维普资讯 http://www.cqvip.com

Determination of catecholamines in plasma by high performance liquid chromatography coupled with fluorescence detection

Zhang Xiaoping, et al

Department. of Central Laboratory, The College of Sciencese Medicine Chongqing

A sensitive fluorimetric method for the determination of catecholamines in human plasma was described. After liquid－liquid extraction with diphenylboric acid 2－aminoethyl ester, the catecholamines in plasma are converted into the corresponding fluorescent compounds by reaction with 1,2－diphenylethylenediamine in aqueous acetonitrile. After being isocraticly eluted by a methanol buffer solution, these compounds could completely be separated with 16 minutes on Shim－pack CLC－ODS column, and with 10 minutes on Waters Nova－pack C^{18} column. The limits of detection were 10 fmol for norepinephrine, 10 fmol for epinephrine and 12.5 fmol for dopamine respectively.

KEY WORDS Catecholamines, 1,2－Diphenylethylenediamine(DPE), Precolumn derivatization, High performance liquid Chromatography－Fluorescence detection (HPLC－FD)

197-199

ADM对LNNA诱导的高血压心肌肥大的作用及机制探讨

基础医学院病理生理教研室 周 兰*
广东医学院解剖教研室 叶 赤
北京医科大学心血管研究所 常英姿 唐朝枢
中心实验室 邱宗荫

提 要 本工作在LNNA经慢性NO封闭诱导的大鼠高血压心肌肥大模型上研究了ADM对其心肌肥大和MSLV钠－钙交换功能损伤的作用。结果:一、较之对照组,LNNA组MAP和LVI分别增加57.4%和18.0%($P<0.01$),其MSLV经钠－钙交换蛋白的钙摄取则明显降低($P<0.01$或0.05);二、ADM组的MAP和LVI则分别较LNNA组降低19.6%和11.3%,而其MSLV的钙摄取则高于LNNA组($P<0.05$);三、对照组、LNNA组和ADM组钠－钙交换蛋白摄取钙的Km值分别为7.51、7.04和7.57μM,而Vmax则分别为6.38、4.32和5.45nmol/-mg pr/min。表明:ADM能拮抗LNNA诱导的高血压心肌肥大和减轻其MSLV钠－钙交换功能的损伤,并且后者可能是ADM拮抗心肌肥大的机制之一。提示内源性ADM的诱导和外源性给予ADM可能有预防和/或延缓高血压心肌肥大发生发展的作用。

关键词 肾上腺髓质素; 高血压心肌肥大; 心肌浆膜囊泡; 钠－钙交换(蛋白)
中图分类号 R365
R544.106 R542.202

细胞内长期Ca^{2+}超负荷是心肌肥大的重要发病机制之一[1];由于胞内Na^+的浓度远低于胞外,因此心肌浆膜钠－钙交换蛋白可以较高速率将胞外Na^+转运至胞内,同时将胞内Ca^{2+}转运至胞外,这对于细胞内钙稳态的维持至关重要。我们对左旋硝基精氨酸 (N^G－nitro－L－arginine,LNNA)经慢性NO封闭诱导的大鼠高血压心肌肥大模型的研究表明,其心肌肌浆膜钠－钙交换功能受损,这种损伤引起的胞内Ca^{2+}排出的减少可能是心肌细胞内钙超载和心肌肥大的发生

