论著

文章编号:1000-5404(2006)18-1850-04

豚鼠心衰时心肌细胞收缩和钙瞬变的变化

齐亚娟,郭 芳,李吉和,刘雪莉,李树民,郭会彩,王永利 (河北医科大学药理学教研室,石家庄 050017)

提 要:目的 探讨慢性心衰时豚鼠心肌细胞收缩及钙瞬变的变化。**方法** 以降主动脉缩窄法及异丙肾上腺素(isoproterenol, ISO)法建立豚鼠慢性心衰模型成功后,以酶解法急性分离左室心肌细胞,然后同步检测两种心衰时心肌细胞收缩和钙瞬变的变化。**结果** 降主动脉缩窄8周后,70%豚鼠出现呼吸困难(BPC组),而给予ISO 8周后的豚鼠(ISO组)未见明显呼吸困难,BPC组及ISO组豚鼠的左室收缩压及舒张末压显著增高,左室压上升和下降最大速率显著降低;左心室质量与体质量比值、肺质量与体质量比值及室壁厚度明显增高,均呈现明显的心衰特点。而缩窄8周后未见呼吸困难的豚鼠(BWPC组)仅左心室质量与体质量比值增加,心脏功能尚处于代偿期。两种心衰心肌细胞收缩幅度、收缩和舒张速度均明显减弱,且BPC组收缩幅度、舒张速度比ISO组减弱更明显;BWPC组的心肌细胞收缩幅度、收缩和舒张速度却明显增高。BPC组心肌细胞内舒张期钙升高,钙瞬变幅度减小,舒张期钙减少50% 所需时间(T_{50}DCa)延长;而BWPC组心肌细胞内钙无明显变化;ISO组心肌细胞内舒张期钙和收缩期钙均降低,钙瞬变幅度也减小,T_{50}DCa却无明显改变。**结论** 降主动脉缩窄或给予ISO 8周后,均可造成豚鼠心衰。心衰后心肌细胞收缩功能减弱,钙瞬变幅度减小。

关键词: 豚鼠;慢性心衰;缩窄;异丙肾上腺素;细胞收缩;钙瞬变

中图法分类号: R322.11;R337.2;R541.602 **文献标识码:** A

Changes of ventricular myocyte contraction and calcium transient in guinea pigs of heart failure

QI Ya-juan, GUO Fang, LI Ji-he, LIU Xue-li, LI Shu-min, GUO Hui-cai, WANG Yong-li (Department of Pharmacology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

Abstract: Objective To explore the changes of myocyte contraction and calcium transient in heart failure models. **Methods** Chronic heart failure (CHF) was inflicted in guinea pigs by constricting descent aorta (n =22) or injecting isoproterenol (ISO, n =18) for 8 weeks. Animals without constriction or getting normal saline injection served as their controls. After the left ventricular myocytes were enzymatically isolated from both normal and failed hearts, the contractile and calcium transient of a single myocyte were assessed simultaneously. **Results** Of 70% animals receiving the constriction developed dyspnea (BPC group), but ISO-injected pigs had no this symptom (ISO group). These animals all showed the symptoms of CHF, including increased left ventricular systolic and diastolic pressures, decreased maximal velocities of left ventricular pressure rising and falling, elevated mass ratios of ventricle to body and lung to body, and the increase of left ventricular hypertrophy. In the animals showing no dyspnea after 8 weeks' constriction (BWPC group), there was only increased mass ratio of ventricle to body, indicating in the course of compensation. Compared with normal cells, the extent of contraction, the velocities of myocyte contractile and diastole were decreased significantly in BPC and ISO groups, with the former more obvious than the later, but these items in BWPC group were significantly increased. In myocytes from BPC group, the diastolic calcium was increased, the calcium transient was decreased, and the time to 50% diastolic calcium (T_{50}DCa) was delayed. But no change was observed in these

基金项目: 河北省自然科学基金资助项目(301360)

Supported by Natural Science Foundation of Hebei Province (301360)

