

左西孟旦对去甲肾上腺素诱导的心肌细胞钙瞬变信号的影响

杨玉青, 卢新政*, 曹佳莉, 邹花一阳, 朱丽红, 张 辉, 孙慧文, 陈明龙, 孔祥清

(南京医科大学第一附属医院心内科, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的: 研究心肌细胞衰竭过程中钙瞬变信号的变化及左西孟旦(levosimendan, LeV)对其影响。方法: 培养 Sprague Dawley(SD)乳大鼠心肌细胞 48 h 后, 分为对照组、去甲肾上腺素(NE)组、NE+LeV1(0.1 $\mu\text{mol/L}$)诱导组和 NE+LeV2(1 $\mu\text{mol/L}$)诱导组。NE 组以去甲肾上腺素 10 $\mu\text{mol/L}$ 诱导; NE+LeV1 组先用 NE 诱导, 再以 LeV 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 干预; NE+LeV2 组先用 NE 诱导, 再以 LeV 1 $\mu\text{mol/L}$ 干预。用 Ca^{2+} 荧光指示剂 Fluo-3/AM 负载心肌细胞, 激光共聚焦显微镜观察心肌细胞钙瞬变信号变化以及心肌细胞的搏动频率。结果: ① 与对照组相比, NE 组心肌细胞钙波分散、传导减慢、同步性较差, 细胞搏动频率较快 (26.7 ± 4.3 vs. 11.6 ± 3.6 , $P < 0.01$), 收缩期钙瞬变峰值下降 (128.37 ± 65.44 vs. 155.33 ± 61.77 , $P < 0.05$), 达峰时间 (T_p , 0.413 ± 0.324 vs. 0.212 ± 0.050 , $P < 0.01$), 衰减时间 (T_m , 1.162 ± 0.524 vs. 0.722 ± 0.169 , $P < 0.01$) 均延长, 钙瞬变幅度 (60.80 ± 39.88 vs. 75.41 ± 36.52 , $P > 0.05$), 谷值 (67.57 ± 42.59 vs. 79.92 ± 38.05 , $P > 0.05$) 变化不大; ② LeV 处理后, 钙波传导均匀同步, 心肌细胞搏动频率及钙瞬变的峰值、幅度、谷值较 NE 组无明显变化, NE+LeV1 组和 NE+LeV2 组 T_p 分别为 (0.212 ± 0.044 , 0.205 ± 0.062), T_m 分别为 (0.735 ± 0.269 , 0.753 ± 0.152) 均较 NE 组缩短 ($P < 0.01$); ③ NE+LeV1 与 NE+LeV2 两组相比, 钙瞬变峰值和谷值、钙瞬变幅度、 T_p 和 T_m 差别无统计学意义。结论: 心肌细胞衰竭过程中钙瞬变减弱变慢、同步性较差; LeV 通过增加钙瞬变速度、改善钙瞬变传导形式, 发挥正性肌力作用。

[关键词] 左西孟旦; 去甲肾上腺素; 乳鼠心肌细胞; 钙瞬变信号

[中图分类号] R542.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)02-166-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20160208

Effects of levosimendan on calcium transient in norepinephrine-cultured neonatal rat ventricular myocytes

Yang Yuqing, Lu Xinzheng*, Cao Jiali, Zou Huaiyang, Zhu Lihong, Zhang Hui, Sun Huiwen, Chen Minlong, Kong Xiangqing

(Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital, NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the alterations of the calcium transient in the development of heart failure, and the impact of levosimendan (LeV) on intracellular Ca^{2+} dynamics. **Methods:** The neonatal rat ventricular myocytes in culture were divided into 4 groups, normal, NE alone (10 $\mu\text{mol/L}$), NE+LeV1 (0.1 $\mu\text{mol/L}$), and NE+LeV2 (1 $\mu\text{mol/L}$). Calcium transients of myocytes loaded by Fluo-3/AM were observed under Laser scanning confocal microscope. **Results:** (1) Compared with the control, calcium wave dispersed, conducted slowly, and exhibited dyssynchrony of Ca^{2+} release in NE group, NE accelerated the cultured cell beating rate (26.7 ± 4.3 vs. 11.6 ± 3.6 , $P < 0.01$), decreased peak systolic Ca^{2+} (128.37 ± 65.44 vs. 155.33 ± 61.77 , $P < 0.05$), shortened time to peak (T_p ; 0.413 ± 0.324 vs. 0.212 ± 0.050 , $P < 0.01$) and decay time (T_m ; 1.162 ± 0.524 vs. 0.722 ± 0.169 , $P < 0.01$) of calcium transient, except Ca^{2+} transient amplitude and resting Ca^{2+} . (2) NE in the presence of LeV increased synchrony of calcium transient, reduced T_p (0.212 ± 0.044 vs. 0.413 ± 0.324 , NE+LeV1 vs. NE, $P < 0.01$ and 0.205 ± 0.062 vs. 0.413 ± 0.324 , NE+LeV2 vs. NE, $P < 0.01$ respectively) and T_m (0.735 ± 0.269 vs. 1.162 ± 0.524 , NE+LeV1 vs. NE, $P < 0.01$; and 0.753 ± 0.152 vs. 1.162 ± 0.524 , NE+LeV2 vs. NE, $P < 0.01$), had no effect on cell beating rate, peak systolic or resting Ca^{2+} , and transient amplitude. (3) There were no concentration difference in the presence of Levosimendan. **Conclusion:** Our results show that calcium transient gets weaker and slower, exhibiting dyssynchrony of Ca^{2+} release in failing rat ventricular myocyte. Levosimendan exerts positive inotropic effect through accelerating the velocity of calcium signaling propagation and synchronizing the calcium release.

[基金项目] 江苏省“六大人才高峰”项目(No2015-WSN-004)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: xzlu@njmu.edu.cn

[Key words] levosimendan; norepinephrine; the neonatal rat ventricular myocyte; calcium transient

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(02): 166-170]

心肌发生收缩的分子基础是钙触发钙释放,在荧光显微镜下该过程表现为钙瞬变。心肌细胞钙瞬变是指动作电位或其他原因引起的心肌细胞内游离 Ca^{2+} 浓度迅速波动现象,包括钙火花、钙波、钙震荡等。钙瞬变信号与心肌细胞收缩、传导相关,并参与心肌肥厚、心力衰竭、心律失常等发生发展^[1]。传统的正性肌力药物如磷酸二酯酶(PDE)抑制剂,增加 cAMP 浓度,开放电压依赖性 L-型钙通道,胞外钙内流增加^[2],触发内质网钙释放,增加细胞内 Ca^{2+} 浓度,增强心肌收缩力的同时易引起钙超载、心律失常等,从而限制临床应用。以往研究表明,左西孟旦(levosimendan, LeV)作为一种新型正性肌力药物,不直接影响心肌细胞内 Ca^{2+} 浓度^[3],而是与肌钙蛋白 C(cTnC)的氨基末端结合,增加 cTnC 与 Ca^{2+} 复合物的构象稳定性,cTnC 与 Ca^{2+} 结合后,原肌球蛋白的分子构象发生改变,解除它对肌动蛋白和肌球蛋白相互结合的阻碍作用^[4],心肌纤维收缩。LeV 与 cTnC 结合具有 Ca^{2+} 浓度依赖性^[5],收缩期细胞内 Ca^{2+} 浓度升高,与肌钙蛋白的亲合力增高,其作用增加,心肌收缩增强;舒张期 Ca^{2+} 浓度降低,亲合力下降,不损伤舒张功能^[6],甚至有实验发现其可改善舒张功能^[7]。 Ca^{2+} 与肌钙蛋白的结合力增加,并非直接影响离子跨膜运动,故难以检测到电生理变化,但可能改变钙瞬变的幅度和速度,进而影响离子跨膜运动^[8]。本实验使用去甲肾上腺素(NE)培养乳鼠心肌细胞,模拟心力衰竭发生发展环境,观察心肌衰竭过程中钙瞬变信号变化及 LeV 对其影响。

1 材料和方法

1.1 材料

磷酸缓冲液(PBS)、DMEM 培养基、胎牛血清(FBS)、胰蛋白酶(Gibico 公司,美国),Lev 分析纯、NE 分析纯(Sigma 公司,美国),Fluo-3/AM(Beyotime 公司),3 cm 激光共聚焦玻底皿(NEST 公司,北京),激光共聚焦显微镜(Carl Zeiss 公司,德国)、LSM 510 软件,1~3 d SD 大鼠(SPF 级)[江苏省实验动物中心提供,动物合格证号:SCXK(苏)2013-0005],雌雄不限。对动物的处理均符合伦理学要求。

