

环维黄杨星 D 对心肌细胞缺氧/复氧损伤的保护作用 和对心肌细胞内游离钙浓度的影响

梁 涛¹, 方泰惠¹, 姚秀娟², 许 立¹, 袁冬平¹, 邱蓉丽¹, 周玲玲^{1*}

(1. 南京中医药大学, 江苏 南京 210029; 2. 西安第四军医大学, 陕西 西安 710033)

[摘要] 目的: 研究环维黄杨星 D(CVB-D) 对培养乳鼠心肌细胞缺氧/复氧损伤的保护作用和对急性分离大鼠心肌细胞内游离 Ca^{2+} 浓度的影响。方法: 采用培养的乳鼠心肌细胞建立缺氧/复氧损伤模型, 测定心肌细胞搏动频率、细胞存活率、肌酸激酶(CK) 的含量; 应用特异性荧光指示剂 Fluo-3/AM 负载急性分离的大鼠心肌细胞, 用激光共聚焦显微镜检测胞内游离钙的变化。结果: 缺氧/复氧损伤+ 环维黄杨星 D 组(H/R+ CVB-D) 乳鼠心肌细胞搏动频率、细胞存活率与缺氧/复氧损伤组比较明显升高, CK 含量与缺氧/复氧损伤组比较明显下降。对急性分离大鼠心肌细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$; 逐步升高, 并呈剂量依赖性; 在有外钙和无外钙时, CVB-D 对胞内钙的升高有显著差异 ($P < 0.05$); 在无外钙并加入内罗啉孵育后, CVB-D 引起的胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$; 轻度升高, 但与无钙组相比无显著性差异 ($P > 0.05$)。结论: 环维黄杨星 D 对培养乳鼠心肌细胞缺氧/复氧损伤有保护作用, 对急性分离大鼠有升高心肌细胞内游离钙离子浓度的作用, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的升高既源于内钙释放又源于外钙内流。

[关键词] 环维黄杨星 D; 心肌细胞; 钙离子; 激光共聚焦显微镜; 缺氧/复氧损伤

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2009)12-0094-04

Protective Effects of Cyclovirobuxine D exposed to Hypoxia-reoxygenation Injury and Experimental Research of Cyclovirbuxine D on Intracellular Free Ca^{2+} Concentration on rat Cardiomyocytes

LIANG Tao¹, FANG Tai-hui¹, YAO Xiujuan², XU Li¹, YUAN Dong-ping¹, QIU Rong-li¹, ZHOU Ling-ling^{1*}

(1. Department of Pharmacology, University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China;

2. Department of Pharmacology, Fourth Military University, Xi'an 710033, China)

[Abstract] **Objective:** To study the protective effects of Cyclovirobuxine D exposed to hypoxia-reoxygenation injury on the cultured myocardial cells and effect of intracellular free Ca^{2+} concentration on rat acute isolated cardiomyocytes. **Methods:** The hypoxia/reoxygenation(H/R) injury model of cultured neonatal rat cardiomyocytes was develop. Myocardial cells beating rate, cell viability, CK were measured. Rat acute isolated cardiomyocytes was measure intracellular free Ca^{2+} concentration by calcium fluorescent probe Fluo-3/AM and laser confocal microscope. **Results:** Compared with H/R group, beating rate, cell viability of H/R+ CVB-D was significantly increased. Compared with H/R group, CK of H/R+ CVB-D was significantly reduced. In Tyrode CVB-D can elevate $[\text{Ca}^{2+}]_i$, its peak values which indicate that the level of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ act in an dose-dependent. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was also significantly higher in Tyrode than that in no calcium Tyrode ($P < 0.05$). In no calcium Tyrode with ryanodine, CVB-D had no effect on level of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ compared with group of no calcium Tyrode ($P > 0.05$). **Conclusion:** CVB-D could protect cultured cardiomyocytes against H/R injury. CVB-D was found to increase rat acute isolated intracellular free Ca^{2+} concentration. The increasing of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was caused by

[收稿日期] 2009-10-13

[通讯作者] * 周玲玲, Tel: (025) 86646302

releasing from intracellular stores and extracellular Ca^{2+} influx.

