DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.08.006
第25卷第8期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 8
2003年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2003

文章编号:1000-5404(2003)08-0663-03

论著

维拉帕米对烧伤后大鼠心肌肌球蛋白异构体转换的影响

黑 砚,郭乔楠,陈意生 (第三军医大学附属西南医院病理学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨烧伤后心肌细胞肌球蛋白异构体转换及维拉帕米对其影响。方法 110只大鼠随机分为4组:单烧组(30%总体表面积Ⅲ度烧伤);维拉帕米组(维拉帕米溶液4 mg·kg^{-1});补液组(乳酸林格氏液4 ml·kg^{-1}·1%烧伤面积$^{-1}$)和对照组。通过聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)观察肌球蛋白异构体的改变。结果 烧伤后12 h(维拉帕米组24 h)开始肌球蛋白由V1向V3转换,与对照组比较,3个实验组存在显著性差异($P<0.05$),维拉帕米组(24、72 h)与单烧组和补液组之间存在显著性差异($P<0.05$),而单烧组和补液组之间无显著性差异($P>0.05$)。结论 烧伤引起心肌收缩蛋白-肌球蛋白异构体V1向V3转换,维拉帕米部分阻止肌球蛋白异构体的转换。

关键词:烧伤;肌球蛋白;维拉帕米
中图法分类号:R32.11;R644;R972 文献标识码:A

Effect of verapamil on the transformation of myosin isoforms in rat myocardial cells after burn

HEI Yan, GUO Qiao-nan, CHEN Yi-sheng (Institute of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the transformation of myosin isoforms and the effect of verapamil on the transformation after burn. Methods Wistar rats were randomly divided in four groups: the burn group (BG, inflicted with 30% TBS third degree burn), the verapamil group (VG), the fluid replacement group (RG) and the control group (CG). The transformation of myosin was observed by SDS-PAGE. Results The transformation of myosin from V1 to V3 in three experimental groups was found at the 12 th hour (at 24 th hour in verapamil group) after burn, which was significantly different from that in the control group ($P<0.05$). Verapamil could evidently reduce the myosin transformation from V1 to V3 ($P<0.05$). There was no significant difference from the burn group and the fluid replacement group ($P>0.05$). Conclusion Burn can induce the transformation of myocardial contractile protein-myosin isoforms from V1 to V3, which can be partially prevented by verapamil.

Key words: burn; myosin; verapamil

肌球蛋白是心肌重要的收缩蛋白,具有3种异构体形式,即V1、V2、V3。它们拥有不同的ATP酶活性,直接影响心肌的收缩功能。研究表明在缺血、缺氧,机械牵张等诸多病理状态下心肌肌球蛋白异构体由V1向V3转化,心肌的耗氧量、收缩功能随之而发生改变,被认为是心肌对外界刺激的适应性反应[1]。本实验通过观察烧伤及不同干预,了解烧伤后心肌肌球蛋白异构体的转换及探讨转换的可能途径。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

大分子蛋白Marker,购自Promega公司;丙烯酰胺、N,N'-亚甲基双丙烯酰胺、SDS、考马氏亮蓝G-250,均购自Sigma公司;高速冷冻离心机:BECKMAN J2-MC;电泳仪及垂直电泳槽:RGo-RAO U.S.A;组织内切式匀浆器:浙江机器厂;紫外可见光分光光度计:上海第三分析仪器厂。

1.2 实验动物与分组[2]

健康Wistar大鼠110只(第三军医大学实验动物中心提供),体质量150~250 g,雌雄不拘,分为烧伤组、烧伤后补液组、维拉帕米组及对照组。前3组各设7个时相点,于致伤后0.5、1、3、6、12、24、72 h活杀动物取材。各时相点5只动物,另取5只作总体对照。

1.3 动物致伤

参照文献[3]造成大鼠30%总体表面积Ⅲ度烧伤。烧伤后

基金项目:全军"九五"攻关课题(96L043)
作者简介:黑 砚(1963-),女,山东省陵县人,博士,主治医师,主要从事烧伤病理学及外科诊断病理学方面的研究,发表论文5篇,现在北京武警总医院病理科,北京 100000
通信作者:郭乔楠,电话:(023)68754431
收稿日期:2002-05-22;修回日期:2002-10-10

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

单烧组(BG)不做特殊处理;维拉帕米组(VG)伤后立即经腹腔注射维拉帕米溶液(4 mg/kg);补液组(RG)立即经腹腔注射乳酸林格氏液(4 $ml \cdot kg^{-1} \cdot 1\%$烧伤面积$^{-1}$);对照组(CG)只行背部脱毛。在预设的时相点分别麻醉(10%乌拉坦腹腔注射1 ml/100 g)动物,迅速开胸取出心脏,置液氮保存。

