

锰在培养大鼠心肌细胞上抗氧化损伤作用

王洪占 江岩 苗智慧

(河北省医学科学院病理生理室)

刘京生

(河北省医学科学院微生物室)

锰是超氧化物歧化酶、精氨酸酶、脯氨酸酶、丙酮酸羧化酶等多种酶的组成成分,并能激活磷酸葡萄糖变位酶、脱氧核糖核酸酶等上百种酶,在机体代谢中起着重要作用,且涉及到多种疾病以及衰老、癌症等生命攸关的重大问题^[1-4]。

鉴于锰的作用十分广泛,它在具体疾病中的作用机制至今难以阐明。近年来,自由基在疾病发生发展中的作用引起人们极大关注。为此,本文拟在单纯的体外培养的心室肌细胞上,在排除神经体液因素影响的条件下,用黄嘌呤、黄嘌呤氧化酶系统诱发心肌细胞的自由基损伤,集中探讨锰的抗自由基损伤作用。

方 法

一、心肌细胞培养及分组

自生后 24—48 小时的 Sprague-Dawley 大鼠取心尖部的心肌,用 0.1%胰蛋白酶(DIFCO)消化分离细胞。将获得的心室肌细胞置于聚苯乙烯培养瓶(Lab-Tek Division, Miles Laboratories, Inc.)内,在含 5%CO₂与 95%空气、pH 7.2、36.5℃的二氧化碳孵箱内进行培养。根据培养基的成份分三组:

对照组 80%MEM(美国 Life Technologies Inc) + 20%小牛血清(浙江金华市清湖犊牛利用研究站)。

加酶组 80%MEM + 20%小牛血清 + 0.42 mM 黄嘌呤(美国 Sigma Chemical Company) + 5.3 nM 黄嘌呤氧化酶(Sigma Chemical Company)(X-XOD)。

酶锰组 80%MEM + 20%小牛血清 + X-XOD + 0.1 ppm MnCl₂(上海金山县兴塔化工厂)。

二、心肌细胞动作电位记录

启开培养瓶之上壁,用 5%CO₂+95%O₂的气帘保持培养基为 pH 7.2、36.5℃。用 3 M KCl 充灌的

玻璃微电极(尖端口径<0.5 微米、两端电阻 20—40 兆欧)胞内引导心肌细胞动作电位及其时间常数,并联输至 VC-9 示波器与 APPLE II 微机,进行照相记录与联机分析以下 7 个电参数:动作电位波幅(APA)、超射(OS)、最大舒张电位(MDP)、阈电位(TP)、最大除极速度(V_{max})、复极 50% 水平的动作电位波宽(APD₅₀)以及动作电位的发放频率(F)。数据处理采用 t 检验。

三、心肌细胞群落搏动记录

将培养瓶置于恒温 36.5℃的倒置显微镜载物台上,经显微镜闭路电视系统把心肌细胞群落的搏动情况显示于监视器荧光屏,再经光电换能与功率放大器推动二导生理记录仪的描笔,记录收缩曲线。同时经频率仪计数每分钟搏动次数,用平衡记录仪描记收缩频率曲线。

结 果

一、心肌细胞的跨膜电活动

在培养 4—8 天过程中,自对照组、加酶组与酶锰组随机引导 94 个心肌细胞的动作电位,加酶组心肌细胞动作电位的 APA、OS、MDP、TP、V_{max}、APD₅₀均比对照组显著减小,呈典型膜损伤性电位表现。酶锰组除 V_{max}外,其他各电参数均恢复至对照水平。各组电参数及典型电位见表 1、图 1。

三组动作电位的发放频率无明显差别,证明电参数的变化不是动作电位频率不同所致。所以,上述结果表明 X-XOD 系统显著地损伤心肌细胞膜,而锰有效地对抗 X-XOD 所致的膜损伤。

