文章编号:1000-5404(2009)14-1341-04

论著

乳化异氟醚对乳鼠缺氧/复氧心肌细胞的保护作用及对 caspase-3 表达的影响

谭兴琴[1],陈玉培[2] (重庆医科大学:[1]附属儿童医院麻醉科,[2]附属第二医院麻醉科,重庆 400010)

摘 要:目的 观察乳化异氟醚(8%体积比)对培养乳鼠心肌细胞模拟缺血再灌注损伤后心肌细胞的保护作用并探讨其可能作用机制。**方法** 利用原代培养的Wistar乳鼠心肌细胞建立模拟心肌缺血再灌注模型,分正常培养组、H/R组、脂肪乳组、乳化异氟醚(终浓度0.28 mmol/L)组。各组心肌细胞作相应分组处理后,利用倒置显微镜观察心肌细胞的生长状态和搏动频率;XTT法测定细胞活力;黄嘌呤氧化酶法测定细胞内超氧化物歧化酶(SOD)活力,硫代巴比妥酸显色法测定细胞内丙二醛(MDA)含量,并测定缺氧复氧后细胞培养液中乳酸脱氢酶(LDH)活性;Western blot法检测caspase-3蛋白表达。**结果** 与正常培养组比较H/R组细胞SOD下降,MDA、LDH及caspase-3蛋白表达升高($P<0.05$)。乳化异氟醚组与H/R组比较,心肌细胞SOD活性提高,MDA、LDH及caspase-3蛋白表达下降($P<0.05$),且心肌细胞形态及超微结构改善。**结论** 乳化异氟醚具有明显的抗缺氧复氧损伤、保护心肌细胞的作用,其作用机制可能与抗自由基损伤及抑制caspase蛋白表达水平有关。

关键词: 乳化异氟醚;缺氧复氧;心肌;细胞;自由基;caspase-3
中图法分类号: R332.11;R394.3;R971.2 **文献标识码:** A

Emulsified isoflurane protects hypoxia/reoxgenation injury in cultured neonatal rat myocardial cells by suppressing caspase-3 expression

TAN Xing-qin[1], CHEN Yu-pei[2] ([1]Department of Anesthesiology, Children's Hospital, [2]Department of Anesthesiology, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective To investigate the protective effects of emulsified isoflurane (8% v/v) on myocardial cells after hypoxia/reoxygenation (H/R) in cultured myocardial cells from neonatal rats. **Methods** Myocardial hypoxia/reoxygenation model was established by culturing myocardial cells primarily isolated from neonatal rats. The myocardial cells were divided into 4 groups, the normal group, model group, fat milk treatment group, and mulsified isoflurane treatment group (0.28 mmol/L). Cellular morphologic changes and pulsation frequency were observed under inverted microscope. Cell activity was determined by XTT assay. The activities of plasma superoxide dismutase (SOD) was measured by xanthine oxidase method and the contents of serum malonicaldehyde (MDA) by thiobarbituric acid method. The activities of lactate dehydrogenase (LDH) in the culture medium after H/R injury was measured. Western blot analysis was used to detect caspase-3 protein expression in every group. **Results** Compared with normal group, SOD activity was decreased, and MDA content, LDH activity and the expression of caspase-3 protein were increased in model group ($P<0.05$). Compared with model group, SOD activity was increased, while MDA content, LDH activity and the expression of caspase-3 were decreased ($P<0.05$) after emulsified isoflurane treatment. The morphological and ultrastructural changes of cardiomyocytes were improved after the treatment. Fat milk treatment group showed similar changes, but not significant as emulsified isoflurane treatment did. **Conclusion** Emulcified isoflurane has

作者简介: 谭兴琴,女,重庆市梁平县人,硕士,医师,主要从事临床麻醉和心肌保护方面的研究。E-mail: tanxingqin@yahoo.com.cn
通信作者: 陈玉培,E-mail: cypgxhcj@tom.com
收稿日期: 2008-12-18;**修回日期:** 2009-02-25

protective effects on cultured neonatal rat myocardial cells after H/R injury, which may be related to reducement of oxygen free radical and the inhibition of caspase-3 expression.

