论著

文章编号:1000-5404(2005)02-0112-03

大鼠心肌缺血再灌注损伤时细胞核游离钙浓度的变化

唐维平[1],司良毅[2],张乐之[1],周 红[1],何华美[1] (第三军医大学:[1]基础医学部药理学教研室,[2]西南医院老年病科,重庆 400038)

提 要:目的 探讨大鼠心肌缺血再灌注损伤(ischemia/reperfusion injury, IRI)时细胞核游离钙浓度的改变。**方法** 健康雄性Wistar大鼠随机分为IRI组和假手术组,结扎冠状动脉左主干制备IRI模型,双波长荧光分光光度法测定分离的心肌细胞核游离钙浓度$[Ca^{2+}]_n$。**结果** 核外ATP为10 mmol/L时,假手术组和IRI心肌$[Ca^{2+}]_n$均随核外钙浓度增加而增加;当核外游离钙为0.1 μmol/L时,两组心肌$[Ca^{2+}]_n$无差别($P>0.05$);当核外游离钙为1 μmol/L和10 μmol/L时,IRI组$[Ca^{2+}]_n$明显高于假手术组($P<0.01$)。在核外无ATP时,两组心肌$[Ca^{2+}]_n$在核外无钙时无差别($P>0.05$),核外游离钙在0.4~1.6 μmol/L时两组心肌$[Ca^{2+}]_n$均较在不含钙缓冲液中增加,但假手术组心肌$[Ca^{2+}]_n$在此范围内相对稳定,而IRI组心肌$[Ca^{2+}]_n$在核外游离钙浓度为1.6 μmol/L时则明显增加($P<0.05$)。**结论** 在核外有或无ATP时过高的核外钙浓度均引起IRI组心肌细胞核游离钙的急剧增加。

关键词:缺血/再灌注损伤;细胞核;心脏;钙

中图法分类号:R322.11; R329.26; R542.202 **文献标识码**:A

Changes of nuclear free calcium concentrations after myocardial ischemia/reperfusion injury in rats

TANG Wei-ping[1,2], SI Liang-yi[2], ZHANG Le-zhi[1], ZHOU Hong[1], HE Hua-mei[1] ([1]Department of Pharmacology, College of Medicine, [2]Department of Geriatrics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the alterations in nuclear free calcium concentrations after myocardial ischemia/reperfusion injury (IRI) in rats. **Methods** Healthy male Wistar rats were divided randomly into IRI and Sham groups. Myocardial IRI models were established by ligating the left coronary artery for 30 min and then reperfusing the hearts for 3 h. Myocardial nuclei were isolated by sucrose density gradient centrifugation and the intranuclear free calcium concentrations ($[Ca^{2+}]_n$) were measured with fura-2 AM by dual-wavelength fluorophotometry. **Results** In the presence of 10 mmol/L ATP, $[Ca^{2+}]_n$ in the myocardial nuclei in both Sham and IRI groups increased as the calcium concentration in incubation buffer increased. When myocardial nuclei were incubated with calcium at the concentration of 0.1 μmol/L, $[Ca^{2+}]_n$ in the two groups showed no difference ($P>0.05$). However, when the calcium concentration in incubation buffer was 1 μmol/L or 10 μmol/L, $[Ca^{2+}]_n$ in IRI group was much higher than that in Sham group ($P<0.01$). In the absence of ATP, no difference in $[Ca^{2+}]_n$ in the myocardial nuclei in the calcium-free incubation buffer was observed between IRI and Sham groups ($P>0.05$). However, increased $[Ca^{2+}]_n$ was measured in the myocardial nuclei in the buffer containing calcium ranging within 0.4 – 1.6 μmol/L in both IRI and Sham groups. $[Ca^{2+}]_n$ in the myocardial nuclei in sham group remained unchanged while $[Ca^{2+}]_n$ in the myocardial nuclei in IRI increased when incubated in the buffer containing 1.6 μmol/L calcium ($P<0.05$). **Conclusion** In the presence or absence of ATP in the incubation buffer, nuclear free calcium concentration increases drastically in ischemic/reperfused myocardium in response to excessive calcium in the incubation buffer.

