

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2005)13-01-0034-03

左旋氨氯地平对缺氧心肌细胞乳酸脱氢酶和肌钙蛋白的影响

刘遂心, 孙明, 李彤

(中南大学湘雅医院心血管病康复中心, 湖南省长沙市 410008)

[关键词] 内科学; 左旋氨氯地平保护缺氧心肌细胞; 荧光探针法; 心肌细胞; 肌钙蛋白; 乳酸脱氢酶; 左旋氨氯地平

[摘要] 目的 探讨钙离子拮抗剂左旋氨氯地平对缺氧心肌细胞损伤标记物及细胞内游离钙离子浓度的影响。方法 在离体乳鼠心肌细胞培养基础上制备心肌细胞缺氧模型, 随机分为正常对照组、缺氧损伤组和钙拮抗剂干预缺氧损伤组。分别测定各组心肌培养基中乳酸脱氢酶、肌钙蛋白的含量, 心肌细胞内游离钙离子的浓度(荧光探针法)。结果 缺氧损伤组心肌培养基中乳酸脱氢酶和肌钙蛋白的含量及心肌细胞内游离钙离子浓度较正常对照组明显增加(P 均 < 0.01); 经左旋氨氯地平干预后细胞培养基中乳酸脱氢酶和肌钙蛋白的含量及心肌细胞内游离钙离子浓度较缺氧损伤组明显降低(P 均 < 0.01)。结论 左旋氨氯地平对缺氧心肌细胞具有保护作用, 其机理可能与减轻心肌细胞内钙超负荷有关。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Effects of Levor-Anlodipine on Lactate Dehydrogenase and Cardiac Troponin of the Anoxic Myocardial Cells

LIU Su-Xin, SUN Ming, and LI Tong

(Department of Cardiac Rehabilitation Centre, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

[KEY WORDS] Myocardial Cells; Lactate Dehydrogenase; Cardiac Troponin; Levor-Anlodipine; Calcium Overload; Anoxia

[ABSTRACT] **Aim** To study the effect of levor-anlodipine on lactate dehydrogenase (LDH) and cardiac troponin of the anoxic myocardial cells. **Methods** Rat myocardial cells were cultured and randomly divided into normal group, anoxic injured group and levor-anlodipine group. Then the anoxic model was set up. After that, the concentrations of LDH, cardiac troponin iv (cTn iv) and dissociative calcium of myocardial cells (with Fura2/am fluorescent probe) were measured in each group. **Results** The concentrations of LDH, cTn iv and dissociative calcium of anoxic group were obviously higher than those of the control group ($P < 0.01$) and levor-anlodipine can lessen the concentrations of LDH, cTn iv and dissociative calcium ($P < 0.01$). **Conclusion** Levor-anlodipine can protect the anoxic myocardial cells by attenuating the calcium overload.

近几年来有关长效二氢吡啶类钙离子拮抗剂治疗高血压已得到公认, 但其对冠心病的影响一直存在争议。研究显示, 氨氯地平与传统降压药物一样可显著降低心肌梗死、脑卒中等心脑血管事件^[1]。拉西地平具有抗动脉粥样硬化的作用^[2]。本研究在离体心肌细胞培养基础上制备心肌细胞缺氧模型, 观察长效二氢吡啶类钙离子拮抗剂左旋氨氯地平对缺氧心肌细胞损伤标志物的影响并初步探讨其作用机理, 为临床进一步推广运用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 试剂

[收稿日期] 2004-06-22 [修回日期] 2004-11-19

[作者简介] 刘遂心, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为冠心病防治, E-mail 为 13308464499@ie165.com。

含 20% 胎牛血清的 DMEM (中南大学湘雅医学院细胞中心); fura2/am 荧光探针及 F127 (Biotium 公司); 左旋氨氯地平纯品 (天风制药公司提供); 肌钙蛋白 iv (cardiac troponin iv, cTn iv) 试剂盒 (南京强欣生物工程公司)。

1.2 动物

2~4 d 龄的 SD 大鼠乳鼠 20 只, 雌雄各半, 由中南大学实验动物中心提供。

1.3 心肌细胞培养及缺氧模型的建立

将大鼠乳鼠无菌操作取出心脏, 磷酸缓冲液 (PBS) 洗去血液, 去心房将心室肌用 PBS 冲洗三遍, 并以眼科剪剪成 1 mm^3 小块, 加入 10 mL 0.125% 胰蛋白酶溶液 37°C 消化 10 min, 自然沉淀后去上清液, 同样方法再消化 5 次 (组织块完全消化为止)。收集上清液, 加冷 PBS 终止消化。1 500 r/min 离心

