

ANGIOTENSIN II SIGNAL TRANSDUCTION PATHWAY IN NORMAL HUMAN FETAL LUNG DIPLOID FIBROBLAST CELL LINE-WI-38

WANG Xiao Dan^{***} CHENG Xiang Mei^{**} FEN Zhe^{*} FU Bo^{*} ZHOU Feng^{*} HONG Quan^{*} FAN Dai Ming

(*The Department of Nephrology, the PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

(**The Department of Digestion, the Forth Military Medical School, Xian 710032, China)

ABSTRACT To investigate the angiotensin II signal transduction pathway in cultured human fetal lung diploid fibroblast cell strain-WI-38, immunofluorescent staining and confocal microscopy, the electrophoretic mobility shift assay(EMSA) and western blot were used to detect the activities of signal transducers and activators of transcription-STAT3 and STAT1 in WI-38 cells stimulated by AngII. Results showed that AngII induced the phosphorylation of STAT3 and STAT1 by AT₁ receptor and the resulting complex dominated with SIF-A was formed, translocated to the nucleus and bound to DNA to regulate the transcription of related genes. It is suggested that the JAK/STAT pathway mediate AngII signal transduction in WI-38.

Key words: WI-38 cells AngiotensinII Signal transduction

白细胞介素-2对心肌负性肌力作用机制的探讨*

曹春梅* 夏强 张雄 张玮 陈君柱

(浙江大学医学院 杭州 310031)

摘要 为研究白细胞介素-2(IL-2)对心肌的负性肌力作用的可能机制,本文采用酶解分离成年大鼠心室肌细胞,用细胞内双波长荧光系统和膜片钳全细胞记录检测细胞膜钙离子通道和细胞内酸碱度(pHi)及钙水平的变化,分别以 fura-2/AM 和 BCECF/AM 作为细胞内钙离子和氢离子荧光指示剂。结果:(1)IL-2(2.5-200U/ml)浓度依赖性地降低单个心室肌细胞电刺激诱导的钙瞬变幅度,使舒张末钙水平升高,选择性 κ -阿片受体阻断剂 nor-BNI(10nmol/L)可阻断 IL-2 对心肌细胞内钙的作用;(2)用 200U/ml 的 IL-2 灌流 10min 后,与对照组相比膜片钳全细胞记录的 L-型钙电流无明显改变;(3)用 200U/ml 的 IL-2 灌流后,与对照组相比 Mn²⁺ 对 fura-2/AM 的淬灭率无明显改变。(4)IL-2(200U/ml)使大鼠心室肌细胞 pHi 降低,其作用可被选择性 κ -阿片受体阻断剂 nor-BNI(10nmol/L)所减弱。结论:IL-2 引起的心室肌细胞 pHi 降低可能是其负性肌力作用机制之一,细胞膜上 L-型钙离子通道可能不参与 IL-2 降低心肌收缩力的作用;细胞膜上的 κ -阿片受体可能介导 IL-2 对心肌的负性肌力作用。

关键词: 白细胞介素-2 心室肌细胞 钙通道 细胞内酸碱度 细胞内钙

本实验室发现,白细胞介素-2(interleukin-2, IL-2)可以抑制大鼠心室肌细胞收缩和降低心肌细胞内的游离钙离子浓度^[1-3]。为了探明与心肌负性肌力作用相伴的细胞内游离钙浓度的改变是否是通过影响细胞膜上的钙离子通道而引起的,在本研究中我们使用膜片钳全细胞记录和光学方法研究了 IL-2 对心肌细胞膜上钙离子通道的影响。

另一方面,有研究报道表明,细胞内的酸化可能是心肌细胞产生负性肌力效应的因素之一^[4]。如在缺血发生的最初几分钟内,细胞内酸化的程度就足以降低心肌收缩力^[5]。目前,有关细胞因子 IL-2 对细胞内酸碱度(pHi)的研究未见报道。本文选用成

年 Sprague-Dawley(SD)大鼠,酶解分离心室肌细胞,以细胞内双波长荧光检测技术,研究 IL-2 对大鼠心肌细胞 pHi 的影响,以探讨 IL-2 的负性肌力作用的可能机制。

材料和方法

1. 药品与溶液

本文 2002 年 7 月 26 日收到,11 月 22 日接受。
基金项目:浙江省自然科学基金青年人才专项基金资助(RC99038)。

* 浙江大学博士后研究人员。
Email: xiaqiang@zju.edu.cn

I型胶原酶(collagenase type I),牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA), nor-binaltorphimine(nor-BNI), 3-(N-吗啡啉)丙磺酸(3-(N-morpholino) propane-sulfonic acid, MOPS), HEPES, EGTA, 牛磺酸(taurine), 2-bis-(2-aminophenoxy)-ethane-N,N,N',N' tetraacetic acid-acetomethyl ester(BAPTA-AM), nigericin, 2, 3-butanedione monoxime, fura-2-acetoxymethyl ester and 2', 7'-bis-(2-carboxy-ethyl)-5, 6-carboxyfluorescein(BCECF/AM)均由 Sigma 公司出品; IL-2 由上海华新生物高技术有限公司出品。

