

维拉帕米对海洛因诱发的乳鼠心肌细胞钙活动异常的作用

王广勇¹, 刘小山^{1*}, 王小宇², 苏涛³, 蒲红伟⁴, 方超¹, 耿文静¹, 竞花兰¹

(1.中山大学中山医学院法医系, 广东 广州 510080; 2.东莞市公安局, 广东 东莞 523008;

3.广州医学院, 广东 广州 510182; 4.新疆医科大学, 新疆 乌鲁木齐 830011)

摘要:【目的】研究海洛因对乳鼠心肌细胞钙活动的影响以及维拉帕米对海洛因作用下的乳鼠心肌细胞钙活动的影响作用。【方法】使用体外培养5 d的SD乳鼠心肌细胞, 标记细胞内游离钙, 应用激光共聚焦显微镜下检测细胞内荧光强度变化可指示细胞内游离Ca²⁺浓度([Ca²⁺]_i)变化; 并应用碘化丙啶进行活性细胞检测。【结果】0.01 mol/L海洛因可增加培养心肌细胞平均细胞内钙浓度和钙瞬变的幅度, 对自发性收缩节律无明显影响; 20 μmol/L维拉帕米可明显抑制海洛因诱导的钙超载, 并可降低收缩节律, 减少细胞死亡。【结论】海洛因可导致心肌细胞钙超载和钙活动异常, 导致细胞死亡, 维拉帕米可抑制细胞内钙活动, 保护心肌细胞。

关键词: 海洛因; 维拉帕米; 心肌细胞; 细胞内钙离子; 激光共聚焦显微镜

中图分类号: R966 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2011)05-0566-05

Antagonistic Effects of Verapamil on [Ca²⁺]_i Hyperactivated by Heroin in Newborn Rat Cardiomyocytes

WANG Guang-yong¹, LIU Xiao-shan^{1*}, WANG Xiao-yu², SU Tao³, PU Hong-wei⁴, FANG Chao¹,
GENG Wen-jing¹, JING Hua-lan¹

(1. Department of Forensic Medicine, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 2. The Bureau of Public Security of Dongguan City, Dongguan 523008, China; 3. Guangzhou Medical College, Guangzhou 510182, China; 4. Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

Abstract: 【Objective】To study the intracellular calcium concentration ([Ca²⁺]_i) mobilized by heroin and the possible remedy by verapamil in newborn rat cardiomyocytes. 【Methods】[Ca²⁺]_i was measured with fluorescent intensity (FI) by confocal microscope in single cultured 5d newborn rat cardiomyocytes loaded with Fluo 3-AM; propidium iodide was added to identify dead cells. 【Results】The average fluorescence intensity and amplitude of calcium transients over 80 s recording period were statistically up-regulated by 0.01 mol/L heroin ($P < 0.01$). The effects were reversed by the addition of 20 μmol/L verapamil. Post-treatments with verapamil partly rescued the cell death induced by continuous administration of heroin. 【Conclusion】Verapamil possesses the antagonistic effects and protective effects on the increased level and vibration of [Ca²⁺]_i induced by heroin in cultured cardiomyocytes.

Key words: heroin; verapamil; cardiomyocytes; intracellular calcium ([Ca²⁺]_i); confocal microscopy

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2011, 32(5):566-570]

在我国滥用的毒品主要是阿片类物质, 尤以海洛因最为广泛和严重。海洛因过量导致的死亡病例屡有发生, 其中心血管系统并发症是死亡的主要原因之一。海洛因(又称二醋吗啡)可激活心脏κ

阿片受体, 后者与心律失常的发生关系密切^[1]。心肌细胞的收缩或窦房结细胞的冲动发放都依赖于细胞内钙信号^[2]。我们既往报道海洛因可导致心肌细胞的钙超载, 这种钙浓度超负荷可引起心肌

收稿日期: 2011-03-03

基金项目: 国家自然科学基金(30860318)

作者简介: 王广勇, 在读硕士, 研究方向: 海洛因致心脏病毒机制的研究, E-mail: wgy8014@126.com; * 通信作者: 刘小山, 博士, 主任法医, 研究方向: 海洛因致神经元和心脏毒理机制的研究, E-mail: liuxsh@mail.sysu.edu.cn