1.4 肌球蛋白提取及检测

1.4.1 肌球蛋白提取 参照文献[4]进行。液氮中的心肌标本,迅速置入0.9% NaCl溶液(4 ℃)中,分离左、右心室。取左心室心尖部肌组织约80~100 mg加5 ml新鲜配制改良的Cuba溶液(4 ℃),剪碎;用组织内切式匀浆器匀浆(10 s/次×3),每次间隔10 min,4 ℃冰箱反应1 h后高速离心(17 000 r/min;4 ℃;20 min),收集上清液备用。

1.4.2 蛋白定量 Broadford法[5]制作标准曲线。依据标准曲线得出换算公式:y=0.001 708+0.112 676 1x;其中x为蛋白浓度(mg/ml),y表示A值。用预冷甘油分装样本(2 mg/ml),-20 ℃保存。

1.5 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳[6]

配制凝胶溶液总容量23 ml(Acr 3.88%,Bis 1.02%),经制胶、上样(肌球蛋白粗提物20 μl加0.1%溴酚蓝作指示剂)、电泳(衡压14 V/cm;28 h;0~4 ℃;pH 8.5)、固定、染色、脱色后分析。

1.6 统计学分析

采用Tiger 920图像分析仪及其分析软件。将所得统计样本条带面积积分吸光度值(Integral absorbance,IA)换算成百分率,以$\bar{x} \pm s$表示,进行t检验。

2 结果

随时间推移,V3逐渐增加,但在12 h前其增加差异无显著性($P>0.05$),12 h开始,各实验组V3含量逐渐增多,见表1。

表1 不同实验组心肌V3含量(IA,%,$n=5$,$\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Contents of V3 in myocardial cells in each group (IA,%,$n=5$,$\bar{x} \pm s$)

Time(h)	BG	RG	VG	CG
0.5	3.91±0.79	3.86±0.51	3.87±0.40	4.15±0.27
1	3.97±0.15	3.89±0.25	3.86±0.17	
3	4.03±0.31	3.99±0.08	3.90±0.33	
6	4.90±0.11	4.05±0.15	4.01±0.21	
12	9.61±0.17 *	9.38±0.21 *	5.08±0.16	
24	15.51±0.09 *	14.87±0.23 *△	9.98±0.10 *★	
72	18.01±0.03 *	16.89±0.09 *△	12.70±0.08 *★	

*:$P<0.05$ *vs* CG;△:$P<0.05$ *vs* BG;★:$P<0.05$ *vs* RG

经统计学处理,与对照组相比,3个实验组0.5、1、3、6 h及维拉帕米治疗组12 h时相点V3转换率差异均无显著性($P>0.05$),单烧组与补液组12、24、72 h,维拉帕米治疗组24、72 h V3转换率均有显著性差异(BG、RG 12 h及VG 24 h $P<0.05$,其余$P<0.01$)。单烧组与补液组相比较V3转换率各时相点差异均无显著性意义($P>0.05$)。维拉帕米组与单烧组及补液组相比较V3转换率24、72 h存在显著性差异($P<0.05$)。

3 讨论

肌球蛋白是心脏的收缩蛋白之一,是构成心肌粗肌丝的主要成分,肌球蛋白分子由两条重链(MHC)和两对轻链(MLC)构成。研究表明心脏的MHC是由两种基因编码,即α-MHC和β-MHC基因,这些基因产物在肌球蛋白分子中形成二聚体,所以相应的有3种分子异构体可能存在,即V1(α、α同源体)、V2(α、β异源体)、V3(β、β同源体)。由于α、β-MHC ATP酶活性不同,所以肌球蛋白ATP酶活性主要由所含V1或V3的量多少而定,以V1占优势的心肌ATP酶活性最高,肌肉收缩速率最快,耗能也最多。而以V3占优势的心肌情况正相反,以V2占优势的心肌表现介于两者之间[7]。

心肌肌球蛋白异构体之间的转换是心肌的适应性改变,是心脏本身负荷和能量供应两方面调节适应的结果。V1通过增加心肌收缩速度来增加供能达到能量供需平衡,V3通过减少耗能而适应压力超负荷。当能量供不应求时,为了利用有限的能源维持低水平收缩功能,心肌以减慢最大收缩速度(V_{max})来节省能量。这一适应过程是通过改变心肌基因组的表达而实现的。