无钙 Tyrode 氏液成分(mmol/L): NaCl 100.0, KCl 10.0, KH_2PO_4 1.2, MgSO_4 5.0, 葡萄糖 20.0, 牛磺酸 10.0, MOPS 10.0(pH7.2)。Krebs-Henseleit(K-H)液成分(mmol/L): NaCl 118.0, KCl 4.7, KH_2PO_4 1.2, MgSO_4 1.2, NaHCO_3 25.0, CaCl_2 1.25, 葡萄糖 10.0(pH7.4)。

孵育液成分(mmol/L): NaCl 130.0, KCl 4.7, KH_2PO_4 0.1, MgSO_4 1.2, CaCl_2 0.1, HEPES 10.0, 葡萄糖 10.0(pH7.4)。

电极内液成分为(mmol/L): KCl 140.0, MgCl_2 3.0, HEPES 10.0, EGTA 10.0, pH7.3。

细胞外液成分(mmol/L): NaCl 137.0, KCl 5.4, MgCl_2 1.0, CaCl_2 1.2, HEPES 10.0, 葡萄糖 10.0, pH7.4。

HBS 灌流液成分(mmol/L): NaCl 118.0, KCl 4.8, MgCl_2 1.2, CaCl_2 1.25, 葡萄糖 11.0, HEPES 25.0, 丙酮酸 5.0(pH7.4)。

细胞内 pH 值校准溶液(mmol/L): KCl 140, MgCl_2 1.0, HEPES 4.0, EGTA 2.0, 2, 3-butanedione monoxime 30, BAPTA-AM 0.05, nigericin 0.014。

2. 心室肌细胞酶解分离

用酶解法分离心室肌细胞^[6]。雄性 SD 大鼠, 由浙江大学实验动物中心提供, 体重 $240 \pm 10\text{g}$, 用断头器处死后, 迅速打开胸腔, 取出心脏, 置于 4°C 氧饱和 Tyrode 氏液中洗净血液后移入盛有 4°C 氧饱和 Tyrode 氏液的培养皿中, 游离主动脉根部, 插入主动脉套管, 然后固定于 Langendorff 灌流装置上进行恒流灌流, 灌流液温度 37°C , 流速 $10\text{ml}/\text{min}$, 并以 $95\% \text{O}_2 + 5\% \text{CO}_2$ 饱和。先以无钙 Tyrode 氏液灌流 5min, 再以含 I 型胶原酶 $0.3\text{g}/\text{L}$ 的无钙 Tyrode 氏液灌流 10min。将心脏从 Langendorff 灌流装置上取下, 剪去心房和基底部组织, 然后将心室肌剪碎, 并用广口吸管缓慢吹打, 于含 0.1% BSA 的无钙 Tyrode 氏液中 37°C 孵育 15min。得到的细胞悬液用 $200\mu\text{m}$ 的尼龙网过滤。滤液在无钙 Tyrode 氏液中逐步复钙至 Ca^{2+} 浓度为 $1.25\text{mmol}/\text{L}$ 。获得的细胞在室温下静置 1-2h 后备用。

3. 细胞内游离钙的测定

用细胞内双波长荧光系统(T. I. L. L., 德国)检测细胞内游离钙离子浓度, 以 fura-2/AM 为钙指示剂。细胞用含有 $5\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 fura-2/AM 室温下负载 30min, 负载后的细胞用含 1% BSA 的 K-H 液以 $500\text{r}/\text{min}$ 离心去除负载液并洗涤三次, 于室温下静置待测 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 。负载 fura-2/AM 的细胞悬液 ($100\mu\text{l}$) 加在浴槽中待细胞贴壁, 以 $95\% \text{O}_2 + 5\% \text{CO}_2$ 饱和的

K-H 液持续灌流。在灌流槽中通过片状铂电极施加频率为 0.2Hz , 强度为 50V 的电场刺激诱导细胞兴奋(特别指出的除外), 在电刺激下产生的细胞内钙离子浓度变化峰值为钙瞬变。光信号通过 T. I. L. L 放大器经 Digidata 1200(美国 Axon 公司)输入计算机, 由 pClamp7.0 软件记录分析。荧光激发波长分别为 340nm 和 380nm , 发射波长 510nm , 其荧光比值可反映细胞内钙离子浓度^[7]。

4. 膜片钳全细胞记录

将细胞悬液加入标本池内, 并置于倒置显微镜(IX-70, Olympus, 日本)工作台上, 细胞贴壁后于室温下用细胞外液灌流($2\text{ml}/\text{min}$)。玻璃微电极由自动控制仪(P-97, Sutter, 美国)制备, 用电极内液充灌, 电极电阻为 $1.5 - 3.0\text{M}\Omega$ 。利用三维操纵器(MHW-3, Narishige, 日本)移动电极, 并轻压在细胞表面, 稍加负压后即可形成 $10\text{G}\Omega$ 以上的高阻封接, 再用较大负压吸破细胞膜, 补偿电容电流和电极串联电阻, 形成全细胞记录形式。信号经 Ag/AgCl 电极引导, 由膜片钳放大器(Axopatch 200B, Axon, 美国)放大, 计算机通过软件经模/数转换系统(Digidata 1200)采集数据, 并进行数据分析。