[**Key words**] Cyclovirbuxine-D; Myocardium; Ca^{2+} ; Laser confocal microscope; hypoxia reoxygenation injury

环维黄杨星 D(CVB-D) 是从黄杨科植物小叶黄杨茎中提取分离得到的一种甙体生物碱^[1], 它对心血管系统具有重要作用, 具有强心、抗心绞痛、扩张血管、抗心律失常等作用。本实验采用离体培养的乳鼠心肌细胞建立缺氧/复氧损伤模型, 以模拟在体的心肌缺血/再灌注损伤, 研究 CVB-D 对体外培养心肌细胞缺氧/复氧损伤的保护作用。钙离子作为细胞内第二信使, 在细胞兴奋、增殖及收缩等反应中起重要作用。本实验采用激光共聚焦显微镜技术, 测定和分析 CVB-D 对心室肌细胞内钙离子的动态变化。

1 实验材料

1.1 动物 SD 大鼠, 体重 250 g 左右, 新生 1~3 d SD 大鼠, 雌雄不拘, 由第四军医大学实验动物中心提供。

1.2 药品与试剂 环维黄杨星 D, 由南京小营制药厂馈赠, 本品为白色粉末状结晶, 批号 990725; 胶原酶型 Fluor-3/AM 美国 Sigma 公司产品; 牛磺酸, 美国 Sigma 公司产品; 左旋谷氨酸, 上海生物工程有限公司产品; 牛血清白蛋白 HEPES, EGTA, 华美生物工程有限公司产品; 新生小牛血清为 Hyclone 公司产品; DMEM 高糖培养基为美国 GIBCO 产品, 四唑盐(MTT), 广州威佳科技有限公司; 肌酸激酶(CK) 试剂盒, 南京建成生物有限公司, 其余均为国产分析纯试剂。

1.3 主要仪器

双相倒置显微镜, 日本 Olympus IMT-2; 激光共聚焦显微镜: 美国 BIO-RAD MRC-1024; 精密扭力天平, 上海第二天平仪器厂 JN-A; PH 计中国 Mettler Toledo; 超级恒温泵, 重庆实验设备厂; 磁力加热搅拌器, 杭州仪表电机厂, BIO-RAD550 型酶标仪(日本生产)。

2 实验方法

2.1 对乳鼠心肌细胞缺氧/复氧的保护作用

2.1.1 乳鼠心肌细胞的分离培养 心肌细胞的培养参考文献^[2]并稍作修改。新生 1~3 d SD 大鼠在无菌条件下, 快速摘取心脏, 置于 Hanks 液中冲洗, 去除心房, 将心室剪成 1 mm × 1 mm 的碎块, 0.1% 胶原酶 37 °C 振荡消化 8 min, 收集细胞混悬液, 500 r·min⁻¹, 离心 5 min, 弃上清, 用含 10% 小牛血清的

DMEM 培养液重悬细胞, 将未消化完的心肌, 按上述步骤重复消化 5~6 次, 直到组织完全消化, 收集细胞混悬液于 180 目滤网过滤, 37 °C 孵箱孵育 90 min, 其中贴壁细胞为心肌成纤维细胞, 未贴壁细胞为心肌细胞, 小心吸取未贴壁的心肌细胞, 按 1×10^4 的密度种植于特制的 50 mm 培养皿, 24 h 后换为无血清 DMEM 培养液继续培养 24 h, 进行实验。

2.1.2 实验分组 分为 4 组: ①正常对照组(Control): 不加任何处理; ②CVB-D($1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组; ③缺氧/复氧损伤模型组(H/R); ④缺氧/复氧损伤+ CVB-D($1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组(H/R+ CVB-D), 在缺氧前 30 min 加入药物。