Key words: ischemia/reperfusion injury; cell nucleus; heart; calcium

心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia/reperfusion injury, IRI)的发生机制至今仍未完全阐明,胞浆钙超载和能量代谢障碍均是IRI主要的病理生理特征;氧自由基损伤在心肌IRI的发生发展中也起着至关重要的作用[1];同时心肌IRI伴随着显著而持久的细胞核功能异常,包括即刻早期基因与次级反应基因表达的改变,尤其是细胞凋亡的增加[2]。最近研究表明[3],心肌细胞核上存在独立的由钙离子通道型受体及钙离子

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30100070)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30100070)
作者简介:唐维平(1975-),男,四川省遂宁市人,硕士研究生,医师,主要从事冠心病的基础及临床方面的研究。现在西南医院老年病科攻读硕士。电话:(023)68752265
通讯作者:何华美,E-mail: hmhe@rics.bwh.harvard.edu
收稿日期:2004-08-04;**修回日期**:2004-12-19

泵构成的钙信号调节系统，其调控下的核钙信号参与调节基因转录、细胞增殖、分化及凋亡等。因此，研究心肌 IRI 时细胞核信号物质游离钙浓度（$[Ca^{2+}]_n$）的变化对阐明 IRI 时细胞核功能异常的核钙信号机制具有重要价值。故本实验利用大鼠在体心肌 IRI 模型，用分离纯化的心肌细胞核观察存在 ATP 和无 ATP 时不同核外游离钙浓度下心肌 $[Ca^{2+}]_n$ 的变化。

1　材料与方法

1.1　实验材料

健康 6～8 月龄雄性 Wistar 大鼠（第三军医大学野战外科研究所实验动物中心提供）共 44 只，体质量 255～330 g，其中模型制作成功 36 只。Fura-2 AM 购自 Fluka 公司；ATPNa2、二硫苏糖醇（dithiothreitol，DTT）、苯甲基磺酰氟（phenylmethylsulfonyl fluoride，PMSF）、亮肽素（leupeptin）、抑肽酶（aprotinin）、胃酶抑素（pepstatin）和标志酶测定试剂购自 Sigma 公司。超氧化物歧化酶（SOD）、还原型谷光甘肽（GSH）及丙二醛（MDA）测定试剂盒购自南京建成生物工程公司。其余均为国产 AR 级试剂。

1.2　缓冲液及介质配方

TKM 溶液（mmol/L，pH 7.5）：Tris-HCl 50，KCl 25，$MgCl_2$ 5；匀浆介质（mmol/L）：含蔗糖 250，EGTA 1，DTT 1，PMSF 1 和含亮肽素 1、抑肽酶 1、胃酶抑素各 1 mg/L 的 TKM 液；离心介质 A：含蔗糖 1 mol/L 的匀浆介质；离心介质 B：含蔗糖 2.5 mol/L 的匀浆介质；无钙细胞核悬浮介质（mmol/L，pH 7.0）：KCl 125，K_2HPO_4 2，Hepes 25，$MgCl_2$ 4，EGTA 2 超纯水配制；含钙细胞核悬浮介质：除含不同浓度 $CaCl_2$ 外，余组分及浓度同无钙细胞核悬浮介质，根据 Winmaxc 多元缓冲对计算程序，调整介质中 $CaCl_2$ 浓度可得所需游离钙浓度。

1.3　实验模型与分组

36 只大鼠按随机数字表法分为假手术组和 IRI 组，每组各 18 只，按 Maulik 等[4]方法略做修改：IRI 组为穿线并结扎冠状动脉左侧主干致心肌缺血 30 min，拉松并解除结扎线致心肌再灌注 3 h；假手术组为穿线但不结扎，总时间仍为 3.5 h。实验结束后从心底部剪取心脏，立即用 50 ml 冰冷 TKM 溶液洗去红细胞。根据被结扎冠状动脉左侧主干走行并结合缺血再灌注区颜色较苍白的特点确定损伤区域，剪下损伤区心肌，吸干水分后称重，然后进入下述操作。