Key words: emulsified isoflurane; hypoxia/reoxygenation; myocardium; cells; cultured; free radical; caspase-3

8%乳化异氟醚是我国开发的一种新型静脉用麻醉药。乳化异氟醚和脂肪乳加入大鼠 Langendorff 心脏灌流及低温保存缺血再灌注损伤模型中能够改善心脏机械功能,减少肌酸激酶(CK)、乳酸脱氢酶(LDH)的释放,缩小心肌梗死面积[1],具有明显的心肌保护作用[2,3]。但其作用机制不清楚。为排除神经体液等因素的影响,本课题组在前期研究[4,5]基础上利用纯化培养的心肌细胞缺氧复氧(hypoxia-reoxygenation,H/R)损伤模型,从细胞水平进一步观察乳化异氟醚对离体心肌细胞缺氧复氧损伤的作用及其对 caspase-3 蛋白表达的影响,并对其可能的机制进行分析。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

乳化异氟醚 120 mg/ml(华瑞制药有限公司),脂肪乳 500 ml/瓶(30% 英脱利匹特,华瑞制药有限公司),DMEM 培养基(美国 Gibco 公司),超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、LDH 试剂盒均购自南京建成生物工程研究所,鼠抗人抗 caspase-3 多克隆抗体(德国 GmbH 公司),反转录聚合酶链反应试剂盒(日本 Nippon Gene 公司),Caspase-3 活性检测试剂盒(德国 GmbH 公司)。

1.2 实验动物与主要仪器

健康新生 1~3 d Wistar 乳鼠,雌雄不拘,120 只,由重庆医科大学实验动物中心提供。HERA cell CO_2 培养箱和 D-37520 型高速冷冻离心机(德国 GmbH 公司),SW-CJ-IF 型净化工作台(苏州安泰技术有限公司),BH-NIC-B 型倒置显微镜(Olypus Optical 公司,日本),Western 电泳仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 测定项目及方法

1.3.1 原代心肌细胞培养 参照文献[6]的方法并结合实际改进。取出生 1~3 d 的 Wistar 乳鼠,75% 乙醇浸泡后,在无菌条件下开胸取出心脏置于预先盛有 D-Hank 液的无菌平皿内,用含抗生素的 D-Hank 液冲洗 2 遍。在无菌操作台内去包膜和大血管,剪成碎泥状,移入 50 ml 离心管中,用 0.25% 胰酶和 0.125% Ⅱ型胶原酶等量混合液 37 ℃水浴消化 5 min,自然沉淀后弃上清液再加入双酶液,37 ℃水浴消化 15 min,再自然沉淀后取上清液至含等量终止液(15% 胎牛血清,85% DMEM)的离心管中终止消化。重复 5~7 次,使组织块消化完全。收集以后的细胞悬液经 200 钼尼龙网过滤,离心 10 min(1 000 r/min)后弃上清液,加入培养液(85% DMEM、15% 胎牛血清、青霉素 100 U/ml、链霉素 100 U/ml 和 0.1 mmol/L BrdU)混悬,台盼蓝染色计数,调整细胞数至 5×10^6 L^{-1}。移至培养瓶中,置 37 ℃,5% CO_2 培养箱中培养 2 h 以纯化心肌细胞(差速贴壁法),然后接种到培养板或者培养瓶中培养。48 h 后换液。其中 BrdU 在细胞培养 72 h 内加入。

