论著

文章编号:1000-5404(2005)03-0192-04

河豚毒素停搏液减轻大鼠心肌细胞内钙超载作用的实验研究

杨朝坤,杨双强,谭松涛,汪 斌,陈 力 (重庆医科大学附属第一医院胸心外科,重庆 400016)

提 要: 目的 观察 Na^+ 通道阻滞剂河豚毒素(TTX)停搏液对离体大鼠心肌细胞内游离 Ca^{2+} 浓度的影响。**方法** 成年 Wistar 大鼠心脏,用酶解法分离成具有搏动性的心室肌细胞悬液,随机分成基础组、STH2 组和 TTX 组,STH2 组和 TTX 组分别应用 STH2 停搏液和 TTX 停搏液处理,建立模拟缺血/再灌注损伤的停搏/复搏细胞模型,激光扫描共聚焦显微镜测定各组细胞不同时期的 $[Ca^{2+}]_i$。用倒置显微镜观察细胞搏动情况和形态学变化。**结果** TTX 组和 STH2 组细胞复搏后 $[Ca^{2+}]_i$ 均明显高于基础组($P<0.01$),但 TTX 组 $[Ca^{2+}]_i$ 明显低于 STH2 组($P<0.01$);在停搏期间,TTX 组细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 上升速度和幅度明显低于 STH2 组;STH2 组和 TTX 组细胞复搏后搏动频率无明显差别($P>0.05$);形态学观察,TTX 组复搏后具有正常活力的杆形心肌细胞比例高于 STH2 组($P<0.01$)。**结论** 河豚毒素停搏液能减轻心肌细胞内 Ca^{2+} 超载和防止缺血再灌注损伤。

关键词: 心脏停搏液;极化停搏;河豚毒素;钠通道;心肌细胞;Ca^{2+}

中图法分类号: R329.2; R654.1; R996.3 **文献标识码**: A

Tetrodotoxin cardioplegia solution alleviates intracellular calcium overload in rat cardiomyocytes

YANG Chao-kun, YANG Shuang-qiang, TAN Song-tao, WANG Bin, CHEN Li (Department of Cardiothoracic Surgery, First Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of sodium channel inhibitor, tetrodotoxin (TTX) cardioplegia solution, on intracellular free Ca^{2+} concentration in isolated cardiomyocytes of rats. **Methods** Ventricular beating myocytes isolated from adult rat hearts by enzymatic dissociation were randomly divided into Base, STH2, and TTX groups. Myocytes in STH2 and TTX groups were treated with St. Thomas Ⅱ and TTX cardioplegia solution respectively for the establishment of the arrest/re-beating cell models of mimic ischemia-reperfusion injury (MIRI). $[Ca^{2+}]_i$ of cardiomyocytes at different stages in each group was measured by laser scanning confocal microscopy (LSCM). The beating and morphology of cardiomyocytes were observed by the inverted microscope. **Results** $[Ca^{2+}]_i$ after re-beating in both STH2 and TTX groups was higher than that in Base group ($P<0.01$), but $[Ca^{2+}]_i$ in TTX group was lower than that in STH2 group ($P<0.01$). During arrest, the elevation of $[Ca^{2+}]_i$ in TTX group was lower than that in STH2 group. There was no difference in beating rate after re-beating between STH2 and TTX groups ($P>0.05$). Morphologically, the ratio of normal active cardiomyocytes in TTX group after re-beating was higher than that in STH2 group ($P<0.01$). **Conclusion** Tetrodotoxin cardioplegia solution could alleviate intracellular Ca^{2+} overload in rat cardiomyocytes and prevent ischemia reperfusion injury.

