DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.02.003


# 烧伤焦痂毒性提取物 $D_1$ 对培养心肌细胞 L-型钙离子通道活动的影响*

舒崇湘 叶本兰** 陈宗荣 程天民 萧家思** 曾晓荣*** (第三军医大学预防医学系防原医学教研室)重庆, 630038

提要 目的:研究烧伤焦痂毒性提取物 $D_1$ 对培养心肌细胞 L型钙离子通道活动的影响;方法:采用培养 2 d~ 5 d的大白鼠乳鼠心肌细胞,以 Cell-attached方式记录通道电活动;结果:正常大鼠皮肤脂质提取物 $D'_1$ 在 0.5 mg/ml与 1.0 mg/ml时对钙离子通道活动无显著影响,在 2.0 mg/ml时可使开放活动有所加强;烧伤焦痂毒性提取物 $D_1$ 在 0.5 mg/ml 1.0 mg/ml 2.0 mg/ml时使通道开放活动显著加强,且随着作用量的增加而加强,与正常大鼠皮肤脂质提取物 $D'_1$ 的作用相差显著,SOD可抑制烧伤焦痂毒性提取物对通道活动的影响;结论:烧伤焦痂毒性提取物 $D_1$ 可激活心肌细胞 L-型钙离子通道,此作用可能是由超氧阴离子介导的。

关键词 灼伤;焦痂;钙离子通道
中图法分类号 R644

本室以往的研究表明烧伤后心肌功能下降与心肌细胞线粒体呼吸功能下降有关,并进一步证实钙离子通道阻断剂维拉帕米可在一定程度上改善烧伤后的心脏功能[1],说明钙离子可能参与了伤后线粒体功能的损害。同时,我们发现:烧伤焦痂毒性提取物 $D_1$ 不仅抑制线粒体的呼吸功能,而且能使线粒体的不饱和脂肪酸与饱和脂肪酸的比值下降,其机理与 $D_1$ 的脂质过氧化作用有关[2]。然而 $D_1$ 对心肌细胞钙离子代谢的作用尚不清楚。本文观察了 $D_1$ 对大鼠培养心肌细胞的 L-型钙离子通道活动的作用,以便初步了解烧伤焦痂毒性提取物 $D_1$ 与烧伤后心功能抑制的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 $D_1$ 与 $D'_1$ 的制备

用 Wistar大白鼠,雌雄不拘,体重 180 g~ 220 g,由本校动物所提供。动物致伤条件及 $D_1$ 与 $D'_1$ 的制备见文献[2]。

### 1.2 心肌细胞培养

用出生后 20 h~ 48 h的 Witar大白鼠,雌雄不拘,由泸州医学院动物所提供,参照 Dawson等方法[3]培养心肌细胞。

### 1.3 通道电活动的记录

通道记录用溶液包括(1)细胞浸浴液(mmol/L): KCl 140, EGTA 1.0, HEPES 10, glucose 10, pH7.4, (2)电极充灌液(mmol/L): $BaCl_2$ 110, HEPES 10, CholineCl 30, TTX 0.03, pH 7.4, (3)盐桥液: $BaCl_2$ 110 mmol/L, 琼脂 1 g/L, pH7.4。

通道电活动的记录采用培养 2 d~ 5 d的大白鼠乳鼠心肌细胞,以 Cell-attached方式与微管电极在室温下(20℃~ 22℃)形成高阻封接,在 -50 mV 保持电位上给予 300 ms + 60 mV的阶跃命令,由 Pelamp 6.0计算机软件中 Clampex程序进行同步刺激与采样记录。

### 1.4 数据处理

采用 Pclamp 6.0软件中 Fetchan与 Pstat程序进行数据处理。用 Gaussian与 Exponential方式对通道的电流幅值直方图及通道的开放与关闭时间分布直方图进行拟合,并进行拟合优度检验。组间数据比较采用 SPLM医学统计软件进行 $t$ 检验与方差分析,以 $P < 0.05$ 为相差显著。

