DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.15.005
第25卷第15期 第三军医大学学报 Vol.25, No.15
1322 2003年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 200

论著

文章编号:1000-5404(2003)15-1322-04

心肌缺血再灌注损伤时细胞核被膜钙泵活性特征的研究

张乐之,付爱玲,何华美 (第三军医大学基础医学部药理学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 研究心肌缺血再灌注损伤时 Ca^{2+}、ATP、ADP和AMP对细胞核被膜钙泵(Ca^{2+}-ATPase)活性的调节。方法 采用大鼠心肌缺血再灌注模型,密度梯度分离纯化细胞核,定磷法测定 Ca^{2+}-ATPase活性。结果 与正常大鼠相比,缺血再灌注损伤动物血浆MDA和FFA显著升高($P<0.01$);细胞核 Ca^{2+}-ATPase活性下降,对 Ca^{2+} 亲和力降低;ADP、AMP对核 Ca^{2+}-ATPase活性的影响明显减弱;ATP对 Ca^{2+}-ATPase的作用在[ATP]小于1.0 mmol/L时,与正常细胞 Ca^{2+}-ATPase活性无显著差异,浓度增至2.0 mmol/L时,活性低于正常细胞,ATP浓度继续增加,核 Ca^{2+}-ATPase活性快速增加。结论 心肌缺血再灌注损伤时 Ca^{2+}、ATP、ADP、AMP对心肌细胞核 Ca^{2+}-ATPase活性的影响发生了明显改变,其病理生理意义值得进一步探讨。

关键词:心肌缺血再灌注损伤;细胞 Ca^{2+}-ATPase;Ca^{2+};ATP;ADP;AMP
中图法分类号:R322.1+1;R329.2+7;R542.2 文献标识码:A

Characteristics of myocardial nuclear Ca^{2+}-ATPase after ischemia-reperfusion injury in rats

ZHANG Le-zhi, FU Ai-ling, HE Hua-mei (Department of Pharmacology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the regulatory effects of Ca^{2+}, ATP, ADP and AMP on myocardial nuclear Ca^{2+}-ATPase activity after ischemia-reperfusion injury. Methods The model of myocardial ischemia-reperfusion injury was established in rats. Myocardial nuclei were purified using sucrose density gradient centrifugation. The activity of Ca^{2+}-ATPase was measured with ascertaining phosphate. Results Compared with the control, plasma levels of MDA and FFA after myocardial ischemia-reperfusion injury increased significantly ($P<0.01$). The effects of ATP and ADP on activity of myocardial nuclear Ca^{2+}-ATPase decreased markedly ($P<0.01$). There was no difference in Ca^{2+}-ATPase activity when ATP concentration was lower than 1.0 mmol/L. However, when ATP concentration reached 2.0 mmol/L, Ca^{2+}-ATPase activity was lower than that of the control. Ca^{2+}-ATPase activity rose dramatically when ATP concentration kept on increasing. Conclusion The effects of Ca^{2+}, ATP, ADP and AMP on nuclear Ca^{2+}-ATPase activity have altered markedly after myocardial ischemia-reperfusion injury.

Key words: myocardial ischemia-reperfusion injury; nuclear Ca^{2+}-ATPase; Ca^{2+}; ATP; ADP; AMP

长时间心肌缺血可造成心肌损伤和细胞死亡,改善心肌缺血理想的方法是恢复灌注,但恢复灌注仍能造成细胞继续损伤。目前,由于冠心病的介入治疗、早期溶栓术以及体外循环手术等的广泛开展,心肌缺血再灌注损伤已成为临床上最为常见的病理过程之一。心肌缺血再灌注损伤时,细胞内 Ca^{2+} 超载。现已知细胞核被膜存在一个独立于胞浆钙的钙主动转运系统[1],缺血再灌注损伤时核被膜 Ca^{2+}-ATPase活性的变化及其病理意义,目前还不清楚。本实验旨在研究心肌缺血再灌注损伤时[Ca^{2+}]、ATP、ADP、AMP对细胞核被膜 Ca^{2+}-ATPase活性影响的改变,以探讨心肌缺血再灌注损伤时细胞核功能紊乱的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

