DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.09.008

论著

文章编号:1000-5404(2002)09-1020-03

牵张刺激诱导心肌细胞分泌生长因子的机制

洪 彬,黄 敏,冯 兵 (第三军医大学附属新桥医院全军心血管内科中心,重庆 400037)

提 要:目的 探讨牵张刺激诱导心肌细胞分泌生长因子的机制。方法 在可变形膜上培养心肌细胞,采用放射免疫法测定培养上清血管紧张素Ⅱ和内皮素的含量,观察细胞骨架解聚剂和百日咳毒素对牵张刺激心肌细胞分泌生长因子的影响。结果 牵张刺激可诱导心肌细胞c-fos蛋白、β-MHC mRNA表达显著升高,同时心肌细胞分泌血管紧张素Ⅱ和内皮素明显升高。而细胞骨架解聚剂、百日咳毒素不仅可显著抑制其表达,同时,也明显抑制牵张刺激心肌细胞分泌血管紧张素Ⅱ和内皮素。结论 G蛋白-细胞骨架可能是介导牵张刺激诱导心肌细胞分泌细胞生长因子的重要途径。

关键词:牵张刺激;细胞骨架;G蛋白;生长因子
中图法分类号:R331.3+1 文献标识码:A

Mechanism of growth factor secretion by cardiocytes after stretch inducement

HONG Bin, HUANG Min, FENG Bing (Department of Cardiovascular Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the mechanism of growth factor secretion of cardiocyte induced by stretch. Methods After the cardiocytes cultured on a deformable membrane were divided into 4 groups, that is, normal control, stretch, stretch+cytoskeleton inhibitor treatment, and stretch+pertussin toxin treatment, with colchicines, cytochalasin B and, the contents of angiotensin Ⅱ and endothelin in the supernatant of the culture medium were measured with radioimmunoassay, c-fos protein and β-MHC mRNA expression were detected with immunochemistry or *in situ* hybrilization. Results The results showed c-fos protein and β-myosin heavy chain mRNA expression were stimulated significantly by stretch, and the contents of angiotensin Ⅱ and endothelin in the supernatant of the stretch culture medium were also elevated markedly than in simple myocardial cell culture. This stimulating function of stretch was inhibited significantly by cytoskeleton disrupting agents and pertussis toxin. Conclusion The G protein-cytoskeleton plays a role in the mechanism of growth factor secretion of cardiocyte induced by stretch.

Key words: stretch; cytoskeleton; G protein; growth factor; cardiocytes

心肌细胞力学信号转导是近年来受到关注的生命现象之一,其重要性在于压力或容量超负荷既可诱导心肌肥大反应,也可刺激心肌纤维化的发展,还可刺激异常的机械-电学(心肌细胞电兴奋性)反应,因此,急切需要阐明其机制。Ingber[1]认为心肌细胞骨架系统在机械感受机制中起到了关键作用,即机械刺激可能是通过细胞骨架拉动把力学信息传递进入细胞核而引起心肌肥大反应(基因表达、蛋白合成增加)。本室研究发现,细胞骨架主要是通过介导细胞自分泌细胞生长因子而参与牵张刺激诱导的心肌细胞肥大反应[2]。目前,牵张刺激后心肌细胞分泌生长因子的分子机制尚有待研究,有实验提示可能与刺激细胞骨架运动加速细胞内分泌囊泡向细胞外运输有关[1]。细胞骨架既可因力学牵张而运动,也可能因蛋白激酶磷酸化修饰而触发运动[3]。目前认为,G蛋白是心肌细胞跨膜信号转导的中心环节,因此,我们拟观察细胞骨架-G蛋白间相互作用在介导细胞分泌生长因子中的作用。

