论著

文章编号:1000-5404(2005)20-2048-03

2,3,7,8-TCDD对培养乳鼠心肌细胞内游离钙离子浓度影响的研究

孙黎黎[1],常 青[1],梁志清[1],余资江[2],糜建红[2] (第三军医大学:[1]西南医院妇产科,[2]基础医学部解剖学教研室,重庆市生物力学实验室,重庆 400038)

提 要:目的 测定培养SD大鼠乳鼠心肌细胞内游离钙离子浓度[Ca^{2+}]$_i$,观察2,3,7,8-四氯二苯并二噁英(2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin,以下略为TCDD)对心肌细胞[Ca^{2+}]$_i$的影响。**方法** 将实验动物分为0.05、0.5、5、10 μg/kg 4个染毒组,采用Fluo-3/AM同时加入Pluronic F-127作为细胞内游离钙离子的荧光探针,负载培养的心肌细胞,应用共聚焦激光扫描显微镜(CLSM)技术检测空白组及染毒组乳鼠心肌细胞[Ca^{2+}]$_i$。**结果** 静息时,心肌细胞[Ca^{2+}]$_i$为(77.68±12.00)nmol/L。染毒组心肌细胞的[Ca^{2+}]$_i$显示不同程度的升高,且呈剂量依赖性。**结论** 应用Fluo-3/AM和Pluronic F-127结合CLSM技术可以精确的反映细胞内游离钙离子浓度,TCDD可能通过某种机制增加心肌细胞[Ca^{2+}]$_i$,从而对乳鼠心脏功能产生一定损伤。

关键词: TCDD;心肌细胞;钙离子;Fluo-3/AM

中图法分类号: R322.11;R329.26;R996 **文献标识码:** A

Effect of 2, 3, 7, 8-TCDD on free Ca^{2+} concentration of cultured cardiac cells of neonate rats

SUN Li-li[1], CHANG Qing[1], LIANG Zhi-qing[1], YU Zi-jiang[2], MI Jian-hong[2] ([1]Department of Gynecology and Obstetrics, Southwest Hospital, [2]Department of Anatomy, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To measure free Ca^{2+} concentration of cultured cardiac cells of neonatal rats, and observe the effects of 2, 3, 7, 8-TCDD on [Ca^{2+}]$_i$. **Methods** The pregnant SD rats were randomly assigned to receive 2, 3, 7, 8-TCDD injection at the dose of 0, 0.05, 0.5, 5, 10 μg/kg respectively on gestation day 8. The cardiac myocytes of 5-day neonatal rat were cultured, and Fluo-3/AM and Pluronic F-127 were loaded as Ca^{2+} sensitive probe. The changes of intracellular Ca^{2+} was observed by confocal laser scanning microscopy (CLSM). **Results** Undr the quiescent condition, the value of Ca^{2+} of cardiac muscle was (77.68±12.00) nmol/L in 2, 3, 7, 8-TCDD group at the dose of 0 μg/kg (control group), while the [Ca^{2+}]$_i$was (77.16±13.20), (93.62±22.95), (110.99±25.96), (135.96±21.08) nmol/L in the 2, 3, 7, 8-TCDD treated group at the dose of 0.05, 0.5, 5, 10 μg/kg respectively. There was no statistical difference in [Ca^{2+}]$_i$ between control group and 0.05 μg/kg TCDD group, but significant difference between control group and other TCDD treated groups in which [Ca^{2+}]$_i$ increased in a concentration-dependent manner. **Conclusion** CLSM system can accurately reflect cytosolic concentration of free Ca^{2+} labeled by Fluo-3/AM and Pluronic F-127. TCDD may increase [Ca^{2+}]$_i$, then make some impairment to the heart function of the neonate rats.

