

分离的成年大鼠心肌细胞的 Ca^{2+} 流入测定

葛兆莺* 顾全保** 梁瑞廉*

(*上海市第六人民医院老年病研究室 200233)

(**中国科学院上海细胞生物学研究所)

钙离子通透心肌细胞膜的流量调控研究,不仅在心肌细胞膜功能的理论上而且在临床实践中都很重要。80年代初, Neyier 发现心肌组织在缺血和缺氧损伤后细胞能否继续生存,与 Ca^{2+} 、 Na^+ 和 K^+ 通过细胞膜的运输调控有非常重要的关系^[1]。为了在心肌细胞水平上进行细胞膜的离子运输测定,一些人用胰蛋白酶消化分离鸡胚的或乳鼠的心肌细胞,经培养形成贴壁单层后供在不同实验条件下的细胞膜离子流量测定^[2,3]。近年来,成年动物心肌细胞的分离也已获得进展,而且这种细胞被认为是一种心肌局部缺血的更理想的体外研究模型^[4]。

本研究以分离的成年大鼠心肌细胞作为实验材料,应用放射性同位素 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 示踪技术,进行 Ca^{2+} 通透心肌细胞膜的流量动力学分析。本文主要报道新鲜分离的成年大鼠的心肌细胞可作为研究心肌细胞膜离子运输功能的体外实验模型,为进一步开展心脏复苏药物的作用机制研究打下基础。

材 料 和 方 法

1. 实验动物和药品

成年 Wistar 大鼠由上海细胞生物学研究所实验动物房供给。一般化学试剂均为国产 AR 级。胶原酶 (Collagenase type II) 购自 Sigma 公司;山梨醇为第二军医大学药理学系产品; $^{45}\text{CaCl}_2$ ($0.37\text{--}1.5\text{ GBq} \times \text{mg}^{-1}\text{Ca}^{2+}$) 购自 Amersham 公司。硝苯甲氧乙基异丙啉 (尼莫的平, Nimodipine) 购自天津中央制药厂。

2. 心肌细胞的分离和收集

成年大鼠心肌细胞的分离参照 Heide 等的方法^[4]。简单过程如下:选取 200—300 克体重的 Wistar 大鼠,戊巴比妥钠麻醉,打开胸腔,取出心脏,在冰冷的缺

Ca^{2+} 液中洗涤干净后,将心脏安装在 Langendoff 装置上,用缺 Ca^{2+} 液灌注 5 分钟,接着用含胶原酶 (1.25 mg/ml) 的缺 Ca^{2+} 液循环灌注 45 分钟,取左右心室部分,剪碎和分散细胞。采用自然沉淀法分次收集心肌细胞,并制备实验所需的细胞悬液,供当日实验使用。整个分离心肌细胞的过程在 37°C 下进行。

3. 心肌细胞形态和成活率鉴定

在光学显微镜下用血球计数板计数细胞,杆状和球形细胞分类统计,并以细胞对锥虫蓝染料的排斥能力,计数成活和非成活的细胞^[4]。

4. Ca^{2+} 通透心肌细胞膜的流入量测定

Ca^{2+} 流入测定参考 McCall 等的方法^[3],并加以改进:计数分离的心肌细胞,制备每毫升流量测定液中含 $7 \times 10^4\text{--}10^5$ 个细胞的悬液(流量测定液成分为: 120 mmol/L NaCl , 30 mmol/L KCl , 3.4 mmol/L MgCl_2 , 15 mmol/L 葡萄糖, 30 mol/L 牛磺酸和 5 mmol/L HEPES , $\text{pH } 7.4$, 加入 CaCl_2 至实验所需浓度)。流入测定系统温育在 37°C 振荡恒温水浴槽内,在加入 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ($1.05\text{--}2.1\text{ } \mu\text{Ci} \times \text{ml}^{-1}$) 时开始计时。按实验设计的时间,分别吸取 $200\text{ } \mu\text{l}$ 均匀的细胞悬液,立即与 30 倍体积的终止液 (7% 山梨醇) 混和,离心 (3000 rpm) 2 分钟,沉淀的细胞再以终止液洗涤 2 次后与 $100\text{ } \mu\text{l}$ 的 5% SDS 充分混匀,移入计数杯和加入 3 ml 闪烁液,用 Beckman LS 5801 液体闪烁计数器计数 cpm。取 $5\text{ } \mu\text{l}$ 细胞悬液计数总 cpm,数据处理参照文献^[5],以每个心肌细胞流入 fmol Ca^{2+} 为计算单位。

