[文章编号] 1000- 4718(2004)04- 0571- 04

甘氨酸对缺氧/复氧心肌细胞[Ca^{2+}]$_i$和TNF- α浓度的影响*

李晓娟#, 陆大祥△, 王华东, 戚仁斌, 王彦平, 李楚杰
(暨南大学病理生理学教研室, 广东 广州 510632)

[摘 要] 目的: 观察甘氨酸对缺氧/复氧心肌细胞内游离钙、心肌细胞存活率和TNF- α浓度的影响。方法: 利用原代培养的SD大鼠乳鼠心肌细胞建立心肌缺氧/复氧(H/R)模型, 实验分7组: ①对照组; ②缺氧/复氧(H/R)组; ③0.5 mmol/L甘氨酸(GLY)+ H/R组; ④1.0 mmol/L GLY+ H/R组; ⑤2.0 mmol/L GLY+ H/R组; ⑥4.0 mmol/L GLY+ H/R组; ⑦4.0 mmol/L GLY对照组。结果: 在一定浓度范围内(0.5- 2.0 mmol/L), 甘氨酸能抑制缺氧/复氧损伤引起的细胞内钙超载, 并呈现剂量依赖性关系, 在2.0 mmol/L浓度水平, 达到最佳抑制效应。甘氨酸能抑制心肌细胞产生TNF- α, 避免心肌H/R损伤的加重, 增加心肌细胞的存活率。结论: 甘氨酸对缺氧/复氧心肌具有保护作用, 其机制与抑制钙超载, 减少TNF- α的生成有关。

[关键词] 缺氧; 甘氨酸; 肿瘤坏死因子
[中图分类号] R363 [文献标识码] A

随着人们生活水平的提高和生活节奏不断加快, 冠心病等心肌缺血性疾病的发病率呈上升趋势, 目前改善心肌缺血最理想的方法是尽早恢复组织的血液灌流, 然而再灌注导致部分机体心肌损伤的加重便成为缺血性疾病防治中所要解决的重要问题。

Ca^{2+}作为细胞生命活动中信息传递的第二信使, 是维持心肌细胞功能的重要因素, 心肌受损时, 细胞内游离钙浓度升高, 出现钙超载; 同时心肌细胞自分泌肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α), 加重心肌细胞损伤。本实验室先前的研究发现, 甘氨酸能够减轻内毒素[1]引起的心肌损伤、对抗垂体后叶素诱导的心肌缺血性[2]和缺血- 再灌注性损伤[3]。本实验通过建立体外培养的乳鼠心肌细胞缺氧/复氧模型模拟在体的心肌细胞缺血- 再灌注损伤, 通过心肌细胞[Ca^{2+}]i、心肌细胞存活率和TNF- α浓度的测定, 观察甘氨酸对缺氧/复氧心肌细胞的保护作用, 为临床缺血性疾病的防治提供理论依据。

材 料 和 方 法

1 材料

新生1- 3 d SD大鼠由广东省实验动物中心提供; DMEM培养基购自美国Gibco公司; 胎牛血清购自杭州四季青生物制品所; 胰蛋白酶为Hyclone产品; Fura- 2/AM购自美国Sigma公司; TNF- α ELISA试剂盒购自晶美生物工程有限公司; EGTA购自威佳科技有限公司; 甘氨酸购自展晨生物科技有限公司; 其余试剂均为市售分析纯产品。Hanks及D- Hanks溶液按鄂征[4]的方法配制。荧光分光光度计: 日本产RF- 5000型(Shimadzu)。将0.5 mg Fura- 2/AM溶于0.5 mL二甲基亚砜(DMSO), 分装后- 20 ℃保存备用。