细胞过度兴奋、收缩等,继而引起心肌细胞损害和收缩节律紊乱,推测是海洛因中毒导致心脏并发症的一个重要病理生理机制^[3-4]。因此,纠正心肌细胞的钙超载可能使细胞恢复部分正常生理功能。维拉帕米是L型钙通道阻滞剂,广泛应用于治疗高血压、心绞痛、心律失常、脑血管病等。本研究通过探讨维拉帕米对海洛因诱发的钙信号紊乱的作用,以了解海洛因诱发心肌损害的可能途径。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1~3 d的新生Sprague-Dawley大鼠20只,雌雄不限,由中山大学实验动物中心提供。海洛因(纯度80%)来自公安机关缴获,经毒化检测证实;维拉帕米和Fluo-3/AM购自Tocris公司;碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)为Sigma公司产品;小牛血清、胰酶、DMEM培养基、D-Hanks液为Gibco产品。Fluo-3/AM溶于DMSO中,均在临用前配制。在实验中DMSO的最终浓度2 μmol/L。

1.2 心肌细胞培养

无菌条件下摘取1~3 d的新生SD大鼠心脏,置于D-Hanks液中冲洗,去除心房,将心室剪成1 mm×1 mm的碎块;1.25 g/L胰蛋白酶37℃消化10 min,离心弃上清,用含100 mL/L小牛血清的DMEM培养基重悬细胞,滤网过滤,收集单细胞悬液;37℃贴壁90 min,以去除非心肌细胞,小心吸取未贴壁的心肌细胞,按 1×10^5 的密度接种于培养皿,置于CO₂孵箱37℃培养。培养前48 h,在心肌细胞的培养液中加入5-溴脱氧核苷(BrdU 0.1 mmol/L),以抑制非心肌细胞生长。

1.3 Fluo-3/AM的负载

体外培养5 d的乳鼠心肌细胞,去除培养基,用D-Hanks液洗涤细胞3次,Fluo-3/AM用D-Hanks液稀释至2 μmol/L,37℃避光条件下负载细胞30 min,用D-Hanks液洗去细胞外残余染料。

1.4 细胞内钙动态测定

将细胞置于共聚焦显微镜(SP2, Leica)下连续动态扫描。与Ca²⁺结合的Fluo-3可被488 nm的氩离子激光激发,发射波长526 nm,细胞内荧光强度

(fluorescent intensity, FI)变化可指示细胞内游离Ca²⁺浓度([Ca²⁺]_i)的相对变化。选定固定视野,给药前后分别进行扫描,每次连续动态扫描80 s,维持参数不变。

1.5 细胞活性测定

将心肌细胞分为3组,海洛因组、海洛因+维拉帕米组和对照组,加药时间点与钙测定实验相同,加海洛因后3 h给予10 μg/mL碘化丙啶(propidium iodide, PI)。由于PI是一种核酸染料,它不能透过完整的细胞膜,但凋亡中晚期的细胞和死细胞由于细胞膜通透性的增加,PI能够透过细胞膜而使细胞核染红。给予PI后在共聚焦显微镜下拍照,活细胞不染色,受损细胞核发出红色荧光。固定视野大小计算死亡细胞数。

1.6 数据分析与统计

利用其图像量化和分析系统进行图像分析,并根据选定细胞的荧光强度计算随时间变化的[Ca²⁺]_i曲线。根据下列公式计算平均荧光强度、平均钙瞬变强度和收缩频率:①平均钙荧光值为记录时间内(80 s)的细胞钙荧光信号算术平均值;②平均钙瞬变幅度=(峰值荧光强度-波谷荧光强度)_i/(收缩次数×对照组荧光强度),用于表示在心肌细胞收缩时代表细胞内游离Ca²⁺浓度的相对变化幅度;③收缩频率为透射扫描下观察记录时间内(80 s)的心肌细胞自发收缩次数。对上述参数进行统计学分析,采用均值±标准差表示,使用单因素方差分析多重检验和配对t检验或成组t检验进行两两比较。