结 果

1. 分离的心肌细胞形态和成活率

用胶原酶灌注成年大鼠的离体心脏,可获得大量的单个分离的心肌细胞(图版 A 图)。18 只动物个体的统计数据显示,平均从每只大鼠心脏的心室部分可分离收集到 $5.1 \pm 0.6 \times 10^6$ 个心肌细胞(表 1),其中杆状细胞约占 85%,

表 1 分离的成年大鼠心肌细胞数量、形态和成活率统计表

动物个体数	细胞数 (个±SE)	杆状细胞率 (%±SE)	杆状拒染细胞率* (%±SE)
18	5.1±0.6×10 ⁶	84.8±1.7	82.7±1.7

* 指形态完整并对锥虫蓝拒染的杆状细胞即成活细胞

活细胞占82%左右。球状细胞如图版B图箭头所示,表明细胞的质膜结构已遭受不可逆性破坏,细胞变形成球状,且迅速被锥虫蓝染色,为死亡心肌细胞。而在较高倍数的光镜下观察,可以看到绝大多数杆状细胞形态完整,能清晰地显示纹状结构并对锥虫蓝拒染,为成活心肌细胞(图版图C)。

2. Ca²⁺流入心肌细胞的时间曲线

为了证明以上分离的一群心肌细胞的质膜功能活性,我们进行了⁴⁵Ca²⁺通透心肌细胞膜流入细胞内的时间曲线测定(图1)。结果表明在30分钟温育过程中,随着温育时间的延长,Ca²⁺流入量逐渐上升。然而,在开始几分钟内,Ca²⁺流入速度较快,以后渐渐减慢,有达到平衡的趋势。当温育时间达60分钟时,未导致明显的Ca²⁺流入量的增加。说明Ca²⁺流入心肌细胞在动力学上有两个不同的时相,其一是快速运输相,另一个为慢速运输相。在上述测定系统中,加入10 μmol/L浓度的硝苯甲氧乙基异丙啶观察其效应,图1的测定数据表明,

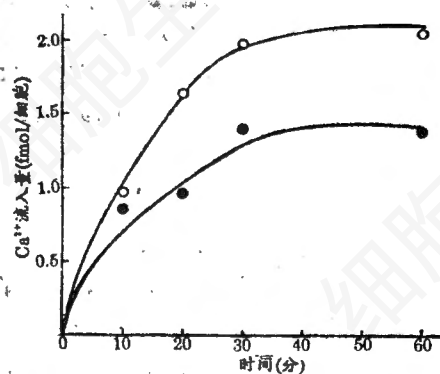


图 1 Ca²⁺流入分离心肌细胞的时间曲线图
(○)为对照组;(●)表示加入10 μmol/L硝苯甲氧乙基异丙啶作用组。

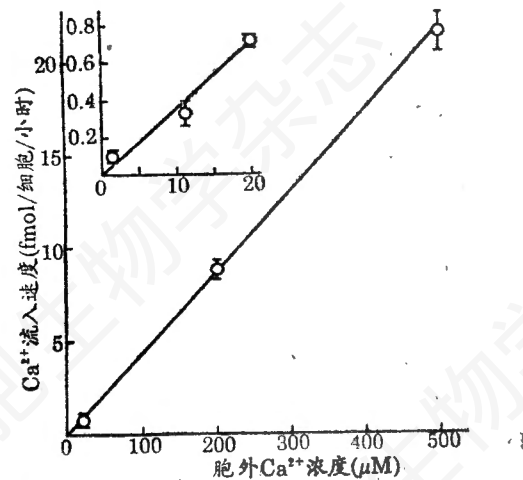


图 2 Ca²⁺流入心肌细胞的速度与Ca²⁺浓度的关系

硝苯甲氧乙基异丙啶对Ca²⁺流入心肌细胞约有30%的抑制作用。

3. Ca²⁺流入心肌细胞的速度与其浓度的关系

在改变Ca²⁺浓度分别为1.37、11.37、20、200和500 μmol/L时的Ca²⁺流入速度分别为0.11±0.01、0.33±0.05、0.73±0.008、8.91±0.21和21.58±0.96 (fmol/cell/h) (图2)。无论是低Ca²⁺浓度(图2左上角),还是较高Ca²⁺浓度,Ca²⁺流入速度与胞外Ca²⁺浓度的关系都呈线性关系。这表明在分离的心肌细胞Ca²⁺通透质膜进入胞内的动力学特征,是与自由扩散的离子通道特性相符合的。

