

• 基础研究 •

不同周龄大鼠心肌细胞收缩/舒张功能的研究

朱肖星 牛小麟 徐琳 李高中 陈定章 朱萧玲 陈绍洋 魏瑾 王文清

【摘要】 目的 研究不同周龄对大鼠心肌细胞收缩/舒张功能的影响。方法 SD大鼠分为三个周龄组:A组(12~15周)、B组(36~41周)和C组(51~55周),并以常规酶解法分离成年大鼠心肌细胞,观察分离即刻(D时间点)、复钙1h后(E时间点)和电刺激10min后(F时间点)心肌细胞成活率,采用IonOptix单细胞边缘探测系统同步检测心肌细胞的收缩幅度、收缩/舒张速度和钙瞬变等,这些指标均由计算机自动实时采集并记录。结果 复钙1h后和电刺激10min后心肌细胞成活率降低均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$),周龄越大越明显,随着周龄的增大,心肌细胞收缩幅度(峰值高度,ph)、心肌细胞收缩幅度/单个心肌细胞的长度百分比(ph/bl%)、最大收缩速率(maximal velocity of contraction, +dL/dt)、最大舒张速率(maximal velocity of relaxation, -dL/dt)和钙瞬变幅度(Δ FFI)降低,ph在A组、B组和C组分别为(0.14±0.06),(0.12±0.05),(0.11±0.05) μm ;ph/bl%分别为(9.17±3.54)%、(7.14±2.58)%和(6.56±2.36)%;+dL/dt分别为(2.01±0.74),(1.82±0.51),(1.51±0.56) $\mu\text{m/s}$; -dL/dt分别为(2.10±0.75),(1.70±0.62),(1.41±0.52) $\mu\text{m/s}$; Δ FFI分别为(0.38±0.05),(0.35±0.04),(0.25±0.05)。其中C组ph/bl%、+dL/dt、-dL/dt和 Δ FFI均较A组显著降低($P<0.05$),降低幅度分别为27%,26%,33%和31%。结论 随着周龄的增大,分离大鼠心肌细胞的成活率下降,大鼠心肌细胞的收缩/舒张功能降低,钙瞬变幅度减小。

【关键词】 心肌细胞;年龄;心肌收缩;心肌舒张;大鼠

The contraction and relaxation functions of cardiac myocytes in rats of different ages

ZHU Xiaoxing*, NIU Xiaolin, XU Lin, et al

* Department of Cardiology, Second Affiliated Hospital, Xian Jiaotong University, Xian 710004, China

【Abstract】 Objective To investigate the changes of contraction and relaxation functions of cardiac myocytes in rats of different ages and the possible mechanism involved, Methods SD rats were divided into three groups: group A(12-15weeks), group B (36-41weeks)and group C (51-55weeks). Cardiac myocytes were separated by enzyme and observed after separation, after loading calcium for 1 h and after electric stimulation for 10 min. The contraction amplitude was measured with video edge tracker method. The following indexes including contraction amplitude(ph), contraction amplitude/single cardiac myocyte length percentage(ph/bl%), maximal velocity of contraction (+dL/dt), maximal velocity of relaxation (-dL/dt)and calcium transients(Δ FFI) were analysed by the computer. Results With increasing age of the rats, the survival rates of myocytes declined after loading calcium for 1 h and electric stimulation for 10 min, with significant difference($P<0.05$ or $P<0.01$). ph Of groups A, B and C were (0.14±0.06), (0.12±0.05) and (0.11±0.05) μm respectively; ph/bl% of the three groups were (9.17±3.54)%, (7.14±2.58)% and(6.56±2.36)% respectively; +dL/dt of the three groups were (2.01±0.74),(1.82±0.51)and(1.51±0.56) $\mu\text{m/s}$ respectively; -dL/dt of the three groups were (2.1±0.75), (1.70±0.62)and(1.41±0.52) $\mu\text{m/s}$ respectively; Δ FFI of the three groups were (0.38±0.05),(0.35±0.04)and(0.25±0.05) respectively. ph/bl%, +dL/dt, -dL/dt and Δ FFI of group C were lower than those of group A with significant difference. These indexes were lower by