2.1.3 缺氧复氧损伤模型建立 将培养 72 h 的心肌细胞均换用低氧(3% O_2 , 5% CO_2 , 92% N_2) 孵箱中饱和 30 min 的无血清 DMEM 培养基, 将 H/R 组和 H/R+ CVB-D 组细胞放入 37 °C 的 3% O_2 , 5% CO_2 , 92% N_2 的三气培养箱中, 在此缺氧条件下培养, 16 h 后放入正常孵箱中继续培养 4 h, 造成缺氧/复氧损伤。其余两组继续在 37 °C 5% CO_2 孵箱中培养 20 h。

2.1.4 心肌细胞搏动频率观察 在倒置显微镜下观察各组心肌细胞搏动频率。

2.1.5 心肌细胞存活率测定 采用 MTT 比色法检测, 培养于 96 孔板中的心肌细胞, 接种密度为 $1 \times 10^5 \text{ cell/孔}$, 各组每孔加入 MTT 溶液($5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 20 μL , 37 °C 孵育 4 h 后移弃培养液, 每孔加入 150 μL DMSO, 振荡 10 min, 使结晶物充分溶解。选择 490 nm 波长, 在酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度值, 计算细胞存活率。细胞存活率 = (试验组吸光度值/对照组吸光度值) × 100%

2.1.6 培养液中肌酸激酶(CK) 的含量测定 心肌细胞悬液接种到 24 孔板, 每孔 1 mL, 待细胞贴壁后, 按以上分组及方法处理后, 取其培养液, 根据试剂盒步骤, 测定 CK 的含量。

2.2 对急性分离大鼠心肌细胞内钙含量测定

2.2.1 大鼠心室肌细胞急性分离 大鼠 ip 肝素 4 $\text{IU} \cdot \text{g}^{-1}$ 抗凝血^[3], 再以戊巴比妥钠(40~50) $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ip 麻醉。迅速打开胸腔, 剪下心脏, 置于 4 °C 的台氏液中, 剪去心脏周围结缔组织, 分离升主动脉。将心脏经升主动脉连接悬挂于 Langendorff 装置上, 恒压

逆向灌流^[4]其流程如下:用台氏液灌流溶液灌流 3 min,冲洗心脏中血液。在此过程中,心脏由于复温而复跳。用含 0.5 mg·mL⁻¹胶原酶和 1 mg·mL⁻¹ BSA 的无钙台氏液溶液循环灌流 35~ 40 min,在此过程中,流速一直持续在慢流速状态,心脏逐渐肿胀发白变软。当胶原酶消化适宜时,流速突然增大,此时应立即停止酶液灌流。用 KB 溶液(室温)灌流 5 min,冲洗残留在心肌内的胶原酶。在 KB 液中剪碎心肌,用 150 目滤网过滤,室温下保存至少 1 h 后实验。吸取急性分离后的心肌细胞悬液,种植于特制的 50 mm 培养皿中进行实验。

2.2.2 Fluor-3/AM 的负载 大鼠急性分离的心室肌细胞,用无钙台氏液洗涤细胞 3 次,于室温避光条件下用 Fluor-3/AM(10 μmol·L⁻¹)负载细胞 30 min,于荧光显微镜下观察负载情况,如荧光强度较低,负载时间适当延长 10~ 20 min,然后用台氏液洗去细胞外残余染料。

2.2.3 细胞内钙的测定 将培养皿置于 ACAS570 载物台上,常温下测定所选定细胞内的钙值,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 Fluor-3 在波长 488 nm 处激发,发射波长 526 nm,采样频率为 488 Hz,共聚焦系统由 BIO-RAD 公司提供的软件控制,在 Pentium 90 计算机中运行,每皿选 2~ 3 个视野,以平均荧光强度变化反映胞内游离钙浓度的相对水平。