1.2 方法

1.2.1 乳大鼠心肌细胞原代培养

在无菌条件下,乙醇消毒乳鼠 3~5 min,开胸取出心脏,分离心房及大血管组织,剪取心尖部组织,用预冷 PBS 漂洗 3 次后,剪成约 0.5 mm³ 小块,放入 25 mL 锥形瓶中,预冷 PBS 洗 3 遍去上清,加入体积分数为 0.1% 胰蛋白酶消化液 5 mL,磁力搅拌器(35~37℃)消化 5 min 后取下吹打混匀后静置,吸弃上清,再加入 0.1% 胰蛋白酶消化液 5 mL,将含细胞悬液的消化液移入小牛血清终止消化,同样条件消化至完全(90~120 min),以 1 000 r/min 离心 8~10 min,吸弃上清液,加入体积分数为 10% 小牛血清 DMEM 完全培养基,重悬沉淀细胞,置入 5% CO₂ 培养箱,37℃ 静置培养 90 min,以差速贴壁法纯化心肌细胞。将细胞密度调至 5×10⁵ 个/mL,接种于 3 cm 玻底皿中,并加用 0.1 mmol/L Brdu 抑制成纤维细胞增长,送入 5% CO₂ 孵育箱中培养。24 h 后更换培养液,以后每 2~3 d 换液 1 次,随机分为 4 组,分别加入含 NE、LeV 完全培养基,诱导 48 h 后备检。

1.2.2 Fluo-3/AM 负载培养心肌细胞

将 Fluo-3/AM 用预冷 PBS 液配制成 1 mmol/L 用于实验。玻底皿中的培养基,用预冷 PBS 清洗 3 次,加入 Fluo-3/AM 终浓度为 1 mmol/L,5% CO₂ 孵育箱中分别温孵 30 min,用无血清 DMEM 培养液洗涤 3 次,加完全培养基继续孵育 30 min,上机检测。

1.2.3 培养心肌细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 瞬间变化测定

Fluo-3/AM 在胞内被酯酶水解成 Fluo-3,以 488 nm 氩离子激光激发,可在 525 nm 处探测到荧光发射,Fluo-3 在结合 Ca^{2+} 后荧光强度增加,荧光强度变化指示心肌细胞内游离 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 相对变化。使用 Zeiss LSM-510 激光共聚焦显微镜,在 20 倍物镜下每孔选 8~10 个视野,取 10 个细胞在 63 倍油镜下进行框架扫描(frame scanning),速度 80~120 ms/张,取相同面积使用 Aim Image Browser 软件计算其荧光强度(图 1),并取其均值,以平均荧光强度反映心肌细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 相对水平,将数据输入 Microsoft Excel 中作进一步分析处理。钙瞬变峰值(peak or systolic Ca^{2+})是指收缩状态荧光强度(intensity)平均峰值;钙瞬变达峰时间(T_p)指钙瞬变开始到达峰所经历时间;钙瞬变衰减时间(T_m)指钙瞬变从峰值到达静息状态所经历时间;钙瞬变幅度(amplitude)是钙瞬变峰值与静息期荧光强度之差;静息期荧光强度(resting

Ca²⁺), 即钙瞬变谷值是指乳鼠心肌细胞静息状态下的平均荧光值。同时记录乳鼠心肌细胞的搏动频率, 63 倍共聚焦显微镜下钙瞬变的活动形式。

1.3 统计学方法

数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 SPSS10.0 统计软件, 方差齐进行 ANOVA 分析, 方差不齐行 Kruskal-Wallis *H* 检验, 秩变换后行 LSD 进行两两比较, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NE 对乳鼠心肌细胞钙瞬变的影响

