DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.10.017
第23卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 10
1170 2001年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)10-1170-03

三磷酸肌醇刺激心肌成纤维细胞的增殖

杨永健[1],祝善俊[1],祝之明[2],胡厚祥[2], 丁钢[2], 钟 键[2] (第三军医大学:[1]附属新桥医院心血管内科,重庆 400037;[2]附属大坪医院野战外科研究所高血压-内分泌科,重庆 400042)

提 要:目的 探讨钙调神经磷酸酶(CaN)依赖的信号通路在三磷酸肌醇(IP_3)刺激的乳鼠心肌成纤维细胞(FBs)增殖中的作用。方法 以培养的FBs为模型,用IP_3刺激FBs内Ca^{2+}释放,环孢素A(CsA)阻断CaN,维拉帕米(Ver)阻断FBs钙通道,检测FBs的CaN、丝裂素活化蛋白激酶(MAPK)、蛋白激酶C(PKC)活性,用^{3}H-亮氨酸及^{3}H-胸腺嘧啶掺入量作为反应FBs增殖的指标。结果 IP_3刺激组FBs蛋白核酸合成速率明显增高,与对照组相比差异显著($P<0.01$);CsA及Ver能明显抑制IP_3介导的FBs蛋白核酸合成速率增高,与IP_3刺激组相比差异显著($P<0.01$)。同时发现IP_3刺激组CaN、PKC活性与对照FBs相比差异显著($P<0.05$, $P<0.01$)。CsA和Ver抑制IP_3介导的FBs的CaN活性增高,Ver抑制IP_3介导的FBs的PKC活性增高。结论 CaN在IP_3刺激的FBs增殖中起重要作用,但CaN信号通路不是IP_3刺激FBs增殖的唯一信号通路,其它信号通路也可能参与了IP_3刺激的FBs增殖。

关键词:钙调神经磷酸酶;成纤维细胞;心肌;细胞增殖;信号通路;三磷酸肌醇;环孢素A;维拉帕米
中图法分类号:R322.11;R329.28;R977 文献标识码:A

Proliferation of cardiac fibroblasts stimulated by inositol(1,4,5)-trisphosphate in rats

YANG Yong-jian, ZHU SHAN-jun, ZHU Zhi-ming, HU Hou-xiang, DING Gang, Zhong Jian (Department of Cardiology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To explore the role of calcineurin (CaN)-dependent signaling passway in the proliferation of rat cardiac fibroblasts (FBs) stimulated by inositol(1,4,5)-trisphosphate (IP_3). **Methods** Using the model of cultured rat FBs, Ca^{2+} influx was stimulated with IP_3, CaN signaling pathway was blocked with cyclosporine A (CsA) and Ca^{2+} channel with verapamil(Ver), the activities of FBs CaN, mitogen activated protein kinase (MAPK) and protein kinase C(PKC) were detected, ^{3}H-Leucine(^{3}H-Leu) and ^{3}H-Thymidine(^{3}H-TdR) incorporation was taken as the mark of FBs proliferation. **Results** Synthesis rates for protein and nucleic acid increased significantly in IP_3 stimulated FBs ($P<0.01$). The syntheses of protein and nucleic acid were markedly decreased in CsA and Ver group with a significant difference from IP_3-stimulated group ($P<0.01$). And also decreased FBs CaN activity and also FBs PKC activity were found in CsA/Ver and Ver group respectively. **Conclusion** CaN signaling pathway plays an important role in FBs proliferation induced by IP_3, but it is not the single signaling pathway in regulating FBs proliferation, other signaling pathway may be also involved in FBs proliferation induced by IP_3.

