DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.23.009
第26卷第23期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 23
2004年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2004

文章编号:1000-5404(2004)23-2105-03

论著

甘氨酸对SD乳鼠心肌细胞缺氧损伤的保护作用

周军利,黄跃生,党永明 (第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨甘氨酸对缺氧心肌细胞的保护作用。方法 台盼蓝排斥实验检测细胞的存活率;生化分析仪检测培养液中心肌细胞乳酸脱氢酶(LDH)的释放量;激光共聚焦显微镜技术检测缺氧后心肌细胞内游离钙的变化。结果 甘氨酸可以明显提高缺氧后心肌细胞的存活率;减少缺氧后心肌细胞LDH的释放且作用随其浓度的升高而增强;减轻缺氧后心肌细胞的钙超载。结论 甘氨酸提高缺氧后心肌细胞的存活率,减少LDH释放,减轻钙超载,对心肌细胞有保护作用。

关键词:甘氨酸;乳酸脱氢酶;钙离子;激光共聚焦显微镜
中图法分类号:R322.11;R364.4;R977.4 文献标识码:A

Protective effect of glycine on hypoxic injury to murine cardiomyocytes

ZHOU Jun-li, HUANG Yue-sheng, DANG Yong-ming (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the protective effect of glycine (Gly) on hypoxic injury to murine cardiomyocytes and the mechanisms. **Methods** The survival rate of cardiomyocyte survival was detected by trypan blue exclusion and lactate dehydrogenase (LDH) with an ultraviolet spectrophotometer. Ca^{2+} changes in the cardiomyocytes were detected by laser confocal microscopy. **Results** Glycine markedly improved the survival rate of cardiomyocytes and decreased the release of LDH in cardiomyocytes after hypoxia. The protective effect was in a dose-dependent manner. Glycine could also block calcium overload after hypoxia. **Conclusion** Glycine has the protective effect on cardiomyocytes through the improvement of survival rate, decrease of LDH release, and blockage of calcium overload after hypoxia.

Key words: glycine; cardiomyocyte; calcium ion; laser confocal microscopy

有证据表明游离的甘氨酸具有显著的细胞保护作用,可以明显改善由内毒素血症所致的血清转氨酶的升高、肝脏和肺的损伤,降低了大鼠的死亡率[1]。同时也有资料表明甘氨酸可以明显减轻缺血、再灌注所致的骨骼肌损伤,减轻肌肉的水肿和减少肌肉的坏死,保存了骨骼肌的能量储备(ATP、磷酸肌酸含量明显升高)[2]。然而甘氨酸对烧伤后心肌细胞是否具有保护作用尚少见报道,本研究在此基础上研究心肌细胞在缺氧条件下甘氨酸对它的保护作用及其可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料来源

出生1~2 d SD乳鼠32只(由第三军医大学实验动物中心提供)。Fluo-4-AM、F-127(美国Molecular Probes)、LDH(南京建成)、DU-7紫外分光光度计(美国Beckman)、激光共聚焦显微镜(美国Leica TCS-NT)。

1.2 实验分组

心肌细胞存活率检测分为正常组、正常+甘氨酸组、缺氧组、甘氨酸+缺氧组;LDH实验分为单纯缺氧组,0.1、0.5、1.0 mmol/L甘氨酸处理组,缺氧1、3、6、12、24 h取上清,用紫外分光光度计检测其D_{440}值;钙离子测定分为正常组、正常+1.0 mmol/L甘氨酸处理组、单纯缺氧组、缺氧+1.0 mmol/L甘氨酸处理组4组。

1.3 实验方法

1.3.1 心肌细胞原代分离与培养 按文献[3]方法,取出生1~2 d的SD乳鼠32只,无菌条件下取出乳鼠心脏,去除心房后剪碎心室组织,并用0.125%胰蛋白酶消化成单细胞悬液。

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973项目")(G199054202);国家杰出青年科学基金资助项目(30125040);国家自然科学基金资助项目(30430680);创伤烧伤与复合伤国家重点实验室开放课题基金资助项目
National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects) (G199054202), the Supported by the National Natural Science Foundation of China (30125040), and the Open Research Fund for State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury
作者简介:周军利(1971—),男,陕西省绥德县人,硕士研究生,主治医师,主要从事烧伤早期脏器损害方面的研究。电话:(023)66979616
通信作者:黄跃生,电话:(023)68754173,E-mail:yshuang@public.cta.cq.cn
收稿日期:2004-09-10;修回日期:2004-11-16