健康雄性Wistar大鼠64只,体质量(200±20) g,由本校实验动物中心提供。ATP-Na_2,ADP-Na,AMP,PMSF,DTT均为Sigma公司产品;L-histidine为上海生物化工公司BBI分装。

1.2 心肌缺血再灌注模型的建立

大鼠1.5%戊巴比妥钠(45 mg/kg)腹腔麻醉,行气管切开术,并予人工机械通气(动物人工呼吸机:浙江医科大学医疗设备厂,DH-140型,潮气量为55 ml,呼吸频率为60次/min)。于胸骨左沿切开肋骨后暴露心脏。用穿有缝合线的3/8c3×6无损伤圆针于左心耳下缘水平进针,在冠状动脉左前降支下穿线,阻断30 min后,再灌注2 h后结束。取动物血和心脏备用。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30100070)
作者简介:张乐之(1950—),男,湖南省岳阳市人,副教授,主要从事心血管药理、抗炎免疫药理方面的研究,发表论文40余篇。电话:(023)68752265
收稿日期:2002-08-12;修回日期:2002-11-20

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

1.3 血液生化指标的测定和心肌形态学观察

于 4 ℃分离血浆, 采用硫代巴比妥酸比色法测定脂质过氧化物 MDA 含量, 采用二次提取比色法测定游离脂肪酸 FFA 含量。取心脏心尖处组织用 10% 福尔马林固定, 常规脱水, 石蜡包埋, 行 HE 染色。

1.4 心肌细胞核的分离

参照文献[2]方法改进: 取心尖端的左室前壁心肌, 称质量。用冷 TKM 液洗去血液(TKM 液 mmol/L: Tris/HCl 50.0, KCl 25.0, $MgCl_2$ 5.0, EGTA 1.0, DTT 1.0, PMSF 1.0, pH 7.4)。剪碎后按 1∶5(W/V)加入等渗匀浆介质(TKM 含 0.25 mol/L 蔗糖), 内切式匀浆器匀浆(1 000 r/min)5 次, 每次 5 min(间隔 30 s), 再经玻璃匀浆器匀浆, 四层纱布过滤后离心(500× g, 5 min), 弃上清, 将沉淀再匀浆和离心 1 次, 加入 1 倍体积的含 1.0 mol/L 蔗糖-TKM 液混匀, 再缓慢加入 3 倍体积的 2.2 mol/L 蔗糖-TKM 液, 使其置于离心管底部, 于 100 000× g 离心 30 min, 收集沉淀即为心肌细胞核。以上操作均在 0~4 ℃进行。分离的细胞核置于储备液中(0.25 mol/L 蔗糖, 50.0 mmol/L Tris/HCl)4 ℃保存。采用 Lowry 法行蛋白质定量。按文献[3~5]方法测定 5′-核苷酸酶(胞浆膜)、葡萄糖-6-磷酸酶(肌浆网)和琥珀酸脱氢酶(线粒体)等标志酶含量。用分离纯化的心肌细胞核进行以下实验。

1.5 [Ca^{2+}] 对核被膜 Ca^{2+}-ATPase 活性的影响

将分离的细胞核加入反应液中(mmol/L: KCl 100.0, Histidine 50.0, $MgCl_2$ 5.0)。调节 Ca^{2+} 浓度为 0.19~800 μmol/L, 加入 2.0 mmol/L ATP 始动反应。终反应体积为 1.0 ml。双复管测定。37 ℃孵育 20 min。冰浴, 10% 三氯乙酸终止反应。定磷法测定无机磷含量。Ca^{2+}-ATPase 活性为总 ATPase 活性与 Mg^{2+}-ATPase 活性之差。酶单位为 nmol·min^{-1}·mg^{-1}。

1.6 ATP、ADP、AMP 对 Ca^{2+}-ATPase 的影响

反应液除 1.5 基本成分外, [Ca^{2+}] 为 25.0 μmol/L, 另分别加入浓度为 0.125~8.0 mmol/L 的 ATP、ADP 或 AMP 进行以上反应。

1.7 统计学处理

数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间差异比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 心肌缺血再灌注损伤特征和血浆 MDA 和 FFA 的测定

