论著

文章编号:1000-5404(2005)06-0494-03

模拟缺血预适应对原代培养乳鼠窦房结细胞内钙及L-型钙电流的影响

张 倩,宋治远,仝识非,黄 骥 (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 观察模拟缺血预适应(IP)对培养乳鼠窦房结细胞内 Ca^{2+} 及 I-LCa 的影响,探讨 IP 对窦房结细胞的保护机制。**方法** 取培养 2 d 的乳鼠窦房结细胞,随机分为:①对照组;②模拟缺血/再灌注(I/R)组;③模拟 IP 组。以免疫荧光技术标记细胞内 Ca^{2+},通过激光共聚焦显微镜检测荧光强度变化;以全细胞膜片钳技术检测 I-LCa。**结果** 模拟 IP 能显著降低 I/R 后窦房结细胞内 Ca^{2+} 荧光强度,增加相应电压下的 I-LCa 峰值,使电流-电压曲线相对下移。**结论** 模拟 IP 能减轻 I/R 引起的窦房结细胞内 Ca^{2+} 超载及 I-LCa 抑制。

关键词: 窦房结细胞;缺血预适应;钙离子;L-型钙电流

中图法分类号: R322.11; R329.27; R364.12 **文献标识码**: A

Effects of mimic ischemic preconditioning on $[Ca^{2+}]_i$ and L-type calcium current of cultured sinoatrial node cells of neonatal rat

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

Abstract: Objective To study the effects of mimic ischemic preconditioning (IP) on $[Ca^{2+}]_i$ and I-LCa of sinoatrial node cells and explore the protective effects of IP. **Methods** Cells were randomized to three groups: control, ischemia/reperfusion (I/R), IP. After labeled with fura4, fluorescence intensity of $[Ca^{2+}]_i$ was studied with laser confocal microscopy and I-LCa was recorded by whole-cell patch clamp technology. **Results** IP significantly reduced the fluorescence intensity of $[Ca^{2+}]_i$ and enhanced the peak of I-LCa as compared with I/R, shifted the I-V curve to more negative value. **Conclusion** IP can reduce the overload of $[Ca^{2+}]_i$ caused by I/R and increase I-LCa weakened by I/R.

Key words: sinoatrial node cell; ischemic preconditioning; calcium ion; L-type calcium current

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)对缺血/再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)损伤所提供的保护作用日益受到重视,而对心肌 IP 的研究已成为热点。近几年来,本实验室已就 I/R 对窦房结细胞形态结构及电生理功能的影响进行了较为系统的研究,并发现 K_{ATP} 通道开放剂能对抗模拟 I/R 对窦房结细胞 I-LCa[1] 及 If[2] 的影响,维持窦房结细胞离子稳态和电生理活动的相对稳定,对细胞产生保护作用。但模拟 IP 对模拟 I/R 时乳鼠窦房结细胞的影响尚不清楚。本研究通过观察模拟 IP 对乳鼠窦房结细胞内 Ca^{2+} 及 I-LCa 的影响,以探讨模拟 IP 对 I/R 时窦房结细胞的保护效应及其机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及配制

Ⅱ型胶原酶购自 Sigma 公司。Fura4/am 荧光探针及 F127 购自 Biotium 公司。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。细胞外灌流液(mmol/L):氯化胆碱 120、$CaCl_2$ 2、$MgCl_2$ 2、CsCl 4、Glucose 10、HEPES 10,用 CsOH 校至 pH 为 7.3。电极内液(mmol/L):CsCl 120、HEPES 10、EGTA 11、Na_2 ATP 5、Na_2 GTP 0.35、$MgCl_2$ 2,用 CsOH 校正 pH 为 7.3。

1.2 乳鼠窦房结细胞的培养

按本实验室建立的乳鼠窦房结细胞培养与鉴定方法进行[3]。

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)68765618

收稿日期:2004-11-03;**修回日期**:2005-01-19

1.3　实验分组

取培养 2 d 的乳鼠窦房结细胞分为以下 3 组:①对照组(C):37 ℃,以模拟再灌注溶液替换培养液,并向其中持续通以 95% O_2 + 5% CO_2 混合气。②模拟 I/R 组(I/R):以 95% N_2 + 5% CO_2 混合气预饱和的模拟缺血溶液替换培养液,并向其中持续通以 95% N_2 + 5% CO_2 混合气 4 h (PO_2 < 4 kPa);再以 95% O_2 + 5% CO_2 混合气预饱和的模拟再灌注溶液替换模拟缺血溶液,并向其中持续通以 95% O_2 + 5% CO_2 混合气 4 h。③模拟 IP 组(IP):按模拟 I/R 组操作先缺血 10 min/再灌注 10 min,反复 2 次;再缺血 4 h/再灌注 4 h。