1.3.2 心肌细胞缺氧复氧损伤模型的建立 参照文献[7]方法,并结合本实验室条件改造。实验用经混合气体 A(95% N_2 和 5% CO_2)预先饱和 1 h 的模拟缺血溶液[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]置换正常培养溶液,将原代培养心肌细胞放入自制缺氧装置中,充入混合气体 A 后密封,将原代心肌细胞放入培养箱中培养 3 h ,即为缺氧(缺血)模型。3 h 后倾弃模拟缺血液,换以用混合气体 B(95% O_2 和 5% CO_2)预先饱和 1 h 的模拟再灌注溶液[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 5.5, HEPES 20; pH 7.4; 用时加 10 ml 胎牛血清],放入培养箱(95% 空气, 5% CO_2, 37 ℃)中,于常氧环境中继续培养 3 h,即为复氧(再灌注)模型。

1.3.3 实验分组 取培养 5 d(120 h)整孔搏动细胞,随机分为 4 组。正常培养组:不加药物处理,常氧条件下培养 6 h;缺氧复氧损伤模型组(H/R 组,模型建立如上述):不加药物处理,缺氧(缺氧模型)3 h 后复氧(复氧模型)3 h;脂肪乳组(浓度同乳化异氟醚中脂肪乳的浓度):用脂肪乳进行 2 h 干预后,余同 H/R 组;乳化异氟醚组:用 8% 乳化异氟醚(终浓度 0.28 mmol/L)提前 2 h 干预后,余同 H/R 组。

1.3.4 心肌细胞形态观察 倒置显微镜下观察各组心肌细胞生长及搏动情况。

1.3.5 指标检测 应用 XTT 比色法检测心肌细胞活力;取细胞培养上清液,以半自动生化分析仪测定乳酸脱氢酶(LDH)活性;以黄嘌呤氧化酶法测定超氧化物歧化酶(SOD)活性;以硫代巴比妥酸法测定脂质过氧化物丙二醛(MDA)含量。各测定方法严格按照试剂盒操作说明进行。

1.3.6 Western blot 检测 caspase-3 表达 分别取各组心肌细胞,提取组织蛋白,用考马斯亮兰蛋白定量试剂盒测定各组样本蛋白质浓度,样品蛋白经 SDS-PAGE 电泳、转膜、加入一抗(caspase)和二抗(IgG)、显影、定影成像。

1.3.7 caspase-3 活性的测定 按照其试剂盒的操作步骤进行,以正常组作为阴性对照,用样品吸光度值/阴性对照吸光度值表示 caspase-3 的活性。

1.4 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SAS 统计软件行方差分析,两两比较采用 SNK-q 检验。

2　结果

2.1　正常心肌细胞形态观察

心肌细胞培养 12 ~ 24 h 出现自发性搏动,72 h 后聚集成簇,呈现频率为 80 ~ 100 次/min 的同步节律性搏动。细胞形态呈梭形或不规则三角形,伪足明显,可发生相互融合,核呈卵圆形居中。H/R 后心肌细胞皱缩变圆,伪足减少,缺氧 3 h 细胞搏幅减弱、频率减慢甚至出现停博。复氧 3 h 后部分可恢复搏动,但出现节律失常现象,有多种形式的短暂停博和阵发性快速搏动。乳化异氟醚组和脂肪乳组细胞形态变化比 H/R 组轻微,生长状态有所改善,乳化异氟醚组改善更明显。

2.2　各组心肌细胞成活率、SOD、MDA、LDH 的变化

H/R 组较正常组细胞成活率明显降低($P < 0.05$);MDA、LDH 含量明显升高($P < 0.05$);SOD 活性明显下降($P < 0.05$)。经乳化异氟醚和脂肪乳的干预,心肌细胞成活率较 H/R 组增高($P < 0.05$),MDA、LDH 降低($P < 0.05$),SOD 增高($P < 0.05$)。见表 1。