缺血再灌注损伤后, 心肌组织 HE 染色淡, 肌原纤维结构紊乱, 心肌细胞水肿伴空泡形成, 并有炎性细胞浸润, 部分组织见点状坏死, 细胞核固缩, 见图 1。动物血浆 MDA 和 FFA 水平显著升高($P<0.01$), 见表 1。

表 1　大鼠心肌缺血再灌注损伤时血浆 **MDA** 和 **FFA** 含量的变化($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Changes in plasma MDA and FFA levels after myocardial ischemia-reperfusion injury in rats($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

	MDA(nmol/ml)	FFA(Eq/L)
Control	2.24±0.71	355.5±103.6
IR	3.93±0.51 *	880.2±150.8 *

*: $P<0.01$ vs control; IR: myocardial ischemia-reperfusion injury

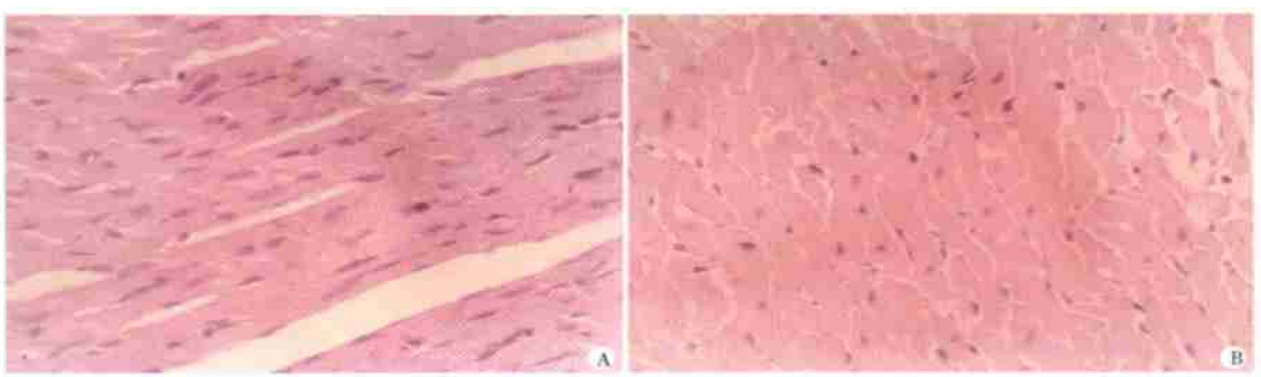


图 1　正常大鼠心肌(**A**)和缺血再灌注心肌(**B**)的比较　(HE× 40)

Fig 1　Comparison of normal rat myocardial cells (A) and ischemia-reperfusion injury myocardial cells　(HE× 40)

2.2 细胞核的制备

本实验制备的心肌细胞核在显微镜下观察细胞碎片少, 胞浆膜标志酶活性< 5%, 肌浆网标志酶活性< 3%, 线粒体标志酶活性< 3%。

2.3 心肌缺血再灌注损伤时[Ca^{2+}] 对细胞 Ca^{2+}-ATPase 活性的影响

正常心肌细胞核 Ca^{2+}-ATPase 活性在[Ca^{2+}] 小于 3.12 μmol/L 时, 随[Ca^{2+}] 升高而增强; 3.12~12.5 μmol/L 时, 曲线基本持平; 但当[Ca^{2+}] 继续增加, Ca^{2+}-ATPase 活性迅速下降。心肌缺血再灌注损伤时细胞核 Ca^{2+}-ATPase 活性在[Ca^{2+}] 小于 50 μmol/L 时, 随[Ca^{2+}] 升高而增强, [Ca^{2+}] 继续提高, Ca^{2+}-ATPase 活性快速下降; 当[Ca^{2+}] 小于 12.5 μmol/L时, 酶活力明显低于正常细胞, 而在[Ca^{2+}] 较高浓度 50 μmol/L 时, 酶活力高于正常细胞。缺血再灌注损伤心肌细胞核反应曲线总体表现为最大值降低且右移, 提示核 Ca^{2+}-ATPase 对 Ca^{2+} 的亲和力下降, 见表 2。