1.4　心肌细胞核提纯

心肌细胞核提纯操作按文献[5]的方法略做改进：心肌剪碎后加入 5 倍体积的匀浆介质（w/v），用玻璃十字匀浆器匀浆至无肉眼可见组织块止，200 目尼龙网过滤，取 0.2 ml 心肌匀浆冻存于 -20 ℃冰箱中，用于氧化性损伤指标测定，余下心肌匀浆离心（5 000 r/min，10 min），弃上清；将沉淀用 5 倍体积的匀浆介质悬浮后再次匀浆 15 次，然后离心（5 000 r/min，10 min），弃上清；将沉淀加入 1 倍体积的离心介质 A 充分混匀后，再加入 3 倍体积的离心介质 B 充分混匀，所得混悬液超速离心（110 000 × g，60 min），沉淀即为心肌细胞核，将心肌细胞核悬浮于无钙细胞核悬浮介质中。上述操作均在 0～4 ℃下进行。采用 Lowry 法行蛋白质定量，二苯胺法行 DNA 定量，定磷法测定肌质膜标志酶 5′-核苷酸酶活力和肌浆网标志酶葡萄糖-6-磷酸酶活力，还原产物比色法测定线粒体标志酶琥珀酸脱氢酶活力。

1.5　心肌细胞核游离钙浓度测定

将心肌细胞核悬液浓度调整到含 DNA100 μg/ml。取 10 μl 的 1 mmol/L Fura-2 AM 加入细胞核悬液 1 ml 中（Fura-2 AM 终浓度为 10 μmol/L），将细胞核悬液在 37 ℃水浴中恒温振荡孵育 45 min。然后加入 10 倍体积经预冷的无钙细胞核悬浮介质，4 ℃离心（5 000 r/min，10 min），弃上清。沉淀再次悬浮于系列含钙和 ATP 的细胞核悬浮介质中，37 ℃水浴中恒温振荡 15 min，然后将核悬液上样于 Hitachi F-2500 荧光分光光度计。Fura-2 AM 进入细胞核内并被酯酶水解为 Fura-2，Fura-2 与核内游离 Ca^{2+} 结合后其最大激发波长发生改变（由 380 nm 变为 350 nm），利用 Fura-2 的这一特性按文献[6]，通过双波长荧光测定 $[Ca^{2+}]_n$，$[Ca^{2+}]_n = Kd(F1/F2)$（令 350 nm 激发波长处荧光值为 F1，380 nm 激发波长处荧光值为 F2，其中 Kd = 224 nmol/L）。

1.6　心肌匀浆 SOD、GSH 及 MDA 的测定

按厂家提供的 SOD、GSH 及 MDA 测定试剂盒说明书，用比色法测定心肌匀浆中总 SOD 活力、GSH 及 MDA 的含量，结果以单位质量蛋白中的活力单位数或含量表示。

1.7　统计学方法

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS（Ver10.0）统计数据包进行单因素方差分析。

2　结果

2.1　再灌注损伤心肌 SOD 活力、GSH 及 MDA 含量的变化

IRI 时心肌抗氧自由基损伤因素 SOD 活力和 GSH 含量较假手术组降低；而膜脂质过氧化损伤产物 MDA 含量明显增加，见表 1。

表 1　IRI 组及假手术组大鼠心肌 SOD 活力、GSH 及 MDA 含量（$n=6$，$\bar{x} \pm s$）

Tab 1　SOD activity and GSH and MDA contents in the rat myocardium in IRI and Sham groups（$n=6$，$\bar{x} \pm s$）

Group	SOD (U/mg protein)	GSH (mg/g protein)	MDA (nmol/g protein)
IRI	57.3 ± 11.7*	19.2 ± 3.4**	416 ± 52#
Sham	70.1 ± 11.1	22.8 ± 3.2	198 ± 32

