

· 基础研究 ·

氯通道阻断剂 NPPB 拮抗离体灌注大鼠心脏 钙矛盾处理引起的心肌损伤

张建英, 冯建宇, 李雨衡, 金振晓, 周京军

[摘要]:目的 观察氯离子通道阻滞剂 5-硝基-2-(3-苯丙胺)苯甲酸(NPPB)对钙矛盾处理造成离体灌注大鼠心脏功能障碍和心肌细胞死亡的影响。方法 钙矛盾处理由 3 min 无钙液、30 min 有钙液接替灌注完成,实验同步记录左室压,并检测心肌损伤面积的大小。结果 与正常对照组相比,钙矛盾组左室舒张末压(LVEDP)显著抬高,左室发展压(LVDP)、心室变化速率(dp/dt)为 0,心脏几乎不存在活性组织;于无钙液灌注前 2 min、无钙液灌注期和复钙后前 5 min 给予 20 μmol/L NPPB 处理后,10 例心脏的心肌损伤面积均显著缩小,其中 4 例 LVDP 大于 2 mm Hg, LVEDP 有降低趋势、dp/dt 有升高趋势;与正常对照组相比,20 μmol/L NPPB 处理的对照心脏于灌注结束时左室功能、心肌损伤面积没有显著改变。结论 NPPB 具有减轻钙矛盾处理引起的心肌损伤,保护心功能作用,提示氯通道参与是钙矛盾处理引起的心肌损伤。

[关键词]: 心脏;氯通道;钙离子;大鼠;心肌损伤

[中图分类号]: R654.1 **[文献标识码]:** A **[文章编号]:** 1672-1403(2012)04-0232-04

Chloride channel blocker NPPB blunted heart injury induced by calcium paradox in rat

Zhang Jian-ying, Feng Jian-yu, Li Yu-heng, Jin Zhen-xiao, Zhou Jing-jun

Department of Physiology, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032 PR China

[Abstract]: Objective This study evaluated the effect of chloride channel blocker 5-nitro-2-(3-phenyl-propylamino)-benzoic acid (NPPB) on heart injury induced by calcium paradox. **Methods** Calcium paradox in isolated rat heart was elicited by 3-min calcium depletion followed by 30-min calcium repletion. 20 μmol/L NPPB was added 2 min prior to calcium depletion, throughout the period of calcium depletion and the first 5 min after calcium repletion. Cardiac function was monitored and infarct size measured. **Results** Comparing to control group, calcium paradox treatment produced a marked depression in cardiac function and induced an enlarged infarct size. In NPPB treatment group, all the 10 hearts showed a marked decrease in infarct size, and the left ventricular developed pressure (LVDP) rescued in 4 of 10 hearts. Meanwhile, the left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP) and dp/dt were improved in NPPB treatment group, although they did not reach significant difference. NPPB at 20 μmol/L had no effect on cardiac performance and cell death at the end of perfusion under control conditions. **Conclusion** The results demonstrate that NPPB protects heart against calcium paradox. It also indicates that chloride channels are involved in.

[Key words]: Heart; Chloride channel; Calcium

钙矛盾(calcium paradox)心肌损伤是指人工短暂无钙液、有钙液接替灌注离体心脏导致的心功能障碍,大量心肌死亡,目前其发生的分子机制并不十分明确^[1-2]。Cl⁻是机体存在的主要阴离子,在心肌组织,多种氯通道承载 Cl⁻的跨膜运动^[3]。研究表明,氯通道参与细胞容积、钙稳态调节^[4]。Omachi 发现,用高渗蔗糖部分替代无钙液中 NaCl 后,心肌

肌球蛋白释放明显减少^[5],提示氯通道可能参与钙矛盾心肌损伤。5-硝基-2-(3-苯丙胺)苯甲酸[5-nitro-2-(3-phenyl-propylamino)-benzoic acid, NPPB]是一苯环类化合物,被广泛应用于研究氯通道功能^[4]。本研究观察了 NPPB 对钙矛盾处理引起的心功能障碍和心肌死亡的影响,结果表明:氯通道阻断剂 NPPB 具有显著拮抗钙矛盾心肌损伤作用,提示氯通道介导了这一过程。