Key words: TCDD; cardiac cell; calcium; Fluo-3/AM

TCDD作为环境雌激素的一种广泛存在于生态环境中,主要来源是垃圾焚烧排放、含氯化学品及农药生产过程中伴随产生及燃煤电站、金属冶炼、抽烟等产生。其性质稳定,不易降解,高脂溶性,通过食物链传递和富集于机体脂肪组织,无法彻底清除,对人体健康的危害很大,且胚胎较成人敏感[1]。

以往的研究表明[1],胚胎心脏可能是TCDD作用的靶器官之一,且TCDD可致心室肌收缩舒张功能受损。钙离子在心肌细胞兴奋收缩耦联过程中起重要作

作者简介:孙黎黎(1978-),女,安徽省阜阳市人,硕士研究生,医师,主要从事妇科内分泌疾病方面的研究,现在武汉空军医院妇产科。电话:13594189351

通讯作者:常 青,电话:(023)68765399,E-mail:CQLi99@yahoo.com.cn

收稿日期:2005-06-29;修回日期:2005-08-09

用，Chu 等[2]认为心肌细胞内钙离子的浓度与心肌收缩力明显相关。所以本研究应用激光共聚焦显微镜结合 Fluo-3/AM 钙荧光指示剂测钙技术，观察比较对照组与 TCDD 染毒组乳鼠心肌细胞内钙离子浓度变化，初步探讨 TCDD 对 SD 大鼠胚胎心肌细胞影响的可能机制。

1　材料与方法

1.1　实验动物

将雌雄各 15 只 SD 大鼠，体质量 250～300 g（由第三军医大学实验动物中心提供）按 1∶1 比例合笼过夜，翌日发现有阴栓者为怀孕第 0 天。于妊娠第 8 天向实验组孕鼠腹腔注射 2,3,7,8-TCDD（二甲基亚砜溶解），染毒组分为 0.05、0.5、5、10 μg/kg 4 组。待孕鼠产后取新生 5 d 空白组及染毒组乳鼠，雌雄兼用。

1.2　实验试剂

TCDD（由中国科学院水生物所徐盈教授提供）；DMEM 培养基（Hyclone）；胎牛血清、胰蛋白酶和Ⅱ型胶原酶（Gibco）；钙敏荧光染料 Fluo-3/AM 及非离子型的多元醇表面活化剂 Pluronic F-127（Biotium）粉剂，用纯净无水的二甲基亚砜 DMSO（Sigma）溶解稀释，储存于冰箱内备用；5-溴脱氧尿嘧啶 Brdu（Sigma）；其它试剂均为国产分析纯。

1.3　实验方法

1.3.1　乳鼠心肌细胞原代培养　在无菌条件下，乙醇消毒乳鼠 3～5 min，开胸取出心脏，仔细剥离心房及大血管组织，用预冷 D-Hanks 液漂洗 3 次后，剪成约 0.5 mm^3 的小块，放入 50 ml 三角烧瓶，加入 0.08% 胰蛋白酶消化液 5 ml，恒温摇床（35～37 ℃）进行消化，5 min 后取下吹打混匀后静置，吸弃上清，再加入 5 ml 含胶原酶的消化液，同样条件消化至完全（30～40 min）后取下，向管中加入少量 DMEM 培养基及小牛血清终止消化，以 1 000 r/min，离心 8～10 min，吸弃上清液，加入含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基（含青链霉素），混悬沉淀的细胞，置入 5% CO_2 培养箱，37 ℃静置培养 1 h，以差速贴壁法纯化心肌细胞。将细胞密度调至 5×10^5/ml，0.4% 台盼蓝染色，活细胞比率 >90%，接种于含无菌载玻片（多聚赖氨酸包被）的 6 孔培养板中，送入 5% CO_2 孵育箱中培养。8～12 h 后更换培养液，并用 0.1 mmol/L 的 Brdu[3] 维持 48 h，以后每 2～3 天换液 1 次。

1.3.2　培养心肌细胞的 Fluo-3/AM 的负载　将 Fluo-3/AM 及 Pluronic F-127 储备液分别用含钙、镁的 PBS 液配制成不同浓度用于实验。去除长有心肌细胞的载玻片孔内的培养基，加入 Fluo-3/AM 终浓度分别为 1、2、3 μmol/L，及 Pluronic F-127 终浓度分别为 1、1.5、2 μl/ml，含 0.2% 小牛血清的培养基 200 μl，5% CO_2 孵育箱中分别温孵 30、40、50 min，用无血清的 DMEM 培养液洗涤 2 次，重悬于 DMEM 培养液中，用于 CLSM 系统中检测。