2 结 果

2.1 心肌细胞钙瞬变

通过如图1A所示的实验方案,观察海洛因对心肌细胞钙瞬变的作用,并研究维拉帕米的可能纠正作用。结果显示,海洛因处理后心肌细胞的自发性钙瞬变明显增强,而在2 h后给予维拉帕米,钙瞬变受到明显抑制(图1B)。对其平均钙荧光值、平均钙瞬变幅度和收缩频率3个参数进行统计学分析。如图2所示,海洛因可提高心肌细胞平均[Ca²⁺]_i和钙瞬变的幅度($P < 0.05, n = 8$, 配对t检验),经统计检验,差异有统计学意义;但对心肌

细胞自发收缩的频率无显著性的影响。在海洛因处理后 2 h 给予维拉帕米, 显示维拉帕米可抑制心肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 和自发性钙瞬变幅度 ($P < 0.01$), 和减慢自发性收缩频率 ($P < 0.05$), 经统计检验,

差异有统计学意义。与加药前比较, 维拉帕米处理后, 心肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 和钙瞬变都具有下降 ($P < 0.01$), 经统计检验, 差异有统计学意义; 但收缩频率无统计学差异。

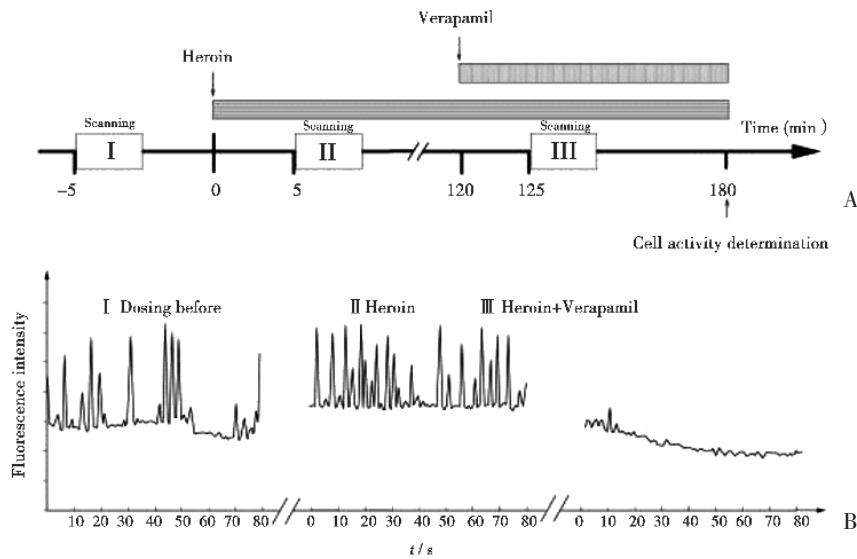


图 1 海洛因对心肌细胞内钙活动的影响以及维拉帕米的拮抗作用

Fig.1 Effect of heroin on $[Ca^{2+}]_i$ of cultured cardiomyocytes and the inhibition by verapamil

A: Schematic diagram illustrating the experimental scheme. B: Calcium transients of a representative cardiomyocyte before and during treatments.

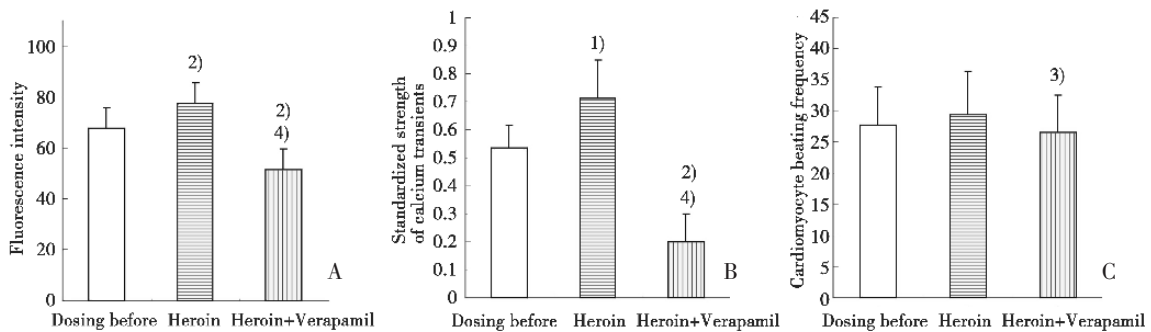


图 2 海洛因及维拉帕米对培养心肌细胞处理前后各项指标统计学分析

Fig.2 Statistical analysis on the indexes of cardiomyocyte activities after the treatments of heroin and verapamil

