基础研究 文章编号:0253-3626(2010)01-0043-03

SEA0400 对大鼠心肌细胞缺血再灌注损伤的保护作用

汪 飞[1],杨双强[2]

(1. 重庆医科大学附属第一医院急诊科;2. 重庆医科大学附属第一医院胸心外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨 SEA0400 对离体大鼠心肌细胞缺血再灌注损伤的保护作用及其机制。方法:利用酶解法分离成年 Wistar 大鼠心脏获得心肌细胞悬液,随机分成 3 组进行研究:(1)对照组:心肌细胞用再灌注液培养 60 min,未经历缺血再灌注过程;(2)缺血再灌注损伤组:心肌细胞缺血 30 min,再灌注 30 min,经历缺血再灌注损伤过程;(3)SEA0400 干预组:在心肌细胞缺血再灌注过程中,予以终浓度 1 μmol/L 的 SEA0400 进行干预。实验结束后测定以上各组心肌细胞内 Ca^{2+} 浓度和心肌细胞活力。结果:缺血再灌注可导致心肌细胞活力降低和细胞内 Ca^{2+} 荧光强度显著升高($P<0.01$);SEA0400 能够明显增加心肌细胞活力和减轻细胞内 Ca^{2+} 荧光强度升高($P<0.01$)。结论:SEA0400 可明显减轻缺血再灌注所致心肌细胞内钙超载,维持心肌细胞活力,从而达到心肌保护的作用。

【关键词】SEA0400;Na^+/Ca^{2+} 交换蛋白;心肌细胞;缺血再灌注;心肌保护

【中国图书分类法分类号】R654.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-12-17

Protective effects of SEA0400 on ischemia-reperfusion injury in rat myocytes

WANG Fei, et al

(*Department of Emergency, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study cardioprotective effects and mechanisms of SEA0400 (2-[4-[(2,5- difluorophenyl)methoxy]-5-ethoxy aniline) on ischemia-reperfusion injury in rat myocytes. *Methods*: Rat myocyte suspension were obtained from adult rat hearts by Langendorff perfusion and enzymatic dissociation, and randomly divided into three groups including the control group, ischemia-reperfusion injury group and SEA0400 intervention group. The control group was incubated in normal condition for 60 minutes. The ischemia-reperfusion injury group underwent ischemia for 30 minutes and reperfusion for 30 minutes respectively. SEA0400 intervention group underwent the same as ischemia-reperfusion injury group in the presence of 1 μ mol/L SEA0400. MTT was applied for the measurement of the cardiomyocyte viability at the end of reperfusion period. The intracellular Ca^{2+} concentration was measured by laser scanning confocal microscope (LSCM) and expressed as fluorescence intensity of Fluo-3. *Results*: Ischemia-reperfusion resulted in the decrease of the cardiomyocyte viability and the increase of the fluorescence intensity of Fluo-3 in rat myocyte. SEA0400 could significantly increase the cardiomyocyte viability and decrease the fluorescence intensity of Fluo-3 in rat myocyte. *Conclusion*: SEA0400 could attenuate Ca^{2+} overload in cardiomyocytes and improve significantly the cardiomyocyte viability during ischemia and reperfusion periods.

【Key words】SEA0400; Na^+/Ca^{2+} exchanger; Cardiomyocytes, myocardial protection; Ischemia-reperfusion injury

缺血再灌注损伤存在于心、脑、肾等多种组织器官,是临床上缺血性心血管疾病的防治和器官移植领域亟待解决的问题。现已明确心肌细胞内钙超载是心肌缺血再灌注损伤的关键环节。Na^+/Ca^{2+} 交换蛋白(Na^+/Ca^{2+} exchanger,NCX)是缺血再灌注损伤和钙反常时 Ca^{2+} 进入细胞的主要途径,它成为人们研究细胞保护的新靶点[1]。

