DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.08.015
694 第26卷第8期 2004年4月 第三军医大学学报 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Vol. 26, No. 8 Apr. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)08-0694-03

去甲肾上腺素刺激乳鼠心肌细胞内活性氧产生受体途径的研究

陈 吉[1],黄 岚[1],吴 强[2] ([1]第三军医大学新桥医院心血管内科,全军心血管内科中心,重庆 400037;[2]贵州省人民医院心血管内科,贵阳 550002)

提 要:目的 探讨去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)刺激心肌细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)产生的量效、时效关系及受体途径。方法 用DCFH-DA荧光探针标记培养乳鼠心肌细胞,流式细胞仪检测细胞荧光强度(反映ROS水平),观察不同浓度和不同时相的NE刺激对心肌细胞ROS生成影响及普萘洛尔和哌唑嗪的干预效果。结果 NE呈剂量依赖性及时间依赖性增加心肌细胞内ROS的产生,哌唑嗪或普萘洛尔均能部分抑制NE的促ROS生成的作用,而哌唑嗪和普萘洛尔共同干预,则几乎可完全抑制NE介导的心肌细胞内ROS产生。结论 NE通过α-肾上腺素能受体和β-肾上腺素能受体介导,以剂量依赖性及时间依赖性的方式刺激心肌细胞内ROS的生成。

关键词:去甲肾上腺素;心肌细胞;活性氧
中图法分类号:R322.11;R329.26;R977.11 文献标识码:A

Receptor pathways involved in norepinephrine-induced intracellular ROS production in cardiac myocytes

CHEN Ji[1], HUANG Lan[1], WU Qiang[2] ([1]Department of Cardiology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China; [2]Department of Cardiology, Guizhou People's Hospital, Guiyang 550002, Guizhou Province, China)

Abstract: Objective To study the effects of norepinephrine (NE) on intracellular reactive oxygen species (ROS) production in cardiac myocytes and receptor pathways involved in ROS production. Methods DCFHDA fluorescent probe was used for the assessment of NE-induced intracellular ROS production in cultured cardiac myocytes of the neonatal rats. Myocytes were exposed to NE, NE + prazosin, NE + propranolol, and NE + prazosin + propranolol at different time and doses. The changes of fluorescence intensity in cells were measured by flow cytometry. Results NE increased myocyte ROS production in time- and dose-dependent manners. NE-induced ROS production was partially inhibited by prazosin or propranolol, and completely inhibited by prazosin and propranolol together in myocytes. Conclusion NE can induce intracellular ROS production in cultured cardiac myocytes of the neonatal rats in time- and dose-dependent manners through the mediation of both α and β adrenoceptors.

Key words: norepinephrine; myocardiocyte; reactive oxygen species

活性氧(reactive oxygen species, ROS)是指一组化学性质活泼的含氧功能基团的化合物,如H_2O_2,$OH^{\cdot}$,$O_2^{-\cdot}$和脂质过氧化物等。实验研究表明,ROS可引起心肌细胞凋亡、生长和蛋白质合成增加、胚胎基因再表达、刺激成纤维细胞增生,因而ROS在心肌重塑中起重要作用[1]。去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)是体内一种重要的神经递质和内分泌激素,在心肌肥厚、心力衰竭等病理过程中起重要作用,而这些病理过程往往伴有心肌细胞的异常生长、凋亡及ROS产生的增加。本研究采用培养乳鼠心肌细胞模型,观察NE能否刺激心肌细胞内ROS的产生以及其中的量效、时效关系,并初步探讨NE刺激ROS产生的受体途径。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

取2 d龄的SD大鼠(购自第二军医大学实验动物中心)20只(雌雄不拘)仰卧固定,常规消毒后取出乳鼠心脏,加入少许酶消化液,将心脏剪成约1 mm×1 mm×1 mm大小的组织块,经消化处理及悬浮细胞后,贴壁法培养心肌细胞。在最初2 d,于培养液中加入0.1 mmol/L的5-溴脱氧嘧啶核苷抑制非心肌细胞生长。于培养1 d后应用形态学及台盼蓝染色进行鉴定,显示培养的细胞初为圆形或椭圆形,以后伸展成为长杆形、多角形、梭形等形态。24 h后可见心肌细胞已贴壁,48~72 h形成细胞单层,各细胞浆突起呈分枝相连成簇状、片状,以同心圆放射状排列,并可见心肌细胞特有的同步化搏动(频率12~80

作者简介:陈 吉(1973-),男,四川省乐山市人,硕士,主治医师,主要从事心内科基础与临床方面的研究,发表论文8篇,现在解放军第44医院心内科工作。电话:(0851)3833271

