维普资讯 http://www.cqvip.com

2. 梁英杰,等. 中华病理学杂志 1993;22(6):369
3. Ojaguren I, et al.Hum Pathol,1993;24(9):905
4. Reinartz JJ, et al.Hum Pathol,1994;25(10):1075
5. Pascal RP, et al. Hum Pathol,1986;17(4):370
6. Tol M, et al. Int J Cancer,1989;43(2):220
7. Mukku VR, et al. J Bio Chemistry, 1985;260(17):9820
8. Dileo A, et al.Dis Colon Rectam,1992;35(4):305
9. Mori T, et al.Cancer,1991;68(3):532

(收稿日期 1998－11－18)

Expressions of proliferating cell nuclearantigen, estrogen receptor and epidermal growth factor receptor in tumors of the gallbladder

Guan Xiaoqin, et al
Department of pathology, college of basic medical sciences

The proliferating cell nuclear antigen (PCNA),estrogen receptor (ER) and epidermal growth factor receptor (EGFR) in tumor cells in the gallbladder were assayed by the LSAB immunohistochemical method in 33 patients.20 of 25 patients with carcinoma were PCNA positive (80%), which was not related significantly to histologicaltypes ($P>0.05$). 15 patients with carcinoma were ER positive (60.0%), which was related to the PCNA ($P<0.01$). 7 patients were EGFR positive (28.0%) and most of these were ER negative. 5 of 8 patients with adenomawere PCNA positive with expression of ER or EGFR in 4 cases. The study suggests that the ER and EGFR are able to stimulate the proliferation of the tumor cells of gallbladder.There is some regulation between ER and EGFR .The expressions of PCNA ER and EGFR in some adenomas should be noticed.

KEY WORDS Tumor of the gallbladder; Hyperplasia; Estrogen receptor;Epidermal growth factor receptor

R542.210.2
232-235
4

病毒性心肌炎心肌组织腺苷酸酶活性和钙、钠含量变化

临床学院内科 陈建彬* 饶邦复 常 静

提 要 本文报告病毒性心肌炎小鼠心肌组织腺苷酸酶(ATPase)活性和钙、钠含量变化的实验研究结果。和对照组比较,结果显示:CVB_3感染后第3天、14天及30天,心肌组织Na^+,K^+—ATPase、Ca^{2+}—ATPase活性显著下降($P<0.01$),钙、钠及含水量明显升高($P<0.01$),早于心肌组织形态学改变。提示病毒感染后心肌ATPase活性下降、反常性Ca^{2+}超载可能是造成继发性心肌细胞损伤、心功能不全的重要原因之一。

关键词 病毒性心肌炎; 心肌; 腺苷酸酶; 钙; 钠
中图分类号 R 542.2

众多研究表明,部分扩张型心肌病是病毒性心肌炎(VMC)的继发性病变。扩张型心肌病心肌腺苷酸酶(ATPase)活性下降,胞内Ca^{2+}代谢紊乱,且与心功能障碍呈正相关[1]。因而有必要探讨急性VMC是否也存在心肌ATPase活性下降、离子代谢紊乱。我们通过复制小鼠VMC模型,测定心肌组织ATPase活性和钙、钠含量,旨为VMC发病机理的研究提供一些实验佐证,亦为临床患者的治疗提供参考。

