

眼睛蛇毒心脏毒素对大鼠心肌细胞收缩及细胞内钙离子的作用

杨育红,单丹,杜洪文,王洪新(锦州医学院药理教研室,辽宁 锦州 121001)

摘要:目的 研究眼睛蛇毒心脏毒素(Cardiotoxin, CTX)对心肌细胞的形态、收缩幅度和细胞内钙离子($[Ca^{2+}]_i$)的作用。方法 应用荧光计量法(以 Fura-2/AM 为荧光染料)及光学成像系统来测定单个心肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 和收缩幅度。结果 0.001 ~ 1 $\mu\text{mol/L}$ 的 CTX 使心肌细胞由杆状变成圆形,药物的作用从第 1 分钟时开始,到第 20 分钟时趋于稳定。在电刺激存在的情况下,1 $\mu\text{mol/L}$ 的 CTX 最初导致电诱导的 $[Ca^{2+}]_i$ 和收缩幅度瞬间增加,接下来 $[Ca^{2+}]_i$ 时程延长,最终细胞对电刺激不敏感、突然收缩、 $[Ca^{2+}]_i$ 持续增高。在缺乏电刺激的情况下,1 $\mu\text{mol/L}$ 的 CTX 可诱导 Ca^{2+} 震荡波、持续性 $[Ca^{2+}]_i$ 增高,这种作用与 40mmol/L 的 KCl 和 10mmol/L 咖啡因所引起的 $[Ca^{2+}]_i$ 瞬间增加不同。结论 CTX 作用初期使 $[Ca^{2+}]_i$ 增高,使细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 超载,同时伴随细胞形状的改变。

关键词:心脏毒素; 心肌细胞; 细胞内钙; 眼睛蛇毒

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2005)06-0448-04

YANG Yu-hong, SHAN Dan, DU Hong-wen, WANG Hong-xin (Department of Pharmacology, Jinzhou Medical College, Jinzhou 121001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the effects of Cobra venom cardiotoxin (CTX) on the cellular morphology, twitch amplitude and intracellular calcium of ventricular myocytes. **METHOD** $[Ca^{2+}]_i$ and twitch amplitude were determined with a fluorometric ratio method using Fura-2/AM and a videomicroscopic technique, respectively. **RESULTS** Addition of 0.001-1 $\mu\text{mol/L}$ CTX led to a time-dependent loss of rod shaped cells, beginning at 1 min, and remaining stable by 20 min. CTX 1 $\mu\text{mol/L}$ initially caused a transient augmentation in amplitude of the electrically induced- $[Ca^{2+}]_i$ transient and twitch amplitude in the single cardiac myocyte. This was followed by a prolongation in duration of $[Ca^{2+}]_i$. In the absence of electrical stimulation, 1 $\mu\text{mol/L}$ CTX induced a $[Ca^{2+}]_i$ spike followed by a sustained elevation of $[Ca^{2+}]_i$, an effect different from that of 40 mmol/L KCl or 10 mmol/L caffeine, which caused a transient elevation in $[Ca^{2+}]_i$. **CONCLUSION** The observations indicate that CTX causes an elevation in $[Ca^{2+}]_i$, which may be related to the change of cellular morphology.

KEY WORDS: cardiotoxin; cardiomyocytes; $[Ca^{2+}]_i$ transient; snake venom

蛇毒毒素不仅包括神经毒素,还包括心脏毒素(CTX)^[1]。心脏毒素是一种作用于细胞膜的多肽酶。由于它的毒性作用包括对多种组织的细胞膜的去极化及最终的细胞溶解,所以也被认为是直接的溶解因子。其中,它的心脏毒性被认为是主要的致命因素^[2]。蛇毒心脏毒素可以诱导离体灌注的心脏^[3]及分离的豚鼠的乳头肌^[4]在短时间的收缩后产生强直收缩。到目前为止,蛇毒心脏毒素对心肌的这种作用机制尚不清楚。本实验主要观察 CTX 对细胞内钙离子、收缩及形态学方面的作用,研究 CTX 诱导的细胞内钙离子的升高对细胞收缩及死亡的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞分离