2 方法

2.1 心肌细胞培养 出生1- 3 d SD大鼠乳鼠20只, 无菌条件下取出心脏剪碎, 0.125%胰蛋白酶分次消化成单细胞悬液, 离心收集沉淀, 用含15%胎牛血清的DMEM培养基悬浮分散细胞, 100目筛网过滤, 将细胞悬液接种于25 mL培养瓶中, 在CO_2孵箱中(95% O_2, 5% CO_2, 37 ℃)培养90 min后, 弃去贴壁的成纤维细胞, 置换细胞悬液于另一培养瓶中, 每24 h换液1次, 48 h时, 心肌细胞已成片搏动, 用0.125%的胰蛋白酶消化, 加入含15%胎牛血清的DMEM培养基终止消化后离心弃上清, 再加入含15%胎牛血清的DMEM培养基吹打细胞, 经0.4%台盼蓝染色检测心肌细胞存活率> 90%, 制成1.5×10^9 cells/L的细胞悬液, 然后加入终浓度为1.0 μmol/L的Fura- 2/AM于37 ℃负载45 min, 取出离心去上清, 再用Hanks液清洗细胞两次, 洗去细胞外的Fura- 2/AM后进行模型复制。

2.2 心肌细胞H/R模型的建立[5] 预先用高纯氮气(99.9%)饱和D- Hanks液, 通气持续时间> 40

[收稿日期] 2003- 12- 15 [修回日期] 2004- 02- 14
* [基金项目] 广东省重点科技项目(No. 2KM04703S); 广东省社会发展公关项目(No. 2002C30102)
△通讯作者 Fax/Tel: 020- 85220004; E- mail: ldx@jnu.edu.cn
新乡医学院委托培养硕士研究生

min, 测血气 PO_2 ≤4.0 kPa 即为低氧液; 用纯氧(99.9%)饱和 Hanks 液(通气持续时间> 40 min), 即为复氧液。用低氧液置换正常培养液, 并于培养瓶中充入高纯氮气造成心肌细胞低氧, 封口膜密封培养瓶 30 min; 以复氧液置换低氧液, 开放培养瓶, 并充以纯氧 30 min 即为心肌细胞复氧。

2.3 *实验分组* 实验随机分为 7 组: ①对照组, 未经缺氧/复氧处理; ②缺氧/复氧(H/R)组, 心肌细胞缺氧 30 min 后复氧 30 min; ③0.5 mmol/L GLY+ H/R 组, 加入终浓度为 0.5 mmol/L 的甘氨酸, 缺氧 30 min 后复氧 30 min; ④1.0 mmol/L GLY+ H/R 组, 加入终浓度为 1.0 mmol/L 的甘氨酸, 缺氧 30 min 后复氧 30 min; ⑤2.0 mmol/L GLY+ H/R 组, 加入终浓度为 2.0 mmol/L 的甘氨酸, 缺氧 30 min 后复氧 30 min; ⑥4.0 mmol/L GLY+ H/R 组, 加入终浓度为 4.0 mmol/L 的甘氨酸, 缺氧 30 min 后复氧 30 min; ⑦4.0 mmol/L GLY 对照组, 加入终浓度为 4.0 mmol/L 的甘氨酸, 但未经缺氧/复氧处理。

2.4 *细胞内游离钙的测定* 应用荧光分光光度计, 荧光值测定在 λex= 340 nm, λem= 500 nm 条件下, 测定荧光强度 F, 加入终浓度 0.1% 的 Triton X-100, 轻轻吹打细胞, 测出最大荧光强度 Fmax, 加入终浓度 20 mmol/L 的 EGTA, 测出最小荧光强度 Fmin。$[Ca^{2+}]i$ 的计算:

$$[Ca^{2+}]i = Kd \times (F - Fmin)/(Fmax - F)\ (nmol/L)$$

式中 *Kd* 是 Fura-2 与 Ca^{2+} 结合反应的解离常数, *Kd* 值为 224 nmol/L, F 为静息时细胞悬液的荧光强度值, Fmax 为最大荧光强度值, Fmin 为最小荧光强度值。

2.5 *心肌细胞存活率检测* 造模后, 用 0.125% 的胰蛋白酶消化贴壁的心肌细胞, 并用含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养基中止消化, 充分吹打细胞悬液, 取 9 滴细胞悬液移入试管中, 加 1 滴 0.4% 台盼蓝溶液混匀, 3 min 内用血细胞计数板在倒置相差显微镜下分别计数活细胞和死细胞(蓝染细胞)。心肌细胞存活率= 未蓝染细胞/(蓝染细胞+ 未蓝染细胞) × 100%。

