DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.09.010
第25卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 9
2003年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2003

文章编号:1000-5404(2003)09-0767-03

论著

K物质对大鼠心肌细胞收缩的影响及其信号传导通路的探讨

成 敏,杨俐萍,魏振宇,高 原,郭志良 (遵义医学院生理学教研室,遵义 563003)

提 要:目的 研究K物质引起大鼠心肌细胞收缩的信号传导通路。方法 应用钙离子荧光指示剂Fluo-3AM负载原代培养的大鼠心肌细胞,通过流式细胞仪检测心肌细胞内游离钙离子浓度([Ca^{2+}]i)变化;分别应用磷脂酶C抑制剂-新霉素,三磷酸肌醇受体拮抗剂-肝素阻断肌醇磷脂-钙信号系统,观察二者对K物质诱导的[Ca^{2+}]i变化的影响。结果 SK(1.78×10^{-5} mol/L)能升高[Ca^{2+}]i;新霉素、肝素均可阻断SK诱导的[Ca^{2+}]i升高的效应。结论 SK可升高心肌细胞[Ca^{2+}]i,其作用与肌醇磷脂-钙信号系统有关。

关键词:心肌细胞;K物质;游离钙;磷脂酶C;流式细胞术
中图法分类号:Q463; R331.36; R977.6 文献标识码:A

Signal transduction pathway for cardiac myocyte contraction induced by Substance K in rats

CHENG Min, YANG Li-ping, WEI Zhen-yu, GAO Yuan, GUO Zhi-liang (Department of Physiology, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China)

Abstract: Objective To study the signal transduction pathway for myocyte contraction induced by Substance K (SK) in rats. Methods The fluorescent Ca^{2+} indicator Fluo-3AM was used to quantitate the calcium signal directly in the primary cultured myocardial cells. Changes of free Ca^{2+} concentration in cardiac myocytes were detected by flow cytometry. The phospholipase C (PLC) inhibitor, neomycin and IP3 receptor antagonist, heparin, were used to block signal system of phosphates-Ca^{2+} in order to investigate whether they took part in the SK-induced changes of [Ca^{2+}]i in myocytes. Results SK(1.78×10^{-5} mol/L) elevated [Ca^{2+}]i in myocytes. The effects could be blocked by neomycin and heparin. Conclusion SK can elevate [Ca^{2+}]i in myocyte, which may be mediated by a signal system of phosphates-Ca^{2+}.

Key words: myocardial cells; substance K; free calcium; PLC; FCW

K物质(Substance K, SK),又名神经激肽A(Neurokinin A, NKA)或神经介质L(Neuromedin L),是Nawa等[1]1983年于牛脑中发现的一种十肽,其氨基酸序列为:组-赖-苏-天冬-丝-苯丙-缬-甘-亮-甲硫-NH_2。它与经典速激肽P物质(Substance P, SP)来自共同的前体—前速激肽原(Pre-protachykinin, PPT)。Hoover等[2]利用豚鼠离体心脏灌流模型,去除了神经、体液因素的影响,观察到SK弹丸式注射具有正性变力效应。我们亦观察到SK可增加离体灌流大鼠心脏的左室收缩压[3];并可使培养的心肌细胞的收缩幅度增强。大量实验证明心肌的收缩是由细胞内钙离子浓度短暂升高(钙瞬流)而启动的,细胞内钙的改变可显著改变完整心肌或单个心肌细胞的收缩力[4,5]。本研究在培养的乳鼠心肌细胞上观察了SK对心肌细胞[Ca^{2+}]i的影响,旨在探讨SK对心肌作用的信号转导途径。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

Wistar乳鼠由遵义医学院实验动物中心提供。K物质、肝素、Fluo-3AM、二甲亚砜(DMSO)、皂苷、肌酸磷酸激酶均系Sigma公司产品;DMEM培养基(高糖型)系Hyclone公司产品;A23187购自Alexis公司;新霉素、$MnCl_2$购自上海生物工程有限公司;胰蛋白酶购自华美生物工程公司;小牛血清为本校中心实验室馈赠。其他试剂均为市售分析纯。

1.2 新生大鼠心肌细胞培养

实验用1~3 d龄Wistar大鼠(每次约8只),在无菌条件下开胸取出心脏。剪取心尖部分的心室组织,尽量剥除心室内、外膜和乳头肌,反复用D-Hanks液冲洗,然后将心肌组织剪成1 mm×1 mm×1 mm的碎块,放入离心管中,加入组织块20~30倍量的胰蛋白酶消化液(0.25%),放在恒温摇床内轻轻晃动(37 ℃,10 min)。消化完毕,用吸管轻吹几下,使碎块散开,静置2 min后吸去上面的混悬液(内含血细胞、内皮细胞以及坏死的心