对照组乳鼠心肌细胞钙瞬变峰值为 (155.33 ± 61.77)、谷值 (79.92 ± 38.05)、钙瞬变幅度 (75.41 ± 36.52)、 T_p (0.212 ± 0.050)、 T_{am} (0.722 ± 0.169)。NE 组钙瞬变峰值为 (128.37 ± 65.44) 较对照组降低 ($P < 0.05$); T_p (0.413 ± 0.324)、 T_{am} (1.162 ± 0.524), 均较对照组延长 ($P < 0.01$); 钙瞬变的谷值 (67.57 ± 42.59)、钙瞬变幅度 (60.80 ± 39.88) 与对照组相比, 差别无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 2)。

2.2 Lev 对 NE 处理后的乳鼠心肌细胞钙瞬变的影响

NE+LeV1 组 T_p (0.212 ± 0.044)、 T_{am} (0.735 ± 0.269), 均较 NE 组缩短 ($P < 0.01$); 钙瞬变峰值 (132.08 ± 50.34)、钙瞬变幅度 (48.82 ± 29.33) 及谷值 (83.26 ± 46.59) 与 NE 组相比, 差别无统计学意义 ($P > 0.05$)。NE+LeV2 组 T_p (0.205 ± 0.062)、 T_{am} (0.753 ± 0.152), 均较 NE 组缩短 ($P < 0.01$), 钙瞬变峰值 (112.44 ± 38.54)、谷值 (55.27 ± 21.36)、钙瞬变幅度 (57.17 ± 33.20), 与 NE 组相比, 差别无统计学意义 ($P > 0.05$)。NE+LeV1 与 NE+LeV2 相比, 钙瞬变峰值和谷值、钙瞬变幅度、 T_p 和 T_{am} , 差别无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 2)。

2.3 对心肌细胞搏动频率的影响

NE 组搏动频率为 (26.7 ± 4.3) 与对照组 (11.6 ± 3.6) 相比, 差异具有显著统计学意义 ($P < 0.01$); NE+LeV1、NE+LeV2 与 NE 组相比, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.4 对钙瞬变活动形式的影响

共聚焦显微镜下可见心肌细胞钙瞬变信号不同步, 对照组、NE+LeV1、NE+LeV2 均呈波浪样铺开, 质地均匀; 而 NE 组则散在分布 (图 3)。

3 讨论

研究发现钙瞬变是心肌细胞收缩、舒张的分

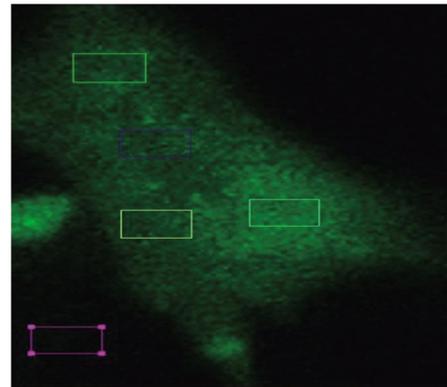
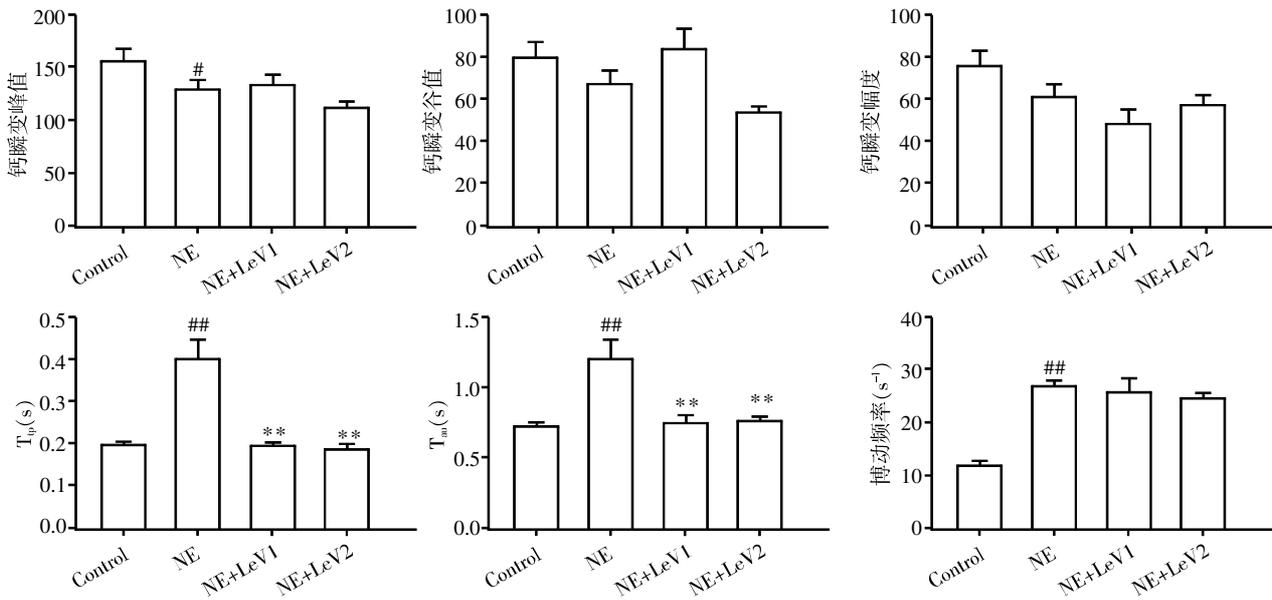


