

[文章编号] 1000-4718(2008)07-1254-05

甘氨酸脂质体对心肌细胞线粒体膜电位及凋亡的影响*

陈梦飞[#], 陆大祥[△], 戚仁斌, 王华东, 王彦平, 张俊艳, 李楚杰
(暨南大学医学院病理生理教研室, 广东, 广州 510632)

[摘要] 目的: 观察甘氨酸脂质体对缺氧/复氧损伤心肌细胞线粒体膜电位及凋亡的影响。方法: 建立培养乳鼠心肌细胞缺氧/复氧(H/R)损伤模型,以 DiOC₆(3)为荧光分子探针检测实验各组心肌细胞线粒体膜电位;以 Annexin V 联合 PI 染色法检测实验各组心肌细胞凋亡率。结果: (1)H/R 处理组心肌细胞线粒体膜电位明显低于对照组($P < 0.01$),甘氨酸脂质体处理组心肌细胞线粒体膜电位降低最少,弱荧光部分细胞百分率为(9.61 ± 0.76)%。与甘氨酸组比较有显著差异($P < 0.01$)。(2)H/R 处理组心肌细胞凋亡率为(20.78 ± 1.58)%,明显高于对照组($P < 0.01$)。甘氨酸脂质体处理组心肌细胞凋亡发生率低于甘氨酸组($P < 0.01$)。空白脂质体组细胞凋亡发生率与 H/R 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论: 甘氨酸脂质体能抑制培养心肌细胞缺氧/复氧损伤诱导的心肌细胞线粒体膜电位下降和心肌细胞凋亡,脂质体携带甘氨酸能更好发挥其细胞保护作用。

[关键词] 甘氨酸; 脂质体; 心肌细胞; 心肌再灌注损伤; 细胞凋亡; 线粒体膜电位

[中图分类号] R363 **[文献标识码]** A

Effect of glycine liposomes on mitochondrial membrane potential and apoptosis in cultured cardiomyocytes

CHEN Meng-fei, LU Da-xiang, QI Ren-bin, WANG Hua-dong, WANG Yan-ping, ZHANG Jun-yan, LI Chu-jie

(Department of Pathophysiology, Medical College of Jinan University, Guangzhou 510632, China. E-mail: ldx@jnu.edu.cn)

[ABSTRACT] **AIM:** To observe the effect of glycine liposomes on the mitochondrial membrane potential and the apoptosis rate in cardiomyocytes induced by hypoxia/reoxygenation injury. **METHODS:** A cardiomyocyte injury model was established by using hypoxia/reoxygenation. DiOC₆(3) as fluorescence molecular probe was used to detect the mitochondrial membrane potential in each group. The method of Annexin V associated with PI was used to detect the apoptosis ratio in each group. **RESULTS:** (1) The result of flow cytometry showed that the mitochondrial membrane potential of cardiomyocytes in H/R group was obviously lower than that in control group ($P < 0.01$). The decrease in mitochondrial membrane potential in Gly-liposome group was the lowest, the percentage of cells about the part of hypofluorescence was (9.61 ± 0.76)%, which was lower than that in glycine group ($P < 0.01$). (2) The apoptosis rate of cardiomyocytes in H/R group was higher than that in control group (20.78 ± 1.58)%, $P < 0.01$. After the treatment of Gly-liposome, the apoptosis rate of cardiomyocytes was lower than that in glycine group ($P < 0.01$). No difference in the apoptosis ratios between blank-liposome group and H/R group was observed ($P > 0.05$). **CONCLUSION:** Glycine liposomes protect cultured cardiomyocytes against hypoxia/reoxygenation injury. Glycine liposomes produce the better protective effects than glycine.