基金项目:贵州省科委基金资助项目(C-153)
作者简介:成 敏(1976—),女,贵州省六盘水市人,博士研究生,主要从事心血管生理学方面的研究。电话:(0852)8204414
收稿日期:2002-05-13;修回日期:2002-07-18

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

肌细胞)。加入胰蛋白酶消化液(37 ℃, 20 min)。后再次吸吹,静置,将消化后的混悬液收集在离心管中,200目尼龙网过滤以滤去细胞团块。而后用Hanks液洗2~3次,洗净残留的胰蛋白酶,离心收集细胞,加入含小牛血清DMEM培养液,接种于25 ml培养瓶中,置于37 ℃, 5%CO_2培养箱中单层贴壁培养。用1 h差速贴壁法去除非心肌细胞。收集细胞悬液,计数,1×10^6/ml接种于培养瓶中。最初两天,加入0.1 mmol/L 5′-溴脱氧尿嘧啶以抑制非心肌细胞的生长。

1.3 可通透细胞的制备

由于肝素不能通过完整的细胞膜,用皂苷制备可通透细胞,观察其对SK的影响。具体方法为:当细胞形成单层,出现自发性的节律性搏动时,用0.1%胰蛋白酶消化,制成细胞悬液,离心沉淀,将消化液吸除,并用细胞质缓冲液洗3次,1 000 r/min,离心5 min,弃上清,用2 ml的细胞质缓冲液悬浮沉淀,并吹打成细胞悬液。细胞分散后,加入50 μg/ml的皂苷孵育4 min,离心5 min(1 000 r/min),沉淀重新悬浮于无皂苷而含2 mmol/L ATP、10 mmol/L磷酸肌酸、20 U/ml肌酸磷酸激酶的细胞质缓冲液中。

1.4 心肌细胞[Ca^{2+}]i测定

用0.1%胰蛋白酶将已形成单层,发生自发性搏动的心肌细胞自瓶壁上消化下来,用含0.2%的牛血清白蛋白Hepes液洗2~3遍,洗净残留的胰蛋白酶溶液,离心收集细胞,200目尼龙网过滤去除细胞团块。台盼蓝排斥实验检查,细胞成活率达85%以上。于细胞悬液(2×10^6/ml)中加入Fluo-3AM(终浓度:8 μmol/L),置于37 ℃恒温摇床中避光孵育45 min,使Fluo-3AM能进入细胞内并充分反应,离心沉淀细胞,以Hepes缓冲液漂洗2~3次,调整细胞悬液为2×10^6个细胞/ml,利用流式细胞仪测得Fluo-3与细胞内Ca^{2+}结合的荧光强度F;加入钙离子载体A23187(1×10^{-5} mmol/L)及1 mmol/L的$CaCl_2$(使细胞外钙饱和),测得最大荧光强度F_{max};再加入荧光淬灭剂$MnCl_2$(2 mmol/L),测得最小荧光强度F_{min}。然后根据公式,[Ca^{2+}]i=Kd(F−F_{min})/(F_{max}−F)(nmol/L)计算细胞[Ca^{2+}]i,Kd=450 nmol/L[6]。

1.5 统计学处理

数据用$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS统计软件进行分析。多样本比较采用多因素方差分析,组内、组间比较采用配对t检验和双样本等或异方差t检验。

2 结果

2.1 SK对心肌细胞[Ca^{2+}]i的作用

取心肌细胞悬液标本0.5 ml(以下步骤均同),实验分为两组:生理盐水(Saline,5 μl)对照组及SK处理组(终浓度为1.78×10^{-5} mol/L)。两组测得[Ca^{2+}]i经统计学处理,其差异有显著性($P<0.01$),见表1。

2.2 新霉素对SK诱导心肌细胞[Ca^{2+}]i升高的影响

磷脂酶C抑制剂新霉素(Neomycin)可明显抑制SK诱导心肌细胞[Ca^{2+}]i的升高。心肌细胞经新霉素(5×10^{-3} mol/L)处理5 min后再加入SK测得的[Ca^{2+}]i与单独加入SK(终浓度为1.78×10^{-5} mol/L)比较有统计学意义($P<0.05$),见表1。