* 女,1963－01出生,讲师

维普资讯 http://www.cqvip.com

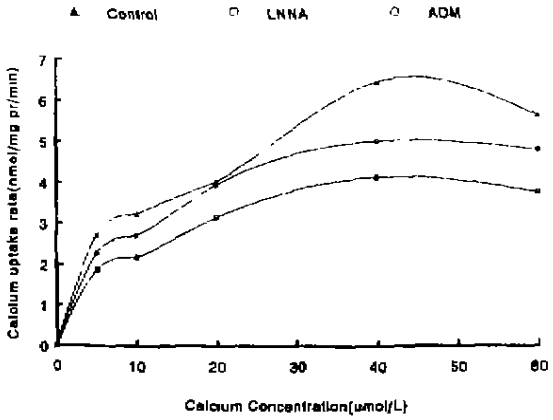


图1 心肌肌浆膜囊泡的Na^+依赖的Ca^{2+}摄取

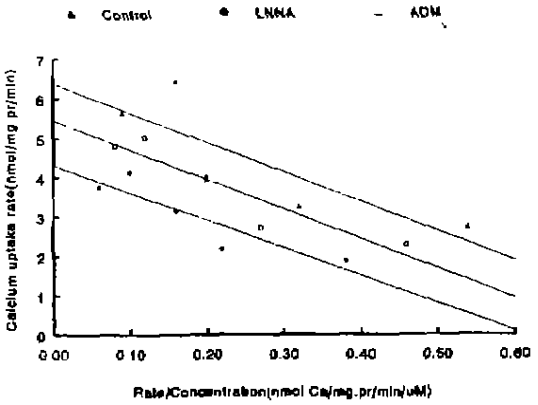


图2 图1中数据的Eadie－Hofstee作图

机制之一[2]。肾上腺髓质素(adrenomedullin，ADM)是1993年发现的具有扩张血管和降低血压作用的心血管活性多肽，在体内广泛存在[3]；近来又发现它具有抑制细胞增殖的作用[4]。本工作拟在LNNA诱导的大鼠高血压心肌肥大模型上研究ADM对其心肌肥大和心肌肌浆膜钠－钙交换功能损伤的作用，探讨ADM在高血压心肌损伤中的意义和可能机制。

1 材料和方法

1.1 高血压心肌肥大模型的建立[5]200±10g雄性Wistar大鼠(北京医科大学实验动物中心提供)，随机分为三组(n=6)。1)LNNA组:LNNA(Sigma)15mg/kg/d，分两次腹腔注射(ip)，连续21天;2)ADM组:同LNNA组，最后7天加用人ADM_{13-52}5nmol/kg/d，分两次ip;3)对照组:每天两次ip等量生理盐水。末次注射后6～12小时内观测下述指标和留取待测标本。

1.2 称体重;20%乌拉坦ip(5ml/kg)麻醉，左颈总动脉插管，连接四导生理计录仪(RM6200)，稳定15分钟后记录平均脉压(MAP);开胸取心脏，称左室重量，计算左室指数(left ventricular index，LVI)即左室重量(mg)/体重(g)作为心肌肥大的指标;取心室肌，分离心肌肌浆膜囊泡(myocardial sarcolemmal vesicle，MSLV)，方法同[3]，考马斯亮兰法蛋白定量，－70°C存放;

1.3 MSLV对Na^+依赖的Ca^{2+}摄取:参照Philipson的方法，略加改良。SLV悬液(40μg蛋白)中加入140mM的NaCl(实验管)或KCl(空白管)5μl，预孵育30min使其囊内负荷Na^+或K^+，然后将其加入测定介质(140mM KCl,5mM Tris,pH7.4)中;该介质含有^{45}Ca标记的不同浓度(5，10，20，40和60μM)的$CaCl_2$(2.48kBq/nM $CaCl_2$);在37°C孵育1min(体积250ul);反应结束后迅速加入30μl终止液(140mM KCl,25mM $LaCl_3$)终止反应，0.22μm的微孔滤膜过滤，5ml冲洗液(140mM KCl,1mM $LaCl_3$)冲洗滤膜三遍，晾干后放进闪烁瓶，加入闪烁液，β－液闪计数仪测定其放射活性，实验管cpm(Na^+依赖和非依赖的摄取总量)与空白管Cpm(非Na^+依赖的摄取量)之差即是钠－钙交换蛋白所摄取的量，摄取率以Ca^{2+}nmol/mg pr/min表示。

1.4 实验结果以均数±标准误($\bar{x}\pm s$)表示，t检验和one－way ANOVA法作统计处理

2 结果

2.1 较之对照组，LNNA组的MAP和LVI分别增加57.4%和18.0%(21.4±0.61 vs 13.6±0.75 kPa; 2.75±0.08 vs 2.33±0.04 mg/g，P<0.01)，而ADM组的MAP和LVI又分别较LNNA组降低19.6%和11.3%(17.2±0.58 vs 21.4±0.61 kPa; 2.44±0.09 vs 2.75±0.08 mg/g，P<0.01)。表明该模型的复制是成功的;ADM对LNNA诱导的高血压心肌肥大有明显的拮抗作用;

2.2 MSLV对Na^+依赖的Ca^{2+}摄取与Ca^{2+}浓度呈正相关;LNNA组的钙摄取率明显低于对照组(P<0.05或0.01)，而ADM组又高于LNNA组(P<0.05)，参见图1。表明ADM能减轻LNNA诱

维普资讯 http://www.cqvip.com

导的心肌浆膜钠－钙交换功能的损伤.