A: Average fluorescence intensity of calcium signals; B: Average strength of calcium transients; C: Spontaneous beating frequency of the cultured cardiomyocytes. 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$ (vs. control); 3) $P < 0.05$, 4) $P < 0.01$ (Heroin+Verapamil vs. Heroin)

2.2 心肌细胞活性改变

为了进一步探讨海洛因对心肌细胞的毒性作用, 研究应用碘化丙啶染色进行活性细胞测定, 结果显示(图 3), 海洛因处理后 3 h, 受损细胞达 $(64.4 \pm 12.6)\%$, 高于对照组 ($P < 0.01, n = 8$, 单因素方差分析和成组 t 检验两两比较), 经统计学检验, 差异有统计学意义。海洛因处理后 2 h 同时给

予维拉帕米 1 h 观察细胞活性, 可见受损细胞下降 ($P < 0.05$), 但仍然高于对照组 ($P < 0.01$), 经统计学检验, 差异有统计学意义。

3 讨论

我们既往研究发现 0.01 mol/L 二醋吗啡 (海

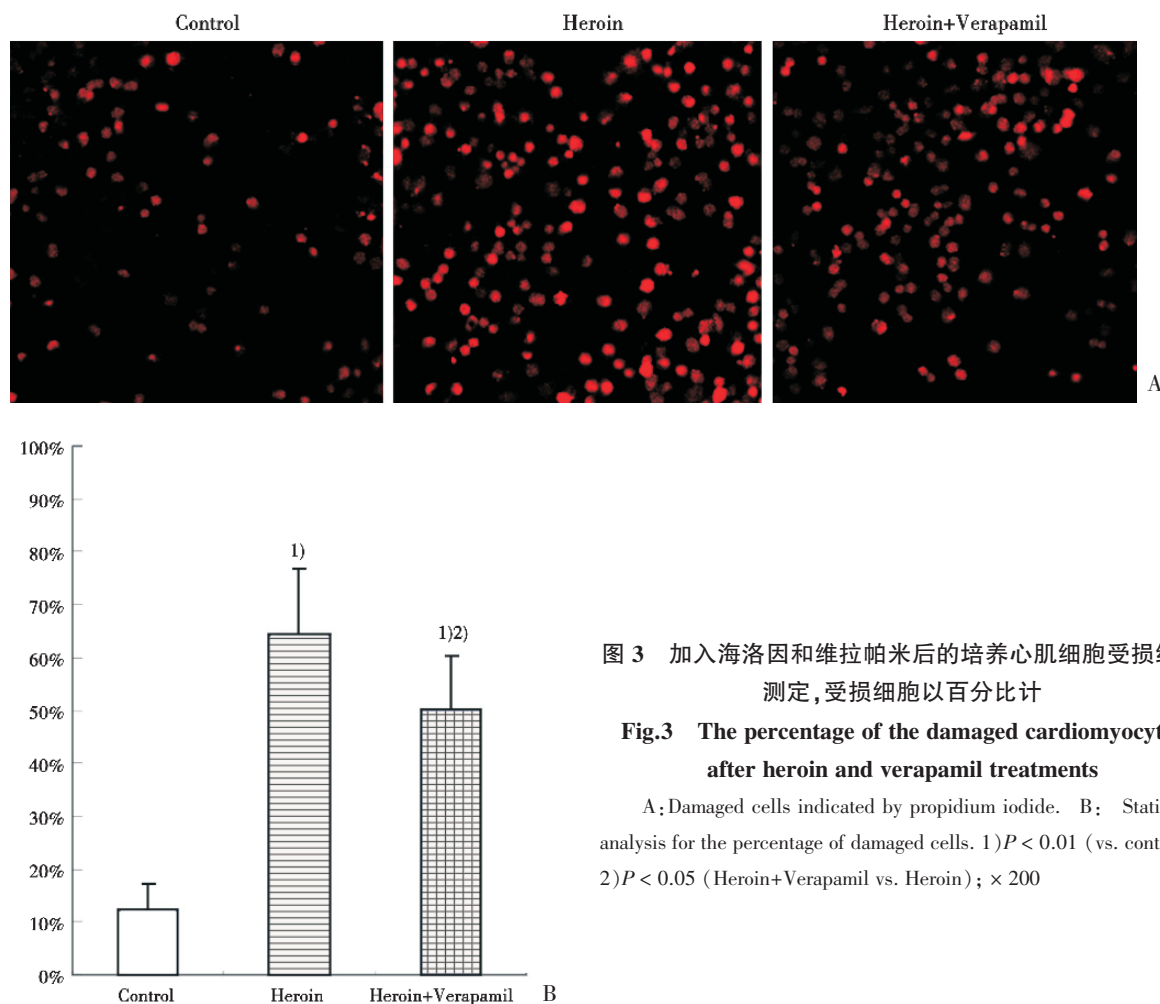


图3 加入海洛因和维拉帕米后的培养心肌细胞受损细胞测定,受损细胞以百分比计

Fig.3 The percentage of the damaged cardiomyocytes after heroin and verapamil treatments

A; Damaged cells indicated by propidium iodide. B; Statistical analysis for the percentage of damaged cells. 1) $P < 0.01$ (vs. control); 2) $P < 0.05$ (Heroin+Verapamil vs. Heroin); $\times 200$

