

· 休克与复苏 ·

甘氨酸对缺氧大鼠心肌细胞的保护作用及机制

周军利 黄跃生 党永明 张家平

【摘要】 目的 探讨甘氨酸对缺氧大鼠心肌细胞的保护作用及机制。方法 分离培养 SD 乳鼠心肌细胞,用生化分析仪检测缺氧后 6 h 及甘氨酸处理后心肌细胞培养液中肌酸激酶(CK)、乳酸脱氢酶(LDH)的释放量;用免疫组织化学方法观察常氧及缺氧心肌细胞甘氨酸受体 α_1 亚基(GlyR α_1)的表达;激光共聚焦显微镜检测细胞内游离钙及心肌细胞膜电位的变化。结果 缺氧后 6 h 心肌细胞培养液中 CK、LDH 值[(393.8 ± 5.3)、(1 564 ± 41) U/L]均升高,甘氨酸处理后 CK、LDH 值[(56.3 ± 2.7)、(716 ± 18) U/L]均明显下降($P < 0.01$)。常氧及缺氧心肌细胞 GlyR α_1 均呈阳性表达。常氧心肌细胞钙离子平均荧光强度为 27 ± 8,缺氧后 6 h 增加为 139 ± 29($P < 0.01$);而甘氨酸处理后细胞钙离子平均荧光强度为 51 ± 11,与缺氧后 6 h 比较明显减少($P < 0.01$),与常氧下比较却明显增加($P < 0.01$)。常氧心肌细胞膜电位为 177 ± 20,缺氧后 6 h 膜电位发生去极化(62 ± 9, $P < 0.01$);而加入甘氨酸后心肌细胞膜电位为 123 ± 16,较缺氧后 6 h 时的去极化程度明显减轻($P < 0.01$)。结论 甘氨酸对缺氧心肌细胞有保护作用,其可能的机制是甘氨酸与其受体结合后,减轻了心肌细胞膜去极化,从而减少了细胞膜电压依赖性钙通道开放,使钙离子内流减少。

【关键词】 甘氨酸; 心肌; 细胞低氧; 钙; 膜电位

Protective effect of glycine on hypoxic rat myocardial cells ZHOU Jun-li, HUANG Yue-sheng, DANG Yong-ming, ZHANG Jia-ping. Institute of Burn Research, Southwest Hospital, State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, The Third Military Medical University, Chongqing 400038, P. R. China
Corresponding author: HUANG Yue-sheng, Email: yshuang@public.cta.cq.cn, Tel: 023-68754173

【Abstract】 Objective To investigate the protective effect of glycine (Gly) on hypoxic rat myocardial cells and its mechanism. Methods Sdfetal rat myocardial cells were isolated and cultured in vitro. The released amounts of creatine kinase (CK) and lactate dehydrogenase (LDH) from the myocardial cells in the culture supernatant at 6 hour after hypoxia and after glycine treatment were determined with ultraviolet spectrophotometer. The expression of the α_1 subunits of glycine receptor (GlyR α_1) in the myocardial cells was detected by immunofluorescent histochemistry. The changes in the intracellular calcium content and the membrane potential of the myocardial cells were determined by laser confocal microscopy. Results The release of CK and LDH in the culture supernatant increased significantly at 6 h after hypoxia [(393.8 ± 5.3), (1564 ± 41) U/L] compared with those before hypoxia, while their levels were obviously decreased after glycine treatment [(56.3 ± 2.7), (716 ± 18) U/L, ($P < 0.01$)] compared with those before glycine treatment. There was positive expression of GlyR α_1 in myocardial cells before and after hypoxia. The average fluorescent intensity of intracellular calcium at 6 hours after hypoxia (139 ± 29) was significantly higher than that before hypoxia (27 ± 8, $P < 0.01$), while it was obviously lower (51 ± 11) after glycine treatment compared with that at 6 hours after hypoxia, but it was evidently higher than that before hypoxia ($P < 0.01$). The membrane potential 6 hours after hypoxia (62 ± 9) was obviously lower than that before hypoxia (177 ± 20, $P < 0.01$), but it was obviously higher after glycine treatment (123 ± 16) than that at 6 hours after hypoxia ($P < 0.01$). Conclusion Glycine might be beneficial in the protection of myocardial cells against hypoxia. The underlying mechanism may involve attenuation of membrane potential depolarization after hypoxia by conjugation of glycine with its receptor, depleting in turn voltage-dependent calcium channel on the cellular membrane, preventing calcium overload due to influx of calcium ions after hypoxia.