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

细胞经离心、洗涤后加入含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基中，37 ℃、体积分数 5% CO_2 孵育 1 h。去除间质细胞将未贴壁的心肌细胞按 1× 10^6/ml 接种于 6 孔培养板中，24 h 后换液 1 次。此后每隔 2 d 换液，培养 4 d 加干预因素。加干预因素时将培养液换为 RPMI 1640(不含甘氨酸)。

1.3.2 细胞的模拟缺氧培养模型 缺氧依靠在密闭容器中充入预先配制好的混合气体进行，密闭容器作为缺氧培养装置。混合气体配方为：95% N_2、5% CO_2，由重庆朝阳气体有限公司配制。将混合气体以 10 L/min 流量充入密闭容器，持续 10 min，同时关闭进气口和出气口，容器内氧终浓度为 1%。

1.3.3 台盼蓝排斥法检测心肌细胞存活率 细胞损伤或死亡时，某些染料可穿透变性的细胞膜，与解体的 DNA 结合，使其着色，而活细胞能阻止这类染料进入细胞内，借此可以鉴别死细胞与活细胞。镜下观察，死细胞被染成淡蓝色，而活细胞拒染。细胞存活率(%)=[蓝染细胞/(蓝染细胞+未蓝染细胞)]×100%。

1.3.4 培养液中 LDH 测定 施加刺激因素后收集培养上清，按南京建成检测试剂盒说明书加下列样品：丙酮酸、标准品(样品)、双蒸水、基质缓冲液辅酶Ⅰ溶液，混匀，37 ℃水浴 15 min，再加入 2、4-二硝基苯肼溶液，混匀，37 ℃水浴 15 min，最后加入 0.4 ml 氢氧化钠溶液，混匀，室温放置 3 min，440 nm，蒸馏水调零，测各管吸光度。LDH 活力=(测定管−测定空白管)/(标准管−标准空白管)×2 000(U/L)。

1.3.5 心肌细胞游离钙的测定 按文献[4]方法，Fluo-4/AM(终浓度为 2 μmol/L)，37 ℃孵育 30 min。在激光共聚焦显微镜下连续动态扫描细胞内荧光强度变化，与钙离子结合的 Fluo-4 在波长 488 nm 处激发，发射波长 510 nm，采样频率为 488 Hz，共聚焦系统在 Physiology software 软件控制下，每皿选 4～5 个视野，取 20 个细胞计算其荧光强度，并取其均值，以平均荧光强度变化反映内游离钙浓度的相对水平。

1.4 统计学处理

所有数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用 SPSS10.0 统计学软件进行单因素方差分析 t 检验。

2 结果

2.1 心肌细胞存活率

有证据表明，在烧伤后 6 h 心肌就已经发生明显的损伤，包括心功能的降低以及心肌细胞的凋亡[5]。本实验取伤后 6 h 观察心肌细胞存活率的变化。未经处理的正常心肌细胞存活率为(92.85±2.22)%，正常+1.0 mmol/L 甘氨酸组细胞存活率为(93.85±2.07)%，两组间无显著性差异($P>0.05$)；缺氧 6 h 后其存活率为(37.47±4.74)%，甘氨酸处理后心肌细胞存活率为(68.26±5.77)%，较缺氧组增高($P<0.01$)。

2.2 心肌细胞 LDH 的释放量

见表 1，缺氧 1、3、6、12、24 h 后心肌细胞损伤逐渐加重，即其释放的 LDH 逐渐增高。而甘氨酸明显具有保护作用，在缺氧后 1 h 开始 0.5 mmol/L 和 1 mmol/L 甘氨酸就明显的减少了 LDH 的释放($P<0.01$)；在 3 种不同浓度的甘氨酸处理后，缺氧心肌细胞释放 LDH 明显减少；并且甘氨酸浓度越高，心肌细胞释放 LDH 越少，即呈现浓度依赖性。

表 1 不同浓度的甘氨酸对心肌细胞 LDH 的影响 [$n=4$，$(\bar{x}\pm s)$U/L]

Tab 1 Effects of different concentrations of glycine on changes of LDH activity in cardiomyocytes [$n=4$ $(\bar{x}\pm s)$U/L]