Key words: calcineurin; fibroblasts; myocardium; signaling pathway; inositol(1,4,5)-trisphosphate; cyclosporine A; verapamil; cell proliferation

心肌成纤维细胞(FBs)增殖在心肌纤维化中起重要作用,心肌纤维化又是心功能由代偿向失代偿期转变的重要病理过程[1]。细胞内钙离子([Ca^{2+}]i)的浓度变化是触发细胞增殖相关信号转导的始动因素[2]。钙调神经磷酸酶(Calcineurin, CaN)是一种受Ca^{2+}及钙调素(Calcineurin M, CaM)调节的多功能信号酶,能使活化的T细胞核因子(Nuclear factor of activated T cells, NF-ATc)转位入核,调节核内一系列基因的表达,在心肌细胞肥大过程中起重要作用[3]。CaN信号通路是否参与IP_3介导的FBs增殖,其它信号通路如丝裂素活化蛋白激酶(MAPK)信号通路的激活是否与细胞内[Ca^{2+}]i变化有关,尚不十分清楚。本研究以培养的大鼠FBs为模型,用三磷酸肌醇(IP_3)刺激FBs的Ca^{2+}释放,观察维拉帕米(Ver)阻断FBs钙通道、环孢素A阻断CaN信号通路,对IP_3刺激的FBs CaN、MAPK、蛋白激酶(PKC)活性及蛋白核酸合成速率的影响,为深入了解CaN信号通路及其它信号通路在FBs增殖中的作用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料

Wistar大鼠乳鼠由大坪医院实验动物中心提供;CaN底物PNPP购自杜邦公司;M199、环孢素A(CsA)、IP_3、髓磷脂碱性蛋白(MBP)、磷脂酰丝氨酸、组蛋白III-SS、蛋白酶抑制剂(PMSF等)均购自sigma公司;氚-亮氨酸(^{3}H-Leu)购自中科院上海核技术开发公司;氚-胸腺嘧啶(^{3}H-TdR)购自北京原子能科学研究院。

1.2 FBs培养

取Wistar大鼠乳鼠心脏,置于D-Hanks液中剪碎,0.25%胰酶消化6~7次,每次10 min,所得细胞悬液在孵箱内贴壁30 min,弃细胞悬液瓶底细胞主要为FBs,待细胞长满瓶底后,0.25%胰酶消化传代以保证FBs的数量和纯度。消化的FBs配制成3×10^5个/ml细胞悬液,按每孔1ml接种于24孔板培

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970304, 39225013)
作者简介:杨永健(1965—),男,重庆市万州人,博士,主治医师,主要从事心肌重构的信号转导方面的研究,发表论文6篇。电话:(023)68757745
收稿日期:2000-06-28;修回日期:2000-10-26

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

养测蛋白核酸合成速率, 2 ml 接种于 12 孔板培养测酶的活性, 用 CsA 阻断 FBs CaN 信号通路, 用 Ver 阻断 FBs 钙通道, 按下列分组进行实验。

1.3　实验分组

①对照组: 不加特殊刺激因素; ②IP_3 刺激组: IP_3 10^{-7} mol/L 刺激 FBs, IP_3 浓度参照文献[4]; ③CsA 干预组: IP_3 10^{-7} mol/L+CsA 100 μg/L 刺激 FBs, CsA 浓度参照文献[3]; ④ Ver 干预组: IP_3 10^{-7} mol/L+Ver 10^{-5} mol/L 刺激 FBs, Ver 浓度参照文献[5]。各组刺激时间均为 24 h。

1.4　CaN 活性测定

参照符民桂等[6,7]的方法。每样本底物Ⅰ液测出的值作为磷酸酶的总活力; 底物Ⅱ液测出的值是非 CaN 的其它磷酸酶活力, 两者之差即 CaN 活力, 结果以比活力(A_{410}/mg)表示, 重复 6 次。

1.5　MAPK 和 PKC 活性测定

取细胞提取液, 按李田昌等[8]的方法, 用 γ-^{32}P-ATP 磷酸化底物 MBP 测 FBs MAPK 活性, 酶的活性用 cpm/well 表示, 重复 6 次; 以 γ-^{32}P-ATP 磷酸化 PKC 底物肽, 测 FBs PKC 活性, 酶的活性用 cpm/well 表示, 重复 6 次。

1.6　^{3}H-Leu 和 ^{3}H-TdR 掺入量的测定

消化的 FBs 悬液配制成 3×10^5/ml 个细胞, 接种到 24 孔培养板, 每孔 1 毫升, 放入 CO_2 培养箱, 24 h 后换上无血清培养基培养 12 h, 分组药物刺激, ^{3}H-Leu 和 ^{3}H-TdR 终浓度为 1.85×10^8 Bq/ml 和 3.7×10^7 Bq/ml, 24 h 后收集各孔细胞, 液闪记数, 用放射性同位素 ^{3}H-Leu 和 ^{3}H-TdR 掺入量反应 FBs 增殖。