2001 年,Matsuda[2]报道了一种新研制的 Na^+/Ca^{2+} 交换蛋白抑制剂 SEA0400,研究表明它可以减轻不同动物心脏、脑、肾脏等器官的缺血再灌注损伤,其作用效能高、特异性高,并且几乎不抑制其它受体、通道和转运蛋白,对心脏负性作用非常小的特点[3-6]。本实验从细胞水平观察 SEA0400 对大鼠心肌细胞缺血再灌注损伤钙超载和细胞活性的影响,进一步探讨其心肌保护作用。

作者介绍:汪 飞(1978-),男,硕士,
研究方向:重症医学。

通讯作者:杨双强,男,教授,E-mail:yysqiang@163.com。

1 材料和方法

1.1 主要材料和试剂

DMSO(二甲亚砜)、MTT(噻唑兰)、Fluo-3/AM、F-127、层粘素均购自美国 Sigma 公司;SEA0400 购自美国 Merck 公司;其他试剂均为市售分析纯。Lagendorff 灌注装置为南京美易科技有限公司;LSCM(激光扫描共聚焦显微镜)为德国

Leica 公司;缺血溶液(缺糖、缺氧、pH=6.6 的 1.0 mmol/L Ca^{2+}K-H 液):NaCl 119,$NaHCO_3$ 25,KCl 5.9,$MgSO_4$ 1.2,$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 1.2,$CaCl_2$ 1.0,HEPES 12,37℃,pH=6.6,$PO_2 \leq 3.0$ kPa;再灌注溶液(含糖、含氧、pH=7.4 的 1.0 mmol/L Ca^{2+}K-H 液):NaCl 119,$NaHCO_3$ 25,KCl 5.9,$MgSO_4$ 1.2,$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 1.2,Glucose11,$CaCl_2$1.0,HEPES 12,37℃,pH=7.4。

1.2 动物分组和处理

成年 Wistar 大鼠 30 只,雌雄不拘,体重 250 ~ 300 g,购至重庆医科大学动物实验中心。30 只大鼠随机分成对照组、缺血再灌注组、SEA0400 组(n=10),分别经酶消化分解后制成左心室心肌细胞悬液备用[7,8]。心肌细胞悬液分为 3 组:(1)对照组:在 37℃的二氧化碳孵箱内用再灌注液培养 60 min,未经历缺血再灌注过程;(2)缺血再灌注损伤组:在 37℃、95%N_2+5%CO_2 混合气中用缺血液培养 30 min 后,再在 37℃的二氧化碳孵箱内用再灌注液培养 30 min,经历缺血再灌注损伤过程[5];(3)SEA0400 干预组:处理同缺血再灌注组,但事先在缺血液和再灌注液中加入终浓度为 1 μmol/LSEA0400。(实验[3,6,9]表明 1 μmol/L SEA0400 可以抑制 80% 以上的 Na^+/Ca^{2+} 交换电流,对心肌细胞上离子通道、受体和转运蛋白没有影响。)

1.3 实验检测方法

1.3.1 MTT 法检测心肌细胞活力 将实验后的各组心肌细胞悬液加入到 96 孔培养板中,加入 MTT 后 37℃下继续孵育 3 h;离心后加入 DMSO,振荡后选择 490 nm 波长,在酶联检测仪上测定各孔光吸收值(OD 值),以此结果表示心肌细胞的活力[10]。

1.3.2 心肌细胞内 Ca^{2+} 荧光强度的检测[11,12] 将酶解法分离的心肌细胞悬液进行细胞贴壁,用 Fluo-3/AM 使用液常温下避光孵育 60 min,然后用不含荧光探针的培养液洗两次,在 37℃下避光保持 30 min,以促使进入心肌细胞内的酯化探针充分水解,选取细胞膜完整,呈杆状,横纹清晰,细胞内没有空泡的心肌细胞用于实验。分别在缺血前、缺血 30 min、再灌注 30 min 时取出在激光扫描共聚焦显微镜下扫描细胞内荧光强度,激发波长 488 nm,在 525 nm 处探测到荧光发射,经软件处理换算得到细胞内平均荧光强度,以此来衡量心肌细胞内游离 Ca^{2+} 浓度。每组每次测量 4 个心肌细胞。