1 材料与方法

1.1 心肌细胞培养

参照Simpson[4]方法进行。按1×10^5/ml将心肌细胞接种于牵张培养盒中进行原代培养,24 h后换液1次,此后每隔2 d换液。

1.2 细胞骨架解聚剂、百日咳毒素对牵张刺激心肌细胞肥大的影响

第4天时换以无血清DMEM培养基培养24 h,再换以3 ml无血清DMEM培养,分别选择4 μmol/L秋水仙碱、0.4 μmol/L细胞松弛素B联合应用,以及G蛋白抑制剂百日咳毒素1 μmol/L预处理培养心肌细胞20 min,再进行牵张刺激心肌细胞24 h,检测心肌细胞表达c-fos蛋白、β-MHC mRNA的变化。牵张刺激方法见文献[5],心肌细胞c-fos蛋白表达用免疫组织化学法检测,β-MHC mRNA表达用原位细胞杂交法检测。心肌细胞β肌球蛋白重链(β-MHC)寡聚核苷酸探针序列为:5′-xctccaggtctcagggcttcacagg-3′,生物素末端标记,NBT-BCIP显色。每组重复4次实验。

1.3 细胞骨架解聚剂、百日咳毒素对牵张刺激心肌细胞分泌生长因子的影响

第4天时换以无血清DMEM培养基培养24 h,再换以3 ml无血清DMEM,然后分4组进行以下20% 拉长牵张刺激实验[5]:对照组(Control, CON),仅进行普通培养;单纯牵张组(Stretch, Stre);牵张刺激+细胞骨架解聚剂处理组(Cytoskeleton inhibitor, Cyto);牵张刺激+百日咳毒素处理组(Pertusis toxin, PT),每组实验均重复4次。24 h后收集各组的培养上清3 ml,分作两份,分别注入已用冰水预冷的两支试管内(一支含EDTA-Na_2 30 μl和抑肽酶40 μl,测内皮素用;另一支含0.3 mol·L^{-1} EDTA 50 μl,0.34 mol·L^{-1} 8-羟基喹啉50 μl及0.32 mol·L^{-1} 2-巯基乙醇25 μl,测血管紧张素Ⅱ),迅速混匀,4 ℃,3 000 r/min,离心10 min,取上清—70 ℃保存待测。内皮素测定方法按301医

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39600041)
作者简介:洪 彬(1970—),男,博士,主治医师,主要从事高血压病心肌肥大方面的研究。电话:(023) 68755000-74601
收稿日期:2001-09-18;修回日期:2001-12-06

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

院提供的试剂盒操作说明进行。血管紧张素Ⅱ测定方法按海军总医院提供的药盒及说明进行。

1.4　牵张刺激的培养上清(条件培养基)诱导心肌细胞肥大效应观察

收集上述 4 组实验的培养上清作为条件培养基, 观察其刺激心肌细胞 c-fos 蛋白、β-MHC mRNA 表达的影响。同样, 每组实验均重复 4 次。

1.5　图像分析

采用 MD20 型真彩色图像分析仪进行蛋白及 mRNA 表达的积分光密度定量。测定条件: 物镜放大倍数 40 倍, 随机测定 10 个细胞, 计算出每个细胞的积分光密度(IOD)。

1.6　统计学处理

所有数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 用 t 检验作组间显著性检验。

2　结果

2.1　细胞骨架解聚剂、百日咳毒素抑制牵张刺激心肌细胞 c-fos 蛋白、β-MHC mRNA 表达

c-fos 蛋白、β-MHC mRNA 表达是心肌细胞肥大的特征指标。研究结果表明, 细胞骨架解聚剂、百日咳毒素均显著抑制牵张刺激诱导的心肌细胞 c-fos 蛋白、β-MHC mRNA 表达, 见表 1。

表 1　细胞骨架解聚剂、百日咳毒素对牵张刺激心肌细胞 **c-fos** 蛋白、β-**MHC mRNA** 表达的影响(**IOD**)($n=4$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Effect of depolymeric agents and pertussis toxin on the c-fos protein and β-MHC mRNA expression of cardiocytes stimulated by stretch ($n=4$, $\bar{x}\pm s$)

Group	c-fos protein	β-MHC mRNA
Con	12.7±7.8	0.09±0.02
Stre	431.2±32.4 **	0.62±0.13 **
Cyto	78.5±12.1 *#	0.24±0.05 *#
PT	56.9±14.6 *#	0.19±0.07 *#