1.7　统计学处理方法

所有数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间比较进行 t 检验。

2　结果

2.1　FBs 的 CaN 活性

IP_3 刺激组 FBs 的 CaN 活性明显高于对照组($P<0.05$), CsA 和 Ver 可明显抑制 IP_3 刺激的 FBs CaN 活性增高, 与 IP_3 刺激组相比差异显著($P<0.05$), 见表 1。

2.2　FBs 的 MAPK 和 PKC 活性

IP_3 刺激组 MAPK 活性与对照组相比差异无显著性($P>0.05$); Ver 能明显抑制 FBs MAPK 活性, 与 IP_3 刺激组相比差异显著($P<0.05$); IP_3 刺激组 FBs PKC 活性明显高于对照组($P<0.01$), Ver 能明显抑制 IP_3 刺激的 FBs PKC 活性增加($P<0.05$), 见表 1。

表 1　CsA 和 Ver 对 IP_3 刺激的大鼠 FBs 的 CaN、MAPK、PKC 活性的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Effects of CsA and Ver on IP_3 induced increase of CaN、MAPK、PKC activities in rat cardiac fibroblasts ($\bar{x}\pm s$)

Group	n	CaN(A_{410}/well)	MAPK(cpm/well)	PKC (cpm/well)
IP_3	6	0.061±0.003△	4 794±369	4 619±721△△
IP_3+CsA	6	0.042±0.002 *	4 769±293	4 583±610△△
IP_3+Ver	6	0.041±0.005 *	4 174±228 *	3 884±820 *△△
Control	6	0.040±0.001	4 825±248	1 360±291

1 cpm=30 Bq; △: $P<0.05$, △△: $P<0.01$ *vs* control; *: $P<0.05$ *vs* IP_3

2.3　FBs ^{3}H-Leu 和 ^{3}H-TdR 掺入

IP_3 明显提高 FBs ^{3}H-Leu 和 ^{3}H-TdR 掺入量, 与对照组相比差异非常显著($P<0.01$), 而 CsA 和 Ver 可明显抑制 FBs ^{3}H-Leu 和 ^{3}H-TdR 掺入量的增加, 与 IP_3 刺激组相比有非常显著性差异($P<0.01$), 见表 2。

表 2　CsA 和 Ver 对 IP_3 刺激的大鼠 FBs ^{3}H-Leu、^{3}H-TdR 掺入的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Effects of CsA and Ver on IP_3-induced increase of ^{3}H-Leu and ^{3}H-TdR incorporation in cultured rat cardiac fibroblasts ($\bar{x}\pm s$)

Group	n	^{3}H-Leu incorporation(cpm/well)	^{3}H-TdR incorporation (cpm/well)
IP_3	6	1 707±87△△	46 600±1 150△△
IP_3+CsA	6	1 239±71 **△△	38 120±1 015 **△△
IP_3+Ver	6	1 247±81 **△△	41 049±1 798 **△△
Control	6	815±91	31 194±1 801

