

- 1977, **83** (2): 346~ 356
- 8 乐加昌, 王文玉, 江丕栋, 等. 用荧光漂白和恢复技术研究竹红菌乙素在小鼠肝癌细胞内的扩散过程. 生物物理学报, 1993, **9** (3): 669~ 672
Yue J C, Wang W Y, Jiang P D, *et al.* Acta Biophysica Sinica, 1993, **9** (3): 669~ 672
- 9 Wang Y Z, Sze H. Similarities and differences between the tonoplast-type and mitochondrial H^+ -ATPase of oat roots. J Bio Chem, 1985, **260** (25~ 26): 10434~ 10440
- 10 乐加昌, 秦素芬, 叶健平, 等. 竹红菌乙素对于人红细胞膜荧光猝灭机理研究. 感光科学与光化学: 1993, **11** (3): 228~ 235
Yue J C, Qin S F, Ye J P, *et al.* Photographic Science and Photochemistry, 1993, **11** (3): 228~ 235
- 11 乐加昌, 屠亚平, 庞素珍. 竹红菌乙素对肌质网 Ca^{2+} -ATPase 蛋白质色氨酸荧光猝灭研究. 科学通报, 1995, **40** (1): 76~ 79
Yue J C, Tu Y P, Pang S Z. Chinese Science Bulletin, 1995, **40** (1): 76~ 79

Preliminary Study on Relationship Between Function and Conformation of Vacuolar H^+ -ATPase of Soybean. DONG Cai-Hua, WANG Zhi-Qiang, WANG Yan-Zhi (School of Life Science, Wuhan University, Wuhan 430072, China).

Abstract Soybean vacuolar H^+ -ATPase is one of the

ATPases and play an important role in the growing period of the plant. Hypocrellin B and KI quench the intrinsic fluorescence of outside and inside membrane domain respectively. This two quench probes have been used to quench the protein's intrinsic fluorescence under different pH and temperature. The relationship between hydrolysis activity and folding condition of V-ATPase has been preliminarily studied. The K_{SV} of outside and inside membrane domain under different pH and temperature had been compared. It shows that the intrinsic fluorescence of the protein and K_{SV} of outside and inside membrane domain all dropped with the deviation of pH and temperature from the optimum condition and the activity of the enzyme dropped too. This illustrates that the folding condition had been changed with the dropping of the enzyme's activity. The changing of the folding condition of the protein plays an important role in the inactivation mechanism.

Key words V-type H^+ -ATPase, HB quenching, K_{SV} , fluorescence quenching

过氧化氢对培养心肌细胞损伤作用的研究

曹纯章 卜丽莎 高 申

杨同书

(白求恩医科大学第三临床学院中心研究室, 长春 130031)

(白求恩医科大学基础医学研究所, 长春 130031)

摘要 氧化应激时产生大量的自由基, 造成心肌细胞的损伤. 过氧化氢 (H_2O_2) 是有机体氧化代谢产物, 同时是一种活性氧. 应用不同浓度的 H_2O_2 , 分别于不同作用时间, 动态观察其对心肌细胞的损伤作用. 从实验结果看到, 低浓度的 H_2O_2 ($< 0.1 \text{ mmol/L}$) 作用 2 h, 使心肌细胞产生早期的生物化学的改变, 如 MDA 产生堆积和细胞周期时相改变 (G1 期细胞增加, G2 期细胞减少), 此时心肌酶基本无泄漏, 心肌细胞的死亡率很低, HE 形态学观察基本无改变; 随着 H_2O_2 浓度的增加 ($1 \sim 5 \text{ mmol/L}$) 和作用时间的延长, 进一步诱导细胞损伤加剧, LDH 释放和 MDA 积累明显升高, 细胞死亡率也明显增加, 已具有统计学意义. 同时可观察到其病理形态学的坏死性改变; 当 10 mmol/L H_2O_2 作用时, 细胞大量死亡, 形态学可见细胞极度收缩、脱落, 形成大面积的细胞脱落区. 因此, H_2O_2 作为一种活性氧自由基, 依其浓度和作用时间不同可造成不同程度的心肌细胞的损伤. 辣根过氧化物酶作为一种自由基清除剂, 可明显减少 H_2O_2 活性氧自由基对心肌细胞的损伤作用.

