论著

文章编号:1000-5404(2005)01-0056-03

模拟缺血预适应对原代培养乳鼠窦房结细胞缺血再灌注损伤的保护作用

张 倩,宋治远,仝识非,钟 理 (第三军医大学西南医院心血管内科,重庆市介入心脏病学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 通过观察不同时间、不同次数的模拟短暂缺血刺激对随后较长时间缺血/再灌注乳鼠窦房结细胞活性的影响,以探讨模拟缺血预适应(IP)对原代培养乳鼠窦房结细胞的保护作用。**方法** 取培养2 d的窦房结细胞,分为对照组、模拟缺血/再灌注(I/R)组及IP1(缺血5 min/再灌注5 min)组、IP2(5 min/5 min×2)组、IP3(5 min/5 min×3)组、IP4(10 min/10 min)组、IP5(10 min/10 min×2)组、IP6(10 min/10 min×3)组、IP7(20 min /20 min)组、IP8(20 min/20 min×2)组、IP9(20 min/20 min×3)组,在模拟缺血3 h/再灌注4 h结束后,通过PI染色及MTT比色法检测各组乳鼠窦房结细胞PI染色阳性率及D_{490}值的变化。**结果** ①各实验组乳鼠窦房结细胞D_{490}值均较对照组明显降低($P<0.01$),但IP2组、IP3组、IP4组、IP5组及IP7组D_{490}值却较I/R组明显升高($P<0.01$)。②各实验组PI染色阳性窦房结细胞百分率均较对照组明显增高($P<0.01$),但IP2组、IP3组、IP4组、IP5组及IP7组PI染色阳性率却较I/R组显著降低($P<0.01$)。**结论** 模拟IP对随后较长时间I/R的乳鼠窦房结细胞具有保护效应,而这种保护作用的产生可能与累计的模拟缺血刺激"总时程"有关。

关键词:窦房结细胞;缺血预适应;细胞活性

中图法分类号:R322.11;R459.9;R654.1 **文献标识码**:A

Protective effect of mimic ischemic preconditioning on viability of cultured sinoatrial node cells of neonatal rats

ZHANG Qian, SONG Zhi-yuan, TONG Shi-fei, ZONG Li (Department of Cardiology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To compare the effects of different ischemic preconditioning (IP) protocols on the viability of primary cultured sinoatrial node cells from neonatal rats for investigating the protective effect of IP. **Methods** The cells were randomized into eleven groups: control, ischemia/reperfusion (I/R), IP1 (preconditioned with ischemia/reperfusion for 5 min), IP2 (preconditioned with 2 cycles of ischemia/ reperfusion for 5 min), IP3 (preconditioned with 3 cycles of ischemia/reperfusion for 5 min), IP4 (preconditioned with ischemia/reperfusion for 10 min), IP5 (preconditioned with 2 cycles of ischemia/reperfusion for 10 min), IP6 (preconditioned with 3 cycles of ischemia/reperfusion for 10 min), IP7 (preconditioned with ischemia/reperfusion for 20 min), IP8 (preconditioned with 2 cycles of ischemia/reperfusion for 20 min), and IP9 (preconditioned with 3 cycles of ischemia/reperfusion for 20 min). PI positive staining rate and changes of D_{490} after 3 h ischemia/4 h reperfusion were determined by PI staining and MTT chromatometry. **Results** ① D_{490} value in sinoatrial node cells in each experimental group was significantly lower than that in the control group, but that in IP2, IP3, IP4, IP5, and IP7 groups was significantly higher than that in I/R group ($P<0.01$). ② The percentage of PI positively stained sinoatrial node cells in each experimental group was significantly higher than that in the control group, but that in IP2, IP3, IP4, IP5, and IP7 groups was significantly lower than that in I/R group ($P<0.01$). **Conclusion** IP can offer protection to sinoatrial node cells exposed to severe I/R and the protection may be determined by the total period of ischemic pretreatment.