5. 光学法测定细胞膜钙离子通道的活性

使用 Mn^{2+} 淬灭实验检测钙通道的活性^[8]。记录信号的激发波长为 360nm , 发射波长为 510nm 。将 fura-2/AM 负载后静息状态的心肌细胞置于标本池内, 待贴壁后用孵育液持续灌流, 同时施加频率为 0.2Hz 的电场刺激诱导细胞兴奋。灌流 15min 后, 将灌流液切换为含有 $0.2\text{mmol}/\text{L}$ MnCl_2 的孵育液, 同时将电刺激停止, 1min 后再施加频率为 1.0Hz 的电场刺激。 Mn^{2+} 通过电压敏感型钙通道进入细胞内使 fura-2/AM 荧光淬灭。钙通道的活性用电刺激激活的 fura-2/AM 淬灭率来表示。

6. 细胞内酸碱度(pH_i)的测定

用细胞内双波长荧光系统检测 pH_i ^[9]。以 BCECF/AM 作为荧光探针。心肌细胞用 $5\mu\text{mol}/\text{L}$ BCECF/AM 的 HBS 液负载 30min。然后, 将负载后的细胞用含有 1% BSA 无荧光染料的 HBS 液洗脱三次。在室温下静置 30min 后开始检测 pH_i 。负载后的细胞悬液 ($100\mu\text{l}$) 加在浴槽中待细胞贴壁, 以 $100\% \text{O}_2$ 饱和的 HBS 液持续灌流。光信号通过 T. I. L. L 放大器经 Digidata 1200 输入计算机, 由 pClamp 7.0 软件记录分析。BCECF/AM 的激发波长是 440 和 500nm , 发射波长为 530nm 。荧光信号采样频率为 10Hz , 以 500 与 440nm 的荧光比值反映 pH_i 。

在实验结束时每一个细胞的荧光比值用不同 pH 值 ($6.7, 6.8, 7.0, 7.2, 7.4$ 和 7.8) 的溶液在原位进行校准。在 pH 值为 $6.5 - 7.8$ 的范围内, pH 值和荧光比值之间存在线性关系, 荧光比值与校准溶液 pH 值的线性回归决定每一个细胞的 pH_i 。

7. 实验方案

实验主要分为三部分: 细胞内游离钙、细胞膜钙离子通道和细胞内酸碱度的测定。分组及处理如下:

第一部分: 细胞内游离钙测定 空白对照组 ($n = 8$),

心肌细胞不作任何处理,连续观察 30min。

IL-2 对细胞内钙作用组。IL-2 剂量效应组 ($n = 14$): 灌流液中 IL-2 浓度分别为 0.5、2.5、10、50 和 200U/ml, 实验观察时间为 25min; IL-2 时间效应组 ($n = 12$): 一次加药后使灌流液中 IL-2 浓度达 200U/ml, 持续观察 30min。

阿片受体阻断剂对 IL-2 作用影响组。nor-BNI + IL-2 组 ($n = 14$): 心肌细胞用 10nmol/L nor-BNI 预处理 10min 后, 在灌流液中加入 IL-2, 使其浓度分别为 0.5、2.5、10、50 和 200U/ml; nor-BNI 组 ($n = 12$): 心肌细胞用 10nmol/L nor-BNI 预处理 10min 后, 连续观察 25min。

第二部分: 细胞膜钙离子通道检测 分为两大组: A 组. 用膜片钳全细胞记录心室肌细胞钙电流组; B 组. 用 Mn^{2+} 淬灭实验检测钙通道的活性组。

A 组. 用膜片钳全细胞记录心室肌细胞钙电流组。空白对照组 ($n = 8$), 心肌细胞不作任何处理, 观察其钙电流; IL-2 作用组 ($n = 8$), 心肌细胞用 200U/ml 处理 10min 后, 观察其钙电流改变。

B 组. 用 Mn^{2+} 淬灭实验检测钙通道的活性组。K-H 对照组 ($n = 10$), 心肌细胞用 K-H 液灌流 10min 后, 观察 fura-2 淬灭率; 无 $MnCl_2$ 组 ($n = 10$), 心肌细胞用 K-H 液灌流 10min 后, 观察 fura-2 淬灭率时不加入 $MnCl_2$; 无电刺激组 ($n = 10$), 心肌细胞用 K-H 液灌流 10min 后, 观察 fura-2 淬灭率时不给予电刺激; nifedipine 组 ($n = 7$), 心肌细胞用 K-H 液灌流 10min 后, 加入 10 μ mol/L nifedipine 观察 fura-2 淬灭率; Isoproterenol 组 ($n = 7$), 心肌细胞用 K-H 液灌流 10min 后, 加入 1 μ mol/L isoproterenol 观察 fura-2 淬灭率; IL-2 组 ($n = 20$), 心肌细胞用 K-H 液灌流 10min 后, 加入 IL-2 200U/ml 灌流 10min 后, 观察 fura-2 淬灭率。

第三部分: 细胞内酸碱度测定 空白对照组 ($n = 14$). 心肌细胞不作任何处理, 连续 45min 观察其细胞内酸碱度的变化。

IL-2 组 ($n = 14$). HBS 灌流液中加入 IL-2 200U/ml, 观察 30min。随后用不含 IL-2 的 HBS 液洗脱 15min。

nor-BNI + IL-2 组 ($n = 12$). 心肌细胞用 10nmol/L nor-BNI 预处理 10min 后, 加 IL-2 200U/ml 观察 30min。随后用不含药物的 HBS 液洗脱 15min。nor-BNI 组 ($n = 8$): 心肌细胞用 10nmol/L nor-BNI 预处理 10min 后, 连续 45min 观察其细胞内酸碱度的变化。