1.4　窦房结细胞内 Ca^{2+} 测定

制备细胞爬片,随机分组。待模拟再灌注结束后,以 PBS 洗涤细胞爬片,然后吸取适量 1 μmol/L 的 Fura4/am 及 F127 覆盖细胞爬片,37 ℃孵育 30 min,待 PBS 洗涤 3 次后,将细胞爬片置于激光共聚焦显微镜下检测其荧光强度。

1.5　窦房结细胞 L-型钙电流的记录

应用 Axopatch-200B 放大器, Digidata 1200 数模转换及 pClamp 软件(6.0 版)记录膜电流。本实验用 Cs^+ 抑制内向整流的 K^+ 电流,以消除其对 I-LCa 的影响;当膜电位大于 - 40 mV 时,钠通道和 T 型钙通道完全失活,此时记录到的慢失活内向电流即 I-LCa。测定过程中持续通入低流量 95% O_2 和 5% CO_2 混合气。微电极尖端阻抗为 4 ~ 6 MΩ,滤波频率 2 kHz。实验温度控制在(35 ± 1) ℃,灌流速度为 3.0 ml/min。

1.6　统计学处理

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用统计软件 SPSS 进行单因素方差分析。

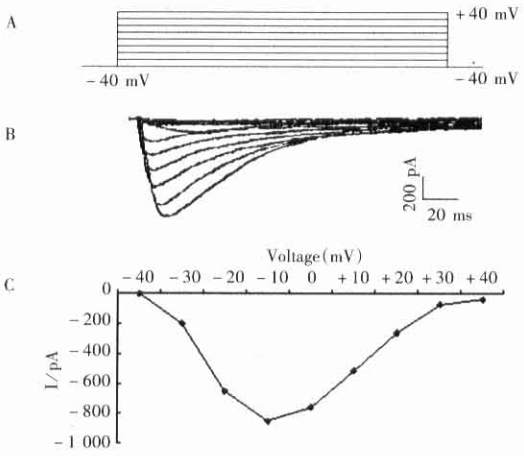
2　结果

2.1　模拟缺血预适应对窦房结细胞内 Ca^{2+} 的影响

Ca^{2+} 荧光强度由激光共聚焦显微镜自带 Quantify software 采集分析所得。结果显示:I/R 组及 IP 组窦房结细胞内 Ca^{2+} 荧光强度(60.96 ± 4.16,40.33 ± 4.04)均较对照组(23.93 ± 1.95)明显增高($P < 0.01$),但 IP 组(40.33 ± 4.04)与 I/R 组(60.96 ± 4.16)比较,细胞内 Ca^{2+} 荧光强度则显著降低($P < 0.01$)。

2.2　模拟缺血预适应对窦房结细胞 L-型钙电流的影响

2.2.1　对照组窦房结细胞 L 型钙电流的基本特征　　图 1 显示为对照组窦房结细胞在不同指令电压下所引出的 I-LCa 原始曲线图。保持电位 - 40 mV,步阶电压 10 mV,指令电压 - 40 ~ + 40 mV,脉宽 200 ms。在 2 mmol/L 含钙台氏液中窦房结细胞 I-LCa 的最大峰值为(- 853.9 ± 6.0)pA,最大激活电压在 - 10 mV 左右。



A: Voltage clamp pulse square wave; B: I-LCa curve under voltage clamp pulse; C: I-V curve of I-LCa

图 1　窦房结细胞指令电压下的 L-型钙电流曲线及电流-电压(I-V)曲线图

Fig 1　I-LCa curve of a single sinoatrial node cell of the control group under voltage clamp pulse from - 40 mV to + 40 mV

2.2.2　模拟缺血预适应对窦房结细胞 I-LCa 峰值的影响　采用全细胞膜片钳技术对指令电压为 - 30 ~ + 30 mV 时各组窦房结细胞 I-LCa 峰值(pA)进行了检测,结果发现:在相同指令电压下,模拟 I/R 组及模拟 IP 组窦房结细胞 I-LCa 峰值均较对照组显著降低($P < 0.01$),但模拟 IP 组窦房结细胞 I-LCa 峰值则较模拟 I/R 组明显升高($P < 0.01$)。见表 1。