关键词 活性氧自由基, 过氧化氢 (H_2O_2), 心肌细胞, 抗氧化剂

学科分类号 R363, R34

近年来活性氧自由基对心脏的损伤作用已引起人们的广泛重视^[1]. 通常在组织的正常氧化代谢中会产生小量的自由基, 同时通过细胞内的防御机制(自由基清除酶类和抗氧化剂)维持氧自由基的代谢平衡. 但是在一些损伤因素的作用下, 细胞内氧化代谢物增加, 或细胞中抗氧化保护机制不足时, 使活性氧产生堆积并对细胞产生毒性. 这种氧化和抗氧化的不平衡状态称之为氧化应激^[2]. 心肌缺血时会造成抗氧化保护机制的改变, 同时产生大量的自由基^[3]. 过氧化氢(H_2O_2)是体内氧化代谢的中间产物, H_2O_2 很易穿透细胞膜到达胞内位点, 如果 H_2O_2 的积累对心肌细胞产生细胞毒性会带来严重的后果. 因此本研究目的是观察 H_2O_2 浓度的积累与心肌细胞损伤程度的关系, 同时观察以 H_2O_2 为底物的过氧化物酶的保护作用. 具体采用体外培养的心肌细胞, 依 H_2O_2 作用的剂量和时间的不同, 观察 H_2O_2 对心肌细胞的损伤作用. 同时探讨辣根过氧化物酶对心肌细胞的保护作用.

1 材料和方法

1.1 心肌细胞培养

取新生1~2 d的Wistar大鼠心室肌组织, 剪碎, 用含0.25%胰蛋白酶的Hank's液分别消化5、15、20 min, 后两次细胞悬液混合在一起. 预培养90 min后, 以 3×10^5 个/ml置入培养器皿中, 在 36.5°C 、5% CO_2 和95%空气的二氧化碳孵箱内进行培养. 培养基为MEM(含15%小牛血清)^[4]. 所有实验检测于培养4 d细胞达融合状态后进行.

1.2 乳酸脱氢酶测定

通过测定培养介质中乳酸脱氢酶(LDH)的含量来评价 H_2O_2 对心肌细胞的毒性. 以不同浓度的 H_2O_2 作用不同的时间, 取培养液在日立7150生化自动分析仪测定LDH活性. 每个浓度的实验做6份重复测试, 做三批培养细胞实验.

1.3 甲基四唑蓝测定

甲基四唑蓝(MTT)比色实验是一种检测细胞存活和生长的方法^[5]. 活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性的MTT还原为蓝紫色结晶物, 沉积在细胞中, 而死细胞无此功能. 用二甲亚砜溶解, 用酶联免疫检测仪在490 nm下测其光吸收值, 间接反映出活细胞数量.

细胞存活率 = 实验组光吸收值 / 对照组光吸收值 $\times 100\%$

1.4 总丙二醛测定

以0.5 nmol/L 1, 1, 3, 3-四甲基丙烷为标准品, 岛津RF-540荧光分光光度计测定心肌细胞及培养液中的总丙二醛(MDA)浓度.

1.5 HE染色观察培养心肌细胞形态学改变

按病理学常规方法制片, 并在光镜下观察.

1.6 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, H_2O_2 作用前后比较采用方差分析, $P < 0.05$ 有显著性差异.

2 结果

2.1 H_2O_2 的积累对培养心肌细胞膜通透性影响

不同剂量的 H_2O_2 作用于培养心肌细胞不同的时间, 其膜通透性的改变以LDH从心肌细胞的漏出来衡量. 当0.1 mmol/L H_2O_2 作用2 h, 心肌细胞酶基本无漏出, 与对照组(47 ± 1.2) U/L相比略有升高(66 ± 2.1) U/L, $P > 0.05$. 0.5 mmol/L H_2O_2 作用于心肌细胞2 h, 膜通透性增加, LDH大量漏出(101 ± 3.1) U/L, $P < 0.05$. 随着 H_2O_2 作用浓度和时间的增加, 培养液中LDH活性显著升高, 与对照组之间有显著差异. 1 mmol/L H_2O_2 作用于心肌细胞2 h, LDH活性(128 ± 2.7) U/L, 24 h时达(260 ± 2.8) U/L, $P < 0.01$ (图1).

