科 学 通 报
第 38 卷 第 12 期 CHINESE SCIENCE BULLETIN 1993 年 6 月

再灌液中 Ca^{2+} 浓度的变化对心肌线粒体摄 Ca^{2+} 功能和 Ca 含量的影响

常英姿 董林旺 苏静怡
(北京医科大学病理生理教研室,北京100083)

关键词 Ca^{2+}、心肌线粒体、Ca^{2+} 摄取

近年大量的实验研究发现,心肌缺血再灌注过程中线粒体结构和功能受到严重损伤,表现为线粒体肿胀、破裂、嵴断裂、收缩带形成并有大量的钙盐颗粒沉积[1]. 有关这种损伤的机制及其意义目前还不清楚. 本实验试图从再灌液中 Ca^{2+} 浓度的变化对线粒体摄 Ca^{2+} 功能和 Ca 含量的影响来探讨线粒体在心肌缺血再灌注损伤中的作用及其机制.

1 材料和方法

1.1 心脏灌流模型

200—250g 雄性 Wistar 大白鼠,20% 乌拉坦 5ml/kg 腹腔注射麻醉后,迅速开胸摘取心脏,在 0—4℃ 下置于 Langendorff 灌流装置.

1.2 实验分组

(1) 正常对照组: 正常 K-H 液 (NaCl 118 mmol/L, KCl 4.74m mol/L, KH_2PO_4 0.93m mol/L, $MgSO_4$ 1.2m mol/L, $NaHCO_3$ 25.0mmol/L, 葡萄糖 10.0 mmol/L, $CaCl_2$ 1.5mmol/L, pH7.4) 持续灌流 75min (以 P 代表).

(2) 单纯缺血组: 正常 K-H 液灌流 15min, 停灌 45min (以 I 代表).

(3) 再灌组: 正常 K-H 液预灌 15min, 停灌 45min, 再灌 15min. 再灌组又分为以下几组: 1)无 Ca^{2+} 再灌组: 再灌时采用无 Ca^{2+} 的 K-H 液(以 R_0 代表); 2) 正常 Ca^{2+} 再灌组: 再灌时采用含 Ca^{2+} 1.5 mmol/L 的 K-H 液(以 $R_{1.5}$ 代表); 3) 高 Ca^{2+} 1 组: 再灌时采用含 Ca^{2+} 3.0mmol/L 的 K-H 液(以 $R_{3.0}$ 代表); 4)高 Ca^{2+} 2 组: 再灌时采用含 Ca^{2+}5.0m mol/L 的 K-H 液(以 $R_{5.0}$ 代表). 实验结束后, 用 20ml 4℃ 150mmol/L 的 LiCl 溶液经主动脉冲洗心脏.

1.3 线粒体的制备[2]

将冲洗完毕的的心脏迅速置于冷介质 (0.25mol/L 蔗糖, 10mmol/L 咪唑- HCl pH7.5) 中,充分剪碎、匀浆, 750×g 离心 10min, 弃去沉淀, 取上清液 900×g 离心 20min, 弃上清液加介质悬浮,以同样速度重复一次,介质悬浮,以 Lowrry 法[3]测定蛋白含量. 以上操作均在 4℃ 下进行.

1.4 测定指标

(1) 线粒体 Ca^{2+}-ATPase 活性测定: 按照 Madhu[4] 等的方法在总体积为 1000μl 的反应介质中含有: 100mmol/L 咪唑-HCl (pH7.4), 4mmol/L $ATPNa_2$, 0.1mmol/L $MgCl_2$, 5mmol/L $CaCl_2$, 100mmol/L KCl, 线粒体蛋白 200 μg. 总 (Ca^{2+}-Mg^{2+})-ATPase 活力在

1992-06-10 收稿, 1993-01-06 收修改稿.

