重庆维普 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)09-1076-04

TTX 停搏液对心肌 α 肌动蛋白的影响及机制研究

尧 林,杨双强,曹建光

(重庆医科大学附属第一医院胸心外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究 Na^+ 通道阻滞剂河豚毒素(Tetrodotoxin,TTX)停搏液对离体大鼠心肌 α 肌动蛋白(α-actin)的影响及其机制。方法:20 只 Wistar 大鼠随机均分入 St.Thomas-2 停博组(STH-2 组),TTX 停博组(TTX 组),建立离体心脏 Langendorff 和 Neely 灌注模型,搏动稳定后,灌注 30min 后停搏 60min,再灌注 60min,观察各组心脏停搏前后的心率(HR)、冠状动脉流量(CAF)、左心室收缩末期压力(LVESP)和压力变化速率(±dp/dt)的恢复率,采用免疫组化检测钙蛋白酶(Calpain),免疫组化和 Western blot 检测 α-actin 的分布及量的变化。结果:恢复灌注后,TTX 停搏组的各项心功能恢复率明显优于 STH-2 组($P<0.01$,$P<0.05$),STH-2 组的 calpain 分布紊乱,表达量明显增多($P<0.01$);α-actin 分布紊乱,表达量明显减少($P<0.01$)。结论:以 TTX 阻断 Na^+ 通道为特点的心脏停搏液对大鼠心肌缺血-再灌注损伤(Myocardial ischemia/reperfusion injury,MIRI)时的 α-actin 及心功能的保护作用优于 STH-2 停搏液,其机制可能是直接或者间接的减少激活 calpain 引起的。

【关键词】TTX 停搏液;α 肌动蛋白;钙蛋白酶;心肌保护

【中国图书分类法分类号】R654.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-11-19

Effects of cardioplegia with tetrodotoxin(TTX) on myocardial α-actin and its and mechanism

YAO Lin,et al

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

【Abstract】***Objective***:To investigate the effects of cardioplegia with Na^+ channel inhibitor tetrodotoxin(TTX)on myocardial α-actin of isolated rat hearts and its and mechanism. ***Methods***:Langendorff and Neely perfusion models were steadily established,then the rat hearts(10 hearts in each group)were arrested by cardioplegia(St. Thomas No. 2 solution,STH-2) in group STH-2,and by cardioplegia (TTX)in group TTX respectively after perfusion for 30 minutes. These arrested hearts were remained for 60 minutes and then underwent reperfusion for 60 minutes. Pre-ischemia and post-ischemia hemodynamic parameters of the rat hearts (HR,CAF,LVESP and recovery rate of pressure change speed)were studied and changes of calpain was detected by immunohistochemistry and myocardial α-actin by Western blot and immunohistochemistry. ***Results***:There was no differences between two groups before myocardial ischemia. But the recovery of myocardial hemodynamic parameters during reperfusoin in group TTX was better than that in group STH-2($P<0.01$ or $P<0.05$). Distribution of calpain was disordered and the expression increased($P<0.01$),and distribution of α-actin was disordered,but the expression decreased significantly($P<0.01$)in group STH-2. ***Conclusion***:The protective effects of cardioplegia with Na^+ channel inhibitor TTX on myocardial α-actin and myocardial hemodynamic parameters were better than those in group STH-2 during myocardial ischemia/reperfusion injuries (MIRI)on isolated rat hearts. Mechanism of protection effects was caused probably by activating calpain directly or indirectly.

【Key words】 TTX cardioplegia; α-Actin; Calpain; Myocardial protection

以 St. Thomas-2 液为代表的高钾心脏停搏是心外科应用最广泛的心肌保护方法。近年来,发现 STH-2 液停搏后心肌电压门控 Na^+ 通道开放可以造成细胞内 Na^+ 超载,进而引发 Ca^+ 超载,导致 MIRI。本实验以 STH-2 停搏液为对照,旨在观察以 TTX阻断 Na^+ 通道为特点的心脏停搏液在 MIRI 中对 α-actin、calpain 及心功能的影响,并探讨其机制。