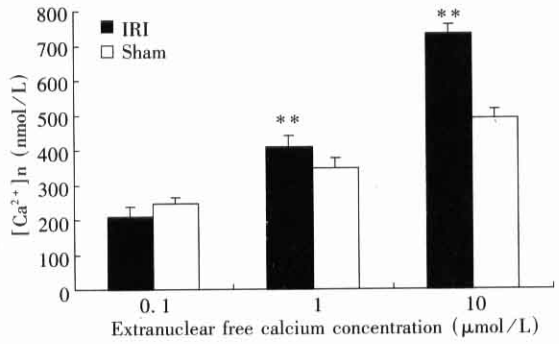
*：$F=0.8998$，$P=0.0211$；**：$F=0.8566$，$P=0.0239$；#：$F=0.9778$，$P=0.0021$，*vs* sham group

2.2　分离的心肌细胞核特征

超速离心分离的心肌细胞核在显微镜下呈椭圆形或长椭圆形，无细胞碎片污染；细胞核蛋白含量为匀浆的 1/35～1/40，蛋白质与 DNA 含量比值为 6～8，核回收率 25%～35%；细胞核各亚细胞组分标志酶的活性均低于匀浆的 5%。

2.3　存在 ATP 时 $[Ca^{2+}]_n$ 与核外游离钙的关系

在细胞核悬浮介质中存在 10 mmol/L ATP 时，假手术组和 IRI 心肌 $[Ca^{2+}]_n$ 均随悬浮介质中钙浓度增加而增加；当核外游离钙为 0.1 μmol/L 时，两组心肌 $[Ca^{2+}]_n$ 无明显差别；当核外游离钙为 1 μmol/L 和 10 μmol/L 时，IRI 组 $[Ca^{2+}]_n$ 明显高于假手术组，见图 1。



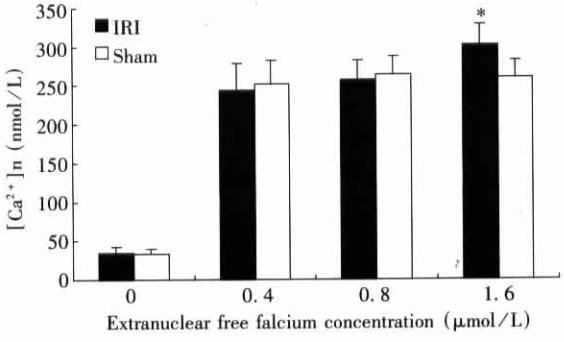
** : $P<0.01$, *vs* sham group

图1 存在ATP时两组心肌[Ca^{2+}]$_n$与核外游离钙的关系($n=6$)

Fig 1 Relationship between [Ca^{2+}]$_n$ and extranuclear free calcium concentrations in the presence of 10 mmol/L ATP ($n=6$)

2.4 无ATP存在时[Ca^{2+}]$_n$与核外游离钙的关系

在细胞核悬浮液中无ATP和钙时,IRI组和假手术组心肌[Ca^{2+}]$_n$无明显差别;核外游离钙在0.4~1.6 μmol/L时两组心肌[Ca^{2+}]$_n$均较在不含钙缓冲液中增加;但假手术组心肌[Ca^{2+}]$_n$在此范围内相对稳定;而IRI组心肌[Ca^{2+}]$_n$在核外游离钙浓度为1.6 μmol/L时则明显增加,见图2。



* : $P<0.05$ *vs* extranuclear free calcium < 1.6 μmol/L of IRI group

图2 无ATP时两组心肌[Ca^{2+}]$_n$与核外游离钙的关系($n=6$)

Fig 2 Relationship between [Ca^{2+}]$_n$ and extranuclear free calcium concentrations in the absence of ATP ($n=6$)

3 讨论

国内外学者围绕IRI时心肌细胞浆、线粒体及肌浆网的钙浓度变化及其调节进行了较为广泛的研究,但迄今鲜有IRI时心肌[Ca^{2+}]$_n$变化及其调节的研究报道。谷天祥等[7]应用细胞化学及电子探针显微方法研究IRI心肌亚细胞钙反常时曾对核总钙含量变化有过观察,但未对心肌[Ca^{2+}]$_n$变化进行阐述。鉴于细胞核游离Ca^{2+}是重要的核内信号物质,对调节细胞核功能有重要意义,故研究IRI时心肌[Ca^{2+}]$_n$变化具有较重要的价值。