8. 统计学处理

所有数据均以均数 \pm 标准差表示, 采用 t 检验、ANOVA 和 Newman-Keuls 法进行显著性检验, $P < 0.05$ 时有显著性差异。

结 果

1. IL-2 对细胞内钙瞬变和舒张末钙水平的影响

IL-2 (2.5–200U/ml) 显著降低心肌细胞钙瞬变幅度和使舒张末钙水平增高, 且随浓度增加对心肌细胞钙瞬变幅度和舒张末钙水平的作用增强 (图 1、2)。用选择性 κ -阿片受体阻断剂 nor-BNI 预处理后, 减弱了 IL-2 对心肌细胞内钙的影响。空白对照组无任何处理的心肌细胞其钙瞬变幅度和舒张末钙水平随观察时间的延长均无明显变化 ($P > 0.05$)。图 3 显示 200U/ml IL-2 对心肌细胞作用的时间效应, 由图中可见, 随作用时间延长, IL-2 对心肌细胞内钙瞬变幅度和舒张末钙水平的作用增强。

2. IL-2 对钙电流的影响

用铯离子 (135mmol/L) 和 TEA (4mmol/L) 阻断钾通道, 钳制电压在 -40mV 失活钠通道, 获得 L-型钙通道电流曲线。图 4A 显示的是一个典型的大鼠心室肌细胞 L-型钙电流的记录图。在用 200U/ml 的 IL-2 灌流 10min 后, 与对照组相比全细胞记录的 L-型钙电流无明显改变 (图 4A, B)。

3. Mn^{2+} 淬灭法检测 IL-2 对钙通道活性的影响

为了进一步观察 IL-2 对细胞膜上的钙通道的开放活性是否有影响, 使用 Mn^{2+} 淬灭法观察了细胞膜钙离子通道的活性。激发波长为 360nm (Ca^{2+} 不敏感的波长)。在生理性细胞内钙离子浓度下, Mn^{2+} 对 Fura-2 的亲合力比 Ca^{2+} 强, 可以化学计量性地淬灭 fura-2 荧光, 淬灭率直接与通过细胞膜上的 Mn^{2+} 内流成比例。以 fura-2 的淬灭率表示 Ca^{2+} 通道的活性, fura-2 的淬灭通过给细胞施加电场刺激激活, 并且可以被 nifedipine 所阻断。

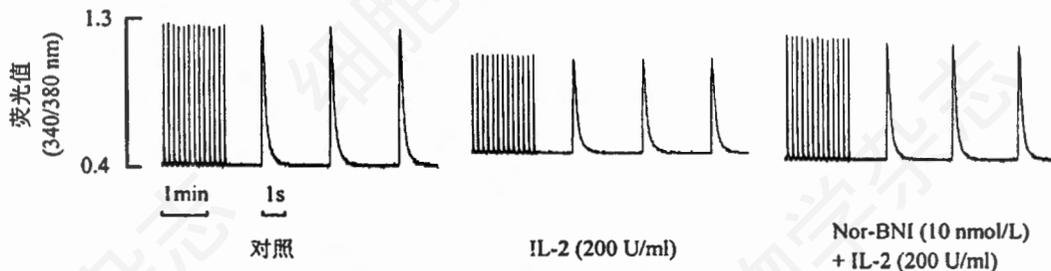


图 1 IL-2 对大鼠心肌细胞内钙影响实验记录图

IL-2 (200U/ml) 降低心肌细胞钙瞬变幅度和使舒张末钙水平增高, 选择性 κ -阿片受体阻断剂 nor-BNI (10nmol/L) 减弱 IL-2 对心肌细胞内钙的影响。

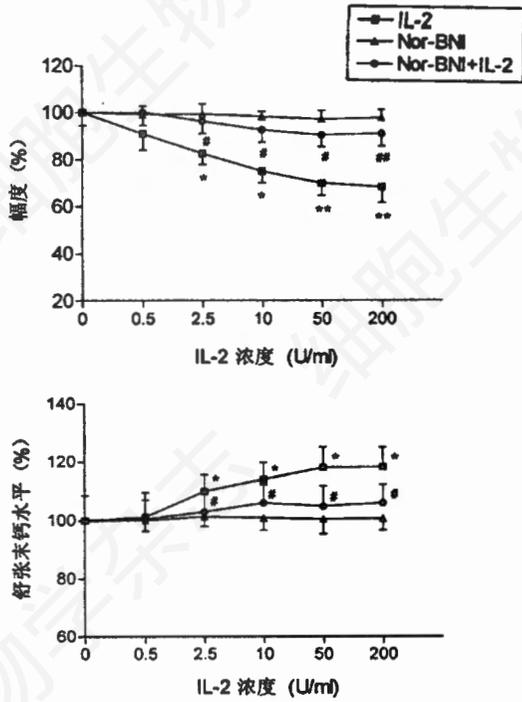


图2 在阿片受体阻断剂 nor-BNI(10nmol/L)存在或不存在时,IL-2对心肌细胞钙瞬变幅度和舒张末钙水平的剂量效应曲线 * P<0.05, ** P<0.01 与加药前相比(0浓度)。 # P<0.05, ** P<0.01, 与 IL-2 组相比。