国外研究者在自发性高血压(SHRs)动物模型[8]、限制饮食的大鼠心肌[9]、慢性低氧(CHH)大鼠模型[10]、糖尿病心功能障碍等实验研究中[11],均看到肌球蛋白由V1向V3的转化。也有报道冠状动脉短暂结扎引起的心肌缺血再灌注模型中,β-MHC mRNA表达无明显改变。这一现象被认为可能是肌球蛋白分子在缺血再灌注时没有受到损伤,或类似压力超负荷时的情况,此基因晚些时候被上调[12]。

正常哺乳动物和人的心室肌球蛋白异构体存在着年龄、种属等差异。正常时大鼠左心室心肌肌球蛋白以V1为主,占60%~90%,而人以V3为主。我们以大鼠为实验对象,结果显示各实验组伤后12 h开始,心肌肌球蛋白V1向V3的转化趋于明显,与国内张瑞莲等[13]报道结果相类似,维拉帕米组更晚一些,24 h明显。Rudolf等[14]在大鼠心肌梗死及压力超负荷模型研究中报道在梗塞后1 d,β-MHC表达明显增高,持续6周或更长时间。本实验看到烧伤后V3转换出现较早。

导致β-MHC基因表达的机制目前仍不清楚。Rudolf报道与肾素-血管紧张素系统的激活有关。烧伤后心肌细胞由于钙超载,酸中毒,能量匮乏,部分细胞因子的激活和释放,肾素-血管紧张素系统的激活,血流动力学的改变等因素导致心肌细胞损伤。这些因素作为刺激信号,可能通过磷酸肌醇途径,使β-MHC表达增加。磷酸肌醇系统是细胞膜上的一个重要信号传导通

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

路, 其中关键酶-磷脂酶 C(PLC)的催化反应被认为是钙动员细胞反应的关键步骤。PLC 分解磷酸肌醇二磷酸(PIP2), 产生二酰脂甘油(DG)和三磷酸肌醇(IP3)。IP3 进入胞浆促进 Ca^{2+} 库释放并促进 Ca^{2+} 通道开放, 引起细胞内 Ca^{2+} 增多, 从而激活钙调素(CaM)依赖的激酶、磷脂酶 A2、环氧化酶等。而 DG 则激活蛋白激酶 C(PKC)。有人认为钙离子与激活的 CaM 依赖蛋白激酶II结合并与 PKC 协同作用促进一些基因表达。

维拉帕米是电压依赖性钙通道(VDC)阻滞剂, 主要阻滞 L 型 VDC, 从而阻滞钙离子内流。本实验显示, 烧伤后 12 h 开始, V3 蛋白水平表达增高, 而维拉帕米组 24 h 才开始升高, 升高幅度明显低于单烧组与补液组, 差异存在显著性($P<0.05$)。提示维拉帕米可能通过其 Ca^{2+} 拮抗作用, 阻止 Ca^{2+} 过度内流, 部分阻止肌球蛋白转换。这一作用是否也是通过磷酸肌醇途径则有待于进一步工作证实。近年来, 关于细胞钙超载, 钙阻滞剂方面的研究涉及面越来越广泛, 越来越受到重视。从文献及我们关于维拉帕米保护烧伤后心肌的实验中推测, 维拉帕米通过降低心肌细胞钙超载, 而减少了钙超载对细胞的直接损害(主要是内质网和线粒体); 减少心肌收缩带形成并使烧伤后心肌细胞的病理改变减轻[15]; 另外通过降低细胞钙离子浓度, 部分阻止一些基因的表达(如 *c-fos*、*c-myc* 等早期反应性基因及β-MHC、α-肌动蛋白等晚期反应性基因), 尽管烧伤后上述基因表达的确切意义尚不十分清楚。另外从我们的实验观察到, 烧伤后 V3 转换时间与心肌梗死、压力超负荷等不同病理状态时 V3 转换时间不尽相同, 原因何在也需进一步工作。

参考文献:

[1] Vandenburgh H H, Solerssi R, Shansky J, *et al*. Mechanical stimulation of organogenic cardiomyocyte growth *in vitro* [J]. Am J Physiol, 1996, 270(5 Pt 1): 1284-1292.

[2] 黑　砚, 郭乔楠, 陈意生. 严重烧伤大鼠心肌[Ca^{2+}]i 浓度变化与原癌基因 c-fos, c-myc 表达的关系[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(11): 1328-1331.

[3] 刘友生, 晏良遂. 烧伤复合内毒素血症对肝脏的损害及其意义的研究[J]. 中华整形烧伤外科杂志, 1994, 10(1): 142.