[KEY WORDS] Glycine; Liposomes; Cardiomyocytes; Myocardial reperfusion injury; Apoptosis; Mitochondrial membrane potential

脂质体(liposome)是磷脂分散在水中形成的双分子层闭合囊泡,其结构类似生物膜。近年来,人们应用脂质体作为药物载体控制药物释放,提高药物靶向性以减少药物毒性,提高药物疗效。脂质体作

[收稿日期] 2007-03-09 [修回日期] 2007-11-19

* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30470718);广东省自然科学基金资助项目(No. 04105844);广州市科技局重点资助项目(No. 2004Z3-E4081)

△ 通讯作者 Tel: 020-85220253; E-mail: ldx@jnu.edu.cn

现在中山大学干细胞与组织工程中心攻读博士

为心血管药物载体已引起研究者的重视,文献报道载药脂质体可以靶向分布到缺血的心肌组织及缺血的心肌细胞中,从而提高心血管药物的疗效^[1-3]。本研究以脂质体为载体,利用脂质体与细胞膜的相互作用并携带药物进入细胞内,观察甘氨酸脂质体对缺氧/复氧损伤心肌细胞线粒体膜电位及凋亡的影响。

材 料 和 方 法

1 仪器

CO₂ 培养箱(Thermo Forma);XSZ-D型倒置生物显微镜(重庆光学仪器厂);DL-8R冷冻离心机(上海市离心机机械研究所);Beckman Coulter流式细胞仪(Beckman)。

2 药品和试剂 甘氨酸脂质体与空白脂质体(暨南大学病理生理实验室合成);胎牛血清(中国医学科学院血液学研究所);胰蛋白酶(Hyclone);5-溴-2-脱氧尿嘧啶核苷(5-bromo-2-deoxyuridine, BrdU; Sigma);Annexin V-FITC凋亡检测试剂盒(北京宝赛生物技术有限公司);3,3-碘化二己基羰花青[DIOC₆(3), Sigma];出生1-3 d SD乳鼠(广东省医学实验动物中心)。

3 方法

3.1 甘氨酸脂质体的释放曲线 4℃保存甘氨酸脂质体,每隔一段时间按文献方法测定包封率^[4],检测甘氨酸脂质体包封率的稳定性。

3.2 心肌细胞缺氧/复氧模型的建立^[5] 取新生SD大鼠20只,剪取心室肌组织制备心肌细胞悬液,100目筛网过滤,将心肌细胞悬液接种于25 mL培养瓶中,差速贴壁法纯化心肌细胞,加入终浓度为0.1 mmol/L的5-BrdU,调整细胞浓度为1×10¹⁰ cells/L接种于培养瓶,放入CO₂培养箱。培养至第3 d,当心肌细胞成片搏动时开始实验。用缺氧液(99% N₂饱和的D-Hanks液)置换正常培养液,并于培养瓶内充入高纯N₂,密闭培养3 h,造成心肌细胞低氧;开放培养瓶,换以复氧液(99% O₂饱和的Hanks液),充以纯氧培养3 h,建立缺氧/复氧损伤模型。

3.3 实验分组 随机分为5组,正常培养组(control):用无血清DMEM培养;缺氧/复氧组(H/R):缺氧培养3 h,复氧培养3 h;缺氧/复氧+甘氨酸组(H/R+Gly):缺氧液和复氧液中均加入终浓度为2.0 mmol/L的甘氨酸;缺氧/复氧+甘氨酸脂质体组(H/R+Gly-lip):缺氧液和复氧液中均加入甘氨酸脂质体(甘氨酸终浓度为2.0 mmol/L);缺氧/复氧+空白脂质体组(H/R+blank-lip):缺氧液和复氧液中均加入空白脂质体。

3.4 心肌细胞线粒体膜电位检测 DIOC₆(3)是一

种亲脂性阳离子荧光染料,可借助线粒体负膜电位结合到线粒体基质,其荧光的增强或减弱说明线粒体内膜电负性的增高或降低。心肌细胞用0.1%胰酶消化,离心收集细胞,加入1 mL冷的PBS,轻轻振荡洗涤3-4次,PBS悬浮细胞,加入终浓度为20 nmol/L的DIOC₆(3),37℃避光孵育15 min,流式细胞仪测定Δψ_m。