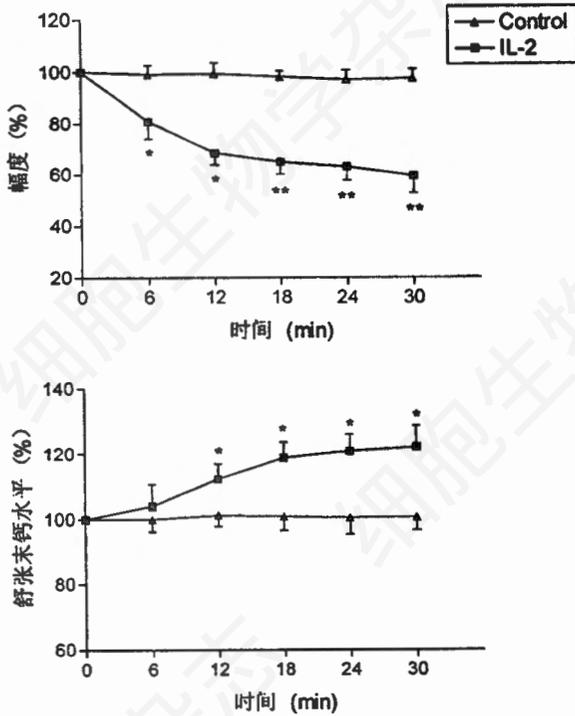


图3 IL-2(200U/ml)对心肌细胞钙瞬变幅度和舒张末钙水平的时间效应曲线 * P<0.05, ** P<0.01 与加药前(0min)相比。

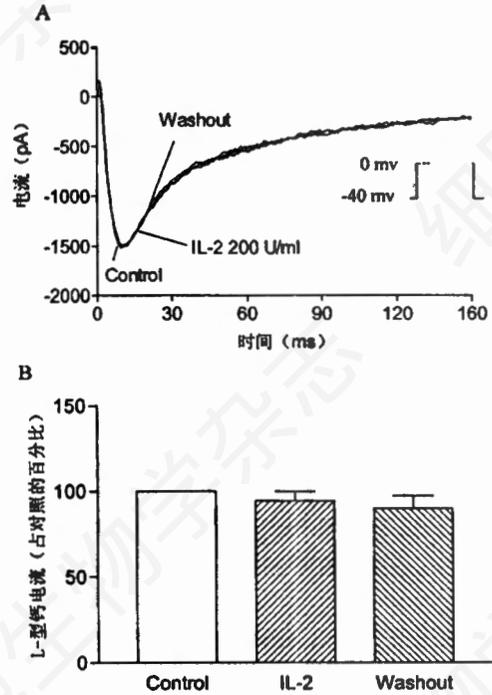


图4 IL-2(200U/ml)对心肌细胞L-型钙电流的影响 A: L-型钙电流实验记录曲线; B: L-型钙电流实验数据汇总。

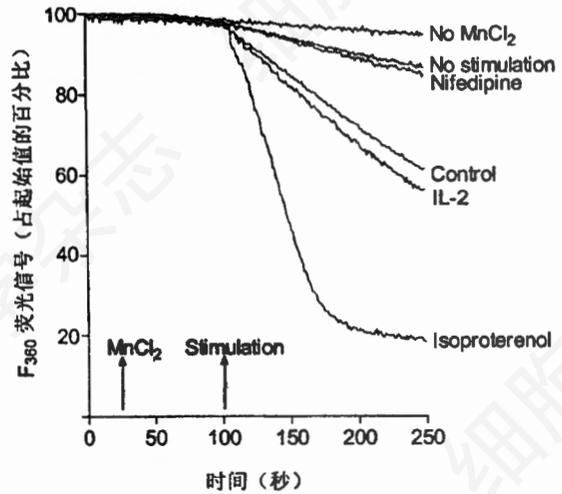


图5 IL-2对心肌细胞L-型钙通道活性的影响 图中所显示的实验记录曲线分别在下列条件下获得:No MnCl₂,细胞施加电刺激但不加入 MnCl₂;No stimulation,加入 MnCl₂但不施加电刺激;Nifedipine,加入 10μmol/L Nifedipine;Control,加入 MnCl₂并施加电刺激;IL-2,细胞用 200U/ml IL-2 灌注后,加入 MnCl₂并施加电刺激;Isoproterenol,用 1μmol/L Isoproterenol 灌注后,加入 MnCl₂并施加电刺激。荧光值用占初始荧光信号的比值表示。

如图5所示,在不加 Mn²⁺时荧光损失很少。不施加电刺激而给予 Mn²⁺ (0.2mmol/L MnCl₂)所

产生的淬灭率为 4.2%/min,而给予 1Hz 电刺激后淬灭率升至 26%/min。而在 nifedipine(10 μ mol/L)存在时,没有电刺激激活的荧光淬灭,与从未施加电刺激细胞所观察到的淬灭率相似。这说明在有电刺激存在时 Mn²⁺ 的淬灭是电压门控钙离子通道依赖的。当将细胞暴露于 isoproterenol(1 μ mol/L)而使钙离子通道激活时,电刺激依赖性 fura-2 的荧光淬灭率显著升高。