1.4 统计学分析

所有数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,数据采用spss11.0 统计软件进行统计学分析,采用单因素方差分析、配对 t 检验和 u 检验处理,以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 SEA0400 对心肌细胞活力的影响

经历缺血再灌注过程后,缺血再灌注损伤组和 SEA0400 组心肌细胞活力均较对照组明显减低($P<0.01$);但是 SEA0400 组细胞活力较缺血再灌注组明显增高($P<0.01$)。

2.2 SEA0400 对心肌细胞内游离 Ca^{2+}浓度的影响

实验各组在缺血前的 Ca^{2+} 荧光强度没有明显的统计学差异($P>0.05$);对照组心肌细胞内 Ca^{2+} 荧光强度在再灌注 30 min 和缺血前无明显改变($P>0.05$);缺血再灌注损伤组在再灌注 30 min 时较缺血前 Ca^{2+} 荧光强度明显升高($P<0.01$);SEA0400 组在再灌注 30 min 时较缺血前 Ca^{2+} 荧光强度明显升高($P<0.01$),在再灌注 30 min 时较缺血再灌注损伤组明显减低($P<0.01$)。

表 1 缺血/再灌注后各组大鼠心肌细胞 OD 值的比较(n=10,$\bar{x} \pm s$)

分组	OD 值
对照组	0.65 ± 0.05△
缺血再灌注组	0.21 ± 0.03△
SEA0400 组	0.48 ± 0.04△

△: 组间比较,$P<0.01$

表 2 缺血/再灌注期间各组心肌细胞内钙荧光强度(n=10,$\bar{x} \pm s$)

分组	缺血前	缺血 30 min	再灌注 30 min
对照组	226.35 ± 18.49△	-	234.72 ± 21.44▲○
缺血再灌注组	228.00 ± 20.01△	401.30 ± 41.92	1184.66 ± 147.46▲*
SEA0400 组	232.85 ± 19.06△	283.27 ± 25.55	335.74 ± 44.64▲*

△: 3 组组间比较,$P>0.05$;▲:3 组组间比较,$P<0.05$;○:与组内缺血前时间点比较,$P>0.05$;*:与组内缺血前时间点比较,$P<0.05$

3 讨 论

Na^+/Ca^{2+} 交换蛋白是存在于细胞膜上的跨膜蛋白,它是一个高容量的转运蛋白,对维持细胞内 Ca^{2+} 稳态起着重要作用,其活性的改变是重要病理生理因素;它有 2 种工作模式:钙外流模式(Na^+ 运入细胞伴随着 Ca^{2+} 运出细胞)和钙内流模式(Ca^{2+} 运入细胞伴随着 Na^+ 运出细胞),其交换比例是 3 个 Na^+ 交换 1 个 Ca^{2+},其工作模式主要与细胞膜电位及细胞内外 Na^+ 和 Ca^{2+} 浓度有关,即总的跨膜电化学势能所决定[1]。心肌缺血再灌注时,通过 Na^+/Ca^{2+} 交换蛋白进入细胞内的 Ca^{2+} 是导致钙超载最主要机制。钙超载导致线粒体功能障碍、细胞膜性成分损伤和氧自由基生成增加等,使心肌细胞发生严重损伤甚至死亡。

本研究以 Fluo-3 为指示剂,采用激光扫描共聚焦显微镜法测定细胞内游 Ca^{2+},结合 MTT 法测定心肌细胞活力的研究表明:对照组在培养的 60 min 内其 Ca^{2+} 荧光强度变化不明显($P>0.05$),说明在 60 min 内荧光探针的荧光无明显的

