

卡托普利晚期预处理对缺氧复氧心肌细胞游离钙的影响

郑 杨, 佟 倩, 迟宝荣

(吉林大学第一医院心内科, 吉林省长春市 130021)

[关键词] 药理学; 卡托普利对缺氧复氧心肌细胞游离钙的影响; 流式细胞分析; 游离钙; 预处理; 缺氧复氧损伤; 卡托普利

[摘要] 目的 观察卡托普利晚期预处理对缺氧复氧心肌细胞游离钙的影响, 评价其延迟心肌的保护作用。方法 建立培养乳鼠心肌细胞缺氧复氧损伤模型。设正常对照组、缺氧复氧组、缺氧预适应组、卡托普利预处理组、蛋白激酶 C 阻断剂+卡托普利组、一氧化氮合酶阻断剂+卡托普利组和核因子 KB 阻断剂+卡托普利组。利用分光光度计测定丙二醛和超氧化物歧化酶含量;全自动生物化学分析仪测定乳酸脱氢酶含量。Fluor 3/AM 负载染色和流式细胞分析技术测定细胞内钙离子浓度。结果 卡托普利预处理和缺氧预处理均可减轻缺氧再灌注时心肌细胞内钙离子浓度增加(594 ± 5 nmol/L, 507 ± 32 nmol/L 比 789 ± 9 nmol/L, $P < 0.01$), 抑制乳酸脱氢酶和丙二醛的增加和超氧化物歧化酶含量的降低;但与对照组(414 ± 37 nmol/L)比较钙内流仍有轻度增加($P < 0.05$);预先分别加入蛋白激酶 C 阻断剂、一氧化氮合酶阻断剂、核因子 KB 阻断剂与卡托普利共同孵育细胞,行缺氧复氧损伤所测得细胞内钙离子浓度分别为 676 ± 32 nmol/L、 700 ± 37 nmol/L 和 689 ± 11 nmol/L,与卡托普利预处理组比较有所增加($P < 0.05$);但与缺氧复氧组比较仍有降低($P < 0.05$)。结论 以上提示,卡托普利预处理可抑制缺氧复氧时的钙超载及其脂质过氧化损伤。其机制可能是通过轻度增加钙内流、启动心肌延迟保护作用;其过程可能涉及蛋白激酶 C、一氧化氮合酶和核因子 KB 信号转导通路中的多个环节。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

Effect of Captopril Late Preconditioning on Intracellular Free Calcium Concentration in Cardiac Myocytes of the Neonatal Rat Undergone Anoxia-Reoxygenation Injury

ZHENG Yang, TONG Qian, and CHI Bao-Rong

(Department of Cardiology, First Hospital, Jilin University, Changchun 130021, China)

[KEY WORDS] Fluor 3/AM; Cardiac Myocytes; Calcium; Preconditioning; Anoxia-Reoxygenation Injury; Captopril

[ABSTRACT] Aim To observe the effects of captopril late preconditioning on intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) in cardiac myocytes of the neonatal rat undergone anoxia-reoxygenation injury and evaluate its delayed protective role.

Methods The anoxia-reoxygenation models in cultured ventricular myocytes of neonatal rat were established and divided into 7 groups: normal, anoxia-reoxygenation, preconditioning, captopril, captopril + PKC inhibitor, captopril + NOS inhibitor (L-NAME), captopril + NF- κ B inhibitor (PDTC). Using spectrophotometry, the activities of malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) were observed. The lactate dehydrogenase (LDH) were observed by biochemical instruments. Using Fluor 3/AM loading and flow cytometry technique, the $[Ca^{2+}]_i$ were observed.