收稿日期:2006-11-10

作者单位:710004 西安市,西安交通大学第二附属医院(朱肖星、牛小麟、魏瑾、李高中);710032 西安市,第四军医大学西京医院超声科(陈定章),麻醉科(朱萧玲、陈绍洋);510010 广州市,解放军广州军区总医院(徐琳);100036 北京市,空军总医院涉外病房(王文清)

作者简介:朱肖星,男,1972年8月生,浙江省杭州市人,医学博士,主治医师。Tel:029-84774574, E-mail:xx_zhu2003@yahoo.com.cn

通讯作者:牛小麟, Tel:029-87679880, E-mail:niuxl@mail.xjtu.edu.cn;王文清, Tel:010-66928422, E-mail:wwq6087@163.com

27%, 26%, 33% and 31% respectively. **Conclusion** With increasing rat age, the survival rates of myocytes decrease, and contraction function, relaxation function and calcium transients of cardiac myocytes decline.

【Key words】 cardiac myocyte; age; contraction, myocardial; relaxation, myocardial; rats

我们研发新的药物,常用的实验动物为大鼠,它的价格便宜,体积小,便于实验操作和观察。考虑整体动物的实验受神经、体液因素的影响,心肌细胞是心脏的基本功能单位,在特定的病理状态和药物干预下,我们采用动缘检测系统测定单个心肌细胞收缩舒张功能,可及时提供心脏收缩、舒张功能的直接信息。随着年龄的变化,心肌细胞的收缩/舒张功能会有改变。目前,未见应用该技术进行此类研究的报道,因此,观察鼠龄增大对心肌细胞收缩/舒张功能的影响及其机制。

1 材料和方法

1.1 材料 成年 Sprague-Dawley (SD) 大鼠(由第四军医大学实验动物中心提供), 240~500g, 雌雄不拘, 正常饮食。胶原酶 II (美国 Worthington Biochemical 公司), IonOptix 单细胞检测系统(美国 IonOptix 公司), 微量双道程控灌流泵(美国 World Precision Instruments 公司)。

1.2 SD 大鼠年龄的分组及依据 A 组(12~15 周)、B 组(36~41 周)和 C 组(51~55 周), 分别与人类的青年、中年和中老年近似或相当。

1.3 大鼠心肌细胞分离 以常规酶解法分离成年大鼠心肌细胞^[1,2]。断头法处死大鼠, 迅速开胸取出心脏并固定于 Langendorff 灌流系统, 经主动脉灌流(37℃)含 O₂ 无钙台氏液。心脏停跳后, 换以含 0.3g/L 胶原酶 II (299 kU/g) 和 0.8 g/L 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA) 的无钙台氏液灌流 10~30min, 待心脏变松软、灌流液流出速度明显加快后, 再以无钙台氏液灌流冲洗残留酶液约 5 min, 去除心房及主动脉, 并将心室肌组织置于含 20 g/L BSA 的含氧 KB 液中, 将心室肌组织剪碎, 以粗头吸管轻轻反复吹打并经 200 目筛网过滤细胞悬液, 室温静置 10 min, 沉降离心室肌细胞, 保留沉淀并换入新鲜 KB 液+20 g/L BSA, 静置 40 min 后, 换以无钙台氏液并逐步复钙至终浓度 1.8 mmol/L, 得到分离的钙耐受(calcium tolerant)心室肌细胞, 保存在含 1.8 mmol/L CaCl₂ 的台氏液中。此法分离, 常规可得到 60%~80% 呈杆状的成活心肌细胞。

1.4 不同时间点细胞存活率的检测 分三个时间点检测分离的细胞存活率, 在光镜下观察呈杆状的

成活心肌细胞的比率, D 时间点(分离即刻)、E 时间点(复钙 1h 后)和 F 时间点(电刺激 10min 后)的细胞成活率。时间点选择的依据如下: 分离即刻的心肌细胞, 目的是观察分离后的质量; 复钙 1h 后观察心肌细胞的成活率, 此时复钙已经完成, 得到的是钙耐受的心室肌细胞, 此种细胞可以用于单细胞收缩功能的检测; 因为电刺激 5min 后, 细胞状态稳定才可以用于实验, 而且记录时间选为 5min, 所以电刺激 10min 后观察成活心肌细胞的比率。