8 min, 细胞沉淀用 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基制成细胞悬液, 并以 $1 \times 10^9/L$ 浓度接种到培养瓶中。5% CO_2 、37℃培养 1~2 h, 吸出细胞悬液, 再接种至培养瓶中继续培养, 每 2~3 天换液, 待细胞长至瓶底面积的 80% 时传代。培养出的心肌细胞以透射电镜观察其肌小节结构作为鉴定。

实验前 24 h 按 $1 \times 10^{10}/L$ 浓度接种至培养瓶中更换成无血清培养基, 24 h 后将培养瓶转至厌氧培养箱中, 抽真空至 0.1 MPa, 以 95% N_2 、5% CO_2 填充, 培养 3 h 后制成缺氧模型, 并移至 CO_2 培养箱中常规继续培养 1 h。药物干预于缺氧损伤前 8 h 进行(左旋氨氯地平 40 mg/L^[3]), 8 h 后进行缺氧处理 3 h 并复氧 1 h, 再行指标测定。

实验分组: 正常对照组仅在 CO_2 培养箱中培养, 不经缺氧处理或药物干预。缺氧损伤组细胞经缺氧处理, 不予药物干预。左旋氨氯地平组细胞以左旋氨氯地平干预, 再予缺氧处理。

1.4 心肌细胞游离钙离子浓度测定^[4]

操作按试剂盒说明进行。将上述处理的各组细胞直接刮离培养瓶并转移至离心管中, 1 000 r/min 离心 15 min, 弃上清, 以冷 PBS 4 mL 混悬细胞, 加入 1 mmol/L fura2/am 及等体积的 20% (w/v) F127, 使 fura2/am 终浓度为 1 μ mol/L, 37℃孵育 40 min, 1 000 r/min 离心 10 min, 去上清, 并再以冷 PBS 冲洗三次, 细胞沉淀以 2 mL 冷 PBS 悬浮, 日立 H-100 型荧光分光光度计检测, 340 nm 激发, 510 nm 接收, 测定值为 F 值; 再将样品经 0.5% Triton 和 0.2 mol/L EGTA 处理, 分别得到 F_{max}、F_{min}。按公式 $[Ca^{2+}]_i = KD \times (F - F_{min}) \div (F_{max} - F)$ 计算钙离子浓度(KD 为解离常数, 为 240 nmol/L)。

1.5 心肌细胞培养基中乳酸脱氢酶和肌钙蛋白 iv 测定

将缺氧 3 h 后的各组心肌细胞在 5% CO_2 培养箱中继续培养 1 h, 从培养瓶中吸出培养液, 1 500 r/min 离心 10 min, 取上清液用酶法测定乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)和 ELISA 法测定 cTn iv 浓度。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 11 统计软件, 组间比较采用 one-way ANOVA, 两两比较采用 LSD, $\alpha \leq 0.05$ 。

2 结果

2.1 培养基中乳酸脱氢酶和肌钙蛋白 iv 含量

经缺氧损伤后 LDH 和 cTn iv 均显著升高, 经左

旋氨氯地平干预后, LDH 和 cTn iv 均显著降低(P 均 < 0.01), 见表 1(Table 1)。

2.2 细胞内游离钙离子浓度

缺氧损伤组心肌细胞内游离钙离子浓度显著升高, 经左旋氨氯地平干预后显著降低($P < 0.01$), 见表 1(Table 1)。

表 1. 培养基中乳酸脱氢酶、肌钙蛋白及心肌细胞内游离钙离子浓度 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1. Concentrations of LDH, cTn iv and dissociative calcium in culture media

分 组	LDH (mmol/L)	cTn iv (μ g/L)	[Ca ²⁺] _i (nmol/L)
正常组	1.76 \pm 0.49	0.21 \pm 0.05	208.15 \pm 32.41
缺氧损伤组	7.23 \pm 1.13 ^a	0.85 \pm 0.15 ^a	716.15 \pm 164.11 ^a
左旋氨氯地平组	3.70 \pm 0.61 ^b	0.60 \pm 0.14 ^b	359.06 \pm 75.00 ^b

a: $P < 0.01$, 与正常组比较; b: $P < 0.01$, 与损伤组比较。

3 讨论

冠心病的关键问题是心肌缺血、缺氧。心肌细胞缺氧时, 氧化代谢减弱, 糖酵解增加, 能量产生不足及利用降低, 导致细胞内钙超负荷。而钙超负荷又进一步导致线粒体损伤, 内呼吸功能受损, 形成恶性循环, 可导致心肌细胞及其周围组织溶解及坏死。坏死后心肌细胞内糖原耗尽, 肌钙蛋白外溢, 心肌酶(LDH 等)释放入血, 因此肌钙蛋白和心肌酶含量的变化是反映心肌坏死的重要指标^[5]。