## 2 实验结果

### 2.1 $D'_1$ 与 $D_1$ 对 L型 $Ca^{2+}$ 通道活动的影响

在形成 Cell-attached膜片的浸浴液中分别加入正常大鼠皮肤脂质提取物 $D'_1$ 和烧伤焦痂毒性提取物 $D_1$,其中 0.5 mg/ml 1.0 mg/ml的 $D'_1$ 对通道活动无显著影响,2.0 mg/ml $D'_1$ 和各浓度的 $D_1$ 均使 L-型钙通道开放活动增强,见附图 G D① 通道开放概率($P_0$)增加;② 平均电流幅值(I)增加;③ 开放时间常数($\tau$)延长;但各曲线的拟合方式不变。上述变化随 $D_1$ 作用浓度的增加而加强,且较相同浓度的 $D'_1$ 的作用相差显著。④ $D'_1$ 对关闭时间常数($\tau 1, \tau 2$)无显著影响,而 $D_1$ 使关闭时间常数显著缩短,在 0.5 mg/ml与 1.0 mg/ml时,主要使长关闭时间常数($\tau 2$)缩短,在 2.0 mg/ml时,长、短二个关闭时间($\tau 1$, $\tau 2$)均缩短,见附表。

* 国家自然科学基金资助项目,No. 39170743;全军"八五"攻关项目
** 基础部生理学教研室 重庆,630038
*** 四川省泸州医学院 泸州,646000

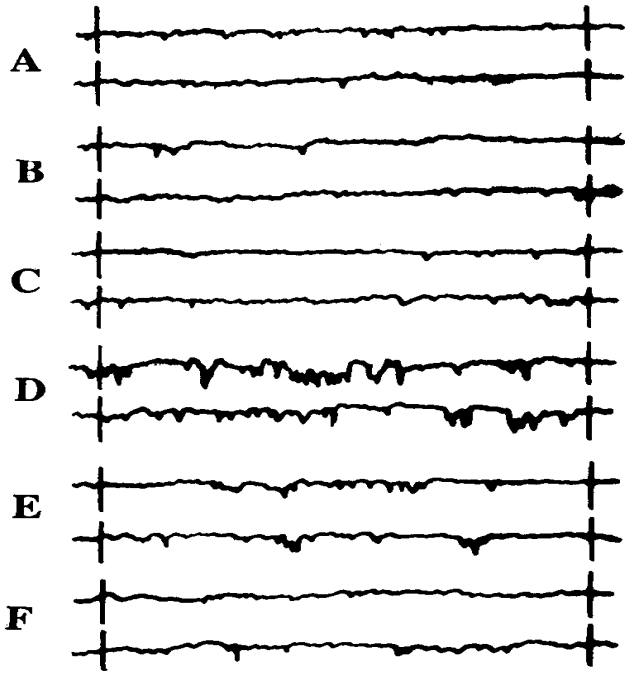
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

附表　$D'_1$ 与 $D_1$ 对心肌细胞 L-型离子通道活动的影响

Tab　Effects of $D'_1$ and $D_1$ on L-type $Ca^{2+}$ channel of cultured myocardial cells

| | I(pA) | Open time ( $L$ /ms) | Closed time( $L$ /ms) | | Po |
|---|---|---|---|---|---|
| | | τ | τ1 | τ2 | |
| N | 1.203± 0.059 | 0.075± 0.009 | 0.870± 0.068 | 8.510± 0.885 | 0.013± 0.002 |
| $D'_1$ ( $P_B$ /mg·ml$^{-1}$) | | | | | |
| 0.5 | 1.199± 0.067 | 0.079± 0.011 | 0.960± 0.087 | 8.386± 0.943 | 0.015± 0.002 |
| 1.0 | 1.300± 0.100 | 0.083± 0.010 | 0.880± 0.058 | 10.003± 0.809 | 0.015± 0.003 |
| 2.0 | 2.023± 0.102* | 0.166± 0.014* | 0.910± 0.069 | 7.980± 0.658 | 0.017± 0.002* |
| $D_1$ ( $P_B$ /mg·ml$^{-1}$) | | | | | |
| 0.5 | 1.745± 0.088*△ | 0.132± 0.012*△ | 0.866± 0.077 | 6.680± 0.465*△ | 0.020± 0.003*△ |
| 1.0 | 2.300± 0.069*△ | 0.220± 0.015*△ | 0.750± 0.084 | 8.050± 0.504*△ | 0.010± 0.003*△ |
| 2.0 | 3.875± 0.113*△ | 0.421± 0.032*△ | 0.540± 0.065*△ | 4.800± 0.412*△ | 0.025± 0.004*△ |
| SOD ( $P_B$ /mg·ml$^{-1}$) | | | | | |
| 10 | 1.195± 0.064 | 0.077± 0.010 | 0.810± 0.055 | 8.357± 0.745 | 0.012± 0.002 |
| 50 | 1.165± 0.085 | 0.085± 0.009 | 0.796± 0.069 | 8.255± 0.453 | 0.014± 0.002 |
| $D_1$ (0.5 $P_B$ /mg·ml$^{-1}$) + SOD ( $P_B$ /mg·ml$^{-1}$) | | | | | |
| 10 | 1.438± 0.079*▲ | 0.105± 0.010*▲ | 0.825± 0.091 | 8.002± 0.560▲ | 0.015± 0.002▲ |
| 50 | 1.227± 0.076 | 0.088± 0.007 | 0.821± 0.091 | 9.010± 0.310 | 0.013± 0.002 |