3.5 心肌细胞凋亡率检测 膜联蛋白V(Annexin V,或称磷脂结合蛋白V)是一种分子量为35-36kD的Ca²⁺依赖性的磷脂结合蛋白,它与PS具有高度的结合力,能与细胞凋亡过程中翻转到膜外的磷脂酰丝氨酸高亲和力特异性结合。以标记了FITC的Annexin V作为荧光探针,联合PI检测法可将细胞分为正常细胞、凋亡细胞及坏死细胞^[6]。

心肌细胞用0.1%胰酶消化,加入冷的PBS洗涤细胞。1 000 r/min,4℃离心10 min,弃上清;加入1 mL冷的PBS,轻轻振荡使细胞悬浮;重复上述步骤2次;调整待测细胞的浓度为5×10⁵-1×10⁹ cells/L;将细胞重悬于200 μL Binding Buffer;加入10 μL Annexin V-FITC和5 μL PI,轻轻混匀,避光室温反应15 min或4℃反应30 min。加入300 μL Binding Buffer,在1 h内上机检测。

4 统计学处理

数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用SPSS 10.0统计软件对数据进行分析,多组间比较采用单因素方差分析,2组比较采用独立样本t检验。

结 果

1 甘氨酸脂质体的释放曲线

甘氨酸脂质体4℃条件下保存时,脂质体在较短时间逐步释放包封的甘氨酸,在30d后包封率下降30%左右,见图1。表明甘氨酸脂质体存在一定程度的渗漏,同时也说明制备的甘氨酸脂质体具有一定缓释作用。

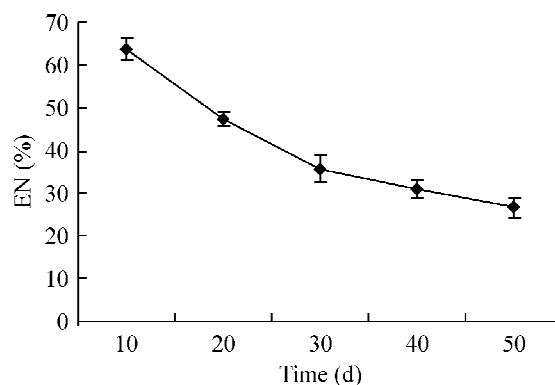


Fig 1 The stability of encapsulation efficacy (EN) of glycine liposomes at 4°C.

图1 甘氨酸脂质体包封率的稳定性

2 心肌细胞形态学观察

经缺氧/复氧损伤处理后,在显微镜下观察实验各组形态学改变。与对照组比较,各损伤组在形态学、活细胞数方面没有明显异常,但各损伤组心肌细胞跳动次数比对照组明显减少。

3 甘氨酸脂质体对缺氧/复氧损伤心肌细胞线粒体膜电位的影响

实验结果显示 H/R 处理组心肌细胞线粒体膜电位明显低于对照组($P < 0.01$),表现为弱荧光部分

(M1 部分)细胞百分率增高(19.92 ± 1.70)%。甘氨酸组弱荧光部分细胞百分率比 H/R 组减少,为(14.96 ± 1.22)%,表明线粒体膜电位比 H/R 组降低程度小($P < 0.01$)。甘氨酸脂质体处理组心肌细胞线粒体膜电位降低最少,弱荧光部分细胞百分率为(9.61 ± 0.76)%。与甘氨酸组比较差异显著($P < 0.01$)。而空白脂质体处理组弱荧光部分细胞百分率与 H/R 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1、图 3。

