DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.02.003

缺氧条件下梭曼中毒对培养大鼠心肌细胞的影响*

刘 勇** 程天民*** 李云鹏 (第三军医大学预防医学系毒理学教研室)重庆,400038

提 要 目的:探讨缺氧与梭曼中毒单一或复合作用对培养大鼠心肌细胞的损伤特点和可能机制。方法:培养的大鼠心肌细胞在缺氧条件下暴露于含不同浓度梭曼的培养液中,观察细胞存活率和培养液肌酸磷酸激酶(CPK)、乳酸脱氢酶(LDH)及谷草转氨酶(GOT)等心肌酶含量变化,同时用 Fura-2/AM 荧光负载测定心肌细胞内游离钙浓度([Ca^{2+}]i)变化。结果:缺氧与梭曼中毒均可导致培养的大鼠心肌细胞存活率下降,培养液中心肌酶含量升高,同时心肌细胞内游离钙浓度也明显增加;缺氧和梭曼中毒两种致伤因素同时作用对培养的大鼠心肌细胞所产生的复合效应显著大于单一因素的致伤结果。结论:缺氧可以加重梭曼对心肌细胞的毒性;缺氧或梭曼中毒所致心肌细胞的损伤可能与心肌细胞内钙超载有关。

关键词 缺氧;梭曼中毒;心肌细胞;大鼠
中图法分类号 R827.171

在梭曼中毒死亡的原因中,循环衰竭占有重要地位,梭曼中毒动物心功能将受到严重抑制[1],其机制除了与胆碱能神经系统的异常活动有关外,部分非胆碱能机制如心肌细胞微环境的改变也起了重要作用。缺氧和梭曼中毒对心脏或心肌细胞的复合作用效应未见文献报道,而高原地区有机磷中毒的病例却时有发生[2]。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

梭曼,纯度 94.6%,军事医学科学院六所提供,用丙二醇-生理盐水稀释后备用。用于心肌细胞培养的培养基和培养液购自 Sigma公司(美国)。Frua-2/AM 及相关试剂购自宝灵曼公司(德国)。

1.2 大鼠心肌细胞培养

Wistar大鼠,体重 230± 24 g,雌雄不限,由本校实验动物中心提供。参照文献[3]方法分离培养心肌细胞,在显微镜下观察可见细胞呈典型杆状,具有横纹并有搏动,对台盼蓝排斥。将细胞放置在培养瓶内,室温下保存 1 h后进行实验。

1.3 致伤及生化测定

培养的心肌细胞分别置于 96孔培养板,暴露于常氧及缺氧(13% O_2+ 87% N_2)环境中,在培养液中分别加入生理盐水、0.60μmol和 0.75μmol梭曼应用液。于加入生理盐水或梭曼前(0 min)及加入后 30、60、120 min分别取培养液用生化自动分析仪(美国制造)检测 CPK、LDH和 GOT含量,同时观察培养细胞的活存情况。

1.4 心肌细胞内游离钙浓度测定

根据文献[4]方法进行。

1.5 统计分析

采用双因素方差分析及 FLSD检验,分析各实验组内及组间的显著性差异和交互作用。

2 结果

2.1 心肌细胞存活状况及培养液生化指标变化

缺氧条件下梭曼中毒对培养的大鼠心肌细胞有明显的抑制作用,并表现出明显的时效性和量效性。和常氧条件下各实验组结果相比较,缺氧条件下各实验组培养细胞的活存率均显著降低,缺氧复合梭曼中毒实验组大鼠心肌细胞活存率不仅低于单纯缺氧组而且也低于单纯梭曼中毒组,提示两种致伤因素的复合效应强于单一因素对大鼠心肌细胞的抑制作用,见表 1。

不论在常氧或缺氧条件下,梭曼均可诱使大鼠心肌细胞培养液中心肌酶含量不同程度升高。常氧时,梭曼使细胞培养液中 CPK含量升高,并具有时效性,即随时间的延长 CPK含量逐渐升高,而加大梭曼剂量,可使 CPK含量升高的时间提前;缺氧也可导致培养液中 CPK含量缓慢升高,缺氧复合梭曼中毒后大鼠心肌细胞培养液中 CPK含量迅速升高,而且具有时效和量效性,大剂量梭曼所致心肌细胞培养液中 CPK含量升高效应明显强于单纯缺氧或梭曼中毒的作用结果,再度证实缺氧加重了梭曼对心肌细胞的损伤作用。