【Key words】 Glycine; Myocardium; Cell hypoxia; Calcium; Membrane potential

基金项目:国家杰出青年科学基金资助项目(30125040),国家重点基础研究发展规划资助项目(G1999054202);国家自然科学基金重点资助项目(30430680);创伤烧伤复合伤国家重点实验室开放课题基金资助项目

作者单位:400038 重庆,第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室

通信(讯)作者:黄跃生,Email: yshuang@public.cta.cq.cn,电话:023-68754173

严重烧伤后早期即发生心肌损害,由于心脏的特殊性、重要性,其损害不仅可引起心功能不全,还可诱发或加重休克,导致或加重全身其他组织器官的缺血缺氧损害和炎症反应,这一现象被称为“休克心”^[1,2]。加强心肌细胞对缺氧的耐受能力,是近年来细胞保护机制的研究热点。而甘氨酸对细胞的

保护作用逐渐受到人们的重视。研究表明,游离的甘氨酸具有显著的细胞保护作用^[1]。已证实,库普弗细胞、中性粒细胞、肾小管上皮细胞、肝实质细胞、人的精子细胞等均存在甘氨酸受体^[2,3]。以往的研究已经证实甘氨酸对缺氧大鼠心肌细胞具有保护作用^[4],在此基础上笔者就甘氨酸对大鼠心肌细胞保护作用的作用机制作进一步探讨。

材料与 方法

1. 主要试剂与仪器:羊多克隆抗体甘氨酸受体 α_1 亚基(GlyR α_1 ,美国 Santa Cruz 公司),异硫氰酸荧光素(FITC)标记兔抗山羊 IgG(北京中山生物工程公司),氨基乙磺酸(美国 Sigma 公司),Fluo-4-AM, F-127(美国 Molecular Probes 公司),DiBAC₂(美国 Molecular Probes 公司),心肌细胞乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)试剂盒(南京建成生物工程公司),激光共聚焦显微镜(TCS-NT 型,美国 Leica 公司),荧光倒置显微镜(日本 Olympus 公司)。

2. 心肌细胞培养:出生 1~2 d 的 SD 乳鼠 32 只,由第三军医大学实验动物中心提供,采用本所常规胰蛋白酶消化法培养心肌细胞待用。加干预因素时将培养液换为 RPMI 1640。并参考文献[7]对心肌细胞进行缺氧处理。

3. 实验分组:将心肌细胞分为 A 组(常氧)、B 组(常氧条件下在心肌细胞中加入 1 mmol/L 甘氨酸)、C 组(缺氧 6 h)、D 组(在心肌细胞中加入 1 mmol/L 甘氨酸后缺氧)、E 组(在心肌细胞中加入 1 mmol/L 甘氨酸及 1:200 的抗 GlyR α_1 后缺氧 6 h)、F 组(心肌细胞中缺氧加入 1 mmol/L 甘氨酸及 5 μ mol/L 的氨基乙磺酸后缺氧 6 h),每组 20 皿细胞。

4. 心肌细胞培养液中 CK、LDH 的测定:将心肌细胞进行缺氧及甘氨酸处理后,收集培养上清液,检测其 LDH 及 CK 值,操作按试剂盒说明书进行。

5. 心肌细胞中甘氨酸受体的检测:将培养于盖玻片上的心肌细胞用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗后,用 40 μ /L 的 -20 $^{\circ}$ C 多聚甲醛固定,体积分数 0.5% TritonX-100 破膜,体积分数 10% 血清封闭,用 GlyR α_1 多克隆抗体(1:200)孵育,4 $^{\circ}$ C 过夜, FITC 标记兔抗山羊 IgG(1:500)孵育, PBS 冲洗,体积分数 90% 甘油封片。荧光倒置显微镜观察常氧及缺氧条件下心肌细胞 GlyR α_1 的表达。