1.3.3　培养心肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的测定　Fluo-3/AM 在胞内被酯酶水解成 Fluo-3，以 488 nm 的氩离子激光激发，可在 525 nm 处探测到荧光发射 Fluo-3 在结合 Ca^{2+} 后荧光强度增加，可指示心肌细胞内游离 Ca^{2+} 的相对变化。使用 Leica 激光共聚焦显微镜（TCS-NT 165211），在 100 倍物镜下每孔选 8～10 个视野，取 50 个细胞计算其荧光强度，并取其均值，以平均荧光强度反映心肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的相对水平。本实验采用 IDQ（Ion domain quanitify）软件（由 Leica 公司提供）对所选定的区域荧光强度的数据采集，再将数据输入 Microsoft Excel 中作进一步分析处理。

1.4　统计学处理

数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件进行 t 检验。

2　结果

2.1　细胞存活率测定

台盼蓝染色观察仅 5% 细胞着色，细胞存活率达 95% 以上。

2.2　心肌细胞形态学观察

刚接种的心肌细胞尚未贴壁，呈圆形，悬浮于培养液中。8～12 h 换培养液时，部分心肌细胞已贴壁生长，并出现自发性搏动，搏动频率较慢，有的每分钟仅数次。24～36 h 的心肌细胞已全部贴壁，贴壁后为梭形、菱形或多角形（图 1），但尚未发生自发性搏动，此时可观察心肌细胞静息状态下 $[Ca^{2+}]_i$。继而细胞逐渐在皿底表面铺展，并伸出伪足，形成不规则的星形并相互接触交织成网，在培养第 48 小时可形成呈放射状排列的细胞簇，其搏动已同步化，每分钟 100 次左右。

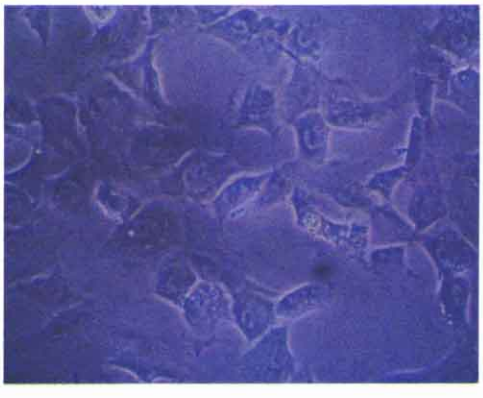


图 1　新生大鼠心肌细胞的体外培养（相差显微镜 ×200）

Fig 1　Cardiac cells of cultured neonatal rats（Phase contrast microscope ×200）

2.3　心肌细胞的 Fluo-3/Am 负载及最后条件

结果显示 2 μmol/L 的 Fluo-3/Am 及 2 μl/ml 的 Pluronic F-127，5% CO_2 恒温孵育箱 37 ℃孵育心肌细胞 40 min 即可达到最佳的负载效果（图 2）。孵育浓度进一步提高和孵育时间的再

延长只能增加背景染色,影响图像的清晰度。若降低孵育浓度和缩短孵育时间则难以达到最佳的负载效果。

2.4 心肌细胞内静息$[Ca^{2+}]_i$及TCDD对心肌细胞静息$[Ca^{2+}]_i$的影响

静息状态,空白组乳鼠心肌细胞$[Ca^{2+}]_i$为(77.68 ± 12.00) nmol/L。而染毒组除0.05 μg/kg组(77.16 ± 13.20) nmol/L与空白组比较无显著统计学差异外($P>0.05$),其余染毒组乳鼠心肌细胞$[Ca^{2+}]_i$均升高,0.5、5、10 μg/kg组分别为(108.62 ± 22.95)、(127.72 ± 25.96)、(142.03 ± 21.08) nmol/L,与空白组比较有显著性差异($P<0.01$),且呈剂量依赖性。

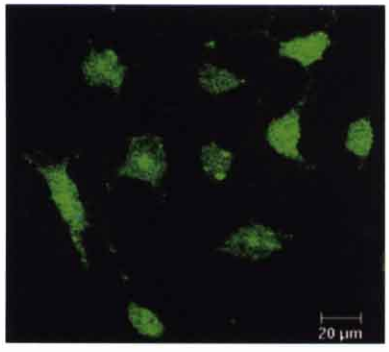


图2 心肌细胞Fluo-3/AM负载40 min的CLSM观察 (Fluorescence ×400)