Results $[Ca^{2+}]_i$ was increased in anoxia-reoxygenation group (789 ± 9 nmol/L vs. 414 ± 37 nmol/L, $P < 0.01$). The precondition of captopril and anoxia-reoxygenation resulted in a significant decrease in $[Ca^{2+}]_i$ (594 ± 5 nmol/L, 507 ± 32 nmol/L vs. 789 ± 9 nmol/L, $P < 0.01$), at one time $[Ca^{2+}]_i$ were lightly increased than normal oxygen condition ($P < 0.05$). Before treatment with captopril, we add PKC blocking agent, PDTC, L-NAME to cell media respectively, captopril late preconditioning relieved calcium overload during anoxia-reoxygenation condition, myocytes $[Ca^{2+}]_i$ were measured as 676 ± 32 nmol/L, 700 ± 37 nmol/L, 689 ± 11 nmol/L, which were significantly increased compared with captopril group ($P < 0.05$); while compared with anoxia-reoxygenation group were still reduced ($P < 0.05$).

Conclusion Captopril late preconditioning in cardiac myocytes is triggered by slightly increasing $[Ca^{2+}]_i$ and weakening the calcium overload and lipid peroxidation effect during subsequenced anoxia-reoxygenation injury. It may include the route of PKC, NF- κ B, NOS.

[收稿日期] 2004-09-13 [修回日期] 2005-06-25

[基金项目] 吉林省科技发展计划资助(吉发合字 990581-1)

[作者简介] 郑 杨, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事高血压和冠心病的研究, 联系电话为 13039202930, E-mail 为 zhengyanghappy2005@tom.com。迟宝荣, 教授, 博士研究生导师, 主要从事动脉硬化研究, 联系电话为 0431-5612437, E-mail 为 chibaorong@sohu.com。佟倩, 副主任医师, 博士, 研究方向为高血压, 联系电话为 0431-5612342, E-mail 为 tongqianhappy2005@sina.com。

防治缺血再灌注损伤是心血管领域研究的重点课题, 1972 年 Shen 等^[1]发现犬心脏冠状动脉短暂闭塞后复灌可加速细胞内 Ca^{2+} 的积聚, 并首次提出钙超载之说, 从而使钙在再灌注损伤中的作用成为人们研究的重点和靶点。缺血预适应 (ischemic preconditioning, IPC) 作为减轻缺血再灌注损伤最强大的

内源性保护机制,涉及细胞内多种复杂的变化。有研究证明,细胞内钙离子($[Ca^{2+}]_i$)的变化在早期缺血预适应中起重要作用^[2]。血管紧张素转换酶抑制剂(angiotensin converting enzyme inhibitor, ACEI)作为细胞保护剂近年来备受关注,通过诱导或增强预处理早期心脏保护作用已有较多研究,我们前面的实验已经证明,卡托普利预适应还具有延迟保护作用^[3,4],但 $[Ca^{2+}]_i$ 在晚期预处理的变化及其作用尚不清楚。我们应用 FLUO-3 荧光指示剂,采用流式细胞分析技术,从细胞水平探讨 ACEI——卡托普利晚期预处理中 $[Ca^{2+}]_i$ 的变化及其作用。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

流式细胞仪(B-D, 美国);可见光分光光度计(Backman DU-640 美国)。卡托普利(Captopril)由中美上海施贵宝公司惠赠;一氧化氮合酶抑制剂(L-NAME)、核因子 κ B 阻断剂(PDTC)、蛋白激酶 C 阻断剂(chelerythrine) Sigma, USA 出品。Fluo-3/AM、购于 Sigma 公司,Fluo-3/AM 用 Me_2SO 配成,分装并于 $-20^\circ C$ 保存备用;丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)检测试剂盒购于南京建成生物工程公司;乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)由生物化学自动分析仪检测;胎牛血清和 DMEM 合成培养基购自 Gibco 公司。Hank's 缓冲液:NaCl 8.0 g, KCl 0.4 g, KH_2PO_4 0.06 g, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 0.13 g, Na_2CO_3 0.35 g, $CaCl_2$ 0.14 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g, 葡萄糖 $\cdot H_2O$ 10.9 g, 加三蒸水至 1 000 mL, 混匀后用 $NaHCO_3$ 调 pH 至 7.4, 过滤除菌, 250 mL 瓶分装, $4^\circ C$ 保存。D-Hank's 缓冲液:NaCl 8.0 g, KCl 0.4 g, KH_2PO_4 0.06 g, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 0.13 g, Na_2CO_3 0.35 g, 加三蒸水至 1 000 mL, 混匀后用 $NaHCO_3$ 调 pH 至 7.4, 高压除菌, 250 mL 瓶分装, $4^\circ C$ 保存。

