DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.12.020
第24卷第12期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 12
1420 2002年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)12-1420-03

一氧化氮抑制牵张刺激心肌细胞肥大反应的实验研究

黄 敏[1],冯 兵[1],陈意生[2],何作云[1] (第三军医大学:[1]附属新桥医院心血管内科,重庆 400037;[2]附属西南医院病理学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨一氧化氮(NO)对牵张刺激心肌细胞肥大的抑制作用。方法 用分光光度法、原位杂交及图像分析法测定蛋白、DNA含量及β-MHC mRNA表达。结果 20%牵张刺激可诱导培养心肌细胞内游离Ca^{2+}含量迅速升高,12~24 h即见蛋白质合成及β-MHC mRNA显著增加。大于3×10^{-4} mol/L的硝普钠(NO供体)可显著抑制牵张刺激诱导的心肌细胞蛋白质合成及β-MHC mRNA表达。NO可同时使牵张刺激引起的细胞内游离Ca^{2+}浓度升高受到抑制。结论 一氧化氮可显著抑制牵张刺激诱导的心肌细胞肥大反应,这种抑制可能是通过降低细胞内游离Ca^{2+}浓度而发挥作用的。

关键词:NO;牵张刺激;心肌细胞肥大
中图法分类号:R322.11;R345.921;R394.2 文献标识码:A

Inhibitory effect of nitric oxide on hypertrophic response of cardiomyocytes stimulated by stretch *in vitro*

HUANG Min, FENG Bing, CHEN Yi-sheng, HE Zuo-yun (Department of Cardiology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To investigate the inhibitory effect of nitric oxide (NO) on the cardiocyte hypertrophic response stimulated by stretch. **Methods** Spectrophotometry, *in situ* hybridilization and image analysis were used to detect changes of protein, DNA contents and β-MHC mRNA expression. **Results** The protein syntheses, β-MHC mRNA expression and the concentration of intracellular free Ca^{2+} of cardiomyoctes induced by stretch were significantly elevated than that in control. Protein syntheses and β-MHC mRNA expression induced by stretch were significantly inhibited by NO ($\geq 3\times10^{-4}$ mol/L), and the role was persistent if its concentration was kept. Meanwhile, the increase of intracellular free Ca^{2+} induced by stretch was also inhibited by NO. **Conclusion** Cardiocytes hypertrophic response stimulated by stretch could be inhibited by nitric oxide. The inhibitory effect might be due to the decrease of the concentration of intracellular free Ca^{2+}.

Key words: nitric oxide; stretch; cardiocyte hypertrophy

早在1987年即有报道指出细胞形变可直接刺激细胞内腺苷酸环化酶活性及cAMP含量升高。在体外灌注心脏时,突然增加压力负荷后10 min心肌腺苷酸环化酶活性及cAMP浓度即显著升高、蛋白合成加快。本室研究[1]也提示,急性压力超负荷可诱导心肌组织cAMP含量迅速升高、cGMP含量迅速降低,说明环核苷酸系统与压力超负荷心肌肥大的信号转导机制有关。近年来,用动物模型观察发现一氧化氮(NO)可改善肥大心肌的舒张功能,并且参与调节心肌细胞β受体功能、抑制心肌肥大等作用[2~7]。我们拟采用体外压力超负荷模拟模型,观察NO供体硝普钠对牵张刺激心肌细胞肥大反应的影响。

1 材料和方法

1.1 心肌细胞培养

参考Simpson等[8]方法进行。按1×10^5/mL接种于牵张培养盒中,24 h后换液一次,此后每隔2 d换液。硅酮膜事先涂上0.25 mg/mL的鼠尾胶原作为粘附基质。