1 材料与方法

* 男,1965－10出生,主治医师

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.1 实验模型和取材

6～8周龄,体重18～20g,雄性Bale/C小鼠40只(本校动物实验中心提供),分为实验组(30只)和对照组(10只)。CVB_3病毒(Nancy株)购于华西医科大学微生物学教研室,$TCID_{50}$为10^7。实验组每只小鼠腹腔接种0.1ml CVB_3病毒悬液,对照组小鼠每只腹腔接种无病毒的MEM Eagle液0.1ml。实验组在接种病毒后第3天、14天及30天分别处死6只、5只及5只(实验过程中死亡14只),对照组在第30天处死,迅速取出心脏,剖开各心腔,去净血液,除去外膜及脂肪称重,置于0.25mol/L蔗糖、0.01mol/L咪唑—HCl(pH 7.4)的冷介质液中充分洗涤。由心尖处取约20mg组织,置冷Dhalla液(经离子交换树脂处理的0.3mol/L蔗糖—0.005mol/L组氨酸,pH7.4)洗涤5min×3次、拈干,称重,液氮保存,供钠、钙含量测定;取适量心肌用10%甲醛固定,供形态学检查;其余部分加入预冷(4℃)的匀浆液(0.25mol/L蔗糖、0.1mol/L PBS、0.0001mol/L,EDTA,PH7.4),冰浴中制成5%组织匀浆,离心(4℃,4000r×10min),上清液—20℃保存,供ATPase活性测定。

1.2 心肌钙、钠含量测定

心肌组织置130℃烘烤12小时,称重,按1:10(重量体积比)加入硝酸及高氯酸混合液(4:1)充分消化,以原子吸收分光光度仪测定。

1.3 ATPase活性测定

试剂盒购于南京建成生物工程研究所。取0.1ml心肌匀浆液,加0.13ml反应液,混匀,37℃水浴10min,加50%三氯醋酸0.05ml中止反应。离心(4000r×10min),取0.1ml上清液,加定磷剂2ml,混匀,45℃水浴20min,蒸馏水调零,660nm处测吸光度OD值。参照文献计算ATPase活性[3]。心肌匀浆液蛋白含量测定采用Bradford法[3]。

1.4 统计方法 t检验。

2 结果

2.1 组织形态学改变

常规包埋,切片,HE染色,光镜下观察。感染第3天,偶见散在分布的肌纤维轻度玻璃样变性;第14天,坏死病变广泛,大量炎性细胞浸润,成纤维细胞增生,坏死灶内及其邻近部位胶原纤维增多,有蓝色钙盐沉着;第30天,炎性细胞浸润减少,成纤维细胞增生活跃,局部胶原进一步增多、增粗,钙盐沉着仍明显。

2.2 ATPase活性变化

实验组感染病毒后第3天、14天及30天心肌组织Na^+,K^+—ATPase、Ca^{2+}—ATPase活性均明显下降,尤以14天最明显(表)。

表 心肌组织ATPase活性变化($\bar{x}\pm s$)

组别	n	ATPase活性($\mu mol \cdot pi \cdot mg^{-1}-1prot \cdot h^{-1}$)	
		Na^+,K^+—ATPase	Ca^{2+}—ATPase
对照组	10	26.13±3.41	6.89±0.79
实验组			
3d	6	20.36±2.25*	4.73±0.22*
14d	5	10.53±2.23*	2.76±0.54*
30d	5	16.33±1.37*	3.87±0.71*

*与对照组比较,$P<0.01$

2.3 心肌组织钠、钙含量变化

实验组感染病毒后第3天、14天、30天心肌组织钠含量分别为4.91mg/g干重±0.82 mg/g干重、8.07 mg/g干重±0.82 mg/g干重和5.54 mg/g干重±0.40mg/g干重,与对照组(3.46 mg/g干重±0.38 mg/g干重)比较均存在显著性差异,$P<0.01$(图1)。

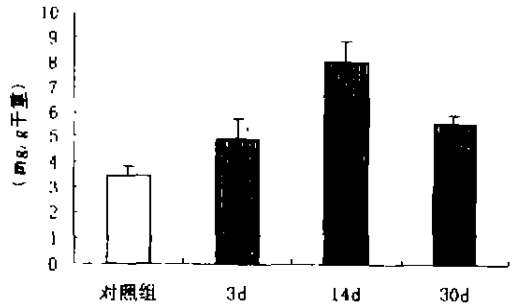


图1 心肌组织钠含量变化

心肌钙含量分别为9.20μg/g干重±0.65μg/g干重、13.10μg/g干重±1.09μg/g干重及10.98μg/g干重±0.85μg/g干重、与对照组(3.92 μg/g干重±0.28μg/g干重)比较亦存在显著性差异,$P<0.01$(图2)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