1.2 新生大鼠心肌细胞的原代培养

取新生 1~4 天 Wistar 大鼠(吉林大学医学部实验动物部提供),消毒皮肤,开胸摘取心脏。取心肌组织剪成 1 mm^3 碎块,0.1%胰蛋白酶分次消化,静置 2 min,自然沉淀,弃上清。沉淀,再次消化反复 2 次后取上清;加入 $4^\circ C$ 预冷含小牛血清的 DMEM 终止胰酶作用,1 000 转/min $\times$ 10 min, $4^\circ C$ 离心、弃上清,反复 3 次,以洗去残存胰酶;以差速贴壁法纯化心肌细胞,使纯度达到 90% 以上。以 $1.5 \times 10^5/L$ 接种于预先用 50 mg/L 多聚赖氨酸涂布过的 2.5 cm^2

培养瓶,在 $37^\circ C$ 、95% O_2 + 5% CO_2 的二氧化碳孵箱内进行培养。每 2 天更换一次培养基,取培养 4 日的单层细胞进行实验。

1.3 缺氧复氧损伤模型的建立

预先用高纯度氮气饱和 D-Hank's 液(无糖)通气,持续时间 $> 40\text{ min}$, 氧分压 $\leq 4.0\text{ kPa}$ 即为低氧液;用纯氧饱和 Hank's 液(含糖)通气,持续时间 $> 40\text{ min}$, 即为复氧液。用低氧液置换正常培养基,并于培养瓶中充入高纯度氮气造成心肌细胞缺氧,封口膜密封培养瓶 30 min;以复氧液置换低氧液,开放培养瓶,并充以纯氧 90 min, 即为心肌细胞复氧,建立缺氧/复氧损伤模型。

1.4 实验分组

将培养的单层心肌细胞分为 7 组。正常对照组;④缺氧复氧损伤组:缺氧培养 30 min, 复氧培养 90 min;④缺氧预适应组:缺氧 5 min, 复氧 5 min, 3 次, 24 h 后重复 ④组;卡托普利预处理组:在培养基中加入卡托普利(10^{-2} mol/L)^[3,4], 24 h 后重复 ④组;PKC 阻断剂+卡托普利组:在培养基中加 PKC 阻断剂(chelerythrine 10^{-6} mol/L) 30 min 后, 重复组;L-NAME+卡托普利组:培养基中加 L-NAME(10^{-6} mol/L) 30 min 后重复组;⑧PDTC+卡托普利组:培养基中加 PDTC(10^{-6} mol/L) 30 min 后重复组。各组均在上述心肌细胞培养条件下培养 3 批细胞并做 6 份重复测试。

1.5 流式细胞仪检测胞浆游离钙

荧光探针 Fluo-3 AM(终浓度 5 mmol/L)负载,进行流式细胞分析。激发波长 488 nm, 随机测定单个细胞的荧光强度值 F(反映细胞内 Ca^{2+} 浓度), 取 10^5 个细胞荧光强度值的平均值为每份标本的测定值;加入 Triton X-100 及 1 mmol/L 的 $CaCl_2$, 测得最大荧光强度 F_{max} , 再加入 EGTA, 测得最小荧光强度 F_{min} 。根据公式 $[Ca^{2+}]_i(\text{nmol/L}) = Kd(F - F_{min}) / (F_{max} - F)$ 计算细胞 $[Ca^{2+}]_i$, $Kd = 450\text{ nmol/L}$ 。

1.6 丙二醛、超氧化物歧化酶和乳酸脱氢酶的含量测定

收集各实验组的培养上清,按 1 mL/份分装, $-70^\circ C$ 冻存备用。利用分光光度计按试剂盒说明书对 MDA 和 SOD 进行测定;利用生物化学自动分析仪测定 LDH 含量。