Key words: cardioplegia; polarized arrest; tetrodotoxin; sodium channel; cardiomyocyte; calcium ion

随着心肌缺血/再灌注损伤(myocardial ischemia reperfusion injury, MIRI)机制的阐明,人们发现传统的高钾去极化心脏停搏液可使心肌细胞内出现 Na^+ 超载,进而诱发 Ca^{2+} 超载,造成心肌损伤[1]。近年来,有学者研究提出一种新的心肌保护方法 - 极化停搏,可提高整体缺血心脏的心肌保护[2,3]。本研究主要应用激光扫描共聚焦显微镜技术,观察 Na^+ 通道阻滞剂河豚毒素(tetrodotoxin, TTX)停搏液对单个心肌细胞内游离 Ca^{2+} 浓度($[Ca^{2+}]_i$)的影响,从细胞水平上探索极化心脏停搏对心肌缺血/再灌注损伤的保护作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 试剂和药品

透明质酸酶(华美生物工程公司),Fluo-3/AM(北京鼎国,Sigma 国内分装),离子载体 A23187(Sigma),河豚毒素(TTX,Sig-

作者简介:杨朝坤(1971-),男,重庆市万州区人,硕士研究生,主治医师,主要从事胸心外科临床方面的研究。电话:(023)89011010

收稿日期:2004-11-10;修回日期:2004-12-10

ma Chemical Co. USA)。胶原酶Ⅱ、牛血清白蛋白(BSA)、胰肽酶、无水二甲亚砜、台盼蓝、EGTA、HEPEs 等均由第三军医大学惠利试剂中心提供。无 Ca^{2+} K-H 液(Krebs-Henseleit buffer)成分(mmol/L)：NaCl 130，KCl 4.8，$MgSO_4$ 1.2，$NaHCO_3$ 2.5，NaH_2PO_4-$2H_2O$ 1.2，Glucose 12.5，HEPEs 12，pH 7.4(使用前 95% O_2 + 5% CO_2 持续氧合)。消化酶液Ⅰ组成：胶原酶Ⅱ(0.43 mg/ml)，透明质酸酶(0.3 mg/ml)，无 Ca^{2+} K-H 液 50 ml。消化酶液Ⅱ组成：胶原酶Ⅱ(0.43 mg/ml)，透明质酸酶(0.3 mg/ml)，胰肽酶(2 mg/ml)，BSA(0.2%)，无 Ca^{2+} K-H 液 50 ml。STH2(St. Thomas Ⅱ号)心脏停搏液成分(mmol/L)：NaCl 110，KCl 16，$MgCl_2$ 16，$CaCl_2$ 1.2，$NaHCO_3$ 10，pH 7.8；TTX 心脏停搏液成分：22 μmol/L TTX + 1 mmol/L Ca^{2+} K-H 液，pH 7.4(使用前持续灌注 95% N_2 + 5% CO_2)。

1.2　心肌细胞悬液的制备

成年 Wistar 大鼠 6 只(重庆医科大学实验动物中心提供)，体质量 250～300 g，雌雄不限。经腹腔注射肝素化，20 min 后颈关节脱位处死，开胸取心脏，连接并建立 Langendorff 灌注模型。用酶解法分离制备心室肌细胞悬液，灌流液温度控制在 37 ℃并持续注入 95% O_2 + 5% CO_2。先用 1 mmol/L Ca^{2+} K-H 液，以灌注压 5 kPa 灌注约 5 min。然后依次灌注无 Ca^{2+} K-H 液 5 min，消化酶液Ⅰ循环灌注 20 min，消化酶液Ⅱ循环灌注 10 min。之后取下心脏，在 7.5 ℃含 1% BSA 和 0.3 mmol/L Ca^{2+} K-H 液的培养皿中取左心室并剪碎，用 200 μm 尼龙网单层过滤并以上述液体洗涤 3 次，滤液以离心力 50 × g 离心 2 min，弃上清，依次用 7.5 ℃含 0.6 mmol/L Ca^{2+} K-H 液、7.5 ℃含 1.0 mmol/L Ca^{2+} K-H 液混匀离心 2 min。最后用 37 ℃ 1.0 mmol/L Ca^{2+} 的 K-H 液制成单个心室肌细胞悬液，台盼蓝检测细胞活性(细胞存活率 95%)，备用。以上液体使用前均注入 95% O_2 + 5% CO_2。