洛因)可引起心肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 增多,推测钙超载可能是吸毒者心律失常发生、心肌细胞坏死而发生死亡的原因之一^[3]。然而,仍有许多细节尚未阐明,譬如海洛因与心肌细胞自发收缩节律、钙瞬变的幅度、细胞毒性作用等等。本研究不仅仅探讨细胞内稳态钙浓度,还结合心肌细胞自发收缩探讨海洛因对自发收缩产生钙瞬变的影响。与既往报道一致,0.01 mol/L海洛因可升高心肌细胞平均 $[Ca^{2+}]_i$ ^[3]。同时,如图1B所示该浓度的海洛因可明显增加心肌细胞钙瞬变的幅度,但对心肌细胞的自身收缩节律无明显作用。钙瞬变幅度与肌细胞的收缩相关,胞浆内的钙离子浓度及其变化程度可能直接影响了肌细胞的收缩强度和舒张程度,具有重要的病理生理意义。

维拉帕米是临床常用的心血管系统药物,主要通过阻断L型电压依赖性钙通道实现其药理作用。由于海洛因具有明显的钙超负荷和增强钙瞬

变的幅度,作为钙阻滞剂,维拉帕米具有一定的抑制作用。研究中发现给予海洛因处理后2h给予维拉帕米,可较明显抑制心肌细胞钙瞬变,同时一定程度降低平均细胞内钙浓度,这种抑制作用较显著,甚至使细胞的钙活动低于正常水平,心肌细胞的自发收缩节律也减慢。

正常生理条件下,心肌细胞可发生自发性去极化,去极化电流可诱导L型电压依赖性钙通道开放,细胞外的钙离子顺浓度差和电位差流入细胞内,再通过钙诱导的钙释放机制引起细胞内钙池释放钙,从而共同升高胞浆钙引起心肌细胞收缩^[5]。心脏存在有阿片肽受体,主要亚型为 κ -阿片受体^[6],可接受心脏可自身合成和释放阿片肽物质^[7],或外源性的毒品如海洛因等阿片类物质的配体激动。海洛因通过结合阿片受体,调节PLC/IP3和PKC/ Ca^{2+} 通路,使肌浆网的钙池释放增加,也可能影响L型电压依赖性钙通道的开放属性,

最终导致钙超载和钙瞬变加剧^[8]。临床上常见钙拮抗剂治疗阿片类药物诱发的心脏并发症^[9],然而其中机制并不明确。小鼠心肌 $[Ca^{2+}]_i$ 增高的同时L型电压依赖型钙通道功能与表达的增量调节可能提供了心律失常发生机制^[10]。此外,L型钙通道的内流是肌浆网钙池释放钙的主要触发因素^[10],推测维拉帕米对抗海洛因诱导的钙活动异常主要通过抑制细胞膜的电压依赖型钙通道。尽管如此,仍不能排除维拉帕米进入细胞内与钙调蛋白结合而发挥作用。研究证明维拉帕米不但可以和钙调蛋白结合^[11],还可影响钙调蛋白的活性和信号传递^[12],而后者是心律失常产生的重要因素。本研究发现维拉帕米主要抑制海洛因诱导的钙活动超载,而对心肌细胞的自我节律无明显影响。维拉帕米对抗海洛因毒性的内在机制仍有待进一步的研究。