1.7 统计学处理

各组数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组数据间显著性检验采用 t 检验, 多个样本均数比较及两两比较采用 ANOVA, 统计学分析应用 SPSS 软件包。 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 缺氧复氧对心肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响

心肌细胞在常氧下(对照组) $[Ca^{2+}]_i$ 为 414 ± 37 nmol/L; 缺氧复氧组 $[Ca^{2+}]_i$ 显著升高为 789 ± 9 nmol/L, 二者比较差异有显著性, 表明心肌细胞缺氧复氧时存在钙超载(表 1, Table 1)。

2.2 预适应对缺氧复氧心肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响

缺氧预适应组和卡托普利预处理组 $[Ca^{2+}]_i$ 分别为 507 ± 32 和 594 ± 5 nmol/L, 与缺氧再灌注组比较显著降低(P 均 < 0.01), 与对照组比较仍有增加(P 均 < 0.05)(表 1, Table 1)。表明缺氧预适应和卡托普利预处理均可抑制缺氧再灌注时的钙超载, 但又有轻度钙内流增加。

2.3 蛋白激酶 C 阻断剂、一氧化氮合酶抑制剂和核因子 κB 阻断剂对 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响

在细胞悬液中预先分别加入 PKC 阻断剂、L-NAME 和 PDTC 作用 30 min 后再加入卡托普利, 24 h

后行缺氧复氧, 所测得 $[Ca^{2+}]_i$ 分别为 676 ± 32 nmol/L、 689 ± 11 nmol/L 和 700 ± 37 nmol/L, 与卡托普利预处理组比较 $[Ca^{2+}]_i$ 均有不同程度增加(P 均 < 0.05); 与缺氧复氧组比较 $[Ca^{2+}]_i$ 仍有程度不同降低(P 均 < 0.05)(表 1, Table 1)。表明上述阻断剂可部分阻断卡托普利对 $[Ca^{2+}]_i$ 的作用。

2.4 卡托普利晚期预处理对缺氧复氧乳鼠心肌细胞丙二醛、超氧化物歧化酶和乳酸脱氢酶的影响

与正常对照组比较, 缺氧复氧组培养基中 LDH 和 MDA 含量增加, SOD 含量降低($P < 0.01$); 缺氧预适应组和卡托普利预处理组 MDA、SOD 和 LDH 则无明显变化($P > 0.05$)。与缺氧复氧组比较, 缺氧预适应组和卡托普利预处理组 LDH 和 MDA 含量下降, SOD 含量增高($P < 0.01$); 三种阻断剂组 LDH、MDA 和 SOD 含量介于卡托普利和缺氧预适应组与缺氧复氧组之间(表 1, Table 1)。

表 1. 实验各组乳鼠心肌细胞游离钙、丙二醛、超氧化物歧化酶和乳酸脱氢酶的变化($\bar{x} \pm s$)

Table 1. The changes of $[Ca^{2+}]_i$, MDA, SOD, LDH in the myocytes of neonatal rat in different groups

分 组	SOD(nmol/L)	丙二醛(UN/mL)	乳酸脱氢酶(U/L)	游离钙(nmol/L)
正常组	33.24 ± 1.08	0.94 ± 0.02	18.32 ± 0.99	414 ± 37
缺氧损伤组	15.89 ± 0.98^a	1.80 ± 0.02^a	42.45 ± 1.15^a	789 ± 9^a
缺氧预处理组	23.46 ± 0.76^c	1.25 ± 0.01^c	26.20 ± 1.05^c	507 ± 32^{bc}
卡托普利预处理组	26.54 ± 1.25^c	1.18 ± 0.03^c	25.56 ± 1.12^c	594 ± 5^{bc}
PKC 阻断剂组	19.75 ± 1.11^{ce}	1.52 ± 0.05^{ce}	33.82 ± 0.95^{ce}	676 ± 32^{df}
L-NAME 组	20.50 ± 1.22^{ce}	1.44 ± 0.02^{ce}	34.15 ± 2.01^{ce}	689 ± 11^{df}
PDTC 组	19.54 ± 0.84^{ce}	1.52 ± 0.1^{ce}	32.60 ± 2.10^{ce}	700 ± 37^{df}

a: $P < 0.01$, b: $P < 0.05$, 与正常组比较; c: $P < 0.01$, d: $P < 0.05$, 与缺氧复氧组比较; e: $P < 0.01$, f: $P < 0.05$, 与卡托普利组比较。