光褪色作用，荧光探针的荧光强度变化能有效地反映细胞内 Ca^{2+} 浓度的变化；缺血再灌注损伤组在缺血 30 min 时心肌细胞内 Ca^{2+} 荧光强度即有升高（$P<0.01$），在再灌注 30 min 时心肌细胞内 Ca^{2+} 荧光强度较缺血 30 min 时发生了显著升高（$P<0.01$），说明缺血和再灌注期间离体心肌细胞内均发生了钙超载，但是再灌注期间心肌细胞内钙超载程度更严重，同时在再灌注 30 min 时较对照组心肌细胞活力明显减弱，说明心肌细胞损伤严重，这与大量实验研究相符合。其原因可能为：在心肌缺血时，由于无氧代谢和 ATP 耗竭，酸性代谢产物增加，使细胞内 Na^+ 排出减少，细胞内 Na^+ 堆积，激活 Na^+/Ca^{2+} 交换蛋白，Ca^{2+} 进入细胞内，使细胞内钙超载；再灌注时缺血细胞重新获得氧、营养物质供应以及细胞外酸中毒的纠正，激活了 Na^+/H^+ 交换蛋白，导致 Na^+/Ca^{2+} 交换蛋白的活力进一步激活，细胞内 Na^+ 浓度进一步增加，大量的 Ca^{2+} 转运入细胞浆，进一步加重细胞钙超载[13-15]。Wang，Satoh 和 Shigematsu 等实验也证实在再灌注期间 Na^+/Ca^{2+} 交换蛋白活性被过度激活[2]。

本研究发现，SEA0400 组心肌细胞内 Ca^{2+} 荧光强度在缺血 30 min 时和再灌注 30 min 时均明显低于缺血再灌注损伤组（$P<0.01$），同时在再灌注 30 min 时心肌细胞活力明显高于缺血再灌注损伤组（$P<0.01$），说明在缺血再灌注期间给予 SEA0400 干预因素，能明显减轻心肌细胞内钙超载，特别是再灌注期间心肌细胞内 Ca^{2+} 浓度的升高，同时最大限度的保护心肌细胞活力。Matsuda，Nagano 等[2,16]研究发现 SEA0400 可以明显减轻神经细胞膜上 Na^+/Ca^{2+} 交换蛋白的 Na^+ 依赖性 Ca^{2+} 内流，降低细胞内 Ca^{2+} 浓度，同时减少氧自由基生成和神经细胞凋亡，增强神经细胞活力并减轻细胞内 DNA 降解。Motegi 等[17]研究表明在 20 min 缺血和 20 min 再灌注模型中，SEA0400 能够提高缺血后心肌收缩力的恢复。其机制可能是 SEA0400 与 Na^+/Ca^{2+} 交换蛋白相结合，减轻细胞内高 Na^+ 对 Na^+/Ca^{2+} 交换蛋白的直接激活，减轻缺血期间心肌细胞线粒体内的 Na^+ 超载、Ca^{2+} 超载，同时使氧自由基生成减少、心肌细胞内高能磷酸盐消耗减少、细胞凋亡减轻、心律失常减少等，从而达到良好的心肌保护作用[5,15,17,18]。

总之，Na^+/Ca^{2+} 交换蛋白对于维持细胞内 Na^+ 稳态和 Ca^{2+} 稳态起着极其重要的作用，Na^+/Ca^{2+} 交换蛋白抑制剂 SEA0400 能明显减轻缺血再灌注损伤大鼠心肌细胞内钙超载，提供良好的心肌保护作用。Na^+/Ca^{2+} 交换蛋白有可能成为新的心肌细胞保护靶点，SEA0400 有着良好的应用前景，其心肌保护机制还需要进一步探讨。

参 考 文 献

[1] Lee C, Dhalla N S, Hryshko L V. Therapeutic potential of novel Na^+-Ca^{2+} exchange inhibitors in attenuating ischemia-reperfusion injury[J]. Can J Cardiol, 2005, 21(6): 509-516.