2.3 图1中数据的Eadie－Hofstee Plot见图2,对照组、LNNA组和ADM组的MSLV摄取Ca^{2+}的Km值分别为7.51、7.04和7.57μM,差异很小;而在最大摄取速率(Vmax)上的差异则较大,其分别为6.38、4.32和5.45nmol/mg pr/min,即LNNA组较对照组降低32.3%,ADM组又较LNNA组升高26.2%.表明LNNA组动物心肌的钠－钙交换功能的明显降低可能系非竞争性抑制所致;而ADM的应用则有效地减轻了这种抑制作用.

3 讨论

3.1 正常动物长期应用NO合成酶抑制剂(LNNA,等)可封闭NO合成,从而诱发高血压和心肌肥大[6].本工作显示,LNNA组动物在出现高血压和心肌肥大的同时,还伴有心肌肌浆膜钠－钙交换功能的明显低下;ADM的应用对LNNA引起的上述变化都表现出明显的拮抗效应.正常的钠－钙交换功能是将胞内Ca^{2+}排出,维持细胞的钙稳态;任何原因引起的该功能损伤或低下都可致钙超载,而钙超载又是心肌细胞肥大的机制之一[2],我们的实验结果也显示心肌钠－钙交换功能越低下,心肌肥大就越明显.因此我们推测,ADM减轻LNNA引起的心肌肌浆膜钠－钙交换功能损伤的作用可能是其拮抗心肌肥大发生发展的重要机制之一.

3.2 机体内许多组织和细胞都能产生和表达ADM.心肌中ADM的mRNA呈高水平表达,也含有丰富的ADM,其心脏效应尚不明了[7,8].本模型大鼠和原发性高血压患者浆中的ADM水平是增高的[9];Shimokubo等[10]对肺高压模型大鼠的研究也发现其血浆ADM水平增高,且右室心肌ADM和ADM mRNA的表达明显增加,而ADM的主要功能是扩血管降血压和抑制细胞增殖.因此我们认为高血压时内源性ADM的产生和表达增加是机体抵抗血压升高、血管平滑肌增殖和心肌肥大的一种代偿性反应,其具体机制有待深入探讨.本工作提示内源性ADM产生的诱导或外源性给予ADM可能具有预防和(或)延缓高血压心肌肥大发生发展的作用.

参考文献

1 Moe GW,et al.Cardiovasc Res 1994;28:66
2 常英姿,等.北京医科大学学报1997;29;32
3 Kitamura K,et al.Biochem Biophys Res Commun 1993;192:553
4 Chini EN,et al.Biochem Biophys Res Commun 1995;215:868
5 Philipson KD,et al.Circ Res 1982;50:287
6 Jover B,et al.Hypertension 1993;2194
7 Kitamura K,et al.Biochem Biophys Res Commun 1993;194:720
8 Jougasaki M,et al.Circ 1995;92:286
9 Kano H, et al.J Hypertension 1996;14;209
10 Shimokubo T,et al.Life Sci 1995;57;1771

(收稿日期1997—01—23)

The effects and mechanism of ADM on cardiac hypertrophy in LNNA－induced hypertensive and cardiac hypertrophic rats

Zhou Lan, et al

Department of Pathophysilogy, The College of Basic Medicine

The purpose of this study is to investigate the effects of adrenomedullin (ADM) on cardiac hypertrophy and the loss of myocardial sarcolemmal vesicle(MSLV) Na－Ca exchanger in LNNA(via chronic nitric oxide blockade)－induced hypertensive and cardiac hypertrophic rats.The results show that:1,the mean arterial pressure (MAP) and left ventricular index(LVI) of LNNA group have increased by 57.4% and 18.0% respectively over that of the control($P<0.01$), but its MSLV calcium uptake is lower than the control($P<0.01$ or 0.05);2,the MAP and the LVI of ADM group have decreased to 80.4 % and 88.7 % of the LNNA($P<0.01$),its calcium uptake rate of MSLV is higher than the LNNA($P<0.05$); 3, the difference of Km of MSLV Na－Ca exchanger among control, LNNA and ADM groups is not obvious (7,51,7,04 and 7,57μM respectively),while the difference of their Vmax is great: 6.38,4.32 and 5.45nmol/mg pr/min respectively.These results suggest that ADM has antagonism to cardiac hypertrophy and that ADM can alleviate the loss of MSLV Na－Ca exchanger induced by LNNA and the effect of ADM may be one of the mechanisms of ADM to antagonize cardiac hypertrophy.

KEY WORDS adrenomedullin; Hypertension and cardiac hypertrophy; Myocardial sarcolemmal vesicle(MSCV); Na－Ca exchange (r)