1 材料和方法

1.1 实验动物、试剂与液体 清洁级 SD 雄性大鼠,体重(280 ± 20) g,由第四军医大学实验动物中心提供。氯通道阻断剂 NPPB 购于 Tocris 公司。正

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30971196)

作者单位:710032 西安,第四军医大学基础部生理学教研室(张建英、周京军),西京医院心血管外科(冯建宇、金振晓),口腔医学系 14 队(李雨衡)

通讯作者:周京军,Email:jjzhou@fmmu.edu.cn

常 Krebs-Henseleit 液(KH, mmol/L): NaCl 120, KCl 4.7, MgSO₄ 1.2, KH₂PO₄ 1.2, CaCl₂ 1.25, NaHCO₃ 25, Glucose 11; 无钙 KH 液: 去除正常 KH 液中的 CaCl₂, 其它成分不变, 同时添加 0.2 mM Na₂EDTA。灌流前 40 min 用体积分数 95% O₂、5% CO₂ 混合气体(v/v) 向 KH 液中持续通气直至实验结束, KH 液温度保持在 37℃, pH 维持在 7.35~7.45。

1.2 离体心脏灌注与心功能监测 按照常规方法实施大鼠心脏离体灌注^[6]。简要过程为: SD 雄性大鼠在腹腔注射肝素(500 U/kg) 20 min 后脱颈处死, 迅速开胸剪取心脏, 置于 4℃ KH 液中; 将主动脉根部固定于 Langendorff 灌流装置(Radnoti Glass Technology Inc., Monrovia, CA, USA), 灌注压保持在 80 mm Hg, 灌流液为正常 KH 液; 待心脏复跳后, 于左心耳的下方剪一小口, 将带有乳胶水囊的测压管经二尖瓣插入左心室, 测压管的另一端经换能器(MP100, BIOPAC Systems, Inc.) 与计算机相连, 调节水囊使左心室舒张末压(left ventricular end diastolic pressure, LVEDP) 维持在 5~10 mm Hg; KH 液灌注 10 min, 待心功能平稳后实施实验。

实验中采用 AcqKnowledge 3.8.1 软件全程记录 LVEDP、左室收缩峰压(left ventricular peak systolic pressure, LVPS) 和心率的变化, 以左心室发展压(left ventricular developed pressure, LVDP, 为 LVPS 与 LVEDP 的差值)、LVEDP、心室压力变化的最大速率(+dp/dt) 和最小速率(-dp/dt) 评价心功能。实验的灌注时间以复钙灌注开始记为 0 min, 分别于 -10, -3, 0, 2, 15, 30 min 时测定冠脉流量。

1.3 实验分组 随机分为 4 组: ① 正常对照组: 正常 KH 液持续灌注 50 min; ② NPPB 对照组: 依次用正常 KH 液平衡灌注 15 min, 含 20 μmol/L NPPB 的 KH 液灌注 10 min, 正常 KH 液灌注 25 min; ③ 钙矛盾组: 依次用正常 KH 液灌注 17 min, 无钙 KH 液灌注 3 min, 正常 KH 液灌注 30 min; ④ NPPB 处理组: 在钙矛盾处理过程(同钙矛盾组)中, 于无钙液灌注前 2 min、无钙液灌注期和复钙后前 5 min 给予 20 μmol/L NPPB 的处理。

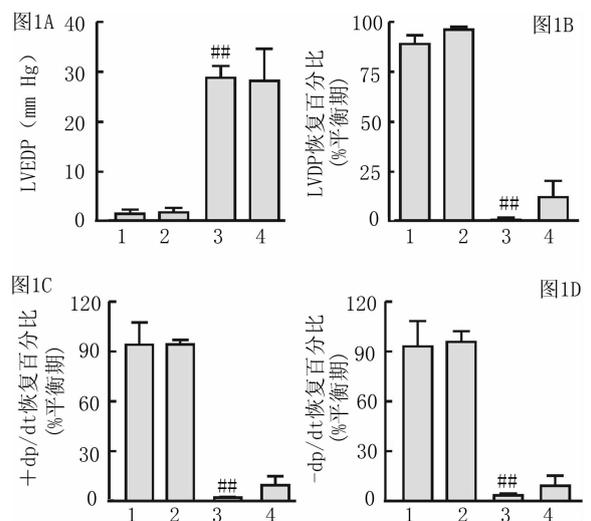
1.4 心肌损伤面积测定 实验结束后, 将心脏置于 -20℃ 冻存 30 min; 剔除心房组织, 沿心脏长轴自心尖向心底方向, 连续切成 6 片厚度约为 1 mm 的环形切片, 置于 1% TTC 溶液中, 37℃ 下避光孵育 15 min; 4% 多聚甲醛固定过夜; 数码相机拍照, 用 OPTIMAS v 5.2 软件双盲法分析心肌梗死面积。正常心肌组织被染为红色, 白色区为坏死组织, 心肌损伤面积百分比(%) = (坏死区面积/总面积) × 100%。