作者介绍:尧 林(1981-),男,硕士,研究方向:心肌保护。

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

1 材料与方法

1.1 实验动物和分组

重庆维普 http://www.cqvip.com

成年 Wistar 大鼠 20 只，雌雄不拘，体重 200～250g(由第三军医大学大坪医院实验动物中心提供)，随机分为两组，STH-2 组和 TTX 组，每组各 10 只。STH-2 组：用 STH-2 停搏液停搏；TTX 组：用 TTX 停搏液[质量浓度为 20μmol/L 的 TTX 加入 K-H 缓冲液(Krebs-Henseleit buffer)]停搏。

1.2 试剂、灌注液成分

TTX 购自泰州市康特生物工程公司，α-actin、calpain 及免疫组化试剂盒购自武汉博士德公司，过氧化物酶标记的二抗购自北京中杉公司，其他的 Western blot 相关产品购自江苏碧云天公司。K-H 液成分(mmol/L)：NaCl 119，$NaHCO_3$ 25，KCl 4.75，$MgSO_4$ 1.2，KH_2PO_4 1.18，$CaCl_2$ 1.4，Glucose 11，95%O_2+5%CO_2 混合气持续氧合，维持 pH78；STH-2 心脏停搏液成分(mmol/L)：NaCl 110，KCl 16，$Mgcl_2$ 16，$CaCl_2$ 2.0，Glucose 11，维持 pH7.8。

1.3 实验模型的建立

腹腔注射肝素盐水 200U，20min 后脱颈处死大鼠，迅速取下心脏，建立离体鼠心 Langendorff 和 Neely 灌注模型，用 37℃，95%O_2+5%CO_2 混合气持续氧合的 K-H 液经主动脉根部逆行灌注，压力 60mmHg(1kPa=7.5mmHg)，稳定 15min，左心房插管，左心室置入测压管，灌注液转流，转为工作心脏灌注模型，灌注压 15mmHg，后负荷 52～60mmHg，稳定 5min，测定 HR、CAF、LVESP、±dp/dtmax，工作 15min 后，主动脉根部按 2ml/100g 体重注入 4℃心脏停搏液使心脏停搏，并观察心脏停搏时间，停搏 30min 后再经主动脉根部按 2ml/100g 体重注入心脏停搏液停搏，停搏过程中同时给予 4℃盐水纱布冷敷，停搏 60min 后给予 37℃，95%O_2+5%CO_2 混合气持续氧合的 K-H 液经主动脉根部逆行复灌，观察心脏复搏时间，15min后转为工作心脏灌注模型，共复灌 60min，并在工作心脏灌注稳定后 40min 测定各项心功能指标，20min 后停止实验，取部分左心室肌 50mg，-80℃保存，用于心肌 α-actin 及 calpain 的检测。

1.4 心肌 α-actin 及 calpain 的免疫组化检测

取 3mm^3 大小心肌组织行石蜡切片，SABC 法行免疫组化染色，染色步骤完全按照说明书进行，光学显微镜观察 α-actin 及 calpain 的分布情况并采集图像，采用 image-pro plus 6.0图像分析系统进行半定量检测，用平均光密度(A)值表示α-actin 及 calpain 的表达量。

1.5 心肌 α-actin 的 Western blot 检测

取 50mg 心肌组织，提取总蛋白，BCA 法定量，蛋白电泳分离、转膜、抗原抗体反应及 ECL 显色，整个过程完全按照说明书进行，采用 quantity one 图像分析系统采集图像并行半定量分析。

1.6 统计学处理

血流动力学参数测定采用多功能生理记录仪(ADInstruments/8sP，Australia)，Chart 4 图形、数据处理软件进行信号采集和统计。数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，组间比较用两独立样本的 t 检验，用 SPSS12 软件进行统计学分析。

2 结 果

2.1 停搏时间和复搏时间

与 STH-2 组比较，TTX 组的停搏时间和复搏时间均明显缩短，差异有显著性(停搏时间 $P<0.01$，复搏时间 $P<0.05$)(表 1)。

表 1 两组停搏时间和复搏时间($n=10,\bar{x}\pm s$)