2.6 *TNF-α 水平的测定* 选择搏动良好的细胞造模后, 取上清液, 采用双抗体夹心 ELISA 法, 按试剂盒要求测定心肌细胞产生的 TNF-α。本法测定 TNF-α 的最低检测限为 10 ng/L。

3 统计学处理

所有统计均采用 SPSS 11.0 软件在计算机上进行随机区组设计的单因素方差分析, 各组数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

结 果

1 甘氨酸对 **H/R** 心肌细胞内游离钙浓度的影响

缺氧/复氧处理后, 心肌细胞内游离钙的浓度明显高于对照组($P < 0.01$), 表明模型复制成功; 给 0.5-2.0 mmol/L 的甘氨酸后, 心肌细胞内游离钙浓度明显降低, 其中在 0.5 mmol/L 时($P < 0.05$), 1.0 和 2.0 mmol/L 时($P < 0.01$)与 H/R 组比较有显著性差异, 而给予 4.0 mmol/L 的甘氨酸不能抑制缺氧/复氧造成的心肌细胞内钙超载; 0.5-2.0 mmol/L GLY+ H/R 3 组与对照组比较也有显著差异($P < 0.01$), 甘氨酸对照组和正常对照组之间比较无显著差异。见表 1。

表 **1** 不同浓度甘氨酸对 **H/R** 心肌细胞内游离钙浓度的影响

Tab 1 Effects of glycine on the concentration of the free calcium in myocardial cells during H/R(nmol/L. $\bar{x} \pm s$. $n = 6$)

Group	Concentration of free calcium
Control	44.14±12.91**
H/R	214.43±33.17#
0.5 mmol/L GLY+ H/R	175.38±8.23*#
1.0 mmol/L GLY+ H/R	140.24±11.23**#
2.0 mmol/L GLY+ H/R	99.42±13.00**#
4.0 mmol/L GLY+ H/R	250.08±36.76#
4.0 mmol/L GLY	41.20±7.44**

# $P < 0.01$ *vs* control group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ *vs* H/R group.

2 甘氨酸对 **H/R** 心肌细胞存活率的影响

由甘氨酸对心肌细胞内游离钙浓度的测定结果发现: 2.0 mmol/L 甘氨酸为抑制心肌细胞内钙超载的最适浓度, 因此采用 2.0 mmol/L 甘氨酸观察对心肌细胞存活率的影响。正常培养条件下, 心肌细胞存活率在 90% 左右; 缺氧/复氧组细胞存活率明显低于对照组($P < 0.01$); 甘氨酸处理组心肌细胞存活率明显高于缺氧/复氧组($P < 0.01$); 甘氨酸处理组与对照组比较也有显著差异($P < 0.01$), 甘氨酸对照组与正常对照组无显著差异, 见表 2。

表 **2** 甘氨酸对 **H/R** 心肌细胞存活率的影响

Tab 2 Effects of glycine on the survival rate of myocardial cells during H/R(%. $\bar{x} \pm s$. $n = 6$)

Group	Survival rate
Control	90.17±4.14
H/R	43.00±4.75#
2.0 mmol/L GLY+ H/R	68.33±6.71*#
2.0 mmol/L GLY	88.92±3.93

# $P < 0.01$ *vs* control group; * $P < 0.01$ *vs* H/R group.

3　甘氨酸对 H/R 心肌细胞 TNF-α 浓度的影响

缺氧/复氧时，培养液中 TNF-α 的浓度明显高于对照组（$P<0.01$）；而甘氨酸处理组培养液中 TNF-α 的浓度得到抑制，低于缺氧/复氧组（$P<0.05$）；甘氨酸处理组与对照组比较也有显著差异（$P<0.05$），甘氨酸对照组与正常对照组无显著差异，见表3。

表 3　甘氨酸对 H/R 心肌细胞内 TNF-α 浓度的影响

Tab 3　Effects of glycine on the concentration of TNF-α of myocardial cells during H/R (ng/L. $\bar{x}\pm s$. $n=6$)

Group	TNF-α
Control	16.40±3.33
H/R	41.33±10.52#
2.0 mmol/L GLY+ H/R	28.87±4.50*#
2.0 mmol/L GLY	17.70±5.26