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* Con; #: $P<0.01$ *vs* Stre

2.2　细胞骨架解聚剂、百日咳毒素对牵张刺激心肌细胞分泌血管紧张素Ⅱ、内皮素的影响

放免测定显示, 牵张刺激可诱导心肌细胞分泌血管紧张素Ⅱ、内皮素显著增加, 而细胞骨架解聚剂、百日咳毒素均可显著抑制牵张刺激诱导的心肌细胞分泌血管紧张素Ⅱ、内皮素, 见表 2。

表 2　细胞骨架解聚剂和百日咳毒素对牵张刺激心肌细胞分泌血管紧张素Ⅱ、内皮素的影响(pg/ml, $n=4$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Inhibitory effects of depolymeric agents and pertussis toxin on the secreting function of cardiocytes stimulated by stretch (pg/ml, $n=4$, $\bar{x}\pm s$)

Group	Ang Ⅱ	ET-1
Con	4.2±0.2	21.9±0.9
Stre	25.8±0.7 *	62.1±1.9 *
Cyto	4.1±0.2 #	20.1±0.5 #
PT	4.8±0.5 #	23.0±1.2 #

*: $P<0.01$ *vs* Con; #: $P<0.01$ *vs* Stre

2.3　不同分组的条件培养基对心肌细胞 c-fos 蛋白、β-MHC mRNA 表达的影响

结果发现, 单纯牵张刺激后的条件培养基可显著刺激心肌细胞 c-fos 蛋白、β-MHC mRNA 表达, 说明牵张刺激可诱导心肌细胞分泌细胞生长因子, 而加入细胞骨架解聚剂及百日咳毒素组的条件培养基对 c-fos 蛋白、β-MHC mRNA 表达均无明显刺激作用, 提示细胞骨架解聚剂、百日咳毒素基本抑制了牵张刺激引起的心肌细胞生长因子分泌, 见表 3。

表 3　各组条件培养基刺激心肌细胞 **c-fos** 蛋白、β-**MHC mRNA** 表达的作用($n=4$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 3　Effect of conditioned mediums on the c-fos protein and β-MHC mRNA expression in the cardiocytes ($n=4$, $\bar{x}\pm s$)

Group	c-fos protein	β-MHC mRNA
Stre	311.2±22.1	0.62±0.13
Cyto	7.5±2.1 *#	0.14±0.05 *#
PT	6.4±1.6 *#	0.11±0.04 *#

*: $P<0.01$ *vs* Con; #: $P<0.01$ *vs* Stre

3　讨论

细胞骨架不仅与保持细胞形态有关, 还与细胞内蛋白激酶-磷酸化级联反应等生理功能有关[6], 尤其是微管蛋白本身具有 GTPase 功能, 在细胞内的空间分布上与在心肌细胞跨膜信号转导机制中发挥重要作用的 G 蛋白(包括小 G 蛋白)密切相关。我们过去研究发现, 细胞骨架是牵张刺激心肌细胞肥大反应信号转导机制中的中介环节, 而且主要是与牵张刺激诱导心肌细胞分泌生长因子有关, 但尚不清楚牵张刺激通过何种机制调节细胞骨架功能、加速细胞分泌功能活化。文献[1]报道, 这种现象可能与细胞骨架运动加速细胞内分泌囊泡向细胞外运输有关, 因此, 我们设想细胞骨架与 G 蛋白相互作用可能介导了牵张刺激诱导的心肌细胞分泌生长因子的功能。