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

表 2 大鼠心肌缺血再灌注损伤时 Ca^{2+}-ATPase 活性对[Ca^{2+}] 反应的变化($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

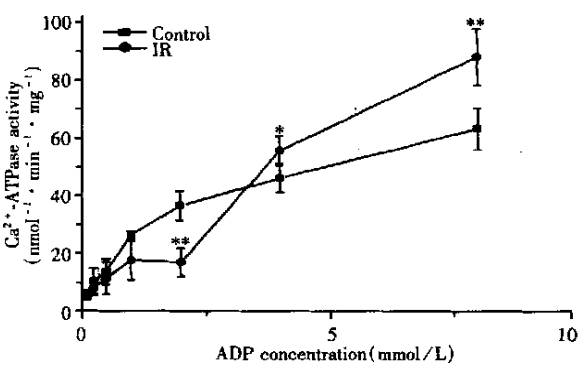
Tab 2 Concentration-response of nuclear Ca^{2+}-ATPase to [Ca^{2+}] after myocardial ischemia-reperfusion injury in rats($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

[Ca^{2+}] (μmol/L)	Ca^{2+}-ATPase activity (nmol·min^{-1}·mg^{-1})	
	Control	IR
0.19	2.74±8.2	24.1±3.0
0.78	37.7±10.3	33.3±7.8
3.12	70.3±11.8	35.1±7.2 **
12.5	68.1±3.9	44.4±5.9 **
50	43.0±12.2	57.3±1.3 **
200	39.1±5.9	48.0±2.6
800	38.8±7.8	12.5±4.1 **

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control

2.4 心肌缺血再灌注损伤时 ATP 对细胞核被膜 Ca^{2+}-ATPase 活性的影响

正常细胞 Ca^{2+}-ATPase 对 ATP 的反应呈浓度依赖性: 即随 ATP 浓度增加, Ca^{2+}-ATPase 活性相应增高。缺血再灌注损伤后, 核被膜 Ca^{2+}-ATPase 活性在 ATP 浓度小于 1.0 mmol/L 时, 与正常细胞 Ca^{2+}-ATPase 活性无显著差异($P>0.05$); 当 ATP 浓度增至 2.0 mmol/L 时, 核 Ca^{2+}-ATPase 对 ATP 的反应明显低于正常细胞($P<0.01$); 但当 ATP 浓度继续增加时, 核 Ca^{2+}-ATPase 活性快速增加, 在 ATP 浓度 4.0 mmol/L 时, 与正常相比有差异($P<0.05$), 8.0 mmol/L 时, 有非常显著差异($P<0.01$), 见图 2。



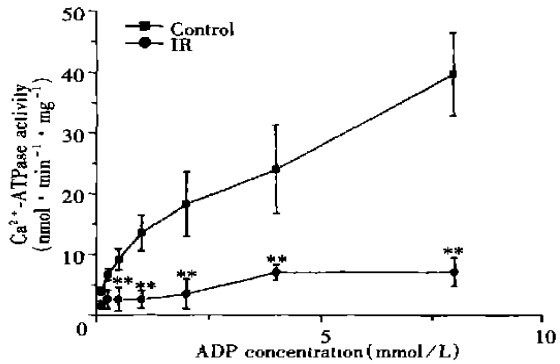
*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control

图 2 大鼠心肌缺血再灌注损伤时 Ca^{2+}-ATPase 活性对[ATP] 反应的变化($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

Fig 2 Concentration-response curve of nuclear Ca^{2+}-ATPase to [ATP] after myocardial ischemia-reperfusion injury in rats($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

2.5 缺血再灌注损伤时 ADP 对细胞 Ca^{2+}-ATPase 活性的影响

正常细胞核被膜 Ca^{2+}-ATPase 对 ADP 的反应呈浓度依赖性增高。而缺血再灌注损伤时细胞核被膜 Ca^{2+}-ATPase 对 ADP 的反应则明显下降, ADP 几乎在各个浓度与正常对照相比均有非常显著差异($P<0.01$); 并且在 ADP 浓度达到 4.0 mmol/L 时, 反应即达到坪值。说明缺血再灌注损伤时细胞 Ca^{2+}-ATPase 对 ADP 的反应显著下降, 见图 3。