1 cpm=30 Bq; △△: $P<0.01$ *vs* control; **: $P<0.01$ *vs* IP_3

3　讨论

细胞内 Ca^{2+} 信号的形成涉及细胞外 Ca^{2+} 跨膜内流及内贮 Ca^{2+} 的释放, IP_3 为细胞内钙激动剂, 主要刺激分布在肌浆网(SR)上的 IP_3 敏感受体(IP_3R)及内质网上(ER)的 IP_3R, 释放内贮 Ca^{2+} 进入胞浆, 同时 IP_3 与细胞核被膜的 IP_3R 结合后, 钙通道开放, 使贮存在胞核被膜间隙内的钙释放入核浆及胞浆中[9], 但可以被钙通道阻滞剂如 Ver 阻断。文献[3]报道, 心肌细胞 $[Ca^{2+}]i$ 浓度增高可激活 Ca^{2+} 敏感酶 CaN, 激活的 CaN 使 NF-ATc 去磷酸化并进入胞核, 去磷酸化的 NF-ATc 再与心肌细胞核内的转录因子如锌指转录因子(GATA$_4$, 一种心肌细胞内的特殊转录因子)等相互作用, 活化多种心肌肥厚的相关基因诱导心肌细胞肥大, 免疫抑制剂 CsA(CaN 的特异抑制剂)可抑制 CaN 活性消除心肌肥厚而改善心衰。CaN 是否介导钙激动剂刺激的 FBs 增殖尚不十分清楚。本研究在培养的 FBs 上观察到, IP_3 可使 FBs CaN 活性增加, 同时使 FBs 蛋白核酸合成速率增加, CsA 和 Ver 可明显抑制 IP_3 刺激的 CaN 活性及 FBs 蛋白核酸合成速率增高。表明 CaN 信号通路在 IP_3 刺激的 FBs 的增殖中起重要作用, 细胞 $[Ca^{2+}]i$ 浓度增高可能通过激活 CaN 的激活引起 FBs 的增殖, CsA 可抑制 CaN 活性而抑制 FBs 的增殖, Ver 可阻断 FBs 钙通道, 抑制细胞 $[Ca^{2+}]i$ 浓度增高而抑制 FBs 增殖。

MAPK 是细胞增殖与分化信号转导的共同通路, 是血管平滑肌和心肌细胞中多种信号向核内传递的共同途径, 在血管平滑肌增殖和心肌肥大反应中起重要作用[10,11]。细胞 $[Ca^{2+}]i$ 浓度增高虽可激活 PKC[12], 但是否激活 FBs MAPK 尚不清楚。本研究发现, 与 IP_3 刺激组相比, IP_3+Ver 刺激组的 MAPK 活性降低; IP_3 刺激 24 h 能明显提高 PKC 活性, Ver 能部分抑制 IP_3 介导的 PKC 活性的增高。表明刺激细胞 $[Ca^{2+}]i$ 浓度增高能激活 PKC 介导 FBs 的增殖, 钙通道阻滞剂能抑制 MAPK、PKC 活性而抑制 FBs 增殖。IP_3 刺激 24 h MAPK 活性增高不明显, 可能原因为 MAPK 的激活发

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

生于刺激的早期，而本实验未能检测 IP_3 刺激后 24 h 内 MAPK 活性的变化。

本研究揭示 CaN 信号通路参与了 IP_3 刺激的 FBs 增殖，钙通道阻滞剂和 CsA 可抑制 CaN 活性而抑制 FBs 的增殖，这些结果文献中未见有报道。CaN 信号通路不是 IP_3 介导 FBs 增殖的唯一信号通路，其它信号通路也参与了 IP_3 介导的 FBs 增殖，CaN 与 PKC 和 MAPK 之间的关系值得进一步研究。