用 200U/ml 的 IL-2 灌流后,与对照组相比 fura-2 的淬灭率无明显改变(图 5,表 1)。

表 1 IL-2 对心肌细胞 Mn²⁺ 淬灭率的影响

组别	n	Mn ²⁺ 淬灭率
对照组	20	2.6 \pm 0.2
IL-2(200U/ml)	20	3.5 \pm 0.4
Nifedipine(10 μ mol/l)	7	0 \pm 0**
Isoproterenol(1 μ mol/l)	7	22.1 \pm 1.9**

数据均用比基础淬灭率增加的倍数来表示。

** P<0.01 与对照组相比。

4. IL-2 对 pHi 的影响

如图 6 所示,在稳定状态下,对照组细胞的 pHi 在本研究观察时间内无明显改变。在药物作用组,当灌流液中加入 200U/ml 的 IL-2 后,随灌流时间延长,IL-2 使 pHi 明显降低。药物作用 30min 后用正常的 HBS 洗脱,洗脱 15min 后,pHi 并不能恢复。

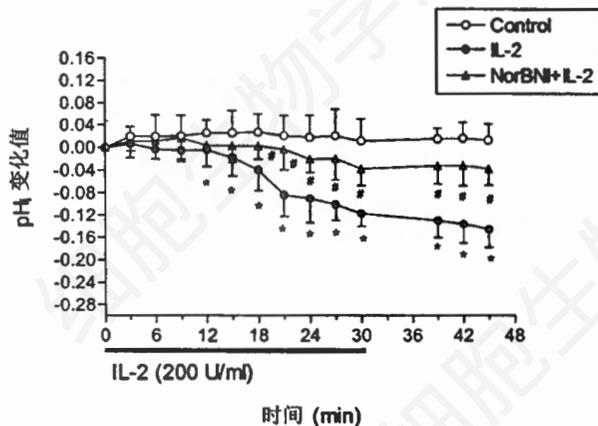


图 6 在阿片受体阻断剂 nor-BNI(10nmol/L)存在或不存在时,IL-2 对心肌细胞 pHi 的影响

* P<0.05,与对照组相比;

P<0.05,与 IL-2 组相比。

为了探讨阿片受体是否参与 IL-2 对 pHi 的影响,我们使用选择性 κ -阿片受体阻断剂 nor-BNI

(10nmol/L)预处理心肌细胞后再观察 pHi 的变化。结果显示,在 nor-BNI 处理后 IL-2 对 pHi 的作用被减弱(P<0.05)。

讨 论

本研究结果显示,IL-2 可浓度依赖性地降低大鼠心肌细胞电刺激诱导的细胞内钙瞬变的幅度,使舒张末静息钙水平升高;IL-2 降低心肌细胞内钙瞬变的作用并非主要通过减少细胞外钙经细胞膜上 L-型钙离子通道的内流;IL-2 可使大鼠心肌细胞 pHi 降低,可能是其负性肌力作用的机制之一;细胞膜上的 κ -阿片受体介导了 IL-2 的作用。

电刺激诱导的细胞内钙瞬变来源于细胞膜去极后的 Ca²⁺ 内流,这部分内流的 Ca²⁺ 会触发肌浆网通过 Ca²⁺ 诱导的 Ca²⁺ 释放机制迅速释放内储 Ca²⁺。以往的研究表明,在单个心肌细胞上电刺激诱导的细胞内钙瞬变与细胞收缩直接相关^[10]。Weisensee 等^[11] 和本实验室近期研究的结果表明^[12],IL-2 对离体大鼠乳头肌和离体培养小鼠心肌细胞具有负性肌力作用,并且该作用是由于心肌细胞 [Ca²⁺]_i 降低所致^[1]。在本研究中,通过膜片钳全细胞记录检测大鼠心肌细胞的 L-型钙离子流的结果显示,IL-2(200U/ml)对钙离子通过 L-型钙离子通道的内流无明显影响,尽管此浓度的 IL-2 在单个心肌细胞上可以产生明显的负性肌力作用^[1,2]。在仓鼠和大鼠的乳头肌上以及 Langendorff 灌流心脏上,IL-2 在这个浓度或更高的浓度也具有负性肌力作用^[12-14]。为了进一步明确 IL-2 对细胞膜 L-型钙离子通道的影响,我们使用 Mn²⁺ 淬灭实验直接观察 Ca²⁺ 内流的变化。Mn²⁺ 进入细胞的途径与 Ca²⁺ 类似,并且在所有的激发波长淬灭 fura-2 的荧光信号^[15]。因此,Mn²⁺ 淬灭 fura-2 荧光反映了 Ca²⁺ 的内流。结果显示,IL-2 作用于心肌细胞后对 Mn²⁺ 淬灭率没有明显影响,这一结果进一步证实了膜片钳全细胞记录的结果。

在心肌细胞收缩的周期中,Ca²⁺ 主要有两种来源:首先是 Ca²⁺ 通过细胞膜上的电压敏感性钙离子通道进入胞浆,其次是 Ca²⁺ 通过 Ca²⁺ 诱导的 Ca²⁺ 释放机制从肌浆网的释放。在大鼠心肌细胞中,在每一次钙瞬变过程中的 Ca²⁺ 流主要是从肌浆网释放的,但其受经细胞膜内流的钙离子的调节^[16]。以上 IL-2 对 L-型钙离子通道无明显影响的结果提示,IL-2 对细胞内钙瞬变的影响可能主要与肌浆网 Ca²⁺ 释放动力学有关,而可能与细胞膜上的 L-型钙