*: $P < 0.05$ *vs* N; △: $P < 0.05$ *vs* $D'_1$ of the same concentration; ▲: $P < 0.05$ *vs* $D_1$ without SOD




附图　$D'_1$ 与 $D_1$ 对心肌细胞 L-型钙离子通道活动的影响

**Fig　Effects of $D'_1$ and $D_1$ on L-type $Ca^{2+}$ channel of cultured myocardial cells.**

A: Normal control;　B　10μl/ml SOD;
C: 0.5 mg/ml $D'_1$;　D: 0.5 mg/ml $D_1$
E: 0.5 mg/ml $D_1$+ 10μl/ml SOD;
F: 0.5 mg/ml $D_1$+ 50μl/ml SOD;

对通道活动的动力学分析表明: $D_1$ 对通道开放与关闭时间分布的拟合方式无影响,即:通道开放时间分布呈单指数曲线拟合,关闭时间分布呈双指数曲线拟合,另外,实验中还观察到有少数亚态水平的通道开放。

### 2.2　SOD 对 $D_1$ 作用的影响

在 Cell-attached膜片的浸浴液中分别加入 SOD 10μg/ml 50μg/ml,对 L-型 $Ca^{2+}$ 通道无显著影响,但在烧伤焦毒性提取物 $D_1$ 0.5 mg/ml作用后,再加入 10μg/ml SOD,可使通道开放增加的程度显著降低,见附图 B E,通道平均电流幅值、通道开放概率的增加及开放时间常数的延长与关闭时间常数的缩短程度,均较未加 SOD时低,其中,通道开放概率及关闭时间常数恢复到正常对照水平。加入 50μg/ml SOD后通道活动的各项指标均恢复至正常对照水平,见附图及附表。

## 3　讨论

心肌细胞内的钙离子稳态对保持细胞的正常生理功能是非常重要的,而细胞膜 L型钙离子通道是调节细胞内钙浓度的一个重要途径。本室以前的研究表明外源性高浓度钙可抑制线粒体呼吸功能,预防和治疗性给予钙离子通道阻断剂维拉帕米可非常显著地改善伤后心肌线粒体功能[4],本实验的结果进一步显示烧伤焦痂毒性提取物 $D_1$ 能显著激活心肌细胞膜 L型钙通道,使心肌细胞钙离子内流增加,细胞内钙离子浓度升高,而胞浆内钙浓度的异常增高,可导致细胞钙超载

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

(Calcium overload). 这样一方面通过影响心肌细胞电生理和收缩活动,使心肌细胞功能受到抑制,另一方面可抑制线粒体膜上 ADP/ATP交换载体,减少线粒体内 Pi或腺核苷酸的利用度,抑制 ATP的合成,从而导致心肌能量代谢障碍[5],此外,钙超载亦可激活磷脂酶,加速膜磷脂的降解而引起膜损伤,使膜对各种离子的屏障作用丧失,加重细胞内外离子分布的紊乱,形成恶性循环,导致心肌细胞的一系列损伤.