参考文献：

[1] Gallagher A M, Bahndon T D, Yu H, *et al*. Species variability in angiotensin receptor expression by cultured cardiac fibroblasts and the infarcted heart [J]. Am J Physiol, 1998, 274(3pt2): H801—809.
[2] Dolmetsch R E, Lewis R S, Goodnow C C, *et al*. Differential activation of transcription factors induced by Ca^{2+} response amplitude and duration[J]. Nature, 1997, 386(6 627): 855—858.
[3] Molkentin J D, Lu J R, Antos C L, *et al*. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy[J]. Cell, 1998, 93(17): 215—228.
[4] Nobuto Ⅰ, Mami N, Yasuhiro K, *et al*. Inositol 1, 4, 5-trisphosphate formation and ryanodine-sensitive receptor subtype[J]. Eur J Physiol, 1995, 4 299(5): 426—433.
[5] 王 玮，李 源，崔致贤 等. 维拉帕米抑制肥厚心肌细胞提取物促心肌细胞生长作用的研究[J]. 第四军医大学学报，1996，17(3)：194—196.
[6] 符民桂，王晓红，姜志胜 等. 钙调神经磷酸酶依赖的信号通路参与血管紧张素Ⅱ刺激的心肌细胞肥大[J]. 生理学报，1999，51(5)：597—601.
[7] 符民桂，唐朝枢. 钙调神经磷酸酶活性测定[J]. 中国动脉硬化杂志，2000，8(1)：78—80.
[8] Li T C, Pang Y Z, Tang C S. Determination for activity of mitogen-activated protein kinase[J]. Bas Med Sci Clin, 1996, 16(3): 155—158.
[9] Berridge M J. Inositol trisphosphate and calcium signaling[J]. Nature, 1993, 361(6140): 315—325.
[10] Lee H W, Eghbali-Webb M. Estrogen enhances proliferative capacity of cardiac fibroblasts by estrogen receptor-and mitogen-activated protein kinase-dependent pathways[J]. J Mol Cell Cardiol, 1998, 30(7): 1 359—1 368.
[11] Rabikin S W, Sunga P S, Sang hera J S, *et al*. Reduction of Angiotensin Ⅱ-induced activation of mitogen-activated protein kinase in cardiac hypertrophy[J]. Life Sci, 1997, 53(11): 955—959.
[12] Takeishi Y, Chu G, Kirkpatrick D M, *et al*. *In vivo* phosphoraylation of cardiac troponi Ⅰ by protein kinase C-beta decreases cardiomyocytes calcium responsiveness and contractility in transgenic mouse hearts[J]. J Clin Invest, 1998, 102(1): 72—78.

（编辑 郭建秀）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2001)10-1172-02

Orem 自护理论在脑出血偏瘫护理中的运用

Application of Orem's self-care theory in nursing hemiplegia patients due to cerebral hemorrhage

黄志玉，潘 莲，黄 莉 （第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所神经内科，重庆 400042）

美国护理学家 Dorothea. E. Orem 提出：自我护理是人类个体为保证生活、维持和增进健康与安定而创造和采取的行为[1]。自护理论中包括三个理论结构：自理结构、自理缺陷结构、护理系统结构。其中的护理系统结构说明了如何通过护理系统帮助个体满足目前正面临的自理需求（即治疗性自理需求），发挥个体最大的自理潜能。目前，脑出血的患病率呈逐年上升趋势，虽然由于治疗方法改进使病死率有所下降，但存活者致残率不断提高。偏瘫是脑出血常见表现之一，使患者自理能力无法满足自理需求。病程早期护理质量的好坏，不仅影响患者的生活质量，还直接影响到患者病情的康复。现将我院 1999 年 10 月至 2000 年 10 月 51 例脑出血偏瘫患者运用 Orem 自护理论的护理体会报告如下。

1 方法与结果

1.1 临床分组

1.1.1 自护理组 51 例，其中男 39 例，女 12 例；年龄 17～83 岁，平均（61±4.9）岁。根据临床症状、体征、头颅 CT（或 MRI）明确诊断。在常规护理基础上，按照 Orem 自护理论予以护理。

1.1.2 常规护理组 20 例，其中男 13 例，女 7 例；年龄 39～77 岁，平均（60.5±6.4）岁。为同期住院的脑出血病人。按照常规护理程序予以护理。两组患者年龄、Barthel 评分无统计学差异（$P>0.05$），见表 1。

1.2 自护理论在不同病程中的运用

1.2.1 急性期 为预防颅内继续出血，患者绝对卧床休息。选择护理系统结构中的全补偿系统，“替”病人完成自理活动，正确摆放患肢位置，防止足下垂。仰卧位时，用软垫支持患者的头、肩、臂、髋部。指导患者健肢带动患肢的活动。每次锻炼 10～20 min，每日 1～3 次，注意患者的心理护理。应充分理解患者，允许患者情感的发泄与表现，予以适度的劝说和安慰，告知患者紧张、焦虑的心理刺激对自身疾病的不良影响，消除消极情绪。

1.2.2 病情平稳期 除提供被动护理外，需要患者采取自理活动。选择部分补偿系统帮助患者完成自理活动。从完全替代护理逐步过度到患者的自我护理。

（下转 1176 页）

作者简介：黄志玉（1970—），女，湖北省荆州市人，主管护师，主要从事急性脑血管病方面的研究。电话：(023)68757343

收稿日期：2001-02-09；修回日期：2001-09-13

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