离子通道无关。

细胞内的 pH_i 是影响心肌细胞收缩的一个重要因素。Fabiato 等的研究显示,细胞内 pH 的升高可以使收缩蛋白对钙离子的敏感性增强^[4]。在心肌细胞中,血管紧张素 II^[17]和去氧肾上腺素^[18]的正性肌力作用归因于细胞内的碱体化。而细胞内的酸化则被认为与负性肌力作用有关^[19]。

细胞内酸化引起心肌收缩力降低的主要机制与收缩蛋白质对 Ca^{2+} 的敏感性降低有关,因为研究发现在细胞内酸化的同时细胞内钙瞬变幅度没有改变甚至增加^[20,21]。另外,细胞内酸化可抑制肌浆网 ryanodine 受体^[22]、降低该受体释放 Ca^{2+} 的敏感性^[23,24],因而通过 Ca^{2+} 诱导的 Ca^{2+} 释放机制从肌浆网的 Ca^{2+} 释放量减少、收缩力降低^[25,26]。本实验结果发现,在灌流液中加入 IL-2 后,心肌细胞稳定状态下的 pH_i 降低。从 pH_i 和细胞内钙瞬变的时间相关关系分析来看,IL-2 作用后可使细胞内钙瞬变在 5min 内开始降低,并随作用时间延长,其作用增强;而 IL-2 对 pH_i 的作用相对较慢,其起效时间在 ~12min,其降低 pH_i 的作用随作用时间延长而增强。所以,IL-2 对心肌细胞内钙瞬变和 pH_i 的影响至少在其作用的早期(<12min)并不一致,即 pH_i 与细胞内钙瞬变并无时间上的相关。因此,IL-2 对心肌的负性肌力作用机制至少涉及细胞内 Ca^{2+} 动力学的改变和/或 pH_i 降低,而细胞内酸化至少与 IL-2 负性肌力作用的持续性有关。有关 IL-2 引起细胞内酸化的机制包括 $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ 交换体活性的改变等有待进一步探讨。

本研究发现,IL-2 可使细胞内静息钙水平升高,机制可能与其使心肌细胞内酸化有关。Bers 等的研究表明,用细胞内钙敏感电极在酸化的心肌纤维上记录到静息 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的升高^[27]。细胞内酸化引起细胞内静息钙水平升高的机制可能与细胞内 $[\text{H}^+]$ 升高激活 $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ 交换、从而改变 $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ 交换活性有关^[28],引起细胞内静息钙水平升高。

研究报道,在中枢神经系统 IL-2 可以通过阿片受体而发挥其作用^[29]。本实验室以往的研究表明,心肌上的阿片受体介导了 IL-2 的负性肌力作用^[1,2]。用特异性 κ -阿片受体阻断剂 nor-BNI 处理心肌细胞后,可取消 IL-2 对细胞内钙和 pH_i 的作用,提示 κ -阿片受体可能介导了 IL-2 的作用。

参 考 文 献

- [1] Cao CM. et al. ,2002, *Pflugers Arch.* ,**443**:635 - 642.
- [2] Cao CM. et al. ,2001, *Chin J Pharmacol Toxicol.* ,**15**: 266 - 271.
- [3] Cao CM. et al. , 2001, *Acta Physiol Sin.* , **53**: 425 - 430.
- [4] Fabiato A. et al. ,1978, *J Physiol.* ,**276**:233 - 255.
- [5] Poole-Wilson PA. , 1978, *J Mol Cell Cardiol.* ,**10**: 511 - 526.
- [6] Farmer BB. et al. ,1983, *Life Sci.* ,**33**:1 - 18.
- [7] Ventura C. et al. ,1991, *Am J Physiol.* ,**261**:H1671 - H1674.
- [8] Merritt JE. et al. , 1989, *J Biol Chem.* , **264**: 1522 - 1527.
- [9] Souza MM. et al. ,2000, *Mol Cell Biochem.* , **210**: 173 - 183.
- [10] Yu XC. et al. , 1998, *J Mol Cell Cardiol.* , **30**: 405 - 413.
- [11] Weisensee D. et al. , 1993, *Int J Immunopharmacol.* , **15**: 581 - 587.
- [12] Wang LL. et al. ,2002, *J Zhejiang Univ.* ,**31**:19 - 22.
- [13] Finkel MS. et al. ,1992, *Science* ,**257**:387 - 389.
- [14] Wang LL. et al. ,2001, *Acta Biol Exp Sin.* ,**34**: 121 - 125.
- [15] Merritt JE. et al. , 1989, *J Biol Chem.* , **264**: 1522 - 1527.
- [16] Cleemann L. et al. ,1991, *J Physiol.* ,**432**:283 - 312.
- [17] Ikenouchi H. et al. ,1994, *J Physiol.* ,**480**:203 - 215.
- [18] Pucaat M. et al. , 1993, *Am J Physiol.* , **264**: H310 - H319.
- [19] Orchard CH. et al. , 1990, *Am J Physiol.* , **258**: C967 - C981.
- [20] Allen DG. et al. ,1983, *J Physiol.* ,**335**:555 - 567.
- [21] Orchard CH. et al. , 1990, *Am J Physiol.* , **258**: C967 - C981.
- [22] Xu L. et al. , 1996, *Circ Res.* , **79**: 1100 - 1109.
- [23] Kentish JC. et al. , 1997, *Cardiovasc Res.* , **33**: 314 - 323.
- [24] Hulme JT. et al. , 1998, *Am J Physiol.* , **275**: H977 - H987.
- [25] Orchard CH. ,1987, *J Physiol.* ,**384**:431 - 449.
- [26] Orchard CH. et al. , 1987, *J Gen Physiol.* , **90**: 145 - 165.
- [27] Bers DM. et al. ,1982, *Pflugers Arch.* ,**393**:171 - 178.
- [28] Bountra C. et al. ,1989, *J Physiol.* , **418**:163 - 187.
- [29] Jiang CL. et al. , 1996, *Acta Physiol Sin.* , **48**: 243 - 248.