收稿日期:2003-06-18;修回日期:2003-08-26

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

次/min)。24 h 心肌细胞的存活率约 90%。培养 72 h 后混杂的少量红细胞已经死亡, 非心肌细胞少于 5%。

1.2　荧光标记

取生长 5 d 的心肌细胞, 用 Hepes 缓冲液冲洗 3 遍, 加入 0.25% 胰蛋白酶消化成单细胞悬液, 以含 10% 胎牛血清 DMEM 培养液终止消化, 800 r/min 离心 6 min, 弃上清, 加入 HBS 缓冲液重新悬浮细胞, 再次予 800 r/min 离心 6 min, 弃上清。在沉淀中加入 HBS 制成 5×10^4/ml 的悬液。吸取 500 μl 细胞悬液, 加入 1 mmol/L 2′, 7′-二氯氢化荧光素二酯(DCFH-DA, 购于 Cayman 公司) 5 μl, 置于 37 ℃避光水浴 30 min 备用。

1.3　分组干预

将 9 管用荧光探针标记过的心肌细胞在流式细胞仪上取样检测, 得到处理 0 min 值。然后将 9 管细胞随机加入不同的刺激源: 对照组(C 组): 加入等量 HBS 缓冲液作空白对照; 低剂量 NE 干预组(NE1 组): 加入用 HBS 缓冲液配制的 NE, 终浓度 2 μmol/L; 中剂量 NE 干预组(NE2 组): 加入用 HBS 缓冲液配制的 NE, 终浓度 10 μmol/L; 大剂量 NE 干预组(NE3 组): 加入用 HBS 缓冲液配制的 NE, 终浓度 20 μmol/L; 普萘洛尔(propranolol, PRO)干预组(PRO 组): 加入用 HBS 缓冲液配制的 NE、PRO, 终浓度均为 20 μmol/L (PRO 在加入 NE 前 30 min 加入, 以下相同); 哌唑嗪(prazosin, PRA)干预组(PRA 组): 加入用 HBS 缓冲液配制的 NE、PRA, 终浓度均为 20 μmol/L; PRA 和 PRO 干预组(PP 组): 加入用 HBS 缓冲液配制的 NE、PRA、PRO, 终浓度均为 20 μmol/L。以上 7 组均于 37 ℃恒温水浴箱内避光温育, 于 15、30 min 各管取样测值。以上实验重复 4 次。

1.4　ROS 的检测

应用流式细胞仪(Becton Dickinson 公司产)分别检测各组 0、15、30 min 不同时相点的荧光强度, 以荧光强度的变化反映细胞内 ROS 含量的变化。流式细胞仪参数: 以 HBS 缓冲液作为鞘液, 电流 0.15 mA, 激光波长 488 nm, 检测绿色荧光的波长范围为 525 nm。

1.5　统计学分析

所有数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 SNK 检验。

2　结果

2.1　NE 刺激心肌细胞内 ROS 产生的量效及时效关系

C 组细胞的荧光强度随时间的延长略有升高, 但各时点无统计学差异。NE 处理后心肌细胞内荧光强度随 NE 浓度的增高、时间的延长, 而呈显著上升趋势(表 1)。

表 1　NE 对心肌细胞内 ROS 水平的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Effect of NE on intracellular levels of ROS in myocardiocytes ($\bar{x}\pm s$)

Group (n=4)	Concentration of NE (μmol/L)	Fluorescence intensity at each time point		
		0 min	15 min	30 min
C	0	292±30	305±35	317±52
NE1	2	291±41△	497±20#*	639±59#*△
NE2	20	296±36△	710±57#	1064±69#△
NE3	200	291±46△	1178±74#*	1791±65#*△

#: $P<0.05$, *vs* control;　*: $P<0.05$, *vs* NE2;　△: $P<0.05$, *vs* 15 min

2.2　肾上腺素受体阻滞剂对 NE 刺激心肌细胞内 ROS 产生的影响

PRA 组和 PRO 组荧光强度均较 NE2 组有明显下降, 而 PP 组细胞的荧光强度则与空白对照组无统计学差异(表 2)。

表 2　肾上腺素受体阻滞剂对 NE 刺激细胞内 ROS 产生的影响

Tab 2　Effect of adrenoceptor blockers on NE-stimulated ROS in myocardiocytes

Group (n=4)	Fluorescence intensity at each time point		
	0 min	15 min	30 min
C	292±30	305±35	317±52
NE2	296±36△	710±57#	1064±69#△
PRO	285±16△	510±18#*	820±30#*△
PRA	284±30△	422±16#*	710±22#*△
PP	284±28	299±25*	320±31*