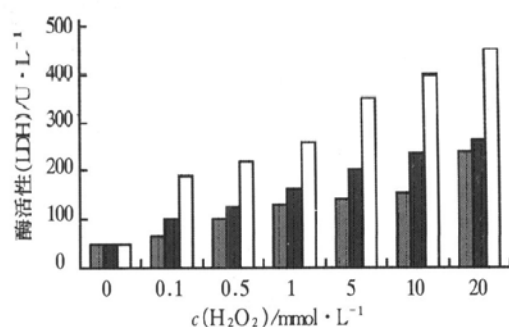


图1 不同浓度 H_2O_2 作用不同时间下对培养心肌细胞漏出LDH的比较

■ : 2 h; ■ : 4 h; □ : 24 h. $n = 6$.

2.2 H_2O_2 对培养的心肌细胞存活率的影响

不同剂量的 H_2O_2 作用于培养心肌细胞不同时间, 用MTT方法测定细胞的存活率. 当0.05 mmol/L H_2O_2 作用2 h, 几乎对心肌细胞无影响, 存活率达99.6%. 随着作用时间的增加, 死亡的细胞逐渐增多, 到24 h, 存活率达83.3%. 当0.5 mmol/L H_2O_2 作用2 h, 几乎有一半的心肌细胞死亡; 作用时间增加到24 h, 已有2/3的细胞

死亡. 10 mmol/L H_2O_2 作用 2 h 后, 大部分心肌细胞已经死亡 (图 2).

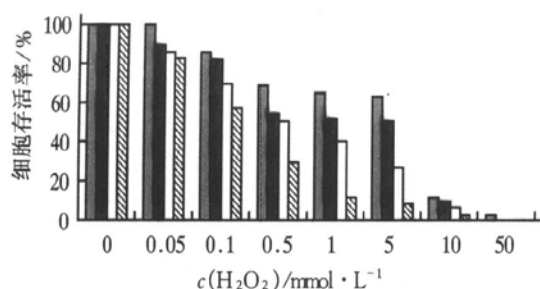


图 2 不同浓度 H_2O_2 作用不同时间对培养细胞存活率的影响

■: 2 h; ▨: 4 h; □: 12 h; ▩: 24 h. $n=6$.

2.3 H_2O_2 诱导心肌细胞脂质过氧化反应

不同剂量的 H_2O_2 作用于培养的心肌细胞 24 h, 丙二醛的测定结果见表 1. 丙二醛是细胞内脂质过氧化反应的最终产物, 它的高低能反映出 H_2O_2 对脂质过氧化反应的影响. 当 0.05 mmol/L H_2O_2 作用 24 h, MDA 略有升高, 与对照组比较, 未见显著差异. 当 0.1 mmol/L H_2O_2 作用时, MDA 升高明显. 当 1 mmol/L H_2O_2 作用 24 h, 细胞内脂质

过氧化反应显著增加, 产物 MDA 呈显著升高, $P < 0.01$.

表 1 不同浓度 H_2O_2 作用培养心肌细胞 24 h 后细胞和介质中 MDA 含量比较

$c(\text{H}_2\text{O}_2) / \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	n	t/h	$c(\text{MDA}) / \text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$
0	6	24	0.388 ± 0.145
0.05	6	24	0.549 ± 0.061
0.1	6	24	$0.602 \pm 0.122^{1)}$
1.0	6	24	$1.713 \pm 0.275^{2)}$
10	6	24	$5.710 \pm 0.571^{2)}$

¹⁾ $P < 0.05$; ²⁾ $P < 0.01$ 与正常对照组细胞比较.

2.4 H_2O_2 对培养心肌细胞周期的影响

用流式细胞仪检测细胞各周期 DNA 含量. 结果表明, H_2O_2 诱导细胞周期时相的改变, 在二倍体峰前出现亚二倍体峰, 同时 $G_0 + G_1$ 期增加, S 期下降. 0.05 mmol/L、0.1 mmol/L、1 mmol/L H_2O_2 作用于培养的心肌细胞 2 h, 亚二倍体峰分别为 4.8%、6.7% 和 11.5% (图 3).