THE MECHANISMS OF NEGATIVE INOTROPIC EFFECT OF INTERLEUKIN-2 ON CARDIOMYOCYTES

CAO Chun Mei XIA Qiang ZHANG Xiong ZHANG Wei CHEN Jun Zhu

(Zhejiang University School of Medicine Hangzhou 310031 China)

ABSTRACT In the present study, we investigated the effect of interleukin-2 (IL-2) on the sarcolemmal calcium channel and intracellular pH (pH_i) in enzymatically isolated ventricular myocytes with whole cell patch clamp and spectrofluorometry techniques. Fura-2/AM and BCECF/AM were used as the intracellular calcium and hydrogen probe, respectively. It was shown that IL-2 (2.5 - 200 U/ml) decreased the amplitude of electrically induced [Ca²⁺]_i transients of ventricular myocytes in a dose-dependent manner and increased the end-diastolic calcium level. Pretreatment with a specific κ -opioid antagonist nor-BNI (10 nmol/L) abolished the effect of IL-2 (200 U/ml) on the [Ca²⁺]_i transients in cardiomyocytes. Perfusion with IL-2 had no significant effect on whole cell L-type calcium current of cardiomyocytes. We also found that pretreatment with IL-2 did not elicit the significant alteration in the initial rate of Mn²⁺ quench activated by electrical stimulation. IL-2 decreased the intracellular pH (pH_i) of cardiomyocytes, which could be attenuated by nor-BNI. It is concluded that the decrease of pH_i induced by IL-2 may be one of the mechanisms of negative inotropic effect of IL-2, in which L-type Ca²⁺ channel of ventricular myocytes was not involved. The cardiac effect of IL-2 is mainly mediated by cardiac κ -opioid receptors.

Key words: Interleukin-2 Ventricular myocytes Calcium channel Intracellular pH
Intracellular calcium

阿克拉霉素对顺铂和足叶乙甙杀伤卵巢癌细胞的影响

阴梅云 郑力芬 韩 硕 阎蕴力

(河北医科大学细胞生物研究室 石家庄 050017)

摘 要 有效化疗药物的选择对于提高卵巢癌的治疗效果至关重要。本文应用 MTT 法, 分别测定了阿克拉霉素 (Aclarubicin, ACR) 血浆峰浓度与不同浓度顺铂 (Cisplatin, CDDP) 或足叶乙甙 (Etoposide, VP-16) 合用对 SKOV3 卵巢癌细胞 24h 的抑制率, 并分析药物合并效应。采用荧光染色观察细胞凋亡; 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 断裂; 并用 western 印迹检测 TopoII 表达与药物作用之关系。结果表明, ACR 对 VP-16 具有拮抗作用; 与药物单用相比, 二者合用后使细胞凋亡率减少、DNA 断裂减少, 拓扑异构酶 II 表达增强。CDDP 单用可以促进 TopoII 表达。ACR 与 CDDP 合用对卵巢癌细胞的抑制具有协同效果; 表现为细胞凋亡率增加、DNA 断裂增加, TopoII 表达降低, 尤其对 TopoII β 表达的抑制作用明显。因此认为: ACR 与 CDDP 合用能够提高对卵巢癌细胞的抑制效果, TopoII 是其重要的作用靶点。该结果对于临床治疗具有一定的参考意义。

关键词: 卵巢癌 阿克拉霉素 顺铂 足叶乙甙 DNA 拓扑异构酶 II

临床资料表明, 卵巢癌往往发现较晚, 确诊时以中、晚期患者多见。化疗仍是目前常用的有效治疗方法。但化疗后尚有 40% - 60% 病人复发, 常需要二线化疗^[1,2]。因此, 高效抗癌药物的研制和应用, 以及选择更有效的化疗方案, 是提高卵巢癌疗效的重要措施。

在临床诸多的抗癌药物中, 以拓扑异构酶 II (Topoisomerase II, TopoII) 为作用靶点的化疗药物含量众多。其中包括能够稳定 DNA-TopoII 断裂复

合体, 造成 DNA 断裂, 导致细胞死亡的 TopoII 毒性抑制剂类药物, 如足叶乙甙 (Etoposide, VP-16)、替尼泊甙 (Teniposide, VM-26)、阿霉素 (adriamycin, ADM) 等。该类制剂临床应用已有较长历史, 其作用特点和疗效相对比较明确。而另一类主要影响 TopoII 催化作用的药物被称为 TopoII 催化抑制剂, 如 ACR、美巴龙 (Merbarone)、ACRF-187 等。此类

本文 2002 年 10 月 17 日收到, 11 月 18 日接受。
E-mail: yanyl@hebm. edu. cn