#: $P<0.05$, *vs* C;　*: $P<0.05$, *vs* NE3;　△: $P<0.05$, *vs* 15 min

3　讨论

生物体内 ROS 的生成与清除处于动态平衡状态, 当各种因素打破这一平衡而致 ROS 大量产生, 将造成核酸、蛋白质等生物大分子损伤, 而导致组织结构和功能变化。近年研究表明, 亚毒剂量的 ROS 可充当信号分子, 通过调节信号转导过程中的诸环节, 促发细胞生长、凋亡、细胞粘附等生物效应。许多诱导心肌细胞凋亡、肥大的刺激因素如血管紧张素 II[2]、TNF-α[3]、内皮素[4]、毒毛花甙 G[5] 均能以受体介导的方式刺激心肌细胞内 ROS 的产生。本实验结果显示, C 组心肌细胞显示一定的荧光强度, 提示心肌细胞内存在基线水平的 ROS。

NE 是主要的交感受神经递质, 可通过 α_1-肾上腺素能受体、β_1-肾上腺素能受体和 β_2-肾上腺素能受体发挥作用。Luo 等[6] 用 3 种浓度的 NE(0.2、2、20 μmol/L)刺激心肌细胞, 发现 NE 能以剂量依赖的方式刺激心肌细胞内 ROS 的产生。本研究结果显示, 经 NE 处理后心肌细胞内 ROS 含量明显增加, 且 ROS 含量随 NE 作用浓度增高和时间延长而逐渐增加, 提示 NE 刺激心肌细胞内 ROS 产生除了存在剂量依赖的作用方式, 还存在时间依赖性。

目前测定细胞内 ROS 水平的方法很多, 流式细胞术是近年发展起来的快速、方便且重复性较好的测定 ROS 水平的方法, 但该方法尚未完全成熟及标准化, 且不能测出 ROS 的绝对水平[7]。尽管本实验所使用的 DCFH-DA 荧光探针, 对 H_2O_2 和 OH^- 比 O_2^- 更为敏感[8], 但该荧光探针对 ROS 具体种类的检测不具特异性, 加之细胞内各种 ROS 之间可相互转换, 故不能对 NE 刺激心肌细胞产生 ROS 的具体种类作出肯定的结论。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

PRA 和 PRO 分别 α_1-肾上腺素能受体阻滞剂和 β-肾上腺素能受体阻滞剂。本研究结果显示 PRA 和 PRO 均可分别部分抑制 NE 介导的心肌细胞 ROS 生成，而 PRA 和 PRO 共同干预则完全阻断 NE 的促 ROS 生成作用，提示 NE 刺激心肌细胞内 ROS 产生的作用是同时通过 α-肾上腺素受体和 β-肾上腺素能受体介导的。目前文献[9]已报道的心肌细胞 ROS 产生系统有 3 类，包括线粒体电子传递链、黄嘌呤氧化酶、NADH/NADPH 氧化酶，最近有研究显示，NADPH 氧化酶可能为 NE 刺激心肌细胞内 ROS 产生的重要来源。

越来越多证据显示，细胞的氧化还原状态是决定细胞功能的潜在决定因素，改变细胞的氧化还原平衡能对细胞功能产生相应的影响。我们的研究显示 NE 能以受体介导的方式刺激心肌细胞内 ROS 的产生，ROS 是否参与了 NE 所诱导的心肌细胞凋亡和肥大的信号转导过程，有待进一步研究。

参考文献：

[1] Givertz M M, Colucci W S. New targets for heart-failure therapy: endothelin, inflammatory, cytokines, and oxidative stress[J]. Lancet, 1998, 352 (Suppl 1): s34—38.

[2] Nakamura K, Fushimi K, Kouchi H, *et al*. Inhibitory effects of antioxidants on neonatal rat cardiac myocyte hypertrophy induced by tumor necrosis factor-alpha and angiotensin II[J]. Circulation, 1998, 98(8): 794—799.

[3] Higuchi Y, Otsu K, Nishida K, *et al*. Involvement of reactive oxygen species-mediated NF-kappa B activation in TNF-alpha-induced cardiomyocyte hypertrophy[J]. J Mol Cell Cardiol, 2002, 34(2): 233—240.

[4] Cheng T H, Shih N L, Chen S Y, *et al*. Reactive oxygen species modulate endothelin-1-induced c-fos gene expression in cardiomyocytes[J]. Cardiovasc Res, 1999, 41(3): 654—662.

[5] Xie Z, Kometiani P, Liu J, *et al*. Intracellular reactive oxygen species mediate the linkage of Na^+/K^+-ATPase to hypertrophy and its marker genes in cardiac myocytes[J]. J Biol Chem, 1999, 274(27): 19323—19328.

[6] Luo J D, Xie F, Zhang W W. Simvastatin inhibits noradrenaline-induced hypertrophy of cultured neonatal rat cardiomyocytes[J]. Br J Pharmacol, 2001, 132(1): 159—164.