1.2 实验分组

普通培养组:培养心肌细胞不给予牵张刺激。单纯牵张刺激组:先精确测量出静止状态下两夹板间硅酮膜的长度,再按20%牵张拉长[9]。硝普钠处理浓度效应组:先向培养心肌细胞中加入不同浓度的硝普钠避光预孵浴20 min,再给予20%牵张刺激,各组均观察48 h。硝普钠处理时间效应组:先向培养心肌细胞中加入3×10^{-4} mol/L的硝普钠避光预孵浴20 min,再给予20%牵张刺激持续不同时间。牵张刺激各组每12 h换液1次以保持NO浓度,上述各组均分别重复3次实验。

1.3 细胞蛋白质及DNA含量的测定

蛋白质含量测定采用Lowry法,DNA含量采用紫外分光光度法测定。

1.4 细胞内游离Ca^{2+}的测定

采用激光共聚焦法[10]。取待测细胞用KHBS液(每升含NaCl 119 mmol,KCl 4.8 mmol,$CaCl_2\cdot H_2O$ 2.5 mmol,KH_2PO_4 1.2 mmol,$MgSO_4\cdot7H_2O$ 1.2 mmol,$NaHCO_3$ 24.8 mmol,调节pH值至7.4)洗2次,加入用KHBS稀释的20 μmol/L Fluo-3 AM 20 μl,并加入20% F127 4 μl,于37 ℃、5% CO_2条件下孵育60 min,用KHBS液洗2次,将细胞置于INSIGHT Plus下观察,可得到细胞的荧光图像。以3~6 s的速度间隔连续扫描,总时间1~4 min,根据需要,牵张刺激及扫描前加入硝普钠。扫描所得一系列荧光图像由计算机收集并储存分析处理,可得到细胞内Ca^{2+}变化的时间效应(相对荧光强度值)曲线,每组扫描20个细胞,取每个细胞荧光强度最大值得到细胞Ca^{2+}浓度平均值。

1.5 心肌细胞β肌球蛋白表达的原位杂交

将各组观察结束的心肌细胞用预冷的PBS(0.1 mol/L,pH 7.4)轻轻冲洗3次,4%多聚甲醛固定30 min,-20 ℃保存。常规mRNA原位杂交,β肌球蛋白重链(β-MHC)寡聚核苷酸探针

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39600041)
作者简介:黄 敏(1971-),女,四川省自贡市人,主管技师,主要从事心肌肥大方面的研究。电话:(023)65200326
收稿日期:2001-11-10;修回日期:2002-03-12

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

序列为: 5′-xctccaggtctcagggcttcacagg-3′, 生物素末端标记, NBT-BCIP 显色。图像分析积分吸光度定量。

1.6　统计学处理

所有数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 用 t 检验作组间显著性分析。

2　结果

2.1　牵张刺激心肌细胞肥大效应

20%牵张刺激可显著诱导培养心肌细胞蛋白质合成, 而 DNA 合成未见增加, 见表 1。同时, 牵张刺激使心肌细胞β肌球蛋白 mRNA 表达也显著升高。

表 1　牵张刺激对心肌细胞蛋白质、DNA 合成及β肌球蛋白 mRNA 表达的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Effect of stretch on the syntheses of protein and DNA and β myoglobulin mRNA expression in cultured cardiocytes($\bar{x}\pm s$)

Group	n	Protein #	DNA #	Protein/DNA	β-MHC mRNA(IOD)
Control	3	0.11±0.02	0.49±0.02	0.27±0.03	0.05±0.008
Stretch	3	0.21±0.03 **	0.48±0.01	0.44±0.05 *	0.10±0.011 *

#: μg/10^6 cells;　*: $P<0.05$,　**: $P<0.01$ *vs* Control

2.2　硝普钠抑制牵张刺激心肌细胞肥大的浓度效应

浓度大于 3×10^{-4} mol/L 的硝普钠即可抑制牵张刺激诱导的心肌细胞蛋白质合成、β肌球蛋白 mRNA 表达, 见表 2。

表 2　硝普钠抑制牵张刺激心肌细胞肥大的浓度效应($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Inhibitory effect of nitroprusside at different concentrations on cardiomyocyte hypertrophy induced by stretch($\bar{x}\pm s$)