Key words: sinoatrial node cell; ischemic preconditioning; cell viability

窦房结作为心脏的最高起搏点,其病变直接表现为心电生理功能的异常;尽管窦房结细胞本身氧耗低,代谢不活跃,但缺血缺氧仍可能是其主要的致病因素之一。作为普遍存在的一种生物自身保护功能,缺血预适应(ischemic preconditioning, IP)对随后的严重缺血

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30070314)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30070314)

作者简介:张 倩(1975-),女,云南省大理市人,博士研究生,医师,主要从事心脏电生理方面的研究。电话:(023)66992060

通讯作者:宋治远,电话:(023)68754000-73050

收稿日期:2004-07-09;**修回日期**:2004-11-09

及再灌注损伤所提供的保护作用日益受到重视，有关心肌 IP 的研究也逐渐成为热点。已有研究发现 K_{ATP} 通道开放剂对原代培养乳鼠窦房结细胞具有缺血保护作用[1]，但模拟 IP 对窦房结细胞保护效应的研究少见文献报道。本实验将通过观察不同时间、不同次数的模拟短暂缺血刺激对随后较长时间的缺血/再灌注(I/R)乳鼠窦房结细胞活性的影响，以探讨 IP 对原代培养乳鼠窦房结细胞的保护作用及其机制。

1　材料和方法

1.1　材料

1.1.1　实验动物　　出生 24 h 内的 Wistar 乳鼠 20 只，雌雄不拘，由第三军医大学实验动物中心提供。

1.1.2　仪器与试剂　　Ⅱ型胶原酶、MTT[3-(4,5 二甲基噻唑-2)-2,5 二苯基四氮唑溴盐]及 PI(碘化丙啶)为 Sigma 公司产品。BIORAD 公司 550 型酶联免疫检测仪。BD 公司 FACS Calibuler 型流式细胞分析仪。模拟缺血溶液(mmol/L)：NaCl 98.5、KCl 10、NaH_2PO_4 0.9、$NaHCO_3$ 6.0、$CaCl_2$ 1.8、$MgSO_4$ 1.2、乳酸钠 40、HEPES 20，pH 6.8；模拟再灌注溶液(mmol/L)：NaCl 129.5、KCl 5.0、NaH_2PO_4 0.9、$NaHCO_3$ 20、$CaCl_2$ 1.8、$MgSO_4$ 1.2、葡萄糖 55、HEPES 20，pH 7.4。

1.2　方法

1.2.1　乳鼠窦房结细胞培养　　按本实验室建立的乳鼠窦房结细胞原代培养与鉴定方法进行[2]。

1.2.2　实验分组　　取培养 2 d 的乳鼠窦房结细胞进行实验，分为以下 3 组：①对照组(C)：37 ℃，以再灌注液替换培养液，并向再灌注液中持续通以 95% O_2-5% CO_2 混合气。②模拟组(I/R)：以模拟缺血溶液替换培养液，并向模拟缺血溶液中持续通以 95% N_2-5% CO_2 混合气 3 h(PO_2 < 4 kPa)，进行模拟缺血；再以模拟再灌注溶液替换模拟缺血溶液，并向模拟再灌注液中持续通以 95% O_2-5% CO_2 混合气 4 h(PO_2：25 ~ 30 kPa)，进行模拟再灌注。③模拟组(IP)：根据模拟预缺血及相应再灌注时间的不同，又分为 9 个亚组。IP1 组：模拟缺血 5 min、再灌注 5 min，继而行模拟 I/R。IP2：模拟缺血 5 min、再灌注 5 min，反复 2 次，继而行模拟 I/R。IP3：模拟缺血 5 min、再灌注 5 min，反复 3 次，继而行模拟 I/R。IP4：模拟缺血 10 min、再灌注 10 min，继而行模拟 I/R。IP5：模拟缺血 10 min、再灌注 10 min，反复 2 次，继而行模拟 I/R。IP6：模拟缺血 10 min、再灌注 10 min，反复 3 次，继而行模拟 I/R。IP7：模拟缺血 20 min、再灌注 20 min，继而行模拟 I/R。IP8：模拟缺血 20 min、再灌注 20 min，反复 2 次，继而行模拟 I/R。IP9：模拟缺血 20 min、再灌注 20 min，反复 3 次，继而行模拟 I/R。缺氧/复氧时混合气配方参照张建军等[3]及 Ghosh 等[4]方法进行，模拟缺血液及模拟再灌注液事先分别以 95% N_2-5% CO_2 及 95% O_2-5% CO_2 饱和处理。

1.2.3　乳鼠窦房结细胞光密度值测定　　将细胞培养于 96 孔板内，行模拟再灌注时每孔中加入 MTT 溶液，使其终浓度为 0.1 mg/ml，4 h 后取出培养板，移去孔内液体，每孔加入二甲基亚砜 150 μl，37 ℃振荡 10 min。后用酶联免疫检测仪在 490 nm 波长处测定每孔光密度值(D_{490})。