[7] 史桂英，高 飞，石学耕，等. 流式细胞术检测细胞内活性氧的方法[J]. 上海第二医科大学学报，2001，21(2)：122—124.

[8] Vanden Hoek T L, Li C, Shao Z, *et al*. Significant levels of oxidants are generated by isolated cardiomyocytes during ischemia prior to reperfusion [J]. J Mol Cell Cardiol, 1997, 29(9): 2571—2583.

[9] Xiao L, Pimentel D R, Wang J, *et al*. Role of reactive oxygen species and NAD(P)H oxidase in alpha(1)-adrenoceptor signaling in adult rat cardiac myocytes[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2002, 282(4): C926—34.

（编辑 栾 嘉）

（上接693页）

震颤(+)。肝功能损害，TB 279.6 μmol/L，DB 214.2 μmol/L，TP 63.4 g/L，ALB 26.3 g/L，GLB 37.1 g/L，ALT 27 U/L，AST 29 U/L，ALP 234 U/L，GGT 174 U/L；血钾 3.6 mmol/L，钠 116 mmol/L；铁蛋白>1 600 mg/L，HBsAg(+)，HBsAb(−)，HBeAg(+)，HBeAb(−)，HBcAb(+)，HBcAb-IgM(+)，乙肝前 S1 抗原(+)，乙肝前 S1 抗体(−)，甲型肝炎抗体 IgM(−)，丙型肝炎抗体(−)，丁型肝炎抗体 IgM(−)，丁型肝炎抗体 IgG(−)；戊型肝炎抗体 IgM(−)；戊型肝炎抗体 IgG(−)；类风湿因子(−)，抗核抗体(−)，抗线粒体(−)，血沉 35 mm/h；PT 25 s(9.6～13 s)，PT% 16.0，FIB 0.9 g/L(1.7～4.1 g/L)，血 WBC 7.3×10^9/L，GR 60.6，Mo 9.3，Ly 30.1，RBC 1.91×10^{12}/L，HGB 87 g/L，HCT 0.216，PLT 101×10^9/L，大便常规(-)，尿 WBC 2～4/HP。胸部 CR 检查双下肺炎，心电图大致正常，腹部 B 超肝硬化、大量腹水。入院诊断慢性重型肝炎，肝硬化晚期，肝性脑病，脑水肿，双下肺炎，电解质紊乱等。经综合治疗及人工肝支持系统治疗，病情好转，无发热、咳嗽、咯痰，无呕吐、腹泻、腹胀，无意识障碍，自主体位，腹水消失，扑翼样震颤(−)，肝功能好转，TB 221.6 μmol/L，DB 187.2 μmol/L，TP 69.6 g/L，ALB 33.5 g/L，GLB 36.1 g/L，ALT 17 U/L，AST 25 U/L，ALP 214 U/L，GGT 164 U/L；电解质好转，血钾 4.2 mmol/L，钠 132.4 mmol/L。因深度黄疸，用苦黄治疗，用药 70 d 时，在滴注苦黄过程中，出现发热，全身不适，体温最高达 38 ℃，无鼻塞、流涕、无咳嗽、咯痰，无呕吐、腹泻，连续 5 d 滴注苦黄后发热，查血常规、尿、粪正常，第 6 天起，停用苦黄后，未再发热，诊断为苦黄致药物热。

讨论

在临床上用苦黄、茵栀黄治疗黄疸型肝炎较普遍，但它们致药物热报道不多。本研究证实了苦黄可以致药物热。目前中药制剂特别是针剂，广泛用于临床，是中药现代化的必然，对人民健康事业有巨大贡献，在许多方面有着西药无法比拟的独特疗效。但是，我们要清醒地认识到中药现代化革命还有很多工作要做。中药制剂可以引起变态反应[1～3]，而且变态反应是中药制剂应用后常见的不良反应之一，几乎每一种中药针剂都可引起一些变态反应，最多见者为皮疹，其他尚有过敏性休克、血清病型反应、药物热、血管神经性水肿、嗜酸性粒细胞增多症、溶血性贫血、再生障碍性贫血、接触性皮炎等。这些易给临床医生诊疗工作带来混乱，给病人带来痛苦。这些变态反应主要由抗原和相应抗体的相互作用所致。对此要提高认识。预防重点在于不滥用或随意应用中药制剂。

关键词：苦黄注射液；药物热
中图法分类号：R283.6 文献标识码：B

参考文献：

[1] 王 蕾，潘巧仪. 中药不良反应概述[J]. 药物不良反应杂志，2000，2(3)：149—153.

[2] 徐 刚，张 冰. 中药不良反应的基本概念[J]. 中医药学报，2000，28(4)：40—42

[3] 周 践，郭代红，和培红. 142例中药不良反应分析[J]. 药物不良反应杂志，2002，4(6)：368—371

（编辑 张大春）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net