本实验结果表明, 单独的细胞骨架解聚剂、G 蛋白抑制剂均可显著抑制牵张刺激心肌细胞 c-fos 蛋白、β-MHC mRNA 表达, 同时使牵张刺激的心肌细胞分泌血管紧张素Ⅱ、内皮素含量明显降低, 这些结果至少可以提示, 细胞骨架和 G 蛋白都是牵张刺激诱导心肌细胞分泌功能活化的信号分子, 它们既可能是信息传递链上的前后环节, 也可以是两条独立的信号途径。进一步研究发现, 它们各自的条件培养基诱导心肌细胞肥大的能力均显著低于单纯牵张刺激组, 而且, 细胞骨架解聚剂组和百日咳毒素组不仅抑制心肌细胞 c-fos 蛋白、β-MHC mRNA 表达的能力相同, 抑制牵张刺激的心肌细胞分泌功能的能力也无明显差异, 提示以前一种可能性最大, 即牵张刺激可能是首先活化了细胞膜内的 G 蛋白, 再通过 G 蛋白调节细胞骨架运动进而诱导细胞分泌。观察 G 蛋白活化后心肌细胞内细胞骨架是否重组, 或者是是否运动, 有利于进一步证实本实验这一结论。

参考文献:

[1] Ingber D E. Tensegrity: the architectural basis of cellular mechanotrans-

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

duction[J]. Annu Rev Physiol, 1997, 59(3): 575—599.
[2] Feng B, Qin J, He Z Y, *et al*. Role of cytoskeleton in the mechanisms of stretch-induced cardiomyoctical hypertrophy *in vitro*[J]. J Med Coll PLA, 2001, 16(1): 1—3.
[3] Yonemochi H, Yasunaga S, Teshima Y, *et al*. Rapid electrical stimulation of contraction reduces the density of beta-adrenergic receptors and responsiveness of cultured neonatal rat cardiomyocytes. Possible involvement of microtubule disassembly secondary to mechanical stress[J]. Circulation, 2000, 101(22): 2 625—2 630.
[4] Simpson P, McGrath A, Savion S. Myocyte hypertrophy in neonatal rat heart cultures and its regulation by serum and catecholamines[J]. Circ Res, 1982, 51(3): 787—801.
[5] 冯 兵, 王德文, 何作云, 等. 培养细胞牵张刺激装置的建立及初步应用[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(5): 498—500.
[6] Sugden P H. Signaling in myocardial hypertrophy: life after calcineurin[J]. Circ Res, 1999, 84(4): 633—646.

（编辑 陈聪连）

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2002)09-1022-01

地氟醚用于嗜铬细胞瘤手术麻醉 1 例

A case report of desflurane anesthesia during resection of phaeochromocytoma

陈 杰, 陶国才 （第三军医大学附属西南医院麻醉科, 重庆 400038）

随着麻醉技术的提高, 已经有许多麻醉剂被成功地应用于嗜铬细胞瘤手术的麻醉, 包括: 安氟醚, 异氟醚及异丙酚等。现报道 1 例地氟醚麻醉下成功行嗜铬细胞瘤切除术。

