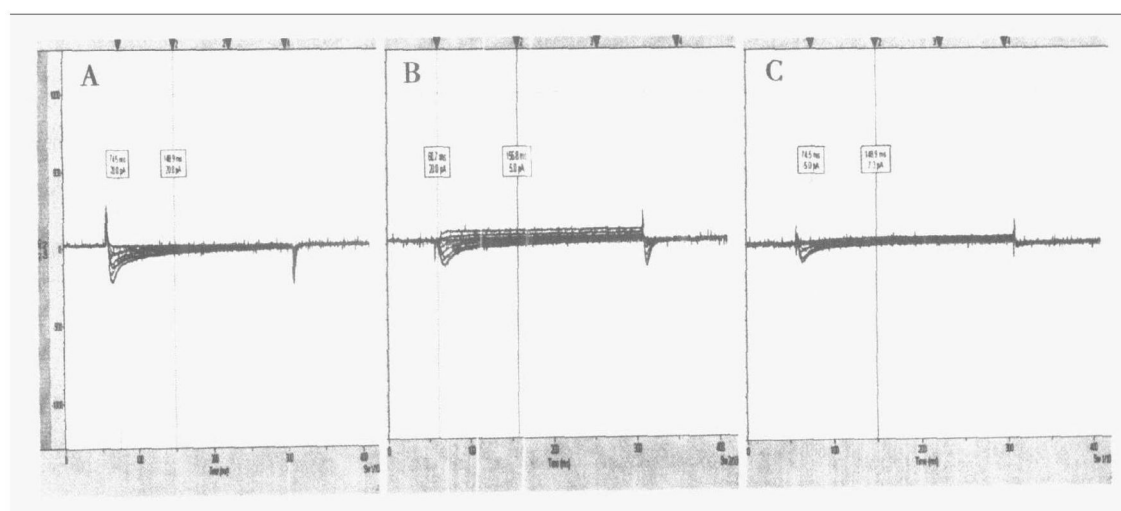


图 3. 肿瘤坏死因子 α 增强急性缺血对豚鼠心室肌细胞 L 型钙通道电流的抑制作用 A、B 和 C 分别为 100 kU/L、300 kU/L 和 500 kU/L $\text{TNF}\alpha$ 灌流 20 min 时的豚鼠心室肌细胞 ICa-L。

Figure 4. The $\text{TNF}\alpha$ increased the inhibitory effects of ischemia with concentration-dependence on peak of ICa-L in isolated guinea pig ventricular myocytes accompany imitation of acute ischemia

表 2. 急性缺血状态下肿瘤坏死因子 α 对豚鼠心室肌细胞 L 型钙通道电流最大峰值的影响(pA)

Table 2. Effects of $\text{TNF}\alpha$ on peak of ICa-L in isolated guinea pig ventricular myocytes accompany imitation of acute ischemia

分 组	n	0 min	5 min	10 min	15 min	20 min
对照组	15	-553 $\pm$ 180	-556 $\pm$ 272	-524 $\pm$ 325	-512 $\pm$ 316	-472 $\pm$ 307
单纯缺血组	14	-590 $\pm$ 192	-389 $\pm$ 93 ^{ac}	-392 $\pm$ 87 ^{ac}	-381 $\pm$ 103 ^{ac}	-370 $\pm$ 104 ^{ac}
$\text{TNF}100 +$ 缺血	16	-568 $\pm$ 202	-297 $\pm$ 99 ^{ac}	-294 $\pm$ 88 ^{ac}	-282 $\pm$ 175 ^{ac}	-268 $\pm$ 124 ^{ac}
$\text{TNF}300 +$ 缺血	16	-550 $\pm$ 211	-207 $\pm$ 91 ^{ad}	-206 $\pm$ 87 ^{ad}	-208 $\pm$ 100 ^{ad}	-191 $\pm$ 102 ^{ad}
$\text{TNF}500 +$ 缺血	16	-551 $\pm$ 168	-107 $\pm$ 70 ^{ac}	-110 $\pm$ 81 ^{ac}	-101 $\pm$ 77 ^{ac}	-88 $\pm$ 71 ^{ac}

a: $P < 0.05$, 与对照组比较; c: $P < 0.05$, f: $P < 0.01$, g: $P < 0.001$, 与同组 0 min 比较。

3 讨论

肿瘤坏死因子($\text{TNF}\alpha$)是一种致炎性细胞因子,急性心梗合并心衰的患者和缺血/再灌注时心肌细

胞合成、分泌的 $\text{TNF}\alpha$ 明显增高^[10],此为心肌细胞对缺血损伤的一种保护性应激反应,但 $\text{TNF}\alpha$ 与冠状动脉血流呈负相关,促进中性白细胞与内皮细胞表

达众多的粘附分子,导致和加剧炎症性心肌损伤,心肌细胞坏死和凋亡程度增加,参与心室重构并使心功能恶化^[1]。

L型钙通道电流(ICa-L)与肌浆网关系密切,动作电位期小量的内向ICa-L即可引起肌浆网释放钙(钙诱发释放)。Sugishita等^[12]发现生理状态下TNF α 使豚鼠心室肌细胞细胞内钙离子浓度($[Ca^{2+}]_i$)明显下降,并呈明显浓度依赖性的抑制异丙肾上腺素增强ICa-L的作用,可能是TNF α 促使鞘氨醇(sphingosine)增加,阻断了肌浆网上的ryanodine受体使胞浆内 $[Ca^{2+}]_i$ 减少,但对心室肌细胞膜ICa-L无明显影响^[11];本实验研究结果亦提示,正常细胞外液灌流下不同较低浓度的TNF α 对豚鼠心室肌细胞膜的ICa-L无明显影响,同于Sugishita等^[12]和Yokoyama等^[13]的试验结果。