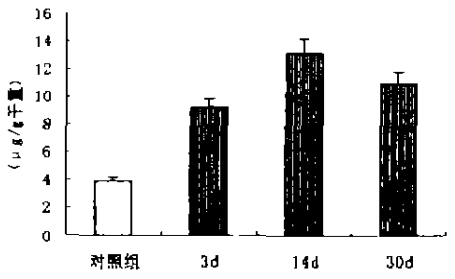


图2 心肌组织钙含量变化

2.4 心肌组织含水率变化

心肌组织含水率(%)=(心肌湿重－心肌干重)÷心肌湿重×100。实验组感染病毒后第3天，14天及30天心肌含水率分别为77.07%±2.33%，83.85%±3.89%及79.60%±2.67%，与对照组(74.26%±2.36%)比较，第3天$P<0.05$，第14天及第30天P均<0.01(图3)。

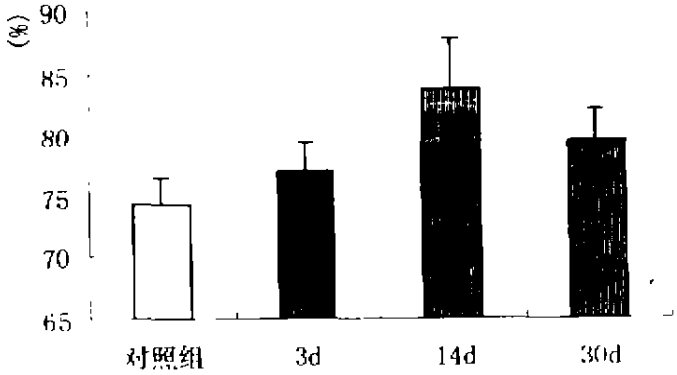


图3 心肌组织含水率变化

3 讨论

本研究结果显示：小鼠VMC在体心脏心肌组织Na^+,K^+—ATPase、Ca^{2+}—ATPase活性下降，心肌钠、钙及含水量增加。虽然我们未直接测定心肌细胞内Na^+，Ca^{2+}含量，但心肌组织经Dhalla液处理后，基本消除了细胞外液离子对测定结果的影响，心肌总钠、总钙含量变化主要反映心肌细胞内Na^+、Ca^{2+}变化趋势[4]。

ATPase主要存在于心肌膜性结构中，对维持细胞内外离子平衡起重要作用，其功能的顺利完成，有赖于本身结构的完整、膜脂微环境的稳定及充足的能量供给。病毒在胞内复制，可直接导致细胞膜、细胞器膜破坏；产生大量氧自由基(OFR)，前者除与膜结构中不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应外，还可直接攻击ATPase蛋白，竞争ATPase上ATP结合位点[6]；ATPase抗原性改变[6]；线粒体结构破坏、功能下降、ATP生成不足等，这些因素均有可能导致心肌细胞膜、细胞器膜ATPase活性下降。

病毒感染，吸附及穿入均可使心肌细胞膜结构破坏，膜电导性及膜通透性增加，膜上L型慢通道对离子通透性发生改变，大量胞外Na^+顺离子梯度进入胞内[7]。加之胞膜Na^+,K^+—ATPase活性下降，胞内Na^+不能排出，致使大量Na^+在细胞内积聚，并导致含水量增加。细胞内含水量增加，除促使线粒体水肿加重、ATP生成进一步障碍、加剧Na^+,K^+—ATPase活性下降外，还直接影响心肌舒缩功能。