# $P<0.05$ *vs* control group; * $P<0.05$ *vs* H/R group

讨　论

近年来，越来越多的研究表明游离的甘氨酸对许多器官、组织、细胞都具有保护作用，其保护作用主要体现在对抗缺氧、缺血再灌注损伤、LPS 攻击形成的二次打击和脓毒症等损伤方面。甘氨酸通过激活肝脏枯否氏细胞上的氯离子通道使细胞膜出现超极化阻滞，抑制钙内流，降低细胞内钙浓度，预防钙超载造成的细胞损伤[6]，并且在一定范围内与其浓度呈正相关[7]；甘氨酸还可通过甘氨酸门控的氯离子通道的一系列活动，对抗脂多糖诱导的细胞内钙积蓄和 TNF-α 的生成[8]；在酒精性肝损伤中，甘氨酸也可通过促进氯内流而减少 TNF-α 生成达到保护肝脏的作用[9]，提前给予甘氨酸可减轻肠缺血再灌注和内毒素作用所致的肝脏和肺损伤，减少组织中致炎因子 TNF-α 的产生，并降低 TNF-α mRNA 的表达[10]。甘氨酸是一种潜在的免疫调节剂，作用于败血症的早期和缺氧、再灌注等不同病理条件下，加速各项生理功能恢复[11]。

我们先前的实验结果表明，甘氨酸可通过增加缺血心肌中 NOS 和 SOD 的释放、降低 MDA 的产生以及促进热休克蛋白 70（heat shock protein 70, HSP70）mRNA 的表达[2]发挥对缺血性心肌的保护作用；甘氨酸还可通过增加心肌组织中的 NOS 的活性和 NO 的含量、促进 Bcl-2 mRNA 的表达以及抑制 iNOS 的活性[3]保护缺血再灌注心肌。本实验是在先前实验的基础上进一步探讨甘氨酸在缺血性疾病防治中的作用。

钙超载是细胞缺血缺氧后继发损伤的重要环节，是细胞死亡的最后通路。研究表明心肌缺氧/复氧导致细胞内酸中毒，可通过 H^+-Na^+ 交换继发 Na^+-Ca^{2+} 交换增加或 H^+-Ca^{2+} 交换增加造成细胞内钙超载[12]。本实验证实在一定浓度范围（0.5–2.0）mmol/L 内，甘氨酸能抑制缺氧/复氧损伤引起的细胞内钙超载，并呈现剂量依赖性关系，在 2.0 mmol/L 浓度水平，达到最佳抑制效应。统计学检验显示甘氨酸处理组与对照组之间也有显著性差异，表明甘氨酸可部分抑制缺氧/复氧心肌细胞内钙超载。

TNF-α 在缺血再灌注损伤中所起的作用也受到越来越多的重视，心肌组织进行再灌注循环时，巨噬细胞和心肌细胞本身受刺激产生分泌 TNF-α，然后作用于血液中的白细胞，导致炎症及损伤的发生[13]。TNF-α 导致的心肌功能障碍包括钙平衡的变化、兴奋-收缩耦联的破坏、心肌细胞凋亡等[14]。本实验证实了在缺氧/复氧的心肌细胞 TNF-α 释放明显增加，而甘氨酸可抑制其产生，保护细胞免受损伤。

本实验表明在心肌细胞缺氧/复氧过程中，甘氨酸能通过抑制心肌细胞钙超载、提高细胞存活率和减少 TNF-α 的释放起到心肌保护作用，为甘氨酸防治缺血性心脏疾病提供进一步的理论和实验依据。

[参　考　文　献]

[1] 戚仁斌，陆大祥，付咏梅，等. 甘氨酸对内毒素所致心肌损伤的影响[J]. 中国病理生理杂志，2001，17(8)：803.

[2] 周　琼，陆大祥，付咏梅，等. 甘氨酸对小鼠心肌缺血性损伤的防治作用研究[J]. 中国病理生理杂志，2002，18(4)：360-362.

[3] 张齐好，陆大祥，王华东，等. 甘氨酸对心肌缺血-再灌注小鼠一氧化氮系统和 *bcl*-2 mRNA 表达的影响[J]. 中国病理生理杂志，2004，20(1)：42-46.