二、搏动心肌细胞群落的顿停跳阈

于培养 4—8 天时,自三个实验组共随机抽样了 16 个呈现自发性搏动的心肌细胞群

表1 X-XOD、Mn对培养心肌细胞电参数的影响

	APA (mV)	OS (mV)	MDP (mV)	TP (mV)	V_{max} (V/s)	APD ₅₀ (ms)	F (bpm)
C	70.6 ± 1.6 (43)	25.6 ± 1.0 (43)	44.9 ± 1.2 (43)	28.5 ± 0.9 (43)	11.2 ± 0.5 (43)	80.7 ± 3.7 (43)	199.4 ± 7.6 (43)
E	54.0 ± 2.4 (18)@@@	19.8 ± 1.6 (18)@@	34.2 ± 1.4 (18)@@@	19.9 ± 1.5 (18)@@@	6.8 ± 0.6 (18)@@@	63.0 ± 4.2 (18)@@	198.4 ± 11.7 (18)
E + Mn	65.9 ± 2.1 (33)***	23.8 ± 1.2 (33)*	42.1 ± 1.5 (33)**	25.9 ± 1.1 (33)**	8.7 ± 0.6 (33)**@	84.6 ± 4.8 (33)**	205.4 ± 8.9 (33)

MEAN SE @; P < 0.05; @@ P < 0.01; @@@; P < 0.001 vs C

(N); 记录电位的心肌细胞数 *; P < 0.05; ** P < 0.01; ***; P < 0.001 vs E

C: 对照组; E, X-XOD组; E + Mn, X-XOD + Mn组

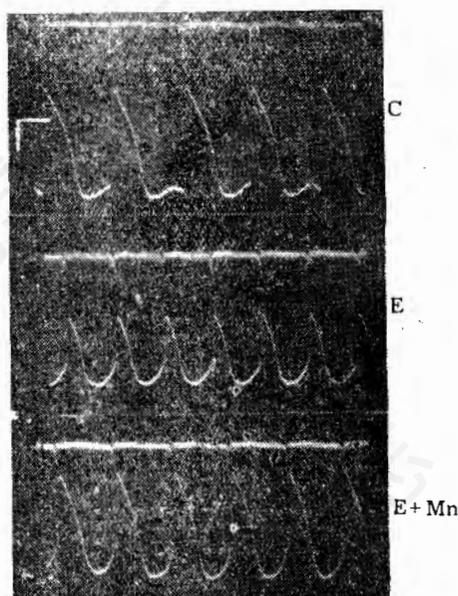


图1 各组心肌细胞动作电位的典型记录

C: 对照组

E: 加酶组

E + Mn: 酶锰组

水平标尺: 零电位线; 200 ms

垂直标尺: 20 mV; 10 V/s

落, 记录其收缩曲线与收缩频率曲线。在记录过程中分次加入 $BaCl_2$ (重庆北碚化学试剂厂), 使培养基中的钡浓度自 0.1 mM 起依次倍增。当搏动频率随钡浓度增高至一定程度时, 群落的自发性搏动突然停止, 如图 2 所示。

钡使搏动停止的最低有效浓度即钡的停跳阈。此阈值降低表示心肌细胞膜的完整性差。

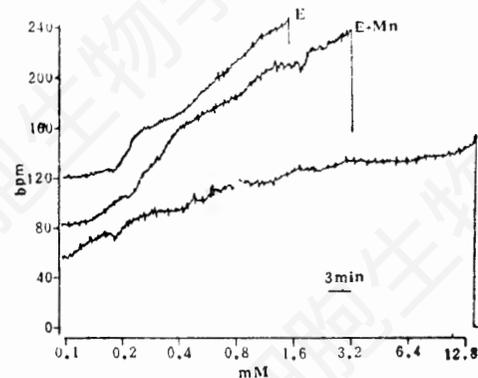


图2 各组钡停跳阈的典型记录

纵座标: 心肌细胞群落的搏动频率

横座标: 培养基中 $BaCl_2$ 的浓度

水平标尺: 3分钟走纸距离

C: 对照组的收缩频率曲线

E: 加酶组的收缩频率曲线

E + Mn: 酶锰组的收缩频率曲线

各组钡的停跳阈汇于图 3。

可以看出, 加酶组比对照组的钡停跳阈显著降低, 而酶锰组比加酶组则显著增高, 与心肌细胞的跨膜电活动一致地表明 X-XOD 系统使心肌细胞膜受损, 而锰可对抗这一损伤。

