金属硫蛋白对大鼠心肌细胞缺氧-复氧损伤的保护作用*

李兆萍　唐朝枢
（北京医科大学病理生理教研室）
程　时
（北京医科大学生物物理教研室）

关键词　金属硫蛋白、心肌细胞、缺氧-复氧损伤

缺血一定时间的心肌恢复灌流后，组织损伤反而进行性加重，出现缺血心肌的再灌注损伤(reperfusion injury)，其发病机制还不清楚，目前尚缺少有效的防治措施。大量研究表明，心肌缺血-再灌注损伤与缺氧-复氧损伤 (oxygen paradox)、缺钙-复钙损伤 (calcium paradox) 有相似的病理表现和发病机制，推测分子氧和钙离子在缺血-再灌注损伤的发病过程中起着重要的作用[1]。金属硫蛋白 (metallothionein, MT) 是生物机体内含有多量硫和金属的非酶蛋白，起着应激保护蛋白的作用。本工作在耐受钙的离体大鼠心肌细胞缺氧-复氧模型上，观察 MT 的细胞保护作用，并进一步观察 MT 对自由基发生系统(free radical generating system)引起的大鼠心肌细胞脂质过氧化 (lipid peroxidation) 的影响，以探讨 MT 的作用机理及其治疗应用的可能性。

一、材料和方法

1. MT 对心肌细胞缺氧-复氧损伤的保护作用　200—250g 雄性 Wistar 大鼠，按以前叙述的方法[2]用含胶原酶 (I 型，Sigma Co) 的 Krebs-Henseleit (K-H) 液灌流，分离出成年大鼠耐受钙的心肌细胞，悬浮于不含葡萄糖的 K-H 液 (Ca^{++} 1.25 mmol/l)，按下述的分组分置于硅化过的小试管中(2ml/管)，在恒温水浴振荡器上 37℃ 孵育。(1) 假缺氧对照：95% O_2:5% CO_2 孵育 60min；(2) 对照：95% N_2:5% CO_2 缺氧孵育 40min，再换95% O_2:5% CO_2 复氧孵育 20min；(3)—(5) 管加入 MT (兔肝 MT，MT/mg 含 Cd 61μg，Zn 7.6μg，Sigma Co) 终浓度分别为 10^{-5}，10^{-6}，10^{-7}mol/l，孵育方法与对照组相同。6 次实验，每次做两平行管。结束孵育后，用台盘蓝排斥试验在光镜下检测杆形细胞存活率；考马斯亮蓝法蛋白定量；一半细胞用硫代巴比妥酸法测定细胞脂质过氧化产物丙二醛 (MDA) 含量，另一半细胞经消化处理后，在原子吸收分光光度计(GGX-1B 型)上测定细胞钙含量。

2. MT 对心肌细胞脂质过氧化的影响　四例大鼠心脏按上述方法分离出心肌细胞，分

本文 1988 年 6 月 4 日收到。1988 年 8 月24日收到修改稿。
* 国家"七五"攻关资助项目。

别置于5组试管中（2ml/管）：(1)空白对照：仅加入 K-H 缓冲液;(2)对照：加入 $FeCl_2$ 和抗坏血酸作为自由基发生系统，终浓度分别为 0.1 和 0.5mmol/l; (3)—(5) 管除加入自由基发生系统外，还加入 MT 分别为 2×10^{-5}, 2×10^{-6}, 2×10^{-7}mol/l。在恒温水浴振荡器上(37℃),95%O_2:5%CO_2 孵育 20min，然后分别测定各管的杆形细胞存活率和 MDA 含量。

实验结果用均值±标准误差表示,配对资料 t 检验作统计学处理。

二、结　果

1. MT 对心肌细胞缺氧-复氧损伤的保护作用　实验分离的大鼠心肌细胞在含钙 1.25 mmol/l 的培养液里，90% 以上排斥台盘蓝紫色，70% 以上呈杆型。心肌细胞缺氧-复氧损伤(对照)表现为细胞挛缩,结合染料,杆形细胞存活率显著减少,而细胞脂质过氧化产物MDA和细胞内钙含量明显增加。MT 处理有效地保护心肌细胞抵抗其缺氧-复氧损伤,与对照组相比较,杆形细胞存活率较高，而细胞 MDA 和 Ca^{2+} 含量较低。其保护作用呈剂量依赖性(见表 1)。