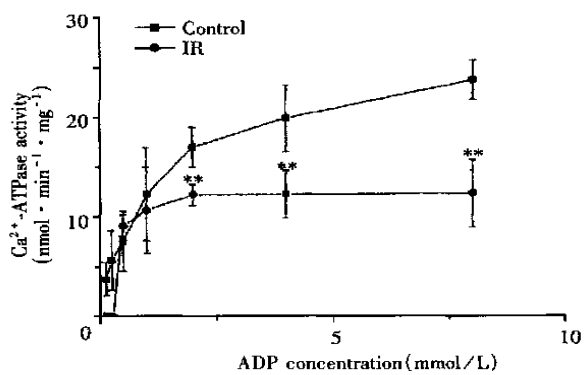
**: $P<0.01$ *vs* control

图 3 心肌缺血再灌注损伤时 Ca^{2+}-ATPase 活性对[ADP] 反应的变化($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

Fig 3 Concentration-response curve of nuclear Ca^{2+}-ATPase to [ADP] after myocardial ischemia-reperfusion injury in rats($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

2.6 缺血再灌注损伤时 AMP 对细胞 Ca^{2+}-ATPase 活性的影响

正常对照细胞核被膜 Ca^{2+}-ATPase 对 AMP 的反应呈现浓度依赖性增高。缺血再灌注损伤时, AMP 浓度在小于 0.25 mmol/L 时, 对 Ca^{2+}-ATPase 不发生反应(数值为 0); 并且当 AMP 浓度大于 2.0 mmol/L 时, 反应达到坪值, 均与正常对照组有非常显著差异($P<0.01$)。说明缺血在灌注损伤时细胞 Ca^{2+}-ATPase 对 AMP 的反应明显下降, 见图 4。



**: $P<0.01$ *vs* control

图 4 大鼠心肌缺血再灌注损伤时 Ca^{2+}-ATPase 活性对[AMP] 反应的变化($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

Fig 4 Concentration-response curve of nuclear Ca^{2+}-ATPase to [AMP] after myocardial ischemia-reperfusion injury in rats($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

3 讨论

心肌缺血再灌注损伤时, 细胞内产生大量的氧自由基, 引起生物膜强烈的脂质过氧化反应, MDA 生成显著升高。此时能量来源不再由游离脂肪酸(FFA)供应, 而主要来源于葡萄糖酵解, 血浆 FFA 增高。

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

钙作为细胞内关键的第二信使之一, 在细胞的多种活动中起着非常重要的作用。细胞核内也存在钙信号, 并且细胞核钙在一定浓度范围内, 调节细胞有丝分裂、基因转录、DNA 修复等重要的生命活动。但核钙稳态的失衡可能参与多种病理生理过程。研究显示, 细胞核钙浓度持续升高是导致细胞凋亡的主要原因。另外, 胞浆 Ca^{2+} 是通过核外膜上的钙泵和 IP_4 受体, 将 Ca^{2+} 摄入核周隙, 经内核被膜上的 IP_3 和利若丁受体, 将 Ca^{2+} 释放入核内[6]。

本研究采用分离纯化的心肌细胞核观察显示, 正常心肌细胞核周围[Ca^{2+}] 小于 3.12 μmol/L 时, 细胞核 Ca^{2+}-ATPase 活力逐渐升高, 并逐渐达一稳态, 但超过 12.5 μmol/L 后, 其活性快速下降, 似乎存在着"高[Ca^{2+}] 抑制钙泵活性"的现象。其意义可能是当胞浆[Ca^{2+}] 升高时, 细胞为避免过多的 Ca^{2+} 进入细胞核而采取的保护性机制。另外, 这种现象也证明了核内钙浓度可受外界[Ca^{2+}] 的影响, 但核本身具有独粒调节钙浓度的能力[7]。