2.3 肝素对SK诱导心肌细胞[Ca^{2+}]i升高的影响

三磷酸肌醇受体拮抗剂肝素(Heparin)(200 μg/ml)预处理心肌细胞2 min后,加入SK,测得的[Ca^{2+}]i与单独加入SK(终浓度为1.78×10^{-5} mol/L)比较差异有显著性($P<0.05$),见表1。

表1 SK(1.78×10^{-5} mol/L)、新霉素(5×10^{-3} mol/L)及肝素(200 μg/ml)对心肌细胞[Ca^{2+}]i的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Effects of SK(1.78×10^{-5} mol/L), neomycin(5×10^{-3} mol/L) and heparin(200 μg/ml) on [Ca^{2+}]i in myocytes($\bar{x}\pm s$)

Group	n	[Ca^{2+}]i(nmol/L)
Saline	6	173.43±20.03
Substance K(SK)	6	284.18±20.24##
Neomycin+SK	6	182.52±20.20*
Heparin+SK	6	162.93±27.06*

##: $P<0.01$ *vs* NS; *: $P<0.05$ *vs* SK

3 讨论

众所周知,细胞内钙以结合钙和游离Ca^{2+}两种形式存在。在通常情况下,细胞内游离Ca^{2+}极少,细胞在非激活状态时胞内游离Ca^{2+}浓度仅为0.1 μmol/L左右,但胞内游离Ca^{2+}浓度的改变,却是细胞完成生理功能的关键环节。钙库如内质网中Ca^{2+}的缓冲能力很大,在调节细胞浆内Ca^{2+}浓度中起重要作用。当一种刺激使钙库释放稍有增加时,均可导致胞浆内Ca^{2+}浓度大幅度增加,继而引发一系列生理、生化反应,而起到传递胞外信号的作用,如心肌细胞的收缩。研究发现SK可升高细胞[Ca^{2+}]i,为SK在离体心脏、培养的心肌细胞上表现出的正性变力作用,提供了理论基础。近年来,随着对速激肽家族研究的深入,人们对速激肽的细胞内信号传导通路,进行了多方面的研究,发现速激肽在很多系统,如神经系统、呼吸系统等通过调控磷脂酶C的活性影响三磷酸肌醇的生成,改变胞内Ca^{2+}的释放进而发挥相应的生理功能[7,8]。大量实验表明Ca^{2+}动员激动剂作用受体后通过磷脂酶C(PLC)特异地水解磷脂酰肌醇4,5-二磷酸(PIP_2)C_3上的磷脂酰键生成甘油二酯(DG)和肌醇1,4,5-三磷酸(IP_3),其中DG可使蛋白激酶C(PKC)活化;IP_3可作用于细胞内质网膜上的IP_3受体,该受体的C端含有膜-空间区,把含有4个对称性亚基的蛋白固定于膜上,形成IP_3敏感的功能性钙通道。大的N-端区游离于胞浆中,起末端有一IP_3结合点。一旦与IP_3结合,受体构象发生改变,导致通道开放[9]。本研究结果进一步显示:PLC抑制剂—新霉素,IP_3受体拮抗剂—肝素明显削弱SK对心肌细胞[Ca^{2+}]i的影响,表明磷脂酶C、肌浆网中IP_3受体在SK诱导心肌细胞[Ca^{2+}]i升高这一过程中具有重要作用。因此SK导致心肌细胞内Ca^{2+}的升高的效应可能是通过三磷酸肌醇系统起作用的。但是Ca^{2+}从钙库中释放后是否与钙调蛋白结合,是否还存在其他通

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

路如蛋白激酶 C 依赖性通路，将有待进一步研究。

参考文献：

[1] Nawa H, Hirose T, Tahashini H, *et al*. Neucleotide sequence of cloned cDNAs for two types of borine brain substance P precursor[J]. Nature, 1983, 306(5938): 32－36.

[2] Hoover D B, Yingzi Chang, Hancock J C. Characterization of responses to neurokinin A in the isolated perfused guinea pig heart[J]. Am J Physiol, 1998, 275 (6 Pt 2): R1803－R1811.

[3] 成 敏，杨俐萍，魏振宇，等. K 物质对离体大鼠心脏功能的影响[J]. 遵义医学院学报，2001, 24(6): 485－487.

[4] Brodde O E, Michel M C, Zerkowski H R. Signal transduction mechanisms controlling cardiac contractility and their alterations in chronic heart failure [J]. Cardiovasc Res, 1995, 30(4): 570－584.

[5] Kao J P, Harootunian A T, Tsien R Y. Photochemically generated cytosolic calcium pulses and their detection by fluo-3[J]. J Biol Chem, 1989, 264 (14): 817－819.