1.2.4　乳鼠窦房结细胞 PI 荧光染色测定　　将细胞培养于 25 ml 培养瓶，待模拟再灌注结束后，以胰酶消化制成细胞悬液，离心弃上清。以 PBS 重新悬浮细胞，加入等体积 PI 液(50 mg/ml)，染色 10 min。后用流式细胞分析仪检测细胞荧光染色阳性比率。

1.3　统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 统计软件做单因素方差分析及均数间多重比较。

2　结果

2.1　模拟缺血预适应对乳鼠窦房结细胞光密度值的影响

各组乳鼠窦房结细胞 MTT 比色 D_{490} 值见表 1。所有各实验组乳鼠窦房结细胞的 D_{490} 值均较对照组明显降低($P < 0.01$)，但 IP2 组(5 min × 2)、IP3 组(5 min × 3)、IP4 组(10 min × 1)、IP5 组(10 min × 2)及 IP7 组(20 min × 1)的 D_{490} 值却较 I/R 组明显升高($P < 0.01$)，表明细胞活性增强、I/R 损伤减轻。而 IP1 组(5 min × 1)、IP6 组(10 min × 3)、IP8 组(20 min × 2)及 IP9 组(20 min × 3)的 D_{490} 值与 I/R 组比较则无显著差异($P > 0.05$)，表明单次 5 min 的模拟 IP 及连续 3 次的 10 min 与 2 次以上的 20 min 模拟 IP 均不能对随后较长时间的 I/R 损伤产生影响。

表 1　各组乳鼠窦房结细胞 MTT 比色 D_{490} 值及 PI 染色百分率的比较($n = 12$，$\bar{x} \pm s$)

Tab 1　Comparison of D_{490} values and positive rates of sinoatrial node cells in each group by MTT colorimetry ($n = 12$，$\bar{x} \pm s$)

Group	D_{490}	Positive rate of PI staining(%)
C	0.845 ± 0.048	1.10 ± 0.34
I/R	0.321 ± 0.046**	25.35 ± 2.40**
IP1	0.335 ± 0.038**	24.70 ± 1.47**
IP2	0.498 ± 0.040**##	15.48 ± 1.55**##
IP3	0.549 ± 0.047**##	12.76 ± 1.42**##
IP4	0.485 ± 0.053**##	15.84 ± 1.31**##
IP5	0.523 ± 0.042**##	14.59 ± 1.59**##
IP6	0.330 ± 0.044**	24.44 ± 1.48**
IP7	0.515 ± 0.042**##	14.92 ± 1.45**##
IP8	0.318 ± 0.037**	26.36 ± 1.62**
IP9	0.310 ± 0.032**	26.87 ± 1.53**

$F(D_{490}) = 104.404$，$P = 0.000$；$F(\mathrm{PI}) = 389.197$，$P = 0.000$；

**：$P < 0.01$，*vs* C group；##：$P < 0.01$，*vs* I/R group

2.2　乳鼠窦房结细胞 PI 荧光染色测定

各组乳鼠窦房结细胞 PI 染色阳性率见表 1。通过对乳鼠窦房结细胞进行 PI 荧光染色发现，各实验组窦房结细胞 PI 染色阳性百分率均较对照组明显增高($P < 0.01$)，但 IP2 组(5 min × 2)、IP3 组(5 min × 3)、IP4 组(10 min × 1)、IP5 组(10 min × 2)及 IP7 组(20 min × 1)PI 染色阳性细胞百分率却较 I/R 组显著降低($P < 0.01$)，而 IP1 组(5 min × 1)、IP6 组(10 min × 3)、IP8 组(20 min × 2)及 IP9 组(20 min × 3)与 I/R 组比较则无显著差异($P > 0.05$)。

3 讨论

早在1986年，Murry就发现犬心肌在经历短暂的缺血后，可使其后严重缺血所引起的心肌梗死范围明显缩小。随后的研究发现，IP对心脏的保护作用还包括增强心肌收缩力、减轻心肌顿抑和减少心律失常的发生等，其广泛存在于在不同种属动物（狗、猪、大鼠、兔等）和人类。但目前尚少见IP对窦房结细胞保护效应的研究报道。

