

简 报

新生大鼠培养心肌细胞的电泳行为及丹参类中药的影响

顾玉苏 梁子钧

(上海医科大学生物物理教研室)

关键词 心肌细胞, 细胞电泳, 丹参素, 丹参酮 II-A, 原儿茶醛

近年来,随着对心肌细胞跨膜电位研究的深入,对细胞表面电位及表面带电基团的性质和结构的研究,也渐引起人们的关注^[1-3]。分离、培养的细胞是研究细胞表面电位的好材料。而细胞电泳法是实现这一目的的简便、有效的方法之一。在此基础上,本文对培养心肌细胞的表面电荷性质和中药丹参及其有效成分对表面电荷的影响进行了探讨。

材 料 和 方 法

取2—4日龄 Sprague-Dawley 大鼠心脏,胰蛋白酶分离消化心室肌, Eagle's MEM 培养液培养^[4]不同时间后,取细胞, 0.01 mol/L 柠檬酸-0.01 mol/L Na₂HPO₄ 缓冲液(加 NaCl 调到生理渗透压)洗细胞三次, 25±1°C 测细胞电泳率 (EPM)。

结 果

1. 心肌细胞的电泳行为 测定介质 pH 7.1 时,心肌细胞的电泳方向与已知其电泳行为的红细胞、淋巴细胞等一致。表明其细胞表面也带负电。随培养时间的延长,心肌细胞表面负电增加。但相隔两日间,此增加无显著意义(表1)。同次实验大鼠的红细胞,在与心肌细胞相同的条件下被胰蛋白酶消化后,其 EPM 由 1.50±0.33 (n=50) 减小为 0.829±0.37 (n=60), 减小 47%。

培养 3—5h 的心肌细胞,在介质 pH 由 7.67 逐步减低到 2.51 的过程中,电泳方向发生反转。即约在

表 1 不同培养时间的心肌细胞电泳率

培养时间	EPM	n	P
3—5h	2.29±0.54	100	
3d	2.42±0.80	110	>0.05
5d	2.55±0.85	180	>0.05

测定时缓冲液 pH 7.1

pH 4.1 时, EPM 为零; 大于 pH 4.1 时, 心肌细胞电泳方向与生理条件下红细胞等的电泳方向一致, 表现为带负电; 而小于 pH 4.1 时, 其电泳方向与上述方向相反, 细胞表现为带正电。pH 4.1 为心肌细胞的等电泳点 (Iso-electrophoretic Point) 此外实验观察表明, 酸性条件下 (pH > 6) 细胞生长未见明显影响, 而碱性

表 2 培养 3—5h 的心肌细胞 EPM 与 pH 的关系

pH	7.67	6.51	4.73	4.22	3.95
EPM	2.66 ±0.72	2.40 ±0.83	0.82 ±0.21	0.84 ±0.35	-0.71 ±0.21
n	20	20	10	100	10
pH	3.25	3.05	2.81	2.78	2.51
EPM	-1.91 ±0.41	-2.45 ±0.55	-3.40 ±0.96	-2.52 ±0.54	-3.86 ±1.04
n	100	10	136	10	100

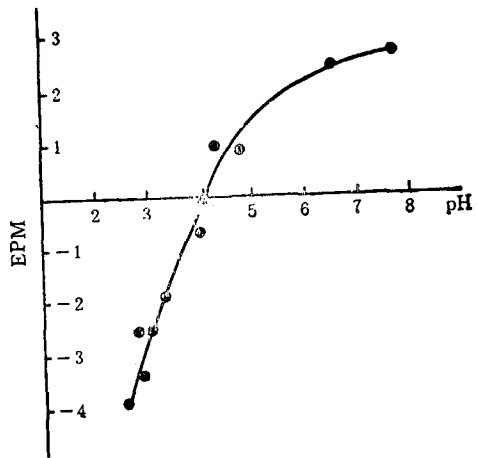


图 1 EPM-pH 关系曲线

(pH>8)时,细胞易死亡。EPM测定在10min内完成,pH对细胞活性的影响较小。

唾液酸酶(NANase)在缓冲液pH7.2条件下,作用培养3—5h的心肌细胞,其EPM有所下降(表3)。酶浓度为0.32U/ml时,心肌细胞EPM下降19%。酶浓度为0.25U/ml时下降不明显。