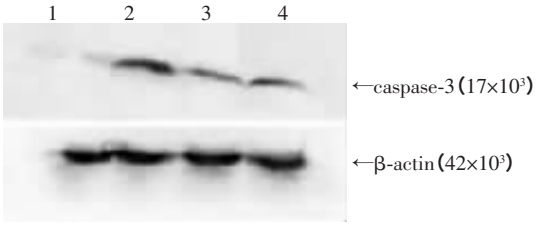
表 1　4 组心肌细胞检测指标比较($n = 9$, $\bar{x} \pm s$)

组别	SOD(U/mg)	MDA(nmol/mg)	LDH(U/L)	OD 值 *
正常培养组	297.29 ± 6.26	1.49 ± 0.34	1 148.47 ± 83.03	0.95 ± 0.05
H/R 组	194.46 ± 2.76^{a}	8.42 ± 0.60^{a}	2 985.45 ± 79.74^{a}	0.40 ± 0.03^{a}
脂肪乳组	204.45 ± 2.71^{ab}	7.56 ± 0.24^{ab}	2 795.52 ± 69.46^{ab}	0.60 ± 0.03^{ab}
乳化异氟醚组	254.23 ± 9.67^{abc}	2.48 ± 0.64^{abc}	2 011.87 ± 137.74^{abc}	0.70 ± 0.07^{abc}

a: $P < 0.05$,与正常培养组比较; b: $P < 0.05$,与 H/R 组比较; c: $P < 0.05$,与脂肪乳组比较; *:OD 值越高示细胞成活率越高

2.3　Western blot 检测 caspase-3 蛋白表达的变化

Western blot 分析乳鼠培养心肌细胞各实验组 caspase-3 的 17×10^3 亚单位的变化,结果发现正常培养组乳鼠心肌细胞未出现 caspase-3 条带谱;H/R 组出现了明显的 caspase-3 条带谱,乳化异氟醚组和脂肪乳组也出现了 caspase-3 条带谱,但其带谱明显减弱(图 1)。吸光度扫描分析结果显示,培养心肌细胞 caspase-3 正常培养组仅有少量表达,H/R 组(7.88 ± 0.26)较正常培养组(1)显著增加($P < 0.05$),乳化异氟醚组(3.13 ± 0.50)较 H/R 组比较显著减少($P < 0.05$),但是仍较正常培养组增加($P < 0.05$),脂肪乳组(3.82 ± 0.73)较正常培养组显著增加,较 H/R 组显著减少($P < 0.05$)。



1:正常培养组;2:H/R 组;3:乳化异氟醚组;4:脂肪乳组

图 1　Western blot 检测各组心肌细胞 caspase-3 的表达

3　讨论

心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia reperfusion injury, MIRI)是心脏缺血性疾病和心脏外科手术围术期常见的一种病理生理现象,减轻或消除这种损伤一直是该领域研究的热点。心肌细胞缺氧复氧损伤模型能够排除神经和体液的影响模拟心肌缺血再灌注损伤,直接观察药物对细胞的作用,被广泛应用于心血管研究。而心肌细胞培养的常见动物是大鼠,常用培养方法包括新生大鼠心肌细胞的培养和成年大鼠心肌细胞的培养。成年大鼠心肌细胞为终末分化细胞,不再具有分裂增殖能力。而胚胎后期和新生早期的心肌细胞仍有核和有丝分裂。因此,大鼠出生时间越短,其心肌细胞分离后成活率越高,越容易贴壁生长。研究表明,选择 1 ~ 3 d 龄大鼠分离其心肌细胞进行原代培养较为理想[6]。故本实验中采用了 1 ~ 3 d 龄大鼠进行心肌细胞原代培养。