1.3　实验方法

全组共 6 枚成年 Wistar 大鼠心脏，用酶解法分离成具有搏动性的单个心室肌细胞悬液，取 100 μl 细胞悬液滴于载玻片上，制备多份并放入 37 ℃的 5% CO_2 培养箱孵育 2 h 取出备用。每枚心脏的心室肌细胞悬液均随机分成基础组、STH2 组和 TTX 组。基础组为未停搏组，用来测定停搏前细胞 $[Ca^{2+}]_i$。STH2 组和 TTX 组分别为 STH2 停搏组和 TTX 停搏组。一份用来测定复搏后细胞 $[Ca^{2+}]_i$，即分别加 7.5 ℃ STH2 停搏液和 TTX 停搏液停搏心肌细胞，并在 7.5 ℃下保存 2 h，用 95% O_2 + 5% CO_2 氧合的 37 ℃ 1.0 mmol/L Ca^{2+} K-H 液进行复搏(即建立模拟缺血/再灌注损伤的停搏/复搏细胞模型)；另一份用来测定停搏期间细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 动态变化。

$[Ca^{2+}]_i$ 的测定：每个标本分别用 50 μl 钙荧光指示剂 Fluo-3/AM(2 μmol/L)37 ℃避光染色 30 min，轻轻洗脱细胞外的钙荧光指示剂后，置于激光扫描共聚焦显微镜(Leica TCS NT，瑞士)样品台，用 488 nm 激光激发 Fluo-3/AM 指示剂钙荧光，测定单个细胞内荧光强度，并减去背景荧光强度，通过公式 $[Ca^{2+}]_i = Kd \times (F - F_{min})/(F_{max} - F)$ 计算出单个细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 浓度。

F_{max} 测定：将孵育 2 h 的心室肌细胞悬液，用含 A23187(10 μmol/L)和 Fluo-3/AM(2 μmol/L)的 10 mmol/L Ca^{2+} K-H 液，37 ℃避光孵育 30 min，然后用 37 ℃ 10 mmol/L Ca^{2+} K-H 液洗脱细胞外的钙荧光指示剂，置于 LSCM 测定细胞内钙荧光强度，即为 F_{max}。

F_{min} 测定：将孵育 2 h 的心室肌细胞悬液，用含 A23187(10 μmol/L)、Fluo-3/AM(2 μmol/L)和 EGTA(10 mmol/L)的无 Ca^{2+} K-H 液，37 ℃避光孵育 30 min，然后用 37 ℃ 无 Ca^{2+} K-H 液洗脱细胞外的钙荧光指示剂，置于 LSCM 测定细胞内钙荧光强度，即为 F_{min}。

形态学观察：用倒置显微镜(Olympus IX/50，日本)观察各组细胞搏动情况和形态学变化。活心肌细胞标准：胞体透明，杆状，无皱褶，边界清晰，部分可见搏动。

1.4　统计学处理

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，用 SAS 软件进行统计学分析，组间比较用 t 检验。

2　结果

2.1　停搏前与复搏后心肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 浓度的比较

TTX 组和 STH2 组心肌细胞复搏后 $[Ca^{2+}]_i$(nmol/L)分别为(148.36 ± 19.05)和(213.65 ± 26.6)，均明显高于停搏前基础组(83.06 ± 8.28)，且差异具有显著性($P < 0.01$)；TTX 组明显低于 STH2 组，且差异具有显著性($P < 0.01$，图 1)。



A：Base group；B：TTX group；C：STH2 group

图 1　LSCM 测定停搏前与复搏后心肌细胞钙荧光强度的影像

Fig 1　Ca^{2+} flurescent images measured by LSCM from a Fluo-3/AM loaded cardiomyocytes before arrest (Base group) and after re-beating (TTX and STH2 groups)

2.2 停搏期间心肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 动态变化

STH2组和TTX组在加入7.5 ℃ STH2停搏液或TTX停搏液后，$[Ca^{2+}]_i$ 均立即下降，TTX组下降速度和幅度明显高于STH2组，其后均上升，STH2组上升速度和幅度明显高于TTX组，至约60 min时，TTX组心肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 超过原有基础水平约5 nmol/L，而STH2组已超过原有基础水平约25 nmol/L，然后均缓慢上升(图2)。