Group	Anoxic time (LDH) (h)				
	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h
Control	358.52±14.91	813.68±16.81	1 564.05±40.52	1 928.55±17.41	2 680.37±14.68
Gly0.1	253.66±16.28	649.57±7.80	1 169.42±28.10 *	1 521.65±59.19	2 385.19±12.28 **
Gly0.5	173.08±8.12 **	523.93±14.87 **	885.67±8.34 **	1 193.31±35.22 **	2 006.67±11.44 **
Gly1	117.21±8.59 **	440.60±5.10 **	716.60±18.39 **	789.06±24.90 **	1 667.04±8.67 **

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，*vs* control

2.3 心肌细胞游离钙的测定

正常心肌细胞钙离子荧光探针 Fluo-4 的平均荧光强度 26.84±8.26(图 1)；正常+甘氨酸组心肌细胞 Fluo-4 平均荧光强度为 26.24±7.52(图 2)，两组间无显著性差异($P>0.05$)。心肌细胞缺氧 6 h 后，Fluo-4 平均荧光强度为 139.60±28.83(图 3)；缺氧组加入 1 mmol/L Gly 后钙离子平均荧光强度为 72.40±52.15(图 4)。缺氧组与正常组相比，具有显著性差异($P<0.01$)；甘氨酸处理组与缺氧组相比，具有显著性差异($P<0.01$)。故缺氧后心肌细胞发生明显的钙超载，而加入 1 mmol/L 甘氨酸后心肌细胞钙超载明显减轻。

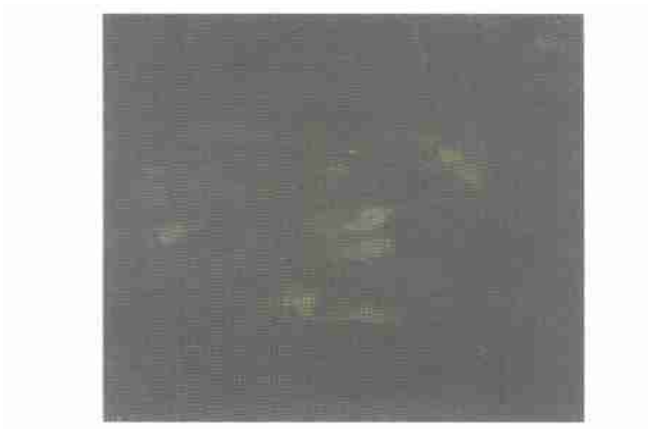


图 1 正常心肌细胞钙离子变化 (荧光探针×400)

Fig 1 Changes of Ca^{2+} in normal cardiomyocytes (Fluo-4×400)



图 2 甘氨酸对正常心肌细胞钙离子的影响 (荧光探针×400)

Fig 2 Effects of glycine on Ca^{2+} of normal cardiomyocytes (Fluo-4×400)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



图 3　缺氧对心肌细胞钙离子的影响　(荧光探针× 400)

Fig 3　Effects of hypoxia on Ca^{2+} of cardiomyocytes　(Fluo-4 × 400)

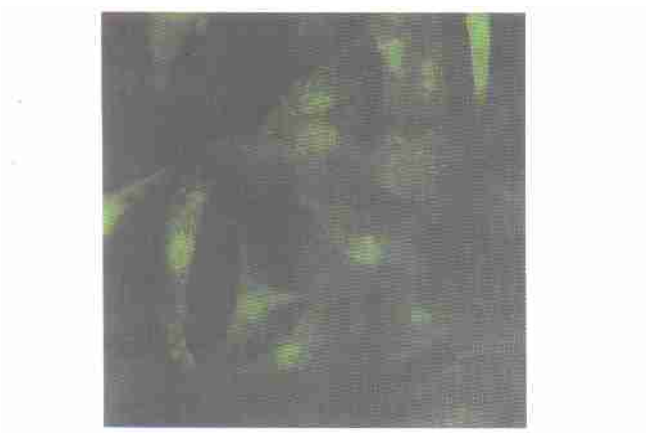


图 4　甘氨酸对缺氧心肌细胞钙离子的影响　(荧光探针× 400)

Fig 4　Effects of glycine on Ca^{2+} of cardiomyocytes after hypoxia

(Fluo-4 × 400)

3　讨论

研究表明烧伤早期就存在心肌缺血缺氧损害, 严重烧伤后很早即发生心肌损害, 由干心脏的特殊重要性, 其损害不仅可引起心功能不全, 还可诱发或加重休克, 导致或加重全身其他组织器官的缺血缺氧损害和炎症反应, 这一现象被称为"休克心"[6]。因而在烧伤早期实施有效的心肌保护措施是治疗成功的关键。