[4] Jean J M, Anne M L, Claudine W, *et al*. Myosin isoenzymic changes in several models of rat cardiac hypertrophy[J]. Circ Res, 1981, 49(2): 525-533.

[5] 孙志贤. 现代生物化学理论与研究技术[M]. 北京: 军事医学科学院出版社, 1995. 392-394.

[6] Dalbis A, Pantaloni C, Bechet J J, *et al*. An electrophoretic studyof native myosin isoenzymes and of their subunit content[J]. Eur J Biochem, 1979, 99(2): 261-272.

[7] Swynghedauw B. Developmental and functional adaptation of contractile proteins in cardiac and skeletal muscles[J]. Physiol Rev, 1986, 66(2): 710-771.

[8] Kojima M, Shioiima I, Yamazaki T, *et al*. Angiotensin II receptor antagonist TCV-116 induces regression of hypertensive left ventricular hypertrophy *in vivo* and inhibits the intracellular signaling pathway of stretch-mediated cardiomyocyte hypertrophy *in vitro*[J]. Circulation, 1994, 89(5): 2204-2211.

[9] Swoap S J, Haddad F, Bodell P, *et al*. Control of β-myosin heavy chain expression in systemic hypertension and caloric in the rat heart[J]. Am J Physiol, 1995, 269(4 Pt 1): C1025-C1033.

[10] Pissarek M, Bigard X, Mateo P, *et al*. Adaptation of cardiac myosin and creatine kinase to chronic hypoxia: role of anorexia and hypertension[J]. Am J Physiol, 1997, 272(4 Pt 2): H1690-H1695.

[11] Machotra A, Sanghi V. Regulation of contractile proteins in diabetic heart [J]. Cardiovasc Res, 1997, 34(1): 34-40.

[12] Ping Y, Carlin S L, Richard A, *et al*. Post-infarction heart failure in the rat is associated with distinct alterations in cardiac myocyte molecular phenotype[J]. J Mol Cell Cardiol, 1998, 30(4): 1615-1630.

[13] 张瑞莲, 陕声国, 王松山, 等. 大鼠严重烧伤早期心肌细胞组织化学研究[J]. 湖北医科大学学报, 1997, 18(2): 101-103.

[14] Rudolf J W, Heimo E, Jorg F, *et al*. Dissociation of left ventricular hypertrophy, β-myosin heavy chain gene expression and myosin isoform switch in rats after ascending aortic stenosis[J]. Circulation, 1997, 95(5): 1253-1258.

[15] 黑　砚, 郭乔楠, 陈意生. 维拉帕米对烧伤大鼠心肌保护作用的实验研究[J]. 武警医学, 2001, 12(8): 461-463.

(编辑　张　宁)

(上接 662 页)

凝、电凝, 甚至电凝穿刺[4,5]。我们收治 9 例, 2 例行巩膜环扎术失败, 1 例玻璃体切除术后囊肿复发, 3 例均做玻璃体视网膜手术而成功。表明视网膜囊肿并非都预后良好, 一旦合并有 PVR, 仅做巩膜外手术, 失败率高。而且, 由于视网膜囊肿的遮挡, 术前往往较难发现视网膜裂孔, 为制定手术方案带来困难。本组病例中, 术前仅 2 眼找到视网膜裂孔, 7 眼在术中找到视网膜裂孔, 即是例证。因此我们认为玻璃体视网膜手术, 能在术中切除病变玻璃体、眼内处理视网膜囊肿及视网膜, 是治疗这种复杂病例的有效手段。

关键词: 视网膜囊肿; 玻璃体切除术

中图法分类号: R774.1　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 廖菊生. 视网膜肿瘤[A]. 见: 李凤鸣 主编. 眼科全书[M]. 中册. 北京: 人民卫生出版社, 1996. 2381.

[2] A. H 奇内尔, 著. 任高英, 马志中, 译. 视网膜脱离手术学[M]. 北京: 中国广播电视出版社, 1994. 42.

[3] Smiddy W E, Michels R G, Green W R. Retinal detachment in highly myopic eyes[J]. Retina, 1990, 10(2): 113-114.

[4] 魏景文, 皱远辉. 视网膜脱离合并视网膜囊肿[J]. 中华眼科杂志, 1984, 20(2): 109-110.

[5] 云　波, 魏文兵. 视网膜脱离合并视网膜囊肿 18 例临床分析[J]. 中华眼底病杂志, 1995, 11(2): 90.

[6] 江　泉, 魏文兵. 视网膜脱离合并视网膜囊肿的超声图像特征[J]. 临床眼科杂志, 1999, 7(6): 424.

(编辑　张　宁)

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