1.5 单细胞收缩的检测^[3~5] 心室肌细胞采用 IonOptix 单细胞动缘检测系统检测心肌细胞收缩。将心肌细胞置于倒置显微镜(Olympus)载物台上的细胞灌流小室内, 以含 O₂ 台氏液灌流(1ml/min, 25℃)。给予 0.5Hz, 5ms 波宽的电场刺激, 场刺激由灌流小室底部两侧镶嵌的铂电极产生, 细胞收缩影像通过 40×物镜传输到 IonOptix 的 MyoCam 照相系统并呈现在监视器上。心肌细胞收缩幅度和收缩/舒张速度等指标由计算机自动实时采集并记录。选取形态, 功能良好的心室肌细胞进行观察。心室肌细胞选取标准: (1)细胞呈长杆状, 长约宽的 5~7 倍; (2)细胞边缘折光性好, 横纹清晰, 细胞膜上无空泡; (3)无自发收缩, 能随电刺激稳定地收缩; (4)给药前细胞收缩幅度恒定, 至少 5min 以上。

1.6 心肌细胞钙瞬变(calcium transient)检测 将 Fura-2/AM (0.5 μmol/L) 与心室肌细胞避光孵育 30 min (25℃), 采用双激发荧光光电倍增系统(IonOptix, 美国)检测荧光信号。75 W 紫外氙光灯发射的光通过 360 nm 或 380 nm 的滤光片到达 0.5 Hz 刺激下收缩的心肌细胞, 细胞内与游离 Ca²⁺ 结合的荧光物质被激发, 其发射光在 510 nm 处被检测并通过光电倍增管记录。细胞相继迅速被 360 nm 和 380 nm 激发光照射并交替扫描, 细胞内游离 Ca²⁺ 浓度的改变(钙瞬变)可通过两种波长荧光强度的比率(ΔFFI)来反映^[3]。

1.7 统计学处理 实验数据以平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 两组间差异采用组间 *t* 检验, 率的比较用卡方检验, 用 Origin 统计软件进行统计学检验, 以 *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同周龄组分离心室肌细胞成活率 三个不

同的周龄组心肌细胞分离即刻(D时间点)的存活率没有差异,但复钙1h后(E时间点),存活率较分离即刻显著降低($P < 0.05$,表1),且随鼠龄的增加存活率降低,三组间差异显著。电刺激10min后(F时间点),存活率进一步明显降低,鼠龄越大,降低越明显。

2.2 不同周龄组对心肌细胞收缩、舒张功能和钙瞬变的影响 台氏液灌流心肌细胞约5 min,待细胞收缩幅度稳定后,记录心肌细胞的 ph 、 $+dL/dt$ 、 $-dL/dt$ 和 ΔFFI ,并计算 $ph/bl\%$ 。随着鼠龄的增长,发现心肌细胞收缩功能(ph 、 $ph/bl\%$ 和 $+dL/dt$)、舒张功能($-dL/dt$)和钙瞬变幅度(ΔFFI)逐步降低,其中C组的中老年大鼠较A组明显降低($P < 0.05$,表2)。

3 讨论

三个不同的周龄组心肌细胞分离即刻的存活率没有差异,但复钙后1h存活率较分离即刻显著降低,随鼠龄的增大,存活率降低,三组间差异显著。电刺激10min后,存活率进一步明显降低,随着鼠龄越大,降低越明显。随着鼠龄的增大,心肌细胞的功能也下降。由于酶解分离心肌细胞,对细胞总有一定的损伤,而且心肌细胞经历从无钙恢复到正常钙浓度,钙浓度的升高对细胞本身也会有损伤,对钙的耐受能力降低,鼠龄大者,复钙就不容易耐受,随鼠龄的增大,心肌细胞对外界环境变化的适应能力下降。

采用单细胞收缩的方法检测心肌细胞的收缩/舒张功能,大周龄组的心肌细胞对电刺激反应显著减弱($P < 0.05$),说明成年大鼠随着年龄增大,细胞的机械功能有所降低。为了更准确反映心肌细胞功