分组	停搏时间	复搏时间
STH-2 组	9.49±0.49	10.88±0.61
TTX 组	8.55±0.68	10.12±0.66

2.2 心功能比较

心脏停搏前，两组的血流动力学各项指标差别无显著性意义($P>0.05$)，心脏复搏后 40min，TTX 组各项指标的恢复率明显优于 STH-2 组，差异有显著性(HR，CAF，LVESPD $P<0.01$；+dp/dtmax，-dp/dtmax $P<0.05$)(表 2)。

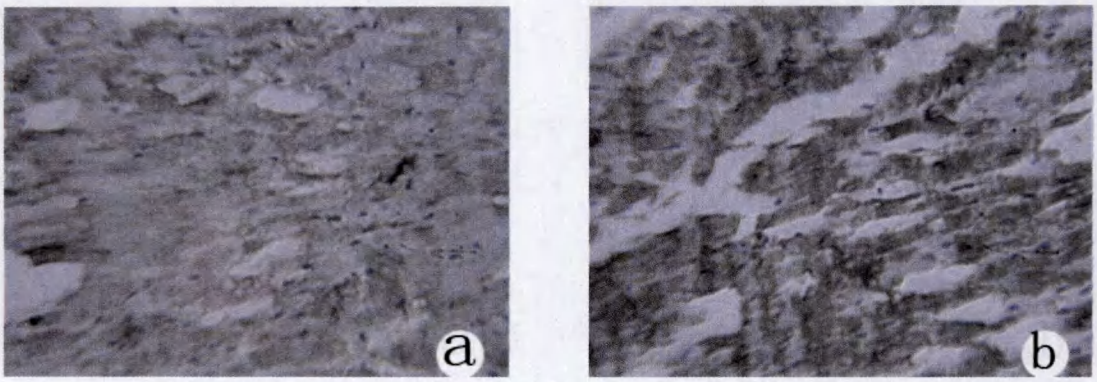
2.3 心肌组织中 α-actin 及 calpain 的改变

免疫组化显示 STH-2 组心肌组织中 α-actin 及 calpain 分布紊乱，α-actin 表达量较 TTX 组明显减少而 calpain 的表达量较 TTX 组明显增多(图 1、2)；进行半定量分析显示 TTX 组心肌组织中 α-actin 表达量明显增加，calpain 的表达量明显减少，差别有显著性($P<0.01$)(表 3)；进一步用 Western blot 对其

表 2 心脏停搏前后两组心功能比较($n=10,\bar{x}\pm s$)

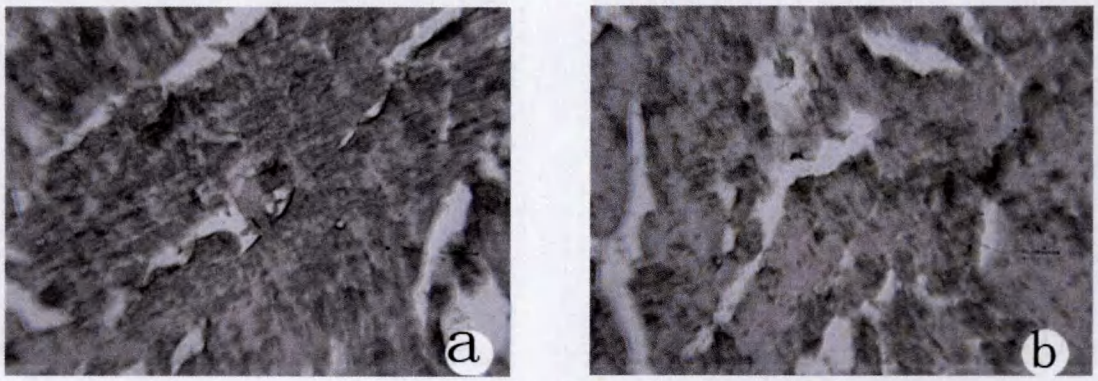
指标	TTX 组			STH-2 组		
	停搏前	停搏后	恢复率(%)	停搏前	停搏后	恢复率(%)
HR(次/min)	256.7±5.1	219.9±7.8	85.65	256±5.4	198.8±5.7	77.66
CAF(ml/min)	15.5±0.6	14.2±0.6	91.81	15.5±0.5	13.7±0.5	88.28
LVESP(mmHg)	95.6±0.6	81.3±0.6	85.03	95.5±0.7	78.5±0.6	82.24
+dp/dtmax(mmHg/s)	196.1±4.7	183.5±4.7	93.59	195.5±4.7	176.3±3.5	90.25
-dp/dtmax(mmHg/s)	166.1±4.7	154.2±3.9	92.87	165.2±4.6	145.8±4.2	88.36