用胶原酶灌注的方法是从成年 SD 大鼠(200 ~ 250g)分离单个心肌细胞^[5]。将大鼠断头后,快速取出心脏。首先用含 Ca^{2+} 1.25 mmol/L 及无 Ca^{2+} 的 Eagle's 培养基灌流心脏 5min,然后用含胶原酶 I 型(125U/mL)缓冲液灌流 35 ~ 45min。取下心脏,剪除心房部分,剪碎心室后通过 250 μm 的钢网过滤。心肌细胞沉淀后置于含 2% 血清白蛋白的培养基中。细胞外液 Ca^{2+} 浓度逐渐增加到 1.25mmol/L。

1.2 细胞形态测量

将心肌细胞置于含有 Krebs 碳酸氢盐缓冲液(125mmol/L NaCl, 5mmol/L KCl, 1.2mmol/L $MgSO_4$, 1.2mmol/L KH_2PO_4 , 1.25mmol/L $CaCl_2$, 25mmol/L $NaHCO_3$, 11 葡萄糖和含 1% 牛血清白蛋白)的培养皿中培养,用细胞计数器在显微镜下计数杆形细胞的比例。

1.3 细胞收缩幅度的测量

应用光学成像系统^[6]来测量收缩幅度。将心肌细胞转移到细胞灌流室中,用 Krebs 缓冲液灌流心肌细胞,灌流液中通以 95% O_2 和 5% CO_2 ,用电刺激器给心肌细胞以 0.2Hz 的场刺激,采用自动图象分析系统来测量心肌细胞收缩幅度。在细胞收缩幅度保持 10min 不变的情况下,加入不同浓度的

CTX 并记录收缩幅度的变化。

1.4 Fura-2 负载

在室温下,将分离后的心肌细胞,用含 Fura-2/AM (4 $\mu\text{mol/L}$)的培养基孵育 25min,然后用新鲜培养基洗细胞两次,以去除没有结合的 Fura-2/AM 染料。

1.5 荧光比值的测量

荧光比值用双波长微量荧光光度仪(PTI)测量。首先将 Fura-2 负载后的心肌细胞转移到细胞灌流室中,用 Krebs 缓冲液灌流心肌细胞,灌流液中通以 95% O_2 和 5% CO_2 。用电刺激器给心肌细胞以 0.2Hz 的场刺激,在倒置显微镜下选取单个心肌细胞,用计算机记录波长 340nm (F340) 和 380nm (F380)处的荧光信号。F340/F380 的比值代表了心肌细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的瞬间改变,具体记录 $[Ca^{2+}]_i$ 的瞬间改变的最大幅度、静息比值及 $[Ca^{2+}]_i$ 瞬变下降 80% 所需时间 (T80L, ms),后者反映了 $[Ca^{2+}]_i$ 的瞬间改变的时间。

1.6 药物

Fura-2/AM,胶原酶及 Caffeine 等药品从 Sigma 公司购买。Fura-2/AM 用二甲基亚砜(DMSO)溶解,其他化学药品用蒸馏水溶解。CTX 用色谱法从 *Naja naja atra* 分离提纯。纯化的 CTX 静注鼠体内测其 LD_{50} 为 2.0mg/kg。

1.7 统计分析

单因素方差分析(one-way ANOVA)来确定多组间的差异。采用配对 *t* 检验来确定药物在不同时间的作用效果。 $P < 0.05$ 被认为具有显著性差异。

2 结果

2.1 CTX 对心肌细胞形状的作用

分离的大鼠心肌细胞大多呈杆形(>70%),且不被台盼蓝染色。CTX 0.001 ~ 1 $\mu\text{mol/L}$ 导致心肌细胞强收缩,杆形细胞呈时间依赖性消失,变为圆形。所有的细胞在 15min 内均呈现高收缩。不同浓度的 CTX 作用的最终结果是相同的,然而高浓度的 CTX 发生作用所需的时间更短。结果如表 1。

表1 不同浓度的CTX对心肌细胞杆形保持率的影响($n=6, \bar{x} \pm s$)

Tab 1 Changes in the presence of rod-shaped cells during incubation in the presence of various concentrations of CTX in rat ventricular cells($n=6, \bar{x} \pm s$)

浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	不同时间(min)心肌细胞杆形保持率(%)						
	0	1	5	10	15	20	30
对照组	75 $\pm$ 5	74 $\pm$ 6	74 $\pm$ 4	73 $\pm$ 4	73 $\pm$ 5	72 $\pm$ 6	73 $\pm$ 5
CTX 0.0001	74 $\pm$ 4	73 $\pm$ 5	75 $\pm$ 7	74 $\pm$ 5	72 $\pm$ 6	74 $\pm$ 7	72 $\pm$ 6
CTX 0.001	76 $\pm$ 2	73 $\pm$ 8	72 $\pm$ 5	66 $\pm$ 4 *	12 $\pm$ 5 * *	18 $\pm$ 2 * *	2 $\pm$ 1 * *
CTX 0.01	77 $\pm$ 3	60 $\pm$ 7 *	8 $\pm$ 2 * *	1 $\pm$ 0 * *	1 $\pm$ 0 * *	0 * *	0 * *
CTX 0.1	73 $\pm$ 5	48 $\pm$ 2 * *	6 $\pm$ 1 * *	2 $\pm$ 0 * *	0 * *	0 * *	0 * *
CTX 1	73 $\pm$ 8	7 $\pm$ 1 * *	2 $\pm$ 1 *	0 * *	0 * *	0 * *	0 * *

注: * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 与对照组比较
Note: Compared with the control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

2.2 CTX对分离心肌细胞[Ca²⁺]_i的作用

CTX 1 $\mu\text{mol/L}$ 持续灌流导致心肌细胞[Ca²⁺]_i快速增加以及接下来的持续增高,CTX的作用与40mmol/L KCl(去极化因子)或10mmol/L咖啡因对心肌细胞的作用不同。KCl和咖啡因均导致[Ca²⁺]_i瞬时增高,后者持续时间相对较短,但两个过程中的[Ca²⁺]_i没有持续增高的这一阶段。CTX对[Ca²⁺]_i作用的同时伴随着细胞的高收缩,使细胞从杆形变为圆形。用缓冲液冲洗掉CTX后,并不能将细胞[Ca²⁺]_i恢复到静息水平,细胞也不能恢复到原来的杆形形状。

2.3 CTX对电刺激的单个心肌细胞的收缩幅度和[Ca²⁺]_i瞬变的作用

1 $\mu\text{mol/L}$ 的CTX使电刺激的单个心肌细胞的收缩幅度瞬间增高,接着有突发性的细胞颤动。最终细胞由杆形状转为圆形之后变得缺乏电兴奋性。结果如表2。

1 $\mu\text{mol/L}$ 的CTX也能导致电刺激的单个心肌细胞[Ca²⁺]_i瞬变的初始幅度瞬间增加,[Ca²⁺]_i的静息比值略有增加。这与电刺激的单个心肌细胞的收缩所表明的CTX作用类似。接下来[Ca²⁺]_i瞬变和振荡的时间(T80L)延长。最终细胞不再兴奋,突然高收缩,[Ca²⁺]_i增多明显。结果如表2。

表2 CTX 1 $\mu\text{mol/L}$ 对电刺激的单个心肌细胞的收缩幅度和[Ca²⁺]_i瞬变的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 2 Effects of CTX on contraction and [Ca²⁺]_i transient of isolated single rat ventricular myocytes electrically stimulated at 0.2 Hz($\bar{x} \pm s, n=6$)

	给CTX前	给CTX后
收缩幅度(μm)	4.5 $\pm$ 0.7	7.3 $\pm$ 0.9 * *
荧光比值(340/380)		
最大幅度	1.2 $\pm$ 0.2	2.3 $\pm$ 0.2 * *
静息比值	0.9 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.1 *
T80L(ms)	986 $\pm$ 38	2420 $\pm$ 30 * *

注: * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 与给药前比较
Note: Compared with pre-treatment, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