大鼠心肌细胞培养液中 LDH含量在梭曼中毒后也有明显变化,与 CPK含量变化不同的是缺氧条件下大剂量梭曼所诱导的 LDH含量升高仅在 60 min时表现为既高于单纯中毒又高于单纯缺氧所致效应,其余各时相点测定值则只高于单纯缺氧组值,提示梭曼中毒亦可加重缺氧对心肌细胞的损伤。

* 全军"九五"攻关项目,No.96L063
** 刘 勇,男,34岁,副教授,博士研究生 *** 预防医学系复合伤研究所
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

GOT的变化与 LDH变化相似,但其复合效应发生在缺氧复合低剂量梭曼中毒后 120 min,此时 GOT含量高于单纯梭曼中毒组和单纯缺氧组,其它各时相点观测值均高于单纯缺氧组值,同 CPK含量变化相比,仅表现出良好的时效性,量效关系不明显,但同样可以说明缺氧和梭曼中毒两种致伤因素的致伤效应可以互相加重。

表 1 缺氧条件下梭曼中毒对培养大鼠心肌细胞存活率的影响 (%) (n= 6, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Effects of soman intoxication on the survival rate of cultured myocytes of rats under the condition of hypoxia (%) (n= 6, $\bar{x}\pm s$)

Condition	Group	Pretreated(min) 0	Time after treatment(min) 30	60	120
Normal	Control	89.8± 4.0	85.8± 4.9	84.0± 3.7	87.8± 4.9
	GD-1	83.9± 4.7	60.9± 3.8*△	48.0± 3.1*△	37.3± 3.2*△
	GD-2	85.9± 3.7	40.1± 3.3*#△	27.1± 4.3*#△	17.3± 6.9*#△
	Anoxia	88.1± 3.3	77.8± 4.3*□	59.5± 6.3*□	57.0± 4.1*□
Hypoxia	Soman-1	87.9± 4.3	37.4± 6.4*□△	20.8± 3.3*□△	11.9± 5.0*□△
	Soman-2	88.5± 6.3	20.8± 4.0*#□△	13.7± 4.9*#□△	7.6± 3.8*#□△

Control: cultured myocytes treated with saline; GD-1: myocytes intoxicated by 0.60 μmol soman; GD-2: the cells exposed to 0.75 μmol soman; Anoxia: cultured cells treated with saline under the condition of hypoxia; Soman-1: cultured myocytes exposed to 0.60 μmol soman in hypoxia; Soman-2: myocytes treated with 0.75 μmol soman in hypoxia; *: $P<0.01$ *vs* pretreatment; △: $P<0.01$ *vs* control or anoxia; #: $P<0.01$ *vs* GD-1 or soman-1; □: $P<0.01$ *vs* normal

2.2 心肌细胞内游离钙浓度变化

从表 2可以发现,梭曼中毒和缺氧都可导致培养心肌细胞内游离钙浓度明显升高,而且具有良好的时效性和量效性,缺氧和梭曼中毒共同作用于培养的大鼠心肌细胞产生复合效应使细胞内游离钙浓度迅速升高,这种复合效应在中毒早期 (30 min)表现为相加 (即 1+ 1≈ 2)损伤,后期则是相互加重,提示其机制的复杂性。

表 2 缺氧条件下梭曼中毒对培养大鼠心肌细胞内游离钙浓度的影响 (C_B /nmol·L^{-1}, n= 6, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Effects of soman intoxication on $[Ca^{2+}]_i$ of cultured rats myocytes under the condition of hypoxia (C_B /nmol·L^{-1}, n= 6, $\bar{x}\pm s$)

Condition	Group	Pretreated(0 min)	Time after treatment(min) 30	60	120
Normal	Control	100± 4	104± 5	105± 5	108± 5
	GD-1	107± 5	143± 6*△	173± 5*△	204± 5*△
	GD-2	105± 6	170± 5*#△	202± 9*#△	219± 8*#△
	Anoxia	102± 5	135± 5*△	160± 5*△□	193± 5*△
Hypoxia	Soman-1	98± 5	173± 5*△□	209± 5*△□	279± 4*△□
	Soman-2	94± 5	199± 4*#△□	284± 5*#△□	346± 5*#△□

*: $P<0.01$ *vs* pretreatment; △: $P<0.01$ *vs* control or anoxia; #: $P<0.01$ *vs* GD-1 or soman-1; □: $P<0.01$ *vs* normal

3 讨论

缺氧条件下梭曼中毒是一种特殊的化学战剂伤,由于缺氧和梭曼中毒本身就是两种有害因素,任何一种单独作用于机体,均可造成受害者不同程度的损伤。当这两种致伤因素同时作用于机体时,极有可能导致更为严重的伤害。本研究即从一个侧面来探讨缺氧和梭曼中毒复合作用于心肌细胞而引起的细胞损伤特点和可能机制。