重庆维普 http://www.cqvip.com



a. STH-2 组；b. TTX 组

图 1　两组心肌组织 α-actin 免疫组化染色(×400)



a. STH-2 组；b. TTX 组

图 2　两组心肌组织 calpain 免疫组化染色(×400)

表 3　两组心肌组织中 α-actin 及 calpain 表达量(n=10, $\bar{x} \pm s$)

组别	α-actin		calpain
	免疫组化	Western blot	免疫组化
STH-2 组	0.030 47 ± 0.000 17	347.0 ± 7.5	0.145 92 ± 0.000 03
TTX 组	0.073 75 ± 0.000 49	864.8 ± 6.5	0.071 56 ± 0.000 05

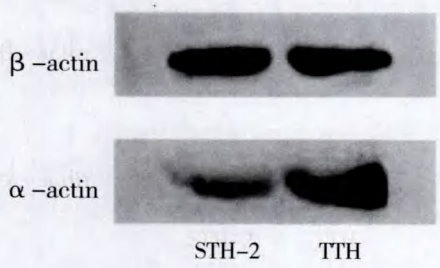


图 3　两组心肌组织 α-actin 的表达情况(Western blot)

进行半定量显示 STH-2 组 α-actin 表达量明显减少，差异有显著性(P<0.01)(图 3、表 3)。

3　讨　论

肌动蛋白的单体为球形分子，称为球形肌动蛋白(Globular actin，G-actin)，分子量为 42 000，它的多聚体称为纤维形肌动蛋白(Fibrous actin，F-actin)。根据等电点的不同可将肌动蛋白分为 3 类，α 分布于各种肌肉细胞中，β 和 γ 主要分布于非肌细胞中。α-actin 是心肌细胞最主要的收缩蛋白之一，是心脏进行收缩的基础。还可能与细胞分裂沟的产生，细胞内的信号传递，作为蛋白质合成的支架成分之一等有关。为此我们设计了该实验。

膜片嵌实验证实缺血缺氧时心肌细胞的持续钠离子内流显著增加。TTX 通过阻断持续的钠离子流对心肌产生保护作用[1]。TTX 停搏液的主要成分TTX 阻断 Na^+ 通道作用直接且过程可逆[2]，因此 TTX 对 Na^+ 通道阻断更迅速，再灌注后 Na^+ 通道功能恢复更快，停搏和复搏时间均明显短于 STH-2 组，同时也减少了能量的消耗。心肌缺血时能量代谢发生障碍，TTX

重庆维普 http://www.cqvip.com

停搏液能迅速阻断 Na^+ 通道，停搏后细胞内外离子浓度接近静息时的水平，从而使维持细胞离子内稳态的离子泵耗能降到最低限度，节省能量物质。我们研究组的前期研究已证明 TTX 极化停博可明显减少心肌能量消耗[3]。在适宜的温度、K^+、Mg^{2+} 浓度，存在 ATP 的条件下，G-actin 可自组装为 F-actin。伴随着 ATP 水解，α-actin 的稳定性随之降低；离子泵转运功能障碍，Ca^+ 进入细胞激活 Ca^+ 依赖性蛋白酶，再灌注时，经一系列反应产生大量的超氧阴离子和过氧化氢；同时 ATP 减少使 Ca^+ 进入线粒体增多，使线粒体功能受损，使氧自由基生成增多，清除减少，最终导致心肌损伤。Powell SR 等[4]报道了缺血后收缩功能的失调是由于收缩蛋白氧化。TTX 能选择性阻断失活缓慢的 Na^+ 电流，衰减 Na^+ 窗口电流，减轻 Na^+ 超载和 Ca^+ 超载，从而避免了对线粒体的损伤，增加了能量的供应；减轻了对自由基生成的促进作用；避免了对各种酶类的激活，其中由 Ca^+ 超载引起的 Calpain 激活可能具有重要作用[5]，从而保护心肌。