保持[Ca^{2+}] 不变, 分别研究 ATP、ADP、AMP 对核被膜 Ca^{2+}-ATPase 的作用。结果显示, 在正常心肌细胞, 它们对核被膜 Ca^{2+}-ATPase 的活性影响均呈浓度依赖性: 随 ATP、ADP、AMP 浓度上升, Ca^{2+}-ATPase 活性相应增高。但 Ca^{2+}-ATPase 对 ATP 的敏感性远高于 ADP, AMP 敏感性最低。

缺血再灌注损伤时, 心肌细胞核被膜 Ca^{2+}-ATPase 活性最大值下降且右移, 说明其活力下降, 对 Ca^{2+} 的亲和力降低。并且 Ca^{2+}-ATPase 对 ADP、AMP 的反应非常显著性降低($P<0.01$)。此时, 对 ATP 的反应随浓度不同: 小于 1.0 mmol/L 时, 与正常细胞 Ca^{2+}-ATPase 活性无显著差异; 浓度增至 2.0 mmol/L 时, 缺血再灌注损伤细胞 Ca^{2+}-ATPase 对 ATP 的反应明显低于正常细胞; 但当 ATP 浓度继续增加时, 缺血再灌注细胞 Ca^{2+}-ATPase 活性快速增加。缺血再灌注损伤时, 细胞内钙超载, 并且 ADP、AMP 增加, ATP 大量减少, 细胞可能通过核被膜 Ca^{2+}-ATPase 活性下降, 对 Ca^{2+}, ADP, AMP 敏感性降低, 从而使进入核内的 Ca^{2+} 减少, 避免核内高钙产生不可逆损伤, 这对于再灌注损伤的心肌细胞具有保护作用。

综上所述, 心肌缺血再灌注损伤时, Ca^{2+}-ATPase 活性降低, 对 Ca^{2+} 的亲和力减弱; 对 ADP、AMP 的反应明显降低, 对 ATP 的反应随浓度而异。其生化机制和病理生理意义值得进一步探讨。

参考文献:

[1] Malviga A N, Rogue P J. "Tell me where is calcium bred": clarifying the roles of nuclear calcium[J]. Cell, 1998, 92(1): 17—23.

[2] Nicotera P, Darid J M, Dean P J, *et al*. ATP stimulates Ca^{2+} uptake and increses the free Ca^{2+} concentration in isolated rat liver nuclei[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 8(4): 453—457.

[3] Dixom T G, Purdom M. Serum-5′-nucleotidase [J]. J Clin Phathol, 1954, 7(3): 341—346.

[4] Jones L R, Beseech H R. Isolation of canine cardiac sarcolemmal vesicles [J]. Meth Pharmacol, 1984, 5(1): 1—6.

[5] 姜妙娜. 肝细胞琥珀酸脱氢酶活力检测条件的探讨[J]. 大连医学院学报, 1991, 13(1): 76—78.

[6] Bootmann M D, Thomas D, Tovey S C. Nuclear calcium signaling[J]. Cell Mol Life Sci, 2000, 57(3): 371—375.

[7] Badminton M W, Kendall J M, Rembold C M. Current evidence suggests independent regulation of nuclear calcium[J]. Cell Calcium, 1998, 23(2—3): 79—86.

(编辑　陈聪连)

欢迎订阅《中国药理学通报》

《中国药理学通报》是国家级核心期刊和权威的文献源期刊, 主要刊登药理学研究论文, 多次荣获国家及华东地区优秀科技期刊奖, 2003 年更是荣获国家期刊奖百种重点期刊奖; 被国家权威机构认定为医学类、药学类核心期刊, 并被几乎所有国内相关检索性期刊及数十种国外著名检索期刊收录、利用。连续 8 年名列美国《CA 千种表》, 1997 年摘引量曾名列美国《CA 千种表》收录的中国医药期刊第 1 名。

《中国药理学通报》为月刊, 大 16 开 120 页, 印刷质量高, 每期定价 12.00 元, 全年 144.00 元。邮发代号: 26—52, 请及时向当地邮局订阅, 漏订读者请直接汇款至我刊编辑部, 免收邮寄费。

地　址: 安徽省合肥市安徽医科大学校内《中国药理学通报》编辑部　　邮　编: 230032

联系人: 吴　慧, 武明静　　电话: (0551)5161221　　电子邮箱: cpb@ahmu.edu.cn

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