[4] 鄂　征 主编. 组织培养技术[M]. 第1版. 北京：人民卫生出版社，1982. 114.

[5] 程何祥，张荣庆，王海昌，等. 牛磺酸对低氧-复氧乳鼠心肌细胞内游离钙浓度的影响[J]. 第四军医大学学报，2003，24(3)：226-228.

[6] Wheeler M, Stachlewitz RF, Yamashina S, et al. Glycine-gated chloride channels in neutrophils attenuate calcium influx and superoxide production[J]. FASEB J, 2000, 14(3): 476-484.

[7] Yamashina S, Konno A, Wheeler MD, et al. Endothelial cells contain a glycine-gated chloride channel[J]. Nutr Cancer, 2001, 40(2): 197-204.

[8] Wheeler MD, Thurman RG. Production of superoxide and TNF-alpha from alveolar macrophages is blunted by glycine[J].

Am J Physiol, 1999, 277(5 Pt 1): L952- L959.

[9] Yin M, Ikejima K, Arteel GE, et al. Glycine accelerates recovery from alcohol- induced liver injury[J]. J Pharmacol Exp Ther, 1998, 286(2): 1014- 1019.

[10] Grotz MR, Pape HC, van Griensven M, et al. Glycine reduces the inflammatory response and organ damage in a two-hit sepsis model in rats[J]. Shock, 2001, 16(2): 116- 121.

[11] Spittler A, Reissner CM, Oehler R, et al. Immunomodulatory effects of glycine on LPS- treated monocytes: reduced TNF-alpha production and accelerated IL- 10 expression[J]. FASEB J, 1999, 13(3): 563- 571.

[12] 张北奇, 马 宁, 董 力, 等. 培养大鼠心肌细胞缺氧与复氧时 H^+ - Ca^{2+} 交换的研究[J]. 生理学报, 1995, 47(1): 54- 58.

[13] Meldrum DR. Tumor necrosis factor in the heart[R]. Am J Physiol, 1998, 274(3 Pt 2): R577- 595.

[14] Cain BS, Meldrum DR, Dinarello CA, et al. Adenosine reduces cardiac TNF- alpha production and human myocardial injury following ischemia- reperfusion[J]. J Surg Res, 1998, 76(2): 117- 123.

Effects of glycine on intracellular free calcium and tumor necrosis factor- α in cardiomyocytes during hypoxia/reoxygenation

LI Xiao- juan, LU Da- xiang, WANG Hua- dong, QI Ren- bin, WANG Yan- ping, LI Chu- jie

(Department of Pathophysiology, Medical College of Jinan University, Guangzhou 510632, China)

[ABSTRACT] **AIM:** To observe the influence of glycine on intracellular free calcium, the concentration of tumor necrosis factor- α and the survival rate of myocardial cells during hypoxia/reoxygenation (H/R). **METHODS:** The simulated model of myocardial ischemia- reperfusion with the primary cultured cardiomyocytes of neonatal rats was established, and the cultured cardiomyocytes were divided into seven groups, control group, hypoxia/reoxygenation group, glycine (0.5 mmol/L) plus hypoxia/reoxygenation group, glycine (1.0 mmol/L) plus hypoxia/reoxygenation group, glycine (2.0 mmol/L) plus hypoxia/reoxygenation group, glycine (4.0 mmol/L) plus hypoxia/reoxygenation group, 4.0 mmol/L glycine group. **RESULTS:** Within certain concentration (0.5- 2.0 mmol/L), the glycine could inhibit the calcium overload resulting from hypoxia/reoxygenation injury in cells in a dose- dependent manner with the optimal inhibitory effect at 2.0 mmol/L. Glycine inhibited the secretion of tumor necrosis factor- α from myocardial cells and increased the survival rate of myocardial cells. **CONCLUSION:** Glycine has a protective effect on hypoxia/reoxygenation myocardial cells, which may be related to inhibiting calcium overload and decreasing the production of tumor necrosis factor- α.

[KEY WORDS] Anoxia; Glycine; Tumor necrosis factor