能的改变程度,笔者采用单细胞动缘检测技术,用 ph 、 $ph/bl\%$ 、 $+dL/dt$ 、 $-dL/dt$ 和 ΔFFI 等指标;其中 ph 代表心肌细胞的收缩幅度,因为细胞大小有差异,收缩幅度也不同,为排除细胞大小造成收缩力的差异,笔者采取心肌细胞收缩幅度/单个心肌细胞长度的百分比($ph/bl\%$),经过校正的 $ph/bl\%$ 可更好地反映心肌细胞的收缩能力。 $+dL/dt$ 表示细胞收缩时长度变化的速率,反映心肌细胞的收缩功能。在一定的范围内, ph 、 $ph/bl\%$ 、 $+dL/dt$ 大,心肌的收缩功能好; $-dL/dt$ 代表心肌细胞舒张时,细胞长度恢复的速率,在一定的范围内, $-dL/dt$ 大,反映心肌舒张功能好^[6,7],从三个不同周龄组的 ph 、 $ph/bl\%$ 、 $+dL/dt$ 和 $-dL/dt$ 变化看,随着鼠龄的增大,发现心肌细胞收缩、舒张功能有降低的趋势,以中老年大鼠组(C组)降低明显,这与正常人的临床心脏超声检查的结果相符^[8,9]。控制心肌兴奋-收缩偶联的各种机制可随年龄而发生变化,心脏的老年性改变主要表现为心肌蛋白质合成和利用降低,脂褐素(老化色素)沉积可引起细胞内蛋白质合成障碍,减少了收缩蛋白的补充,是老年人心肌收缩力下降的原因之一,表现在左室射血期缩短,射血前期延长,反映了左心室收缩功能和速度降低。随着年龄的增大,心肌细胞间质易发生胶原纤维增生,心肌间质纤维化,胶原蛋白的可溶性下降,引起顺应性和舒张功能下降。心肌ATP酶活性随年龄增大而降低,因此心脏收缩和舒张时由肌浆网释放和摄取钙离子的速度减慢^[9~11],心室舒张早期的充盈速率降低,单个细胞的收缩功能变化可以排除神经反射和体液因素的影响,较好地反映心脏收缩/舒张功能的变化,因此,有较大的意义。 ΔFFI 反映钙瞬变的幅度,随着鼠龄的增加,发现 ΔFFI 降低,提示心肌细

表1 三个周龄组不同时间点分离心室肌细胞成活率(n=10)

组别(周)	D时间点(%)	E时间点(%)	F时间点(%)
A组(12~16)	90±9	82±11 [▲]	51±12 ^{★△}
B组(36~41)	89±10	73±15 ^{★▲}	43±23 ^{★▲△}
C组(51~55)	89±12	61±21 ^{★△▲}	36±16 ^{★△★}

注:与A组比较,★ $P < 0.05$,△ $P < 0.01$;与B组比较,▲ $P < 0.05$,* $P < 0.01$;与D时间点比较,▲ $P < 0.05$,* $P < 0.01$;与E时间点比较,△ $P < 0.05$

表2 不同周龄组对心肌细胞收缩、舒张功能和钙瞬变的影响(n=10)

组别(周)	$ph(\mu m)$	$ph/bl(\%)$	$+dL/dt(\mu m/s)$	$-dL/dt(\mu m/s)$	ΔFFI
A组(12~16)	0.14±0.06	9.17±3.54	2.01±0.74	2.1±0.75	0.38±0.05
B组(36~41)	0.12±0.05	7.14±2.58	1.82±0.51	1.70±0.62	0.35±0.04
C组(51~55)	0.11±0.05	6.56±2.36*	1.51±0.56*	1.41±0.52*	0.25±0.05*

注:与A组比较,* $P < 0.05$

(下接第426页)

黏稠度;增强大血管和微血管内皮细胞一氧化氮合酶活性^[5,6],拮抗活性氧簇的毛细血管通透性改变,从而保护血管,改善肾功能^[7]。

近年来老年人糖尿病肾病、高血压肾病的发生率逐年升高,加之肾功能随年龄的增加而生理性衰减,越来越多老年人出现了肾功能不全的情况。病情常迁延恶化,最终将发展为终末期肾功能衰竭。目前常规综合治疗慢性肾功能衰竭的方案,并未能显著抑制肾功能的恶化。本研究中,对照组给予常规综合治疗,患者 BUN、Scr、Ccr 变化虽然无统计学意义,但临床上可部分稳定病情。而治疗组患者血 Scr 较治疗前显著下降,Ccr 显著上升,患者病情明显好转,表明羟苯磺酸钙在治疗慢性肾功能不全中优于常规综合治疗。本研究还表明,羟苯磺酸钙不仅可以改善肾功能,而且对于老年患者用药安全性能好,在老年慢性肾功能不全的治疗上有着很好的应用价值。

尽管如此,目前对于羟苯磺酸钙的肾脏保护作用,仍存在许多疑问。比如本研究发现使用羟苯磺酸钙后患者 Scr 显著下降,Ccr 显著上升,而 BUN 却无相应的显著改变;该药是否通过肾外机制如抑制肌酸的代谢作用而降低 Scr,尚待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Garay RP, Hannaert P, Chiavaroli C. Calcium dobesilate

in the treatment of diabetic retinopathy. *Treat Endocrinol*,2005,4:221-232.