6. 心肌细胞游离钙及膜电位的测定:按文献[4]方法选择终浓度为 2 μ mol/L 的 Fluo-4-AM,于 37 $^{\circ}$ C 与心肌细胞共孵育 30 min。在激光共聚焦显

显微镜下扫描细胞内荧光强度,在 Physiology Software 软件控制下,每皿选 4~5 个视野,取 20 个细胞计算其平均荧光强度,以平均荧光强度变化反映细胞内游离钙浓度的相对水平。终浓度为 10 μ mol/L 的 DiBAC₂ 加入心肌细胞培养皿,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,检测细胞膜电位。在 Physiology Software 软件控制下,每皿选 4~5 个视野,取 10 个细胞计算其荧光强度,并取其均值,以平均荧光强度变化反映心肌细胞膜电位的相对水平。

7. 统计学处理:所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 10.0 统计学软件行单因素方差分析及 *t* 检验。

结果

1. 心肌细胞培养液中 CK、LDH 的含量:C 组心肌细胞培养液中 CK、LDH 含量为(393.8 \pm 5.3)、(1 564 \pm 41) U/L,甘氨酸处理后,D 组 CK、LDH 含量[(56.3 \pm 2.7)、(716 \pm 18) U/L]均较 C 组明显下降($P < 0.01$)。

2. 甘氨酸受体的检测:常氧及缺氧条件下心肌细胞免疫组织化学染色后,在荧光倒置显微镜下可见心肌细胞膜上 GlyR α_1 亚基呈阳性表达(图 1)。



A 组(常氧时)心肌细胞 GlyR α_1 呈阳性表达



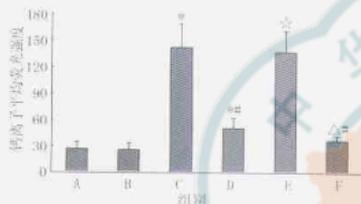
C 组(缺氧 6 h)心肌细胞 GlyR α_1 呈阳性表达

图 1 体外培养的大鼠心肌细胞 GlyR α_1 免疫组织化学染色。荧光倒置显微镜 $\times 400$

Fig 1 Immunohistochemical staining of GlyR α_1 in rat cardiomyocyte. Fluorescent microscopy $\times 400$

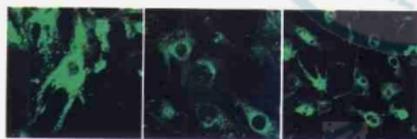
3. 心肌细胞游离钙及膜电位荧光强度的测定:

C 组心肌细胞 Ca^{2+} 平均荧光强度 (139 ± 29) 较 A 组 (27 ± 8) 明显增加 ($P < 0.01$); D 组, F 组 (51 ± 11 , 35 ± 5) 较 C 组明显降低 ($P < 0.01$), 但 D 组与 A 组比较明显增加 ($P < 0.01$); E 组 (137 ± 23) 与 C 组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 2。A 组心肌细胞膜电位为 177 ± 20 , C 组膜电位发生明显去极化 (62 ± 9 , $P < 0.01$); E 组心肌细胞膜电位为 123 ± 16 , 较 C 组时的去极化程度明显减轻 ($P < 0.01$)。见图 3。



注: A 组为常氧, B 组为常氧 + 甘氨酸, C 组为缺氧 6 h, D 组为缺氧 6 h + 甘氨酸, E 组为缺氧 6 h + 甘氨酸及其 GlyR $\alpha 1$, F 组为缺氧 6 h + 甘氨酸及氨基乙磺酸, 每组 20 组细胞; * 与 A 组比较, $\# P < 0.01$; 与 C 组比较, $\Delta P < 0.01$; 与 D 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\triangle P < 0.01$ 。

图 2 各组心肌细胞培养后钙离子平均荧光强度
Fig 2 Changes in the average fluorescence intensity of free Ca^{2+} in different groups