1.5 统计分析 应用 GraphPad Prism 4.0 统计软件进行分析, 数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$) 表示。多组间差异显著性检验采用单因素方差分析(ANOVA), 两组间比较用 Tukey 检验; 比较各组 LVDP > 2 mm Hg 的阳性比率间的差异时采用 X² 检验, 以 P < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NPPB 对离体灌注大鼠心脏钙矛盾处理后血流动力学的影响 与正常对照组相比, 钙矛盾组在无钙液灌注末(0 min)、复钙灌注的 2 min、15 min、30 min 时的冠脉流量显著减少。与钙矛盾组相比, 无钙液灌注前 2 min、无钙液灌注期及有钙液灌注开始后的前 5 min 给予 20 μmol/L NPPB 干预可拮抗钙矛盾处理的这一作用, 复钙灌注后 2 min、15 min、30 min 的冠脉流量增加。20 μmol/L NPPB 对正常心脏的冠脉流量没有显著影响。见表 1。

钙矛盾组所有离体心脏于实验结束时 LVDP > 2 mm Hg 的阳性个数为 0, 与正常对照组相比具有显著性差异。与钙矛盾组相比, 20 μmol/L NPPB 干预显著增加钙矛盾处理后 LVDP > 2 mm Hg 的阳性百分比。见表 2。比较 LVDP > 2 mm Hg 的数据发现, 20 μmol/L NPPB 对 LVDP、LVEDP、dp/dt 的影响虽有改善趋势, 但没有显著性差异。对 20 μmol/L NPPB 干预对正常心脏于实验结束时的 LVDP 未产生显著影响。见图 1。



注: 1: 正常对照组; 2: NPPB 对照组;
3: 钙矛盾组; 4: NPPB 处理组。

与正常对照组相比, ^{###}P < 0.01。

图 1 20 μmol/L NPPB 对钙矛盾处理后左室功能变化的影响

表 1 各组离体灌注大鼠心脏冠脉流量的比较(ml/min, n=6, $\bar{x} \pm s$)

组别	-10 min	-3 min	0 min	2 min	15 min	30 min
正常对照组	12.7 ± 0.3	13.4 ± 0.2	13.4 ± 0.4	13.5 ± 0.2	12.9 ± 0.1	13.1 ± 0.4
NPPB 对照组	12.4 ± 0.7	12.3 ± 0.6	12.3 ± 0.3	11.6 ± 0.4	12.0 ± 0.5	11.7 ± 0.7
钙矛盾组	12.1 ± 0.5	11.4 ± 0.2	8.2 ± 0.5 ^{##}	6.1 ± 0.3 ^{##}	6.0 ± 0.2 ^{##}	6.0 ± 0.2 ^{##}
NPPB 处理组	11.6 ± 0.7	12.1 ± 0.4	7.8 ± 0.6	7.1 ± 0.3 [*]	7.1 ± 0.3 [*]	7.1 ± 0.4 [*]