3 讨论

本实验应用应用光学成像系统及直接的荧光Ca²⁺指示剂方法,首次研究CTX对心肌细胞收缩幅度和[Ca²⁺]_i的影响。已有研究表明CTX在引起心脏电生理和收缩紊乱的剂量范围内^[3,4]导致心肌收缩幅度增加,最终导致不可逆的高收缩。该种作用可能与[Ca²⁺]_i调节机制的破坏有关。

电刺激心肌细胞引起Ca²⁺内流增加,通过Ca²⁺诱导和Ca²⁺释放机制使肌浆网释放Ca²⁺,最终引起细胞收缩^[7]。以前的资料表明电刺激诱导的[Ca²⁺]_i瞬变的大小是与心肌收缩的幅度直接相关^[8]。本实验也揭示电刺激单个心肌细胞后CTX导致[Ca²⁺]_i瞬变和收缩幅度的增加,[Ca²⁺]_i瞬变和[Ca²⁺]_i振荡,[Ca²⁺]_i持续增加并最终导致高收缩。缺氧再供氧和局补缺血诱导的细胞损伤中,也可以观察到[Ca²⁺]_i相似的改变^[9]。[Ca²⁺]_i的增加是导致细胞中毒和最终细胞死亡的共同原因。

已经证实,当[Ca²⁺]_i超过某一水平并持续一段时间时,细胞就丧失了收缩的能力^[10]。在本次研究中,观察到CTX引起的静止细胞初始的[Ca²⁺]_i峰增加,这与KCL及caffeine诱导的[Ca²⁺]_i增加相似,然而第二阶段的[Ca²⁺]_i保持在高水平达很长时间,明显与后两者不同,提示它们的作用机制不同。

心肌细胞内持续高水平的[Ca²⁺]_i增高很可能是细胞收缩障碍、形状改变及最终死亡的原因。就CTX诱导[Ca²⁺]_i增高,我们设想了一些机制:Ca²⁺通过特异或非特异性Ca²⁺通道、肌膜的Na²⁺-Ca²⁺交换及肌浆网Ca²⁺螯合的损害等,具体机制尚需进一步研究。

参考文献

[1] Lee CY. Chemistry and pharmacology of polypeptide toxins in snake venoms[J]. Annu Rev Pharmacol,1972,12:265-286.
[2] Dufton MJ, Higer RC. Satructure and pharmacology of elapid cytotoxins[J]. Pharmacol Ther,1988,36:1-40.
[3] Sun JJ, Walker MJA. Action of cardiotoxins from the southern Chinese corba (Naja najia atra) on rat cardiac tissue[J]. Toxicon,1986,24:233-245.
[4] Harvey AL, Marshall RJ, Karlsson E. Effects of purified cardio-

- toxins from the Thailand cobra (*Naja naja siamensis*) on isolated skeletal and cardiac muscle preparations[J]. *Toxicon*, 1982, 20:379-396.
- [5] Wang HX, Wong TM, Kwan CY. Tetrandrine inhibits electrically-induced $[Ca^{2+}]_i$ transient in the isolated single rat cardiomyocyte[J]. *Eur J Pharmacol*, 1997, 319:115-122.
- [6] Barry WH, Smith TW. Mechanisms of transmembrane calcium movement in cultured chick embryo ventricular cells[J]. *J Physiol (Lond)*, 1982, 325:243-260.
- [7] Fabiato A. Time and calcium dependence of activation and inactivation of calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac Purkinje cell[J]. *J Gen Physiol*, 1985, 85:247-290.
- [8] Janczewski AM, Lakatta EG. Buffering of calcium influx by sarcoplasmic reticulum during the action potential in guinea-pig ventricular myocytes[J]. *J Physiol (London)*, 1993, 471:343-363.
- [9] Silverman HS, Stern MD, Lakatta EG. Contrasting effects of anoxia and graded hypoxia on single cardiac myocyte function[J]. *Am J Cardiovasc Pathol*, 1992, 4:256-264.
- [10] Josephson RA, Silverman HS, Lakatta EG, *et al.* Study of the mechanisms of hydrogen peroxide and hydroxyl free radical-induced cellular injury and calcium overload in cardiac myocytes [J]. *J Biol Chem*, 1991, 266:2354-2461.

收稿日期:2004-06-10