SOD对心肌细胞膜 L型 $Ca^{2+}$ 通道活动无显著影响,但它可抑制 $D_1$ 对通道开放加强的作用,说明 $D_1$ 激活心肌细胞 L型钙通道作用可能是由超氧阴离子自由基介导的. 本室以前的实验结果表明 $D_1$ 的主要毒性成份是脂肪酸和脂质过氧化物,且 $D_1$ 与亚线粒体颗粒相互作用时可产生超氧阴离子、单线态氧等自由基,诱导亚线粒体化学发光[2],此外,文献报道自由基可增加钙通道的开放[6],这些资料支持上述论点. 然而,关于自由基如何引起钙通道开放活动增加,目前还不十分清楚,有人认为可能是自由基使通道蛋白上半胱氨酸巯基氧化而进行的[6],而 Clague等则认为可能是自由基增加钙的漏电流所致[7].

通道开放与关闭时间分布的拟合方式可以反映通道活动的动力学状态. $D_1$ 诱导的钙通道开放时间分布呈单指数曲线拟合,关闭时间分布呈双指数曲线拟合,这符合 Hess等提出的钙通道的门控由 2个关闭状态和 1个开放状态所组成的动力学模型[8],说明 $D_1$ 虽使通道开放活动加强,但不改变通道门控活动的动力学状态. 至于实验中有少数亚态水平的通道开放,其机理尚待研究.

## 参考文献


1 叶本兰,程天民,萧家思. 放射损伤、烧伤与放烧复合伤早期在体心功能变化的研究. 第三军医大学学报, 1996; 18(1): 8

2 舒崇湘,陈宗荣,楼淑芬等. 烧伤焦痂毒性提取物 $D_1$ 诱发大鼠肝脏亚线粒体颗粒化学发光作用. 第三军医大学学报, 1995; 17(2): 96

3 Dawson M, Abdul-Jabar Z. A method for preparing beating heart cells for culture. In: Richards RJ, Rajan KT eds. Tissue culture in medical research (Ⅱ). New York: Pergamon Press, 1980; 71~77

4 熊 业,陈宗荣,程天民. 维拉帕米对放烧复合伤大鼠心肌线粒体功能的保护作用. 第三军医大学学报, 1995; 17(2): 93

5 Fagian M M. Inhibition of oxidative phosphorylation by $Ca^{2+}$ or $Sr^{2+}$: a competition with $Mg^{2+}$ for the formation of adenine nucleotide complex. Biochem Biophs Acta, 1986; 852(2): 262

6 Boraso A, Williams J. Modification of the gating of the cardiac sarcoplasmic reticulum $Ca^{2+}$-release channel by $H_2O_2$ and dithithreitol. Am J Physiol, 1994; 267(Heart Cire Physiol 36): H1010

7 Clague J R, Langer G A. The pathogenesis of free radical-induced calium leak in cultured rat cardiomyocytes. J Mol Cell Cardiology, 1994; 26(1): 11

8 Hess P, Lansman J B, Tsien R W. Different modes of Ca channel gating behaviour favoured by dihydropyridine Ca agonists and antagonist. Nature, 1984; 311(11): 538


(收稿: 1996-07-09;修回: 1997-01-27)

(编辑 张大春)

# Effects of the toxic component $D_1$ extracted from burn eschar on L-type calcium channel of cultured myocardial cells*

Shu Chongxiang, Ye Benlan, Chen Zongrong, Cheng Tianmin, Xiao Jiasi, Zen Xiaorong (Department of Radiation Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract **Objective**: To study the effects of the toxic component $D_1$ extracted form burn eschar on L-type calcium channel of cultured myocardial cells. **Methods**: The electrical activity of L-type calcium channel was recorded from cell-attached patches of myocardial cells from rats cultured for 2~5 days. **Results**: $D'_1$, a toxic component from normal animal skin, exerted no effects on the electrical activity at 0.5mg/ml and 1.0mg/ml and only exerted effects on it at 2.0mg/ml. However, $D_1$ significantly activated the channel at 0.5mg/ml, 1.0mg/ml and 2.0mg/ml and its effects on the electrical activity were progressively enhanced with the increase of concentration. The effects could be inhibited by SOD. **Conclusion**: $D_1$ can activate L-type calcium channel of cultured myocardial cells, which might be induced by the superoxide anion.

**Key words** burn; eschar; calcium channel.

* Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 39170743

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