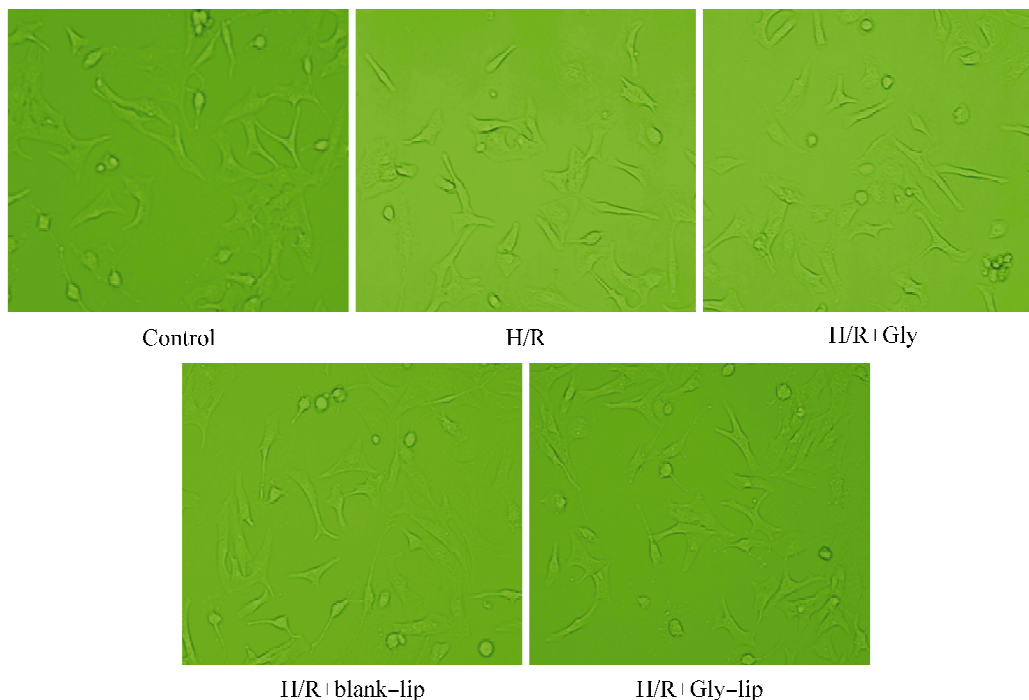


Fig 2 The cardiomyocytes morphology ($\times 200$). Comparing with control group, no difference was detected on morphology and viable count in each impaired group, but the cardiomyocyte beat ratio was decreased obviously.

图 2 心肌细胞形态学观察

表 1 甘氨酸脂质体对缺氧/复氧损伤心肌细胞线粒体膜电位的影响

Tab 1 Effect of glycine liposomes on mitochondrial membrane potential of cultured cardiomyocytes injured by hypoxia/reoxygenation ($\% \bar{x} \pm s, n = 3$)

Group	Rate of hypofluorescence cell (%)
Control	6.96 ± 0.54
H/R	$19.92 \pm 1.70^*$
H/R + Gly	$14.96 \pm 1.22^{**}$
H/R + blank - lip	18.51 ± 1.26
H/R + Gly - lip	$9.61 \pm 0.76^\Delta$

* $P < 0.01$ vs control; ** $P < 0.05$ vs H/R; $^\Delta P < 0.01$ vs H/R + Gly.

4 甘氨酸脂质体对缺氧/复氧诱导心肌细胞凋亡的影响

Annexin V 联合 PI 染色后,用流式细胞仪检测各组心肌细胞凋亡率,在流式细胞术双参数散点图右下象限显示凋亡细胞(Annexin V⁺/PI⁻),见表 2、图 4。对照组心肌细胞未经缺氧/复氧处理,凋亡发

生率低,为(2.52 ± 0.39)%。H/R 处理组心肌细胞凋亡率明显高于对照组($P < 0.01$)。甘氨酸组细胞凋亡率比 H/R 组低(15.33 ± 1.05)%, $P < 0.01$ 。甘氨酸脂质体处理组心肌细胞凋亡发生率为(9.15 ± 0.89)%,与甘氨酸组比较有显著差异($P < 0.01$)。空白脂质体组细胞凋亡发生率与 H/R 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 2 甘氨酸脂质体对缺氧/复氧诱导心肌细胞凋亡的影响

Tab 2 Effect of glycine liposomes on apoptosis of cardiomyocytes injured by hypoxia/reoxygenation ($\% \bar{x} \pm s, n = 3$)

Group	Apoptosis rate (%)
Control	2.52 ± 0.39
H/R	$20.78 \pm 1.58^*$
H/R + Gly	$15.33 \pm 1.05^\Delta$
H/R + blank - lip	19.28 ± 1.33
H/R + Gly - lip	$9.15 \pm 0.89^{\Delta\Delta}$

* $P < 0.01$ vs control; $^\Delta P < 0.01$ vs H/R; $^{\Delta\Delta} P < 0.01$ vs H/R + Gly.