[6] Gromdordy B M, Frossard N, Rhoden K J, *et al*. Tachykinin-induced phosphoinositide breakdown in airway smooth muscle and epthelium: relationship to contraction[J]. Mol Pharmacol, 1988, 33(5): 515－519.

[7] Watson S, Arikinstall S. The G-proetin linked receptor factsbook: Tachykinins[M]. London: Academic Press, 1994. 266－267.

[8] 方 芳，张 放，刘景生. 胞浆内信息传递及第二信使[A]. 见：刘景生主编. 细胞信息与调控[M]. 北京：北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社，1998. 183－190.

（编辑 冷怀明）

文章编号：1000-5404(2003)09-0769-01

个案与短篇

c-myc、bcl-2 在原发性肝癌中表达的观察与分析

Expressions of c-myc and bcl-2 in primary hepatocellular carcinoma and their clinical values

余昌中[1]，应大君[1]，林 晨[2]，郑树国[3]，马宽生[3]（[1] 第三军医大学基础医学部解剖学教研室，国家教育部生物力学与组织工程学重点实验室力学研究室，重庆 400038；[2] 中国医学科学院肿瘤研究所，北京 100021；[3] 第三军医大学附属西南医院全军肝胆外科研究所、西南肝胆外科医院，重庆 400038）

肝细胞癌（Hepatocellular carcinoma，HCC）的发生发展与原癌基因的异常激活密切相关。原癌基因 *c-myc*、*bcl-2* 在肝癌发生中起重要作用[1,2]。本研究采用免疫组化法检测两种癌基因在肝癌组织中表达，探讨二者在肝癌发生发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 组织来源

1997 年 12 月至 1998 年 11 月间行肝癌根治性切除临床资料完整的肝癌石蜡标本 38 例（我校附属西南医院病理学研究所提供）。癌周组织为距癌边缘 2.0 cm 以上部位的肝组织，5 例正常肝组织取自粉碎性肝外伤者。

1.2 临床资料

38 例病人中男 32 例，女 6 例，年龄 26～65 岁，平均 46.6 岁，HBsAg 阳性者占 84.27%，伴有肝硬化者占 73.9%，AFP≥31 μg/L 者占 71%，肿瘤直径≥5 cm 者占 68.9%，包膜完整者占 42.1%，包膜不完整者占 47.4%，无包膜者占 10.5%，门脉有癌栓者占 31.6%，肝内有转移者占 22.2%。临床 TNM 分期按国际抗癌联盟标准（1987），其中Ⅰ期 2 例，Ⅱ期 12 例，Ⅲ期 21 例，Ⅳ期 3 例。病理分级按 Edmondson-steiner 肝细胞癌分级标准（1956），其中Ⅰ级 2 例，Ⅱ级 11 例，Ⅲ级 19 例，Ⅳ级 6 例。

1.3 免疫组化染色

兔抗人 c-myc 单克隆抗体（9E/11）及 bcl-2 单克隆抗体（100/D5），美国 Maxim Biotech, Inc. 产品，链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶免疫组化染色超敏试剂盒（UltraSensitiveTMS-P kit）购自福州迈新公司。具体操作按说明书进行。每批标本染色均设阴性片作对照。

1.4 结果判断与统计学处理

高倍镜下阳性染色细胞大于 10% 判断为阳性。采用配对资料 t 检验。

2 结果

2.1 c-myc、bcl-2 在不同肝组织中的表达

肝癌组织、癌周组织中 c-myc 蛋白阳性表达率较高（分别为 63.1%、57.9%），癌组织中 c-myc、bcl-2 蛋白均表达者占 13.1%。正常肝组织中 c-myc、bcl-2 蛋白表达均为阴性。

2.2 c-myc、bcl-2 在肝癌中的表达与临床多因素之间的关系

c-myc、bcl-2 在肝癌中均表达者发生在高病理分级的病人中。c-myc 蛋白阳性表达与高病理分级、肿瘤无纤维包膜、血清 HBsAg 阳性、合并肝硬化及临床 TNM 分期密切相关（$P<0.05$），c-myc、bcl-2 的表达与病人性别、年龄、血清 AFP、肿瘤大小及有无门静脉癌栓无关（$P>0.05$）。

作者简介：余昌中（1965－），男，河南省潢川县人，博士，主治医师，主要从事胆结石形成原因及肝癌治疗方面的研究，发表论文 10 余篇，现在北京军区总医院肝胆外科。电话：(023)68752225

收稿日期：2001-11-06；修回日期：2002-06-29

（下转 773 页）

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