图 1 每个细胞取相同面积计算荧光值, 而后取平均值
Figure 1 Fluorescence intensity of the calcium transient of neonatal rat myocytes stained with Fluo-3/AM in a spontaneous contraction period. The average fluorescence values of the same size area were collected for analysis

子基础, 其升高的幅度、速度以及衰减速度直接影响心肌细胞收缩程度、速度以及舒张速度^[9]。NE 是心衰发生发展过程中主要升高的儿茶酚胺类激素^[10], 本研究使用 NE 培养乳鼠心肌细胞, 模拟心衰发生发展过程中高儿茶酚胺类激素的微环境^[11]。动物实验发现 NE 可激活乳鼠心肌细胞 α 受体, 引起心肌细胞肥大^[12], 造成钙瞬变峰值、谷值、幅度下降, T_p 、 T_{am} 延长^[13]。本研究中亦见 NE 组钙瞬变峰值下降、 T_p 和 T_{am} 延长。而钙瞬变幅度、谷值变化不明显, 可能与心肌细胞搏动频率增快、频率依赖性 Ca²⁺ 浓度增高有关。在动物心衰模型中, 心肌肥厚逐渐向心衰进展, 钙瞬变由增强向衰减不断变化, 但钙瞬变谷值在终末期心衰前是不变的^[14]。另外, 实验动物种属、年龄^[15]也是导致实验结果不同的原因。

心力衰竭不仅与钙瞬变幅度、速度有关, 也与钙瞬变同步性有关^[16]。钙释放的不同步使得心肌收缩不同步, 降低心肌收缩力^[17]。共聚焦显微镜下可见 NE 组钙波活动杂乱无章, 钙瞬变时空上的不均一性使得钙瞬变速度减慢、幅度降低。研究发现钙瞬变非同步性与 T 管丢失或异常^[18]、RyRs 发育不成熟、动作电位形态改变^[19]等有关。因为实验条件限制, 本文暂未做相关研究。