Parameter	Control	Nitroprusside(10^{-4}mol/L)				
		1	2	3	4	5
Protein/DNA	0.44±0.03	0.39±0.01	0.35±0.02	0.28±0.02 *	0.27±0.01 *	0.27±0.01 *
β-MHC mRNA	0.1±0.001	0.09±0.003	0.07±0.002	0.05±0.002 *	0.047±0.001 *	0.049±0.002 *

*: $P<0.05$ *vs* Control

2.3　硝普钠抑制牵张刺激心肌细胞肥大的时间效应

同时, 3×10^{-4} mol/L 的硝普钠对牵张刺激诱导的心肌细胞蛋白质合成(图 1A)及β肌球蛋白 mRNA 表达具有持续的抑制作用(图 1B)。

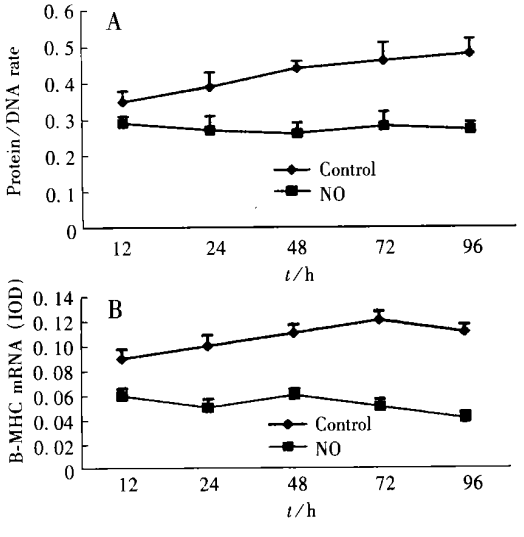


图 1　硝普钠抑制牵张刺激心肌细胞肥大的时间效应

Fig 1　Inhibitory effect of nitroprusside for different times on the hypertrophic response of cardiomyocytes induced by stretch

2.4　硝普钠对牵张刺激心肌细胞内游离 Ca^{2+} 变化的影响

静息心肌细胞 Ca^{2+} 荧光强度均值为(312±24)荧光单位, 牵张刺激可诱导心肌细胞内游离 Ca^{2+} 含量迅速升高, 达到(623±15)荧光单位($P<0.05$)。若预先加入 3×10^{-4} mol/L 的硝普钠, 可明显抑制这种细胞 Ca^{2+} 浓度的变化[仅为(322±16)荧光单位, 与牵张刺激组比较差异显著($P<0.05$)。

3　讨论

由于发现 cGMP 在 NO 这一无机分子的信号传递中的作用, cGMP 才受到人们的高度重视, 尤其是对 NO—cGMP 在血管内皮细胞依赖的平滑肌细胞舒张机制、增殖抑制等方面进行了深入研究, 但对其在心肌细胞内的信使作用, 尤其是在心肌细胞肥大中的作用多仅在动物模型中有研究报道[1~5]。

cAMP 与 cGMP 是一对相互拮抗的细胞内信号分子。cAMP 可通过调节细胞膜和肌浆网 Ca^{2+} 通道影响细胞内游离 Ca^{2+} 浓度水平, 进而调控细胞代谢、细胞收缩和基因表达, 结合本室研究[1,5], 在急性压力超负荷大鼠心肌 cGMP 浓度有一个从正常水平到降低, 再到恢复正常的过程, 这一变化特点恰与 cAMP 的变化曲线相反, cGMP 的变化趋势与心肌中 NO 的变化也相平行, 因此, 我们推测 NO—cGMP 信号系统可能与拮抗心肌肥大机制有关。