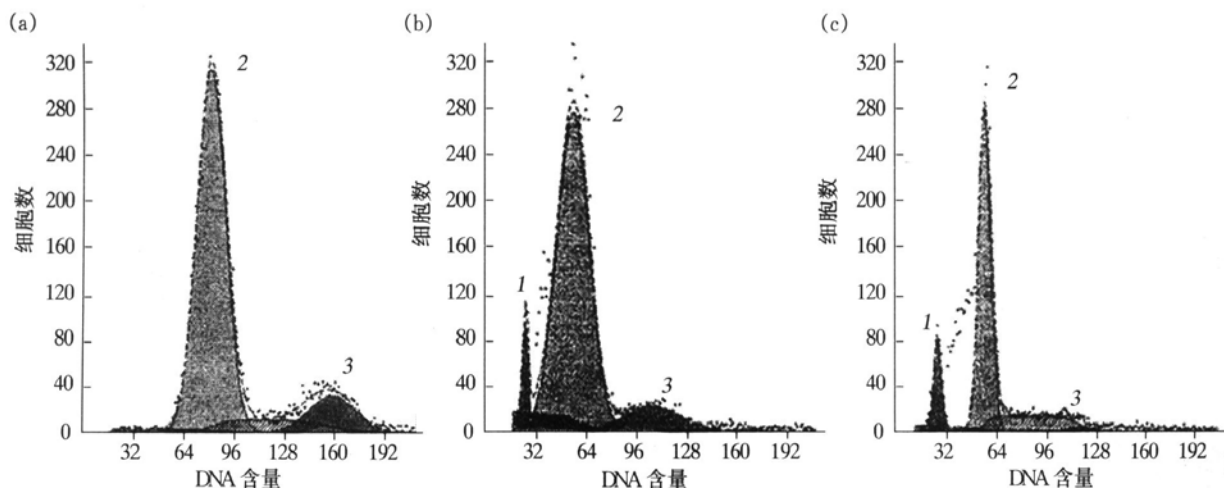


图 3 H_2O_2 对培养心肌细胞增殖周期的影响

只有 DNA 发生断裂才会出现此峰; 峰 1: 亚二倍体峰; 峰 2: G_1 期 DNA 峰即二倍体峰; 峰 3: G_2 期峰. (a) 正常对照: G_1 (峰 2) = 68.4%, G_2 (峰 3) = 19.3%, S = 12.2%, AP = 0. (b) 0.1 mmol/L H_2O_2 (2 h): G_1 (峰 2) + G_2 (峰 3) = 93.3%, AP (峰 1) = 6.7%. (c) 1 mmol/L H_2O_2 (2 h): G_1 (峰 2) + G_2 (峰 3) = 88.5%, AP (峰 1) = 11.5%.

2.5 HE 染色结果

H_2O_2 对于培养心肌细胞形态学的影响是, 低浓度的 H_2O_2 (< 0.1 mmol/L) 基本上对心肌细胞无影响. 1~5 mmol/L H_2O_2 作用 4 h, 可以造成培

养心肌细胞形态学的改变, 心肌细胞收缩、胞体变小、细胞间桥结构减少、胞间隙明显增加. 当 10 mmol/L H_2O_2 作用时, 心肌细胞极度收缩, 产生大片的细胞脱失区 (图 4).

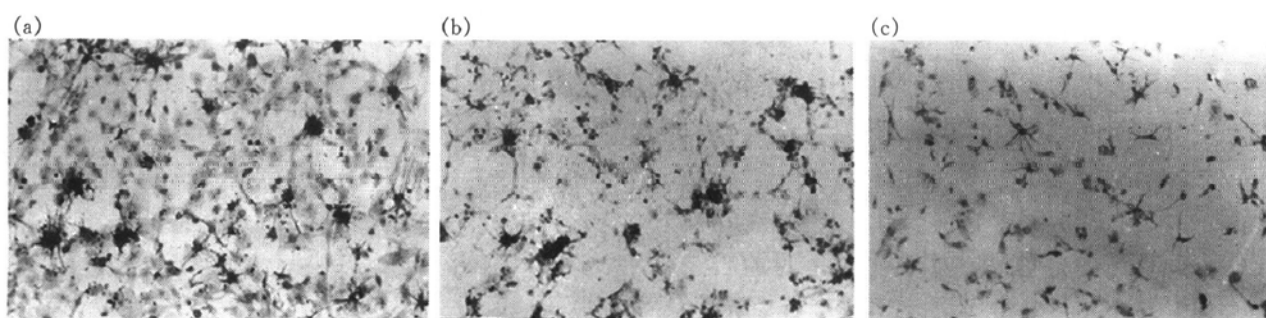


图4 培养心肌细胞的 HE 染色观察

(a) 对照组; (b) 5 mmol/L H_2O_2 (4 h); (c) 10 mmol/L H_2O_2 (4 h). (放大倍数 $\times 200$)