A 组(常氧)为正常膜电位 B 组(缺氧 6 h)膜电位发生明显去极化 C 组(甘氨酸 + 缺氧 6 h)膜电位去极化减轻

图 3 各组大鼠心肌细胞培养后膜电位的变化。荧光探针 $\times 400$

Fig 3 Changes in the membrane potential in rat cardiomyocytes. $EP \times 400$

讨 论

研究表明,在缺氧后 6 h 心肌就已经发生明显的损伤,包括心功能的降低及心肌细胞的凋亡¹⁸。本实验中观察到心肌细胞缺氧后 6 h, CK、LDH 的释放均明显增加,说明心肌细胞受到了不同程度的损伤;前加入甘氨酸后,CK、LDH 则明显减少,说明甘氨酸对心肌细胞具有显著的保护作用。

在甘氨酸作用机制的研究中,甘氨酸受体逐渐

成为研究的热点¹⁹。甘氨酸受体是由 3 个 α 亚基和 2 个 β 亚基及另一个相对分子质量为 93×10^3 的细胞质蛋白“gephyrin”组成。受体 $\alpha 1$ 亚基与受体的配体鉴别、激动剂效能和拮抗剂结合等密切相关,表明 $\alpha 1$ 亚基是 GlyR 的功能性亚基¹⁹。甘氨酸的作用可能是通过其受体而完成的。本实验应用 GlyR $\alpha 1$ 多克隆抗体作免疫组织化学观察,证实存在心肌细胞中存在 GlyR $\alpha 1$ 亚基。故心肌细胞可能存在 GlyR, 甘氨酸与其受体结合后发挥其保护作用。

心肌细胞内 Ca^{2+} 的增加会导致钙超载而损伤心肌细胞¹¹。笔者运用激光共聚焦技术结合钙离子荧光探针 Fluo-4-AM 显示细胞内游离钙,对甘氨酸在心肌细胞中 Ca^{2+} 调节的作用进行了初步研究。结果表明,缺氧后心肌细胞发生明显的钙超载,加入甘氨酸后钙超载减轻,而加入抗 GlyR $\alpha 1$ 后,缺氧心肌细胞钙超载又明显加重;加入甘氨酸受体激动剂氨基乙磺酸后,钙超载则明显减轻。有文献报道氨基乙磺酸与甘氨酸均作用于甘氨酸受体的 $\alpha 1$ 亚基¹⁷,推测甘氨酸是通过与其受体结合而减轻心肌细胞的钙超载,发挥其保护作用;在甘氨酸受体中, $\alpha 1$ 亚基起着重要作用。

细胞膜上存在 L-型钙离子通道,而膜电位的改变可以影响 L-型 Ca^{2+} 通道的开放与关闭,当细胞膜电位发生去极化时, L-型 Ca^{2+} 通道开放更容易;而当细胞膜电位发生超极化时,其通道开放较困难²⁰。本实验证实缺氧后心肌细胞膜发生明显的去极化,加入甘氨酸后心肌细胞膜去极化减轻,从而使细胞膜上 L-型 Ca^{2+} 通道开放,并减轻了心肌细胞的钙超载。

本实验结果表明,甘氨酸对心肌细胞具有保护作用。其可能的机制为:在心肌细胞中存在甘氨酸受体;缺氧后,心肌细胞膜发生去极化,导致细胞膜电压依赖性 Ca^{2+} 通道开放增加, Ca^{2+} 内流增多,心肌细胞受损;甘氨酸与其受体结合后,导致心肌细胞膜去极化明显减轻,从而使细胞膜电压依赖性 Ca^{2+} 通道开放减少, Ca^{2+} 内流减少,发挥了其保护作用。

参 考 文 献

- 1 黄厥生,李志清,吴庆云,等.缺血缺氧在烧伤后“休克心”中的作用及其机制探讨.中华烧伤杂志,2002,18:205-209.
- 2 黄厥生,杨宗成,迟路祖,等.烧伤后“休克心”的研究.中华烧伤杂志,2000,16:275-278.
- 3 Zhong Z, Wheeler MD, L-Glycine, a novel antiinflammatory, immunomodulatory, and cytoprotective agent. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2003,6: 229-240.
- 4 Ascher E, Hanson JN, Cheng W, et al. Glycine preserves function and decreases necrosis in skeletal muscle undergoing ischemia and