本研究采用大鼠心肌在体局部缺血再灌注损伤模型,与离体心肌灌注模型比较,能较好地模拟动物体内实际的损伤情况且方法简便,但存在可利用心肌组织少的不足。在动物分组上,损伤组选取缺血30 min、再灌注3 h的单一时相点,既可以反映心肌缺血再灌注损伤时的典型改变,如即刻早期基因及次级基因表达改变、细胞凋亡增加[2],同时可以减少工作量尤其是与课题的后续内容衔接,利于实验的进行。采用超速离心分离的心肌细胞核可以排除细胞内复杂的信号通路及其他物质的影响,直观反映核外钙及ATP对[Ca^{2+}]$_n$的影响。分离的心肌细胞核经酶学方法鉴定,细胞核各亚细胞组分标志酶的活性均低于匀浆的5%,说明分离方法有效,结果与文献[5]报道一致。

正常心肌细胞静息时胞浆游离钙浓度为10^{-7} mol/L[8];正常心肌细胞内ATP浓度为10 mmol/L[9]。本实验显示,在核外ATP取10 mmol/L时,随着核外游离钙的增加,IRI组[Ca^{2+}]$_n$急剧增加,而假手术组无论增加幅度和绝对值均显著低于IRI组。在核外无ATP且核外游离钙浓度增高时,假手术组心肌[Ca^{2+}]$_n$保持相对恒定,但IRI组在核外游离钙浓度达1.6 μmol/L时心肌[Ca^{2+}]$_n$则明显增加。上述结果提示无论心肌细胞核外有无ATP,细胞核悬浮介质中过高的钙浓度均可引起IRI组心肌[Ca^{2+}]$_n$的急剧增加,这对精细调节[Ca^{2+}]$_n$在一个相对稳定的范围、维持核内钙信号系统平衡不利,在核外钙浓度异常增高时容易导致核钙信号系统紊乱。

本实验同时证实IRI时存在明显的氧化应激,心肌IRI时[Ca^{2+}]$_n$变化的机制可能与氧自由基导致的脂质过氧化改变了核膜微环境及氧自由基对参与核钙信号调节的钙离子通道型受体或钙离子转运酶的直接损害有关[10],这正是本研究组进一步要证实的内容。

参考文献:

[1] Piper H M, Garcia Dorado D, Ovize M. A fresh look at reperfusion injury [J]. Cardiovasc Res, 1998, 38(2): 291-300.

[2] Gottlieb R A, Engler R L. Apoptosis in myocardial ischemia reperfusion [J]. Ann N Y Acad Sci, 1999, 874: 412-426.

[3] Rogue P J, Malviya A N. Calcium signals in the cell nucleus. Strasbourg, France, August 20-23, 1998[J]. EMBO J, 1999, 18(19): 5147-5152.

[4] Maulik N, Engelman R M, Rousou J A, *et al*. Ischemic preconditioning reduces apoptosis by upregulating anti-death gene Bcl-2[J]. Circulation, 1999, 100(19 Suppl): II 369-375.

[5] 刘 健, 何作云, 许蜀闽, 等. 心肌肥厚大鼠心肌细胞核三磷酸肌醇受体的特性[J]. 生理学报, 2001, 53(4): 281-285.

[6] Stuyvers B D, Miura M, ter Keurs H E. Ca^{2+}-dependence of passive properties of cardiac sarcomeres[J]. Adv Exp Med Biol, 2000, 481: 353-370.

[7] 谷天祥, 张显清, 谷春久, 等. 心肌缺血再灌注损伤亚细胞Ca^{2+}反常与ATP酶泵功能抑制[J]. 中华心血管病杂志, 2001, 29(7): 420-423.

[8] Braveny P. Heart, calcium and time[J]. Exp Clin Cardiol, 2002, 7(1): 111-178.

[9] Oketani N, Kakei M, Ichinari K, *et al*. Regulation of K(ATP) channels by P(2Y) purinoceptors coupled to PIP(2) metabolism in guinea pig ventricular cells[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002, 282(2): H757-H765.

[10] Lucas D T, Szweda L I. Cardiac reperfusion injury: aging, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(2): 510-514.

(编辑 汪勤俭)