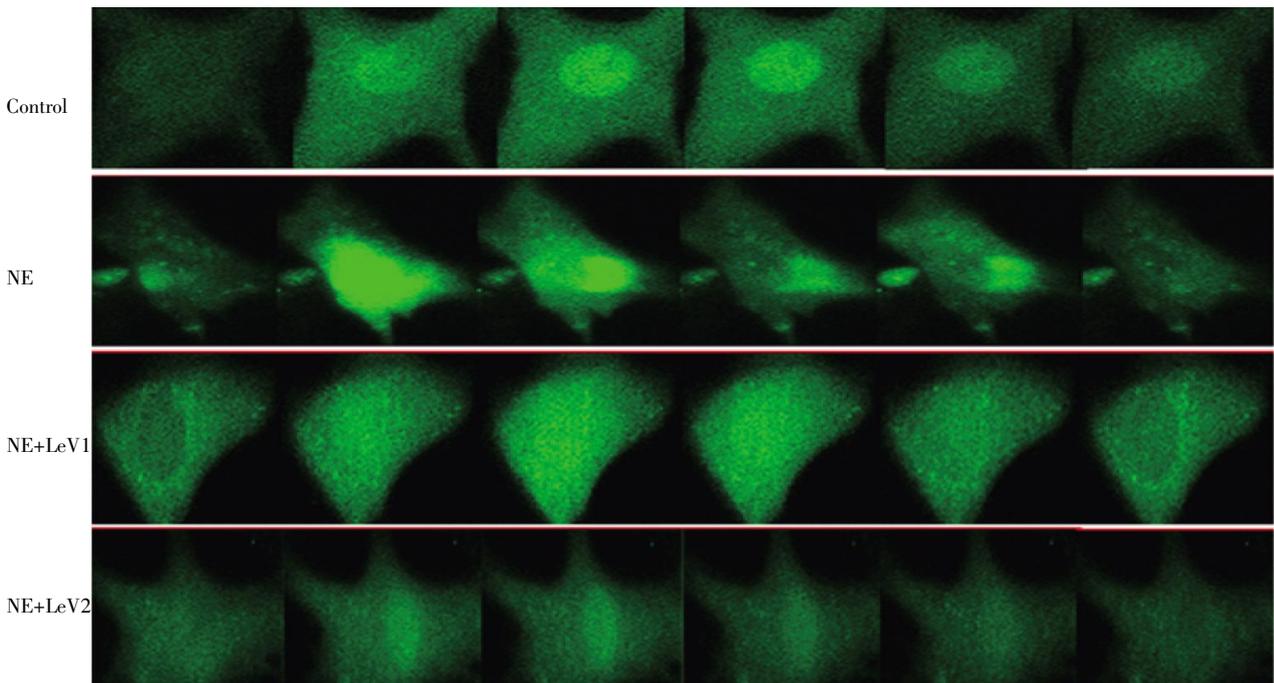
本研究发现 Lev 处理后钙波活动形式较 NE 组均匀一致, T_p 、 T_{am} 缩短。Lev 与 cTnC 结合具有 Ca²⁺ 浓度依赖性^[5], 收缩期细胞内 Ca²⁺ 浓度升高, 与肌钙蛋白的亲合力增高, 其作用增加, 心肌收缩增强、速度加快, T_p 缩短; 舒张期 Ca²⁺ 浓度降低, 亲合力下降,



与对照组相比,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;与 NE 组相比,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$;Control:对照组;NE:去甲肾上腺素;LeV1: 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 左西孟旦;LeV2: 1 $\mu\text{mol/L}$ 左西孟旦。

图 2 各处理组钙瞬变与搏动频率的变化

Figure 2 Characteristics of the calcium transient and beating rate



Control:对照组;NE:去甲肾上腺素;LeV1: 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 左西孟旦;LeV2: 1 $\mu\text{mol/L}$ 左西孟旦。

图 3 钙瞬变的表现形式

Figure 3 Manifestations of calcium transient

心肌舒张加快, T_{m} 缩短,因此不损伤心肌舒张功能^[6],甚至有实验发现其可改善舒张功能^[7]。本研究未见钙瞬变峰值、幅度、谷值发生明显变化,这可能与不影响胞内 Ca^{2+} 浓度有关^[3]。

众多实验表明当 Lev 浓度 $\geq 1 \mu\text{mol/L}$ 时,可轻度抑制 PDE 酶,增加细胞内 Ca^{2+} 浓度,但是本研

究发现 Lev 1 $\mu\text{mol/L}$ 、0.1 $\mu\text{mol/L}$ 浓度之间,钙瞬变变化不大,可能与实验动物 PDE 酶的亚型不同有关^[20]。

综上所述,本研究结果表明,心肌细胞衰竭过程中,心肌收缩力下降与钙瞬变减弱变慢、传导异常有关;Lev 可增加钙瞬变速度,改善钙瞬变传导形

式,发挥正性肌力作用,但具体对 Ca^{2+} 活动的影响,仍需进一步研究。

[参考文献]