本研究运用体外心肌细胞培养并制备心肌细胞缺氧模型, 结果发现缺氧损伤组心肌细胞培养基中心肌损伤的标志物 LDH 和 cTn iv 均显著升高(本研究中正常对照组 LDH 和 cTn iv 亦有轻度升高, 原因是在试验检测过程中如细胞从培养瓶中转移至试管及离心等细胞所受到的轻微损伤, 因各组操作相同, 损伤程度相等, 具有可比性), 说明心肌细胞缺氧模型的制备是成功的, 已对细胞造成了实质性的损伤。在此基础上进一步运用长效二氢吡啶类钙离子拮抗剂左旋氨氯地平进行干预, 结果发现左旋氨氯地平可以明显地降低心肌损伤的标志物 LDH 和 cTn iv 的浓度, 表明左旋氨氯地平具有保护缺氧受损的心肌细胞的作用。

缺氧对心肌的损伤可由多个环节引起, 其中氧自由基损伤和钙超载是两个重要因素^[6]。自由基导致细胞膜流动性下降, 钙超载诱发细胞不可逆性损伤和细胞信息传递的障碍, 共同导致细胞内环境

紊乱。动物实验^[7,8]表明心肌细胞内钙超负荷是引起细胞损伤和细胞凋亡的主要原因,且 Ca^{2+} 超载的程度与心肌细胞受损程度呈正相关。因此减轻心肌细胞 Ca^{2+} 超载是保护缺氧心肌细胞的重要环节。

本研究实验结果显示,心肌细胞缺氧损伤后细胞内游离钙增高,提示细胞内钙超载是导致缺氧细胞损伤的机制之一。经左旋氨氯地平干预后心肌细胞内游离钙离子浓度明显降低,提示左旋氨氯地平可能通过减轻心肌细胞钙超载保护缺氧心肌细胞。但其确切作用机制有待进一步研究。

[参考文献]

[1] ALLHAT Officers and Coordinators for the ALLHAT Collaborative Research Group. Major outcomes in high-risk hypertensive patients randomized to angiotensin-converting enzyme inhibitor or calcium channel blocker vs diuretic: The Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial (ALLHAT). *JAMA*, 2002, **288** (23): 2 981-

997

- [2] Zanchetti A, Bond MG, Hennig M, Neiss A, Mancina G, Dal Palu C, et al. Calcium antagonist lacidipine slows down progression of asymptomatic carotid atherosclerosis: principal results of the European Lacidipine Study on atherosclerosis (ELSA), a randomized, double-blind, long-term trial. *Circulation*, 2002, **106** (19): 2 422-427
- [3] Yamanaka S, Tatsumi T, Shiraishi J, Mano A, Keira N, Matoba S, et al. Amlodipine inhibits doxorubicin-induced apoptosis in neonatal rat cardiac myocytes. *Am Coll Cardiol*, 2003, **41** (5): 870-878
- [4] 张喆, 杜学良, 孙 瑛, 王 华, 沈传陆, 吴其夏. 致糖尿病因素对血管内皮细胞内游离 Ca^{2+} 浓度的影响. *中国动脉硬化杂志*, 1997, **5** (2): 107-111
- [5] 项志敏, 胡大一, 崔 亮, 陈牧雷, 鲍德兰, 连桂清, 等. 血清肌钙蛋白 T 对急性心肌梗塞溶栓疗效的判定价值. *中国动脉硬化杂志*, 1996, **4** (3): 208-211
- [6] Park SI, Park EJ, Kim NH, Baek WK, Lee YT, Lee CJ, et al. Hypoxia delays the intracellular Ca^{2+} clearance by Na^{+} - Ca^{2+} exchanger in human adult cardiac myocytes. *Yonsei Med J*, 2001, **42** (3): 333-337
- [7] 张 鑫, 刘瀚温, 周同甫, 杨永健, 朱 俊, 赵龙生. 缺氧对乳鼠心肌细胞的损伤作用研究. *华西医学报*, 2002, **33** (1): 144-146
- [8] 陈红勤, 陈鹏慧. 缺氧对大鼠心肌细胞钙通道的影响. *高原医学杂志*, 2001, **11** (2): 12-15
- (此文编辑 文玉珊)