甘氨酸是化学结构最简单的天然氨基酸, 也是人体内的一种非必需氨基酸。它除了参与蛋白质代谢基本功能外, 已被证明是中枢神经系统中惟一一种抑制性神经递质, 通过激活突触后膜上的甘氨酸受体来发挥作用[7]。近来的研究表明, 游离的甘氨酸具有显著的细胞保护作用。甘氨酸对 Kuffer 细胞、中性粒细胞、血管内皮细胞、精子细胞、肝实质细胞等都具有保护作用, 其保护作用主要体现在对抗缺氧、缺血再灌注损伤、LPS 攻击形成的二次打击和脓毒症等损伤方面[8]。甘氨酸对缺血心肌有明显的保护作用, 降低了心肌组织脂质过氧化物 MDA 的产生, 超氧化物歧化酶 SOD 明显增加, 同时也改善了心肌的缺血[9]。

本实验台盼蓝排斥法检测心肌细胞存活率中证实, 甘氨酸对正常心肌细胞无损害, 但明显降低缺氧 6 h 后心肌细胞的死亡率; 同时证实缺氧 6 h 后部分心肌细胞已经发生不可逆性损伤。心肌细胞缺氧后释放 LDH 明显增加, 说明心肌细胞受到了不同程度的损伤, 并且随缺氧时间的延长其损伤逐渐加重; 而加入甘氨酸后, 其各个时相点释放 LDH 都明显减少, 而说明甘氨酸具有显著的保护作用; 并且其保护作用与甘氨酸的浓度呈依赖性。

心肌细胞内钙离子的增加会导致钙超载, 损伤细胞膜, 激活磷脂酶, 促进膜磷脂的降解, 损伤心肌细胞[10]。本研究运用激光共聚焦技术结合钙离子荧光染料 Fluo-4AM 显示细胞内游离钙, 对甘氨酸在心肌细胞的钙离子调节中作用进行了初步研究。根据本研究的实验结果表明, 缺氧后心肌细胞发生明显的钙超载, 加入甘氨酸后钙超载明显减轻。

本实验结果表明, 甘氨酸对心肌细胞有明显的保护作用, 提高了缺氧后心肌细胞的存活率, 减少了 LDH 的释放, 减轻了心肌细胞的钙超载, 从而发挥了它的保护作用。然而其具体的作用机制还有待进一步探讨。

参考文献:

[1] Qu W, Ikejima K, Zhong Z, *et al*. Glycine blocks the increase in intracellular free Ca^{2+} due to vasoactive mediators in hepatic parenchymal cells[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002, 283(6): G1249－G1256.

[2] Ascher E, Hanson J N, Cheng W, *et al*. Glycine preserves function and decreases necrosis in skeletal muscle undergoing ischemia and reperfusion injury[J]. Surgery, 2001, 129(2): 231－235.

[3] Chlopcikova S, Psotova J, Miketova P. Neonatal rat cardiomyocytes- a model for the study of morphological, biochemical and electrophysiological characteristics of the heart[J]. Biomed Pap Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2001, 145(2): 49－55.

[4] Pratusevich V R, Balke C W. Factors shaping the confocal image of the calcium spark in cardiac muscle cells[J]. Biophys J, 1996, 71(6): 2942－2957.

[5] 张家平, 黄跃生, 周　新, 等. 黄跃生严重烫伤大鼠心肌细胞凋亡与心功能损害的关系[J]. 中华烧伤杂志, 2002, 18(5): 272－275.

[6] 黄跃生. 烧伤后"休克心"与早期损害[J]. 中国医师杂志, 2002, 4(2): 120－121.

[7] Wheeler M, Stachlewitz R F, Yamashina S, *et al*. Glycine-gated chloride channels in neutrophils attenuate calcium influx and superoxide production [J]. FASEB J, 2000, 14(3): 476－484.

[8] Zhong Z, Wheeler M D, Li X, *et al*. L-Glycine: a novel antiinflammatory, immunomodulatory, and cytoprotective agent[J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2003, 6(2): 229－240.

[9] 周　琼, 陆大祥, 付咏梅, 等. 甘氨酸对小鼠心肌缺血性损伤的防治作用研究[J]. 中国病理生理杂志, 2002, 18(4): 360－362.

[10] 黄跃生. 烧伤早期脏器损害防治的研究进展[J]. 中华烧伤杂志, 2003, 19(5): 257－260.

(编辑　刘洪娥)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net