作者简介: 齐亚娟(1970-),女,河北省昌黎县人,博士研究生,副教授,主要从事心脑血管药理方面的研究,现在华北煤炭医学院药理学教研室工作。电话:(0315)3725870, E-mail: yajuanqi@yahoo.com.cn

通讯作者: 王永利,电话:(0311)86266824,E-mail: wangyl52@heinfo.net

收稿日期: 2005-10-19;**修回日期:** 2006-05-22

indexes in BWPC group. In ISO group, the systolic and diastolic calcium, and calcium transient were decreased, and T_{50} DCa remained in its origin. **Conclusion** Constricting descent aorta or injecting ISO for 8 weeks both can inflict CHF in guinea pig. Cell contraction and calcium transient are decreased in a single ventricular myocyte after CHF establishment.

Key words: guinea pig; chronic heart failure; constrict; isoproterenol; cell shorting; calcium transient

慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF)是高血压、缺血性心脏病、心脏瓣膜病等许多心血管疾病发展的最终结果。CHF 过程中,心肌细胞的钙稳态平衡遭到破坏,表现为胞内钙瞬变减小和衰减减慢,进而导致心肌收缩能力减退[1]。由于在心室肌细胞兴奋-收缩偶联中,豚鼠使细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 升高或降低的不同途径所占比例和人较为接近[2],另外,豚鼠在肌球蛋白亚型(以 β 肌球蛋白重链为主)和心肌功能方面(正向肌力-频率关系)与人也相似[3],故本实验采用降主动脉缩窄法和皮下注射异丙肾上腺素(isoproterenol, ISO)法建立豚鼠 CHF 模型,并同步检测 CHF 时心肌细胞收缩及钙瞬变的变化。

1　材料与方法

1.1　实验动物

雄性豚鼠 60 只,体质量 250 ~ 300 g,由河北医科大学实验动物中心提供。设对照组Ⅰ 10 只,缩窄组 22 只,对照组Ⅱ 10 只,ISO 组 18 只,各组同室饲养。

1.2　模型制备

1.2.1　降主结扎致豚鼠心衰模型制备　取雄性豚鼠,皮下注射阿托品 0.10 mg/kg,腹腔内注射氯胺酮 30 mg/kg 麻醉。在无菌体条件下,经气管插管行呼吸机正压通气(潮气量 4 ~ 5 ml, 45 次/min)。于胸部左侧第 3、4 肋间隙开胸,分离降主动脉,并用 2-0 号丝线与一针头(长 8 mm,外径 1.00 mm)紧紧结扎,然后抽出针头,造成主动脉狭窄,负压闭和胸腔,恢复自主呼吸。对照组动物施以同样操作,只是不缩窄血管。

1.2.2　ISO 致豚鼠心衰模型制备　雄性豚鼠,腹腔注射 2 % ISO (Sigma),第 1 周 0.5 mg/kg,隔日 1 次,第 2 周 0.5 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$,从第 3 周开始每周增加 0.5 mg/kg,每日 1 次直至第 7、8 周为 3.0 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$。对照组同法注射相同剂量生理盐水。

8 周后 2 种模型动物用有无呼吸困难、左心室质量(湿重)与体质量比值(LVW/BW)、肺质量(湿重)与体质量比值(LW/BW)、室壁厚度(W_{LVP})、左心室收缩压(LVSP),左心室舒张期末压(LVEDP)以及左室压上升和下降最大速率($\pm dp/dt_{max}$)等指标评价心衰模型是否形成。

1.3　单个心室肌细胞的急性分离

取实验用豚鼠,腹腔注射肝素(2 500 U)及 1% 戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉后,开胸迅速取其心脏置于冷无钙台氏液中,修饰后固定于 Langendorff 灌流系统,经主动脉逆行灌流含 EGTA (30 mmol/L) 无钙台氏液约 5 min (7 ~ 9 ml/min);随后用含有胶原酶Ⅱ 12 mg (Gibco) 的无钙台氏液 30 ml,反复循环灌流 15 ~ 20 min,至心脏松软。剪取左心室,于 10 ml KB 液[含 2% 胎牛血清白蛋白(Sigma)]中剪碎,震荡 10 min,尼龙网过滤,室温静置 1 h 后,分 3 级复钙至终浓度为 1.8 mmol/L,保存于正常钙台氏液中待用。上述灌流液持续充 100% 氧气,并保持温度(36 ± 1)℃。