[2] Matsuda T, Arakawa N, Takuma K, et al.SEA0400, a novel and selective inhibitor of the Na^+Ca^{2+} exchanger, attenuates reperfusion injury in the in vitro and in vivo cerebral ischemic models[J].J Pharmacol Exp Ther, 2001, 298(1): 249-256.

[3] Tanaka H, Nishimaru K, Aikawa T, et al. Effect of SEA0400, a novel inhibitor of sodium calcium exchanger, on myocardial ionic currents[J].Br J Pharmacol, 2002, 135(5): 1096-1100.

[4] Tanaka H, Namekata I, Takeda K, et al. Unique excitation contraction characteristics of mouse myocardium as revealed by SEA0400, a specific inhibitor of Na^+-Ca^{2+} exchanger[J].Naunyn-Schmiedeberg's Arch, Pharmacol, 2005, 371(6): 526-534.

[5] Motegi K, Tanonaka K, Takenaga Y, et al.Preservation of mitochondrial function may contribute to cardioprotective effects of Na^+/Ca^{2+} exchanger inhibitors in ischaemic/reperfused rat hearts[J]. Br J Pharmacol, 2007, 151(7): 963-978.

[6] Matsuda T, Koyama Y, Baba A.Functional proteins involved in regulation of intracellular Ca^{2+} for drug development: pharmacology of SEA0400, a specific inhibitor of the Na^+-Ca^{2+} exchanger[J]. J Pharmacol Sci, 2005, 97(3): 339-343.

[7] Gudrun A, Kanigula M, Ines N, et al. Mechanisms underlying the frequency dependence of contraction and $[Ca^{2+}]$I transients in mouse ventricular myocytes[J].Journal of Physiology, 2002, 543(3): 889-898.

[8] 许秀芳，李温斌，陈宝田，等.成年大鼠心肌细胞培养方法的建立和形态学观察[J].首都医科大学学报，2001，21(2)：104-107.

[9] Farkas A S, Acsai K, Nagy N, et al. Na^+/Ca^{2+} exchanger inhibition exerts a positive inotropic effect in the rat heart, but fails to influence the contractility of the rabbit heart[J]. Br J Pharmacol, 2008, 154(1): 93-104.

[10] 杨吉成，宋礼华，周建华，等.医用细胞工程[M].上海：上海交通大学出版社，2003.129.

[11] Ladilov Y S, Haffner C, Balser-schafer H, et al. Cardioprotective effects of KB-R7943: a novel inhibitor of the reverse mode of Na^+/Ca^{2+} exchanger[J].Am J Physiol, 1999, 276: H1868-H1876.

[12] 袁 兰.激光扫描共聚焦显微镜技术教程[M].北京：北京大学医学出版社，2004.

[13] Goldhaber J I. Free radicals enhance Na^+/Ca^{2+} exchange in ventricular myocytes[J]. Am J Physiol, 1996, 271: H823-H833.

[14] Munekazu S, Takahiro I.Cardiac Na^+-Ca^{2+} Exchange Molecular and Pharmacological Aspects[J].Circ Res, 2001, 88: 864-876.

[15] Griffiths E J. Mitochondrial calcium transport in the heart: physiological and pathological roles[J].J Mol Cell Cardiol., 2009, 46(6): 789-803.

[16] Nagano T, Osakada M, Ago Y.SEA0400, a specific inhibitor of the Na^+/Ca^{2+} exchanger, attenuates sodium nitroprusside-induced apoptosis in cultured rat microglia[J].British Journal of Pharmacology, 2005, 144(5): 669-679.

[17] Motegi K, Tanonaka K, Takenaga Y, et al. Preservation of mitochondrial function may contribute to cardioprotective effects of Na^+/Ca^{2+} exchanger inhibitors in ischaemic/reperfused rat hearts[J]. British Journal of Pharmacology, 2007, 151(7): 963-978.

[18] Anumonwo J.Antiarrhythmic benefits of targeting the Na^+/Ca^{2+} exchanger[J].Heart Rhythm, 2008, 5(10): 1453-1454.

（责任编辑：冉明会）