胞内Na^+浓度升高，可激活Na^+—Ca^{2+}交换系统[8]；在VMC发病过程中，机体产生抗腺苷酸转位酶抗体，该抗体除作用于线粒体内膜腺苷酸转位酶、导致腺苷酸从线粒体内转移至胞浆障碍外，还可与胞膜Ca^{2+}通道发生交叉反应，增加该通道的通透性[9]；在OFR作用下，胞膜上可形成病理性Ca^{2+}通道[10]等，这些因素导致Ca^{2+}内流量增加，细胞内Ca^{2+}超载。Tominaga等[11]及郭棋等[12]采用放射性同位素$^{45}Ca^{2+}$示踪技术，发现体外培养的心肌细胞，在CVB3感染情况下，细胞Ca^{2+}内流量亦增加。在正常情况下，心肌胞浆内过多的Ca^{2+}可通过Ca^{2+}—ATPase泵入肌浆网和线粒体，以缓解胞浆内Ca^{2+}超载。本实验结果表明，病毒感染心肌Ca^{2+}—ATPase活性下降，因此造成了胞浆内持续性Ca^{2+}超载。心肌胞浆Ca^{2+}超载可导致：①促进OFR生成；②大量Ca^{2+}与磷酸结合形成磷酸钙，沉积于线粒体内膜，干扰ATP生成；③激活蛋白激酶、磷脂酶，引起细胞膜、细胞器膜破坏；④引起心肌细胞过度收缩，膜、润盘撕裂，膜通透性增加，大量酶及蛋白质外溢，最终导致细胞死亡。

本研究结果还显示，VMC在病程第3天，心肌

维普资讯 http://www.cqvip.com

组织Na^+,K^+—ATPase及Ca^{2+}—ATPase活性就明显下降,钠、钙含量显著升高,早于光镜下组织形态学变化。提示离子泵功能障碍,反常性Ca^{2+}超载可能是造成病毒感染后心肌细胞继发性损伤及心功能下降、心功能不全的重要原因之一。有研究表明,卡托普利(Captopril)能阻止缺氧、复氧心肌Na^+—Ca^{2+}交换,阻止胞膜病理性Ca^{2+}通道形成,减少缺氧、复氧心肌损伤[10,13],其对VMC心肌是否具有相似的药效学,有待进一步研究。

参 考 文 献

1. Ingwau JS. Cirulation 1993;87 (s):58
2. 徐友函,等.生物化学与生物物理进展 1986;13:64
3. Brad ford MM.Anal Biochem 1976;72:248
4. Alto A, et al. Am J Physiol 1979;237:H713
5. Xu KY, et al. Circ Res 1997;80:76
6. Khaw BA, et al. Eur Heart J 1995;16[suppl O]:92
7. Bhojani IH, et al. J Mol Cell Cardiol 1990;22:507
8. Dixon IM, et al. Mol Cell Biochem 1990;99(2):125
9. Kuhl U, et al, Eur Heart J 1991;12(D):99
10.Piper HM, et al. Basic Res Cardiol 1993;88:471
11.Tominage M, et al. J Clin Invest 1993;94(9):1231
12.郭棋,等.中华医学杂志 1993;73(9):562
13.Wang J, et al. Chin J Pathophysiol 1996;12:95

(收稿日期 1998－11－27)

Changes in myocardium ATPase activities and calcium and sodium concentrations in mouse with viral myocarditis

Chen Jianbin, et al
Department of internal medicine, college of clinical medicine

Myocardial ATPase activities and, calcium and sodium concentrations were investigated in mouse with viral myocarditis. The results indicated that the activities of Na^+,K^+—ATPase and Ca^{2+}—ATPase reduced significantly ($P<0.01$), while the concentations of calcium and sodium as well as water increased apparently compared to controls ($P<0.01$) in mouse myocardium infected with CVB_3 on the day 3, 14 and 30, respectively. These changes were observed prior to histologic changes. This study suggests that the inhibition of ATPase activities, and Ca^{2+} overload in myocardium after CVB_3 infection may be an important cause of secondary myocardium damage and cardiac insufficency.

KEY WORDS Viral myocarditis; Myocardium; ATPase; Calcium; Sodium