实验结果显示, 模拟在体压力超负荷的牵张刺激也可诱导受牵张心肌细胞内游离 Ca^{2+} 浓度迅速升高, 而且, 心肌细胞β肌球蛋白重链 mRNA 表达和总蛋白合成也显著增加。若预加入一定浓度的 NO 可显著抑制牵张刺激诱导的心肌肥大反应, 而且具有浓度依赖性, 同时, 心肌细胞内游离 Ca^{2+} 含量也明显受到抑制, 因此提示 NO 抑制牵张刺激心肌细胞肥大作用可能是通过抑制细胞内游离 Ca^{2+} 含量升高而起作用的。今后, 如能从临床上研究证实 NO 供体的抗心肌肥大作用, 这将是一个理论上和应用上的极大突破。

参考文献:

[1] 冯　兵, 陈意生, 何作云, 等. 大鼠压力超负荷早期心肌收缩功能和环核苷酸的动态反应及其意义[J]. 中国病理生理杂志, 1999, 15(4): 296—299.

[2] MacCarthy P A, Shah A M. Impaired endothelium-dependent regulation of ventricular relaxation in pressure-overload cardiac hypertrophy[J]. Circulation, 2000, 101(15): 1 854—1 860.

[3] Grieve D J, MacCarthy P A, Gall N P, *et al*. Divergent biological actions of coronary endothelial nitric oxide during progression of cardiac hypertrophy [J]. Hypertrophy, 2001, 38(2): 267—273.

[4] Pereira L M, Mandarim D L C A. The effect of enalapril and verapamil on the left ventricular hypertrophy and the left ventricular cardiomyocyte numerical density in rats submitted to nitric oxide inhibition[J]. Int J Exp Pathol, 2001, 82(2): 115—122.

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

[5] 冯 兵, 陈意生, 何作云, 等. 压力超负荷大鼠心肌内分泌因子活化及相互作用[J]. 中国应用生理学杂志, 1999, 15(4): 329－331.
[6] Fagan J M, Rex S E, Hayes Licitra S A, *et al*. L-arginine reduces right heart hypertrophy in hypoxia-induced pulmonary hypertension[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 254(1): 100－103.
[7] Simko F, Simko J. The potential role of nitric oxide in the hypertrophic growth of the left ventricle[J]. Physiol Res, 2000, 49(1): 37－46.
[8] Simpson P, McGrath A, Savion S. Myocyte hypertrophy in neonatal rat heart cultures and its regulation by serum and by catecholamines[J]. Circ Res, 1982, 51(7): 787－801.
[9] 冯 兵, 何作云, 王德文, 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.
[10] 李 楠, 邵迎红, 陆庆国, 等. 激光扫描共聚焦显微镜观察硝本地平对肌细胞内钙流动的影响[J]. 中国体视学与图像分析, 1998, 3(4): 224－228.

（编辑 谢义霞）

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2002)12-1422-01

电击伤致癫痫发作 2 例

Two cases report on epilepsy due to electronic injury

王惠玉, 黄河清, 陈 莉 （第三军医大学附属西南医院神经内科, 重庆 400038）

例 1: 男, 22 岁。1999 年工作中被 380 V 电击伤后心跳、呼吸停止约 3 min, 在当地抢救心跳、呼吸恢复后于次日入院。体检: 浅昏迷状态, 血压 13/9 kPa, 心率 100 次/min, 心肺(－)。心肌酶谱: 谷草转氨酶、肌酸激酶均升高。神经系统检查: 肌张力正常, 腱反射正常。病理征(－)。头颅 CT: (－)。入院第 2 天患者苏醒, 述头剧痛。行脑电图(EEG)检查: 各区为 5～6 Hz θ 节律, 间有较多 3 Hz 高幅 δ节律, 另见各区较多阵发长程极高幅棘慢综合波发放。第 3 天患者出现突发意识丧失、全身抽搐, 每次约 5 s, 每日 4～6 次。给予抗癫痫治疗 3 d 后, 每日发作 1～2 次。继续治疗 3 月后, 未出现临床发作, 复查 EEG 仍见各区较多阵发短程极高幅棘慢综合波发放。患者否认即往有癫痫史。