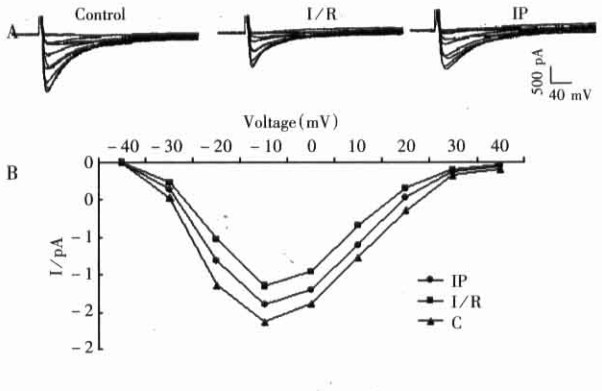
表 1　- 30 ~ + 30 mV 指令电压下各组窦房结细胞 I-LCa 峰值比较($n = 10$, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1　Comparison of peak values of I-LCa of the sinoatrial node cells of each group under voltage clamp pulse from - 30 mV to + 30 mV ($n = 10$, $\bar{x} \pm s$)

Group	Command potential(mV)						
	- 30	- 20	- 10	0	+ 10	+ 20	+ 30
C	- 191.7 ± 4.8	- 653.6 ± 5.9	- 853.9 ± 6.0	- 757.1 ± 6.6	- 512.2 ± 4.2	- 262.2 ± 4.7	- 70.9 ± 3.2
I/R	- 106.9 ± 5.8☆	- 409.7 ± 5.5☆	- 659.6 ± 3.5☆	- 582.5 ± 3.8☆	- 341.0 ± 6.1☆	- 141.6 ± 5.4☆	- 40.9 ± 2.3☆
IP	- 148.9 ± 5.1☆★	- 522.6 ± 6.3☆★	- 759.6 ± 3.9☆★	- 683.5 ± 5.8☆★	- 442.6 ± 6.3☆★	- 187.5 ± 5.5☆★	- 51.1 ± 4.0☆★

☆: $P < 0.01$, *vs* C; ★: $P < 0.01$, *vs* I/R

2.2.3　模拟缺血预适应对窦房结细胞 I-LCa 电流-电压曲线的影响　　将不同指令电压下各组窦房结细胞 I-LCa 峰值绘制成 I-V 曲线,结果显示:与对照组比较,模拟 I/R 及模拟 IP 均使窦房结细胞 I-V 曲线上移,但模拟 IP 组窦房结细胞 I-V 曲线上移幅度则较 I/R 组明显减小。见图 2。



A: Comparison of I-LCa curve of three groups; B: Effects of IP on the I-V curve of I-LCa

图 2 模拟缺血预适应对窦房结细胞 L-型钙电流 I-V 曲线的影响

Fig 2 Effects of IP on the current-voltage curve of I-LCa

3 讨论

心肌 IP 是指经过 1 次或反复数次短暂缺血/再灌注后，使随后较长时间缺血的心肌得到保护。它广泛存在于各种动物和人类，对缺血及再灌注损伤均有保护作用。I/R 损伤是一个复杂的病理生理现象，是多种因素共同作用的结果，其中自由基及细胞内 Ca^{2+} 超载被认为是 I/R 损伤的主要原因，细胞内 Ca^{2+} 超载可引起诸多不可逆损伤并导致细胞的死亡和凋亡。L-型钙通道普遍存在于人及动物心肌细胞中，在窦房结细胞等慢反应细胞，I-LCa 是 0 期去极化的主要电流，I-LCa 的变化必然影响到窦房结细胞的电生理特性。

本实验研究了模拟 IP 对 I/R 时窦房结细胞内 Ca^{2+} 浓度及 I-LCa 的影响，结果显示，虽然模拟 I/R 组及模拟 IP 组窦房结细胞内 Ca^{2+} 荧光强度均较对照组明显增高，但与模拟 I/R 组比较，模拟 IP 组窦房结细胞内 Ca^{2+} 荧光强度显著降低。此外，模拟 I/R 组各指令电压下的 I-LCa 峰值均较对照组显著降低，电流-电压曲线上移；而模拟 IP 组则能拮抗 I/R 对 I-LCa 的影响，显著增加I/R 后窦房结细胞各指令电压下的 I-LCa 峰值，使电流-电压曲线相对下移。表明模拟 IP 能减轻模拟 I/R 引起的窦房结细胞内 Ca^{2+} 超载，改善被 I/R 抑制的 I-LCa。