患者, 男性, 49 岁, 反复头痛、心悸 2 年, 加重伴右侧腰痛 1 月入院。术前诊断: 右肾上腺嗜铬细胞瘤。阵发性高血压, 本次发作时血压 21/13.9 kPa。CT、MRI、B 超: 右肾上腺肿物。24 h 尿儿茶酚胺: 1040 μg(正常值 50～170 μg/24h)。心电图正常。术前准备: 于术前 11 d 口服哌唑嗪 3 mg/d, 心得安 30 mg/d; 术前 5 d 扩容, 输血浆 800 ml, 全血 600 ml。术前血压维持于 17～14/12～8 kPa。麻醉管理: 术前 30 min 肌注苯巴比妥钠 100 mg, 阿托品 0.5 mg。07:45, 进入手术室, 局麻下完成左桡动脉和右颈内静脉穿刺置管, 直接监测动脉血压(ABP)和中心静脉压(CVP), ABP 19.6/13.1 kPa, 心率 76 次/min, CVP 11 mmHg, 脉搏氧饱和度 100%。08:35, 以硫喷妥钠 325 mg, 氟哌啶 5 mg, 芬太尼 0.1 mg, 维库溴铵 4 mg 诱导插管, 插管后 ABP 17.9/11.3 kPa, 心率 96 次/min。60%笑气和 4%地氟醚维持麻醉, 定时给以芬太尼, 必要时静注维库溴铵, 同时明胶(血定安)扩容。09:10, 手术开始, 此时 ABP 14.8/9.6 kPa, 心率 101 次/min, CVP 7 mmHg, 地氟醚吸入浓度减至 2%。09:55, 患者小便量 120 ml, CVP 9 mmHg, 输入胶体液 1 000 ml。肿瘤周围操作引起 ABP 从 15.6/10.2 kPa 升至 19.8/13.6 kPa, 增大地氟醚吸入浓度至 5%后, ABP 降至 16.4/10.5 kPa。每一次外科操作引起的 ABP 的增高, 都可以通过调高地氟醚吸入浓度(通常 6%即可, 偶尔达 8%)快速、方便地加以控制。10:25, 切除肿瘤, ABP 从 16.8/11.1 kPa 升至 26.2/15.9 kPa, 心率从 95 次/min 增至 130 次/min, 逐渐增大地氟醚吸入浓度至 10%, 同时静注艾司洛尔 10 mg。患者 ABP 缓慢降至基线(16/10.7 kPa), 心率也降至 100 次/min, 地氟醚吸入浓度减至 3%。在整个短暂的高血压阶段, 并未出现心律失常。肿瘤切除后, ABP 降至 10.8/7.1 kPa, 给予多巴胺 20 $\mu g \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$ 持续静脉泵注, 同时输注新鲜全血 1 000 ml, 胶体液 500 ml, 地氟醚吸入浓度减至 2%并维持此浓度直至手术结束。ABP 逐渐回升至 17.2/10 kPa。术毕病人清醒, 拔管, 回病房, 以多巴胺 15～8 $\mu g \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$ 维持血压 18.4/10.7 kPa, 心率 97 次/min, 术后第 2 天停用多巴胺。术后 9 d 患者康复出院, 病理诊断为肾上腺嗜铬细胞瘤。

讨论

在嗜铬细胞瘤手术中, 正确的围手术期准备工作也许比选择适当的麻醉方法更为重要。在应用 α_1-受体阻滞剂扩张血管的同时充分扩容, 可以比较满意地恢复患者部分血容量, 进而能够将麻醉诱导期和术中的血压波动减少到最小。地氟醚是一种新型吸入麻醉药, 具有无肝肾毒性, 麻醉诱导快, 苏醒早和降压效果明显, 容易控制等优点。但在快速吸入地氟醚呼气末浓度超过 1MAC 时可产生交感兴奋作用[1], 使其在嗜铬细胞瘤手术的应用受到很大局限。在本病例, 通过采用低流量麻醉, 控制地氟醚吸入浓度在 6%以下, 缓慢增加地氟醚浓度以及伍用芬太尼[2], 不但有效降低了外周血管阻力和动脉压, 而且有效避免了地氟醚交感兴奋作用。即使在地氟醚吸入浓度达 10%的肿瘤切除阶段, 由于采用了缓慢调节挥发罐浓度, 高浓度地氟醚吸入时间短以及伍用 β-受体阻滞剂等措施, 除了手术操作引起的高血压和心动过速, 并没有观察到地氟醚兴奋交感神经的临床表现, 在高血压阶段的心电图上也没有发现任何心肌缺血的迹象。

关键词: 地氟醚; 嗜铬细胞瘤
中图法分类号: R971+2; R736.6 文献标识码: B

参考文献:

[1] Ebert T J, Muzi M. Sympathetic hyperactivity during desflurane anesthesia in health volunteers: a comparison with isoflurane[J]. Anesthesiology, 1993, 79(3): 444—453.
[2] Pacentine G G, Muzi M, Ebert T J. Effect of fentanyl on sympathetic activation associated with the administration of desflurane[J]. Anesthesiology, 1995, 82(4): 823—831.

（编辑 薛国文）

作者简介: 陈 杰(1971—), 男, 四川省自贡市人, 硕士研究生, 主治医师, 主要从事出凝血机制方面的研究, 发表论文 5 篇。电话: (023)65386544

收稿日期: 2001-07-05; 修回日期: 2001-11-20

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