表3 培养3—5h的心肌细胞经NANase作用后的EPM

NANase 浓度	EPM	n	P
对 照	2.34±0.64	100	
0.25U/ml	2.28±0.71	107	>0.05
0.32U/ml	1.90±0.53	100	<0.01

测定时缓冲液 pH 7.2

2. 药物作用(表4) 丹参增加心肌细胞电泳率,但仅当其浓度为37.5mg/ml时,EPM增加有统计意义。丹参酮 II-A 浓度为0.01046mmol/L和1.046mmol/L作用心肌细胞时,明显增加其EPM;浓度为

表4 丹参、丹参酮 II-A、原儿茶醛和丹参素对培养3—5h心肌细胞EPM的影响

药 物	作用浓度	EPM	n	P
丹 参 (mg/ml)	0.375	2.47±0.54	100	>0.05
	1.2	2.50±0.63	100	>0.05
	12	2.39±0.49	106	>0.05
	37.5	2.58±0.81	100	<0.01
丹参酮 II-A (mmol/L)	0.01046	2.59±0.55	102	<0.01
	0.1046	2.28±0.56	100	>0.05
	1.046	2.84±0.70	100	<0.01
原儿茶醛 (mmol/L)	0.0217	2.22±0.49	100	>0.05
	0.724	2.41±0.56	110	>0.05
	2.17	2.04±0.37	100	<0.01
丹 参 素 (mmol/L)	0.0505	2.31±0.50	100	>0.05
	1.009	2.42±0.60	100	>0.05
	1.514	2.22±0.45	100	>0.05
对 照		2.34±0.64	100	

缓冲液 pH 7.2

加药物后缓冲液 pH 微偏酸 (Δ pH<0.3)。

0.1046mmol/L时无类似效应。原儿茶醛2.17mmol/L组,其EPM明显下降。丹参素对心肌细胞的EPM无明显影响。

讨 论

新生大鼠心肌细胞由胰蛋白酶分离后,其细胞被膜(Glycocalyx)的唾液酸已被大量水解^[3,6]。0.32U/ml NANase使心肌细胞EPM下降19%。不同种属动物的红细胞表面负电主要由唾液酸所携带,当红细胞被NANase作用后,其EPM将下降60—90%^[3]。而大鼠红细胞被胰蛋白酶作用后,其EPM下降47%,胰蛋白酶部分水解了细胞表面的唾液酸。可见培养3—5h的心肌细胞其表面唾液酸含量已相当少,因此其等电点也较高,约4.1。细胞表面负电可能主要由质膜中带负电的磷脂基团提供^[1]。随着细胞的生长代谢,细胞表面负电量有所增加,但在一定培养时间内,此增加不显著。培养时间的选择,对实验结果影响较小。

细胞表面负电的多寡,直接影响细胞对阳离子的结合力。而结合于细胞表面Ca²⁺的增加,将导致心肌收缩力的增加^[2]。此外心肌细胞表面唾液酸的有无,对于Ca²⁺的结合,细胞收缩及慢通道Ca²⁺内流无明显影响^[3,7,8]。所以增加细胞负电性的丹参、丹参酮 II-A,可能导致细胞结合Ca²⁺增加,进而导致Ca²⁺内流增加,心肌收缩力增强;原儿茶醛减少细胞表面负电性,可能会拮抗心肌收缩力的增强;而丹参素作用不明显。

参 考 文 献

- 1 Bart J M *et al.* *Circ Res*, 1983; 53(5):679.
- 2 Philipson K D *et al.* *J Mol Cell Cardiol*, 1980; 12: 1159
- 3 Langer G A *et al.* *Circ Res*, 1983; 53 (4): 482
- 4 杨英珍等,上海医学,1985; 8: 163
- 5 Sherbet G V. In: *The biophysical characterization of the cell surface*. London, NY, San Francisco: Academic Press, 1978; 36—78
- 6 Masson-Pevet M *et al.* *J Mol Cell Cardiol*, 1976; 8: 747
- 7 Isenberg G *et al.* *Nature*, 1980; 284 (27): 358
- 8 Harding S E *et al.* *Nature*, 1980; 286(21): 819

[本文于1989年7月10日收到]