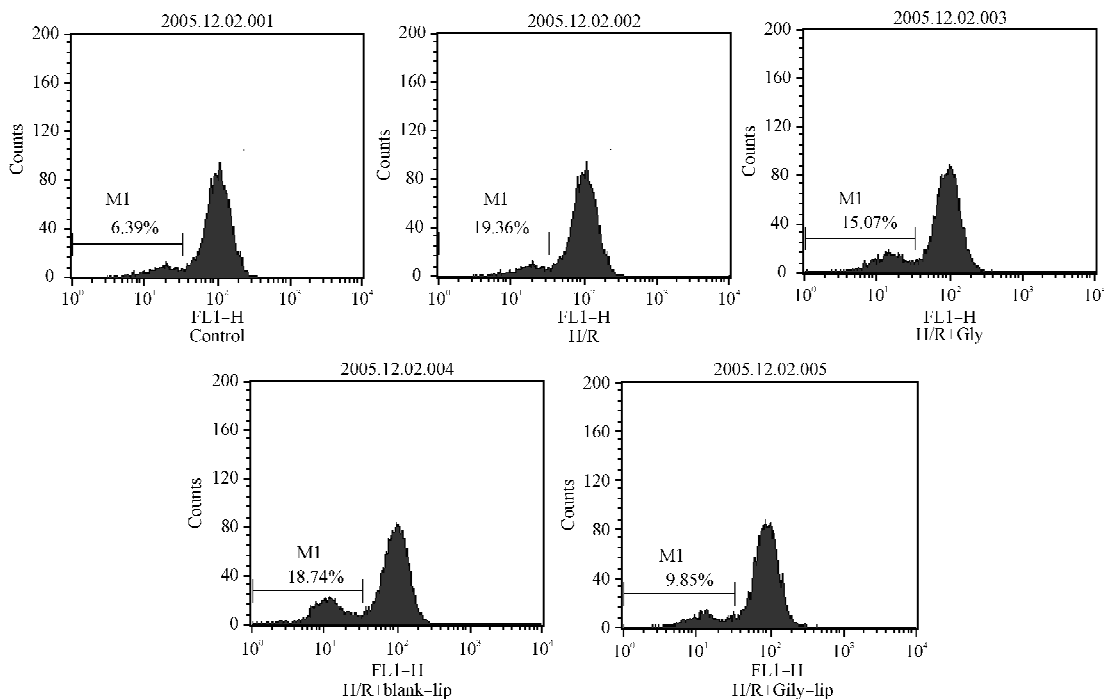


Fig 3 Analysis of the cardiomyocytes mitochondrial transmembrane potential by flow cytometry.