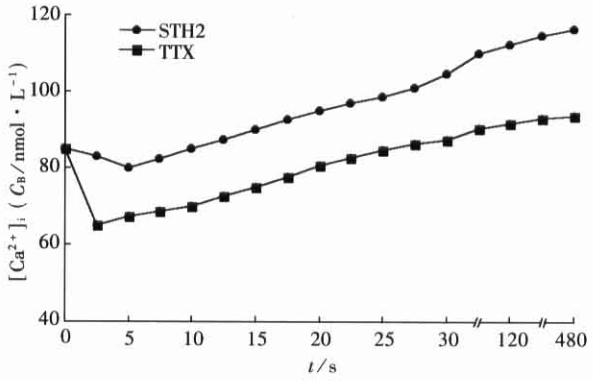


图2 停搏期间心肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 动态变化

Fig 2 $[Ca^{2+}]_i$ changes of cardiomyocytes during arrest in TTX and STH2 groups

2.3 停搏前与复搏后心肌细胞搏动频率及形态学比较

TTX组和STH2组心肌细胞复搏后搏动频率(min^{-1})分别为(17.18 ± 9.15)和(12.36 ± 6.05)，均明显低于基础组(48.18 ± 17.30)($P < 0.01$)；而TTX组和STH2组搏动频率无明显差别($P > 0.05$)；TTX组和STH2组复搏后中具有活力的正常形态心肌细胞所占比例(%)分别为(36 ± 2.71)和(20 ± 1.72)，均明显低于基础组(94 ± 1.47)，且差异具有显著性($P < 0.01$)；TTX组明显高于STH2组，且差异具有显著性($P < 0.01$)。

3 讨论

心肌细胞内游离钙在细胞生理和病理过程中起着重要作用。生理状况下其触发心肌细胞收缩、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。Ca^{2+} 超载是MIRI病理链中关键环节，是细胞损害的必经途径[4]。心肌细胞内游离 Ca^{2+} 的变化是跨膜转运的 Ca^{2+} 内流和细胞内钙池摄取、释放 Ca^{2+} 等过程动态平衡的结果，胞外 Ca^{2+} 内流和胞内肌浆网钙库动员形成的钙震荡在各种生理过程中起着重要作用，Ca^{2+} 内流和 Ca^{2+} 分隔机制失调会导致细胞内 Ca^{2+} 超载，造成心肌细胞损害[5]。防止或减轻缺血/再灌注后心肌细胞内 Ca^{2+} 超载，必将改善心脏的舒缩功能，提高心肌保护效果。

Na^+ 通道阻滞剂TTX极化心脏停搏，即诱导心脏停搏在极化状态，维持心肌细胞膜电位(Em)接近于静息Em。文献[6]报道，河豚毒素(TTX)是一种具有强有力的和快速可逆的 Na^+ 通道阻滞剂，能选择性地阻滞心肌缺血期间内向性 Na^+ 电流，从而防止缺血早期 Na^+ 超载，继而减轻 Ca^{2+} 超载，改善缺血再灌注后的心脏功能恢复。已有研究证实，与高 K^+ 去极化心脏停搏液比较，TTX极化心脏停搏液可明显促进离体大鼠心脏的血液动力学指标恢复、保存高能磷酸盐含量和减轻超微结构损伤[3]。本实验研究 Na^+ 通道阻滞剂河豚毒素停搏液对离体大鼠心肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 影响，从细胞水平上探讨极化心脏停搏液对心肌缺血/再灌注损伤的保护作用及其机制。采用酶解法将成年大鼠心脏分离成具有搏动性的单个心室肌细胞悬液，保存了良好的细胞活性(细胞存活率95%)，并建立模拟缺血/再灌注损伤的停搏/复搏细胞模型，用新一代钙荧光指示剂Fluo-3/AM标记后，以激光扫描共聚焦显微镜技术，精确地实时测定单个心肌细胞内游离 Ca^{2+} 浓度。该实验方法的创新之处是，在分离具有搏动性的单个心室肌细胞悬液基础上，成功建立了模拟心肌缺血/再灌注损伤的停搏/复搏心肌细胞模型。结果表明：①模拟缺血/再灌注损伤的心肌细胞停搏/复搏后，TTX组心肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 明显低于STH2组($P < 0.01$)，说明TTX极化心脏停搏液与STH2去极化心脏停搏液比较，能明显减轻停搏/复搏后心肌细胞内 Ca^{2+} 超载。②停搏期间心肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 测定结果显示，TTX组中心肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 上升幅度和速度明显低于STH2组，说明TTX极化心脏停搏液与STH2去极化心脏停搏液比较，能明显减轻停搏期间心肌细胞内 Ca^{2+} 超载。③模拟缺血/再灌注损伤的心肌细胞停搏/复搏后，心肌细胞搏动频率TTX组高于STH2组，但无显著差异($P > 0.05$)，提示复搏后两组细胞活动能力无明显差别；但从形态学比较，具有活力的正常形态心肌细胞比例TTX组明显高于STH2组($P < 0.01$)。这说明TTX极化心脏停搏液较STH2去极化心脏停搏液能较好地保护心肌细胞形态结构。