含 Mg^{2+} 和 Ca^{2+} 的介质中测定，Mg^{2+}-ATPase 在只含 Mg^{2+} 和 4mmol/L EGTA 的介质中测定。酶活性单位用 μmol 磷/mg 蛋白·h 表示。

(2) 线粒体摄 Ca^{2+} 能力的测定：按 Moore 等[5]的方法，稍作修改。$^{45}Ca^{2+}$ 摄取率的测定在在线粒体制备好后立即进行。在总体积为 1.5ml 的反应体系中含有 30 mmol/L 咪唑-HCl (pH7.4)，100mmol/L KCl，10mmol/L $MgCl_2$，4mmol/L ATP Na_2，0.2mmol/L $CaCl_2$，5mmol/L 琥珀酸，5mmol/L KH_2PO_4，400μg 线粒体蛋白。在 37℃ 恒温水浴中分别振荡温育 2，5，10，20min，反应完毕后迅速加入 200mmol/L $MgCl_2$ 3ml 终止反应，并将其通过 0.45μm 的微孔滤膜过滤，用 100m mol/L $MgCl_2$ 冲洗两遍，抽干后加 5ml 闪烁液 (PPO 0.5%，POPOP 0.05%，二甲苯 70%，乙醇 30%)，测定其放射活性，以 Ca^{2+} μmol/mg 蛋白表示。

(3) 线粒体 Ca^{2+} 含量测定：按照 Daly 等[6]的方法在 PERKIN ELMER 703 型原子吸收仪(美国)上进行测定。以 μg/mg 蛋白表示。

1.5 统计学处理

各组数据均以均数±标准误 ($\bar{X}\pm SE$) 表示，以 t 检验判别组间差异的显著性。

2 实验结果

2.1 再灌液中 Ca^{2+} 浓度的变化对线粒体 Ca 含量的影响

单纯缺血组线粒体 Ca 含量与对照组无明显差异。再灌各组线粒体 Ca 含量与对照组相比均有明显差异。其中无 Ca^{2+} 再灌组可使线粒体 Ca 含量增加 49%($p<0.01$)，正常 Ca^{2+} 再灌组、高 Ca^{2+} 1 组和高 Ca^{2+} 2 组可分别使其增加 58.46%($p<0.01$)，66.29%($p<0.01$) 和 56.34% ($p<0.01$)，见表 1。

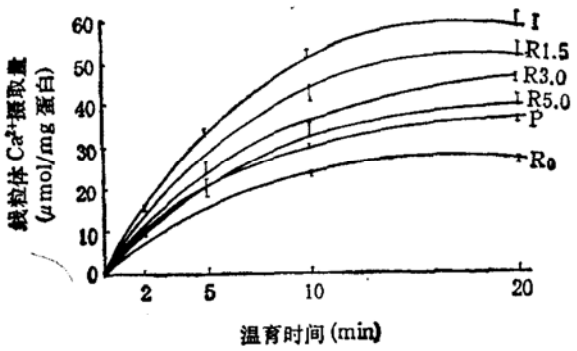

图 1 再灌液中 Ca^{2+} 浓度的变化对线粒体摄 Ca^{2+} 能力的影响

2.2 线粒体 Ca^{2+}-ATPaes 活力的变化

除无 Ca^{2+} 再灌组可明显增加线粒体 Ca^{2+}-ATPase 活力外，与对照组相比增加 22.9% ($p<0.01$)，其余各组与对照组相比均无明显差异，见表 1。

2.3 线粒体摄 $^{45}Ca^{2+}$ 能力的变化

单纯缺血组、正常 Ca^{2+} 再灌组和高 Ca^{2+} 1 组其最大摄 Ca^{2+} 量均较对照组明显增加

表 1 再灌液中 Ca^{2+} 浓度的变化对线粒体 Ca 含量 Ca^{2+}-ATPase 活力的影响[a)]

分组	n	Ca 含量 (μg/mg 蛋白)	Ca^{2+}-ATPase 活力 (μmol 磷/mg 蛋白/h)
P	6	8.04±0.35	55.65±0.8
I	6	8.15±0.85	57.9±0.96
R0	6	11.99±0.12**	68.4±0.63**
R1.5	6	12.74±0.04**	51.25±0.49
R3.0	6	13.37±0.13**	55.05±0.67
R5.0	6	12.57±0.05**	58.65±0.58

a) 与 P 相比，** $p<0.01$.