乳化异氟醚是我国新开发的一种具有自主知识产权的可静脉用的新型麻醉药(目前尚未应用于临床),它是由 30% 的脂肪乳和异氟醚在一定条件下混合震荡而成。目前通过临床前期对乳化异氟醚的研究证实其特点表现为:①经过对其药效学和毒性的评估,发现该制剂具有诱导和苏醒极为迅速的优点,且安全性较好,对重要脏器无明显毒副作用[8]。②乳化异氟醚的安全性与有效性与异丙酚相仿,且其麻醉作用起效时间短,恢复快[9]。③在单次静脉给药时乳化异氟醚麻醉起效时间和麻醉恢复时间均优于异氟醚。④与芬太尼和咪达唑仑联合使用具有协同作用[10,11]。⑤可能具有器官保护作用[1-5]。具有较好临床研究前景。研究证实作为乳化异氟醚成分之一的异氟醚对实验动物或者人的心肌细胞具有显著的保护作用[12-14],脂肪乳可增加心脏 ATP 的供应,增加脂肪酸底物的利用和脂肪酸的氧化,对心肌保护也有一定的作用[15]。因此探讨乳化异氟醚对缺氧复氧心肌细胞的影响具有研究价值和理论基础。0.28 mmol/L 异氟醚相当于临床上 MAC 时血药浓度[16],所以本实验以此浓度作为乳化异氟醚实验剂量组。

LDH 是一种糖酵解酶,广泛存在于人体各组织器官中,主要存在于细胞质内。心肌细胞 LDH 漏出量变化是反应心肌坏死的重要指标。本研究发现,H/R 组培养液中的 LDH 含量明显高于正常组,提示 H/R 可使细胞膜受损,导致细胞损伤,与文献报道一

致,证明我们建立的心肌细胞 H/R 损伤模型是成功的。应用乳化异氟醚和脂肪乳干预后,与 H/R 组比较,LDH 值明显下降($P<0.05$),提示乳化异氟醚和脂肪乳有稳定细胞膜的作用,对缺氧复氧损伤的心肌细胞具有保护效应。但乳化异氟醚比脂肪乳的作用更显著($P<0.05$)。

丙二醛(MDA)是脂质过氧化反应中的重要产物,测定 MDA 生成可反映心肌膜结构脂质过氧化反应的程度,间接反映氧自由基生成的情况以及细胞损伤的程度。SOD 是主要存在于细胞质和线粒体内的一种金属蛋白酶,催化歧化反应,清除超氧阴离子,从而缓冲自由基连锁反应,清除自由基而发挥细胞保护作用,是机体内抗氧化系统的重要组成部分。SOD 也是机体内清除超氧化物阴离子的专一性酶,它的升高与降低反应了机体清除超氧阴离子的能力。SOD 的活力的高低间接反应了机体清除氧自由基的能力。本研究发现,H/R 组较正常组比较细胞成活率降低,SOD 活性明显降低,MDA 水平显著升高,而在应用了乳化异氟醚和脂肪乳后,细胞成活率、SOD 活性均较 H/R 组明显增高,MDA 含量低于 H/R 组,提示乳化异氟醚和脂肪乳可降低心肌细胞脂质过氧化反应,提高心肌细胞清除超氧阴离子的能力,从而发挥抗自由基损伤的作用。表明乳化异氟醚和脂肪乳的心肌保护效应与其抗自由基氧化有关,且乳化异氟醚比脂肪乳的作用更显著($P<0.05$),这可能与异氟醚的心肌保护作用有关[16]。

caspase-3 是细胞凋亡过程中最关键的执行分子(key executioner)之一,可以剪切细胞凋亡过程中的许多关键蛋白,例如 PARP。caspase-3 的激活需要从没有活性的全长 caspase-3(35×10^3),在 Asp28 和 Ser29 之间及 Asp175 和 Ser176 之间进行剪切,产生有活性的亚基和 12×10^3 的亚基。所以本实验仅对 caspase-3 17×10^3 亚基进行检测。本实验结果显示对照组心肌细胞 caspase-3 的活性很低;缺氧复氧损伤后 caspase-3 的活性比对照组增加约 3 倍;而乳化异氟醚组和脂肪乳组 caspase-3 的活性明显降低。说明乳化异氟醚和脂肪乳对缺氧复氧损伤后心肌细胞的凋亡起到一定的抑制作用,但乳化异氟醚比脂肪乳的作用更显著($P<0.05$)。

目前乳化异氟醚的实验处于临床前期,其对人体心肌细胞的保护作用是否同本实验结论一样还需要进一步的研究证实。

参考文献:

[1] 刘陕岭, 刘 进. 乳化异氟醚和脂肪乳对大鼠心脏缺血再灌注损伤的影响[J]. 华西药学杂志, 2007, 22(5): 525-527.