图3 流式细胞仪检测心肌细胞线粒体膜电位

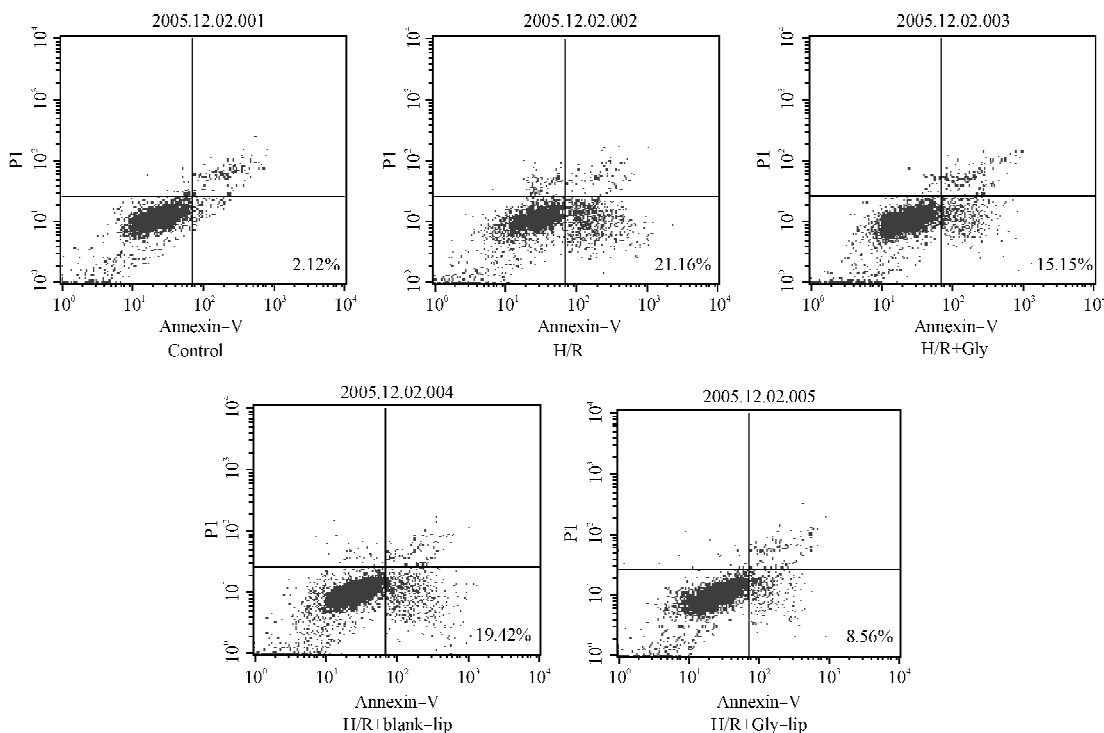


Fig 4 Apoptosis ratio of the cardiomyocytes detected by flow cytometry.

图4 流式细胞仪检测心肌细胞凋亡率

讨 论

甘氨酸是一种结构最简单的氨基酸,越来越多的研究发现,甘氨酸在脑、肝、肾、肠等多种组织器官的缺血再灌注损伤、内毒素及毒物损伤、器官移植排斥反应、休克、肿瘤等病理生理过程中具有抗炎、免

疫调节和细胞保护作用^[7]。陆大祥等^[8]报道甘氨酸对内毒素的致热性有显著拮抗作用,在进一步的研究中发现甘氨酸能对抗内毒素引起的心脏损伤^[9-11]。新近的研究表明,在大鼠心肌细胞存在甘氨酸受体表达,并且甘氨酸受体可能在内毒素和 H/R 引起的心肌损伤过程中起到细胞保护作用^[12]。

线粒体在细胞凋亡中扮演着重要角色,细胞凋亡过程中许多重要事件的发生都与线粒体密切相关,其功能受损是导致缺血-再灌注心肌损伤的重要原因之一^[13]。凋亡机制的深入研究表明,在几乎所有诱导剂引起的各种类型的细胞凋亡均出现 $\Delta\psi_m$ 下降,并且这种改变发生于凋亡细胞的形态学改变之前,提示 $\Delta\psi_m$ 下降为凋亡早期阶段^[14]。Ruiz - Meana等^[15]用分离的心肌细胞线粒体悬液模拟缺血-再灌注时发现:缺氧/复氧所诱导的线粒体肿胀可能与线粒体通透性转换孔(MPTP)改变有关,如在复氧液中加入3 mmol/L Gly则能完全阻止线粒体肿胀。提示Gly的心肌保护作用与抗线粒体损伤有关。

本研究结果显示心肌细胞经H/R处理后,尽管各损伤组在形态学、活细胞数方面没有明显异常,但心肌细胞线粒体膜电位和早期细胞凋亡率已发生不同改变。H/R组心肌细胞线粒体膜电位明显低于对照组($P < 0.01$),甘氨酸处理组线粒体膜电位比H/R组高($P < 0.01$)。表明甘氨酸的细胞保护作用与维持线粒体膜电位,从而保护线粒体正常功能有关。甘氨酸脂质体处理组心肌细胞线粒体膜电位降低最少,与甘氨酸组比较有显著差异($P < 0.01$)。而空白脂质体对缺氧/复氧诱导的心肌细胞线粒体膜电位降低无显著影响。Annexin V联合PI染色后,流式细胞仪检测结果显示H/R处理组心肌细胞凋亡率明显高于对照组($P < 0.01$)。甘氨酸脂质体处理组心肌细胞凋亡发生率为(9.15 ± 0.89)%,与甘氨酸组比较有显著差异($P < 0.01$)。