- [1] 杨晓慧, 卢新政. 心肌细胞钙瞬变信号的研究进展[J]. 国际心血管病杂志, 2009, 36(4): 215-224
- [2] Antoniadis C, Tousoulis D, Koumallos N, et al. Levosimendan; beyond its simple inotropic effect in heart failure[J]. *Pharmacol Ther*, 2007, 114(2): 184-197
- [3] Moreno N, Tavares-Silva M, Lourenco AP, et al. Levosimendan: The current situation and new prospects[J]. *Rev Port Cardiol*, 2014, 33(12): 795-800
- [4] Sorsa Tia, Pollesello Piero, Rosevear Paul, et al. Stereoselective binding of levosimendan to cardiac troponin C causes Ca^{2+} sensitization[J]. *Eur J Pharmacol*, 2004, 486(1): 1-8
- [5] Husebye T, Eritsland J, Muller C, et al. Levosimendan in acute heart failure following primary percutaneous coronary intervention-treated acute ST-elevation myocardial infarction. Results from the LEAF trial: a randomized, placebo-controlled study[J]. *Eur J Heart Fail*, 2013, 15(5): 565-572
- [6] Givertz MM, Andreou C, Conrad CH, et al. Direct myocardial effects of levosimendan in humans with left ventricular dysfunction: alteration of force-frequency and relaxation-frequency relationships[J]. *Circulation*, 2007, 115(10): 1218-1224
- [7] Nieminen MS, Altenberger J, Ben-Gal T, et al. Repetitive use of levosimendan for treatment of chronic advanced heart failure: clinical evidence, practical considerations, and perspectives: an expert panel consensus [J]. *Int J Cardiol*, 2014, 174(2): 360-367
- [8] Mann DL, Kent RL, Parsons B, et al. Adrenergic effects on the biology of the adult mammalian cardiocyte[J]. *Circulation*, 1992, 85(2): 790-804
- [9] Mork HK, Sjaastad I, Sejersted OM, et al. Slowing of cardiomyocyte Ca^{2+} release and contraction during heart failure progression in postinfarction mice[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009, 296(4): H1069-H1079
- [10] Thandapilly Sijo J, Louis Xavier L, Yang Tonghua, et al. Resveratrol prevents norepinephrine induced hypertrophy in adult rat cardiomyocytes, by activating NO-AMPK pathway[J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 668(1-2): 217-224
- [11] Tavares M, Rezlan E, Vostroknoutova I, et al. New pharmacologic therapies for acute heart failure[J]. *Crit Care Med*, 2008, 36(1 Suppl): S112-S120
- [12] Lee CS, Tkacs NC. Current concepts of neurohormonal activation in heart failure: mediators and mechanisms[J]. *AACN Adv Crit Care*, 2008, 19(4): 364-385; quiz 386-387
- [13] Satoh N, Suter TM, Liao R, et al. Chronic alpha-adrenergic receptor stimulation modulates the contractile phenotype of cardiac myocytes *in vitro*[J]. *Circulation*, 2000, 102(18): 2249-2254
- [14] Zaugg CE, Buser PT. When calcium turns arrhythmogenic: intracellular calcium handling during the development of hypertrophy and heart failure[J]. *Croat Med J*, 2001, 42(1): 24-32
- [15] Fares E, Howlett SE. Effect of age on cardiac excitation-contraction coupling[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2010, 37(1): 1-7
- [16] Louch WE, Hake J, Jolle GF, et al. Control of Ca^{2+} release by action potential configuration in normal and failing murine cardiomyocytes [J]. *Bio phys J*, 2010, 99(5): 1377-1386
- [17] Goldhaber JL, Bridge JH. Loss of intracellular and intercellular synchrony of calcium release in systolic heart failure[J]. *Circ Heart Fail*, 2009, 2(3): 157-159
- [18] Louch WE, Mork HK, Sexton J, et al. T-tubule disorganization and reduced synchrony of Ca^{2+} release in murine cardiomyocytes following myocardial infarction [J]. *J Physiol*, 2006, 574(Pt 2): 519-533
- [19] Sah R, Ramirez RJ, Backx PH. Modulation of Ca^{2+} release in cardiac myocytes by changes in repolarization rate: role of phase-1 action potential repolarization in excitation-contraction coupling[J]. *Circ Res*, 2002, 90(2): 165-173
- [20] Pathak A, Lebrin M, Vaccaro A, et al. Pharmacology of levosimendan: inotropic, vasodilatory and cardioprotective effects[J]. *J Clin Pharm Ther*, 2013, 38(5): 341-349

[收稿日期] 2015-07-03