[2] Padilla E, Ganado P, Sanz M, et al. Calcium dobesilate attenuates vascular injury and the progression of diabetic retinopathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes Metab Res Rev*,2005,21:132-142.

[3] Cagli K, Ozisik K, Emir M, et al. The effect of calcium dobesilate on venous function following saphenectomy in coronary artery bypass grafting. *Cardiovasc Revasc Med*,2006,7:212-216.

[4] Liu XC, Lu YM, Jin XB, et al. Dobesilate calcium in the treatment of chronic kidney failure. *Natl Med J China*, 2004,84:1892-1893.

[5] Suschek CV, Kolb H, Kolb-Bachofen VV. Effects of magnesium dobesilate on nitric oxide synthase activity in endothelial cells. *Int J Angiol*,1999,8:21-24.

[6] Brunet J, Farine JC, Garay RP, et al. Angioprotective action of calcium dobesilate against reactive oxygen species-induced capillary permeability in the rat. *Eur J Pharmacol*,1998,358:213-220.

[7] Hannaert P, Brunet J, Farine JC, et al. Antioxidant-angioprotective actions of calcium dobesilate in diabetic rats. *Int J Angiol*,1999,8:2-4.

(上接第 420 页)

胞内的钙浓度不能及时升高或降低,反映心肌细胞收缩或舒张功能降低;反之,心肌细胞内钙浓度的快速升高和降低,即钙瞬变加快,反映心肌细胞收缩和舒张功能增强。

研究表明,检测单细胞收缩对心脏生理和药理研究也有较大价值,在细胞水平提供心肌收缩、舒功能变化最直接的信息,钙瞬变的同时测定为了解胞浆钙浓度的变化和肌浆网功能研究提供了理想的工具。

参 考 文 献

[1] 朱肖星,梅其炳,刘莉,等. MN9202 对心肌细胞的收缩和舒张功能的影响. *中华老年多器官疾病杂志*,2005,4:50-53.

[2] 朱肖星,梅其炳,刘莉,等. MN9202 抑制心肌细胞收缩、舒张机制的研究. *解放军医学杂志*,2005,30:1022-1024.

[3] 郭海涛,朱妙章,裴建明,等. 血管钠肽抑制异丙肾上腺素增强的大鼠心肌细胞钙瞬变. *生理学报*,2004,56:335-340.

[4] Hintz KK, Norby FL, Duan J, et al. Comparison of cardiac excitation-contraction coupling in isolated ventric-

ular myocytes between rat and mouse. *Comp Biochem Physiol*,2002, 133:191-198.

[5] Okayama H, Hamada M, Kawakami H, et al. Increased contraction of myocytes isolated from the young spontaneously hypertensive rat; relationship between systolic and diastolic function. *Am J Hypertens*,1998,11:349-356.

[6] Shen JX, Wang SQ, Han TZ, et al. Polymorphism of calcium sparks evoked from in-focus calcium release units in cardiac myocytes. *Biophys J*, 2004,86:182-190.

[7] Cheng H, Wang SQ. Calcium signaling between sarcolemmal calcium channels and ryanodine receptors in heart cells. *Front Biosci*,2002,7:1867-1878.

[8] Bers DM. *Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force*. 2nd. Boston: Kluwer Academic Publishers,2001. 273-331.

[9] 朱妙章,袁文俊,吴博威,等. *心血管生理学与临床*. 北京:高等教育出版社,2004. 192-199.

[10] 沈建新,程和平,韩太真. 异丙肾上腺素对心肌细胞内钙释放和肌浆网内钙容量的影响. *心脏杂志*,2004,16:218-220.

[11] 朱肖星,牛小麟,魏瑾,等. 心肌细胞蛋白质合成与活力关系的研究. *南方医科大学学报*,2007,27:878-880.