脂质体携带药物到达靶细胞后通过接触释放、吸附、内吞以及融合等方式与细胞相互作用,使脂质体内药物释放入细胞内或在细胞附近形成高浓度。本实验中甘氨酸脂质体对心肌细胞线粒体膜电位降低和心肌凋亡的抑制作用比同浓度的甘氨酸(2.0 mmol/L)更明显,表明以脂质体为载体可携带甘氨酸进入细胞有利于发挥保护作用,其机制可能与甘氨酸进入细胞内作用于线粒体有关。

本研究结果不仅进一步证实了甘氨酸的心肌细胞保护作用,并且为甘氨酸脂质体成为防治心肌缺血再灌注损伤的新制剂提供了可靠的实验依据。

[致谢:本研究得到暨南大学医学院病理生理实验室(国家中医药管理局三级实验室)多位老师给予的热心帮助,在此表示衷心感谢!]

[参 考 文 献]

[1] Tang CS, Su JY, Li ZP, et al. Possibility of targeting

treatment for ischemic heart disease with liposome (I) [J]. *Sci China B*, 1993, 36 (5): 590 - 598.

[2] Torehilin VP. Drug targeting[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2000, 11 (Suppl 2): S81 - S91.

[3] Smalling RW, Feld S, Ramanna N, et al. Infarct salvage with liposomal prostaglandin E₁ administered by intravenous bolus immediately before reperfusion in a canine infarction reperfusion model [J]. *Circulation*, 1995, 92 (4): 935 - 943.

[4] 杨 彤,周云璠,王 娜,等. 细胞黏附位点 RGD 三肽脂质体的制备及表征[J]. *吉林大学学报(理学版)*, 2003, 41(4): 356 - 360.

[5] 王兴祥,周利龙,丁家望,等. 腺苷对缺氧/复氧心肌细胞的保护作用[J]. *生理学报*, 2004, 55(1): 47 - 52.

[6] Chen GG, Sin FL, Leung BC, et al. Glioblastoma cells deficient in DNA - dependent protein kinase are resistant to cell death[J]. *J Cell Physiol*, 2005, 203 (1): 127 - 132.

[7] Zhong Z, Wheeler MD, Li X, et al. L - Glycine: a novel antiinflammatory, immunomodulatory, and cytoprotective agent[J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2003, 6 (2): 229 - 240.

[8] 陆大祥,李楚杰,付咏梅,等. 甘氨酸对内毒素致热性的拮抗作用研究[J]. *中国病理生理杂志*, 1996, 12 (3): 235 - 238.

[9] 李晓娟,陆大祥,王华东,等. 甘氨酸对缺氧/复氧心肌细胞[Ca²⁺]_i和TNF-α浓度的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2004, 20(4): 571 - 574.

[10] 戚仁斌,陆大祥,王华东,等. 甘氨酸拮抗内毒素性离子心脏损伤的作用研究[J]. *中国药理学通报*, 2005, 21(6): 738 - 741.

[11] Warnecke G, Schulze B, Steinkamp T, et al. Glycine application and right heart function in a porcine heart transplantation model[J]. *Transpl Int*, 2006, 19(3): 218 - 224.

[12] Qi RB, Zhang JY, Lu DX, et al. Glycine receptors contribute to cytoprotection of glycine in myocardial cells[J]. *Chin Med J*, 2007, 120(10): 915 - 921.

[13] 郝 然,姜金丽,张允岭,等. 参麦注射液对缺氧心肌细胞凋亡的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2007, 23 (4): 660 - 663.

[14] 蔡 循,陈国强,陈 竺,等. 线粒体跨膜电位与细胞凋亡[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2001, 28(1): 3 - 6.

[15] Ruiz - Meana M, Pina P, Garcia - Dorado D, et al. Glycine protects cardiomyocytes against lethal reoxygenation injury by inhibiting mitochondrial permeability transition [J]. *J Physiol*, 2004, 558 (Pt 3): 873 - 882.