[2] 张雪松, 曾繁荣, 左会明. 乳化异氟醚预处理对缺血再灌注大鼠心肌的保护作用[J]. 中国康复理论与实践, 2008, 14(8): 727-728.

[3] 陈永权, 金孝岠, 戴泽平, 等. 乳化异氟醚预处理对兔缺血再灌注心肌血流动力学的影响[J]. 国际麻醉学与复苏杂志, 2006, 27(4): 224-226.

[4] 徐 茜, 陈玉培. 静脉乳化异氟醚的研究进展[J]. 医学综述, 2008, 14(5): 2350-2353.

[5] 谭兴琴, 陈玉培, 张文胜, 等. 乳化异氟醚对缺氧复氧乳鼠心肌细胞的保护作用及 bcl-2、bax 表达的影响[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(17): 1611-1614.

[6] 王 娜, 关 鹏, 段相林, 等. 新生大鼠心肌细胞原代培养方法的改进[J]. 河北师范大学学报:自然科学版, 2007, 31(2): 256-259, 263.

[7] 赵晓辉, 彭毅志, 王元元, 等. 缺氧复氧心肌细胞中 HSP90 对 AKT 表达的调控作用[J]. 现代生物医学进展, 2007, 7(4): 521-524.

[8] 孙海峰, 王泉云, 梁小民, 等. 乳化异氟醚腹腔注射对大鼠的麻醉作用与安全性[J]. 中华麻醉学杂志, 2004, 24(1): 51-53.

[9] 马汉祥, 李 杰, 杨宗斌, 等. 犬静脉注射乳化异氟醚与异丙酚麻醉的效果[J]. 中华麻醉学杂志, 2006, 26(9): 862-863.

[10] 杨经文, 陈 燕, 高安量, 等. 乳化异氟醚与芬太尼麻醉作用的相互影响[J]. 华西药学杂志, 2007, 22(5): 527-529.

[11] 陈其彬, 闵 苏, 兰培丽, 等. 瑞芬太尼联合异氟醚控制性降压在颅内动脉瘤介入栓塞术中的观察[J]. 重庆医科大学学报, 2008, 33(4): 507-509.

[12] Jiang M T, Nakae Y, Ljubkovic M, *et al*. Isoflurane activates human cardiac mitochondrial adenosine triphosphate-sensitive K^+ channels reconstituted in lipid bilayers[J]. Anesth Analg, 2007, 105(4): 926-932.

[13] Patel H H, Tsutsumi Y M, Head B P, *et al*. Mechanisms of cardiac protection from ischemia/reperfusion injury: a role for caveolae and caveolin-1[J]. FASEB J, 2007, 21(7): 1565-1574.

[14] Lee M C, Chen C H, Kuo M C, *et al*. Isoflurane preconditioning-induced cardio-protection in patients undergoing coronary artery bypass grafting[J]. Eur J Anaesthesiol, 2006, 23(10): 841-847.

[15] Van de Velde M, DeWolff M, Leather H A, *et al*. Effects of lipids on the functional and metabolic recovery from global myocardial stunning in isolated rabbit hearts[J]. Cardiovasc Res, 2000, 48(1): 129-137.

[16] 赵建力, 刘保江, 李 锦, 等. 异氟醚对缺氧心肌细胞的影响[J]. 山西临床医药杂志, 2002, 11(3): 168-169.

(编辑 邓强庭)