1.4　单细胞收缩和钙瞬变的同步检测

分离后的细胞负载荧光染料 fura2-AM (Sigma, 2 μmol/L),避光孵育 30 min (25 ℃) 后,置于细胞槽(大小约 0.7 ml)中,以正常台氏液持续灌流 (1 ml/min, 25 ℃) 约 5 min 后,应用可视化动缘探测系统(IonOptix Co, USA) 动态跟踪同步检测单细胞收缩和钙瞬变。即以日本光电刺激器(SEN 27103, NIKON)通过安置在细胞槽相对长边底部的一对平行铂丝电极进行场刺激,刺激频率为 0.5 Hz, 脉宽 4 ms。通过倒置显微镜(Nikon)选取边缘完整、横纹清晰、折光性好及无空泡的心室肌细胞,用该系统照相机以 8.3 ms/帧的速率记录单细胞收缩变化图像,同时采用双激发荧光光电倍增系统检测荧光信号。细胞内游离 Ca^{2+} 浓度的改变(即钙瞬变)可由 2 种波长荧光强度的比值 (F340/F380) 反映[4]。

1.5　溶液组成

无钙台氏液(mol/L):NaCl 136.9、KCl 5.4、$MgCl_2$ 0.5、NaH_2PO_4 0.33、Glucose 5.5、HEPES 5.0。正常台氏液:无钙台氏液加 $CaCl_2$ 1.8 mmol/L。KB 液(mol/L):L-glutamic acid 50、KCl 40、KOH 80、taurine 20、KH_2PO_4 25、$MgSO_4$ 3、EGTA 1、Glucose 10、HEPES 10。

1.6　统计学方法

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行双侧 t 检验。

2　结果

2.1　心衰模型相关指标检测结果

缩窄手术后 8 周时,22 只结扎组豚鼠有 2 只死亡,6 只未出现呼吸困难(band group without pulmonary congestion, BWPC);14 只出现呼吸困难(band group with pulmonary congestion, BPC),而 18 只 ISO 组豚鼠死亡 6 只,存活豚鼠未见呼吸困难症状。

BWPC 组仅 LVW/BW 从(1.94 ± 2.20) g/kg 显著增加为(2.67 ± 0.16) g/kg ($P < 0.05$),而 BPC 组及 ISO 组 LVW/BW、LW/BW 及 W_{LVP} 均明显增加,且 BPC 组增加更明显,其中 LVW/BW 分别由对照的(1.94 ± 2.20) g/kg 和(2.07 ± 0.38) g/kg 增加为(3.22 ± 0.15) g/kg ($P < 0.01$) 和(2.78 ± 0.25) g/kg ($P < 0.05$)、LW/BW 分别由对照的(5.18 ± 1.02) g/kg 和(5.41 ± 0.88) g/kg 增加为(12.9 ± 2.16) g/kg 和(7.06 ±

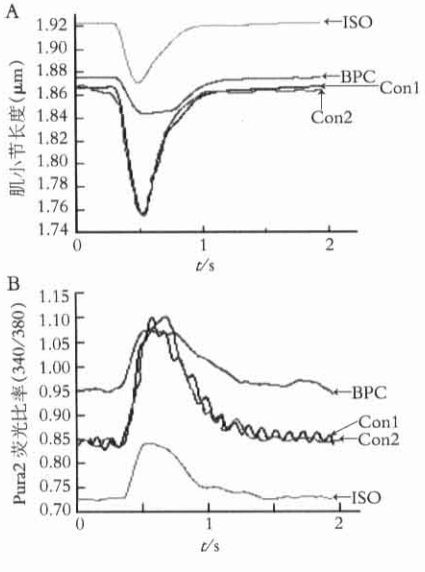
1.63) g/kg ($P<0.01$, $P<0.05$)、W_{LVP}则由对照的(3.04 ± 0.39) mm和(2.95 ± 0.39) mm 增加为(3.55 ± 0.28) mm 和(3.25 ± 0.23) mm($P<0.05$)。