例 2: 女, 10 岁。1996 年被断裂的高压线(电压不详)掉到身上, 当即向后倒地全身抽搐约 10 s 后呼吸、心跳停止。经就地人工呼吸约 8 min 后呼吸、心跳恢复, 昏迷 3 h。清醒后有心悸、胸闷感, 即入院治疗。查体见烧伤创面布于颈、背部及双下肢, 总面积约 6%。其中 III度占 0.5%, 深 II 度占 5.5%。心电图示窦性心律不齐, 心率 100～110 次/min。血压 11/7 kPa。心肌酶谱: 谷草转氨酶、肌酸激酶及同工酶均升高。经对症治疗 20 余天后上述创面愈合。自述头昏, 右侧头部阵发性疼痛, 其母诉患儿时有夜间惊叫并有夜间四肢轻微抽搐, 进而呈阵挛性抽搐, 每次约 4 min, 每周 2～3 次。神经系统检查: (－)。头颅 CT: (－)。EEG: 各区为 9～11 Hz α 节律, 另见各区较多爆发短～长程高幅 4～6 Hz θ 波, 尖波及 3 Hz 高幅 δ波。两侧脑波不对称: 左侧为 α 波, 右侧为 θ 波。给予对症治疗 20 余天后, 患儿头痛略有减轻, 抽搐减少至每月 1 次。复查 EEG: 高幅 δ波及高幅尖波略减少。继续治疗半月后 EEG 无明显好转。

讨论

电击伤后电流进入人体, 主要损害心脏, 引起心血管系统紊乱, 出现心悸、眩晕、意识障碍, 可发生电休克、心跳、呼吸骤停致使脑部缺血缺氧。同时因脑部神经细胞的超限抑制, 引起病人抽搐、昏迷, 其严重程度与触电之电压强度、时间长短有关。

据文献报道, 轻度电击伤者 EEG 改变主要为基本节律的慢化和波幅降低, 一般 2 h 内可恢复正常。严重电击伤者, EEG 可表现基本节律解体, α 波消失, 并出现广泛性不规则高波幅慢活动, 意识恢复后可见 EEG 失对称或局限性改变。当大脑皮层机能减退时, EEG 示脑波频率变慢, 甚至出现慢波; 频率愈慢, 说明大脑皮层机能愈低下。而棘波, 尖波系由于大脑皮层神经元超同步放电的结果, 是癫痫的一种特异性放电; 而有节律性的棘慢波发放, 说明有较广范围的癫痫源性病灶存在, 并与痉挛发作有密切关系[1]。

另有实验表明: 在给鼠电休克后 30 min 测定 EEG, 见杂乱的 θ 活动与被动记忆的损伤明显相关。在动物电休克后强直痉挛发作时, 海马部位出现典型的癫痫样放电[2]。

综上所述, 电击伤对人体大脑的损伤并非是先由电流流过躯体伤及心脏, 使之骤停而致脑缺血缺氧。亦有可能为心脏、大脑同步受损且对大脑的损伤可以是广泛性的, 深部及皮层均可能受累。

本研究 2 例患者 EEG 中痫样放电出现于各区, 即有大脑一侧受损, 异常放电向对侧传递的可能, 亦有广泛受损所致各区均出现异常的可能。同时此 2 例患者除 EEG 均有癫痫样放电外, 均有临床癫痫发作, 提示电击伤可导致大脑皮层神经元异常放电, 并且当临床发作消失或减少后, EEG 仍有癫痫样放电, 说明大脑功能的恢复与临床恢复并非同步。

关键词: 电击伤; 癫痫
中图法分类号: R742.102 文献标识码: B

参考文献:

[1] 黄远桂. 临床脑电图学[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1984. 283－290.
[2] 沈建华. 电惊厥脑电图[J]. 临床脑电学杂志, 1995, 3(1): 44－46.

（编辑 汪勤俭）

作者简介: 王惠玉(1955－), 女, 云南省昆明市人, 副主任技师, 主要从事神经电生理的临床应用方面的研究, 发表论文 20 余篇。电话: (023) 65318301－73072

收稿日期: 2002-07-30; 修回日期: 2002-10-03

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