将培养的大鼠心肌细胞置于缺氧条件下给予不同浓度的梭曼中毒,通过观察心肌细胞生长状况、培养液中心肌酶的改变以及心肌细胞内游离钙浓度的变化,

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

可以发现,两种有害因素单独或同时作用于心肌细胞,都可导致细胞成活率明显下降,培养液中心肌酶含量增多,心肌细胞 $[Ca^{2+}]i$显著升高,而且通常情况下,两种致伤因素的复合效应要强于单一致伤效应,复合效应在部分时相点表现为相加性,其它则为相互协同。

缺氧对心肌细胞的损伤可由多个环节引起,自由基损伤和 Ca^{2+} 超载损伤是其中的两个重要因素,自由基可能导致细胞膜脂质流动性下降,而 Ca^{2+} 超载则诱发细胞不可逆性损伤及细胞信息传递的紊乱[5,6];梭曼中毒后也可引起脂质过氧化[7]和细胞微环境改变[8],进而导致细胞损伤。可见就损伤机制而言,两种致伤因素有相似或相近之处,缺氧和梭曼中毒两种因素共同作用所产生的复合效应更为严重,正如本结果所见。此外,我们也发现部分时相点复合效应表现为相加作用,即复合效应为两种单一损伤效应之和,进而揭示两种致伤因素的损伤机制存在不同之处。

(赵吉青、王仕丽同志协助部分工作;承蒙余争平博士启式讨论,一并致谢!)

参考文献

1 Ozyurt G, Yilmazlar A, Tamgac F, *et al*. The myocardium and brain SPECT findings in organophosphate poisoning. Eur J Emerg Med, 1997, 4(1): 29

2 魏相德.高原神经毒中毒研究概况.卫生毒理学杂志, 1997, 11(1): 23

3 Lemasters J J, Bond J M, Chacon E, *et al*. The pH paradox in ischemia-reperfusion injury to cardiac myocytes. Eur Xanthine Sci, 1996, 76(1): 99

4 Davidoff A J, Maki T M, Ellingsen O, *et al*. Expression of calcium channels in adult cardiac myocytes is regulated by calcium. J Mol Cell Cardiol, 1997, 29(7): 1791

5 Silverman H S, Wei S, Haigney M C, *et al*. Myocyte adaptation to chronic hypoxia and development of tolerance to subsequent acute severe hypoxia. Circ Res, 1997, 80(5): 699

6 Minhaz U, Tanaka M, Tsukamoto H, *et al*. Effect of MCI-186 on postischemic reperfusion injury in isolated rat heart. Free Radic Res, 1996, 24(5): 361

7 Kassa J, Fusek J. Effect of Panpal pretreatment and antidotal treatment (HI-6 plus benactyzine) on respiratory and circulatory function in soman-poisoned rats. Hum Exp Toxical, 1997, 16(10): 563

8 Bouchaud C, Chollat N A, Duserre S, *et al*. The role of nitric oxide in the neuropathology in soman intoxication. Brain Res, 1994, 660(2): 249

(收稿: 1998-01-09;修回: 1998-10-08)

(编辑　冯崇英)

Effects of soman intoxication on cultured rat myocardial cells during hypoxia*

Liu Yong, Cheng Tianmin, Li Yunpeng (Department of Toxicity, Faculty of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To investigate the effects of soman intoxication or hypoxia alone and the two in combination on cultured rat myocardial cells and the possible mechanism of myocardiocytic injury by soman intoxication under the condition of hypoxia. Methods: The cultured rat myocardial cells were exposed to soman solution at different concentrations under the condition of hypoxia. The changes in contents of CPK, LDH and GOT in the culture solution were determined. Meanwhile, the concentration of free calcium in the cells ($[Ca^{2+}]i$) were measured by using Fura-2 as the fluorescent probe for intracellular Ca^{2+}. Results: Both soman intoxication and hypoxia markedly reduce the survival rate of the cultured rat myocardial cells. The contents of CPK, LDH and GOT in the culture solution were remarkably increased after the exposure of the cells to soman or hypoxia alone or the two in combination. The increase of $[Ca^{2+}]i$ due to the combination was much higher than that produced by soman intoxication or hypoxia alone. Conclusion: Hypoxia can enhance the cytotoxic effects of soman on the myocardial cells. The injury of the myocardial cells caused by hypoxia or soman intoxication might be related to calcium overload in the cells.

Key words hypoxia; soman intoxication; myocardial cell; rat

* This project was supported by the "Ninth five" obligatory budget of PLA, No. 96L063

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