BWPC 组 LVSP、LVEDP 和 ± dp/dt_{max}均无显著性改变,而 BPC 组 LVSP 和 LVEDP 显著增高,分别由对照的(86.96 ± 21.93) mmHg 和(3.60 ± 1.17) mmHg 增高为(112.5 ± 9.63) mmHg ($P<0.05$)和(11.83 ± 2.77) mmHg ($P<0.01$), ± dp/dt_{max}分别由对照的(4 003.59 ± 899.62) mmHg/s 和(3 499.94 ± 667.90) mmHg/s 下降为(2 096.83 ± 712.40) mmHg/s ($P<0.01$)和(2 645.65 ± 960.66) mmHg/s ($P<0.05$)。ISO 组 LVSP 和 LVEDP 也均增加,分别由对照的(75.28 ± 14.54) mmHg和(3.84 ± 0.95) mmHg 增高为(91.63 ± 7.84) mmHg ($P<0.05$)和(7.14 ± 3.63) mmHg ($P<0.05$), ± dp/dt_{max}分别由对照的(4 268.23 ± 662.11) mmHg/s 和(3 677.19 ± 550.72) mmHg/s下降为(2 882.59 ± 694.68) mmHg/s ($P<0.01$)和(2 765.12 ± 647.30) mmHg/s ($P<0.05$),并且 BPC 组 LVEDP 和 + dp/dt_{max}的变化均比 ISO 组更明显。

以上各项指标的综合评价结果表明:BWPC 组豚鼠心脏功能可能尚处于代偿期,而 BPC 组和 ISO 组豚鼠 CHF 模型形成良好。

2.2 慢性心衰心肌细胞收缩和钙瞬变的变化

结果见图1和表1。两对照组各项指标无差别;BWPC 组收缩幅度、肌小节收缩和舒张速度均增大($P<0.05$, $P<0.01$)。而 BPC 组和 ISO 组心衰心肌细胞收缩幅度、收缩和舒张速度减弱($P<0.01$, $P<0.05$),提示慢性心衰可致心肌细胞收缩力下降、收缩和舒张速度减小,且 BPC 组收缩力和舒张速度下降更明显。



A:细胞收缩单一信号图; B:钙瞬变单一信号图. Con 1:假手术组; BPC:手术致心衰组;Con 2:ISO 对照组;ISO:异丙肾致心衰组

图1 心衰时心室细胞收缩和钙瞬变的变化 均为来自10个细胞的平均值

表1 豚鼠心衰时心肌细胞收缩力的变化

组别	细胞数	细胞收缩幅度(μm)	收缩速度(μm/ms)	舒张速度(μm/ms)
对照Ⅰ	22	0.081 ± 0.017	1.020 ± 0.300	0.525 ± 0.162
BWPC	18	0.101 ± 0.021[b]	1.331 ± 0.326[a]	0.998 ± 0.305[b]
BPC	20	0.048 ± 0.013[be]	0.610 ± 0.180[b]	0.283 ± 0.096[be]
对照Ⅱ	20	0.083 ± 0.022	1.100 ± 0.283	0.532 ± 0.154
ISO	22	0.070 ± 0.019[c]	0.521 ± 0.108[d]	0.376 ± 0.094[d]

a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, 与对照组Ⅰ比较; c: $P<0.05$, d: $P<0.01$, 与对照组Ⅱ比较; e: $P<0.01$, 与 ISO 组比较

心肌细胞 Ca^{2+} 瞬变情况(表2)也表明,两对照组及 BWPC 组各项指标无显著差别,BPC 组舒张期 Ca^{2+} (diastolic Ca^{2+}, DCa)升高($P<0.01$),收缩期 Ca^{2+} (Systolic Ca^{2+}, SCa)无明显变化,而 ISO 组二者均下降($P<0.05$, $P<0.01$);2种心衰心肌细胞 Ca^{2+} 瞬变幅度[Ca^{2+} 荧光比率(fluorescence ratio, FR)变化]均减小($P<0.01$)。BPC 组 T_{50}DCa 延长($P<0.05$),而 ISO 组变化不明显。