本实验研究还进一步发现,模拟急性缺血状态,TNF α 却呈浓度依赖性地增强缺血对于豚鼠心室肌细胞ICa-L的抑制作用,首次从TNF α 与ICa-L的相关性角度回答了急性缺血时TNF α 对钙离子通道的作用,此结果在国内外文献中尚未见报道。已知鞘氨醇调节TNF即刻负性肌力作用^[13];鼠和猫离体心肌细胞电生理研究均发现鞘氨醇直接明显抑制ICa-L;以N-oleylethanolamine阻断鞘氨醇生成可改善缺血后损伤^[14,15]。笔者推测,作为细胞内第二信使的鞘氨醇激活蛋白激酶和促进核因子 κB 的释放等,影响ICa-L的 α 亚基的半胱氨酸残基中巯基活性而抑制该通道活性,增强缺血对于豚鼠心室肌细胞ICa-L的抑制。

综上所述,虽正常灌流液中不同浓度的TNF α 对豚鼠心室肌细胞峰值ICa-L无明显影响;但模拟急性缺血时TNF α 却呈浓度依赖性地增强对ICa-L的抑制作用。如进一步明确TNF α 在心肌缺血中的离子通道机制,将有助于TNF α 特异性单克隆抗体、TNF α 受体阻滞剂或阻断TNF α 信号传导途径TNF α 中介的心血管病的治疗分层。

[致谢] 北京大学第一临床学院心内科任自文教授和周菁博士、北京朝阳医院心脏中心李翠兰研究员、刘秀兰老师在本课题中予以悉心指导和大力支持。

[参考文献]

- [1] Meldrum DR. Tumor necrosis factor in the heart. *Am J Physiol*, 1998, 274 (3P2): R577-595
- [2] Gurevitch J, Frolkis I, Yuhua Y, Paz Y, Matsa M, Mohr R, et al. Tumor necrosis factor-alpha is released from the isolated heart undergoing ischemia and reperfusion. *J Am Coll Cardiol*, 1996, 28 (1): 247-252
- [3] 吴其夏, 党瑛, 荣克, 李岩. 肿瘤坏死因子和蛋白激酶C对单个内皮细胞和白细胞钙的影响. *中国动脉硬化杂志*, 1995, 3 (1): 1-4
- [4] 周秀霞, 温进坤, 韩梅. 白细胞介素1 β 和肿瘤坏死因子 α 对血管平滑肌细胞及基质金属蛋白酶2骨桥蛋白基因表达的影响. *中国动脉硬化杂志*, 1999, 7 (4): 292-295
- [5] 李凝旭, 李建军, 李庚山, 王晶, 徐红新, 李夏, 等. 细菌脂多糖诱导人外周血单核细胞肿瘤坏死因子 α 的合成及核因子 κB 的活性. *中国动脉硬化杂志*, 2002, 10 (4): 320-323
- [6] 王骁良. 心血管系统离子通道基本理论. 中国医学科学院, 中国协和医科大学药物研究所, 1997; 1-19
- [7] Hua Z, Wang XL. Inhibitory effect of berberine on potassium channels in guinea pig ventricular myocytes. *Acta Pharmacol Sin*, 1994, 29 (8): 576-580
- [8] 周菁, 任自文, 张均华, 唐朝枢. 牛磺酸对尾加压素II抑制L型钙电流的影响. *中华老年心脑血管病杂志*, 2002, 4 (1): 40-42
- [9] 吴黎明, 唐敏. 急性缺血对豚鼠心室肌细胞L型钙通道电流的影响. *福建医科大学学报*, 2002, 36 (4): 374-377
- [10] Latini R, Bianchi M, Correale E, Dinarello CA, Fantuzzi G, Fresco C, et al. Cytokines in acute myocardial infarction: selective increase in circulating tumor necrosis factor, its soluble receptor, and interleukin-1 receptor antagonist. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1994, 23 (1): 1-6
- [11] Gurevitch J, Frolkis I, Yuhua Y, Paz Y, Matsa M, Mohr R, et al. Tumor necrosis factor-alpha is released from the isolated heart undergoing ischemia and reperfusion. *J Am Coll Cardiol*, 1996, 28 (1): 247-252
- [12] Sugishita K, Kinugawa K, Shimizu T, Harada K, Matsui H, Takahashi T, et al. Cellular basis for the acute inhibitory effects of IL-6 and TNFalpha on excitation-contraction coupling. *J Mol Cell Cardiol*, 1999, 31 (8): 1457-467
- [13] Yokoyama T, Vaca L, Rosen RD, Durante W, Hazarika P, Martin DL. Cellular basis for the negative inotropic effects of tumor necrosis factor-alpha in the adult mammalian heart. *J Clin Invest*, 1993, 92 (5): 2303-312
- [14] McDoxogh PM, Yarui K, Betto R, Salvati G, Glemhotaki CC, Palade PT, et al. Control of cardiac Ca levels: inhibitory actions of sphingosine on Ca^{2+} transients and L-type Ca^{2+} channel conductance. *Circ Res*, 1994, 75 (6): 981-989
- [15] Friedrichs GS, Swillo RE, Jow B, Bridal T, Numan R, Warner LM, et al. Sphingosine modulates myocyte electrophysiology, induces negative inotropy, and decreases survival after myocardial ischemia. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2002, 39 (1): 18-28

(此文编辑 胡必利)