($p < 0.01$)，无 Ca^{2+} 再灌组最大摄 Ca^{2+} 量明显降低 ($p < 0.01$)，而高 Ca^{2+} 2组与对照组相比无明显差异，见图1。

3 讨　论

线粒体不仅是细胞的供能器，而且在心肌细胞 Ca^{2+} 稳态的调节中起着十分重要的作用线粒体有两种不同的 Ca^{2+} 转运体系：内流和外流。Ca^{2+} 内流的方式有：1)依赖于建立在膜两侧的质子梯度 (ΔH) (即电泳性单向输送体)；2) Ca^{2+}, HPO_4^{2-} 的同向转运 (symport)；3) Ca^{2+}-ATPase。线粒体对 Ca^{2+} 转运的这种调节方式只在防止细胞内 Ca^{2+} 浓度大幅度变化过程中起着决定作用，而正常情况下线粒体并不摄取大量的 Ca^{2+}[7]。有实验表明[8]，心肌缺血一定时间后 (60min) 可明显降低线粒体摄取 $^{45}Ca^{2+}$ 的能力，线粒体内有大量钙盐颗粒沉积。我们采用不同浓度 Ca^{2+} 的再灌液进行再灌的实验显示：心肌缺血 45min 后分别用不同浓度 Ca^{2+} 的 K-H 液进行再灌，可不同程度地影响线粒体摄 $^{45}Ca^{2+}$ 能力、线粒体 Ca 含量及 Ca^{2+}-ATPase 活力。1) 线粒体摄 $^{45}Ca^{2+}$ 能力：除无 Ca^{2+} 再灌组最大摄 $^{45}Ca^{2+}$ 量较对照组明显降低；高 Ca^{2+} 2组与对照组无明显差异外，其余各组最大摄 $^{45}Ca^{2+}$ 量均较对照组明显增加，以单纯缺血组摄 $^{45}Ca^{2+}$ 量最大。其可能的解释为单纯缺血时，线粒体摄 $^{45}Ca^{2+}$ 能力代偿性增加，此时分离出的线粒体与高 Ca^{2+} 介质温育 (0.2mmol/L) 可使线粒体摄 $^{45}Ca^{2+}$ 量明显增加，与 Piper 等[8]报道的短时间缺血可增加线粒体摄 $^{45}Ca^{2+}$ 能力的结果一致，同时也说明与各再灌组相比，此时线粒体损伤最轻。随着再灌液中 Ca^{2+} 浓度的增加，心肌细胞内 Ca^{2+} 浓度也明显增加，此时线粒体摄 Ca^{2+} 能力增强以发挥其缓冲细胞内 Ca^{2+} 的作用。且线粒体摄 Ca^{2+} 能力随着再灌液中 Ca^{2+} 浓度的逐渐增加呈逐步降低的趋势，表明细胞及线粒体严重 Ca 超载所导致的线粒体结构和功能损伤的加重。2)线粒体 Ca 含量：除单纯缺血组与对照组无明显差异外，其余各组均较对照组明显增加。无 Ca^{2+} 再灌组线粒体 Ca 增加的机制可能为虽再灌液中不含 Ca^{2+}，且我们以前的实验表明组织总 Ca 含量并无增加，但此时很可能存在 Ca 细胞内的重新分布，从而使线粒体 Ca 含量增加，而且随着再灌液中 Ca^{2+} 浓度的增加，线粒体 Ca 含量逐渐增加，表明线粒体功能和结构损伤的加重。3)线粒体 Ca^{2+}-ATPase 活力：除单纯缺血组代偿性增加外，其余各组与对照组相比均无明显差异。这种 Ca^{2+}-ATPase 活力的变化与 Ca含量、摄 Ca^{2+} 能力不一致的原因，我们考虑有以下两种解释：(1) 在缺血再灌这种病理过程中可能存在 Ca^{2+}-ATPase 水解 ATP 与 Ca^{2+} 转运脱偶联现象；(2) 在此过程中线粒体 Ca^{2+} 转运还存在其它途径，如电泳性单向输送体，Ca^{2+}, PHO_4^{2-} 的同向转运，但其机制有待于进一步探讨。

参　考　文　献

[1] Zimmerman, A. N. E., Hülsmann, W. C., *Nature*, 1966, 211: 646—647.
[2] Maclennan, D. H., *J. Biol. Chem.*, 1970, 245: 4508—4518.
[3] Lowrry, O. H. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 1951, 193: 265—275.
[4] Madhu, B. *et al.*, *J. Biochem.*, 1977, 82: 1731—1739.
[5] Moore, L. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 1976, 251: 1197—1201.
[6] Daly, M. J. *et al.*, *Circ. Res.*, 1987, 61: 56.
[7] Nicholls, D. *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1982, 683: 57—88.
[8] Piper, H. M. *et al.*, *J. Mol. Cell Cardiol.*, 1985, 17: 885—892.