表2 豚鼠心衰时心肌细胞钙瞬变的变化

组别	细胞数	钙瞬变 DCa(FR)	SCa(FR)	ΔCa (FR)	TTPCa(ms)	T_{50}DCa(ms)
对照组Ⅰ	22	0.83 ± 0.08	1.10 ± 0.22	0.36 ± 0.12	293 ± 97	306 ± 98
BWPC	18	0.78 ± 0.10	1.08 ± 0.16	0.33 ± 0.12	265 ± 77	289 ± 51
BPC	20	0.93 ± 0.10[b]	1.10 ± 0.12	0.16 ± 0.05[b]	301 ± 99	382 ± 94[a]
对照组Ⅱ	20	0.82 ± 0.09	1.11 ± 0.16	0.35 ± 0.10	295 ± 90	313 ± 92
ISO	22	0.77 ± 0.11[c]	0.88 ± 0.13[d]	0.13 ± 0.05[d]	292 ± 93	340 ± 96

FR:340/480 荧光比率;DCa:舒张期钙; SCa:收缩期钙;ΔCa(FR):钙瞬变;TTPCa: 收缩期钙达峰时间;T_{50}DCa:舒张期钙恢复50%所需时间 a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, 与对照组Ⅰ比较; c: $P<0.05$, d: $P<0.01$, 与对照组Ⅱ比较

另外,为判断收缩和钙瞬变变化的因果关系,对收缩和钙瞬变的单一信号进行分析。发现若以每次收缩的起点时间为0 ms,则正常组和 BPC 组钙瞬变峰的起点时间分别为(-73 ± 21) ms、(-83 ± 27) ms,均较细胞收缩显著提前($P<0.01$)。提示细胞内钙的升高均发生在收缩之前,进而表明每次收缩系细胞内钙升高所致。

3 讨论

降主动脉缩窄致压力超负荷进而可发展成 CHF,而皮下大剂量注射 ISO 可造成心肌细胞弥漫性坏死、纤维化及心室扩张,从而导致 CHF[5]。根据豚鼠的细胞电生理学特性与人较为接近的特点,制作豚鼠 CHF 模型进行研究甚为必要。本研究中,BPC 组及 ISO 组豚鼠,LVSP 和 LVEDP 明显增高, ± dp/dt_{max}下降,且

LVW/BW 及 LW/BW 明显增大，W_{LVP}明显增加,提示两种方法均可致 CHF 的形成。但 ISO 法各项指标改变程度均较缩窄法为轻。

大多数 CHF 患者心肌的收缩和舒张功能受到损害,其心肌收缩力降低,主要起源于单个心室肌细胞的舒缩能力受损。本实验显示心衰心肌细胞收缩和舒张速度均较正常细胞明显减慢,收缩幅度也显著降低,表明 CHF 时心肌细胞收缩力减弱。而 BWPC 组三者均增大,提示其心脏功能可能尚处于代偿阶段。

一般认为,Ca^{2+}介导的兴奋-收缩偶联是心肌细胞收缩始动的关键环节。本研究在检测收缩力的同时,同步检测了细胞内钙的变化。结果表明,在电场刺激下,两心衰组钙瞬变的幅度均较对照组减小,与收缩力减弱相一致,且细胞内钙的升高发生在收缩之前,从细胞水平说明,心肌细胞的每次收缩确系细胞内钙的增高所致。但两种模型心衰心肌细胞钙的变化并不相同。在缩窄法表现为 DCa 明显增加,SCa 无改变,而在 ISO 法则表现为 DCa 和 SCa 均明显减少。缩窄法 T_{50} DCa 延长,收缩期钙达峰时间无明显变化,但 ISO 法二者均无明显变化。