注:与正常对照组对应时间点相比,^{##}P < 0.01;与钙矛盾组对应时间点相比,^{*}P < 0.05。

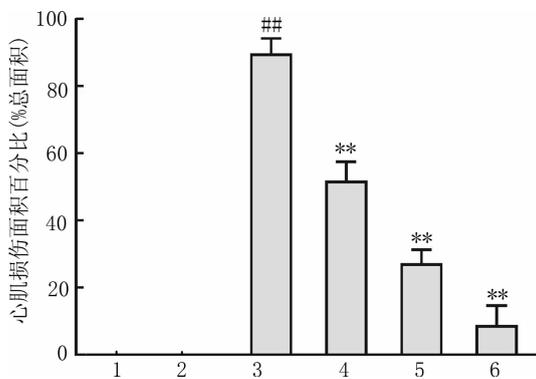
表 2 各组在实验结束时 LVDP > 2 mm Hg 的阳性百分比比较

组别	实验例数	阳性个数	阳性百分比
正常对照组	6	6	100%
NPPB 对照组	6	6	100%
钙矛盾组	6	0	0 ^{##}
NPPB 处理组	10	4	40% ^{**}

注:与正常对照组对应时间点相比,^{##}P < 0.01;与钙矛盾组对应时间点相比,^{**}P < 0.05。

2.2 NPPB 对心脏钙矛盾处理引发心肌损伤面积的影响 与正常对照组相比,3 min 无钙液、30 min 含 1.25 mmol/L Ca²⁺ 的 KH 液接替灌注使得心肌几乎全部死亡,20 μmol/L NPPB 处理可显著缩小心肌损伤面积,20 μmol/L NPPB 对单纯离体灌注心脏的损伤面积没有影响,见图 2。

比较不同浓度 NPPB 对心肌损伤面积的影响时发现,NPPB 从 0.2 μmol/L 时开始具有拮抗钙矛盾处理引发心肌损伤作用,在 20 μmol/L 时达到最大效应,见图 2。



注:1:正常对照组;2:NPPB 对照组;3:钙矛盾组;
4~6:NPPB 处理组,其浓度分别为
0.2 μmol/L、2 μmol/L、20 μmol/L。
与正常对照组相比^{##}P < 0.01,
与钙矛盾组相比^{**}P < 0.01。

图 2 不同浓度 NPPB 对钙矛盾处理后引发心肌损伤面积的影响

3 讨论

钙矛盾处理是研究心肌钙超载损伤的重要模型^[2],阐明其机制有助于认识钙稳态调节的分子机

制。本研究主要观察到:与钙矛盾组相比,实验结束时 NPPB 处理组的冠脉流出液显著增加,心肌损伤面积显著缩小,心功能明显改善。结果表明 NPPB 具有拮抗钙矛盾处理引发损伤的作用,提示氯通道参与钙超载心肌损伤。

心肌存在多种亚型氯通道。根据生理学或药理学实验结果,氯通道可分为蛋白激酶 A、蛋白激酶 C、ATP、Ca²⁺ 和容积敏感性调节的氯通道。基因序列清楚的氯通道有 CFTR 和电压门控氯通道(包括 ClC-2 和 ClC-3)^[3]。本课题观察到,氯通道阻断剂 NPPB 可显著抑制钙矛盾处理引起的心肌损伤,这与 Omachi 发现高渗蔗糖溶液具有拮抗钙矛盾损伤的结果相一致^[5],进一步提示氯通道介导这一过程,因此,我们有必要进一步明确何种氯通道亚型参与这一过程。

我们前期发现,钙矛盾处理可通过激活钙依赖蛋白酶(calpain),加速底物蛋白降解,引起心肌损伤^[7],本实验中观察到氯通道阻断剂 NPPB 可显著缩小心肌损伤面积,改善心功能,因此我们亟需观察钙矛盾处理过程中氯通道阻断剂 NPPB 和 calpain 活性的关系。由于钙稳态失衡是钙矛盾处理引起损伤的重要原因^[8],那么氯通道是促发钙超载引起心肌死亡?抑或钙超载改变氯通道功能进而影响心肌存活?即钙矛盾处理过程中氯通道和钙超载的上下游关系也需明确。另外,实验中观察到钙矛盾处理可减少冠脉流量,氯通道阻断剂 NPPB 则拮抗这一作用。由于 NPPB 处理组的 LVEDP 有降低趋势,我们认为,NPPB 改善冠脉流量的作用可能与其降低 LV-EDP 有关。

总之,本研究观察到氯通道阻断剂 NPPB 显著拮抗钙矛盾处理引起的心功能障碍和细胞死亡,氯通道在这一损伤中的作用有待深入研究。