3-(4，5-二甲基噻唑-2)-2，5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)能被活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶还原为蓝紫色结晶并沉积在细胞中，二甲基亚砜溶解此紫色结晶后，其光吸收值在490 nm波长处与活细胞数量成正比。碘化丙啶(PI)可穿透变性细胞的细胞膜，与解体的DNA结合，使其着色，而活细胞拒染。两种方法结合可提高对细胞活性检测的敏感性和准确性。因此，本实验通过MTT比色及PI染色以检测细胞活性。

既往研究显示，初次缺血的时间和频率对IP的诱导至关重要[5]。不仅缺血时间、刺激频率的改变会影响IP效应的产生，即使同一阻断剂对不同刺激频率所诱发的IP的干预也不相同[6]。由此推测IP的产生需要有效的“缺血时程”来触发，诱发过程中各启动子之间存在协同作用，即当单次短暂缺血刺激时，诸多内源活性物质共同作用达到启动阈值，任一途径的阻断均可导致保护作用的丧失；然而当多次短暂缺血刺激顺序发生时，即使某一途径遭到阻断，其余代谢物经多次刺激的累积仍可达到启动阈值而继续诱发IP[7]。虽然对于有效的初次缺血时间及刺激频率至今并无定论，但一般认为低于2 min的单次缺血刺激不足以产生IP。本研究结果显示，初次缺血的时间和刺激频数共同决定着IP的产生，即预缺血的总时程对IP的诱导起至关重要的作用。我们的研究显示单次5 min、3次10 min及2～3次20 min的缺血预处理，均未能对经历严重缺血/再灌注的窦房结细胞产生保护作用；而2～3次5 min、1～2次10 min及单次20 min的缺血预处理显著减少了窦房结细胞的死亡率，增加了细胞活性。由此我们推测在IP诱导启动过程中起决定作用的应该是预缺血的总时程，而非刺激频数或单次缺血本身，并且这种预缺血总时程似乎被局限在一个有限的范围内，在此有效缺血时程内，内源活性物质——启动子的释放，相应膜受体的活化累积达到启动阈值，从而诱发IP。因此当单次缺血刺激相对短暂时，增加刺激频数有助于IP启动元素的累积；而当单次缺血时间相对较长，其本身的缺血刺激足以制造足够的启动因素时，过多的刺激频数反而导致钙离子、氧自由基等损伤因子的累积，从而阻断IP的产生。本实验显示低于5 min的缺血刺激未能启动IP，而高于30 min的累计缺血刺激同样导致IP的丧失，刺激频率的增加并不总与强化IP相联系，只有当刺激频率与刺激强度有效结合，即预缺血总时间控制在一定范围内时，刺激轮次的增加才与IP之间有了协同的作用。同时实验显示15 min的累计预缺血时间获得了最显著的保护效果，这似乎暗示着IP现象也并不完全是一个“全或无”的过程。然而现有的诸多研究对有效缺血时程的体现差别显著，不同种属的动物、类型各异的细胞以及各自的实验条件都是造成实验结果多样的重要原因，但总的说来在体动物模型的有效缺血时间普遍短于细胞水平的实验。

参考文献：

[1] 仝识非，宋治远. ATP敏感性钾通道开放剂对培养乳鼠窦房结细胞模拟缺血时细胞活性的影响[J]. 第三军医大学学报，2001，23(11)：1303－1305.

[2] 钟 理，宋治远. 乳鼠窦房结细胞取材与纯化培养方法的探讨[J]. 中国心脏起搏与心电生理杂志，2000，14(3)：188－190.

[3] 张建军，胡大一，唐朝枢，等. 缺血预适应对缺氧-复氧后细胞离子稳态的影响及机制[J]. 中国心脏起搏与心电生理杂志，2000，14(3)：191－194.

[4] Ghosh S，Standen N B，Galinanes M. Evidence for mitochondrial K ATP channels as effectors of human myocardial preconditioning[J]. Cardiovasc Res，2000，45(4)：934－940.

[5] Ghosh S，Standen N B，Galinanes M. Preconditioning the human myocardium by simulated ischemia：studies on the early and delayed protection[J]. Cardiovasc Res，2000，45(2)：339－350.

[6] Miki T，Cohen M V，Downey J M. Opioid receptor contributes to ischemic preconditioning through protein kinase C activation in rabbits[J]. Mol Cell Biochem，1998，186(1-2)：3－12.

[7] Cohen M V，Baines C P，Downey J M. Ischemic preconditioning：from adenosine receptor of KATP channel[J]. Annu Rev Physiol，2000，62：79－109.

（编辑 龙 亮）