本研究结果提示维拉帕米可能是对抗海洛因,甚至是其它阿片类药物,诱发的心脏毒性的比较理想药物。然而,目前20 $\mu\text{mol/L}$ 的维拉帕米是钙活动抑制低于正常水平,更有效的药物浓度还有待进一步的实验完善。尽管该浓度的维拉帕米导致细胞钙活动低于正常水平,细胞活性实验结果显示维拉帕米可部分减少海洛因诱导的受损细胞数。有实验表明,在对照组的心肌细胞内,细胞内 Ca^{2+} 荧光强度显得微弱;单纯的维拉帕米处理后心肌细胞组心肌细胞内 Ca^{2+} 荧光强度减少,与对照组相比差异无统计学意义,心肌细胞无论从数量上还是形态和状态上与对照组没有显著差异^[13],进而从侧面说明维拉帕米拮抗海洛因诱导的钙活动异常有较显著效果。

研究中显示0.01 mol/L海洛因可导致钙超负荷、钙瞬变增强,连续给予3 h,可导致约64%的细胞死亡,提示细胞钙的连续超负荷可能是导致心肌细胞死亡的主要原因之一。维拉帕米通过减少钙内流和影响钙活动,限制细胞内钙超载,可降低细胞死亡率^[13],可能具有一定的心肌保护作用。因此,维拉帕米对于海洛因诱导心肌毒性的保护作用值得进一步的探讨和验证。

参考文献:

[1] Valtchanova-Matchouganska A, Missankov A, Ojewole JA. Evaluation of the antidysrhythmic effects of delta-

- and kappa-opioid receptor agonists and antagonists on calcium chloride-,adrenaline-and ischemia/reperfusion-induced arrhythmias in rats[J]. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 2004, 26(1): 31-38.
- [2] Kemi OJ, Ellingsen O, Smith GL, et al. Exercise-induced changes in calcium handling in left ventricular cardiomyocytes[J]. *Front Biosci*, 2008, 13(1): 356-368.
- [3] 刘小山, 吴敬东, 蒿自睿, 等. 二醋吗啡对大鼠心肌细胞游离 Ca^{2+} 度的作用[J]. *法医学杂志*, 2007, 23(6): 424-427.
- [4] Warner-Smith, M, Darke S, Lynskey M, et al. Heroin overdose: causes and consequences [J]. *Addiction*, 2001, 96(8): 1113-1125.
- [5] Yu L, Netticadan T, Xu YJ, et al. Mechanisms of lysophosphatidylcholine-induced increase in intracellular calcium in rat cardiomyocytes [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1998, 286(1): 1-8.
- [6] Saraiva J, Oliveira SM, Rocha-Sousa A, et al. Opioid receptors and preconditioning of the heart [J]. *Rev Port Cardiol*, 2004, 23(10): 1317-1333.
- [7] Lishmanov YB, Maslov LN. Opioid receptors and heart resistance to arrhythmogenic factors [J]. *Bull Exp Biol Med*, 2004, 138(2): 107-112.
- [8] Pei JM, Zhou JJ, Bian JS, et al. Impaired $[Ca^{2+}]_i$ and pH_i responses to kappa-opioid receptor stimulation in the heart of chronically hypoxic rats [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2000, 279(5): 1483-1494.
- [9] 苏木金, 谭国生, 梁剑芳, 等. 尼莫地平控释片辅助治疗海洛因戒断综合征[J]. *中国药物依赖性杂志*, 2001, 10(3): 204-205.
- [10] Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling [J]. *Nature*, 2002, 415(6868): 198-205.
- [11] Johnson JD, Fugman DA. Calcium and calmodulin antagonists binding to calmodulin and relaxation of coronary segments [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1983, 226(2): 330-334.
- [12] Kim HC, Raess BU. Verapamil, diltiazem and nifedipine interactions with calmodulin stimulated ($Ca^{2+} + Mg^{2+}$)-ATPase [J]. *Biochem Pharmacol*, 1988, 37(5): 917-920.
- [13] 余薇, 汪晶晶, 甘文云, 等. 心肌缺血再灌注损伤和维拉帕米预处理对大鼠心功能和心肌细胞内钙荧光强度以及L型钙电流的影响[J]. *中华心血管病杂志*, 2010, 38(3): 225-229.