已知钙瞬变的幅度及时程由细胞膜 L-型钙通道、肌浆网(sarcoplasmic reticulum, SR)膜 Ryanodine-受体操纵的钙通道、Ca^{2+}-ATPase 和 Na-Ca 交换体(NCX)等多种蛋白调控。钙瞬变的幅度反映了细胞膜上 L-型钙通道和 SR 膜上 Ryanodine-受体操纵的钙通道的活性,而钙瞬变的时程则反映了钙泵(Ca^{2+}-ATPase)的活性[6]。在 CHF 时,L-型钙通道的密度变化不明显,但心肌细胞 T-管密度减小,Ca^{2+}经 L-型钙通道激活的 SR Ryanodine-受体的效率降低,导致 SR 对钙的重吸收和释放均减少,使钙瞬变减小[7];肌浆网 Ca^{2+}-ATPase 在蛋白和 mRNA 水平上降低，使舒张期对 Ca^{2+}的重吸收减弱,细胞质 Ca^{2+}升高[8];NCX 在蛋白和 mRNA 水平升高[9],可使 Ca^{2+}经反向 NCX 内流而增加细胞内钙,且其主要影响钙瞬变的终末期;另外,心衰心肌细胞膜上 Na^+, K^+- ATP 酶的改变也间接影响着细胞内钙水平[10]。因此,缩窄法致心衰心肌细胞内舒张期钙的增加和钙瞬变的减小,可能是 SR 膜 Ryanodine-受体操纵的钙通道、NCX 及 Na^+, K^+- ATP 酶等多种因素综合影响的结果;而 T_{50}DCa 延长可能与肌浆网钙- ATPase 活性降低有关。ISO 法舒张期内钙明显减少,可能涉及心肌肿瘤坏死因子TNF-α的作用,TNF -α以旁分泌或自分泌方式直接作用心肌细胞膜 TNF -α 受体,通过第二信使—神经鞘氨醇启动胞内信号转导系统使胞内钙离子内流减少,导致心肌收缩力下降，发挥负性肌力作用[11]。缩窄法细胞内钙的变化更接近临床 CHF 症状[1],可能更适合研究心衰心肌细胞收缩力与胞内钙的变化。

参考文献:

[1] PIACENTINO V, 3rd., WEBER C R, CHEN X, *et al*. Cellular basis of abnormal calcium transients of failing human ventricular myocytes [J]. Circ Res, 2003, 92(6): 651 - 658.

[2] BERS D M. Cardiac excitation-contraction coupling [J]. Nature, 2002, 415(6868): 198 - 205.

[3] HASENFUSS G. Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hypertrophy[J]. Cardiovasc Res, 1998, 39(1): 60 - 76.

[4] 张海锋,张　博,张晓东,等. 可视化动缘探测系统检测心肌细胞舒缩功能[J]. 中国应用生理学杂志, 2004, 20(4): 410 - 414.

[5] MORI T, HAYASHI T, SOHMIYA K, *et al*. Mechanisms of combined treatment with celiprolol and candesartan for ventricular remodeling in experimental heart failure[J]. Circ J, 2005, 69(5): 596 - 602.

[6] 裴建明,朱妙章. 如何测定心肌细胞内的钙瞬变[J]. 心脏杂志, 2002,14(4): 359 - 360.

[7] BENITAH J P, KERFANT B G, VASSORT G, *et al*. Altered communication between L-type calcium channels and ryanodine receptors in heart failure[J]. Front Biosci, 2002, 7: e263 - e275.

[8] HOUSER S R, PIACENTINO V, 3rd., WEISSER J. Abnormalities of calcium cycling in the hypertrophied and failing heart[J]. J Mol Cell Cardiol, 2000, 32(9): 1595 - 1607.

[9] CONWAY S J, KOUSHIK S V. Cardiac sodium-calcium exchanger: a double-edged sword[J]. Cardiovasc Res, 2001, 51(2): 194 - 197.

[10] TROUVE P, CARRE F, BELIKOVA I, *et al*. Na^+-K^+-ATPase alpha(2)-isoform expression in guinea pig hearts during transition from compensation to decompensation[J]. Am J Physiol Heart Circ Physio, 2000, 279(4): H1972 - H1981.

[11] CAIN B S, MELDRUM D R, DINARELLO C A, *et al*. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta synergistically depress human myocardial function [J]. Crit Care Med, 1999, 27(7): 1309 - 1318.

(编辑　周　芳)