2.6 HRP 对心肌细胞的保护作用

HRP 是以过氧化物 (包括 H_2O_2) 为底物的一种氧化酶, 它能分解 H_2O_2 而降低其产生自由基损伤的可能性. 为评价 HRP 对心肌细胞的保护作用, 预先用 3、5、15 U/ml 的 HRP 与心肌细胞孵育

12 h, 然后换液加入 H_2O_2 , 测定培养细胞介质中 LDH、MDA 的含量. 其结果见表 2. 结果表明, HRP 能有效地减少 H_2O_2 损伤心肌细胞的 LDH 释放和 MDA 的积累, 与单纯施加 H_2O_2 组有明显的差别.

表2 HRP 对 H_2O_2 诱导的心肌细胞介质中 LDH 和 MDA 含量的影响

	<i>n</i>	酶活性 (LDH) / $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	<i>c</i> (MDA) / $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$
对照组	6	47 ± 2.1	0.388 ± 0.145
5 mmol/L H_2O_2	6	$147 \pm 3.5^{1)}$	$4.732 \pm 0.326^{1)}$
HRP (3 U/ml) + 5 mmol/L H_2O_2	6	$87 \pm 2.7^{2)}$	$1.076 \pm 0.231^{1)2)}$
HRP (5 U/ml) + 5 mmol/L H_2O_2	6	$75 \pm 4.6^{2)}$	$0.825 \pm 0.176^{2)}$
HRP (15 U/ml) + 5 mmol/L H_2O_2	6	$63 \pm 3.9^{2)}$	$0.618 \pm 0.096^{2)}$

¹⁾ $P < 0.05$, 与对照组比较; ²⁾ $P < 0.05$, 与 H_2O_2 组比较 ($\bar{x} \pm s$).

3 讨 论

自由基能造成多种组织细胞的损伤. 自由基上的活跃电子能与多种生物大分子发生反应, 如蛋白质 (酶)、核酸大分子和生物膜上的不饱和脂肪酸, 结果导致大分子变性失活以及脂质过氧化反应造成的生物膜损伤, 对细胞产生毒性. 有机体的细胞内存在重要的防御机制, 如抗氧化剂和自由基清除酶类. 抗氧化防御机制与自由基之间失去平衡, 就会产生氧化应激状态, 造成细胞损伤.

心肌缺血诱导心肌细胞死亡, 其机制并未完全阐明. 有研究报告^[6]缺血的心肌组织中产生大量的自由基, 活性氧自由基在缺血/再灌注的心肌损伤病理发生过程中起重要的作用. 作为一种活性氧物质, H_2O_2 积累到一定程度, 会造成心肌细胞损伤. 从本文实验结果看, 低浓度 H_2O_2 ($< 0.1 \text{ mmol/L}$) 就能引起培养的心肌细胞早期的生物化学改变 (LDH 释放, MDA 生成和细胞周期

的改变), 与未施加 H_2O_2 的对照组相比尚未达到统计学的显著差异, 此时形态学无明显改变. 应用 $1 \sim 5 \text{ mmol/L}$ 的 H_2O_2 进一步诱导细胞的损伤, 培养液中的 LDH 和 MDA 明显升高, 统计学分析差异显著, 死亡的心肌细胞也明显的增多. 形态学上观察到心肌细胞收缩, 胞体变小, 细胞的间桥结构减少, 胞间隙明显增加. 说明 H_2O_2 已造成培养心肌细胞的严重损伤, 引发生物膜系统的脂质过氧化反应, 产生大量的 MDA, MDA 在膜内能形成交链, 使膜成分多聚化, 最终导致膜流动性下降、膜结构改变和膜通透性增加. LDH 的大量泄漏说明膜结构崩塌. 当应用高浓度 H_2O_2 ($> 10 \text{ mmol/L}$) 时, 培养的心肌细胞快速死亡, 2 h 时已有近 90% 的细胞死亡. 形态学上可观察到大量的细胞脱落. 以上结果表明, H_2O_2 对心肌细胞的损伤作用具有浓度和时间依赖性关系. 本研究在连续浓度的 H_2O_2 损伤作用下, 综合观察了培养心肌细胞的多种生化指标的改变, 特别是早期的生化指标的改变

变,为进一步研究缺血心肌自由基损伤机制打下基础.