IP 减轻细胞内 Ca^{2+} 超载可能与开放 K_{ATP} 通道有关：①线粒体 K_{ATP} 通道开放，降低膜电位，减少线粒体膜 Ca^{2+} 通道对 Ca^{2+} 内流的驱动力，从而减轻线粒体 Ca^{2+} 超载，避免线粒体功能障碍；同时 K^+ 内流使线粒体基质肿胀、容积增加，激活电子传递链，促进线粒体呼吸和增加净氧化，进而使 ATP 合成增加[4]。线粒体是能量代谢的场所，又是缺血时自由基产生的主要部位，I/R 时线粒体结构功能的维护，能改善因 ATP 缺乏所致的胞膜及肌浆网的钙泵功能障碍，排出和摄取细胞浆中过多的 Ca^{2+}；减轻细胞内的酸中毒，减少 H^+-Na^+，Na^+-Ca^{2+} 交换；减少自由基生成，减轻因生物膜结构遭到破坏所引起的细胞内 Ca^{2+} 非特异性增加。②胞膜 K_{ATP} 通道开放，缩短动作电位时程，减少 Ca^{2+} 内流，并降低能量消耗。

由于生理情况下细胞内 Ca^{2+} 浓度的增加主要取决于细胞内 Ca^{2+} 的释放，而经 L-型钙通道产生的内向钙电流是细胞内 Ca^{2+} 释放触发的主要机制。I/R 时细胞内 Ca^{2+} 超载是否与 I-LCa 增强有关，目前尚有争论。有研究表明，缺血时 I-LCa 增加，再灌注时 I-LCa 进一步加大，从而引起细胞内 Ca^{2+} 的异常增多[5]。L-型钙通道阻断剂可降低 I/R 损伤的证据似乎支持上述结论。但也有研究认为，L-型钙通道受细胞内 pH 值和 ATP 浓度的影响，I/R 能抑制 I-LCa[6]。同时钙依赖式失活是心肌细胞钙通道的独特功能，当细胞内 Ca^{2+} 浓度异常升高时，在钙调蛋白作用下，能及时触发通道失活[7]。分析应用 Ca^{2+} 拮抗剂的研究，大多只有在缺血前给药才有效，再灌注时给药并不能阻止 Ca^{2+} 超载。可见 Ca^{2+} 拮抗剂的心肌保护作用可能只是在缺血时快速中止电活动和收缩活动，以减少能量消耗，保护心肌细胞。本结果也提示 L-型钙通道并未在 I/R 引起的细胞内 Ca^{2+} 超载中起关键作用。相反细胞内 Ca^{2+} 增加，导致 Ca^{2+} 跨膜浓度梯度降低，可能使跨膜钙电流的幅度减小。同时细胞内 Ca^{2+} 超载，线粒体作为细胞内最大的钙库，必然保护性摄钙，最终导致线粒体内 Ca^{2+} 超载，引起线粒体结构功能的破坏，ATP 生成减少。由于慢通道的电压激活是通过磷酸化实现的，ATP 水平降低引起的磷酸化障碍也可能导致 I-LCa 的抑制。而 IP 可能通过减轻 I/R 时细胞内 Ca^{2+} 负荷以及调节线粒体氧化磷酸化功能等途径，维持窦房结细胞的离子稳态、减轻酸中毒、恢复 ATP 供应，从而改善 I/R 后受抑的 I-LCa，维持窦房结细胞电生理活动的稳定性。

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 L-型钙电/流的影响[J]. 第三军医大学学报，2001，23 (12)：1383－1385.

[2] 仝识非，宋治远. 模拟缺血-再灌注对窦房结细胞起搏离子流的影响及 KATP 通道开放剂的干预作用[J]. 中国心脏起搏与心电生理杂志，2002，16(3)：205－207.

[3] 钟 理，宋治远. 乳鼠窦房结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，2001，14(3)：188－190.

[4] 马守国，付润芳，翁世艾. 线粒体 ATP 敏感性钾通道在心肌预适应中的作用机制[J]. 医学综述，2003，9(9)：531－533.

[5] Fearon I M, Pallmer A C, Balmforth A J, *et al*. Hypoxic and redox inhibition of the human cardiac L type Ca^{2+} channel[J]. Adv Exp Med Biol, 2000, 475: 209－218.

[6] 陈 波，张培华，马季华. 心室肌细胞 L 型钙离子通道研究[J]. 武汉科技大学学报，2003，26(2)：209－211.

[7] Sun H, Leblanc N, Nettel S. Mechanisms of inactivation of L type calcium channels in human atrial myocytes[J]. Am J Physiol, 1997, 272(4): 1625－1635.

（编辑 龙 亮）