2.2.4 实验分组 台氏液组 CVB-D10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵ mol·L⁻¹;无钙台氏液组: CVB-D10⁻⁵ mol·L⁻¹;内罗啉组:在无钙台氏液中内罗啉 10⁻⁴ mol·L⁻¹ 孵育 10 min 后,加入 10⁻⁵ mol·L⁻¹ CVB-D 进行检测。

2.2.5 数据分析 数据经 Pentium 90 微机系统进行实时测量而获得。实验结果均以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,数据处理采用组间或配对 *t* 检验。

3 结果

3.1 对乳鼠心肌细胞缺氧复氧的保护作用 CVB-D 对缺氧复氧乳鼠心肌细胞的搏动频率、细胞存活率、肌酸激酶(CK)的影响(见表 1)。

表 1 CVB-D 对心肌细胞搏动频率、存活率及培养液中 CK 含量的影响

组别	搏动频率(beat/min)	细胞存活率(%)	CK(U·mL ⁻¹)
Control	95.45 ± 6.78 ²⁾	97.56 ± 1.09 ²⁾	0.346 ± 0.045 ¹⁾
CVB-D	90.14 ± 8.12 ²⁾	96.32 ± 2.08	0.387 ± 0.033
H/R	37.82 ± 9.23	30.17 ± 6.45	0.552 ± 0.026
H/R+ CVB-D	80.12 ± 10.67 ²⁾	73.65 ± 5.12 ²⁾	0.423 ± 0.052 ¹⁾

注:与 H/R 组比较, ¹⁾ *P* < 0.05, ²⁾ *P* < 0.01

3.2 对急性分离大鼠心肌细胞内钙含量测定 台氏液中 CVB-D 浓度为 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵ mol·L⁻¹ 时,心肌细胞内 [Ca²⁺]_i 逐渐升高,峰值分别为 52.78 ± 1.41, 59.86 ± 4.17, 62.99 ± 2.66, 有明显的剂量依赖性,无时间依赖性。在无外钙时,加入 10⁻⁵ mol·L⁻¹ CVB-D,胞内 [Ca²⁺]_i 峰值为 55.98 ± 1.21;在有外钙时,加入 10⁻⁵ mol·L⁻¹ CVB-D,胞内 [Ca²⁺]_i 峰值为 62.99 ± 2.66,二者相比有显著性差异,达峰时间无差异。在无钙台氏液中加入内罗啉孵育 10 min 后,加入 10⁻⁵ mol·L⁻¹ CVB-D,胞内 [Ca²⁺]_i 峰高 56.98 ± 1.32;在无钙台氏液中加入 10⁻⁵ mol·L⁻¹ CVB-D 峰高为 55.98 ± 1.21,二者相比无显著性差异,达峰时间无差异。见表 2。

表 2 CVB-D 对急性分离大鼠心肌细胞内 [Ca²⁺]_i 的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

分组	静息值(FI)	峰值(FI)	达峰时间(s)
10 ⁻⁷ mol·L ⁻¹ CVB-D	51.24 ± 1.28	52.78 ± 1.41	52.92 ± 19.52
10 ⁻⁶ mol·L ⁻¹ CVB-D	52.29 ± 4.97	59.86 ± 4.17 ¹⁾	51.31 ± 16.11
10 ⁻⁵ mol·L ⁻¹ CVB-D	51.25 ± 1.32	62.99 ± 2.66 ^{1,2)}	52.28 ± 16.11
无钙台式液+ 10 ⁻⁵ mol·L ⁻¹ CVB-D	50.04 ± 2.23	55.98 ± 1.21	51.97 ± 19.27
无钙台式液+ 内罗啉+ 10 ⁻⁵ mol·L ⁻¹ CVB-D	51.14 ± 1.42	56.98 ± 1.32	52.21 ± 17.84

注:与 10⁻⁷ mol·L⁻¹ CVB-D 组比较¹⁾ *P* < 0.01,与无钙台式液+ 10⁻⁵ mol·L⁻¹ CVB-D 比较²⁾ *P* < 0.01