本研究结果提示：河豚毒素停搏液与高钾去极化心脏停搏液相比较，能显著减轻心肌细胞内 Ca^{2+} 超载和提高心肌细胞保护效果，防止心肌缺血/再灌注损伤，其保护机制可能是通过抑制心肌细胞内 Ca^{2+} 超载。这可能与极化心脏停搏的以下特点有关：①极化停搏下心肌细胞Em不能达到激活离子通道的阈电位，将减少离子运动，尤其是 Na^+ 和 Ca^{2+}；②Na^+、Ca^{2+} 窗口电流不会被激活；③这种离子失衡程度的减轻，反

过来将减少心肌细胞离子运动和维持离子梯度所需要的能量耗损[7]。但本实验研究还表明，在停搏的最初阶段，心肌细胞$[Ca^{2+}]_i$有短暂下降，这与 López 等[8]报道有所不同，其原因有待进一步研究。

参考文献：

[1] Racay P, Matejovicova M, Drgova A, *et al*. The effect of ischemia and ischemia-reperfusion on ion transport systems[J]. Bratisl Lek Listy, 1998, 99(7): 386 - 394.

[2] Chambers D J, Hearse D J. Developments in cardioprotection: "polarized" arrest as an alternative to "depolarized" arrest[J]. Ann Thorac Surg, 1999, 68(5): 1960 - 1966.

[3] 谭松涛，杨朝坤，杨双强. 极化心脏停搏液对离体大鼠心脏的保护作用[J]. 中国胸心血管外科临床杂志，2003，10(4)：280 - 283.

[4] Piper H M. The calcium paradox revisited: an artefact of great heuristic value[J]. Cardiovascular Res, 2000, 45(1): 123 - 127.

[5] 徐新春，王文健. 钙超载与心肌缺血再灌注损伤[J]. 心血管病学进展，2000，21(4)：227 - 230.

[6] Snabaitis A K, Chambers D. Long-term myocardial preservation: beneficial and additive effects of polarized arrest (Na^+-channel blockade), Na^+/H^+-exchange inhibition, and $Na^+/K^+/2Cl^-$ cotransport inhibition combined with calcium desensitization[J]. Transplantation, 1999, 68(10): 1444 - 1453.

[7] Chambers D J. Mechanisms and alternative methods of achieving cardiac arrest[J]. Ann Thorac Surg, 2003, 75(2): S661 - 666.

[8] López J R, Jahangir R, Jahangir A, *et al*. Potassium channel openers prevent potassium-induced calcium loading of cardiac cells: possible implications in cardioplegia[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 1996, 112(3): 820 - 831.