表1　MT 对心肌细胞缺氧-复氧损伤的影响

	假缺氧	对照	MT(mol/l)		
			10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
细胞存活率(%)	73.2±2.1**	56.4±2.1	64.9±1.4**	60.3±1.5*	56.4±1.9
MDA含量(nmol/mg蛋白)	0.40±0.04**	0.79±0.06	0.55±0.04**	0.72±0.05*	0.77±0.06
Ca^{2+}含量(nmol/mg蛋白)	10.7±2.4**	36.8±1.2	10.7±2.5**	24.9±2.5*	36.3±0.7

$n=6$，与对照组相比较：*$P<0.05$; **$P<0.01$.

2. MT 对心肌细胞脂质过氧化的影响　自由基发生系统引起心肌细胞 MDA 含量成倍增加,杆形细胞存活率显著降低。MT 明显拮抗自由基发生系统引起的细胞损伤，与对照组相比较,和 MT 共同孵化的心肌细胞的 MDA 含量较低,而细胞存活率高，其效应呈剂量依赖性(表 2)。

表2　MT 对心肌细胞脂质过氧化的影响

	空　白	对　照	MT (mol/l)		
			2×10^{-5}	2×10^{-6}	2×10^{-7}
细胞存活率(%)	72.8±0.7**	56.4±3.6	66.4±1.7*	62.1±2.8*	57.8±2.1
MDA含量(nmol/mg蛋白)	0.45±0.04**	0.94±0.07	0.76±0.08**	0.80±0.10*	0.84±0.14

$n=4$，* 与 ** 同表1.

三、讨　论

MT 是生物体中广泛存在的富含半胱氨酸残基的低分子量蛋白(在哺乳动物其分子量是6100),分子上结合有 Cd,Zn 等多种重金属离子，其生理功能尚未完全阐明。近年发现在炎症、感染、辐射及各种应激刺激时,肝脏合成 MT 增加，MT 参与细胞代谢调节和应激时细胞的适应反应，推测是机体对外源性损伤的第一线防御机构之一[3]。但迄今尚无在疾病模型上

治疗应用的报道。本实验在大鼠心肌细胞上，观察发现 MT 显著抑制细胞缺氧-复氧损伤，表现为提高了细胞存活率，抑制了心肌细胞钙含量和 MDA 含量的增加。目前认为 Ca^{2+} 内流导致的细胞内钙超负荷是心肌缺血-再灌注损伤的重要发病环节，而微量的 Cd 等重金属离子能有效地阻止细胞外钙的内流[4]，推测 MT 分子中的重金属离子对阻止钙超负荷的发生有重要意义，但需进一步研究证实。

缺血心肌再灌注时产生大量活性氧，膜脂质过氧化导致膜功能与结构损伤。Thornalley 等[5]报道 MT 对氧自由基，尤其是对羟自由基（·OH）有较强的清除作用，其作用可能与MT 分子上的半胱氨酸残基（—SH）有关。本实验 MT 显著拮抗自由基发生系统（$FeCl_2$，抗坏血酸）引起的心肌细胞膜脂质过氧化，降低细胞 MDA 含量并提高细胞存活率，其效应呈剂量依赖性。实验结果提示，MT 作为有效的细胞保护剂，对于缺血心肌再灌注损伤是很有前途的防治药物。

MT 本身是无毒性的低分子量蛋白，但目前 MT 的提取全是采用 Cd 饱和法制备出 Cd-MT，体内应用存在着 Cd 中毒的肝和肾严重损伤的问题，MT 的临床应用尚需要改革 MT 的制备方法，如用对身体无毒的 Zn 代替 Cd 制备 Zn-MT。

参 考 文 献

[1] Braunwald, E. and Kloner, B.A., *J Clin Invest*, **76**(1985), 1713—1719.
[2] 唐朝枢等，北京医科大学学报，**19**(1987), 299—301.
[3] 程时，生理科学进展，**18**(1987), 352—354.
[4] Rich, T. L. and Langer, G.A., *Circ Res.*, **51** (1982), 131—141.
[5] Thornalley, P.J. and Vasak, M., *Biochim. Biophys. Acta*, **827**(1985), 36—44.