讨 论

本实验用 X-XOD 系统造成培养心肌细胞的自由基损伤^[6], 表现为心肌细胞动作电位的

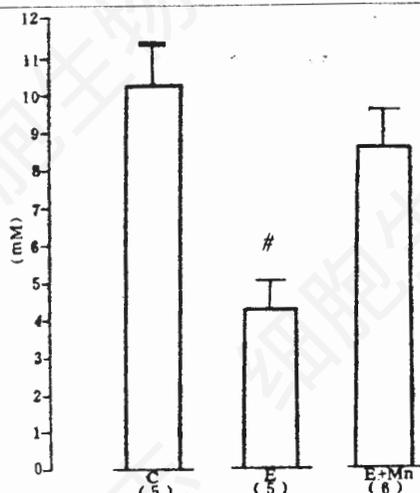


图3 搏动心肌细胞群落的钡停跳阈

纵座标: 培养基中的 BaCl_2 浓度 (mM)

(N): 倒数

C: 对照组

E: 加酶组

E+Mn: 酶锰组

#: 与对照组比较, $P < 0.05$

*: 与加酶组比较, $P < 0.05$

APA、OS、MDP、TP、 V_{\max} 、 APD_{50} 减小, 搏动心肌细胞群落的钡停跳阈降低。 MnCl_2 可对抗 X-XOD 对培养心肌细胞的损伤作用, 使跨膜电活动与自发性搏动均向正常方向转化。

上述结果与超氧阴离子自由基 (O_2^-) 的形成、清除机理正相吻合。黄嘌呤氧化酶催化黄嘌呤与氧反应生成 O_2^- , 启动自由基链锁反应, 导致生物膜的脂质降解、断裂, 造成心肌细胞膜的损伤^[6], 清除 O_2^- 的第一步是超氧化物歧化酶(SOD)使 O_2^- 歧化成 H_2O_2 。SOD有三种: Cu-Zn-SOD、Mn-SOD与Fe-SOD。Mn是Mn SOD的活性中心^[7]。因此, 向培养基中加入 X-XOD 使 O_2^- 形成增多, 而向培养基中加锰则促进 O_2^- 的清除。所以, 锰能对抗 X-XOD 所致的培养心肌细胞的自由基损伤。

心肌细胞膜的完整性受损使各种离子的通透性普遍增高。膜内外离子分布的紊乱, 特别

是细胞内钾的丢失造成膜的除极化(MDP减小)与细胞内钙增高抑制钙通道开放, 使动作电位波宽(APD_{50})变窄。这又继发地导致 V_{\max} 、OS、APA、TP的减小。

钡可阻塞钾通道使膜除极化^[8], 又可与肌钙蛋白结合而始动收缩^[9]。两种作用均促使收缩频率加快, 而当膜除极化至快、慢通道均失活时, 因动作电位停止发放而心搏骤停, 在心肌细胞膜损伤的条件下, 钡通透性加大, 所以向培养基中加钡时搏动频率增加急剧, 钡的停跳阈降低。

摘 要

本文以心肌细胞动作电位与自发性搏动为指标看到, 向培养基中加入 0.1 ppm MnCl_2 对抗 0.42 mMOL/L 黄嘌呤与 5.3 nMOL/L 黄嘌呤氧化酶(X-XOD)对培养的心肌细胞的损伤作用。这可能是锰通过含锰超氧化物歧化酶(Mn-SOD)清除 X-XOD 诱发的超氧阴离子自由基(O_2^-)所致。

参 考 文 献

- [1] 顾公望, 1988, 微量元素, 1:5-8.
- [2] 宁选等, 1988, 中国营养学会第二届微量元素专题讨论会论文摘要汇编, pp.53.
- [3] 孔祥瑞, 1982, 必需微量元素的营养生理及临床意义, pp. 339.
- [4] 胡锦丰等, 1988, 中国营养学会第二届微量元素专题讨论会论文摘要汇编, pp.61.
- [5] 王雪清等, 1988, 全国第一届分子生物物理学会议论文摘要汇编, pp.71.
- [6] J. M. McCord, 1985, *New Eng J Med*, 312(3):159-164.
- [7] 方允中, 1988, 自由基生物学与自由基医学学术会议资料, pp.56.
- [8] H. Gondo et al, 1986, *Jap J Physiol*, 36(3):467-484.
- [9] D. Potreau et al, 1987, *Pflugers Arch.*, 410(3):326-334.