（编辑　薛国文）

文章编号：1000-5404(2005)03-0195-01

个案与短篇

高压氧综合治疗急性砷化氢中毒 4 例临床报告

A report of hyperbaric oxygen for integrate therapy of acute arsine poisoning in 4 cases

李　宁[1]，陈　军[2]，徐晓青[1]，徐宏萍[1]，黄　娟[1]　（[1] 第三军医大学新桥医院高压氧治疗中心，重庆 400037；[2] 贵州预备役师师医院，贵阳 550002）

1　临床资料

患者 4 例，均为男性，(45 ± 5)岁。2003 年 11 月 18 日 17:00 时在工作中不慎吸入泄漏的砷化氢气体，即出现不同程度的全身不适，乏力，恶心，21:00 时入当地医院诊治，其中 2 例出现腰痛，小便颜色深，血红蛋白尿、尿蛋白(+++)，尿呈酱油色，皮肤进行性黄染，恶心，呕吐频繁，其中 1 例患者尿量减少，尿量仅 500 ml。由于医疗条件所限，于 11 月 21 日 21:00 时转诊我院，2 例轻患者门诊高压氧综合治疗，另外 2 例危重患者入院，入院查：全身皮肤粘膜黄染，皮下有瘀斑，双下肢轻度水肿。辅助检查：血常规 WBC 28.0×10^9/L、RBC 1.56×10^{12}/L、HGB 61 g/L、HCT 18.1%、PLT 224×10^9/L。尿常规：RBC(+)，WBC 2 个(高倍镜下)，pH 8.0，PRO 3.0 g/L，BCD 250 个/μl。肾功：BUN 23.5 mmol/L，Cr 623.0 μmol/L。血生化：Na^+ 135.7 mmol/L，Cl^- 93.0 mmol/L，TCO_2 24 mmol/L。肝功能：ALT 150 IU/L，AST 174 IU/L，TP 66.2 G/L，ALB 42.8 g/L，T-BIL 45.7 μmol/L，D-BIL 18.4 μmol/L。大便隐血试验(++)。心脏超声提示：左室后壁心包局限性积液。入院诊断为：①急性砷化氢中毒；②急性肾功能衰竭；③急性溶血性贫血；④急性中毒性肝损害。

2　综合治疗

支持治疗：10%葡萄糖 500 ml + V_C 2 g + ATP 40 mg 静脉滴注 1/d，20%力能液 250 ml 静脉滴注 1 次/d；抗感染治疗：头孢他定针剂 1 g 静脉滴注 2 次/d。护肾保肝治疗：6-磷酸果糖 100 ml 静脉滴注 1 次/d，阿托莫兰 1.2 g 静脉滴注 1 次/d，凯西来针剂 0.2 g 静脉滴注 1 次/d；保护胃粘膜治疗：甲氰咪胍 0.2 g 口服 3 次/d，麦滋淋-S 颗粒冲剂 1 包口服 3 次/d；血液透析治疗：1 次/d，共 10 次。11 月 24 日开始高压氧治疗：压力 2ATA，吸氧 20 min × 4，停吸氧 10 min × 3。1 例重症治疗 20 次后复查心脏超声心包积液部分吸收，肝肾功能、血常规、尿常规及大便常规均正常。1 例治疗 15 次后查肝功、肾功好转，大小便正常；较轻的 2 例治疗 10 次高压氧治疗后症状全部消失。5 个月后随访 4 例患者均未留下后遗症。

3　讨论

急性砷化氢中毒报道较少，目前急性砷化氢中毒的治疗仅以对症治疗为主，常留下后遗症。以高压氧综合治疗急性砷化氢中毒未见报道。砷化氢是某些生产过程中生产的废气，也称为胂。急性砷化氢中毒(acute arsine poisoning)是指砷化氢有害气体经呼吸道侵入人体吸收入血后，与红细胞中血红蛋白结合，

（下转 199 页）

作者简介：李　宁(1958 -)，男，江西省婺源县人，副主任医师，副教授，主要从事高压氧医学和肿瘤内科学的临床方面的研究，发表论文 30 余篇。电话：(023)68755640

收稿日期：2004-08-15；修回日期：2004-10-20