3 讨论

本实验采用培养乳鼠细胞, 构建心肌细胞缺氧复氧损伤模型以模拟缺血再灌注损伤, 为从细胞水平直观地认识缺血再灌注损伤、ACEI 预处理对心肌细胞的延迟保护作用提供了实验研究的基础。

结果表明, 卡托普利预处理可有效抑制 24 h 后缺氧复氧心肌细胞 LDH 释放的增加、减少 MDA 含量、提高 SOD 活性, 提示卡托普利预处理可增强缺氧复氧心肌细胞抗自由基和脂质过氧化损伤的能力, 对再灌注心肌细胞有延迟保护作用。进一步实验观察到, 卡托普利预处理后 24 h 行缺氧复氧 $[Ca^{2+}]_i$ 显著降低; 但仍有 $[Ca^{2+}]_i$ 轻度增加, 提示, 卡托普利预处理抑制缺氧复氧损伤所致 $[Ca^{2+}]_i$ 过度升高, 及其钙超载所引起脂质过氧化反应和细胞损伤。分析其机制, 可能为轻度增加钙内流, 触发了

细胞内的信号瀑布, 启动系列的保护程序, 实现晚期预适应, 即心脏的延迟保护作用。

Ca^{2+} 作为细胞内第二信使, 在细胞生理和病理过程中起重要作用。生理情况下触发心肌细胞收缩、参与细胞电活动以及作为第二信使参与酶活性和细胞代谢的调节。病理情况下细胞内钙超载可抑制细胞的舒缩功能, 激活细胞内钙离子依赖酶的活性, 促进脂质过氧化, 造成细胞不可逆性损伤, 并引发心肌电生理异常及其心律失常。已有研究表明^[5], 缺血及缺血再灌注(缺氧及缺氧/复氧)损伤可增加心肌细胞 Ca^{2+} 的跨膜内流, 增加细胞内的钙含量, 导致钙超载。我们利用荧光探针 Fluor-3 AM 负载行流式细胞分析, 从单细胞水平也证实, 缺氧复氧可显著增加 $[Ca^{2+}]_i$, 造成细胞钙超载, 所得结果与其它实验室报道一致^[6]。细胞内钙超载一方面启动

了细胞坏死及凋亡程序,细胞发生不可逆坏死;另一方面钙超载诱发后除极,易导致恶性心律失常的发生。是缺血再灌注产生细胞损伤及心律失常的最恶祸首,这已是不争的事实^[6,7]。但近年来大量的研究也显示^[8,9], $[Ca^{2+}]_i$ 是早期缺血预适应保护中不可缺少的触发因素,即反复短暂缺血,使 $[Ca^{2+}]_i$ 一过性轻度升高, $[Ca^{2+}]_i$ 作为触发因子触发了细胞内的信号瀑布,启动了一系列的保护程序,实现心脏保护作用。因此, $[Ca^{2+}]_i$ 是双重身份双重作用的关键离子,既作为早期缺血预适应的触发子,又是缺血预适应效应子改变的结果。本实验结果从单细胞水平证明,模拟缺血晚期预适应和卡托普利均可轻度增加 $[Ca^{2+}]_i$,并抑制24 h后模拟缺血再灌注引起的钙超载。即 $[Ca^{2+}]_i$ 不仅可触发早期预适应,也可能触发了晚期预适应的保护作用。

为进一步探讨卡托普利预处理对缺氧复氧时细胞内钙离子影响的机制,预先分别给予L-NAME、PKC阻断剂和PDCT,实验证明三种阻断剂可部分取消卡托普利对 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响,但任一阻断剂均不能完全取消卡托普利的延迟保护作用。提示其过程可能涉及PKC、NOS和核因子 κB 信号转导通路中的多个环节。