讨 论

为了建立Ca²⁺通透心肌细胞膜流量研究的体外实验模型,本研究以成年大鼠分离的心肌细胞为材料,应用放射性同位素⁴⁵Ca²⁺示踪

法,进行了 Ca^{2+} 流入动力学分析。作离子通透细胞质膜的流量测定,首先应该考虑细胞膜的完整性^[5]。最近有人应用荧光标记凝集素的方法证明,在胶原酶消化分离心肌细胞过程中,细胞质膜表面的结构没有受到破坏^[6]。我们以相似的方法分离得到的心肌细胞,从形态和对锥虫蓝拒染的结果都与文献^[3]报道的相一致。 Ca^{2+} 流入分离的心肌细胞的时间依赖性分析表明, Ca^{2+} 的运输符合两室动力学特征^[7],从而为进一步证明从成年动物分离的心肌细胞的质膜具有完整性和功能活性提供了又一证据。

Ca^{2+} 流入心肌细胞的时间曲线(图1)显示两个不同的时相,其一是快速运输 Ca^{2+} 的系统,另一个是慢速运输 Ca^{2+} 系统,这可用心肌细胞膜上存在两类 Ca^{2+} 运输成分的叠加来作解释。Murphy等报道了在贴壁培养的鸡胚心肌细胞所进行的 Ca^{2+} 流量测定^[2]。他们的 Ca^{2+} 流入时间曲线同样显示两个不同的时相。然而,他们所测得 Ca^{2+} 迅速运输的 $t_{1/2}$ 约9秒,而从本实验的时间曲线看,迅速运输相的 $t_{1/2}$ 大约是10分钟。由于实验材料和实验条件不同,产生如此的差异也是可以理解的。

无机离子通透细胞膜的运输,主要由载体和通道两类蛋白质分子担负,两者在动力学上有显著差别,前者是饱和动力学特征,而后者是自由扩散动力学特征^[8]。我们在 Ca^{2+} 流入心肌细胞的速度与胞外 Ca^{2+} 浓度的依赖关系分析中看到(图2),分离的心肌细胞质膜上存在的 Ca^{2+} 流入系统是非饱和成分,这就证明 Ca^{2+} 流入分离的心肌细胞是通过其质膜上的通道途径。

为了进一步鉴定 Ca^{2+} 通道的功能特性,本实验应用已知的 Ca^{2+} 通道拮抗剂硝苯甲氧乙基异丙啉考察了对 Ca^{2+} 流入的效应。实验结果明显地看出,10 $\mu\text{mol/L}$ 硝苯甲氧乙基异丙啉对 Ca^{2+} 流入约有30%的抑制效应(图1),这与McCarthy等报道相一致^[9]。因此,分离的

成年大鼠心肌细胞为我们今后深入开展心脏复苏药物对细胞膜离子运输系统作用机理的研究提供了很有意义的实验材料。

摘 要

本研究进行了成年Wistar大鼠心肌细胞的分离,从细胞的形态及其对锥虫蓝拒染的结果显示分离细胞的成活率达80%以上。以放射性同位素 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 作为示踪物,对 Ca^{2+} 流入分离的心肌细胞作动力学分析结果表明:流入心肌细胞的 Ca^{2+} 量依赖于温育时间; Ca^{2+} 的流入速度与胞外 Ca^{2+} 浓度的依赖性呈线性关系。由此说明,一群分离的心肌细胞具有完整的和稳定的质膜表面, Ca^{2+} 通透心肌细胞质膜的流入符合自由扩散动力学特征,显示了 Ca^{2+} 通道的功能活性。从而,为进一步开展心脏复苏药物对心肌细胞膜 Ca^{2+} 通道作用机理的分析和缺血缺氧对心肌细胞功能影响的研究提供了一个体外实验模型。

参 考 文 献

- [1] Neyier, W. G., 1981, *Am. J. Pathol.*, 102: 262.
- [2] Murphy, J. G. et al., 1987, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 19: 271—279.
- [3] McCall, D. and T. A. Fried, 1990, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 22: 201.
- [4] Heide, R. S. V. et al., 1990, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 22: 165.
- [5] 顾全保, 细胞生物学杂志, 1983, 5(3): 39.
- [6] Stegemann, M. et al., 1990, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 22: 787.
- [7] Grardos, G. et al., 1969, In: *Laboratory Techniques in membrane Biophysics*, (Passow, H. and Stampfl, R. Eds.) Springer Verlag, P. 8—20.
- [8] Darnell, J. et al., In: *Molecular cell biology*, 2nd ed, W. H. Freeman and Company, New York, 1990, 531—582.
- [9] McCarthy, R. T. and C. J. Cohen, 1989, *J. Gen. Physiol.*, 94(4): 669.