Calpain 是一组依赖钙离子激活的中性半胱氨酸蛋白酶同工酶，主要分布在细胞浆和细胞膜。正常情况下，calpain 以无活性的酶原形式存在于心肌细胞内。当细胞内游离 Ca^{2+} 浓度由于缺血再灌注后钙超载而升高达到 calpain 激活所需要的阈值时，calpain 便发生自溶激活[6]。通过一系列细胞内信号转导途径，或者直接作用于其底物蛋白，促使心肌细胞收缩蛋白等降解从而破坏细胞结构，改变细胞功能，造成细胞损伤甚至死亡。很多研究证实了心肌细胞缺血再灌注引起细胞内游离钙离子浓度升高以后，calpain 表达活性显著增加[7]，其是心肌细胞缺血再灌注后钙超载引起最终细胞结构破坏，功能障碍的中间环节[5,8]。本研究显示 TTX 组 calpain 表达量显著减少，提示 TTX 停搏液对 α-actin 的保护作用可能主要是通过减少 calpain 的激活实现的。但是减少 calpain激活的具体途径及是否与其抑制剂 calpain 抑制蛋白(Calpastatin，CAPT)有关等尚需进一步研究。

由于能量消耗的减少，calpain 活性的降低和自由基损伤作用的减轻，各种离子泵也保持较高活性，利于再灌注后离子平衡功能的迅速恢复，因而有效减轻了 MIRI。

参 考 文 献

[1] Saint DA. The role of the persistent Na(+) current during cardiac ischemia and hypoxia[J]. J Cardiovasc Electrophysiol,2006;17(1):S96-S103.

[2] 贾宏钧，王钟林，杨期东.离子通道与心脑血管疾病－基础与临床[M]. 第 1 版.北京：人民卫生出版社，2001.113-118.

[3] 谭松涛，杨双强，杨朝坤.Na^+ 通道阻滞极化停搏液在离体大鼠心脏保存中的保护作用[J]. 第一军医大学学报，2005；25(10)：1283-1285，1289.

[4] Powell SR，Gurzenda EM，Wahezi SE. Actin is oxidized during myocardial ischemia[J]. Free Radic Biol Med，2001；30(10)：1171-1176.

[5] Mazzanti NM.Cytoskeleton control of rectification and expression of four substates in cardiac ineard rectifier K^+ channels[J]. FASEB. J，1996；10(2)：357-361.

[6] Kim MJ，Oh SJ，Park SH，et al. Hypoxia-induced cell death of HepG2 cells involves a necrotic cell death mediated by calpain[J]. Apoptosis，2007；12(4)：707-718.

[7] Post JA，Verkleij AJ，Langer GA. Organization and function of sarcolemmal phospholipids in control and ischemic/eperfused cardio myocytes[J]. J Mol Cell Cardiol，1995；27(2)：749-760.

[8] Maltsev VA，Undrovinas AI.Cytoskeleton modulates coupling between availability and activation of cardiac sodium channel[J]. Am J Physiol，1997；273(4 Pt 2)：H1832-1840.

(责任编辑：谭乐勤)

作者署名须知

作者署名不宜过多，一般不超过 6 人。文章中每位作者应该是论文学术内容的构思者或设计者；实验数据的采集并能给予解释者；能对杂志提出的审改意见进行修改者；能在学术界就论文内容进行答辩者。对论文有贡献的其他人可写在脚注或致谢项中。综述作者不超过 2 人。作者单位、邮政编码不同者应分别列出并予标识。为便于全国科技论文统计时能准确、及时、全面地收录我刊科技论文情况和提高论文分析质量，请投稿时注明第一作者的和科室、出生年、性别、学历、学位、职称、职务和研究成果。

(本刊杂志社)