4 讨论

通过体外培养乳鼠心肌细胞可以排除神经体液等在体因素的干扰。心肌缺血/再灌注损伤是缺血性心肌病最为常见的并发症。体外缺氧/复氧损伤与在体心肌细胞缺血/再灌注具有相似的表现和机制,氧自由基的形成、心肌损伤有关酶类含量的急剧升高、细胞死亡和凋亡、钙超载是心肌缺氧/复氧引起细胞损伤的主要机制^[5]。本实验结果显示 CVB-D 对乳鼠心肌细胞缺氧/复氧引起细胞损伤有保护作用,使心肌细胞搏动频率及存活率显著提高,降低 CK 含量,从而保护心肌细胞损伤。

细胞内游离钙离子在细胞信息传递过程中起着重要作用。游离钙离子浓度能反映细胞的状态、药物和环境等对细胞的影响。我们采用第三代钙离子荧光指示剂 Fluor-3,利用激光共聚焦扫描技术来观察胞内钙离子的空间和时间变化。

研究发现, CVB-D 能升高急性分离的大鼠心肌细胞的细胞内游离钙浓度,并呈剂量依赖性。同时

研究发现, CVB-D 在无钙台式液中, 可引起胞内钙离子浓度升高, 并与台氏液中钙离子的升高有显著性差异。提示 CVB-D 可能不仅能促进细胞外钙离子内流, 而且能促进细胞内钙离子释放。我们又在无钙台氏液中加入内罗啉 $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 孵育 10 min 后, 再加入 $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CVB-D 进行检测, 结果显示 CVB-D 能使胞内钙离子浓度升高, 但与无钙台氏液组相比无统计学意义, 内罗啉是一种中性植物碱, 内罗啉受体可以调节肌浆网的钙离子释放^[6]。因此我们推测 CVB-D 能促进细胞内钙的释放, 但可能不是通过内罗啉受体来实现的。

通过以上实验, 我们发现 CVB-D 可以升高心肌细胞内游离钙离子浓度, 可能不仅促进细胞外钙离子内流, 而且能促进细胞内钙离子释放, 机制尚不清楚, 这与其临床具有强心机制相符合。同时研究发现, 其对缺氧/复氧的心肌细胞有保护作用, 表明虽然 CVB-D 可升高台氏液和无钙台氏液细胞内钙离子含量, 但对缺氧/复氧的心肌细胞有保护作用, 这可能与 CVB-D 可通过清除氧自由基, 抗脂质过氧化及降低细胞凋亡率等多方面机制保护缺氧/复氧损

伤后的心肌细胞有关。

[参考文献]

- [1] 唐有元, 邓晨安, 梁秉文. 中国小叶黄杨不同部位中生物碱含量的研究[J]. 中草药, 1981, 12(3): 43.
- [2] Lee H W, Eghbali Webb M. Estrogen enhances proliferative capacity of cardiac fibroblasts by estrogen receptor and mitogen-activated protein kinase-dependent pathways[J]. J Mol Cell Cardiol, 1998, 30(11): 1395.
- [3] Gromez A M, Benitah J P, Henzel D, *et al.* Modulation of electrical heterogeneity by compensated hypertrophy in rat left ventricle[J]. Am J Physiol, 1997; 272(Heart Circ Physiol 41): H1078.
- [4] 李慈珍, 刘远谋, 王红卫, 等. 耐钙心肌细胞的分离和电生理特征观察[J]. 中国应用生理学杂志, 1994; 10(4): 359.
- [5] Das S, Falch. iM, Bertelli A, *et al.* Attenuation of ischemia/reperfusion injury in rats by the anti-inflammatory action of resveratrol [J]. *Arzneimittelforschung*, 2006, 56(10): 700-706.
- [6] 王 进, 高天礼. 心肌细胞的钙致钙释放[J]. 生理科学进展, 1997, 28(2): 169.