Fig 2 Cardiac cells loaded with Fluo-3/AM for 40 min observed by CLSM (Fluorescence ×400)

3 讨论

钙离子是细胞内重要的活性物质,是心肌兴奋-收缩的耦联因子。细胞内钙离子的正常摄取与释放,是心肌维持正常舒缩功能的基础。同时钙离子的变化与许多疾病相关,因此对生理和病理状态时细胞内钙水平的准确了解有助于阐明Ca^{2+}在疾病发生中的作用。本研究应用激光共聚焦显微镜结合钙离子荧光探针Fluo-3/AM显示细胞内游离钙,设立空白对照组,比较不同染毒剂量组TCDD对乳鼠心肌细胞静息$[Ca^{2+}]_i$含量的影响,初步探讨TCDD对SD大鼠胚胎心肌细胞影响的可能机制。研究结果表明TCDD可导致乳鼠心肌细胞内Ca^{2+}含量增高,产生钙超载现象,且呈剂量依赖性。静息状态下,空白组乳鼠心肌细胞$[Ca^{2+}]_i$为(77.68 ± 12.00) nmol/L,与文献[4]报道相比较小,分析原因可能与本实验采用自制浴槽而非恒温系统有关。但这对于TCDD的作用及机制的研究影响不大。TCDD染毒组除0.05 μg/kg组与空白组比较无显著统计学差异外($P>0.05$),其余染毒组乳鼠心肌细胞$[Ca^{2+}]_i$均有不同程度升高,与空白组比较有显著性差异($P<0.01$)。

目前认为"钙超载"可能是引起细胞损伤和死亡的最终通路。细胞内游离Ca^{2+}增多,线粒体钙负荷过重,氧化磷酸化过程及能量产生发生障碍;细胞内大量游离Ca^{2+}激活大量的钙调蛋白(CaM),影响细胞内正常的信息传递;细胞内超载的Ca^{2+}还可以通过激活一系列酶(蛋白水解酶、磷酸脂酶、蛋白激酶等)的活性,引起细胞膜内外信号转导失控,进而导致细胞凋亡或坏死[5]。Ivnitski等[6]用鸡胚模型观察到TCDD可以使鸡胚心肌细胞的凋亡增加,增殖减少,继而影响心血管系统结构的正常发育,最终导致畸形的发生。

我们推测,TCDD可能通过某种机制使心肌细胞内"钙超载",而"钙超载"又通过激活一系列酶(蛋白水解酶、磷酸脂酶、蛋白激酶等)的活性,引起细胞膜内外信号转导失控,导致细胞凋亡或坏死,最终影响心血管系统结构的正常发育。通过增加细胞的Ca^{2+}处理能力,就有可能逆转心肌细胞内Ca^{2+}超负荷状态,保护心肌、改善心肌功能。TCDD作用后细胞内Ca^{2+}含量增高的机制尚有待进一步研究。

参考文献:

[1] Walker M K, Catron T F. Characterization of cardiotoxicity induced by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related chemicals during early chick embryo development[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2000, 167(3): 210 - 221.

[2] Chu L, Takahashi R, Norota I, *et al*. Signal transduction and Ca^{2+} signaling in contractile regulation induced by crosstalk between endothelin-1 and norepinephrine in dog ventricular myocardium[J]. Circ Res, 2003, 92(9): 1024 - 1032.

[3] 赵榆华, 迟路湘, 陈一茂. 血管紧张素Ⅱ诱导乳鼠心肌细胞凋亡的研究[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(20): 1819 - 1822.

[4] Yin L, Bien H, Entcheva E. Scaffold topography alters intracellular calcium dynamics in cultured cardiomyocyte networks[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004, 287(3): H1276 - H1285.

[5] Jones L R, Cala S E. Biochemical evidence for functional heterogeneity of cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles[J]. Biol Chem, 1981, 256(22): 11809 - 11818.

[6] Ivnitski I, Elmaoued R, Walker M K. 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin(TCDD) inhibition of coronary development is preceded by a decrease in myocyte proliferation and an increase in cardiac apoptosis[J]. Teratology, 2001, 64(4): 201 - 212.

(编辑 栾 嘉)