综上所述,本实验通过培养乳鼠心肌细胞模拟

缺血再灌注损伤模型,证明卡托普利预处理可抑制缺氧复氧时的钙超载及其脂质过氧化损伤。其机制可能是通过轻度增加钙内流、启动心肌延迟保护作用;其过程可能涉及PKC、NOS和核因子 κB 信号转导通路中的多个环节。

[参考文献]

- [1] Shen AC, Jennings RB. Kinetics of calcium accumulation in acute myocardial ischemic injury. *Am J Pathol*, 1972, **67**: 441-447
- [2] Meldrum DR. Mechanism of cardiac preconditioning: ten years after the discovery of ischemic preconditioning. *J Surg Res*, 1997, **73**: 1
- [3] 徐慧,郑杨,佟倩. 卡托普利晚期预处理对人内皮细胞缺氧复氧损伤时内皮素1和一氧化氮和酶表达的影响. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (2): 155-158
- [4] 徐慧,郑杨,佟倩. 卡托普利晚期预处理保护人内皮细胞缺氧复氧损伤的作用机制. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (3): 291-295
- [5] Ylitalo KV, Alar Rami A, Liimatta EV, Peuhkurinen KJ, Hassinen IE. Intracellular free calcium and mitochondrial membrane potential in ischemia/reperfusion and preconditioning. *J Mol Cell Cardiol*, 2000, **32** (7): 1 223-238
- [6] Dekker LR, Coronel R, VanBavel E, Spaan JA, Ophof T. Intracellular Ca^{2+} and delay of ischemia-induced electrical uncoupling in preconditioned rabbit ventricular myocardium. *Cardiovasc Res*, 1999, **144** (1): 101-112
- [7] Steenbergen C, Perlman ME, London RE, Murphy E. Mechanism of preconditioning: ionic alterations. *Circ Res*, 1993, **72** (1): 112-125
- [8] Miyawaki H, Ashraf M. Ca^{2+} as a mediator of ischemic preconditioning. *Circ Res*, 1997, **80** (6): 790-799
- [9] Smith GB, Stefanelli T, Wu ST, Wikmar-Coffelt J, Pamley WW, Zaugg CE. Rapid adaptation of myocardial calcium homeostasis to short episodes of ischemia in isolated rat hearts. *Am Heart J*, 1996, **131** (6): 1 106-112

(此文编辑 朱雯霞)

•读者•作者•编者•

《中国动脉硬化杂志》第三届编辑委员会

(2002-08-03 组建, 2004-08-03 调整)

名誉主编: 蔡海江*

主 编: 杨永宗*

副 主 编: 唐朝枢* 陈保生* 廖端芳* 叶 平* 胡必利*

秘 书 长: 胡必利 (兼)

编 委 (按姓名拼音字母顺序排列):

陈 琪*	陈 瑗	陈生弟	陈文垠	陈孝曙	范乐明*	高广道	高钰琪	葛均波
顾 瑛	关永源	何作云	胡维诚*	黄达德	霍 勇	金惠铭	黎 健	李建军
李元建*	林曙光*	凌文华	凌亦凌	刘秉文	刘德文	刘国庆	刘乃丰	卢 建
欧阳静萍	潘敬运	阮长耿	阮秋蓉*	沈卫峰*	宋剑南	粟秀初	徐玉林*	王家富
王建枝	王士雯	王树人*	韦立新*	温进坤*	沃兴德	吴可贵	吴立玲*	吴其夏
吴满平*	吴伟康	肖献忠	徐仓宝*	杨宝峰	杨向红*	杨英珍	易光辉	尹卫东
詹思延	张 运	张道友	张闾珍	赵克森	赵水平*	周 新	朱广瑾	朱晓东

特邀编委: 陈富生 范江霖

注: 姓名右上角标* 者为常务编委

中国动脉硬化杂志编辑部: 胡必利(教授,主任) 朱雯霞(编辑) 文玉珊(编辑)

常 玲(一级校对,编辑干事)