在心肌组织中存在抗氧化系统,如抗氧化剂,抗氧化酶类,来抵御自由基的侵袭.本研究采用辣根过氧化物酶(HRP),它能催化 H_2O_2 产生 H_2O 而消除 H_2O_2 的毒性作用.研究结果表明HRP有抑制 H_2O_2 诱导的心肌细胞毒性作用,3 U/ml的HRP预先与心肌细胞孵育12 h,可明显减少 H_2O_2 对心肌细胞的脂质过氧化反应和膜损伤,使培养心肌细胞的LDH和MDA分别下降了41%和77%,由原来的LDH 147 U/L、MDA 4.732 nmol/L分别下降到87 U/L、1.076 nmol/L,两组相比较差异显著.提示过氧化物酶能抑制 H_2O_2 等活性氧自由基引起的心肌细胞的损伤,为它在心脏疾病的治疗和预防中发挥作用提供了依据.

参 考 文 献

- 1 Yang T S, Ou Yang Y B, Yang J. The mechanism of free radical injury in myocardial necrosis of Keshan disease. *Advances in Free Radical Biology and Medicine*, 1991, **1** (1): 19~ 34
- 2 Ferrai R, Agnoletti L, Comini L, *et al.* Oxidative stress during myocardial ischaemia and heart failure. *Eur Heart J*, 1998, **19** (Suppl B): B2~ B11
- 3 MacLellan W R, Schneider M D. Programmed cell death in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*, 1997, **81** (1): 137 ~ 144
- 4 Lai C C, Peng M, Huang L, *et al.* Chronic exposure of neonatal cardiac myocytes to hydrogen peroxide enhances the expression of catalase. *J Mol Cell Cardiol*, 1996, **28** (8): 1157~ 1163
- 5 司徒镇强, 吴军正主编. 细胞培养. 西安: 世界图书出版西安公司, 1996. 186~ 187
Si Tu Z Q, Wu J Z. *Cell Culture*. Xi'an: World Books Publishing Company, 1996. 186~ 187
- 6 Gurevitch J, Frolkis I, Yuhay Y, *et al.* Tumor necrosis factor-alpha is released from the isolated heart undergoing ischemia and reperfusion. *J Am Cell Cardiol*, 1996, **28** (2): 247~ 252

The Injured Effect of Hydrogen Peroxide on Cultured Cardiac Myocytes. CAO Chun-Zhang, BU Li-Sha, GAO Shen (*Central Laboratory, Third Clinical Teaching College, Norman Bethune University of Medical Sciences, Changchun 130031, China*); Yang Tong-Shu (*Institute of Preclinical Medicine, Norman Bethune University of Medical*

Sciences, Changchun 130021, China).

Abstract Neonatal rat cardiomyocytes were cultured and cytotoxicity in cultured cardiomyocytes was induced by H_2O_2 over a wide concentration range (0.05~ 50 mmol/L) to assess dynamically the effect of H_2O_2 on cardiomyocytes. The results showed that application of < 0.1 mmol/L H_2O_2 to cardiomyocytes caused accumulation of lipid peroxide (MDA) at 24 h, and phase changes of cellular proliferation cycle at 2h, which represented early biochemical changes. Exposure of cardiomyocytes to the increasing concentrations of H_2O_2 (1~ 5 mmol/L) induced progressively biochemical injury; the levels of LDH and MDA were significantly higher in the cardiomyocytes exposed to H_2O_2 than in control, with concomitant morphologic changes. When exposed to high concentrations (> 10 mmol/L), a large number of cardiomyocytes were found dead by MTT assay, and morphologic examination by HE-staining showed that cardiomyocytes contracted extremely, forming a large dropping areas of cardiomyocytes, concurrently with the marked increase of membrane permeability which caused LDH substantial leakage from myocytes to H_2O_2 . It is proposed that H_2O_2 accumulation can induce cardiomyocyte cytotoxicity in a dose- and time-dependent manner. Treatment with low concentrations of H_2O_2 causes cardiomyocytes early slight biochemical changes which represent pre-apoptotic injurious features. High concentrations of H_2O_2 can progressively induce lipid peroxidation, which cause the severe damage of the cell membrane. With exposure of cardiomyocytes to H_2O_2 , the magnitude of the cytotoxicity is modulated by horseradish peroxidase (HRP). It is suggested that HRP may protect cardiomyocytes against reactive oxygen species.

Key words free radicals injury, hydrogen peroxide, cultured cardiomyocytes, antioxidant