DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.03.044
第23卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 3
346 2001年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)03-0346-03

去氧肾上腺素对肝细胞内游离钙分布的影响

夏 锋,何振平,李 昆,陈 莉,王小丽 (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)

提 要:目的 探讨去氧肾上腺素对肝细胞内游离钙分布的影响。方法 应用激光扫描共聚焦显微镜观察去氧肾上腺素单独或在酚妥拉明预处理后对肝细胞作用所引起的细胞内荧光强度的变化。结果 去氧肾上腺素对肝细胞作用后可引起细胞内荧光强度的迅速增强。而在酚妥拉明预处理肝细胞后细胞内荧光强度的变化不显著。同时肝细胞内荧光强度的不均匀分布亦表明游离钙的分布存在着亚分区现象。结论 去氧肾上腺素可通过α受体介导肝细胞内钙信号的变化,同时细胞内的钙分布及其动态变化存在一定的特征性。

关键词:去氧肾上腺素;钙;肝细胞
中图法分类号:R322.47;R348.2 文献标识码:A

Effects of phenylephedrine on free calcium distribution in hepatocytes

XIA Feng, HE Zhen-ping, LI Kun, CHEN Li, WANG Xiao-li (Center of Hepatobiliary Surgery of PLA, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the changes of free calcium distribution in hepatocytes after administration of phenylephedrine. Methods The changes of fluorescence intensity were observed by confocal laser scanning microscopy after administration of phenylephedrine alone or pretreated with phentolamine before phenylephedrine administration. Results The fluorescence intensity increased rapidly after administration of phenylephedrine to hepatocytes. When liver cells were pretreated by phentolamine before phenylephedrine administration, the changes of fluorescence intensity not obvious. Meanwhile, the inconformity of the fluorescence intensity in hepatocytes suggested the existence of the second subarea of free calcium distribution. Conclusion Ca^{2+} signal can be arisen by phenylephedrine via the α-receptor in hepatocytes *in vitro*. The distribution and dynamic changes of free calcium in hepatocytes display some characteristics.

Key words: phenylephedrine; Ca^{2+}; liver cell

钙是肝细胞内极其重要的第二信使,游离钙浓度的变化会直接导致 Ca^{2+} 信号的转导从而影响到细胞不同功能的发挥[1]。以前的实验中对钙的观察往往仅局限于对细胞内钙含量的测定,而对细胞内钙的不同分布形态及在外界因素作用下总游离钙含量的动态变化的规律的观察较少。激光共聚扫描焦显微镜可对细胞进行断层扫描及时效性跟踪观察,这样对细胞内游离钙的观察便有了较先进的手段。本研究探讨应用拟肾上腺素类药物去氧肾上腺素刺激α受体,观察肝细胞内游离钙的分布的动态变化,以及应用酚妥拉明阻断α受体后的变化,以明确肝细胞内游离钙分布及其动态变化的特征。

1 材料与方法

1.1 试剂

去氧肾上腺素(Phenylephedrine)(终浓度为10 μmol/L)和酚妥拉明(Phentolamine)(终浓度为10 μmol/L)均购自上海化学试剂公司,DMEM培养基购自美国GIBCOL公司,小牛血清购自本校传染病中心,Fluo-3/AM、F-127均购自美国SIGMA公司。

1.2 细胞培养

人肝组织活体切取标本12例,细胞培养按照我中心实验室常规方法分离培养。肝细胞用DMEM培养基加小牛血清常规培养。

1.3 仪器

激光共聚焦扫描显微镜(德国LEICA公司TCSNT),激光光源为ArKr:488,533,647 nm。细胞观察架(本校组织学与胚胎学教研室提供)。

1.4 方法

在实验前1 d收集肝细胞用培养液稀释至(8~10)×10^7/L,接种于60 mm培养皿中,接种前放入20 mm×20 mm的盖玻片数枚,再加入无血清培养基,使肝细胞贴于盖玻片上生长。于试验前2 h取出盖玻片,用无血清培养基清洗后加入预孵液,内含Fluo-3/AM(终浓度为4 μmol/L)和助染剂F-127(终浓度为1%),预孵1~2 h后,取出盖玻片,用无血清培养基清洗2~3遍,洗掉未进入细胞内的Fluo-3/AM,用观察架固定盖玻片后上镜观察。首先用激光共聚焦扫描显微镜在激发光波长为488 nm条件下扫描处于稳态的细胞,5 min后再加药,动态记录数个肝细胞内钙离子含量变化的荧光图像。或先加酚妥拉明,5 min后用无血清培养基清洗,再加去氧肾上腺素。计录时长5 min,扫描20次。同时应用荧光强度分析软件对图像中不同区域的肝细胞内荧光强度的变化进行分析。

2 结果

2.1 去氧肾上腺素对肝细胞内游离钙浓度的影响

去氧肾上腺素加入后观察了5 min内的图像变化。起初只可见到极少量的荧光亮点,即少数细胞。以15 s间隔扫描后逐渐可见荧光亮点逐渐增多、增强,细胞轮廓也逐渐明显,荧光强度的变化在开始2 min内变化十分明显,强度增加了1倍。这

作者简介:夏 锋(1968-),男,安徽省马鞍山市人,博士,主治医师,讲师,主要从事肝功能评估及肝脏病理生理方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)68754000-73077

收稿日期:2000-03-06;修回日期:2000-09-10

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

表明细胞内游离钙的浓度的增强, 见图 1。

2.2　酚妥拉明阻滞后去氧肾上腺素对肝细胞内钙离子浓度的影响

先加入酚妥拉明后 5 min 再加去氧肾上腺素后可见细胞内荧光强度变化不明显。起初有一轻度增强后又缓慢回落至起始水平, 表明经酚妥拉明预处理后去氧肾上腺素对肝细胞内钙离子浓度的影响不大, 见图 2。

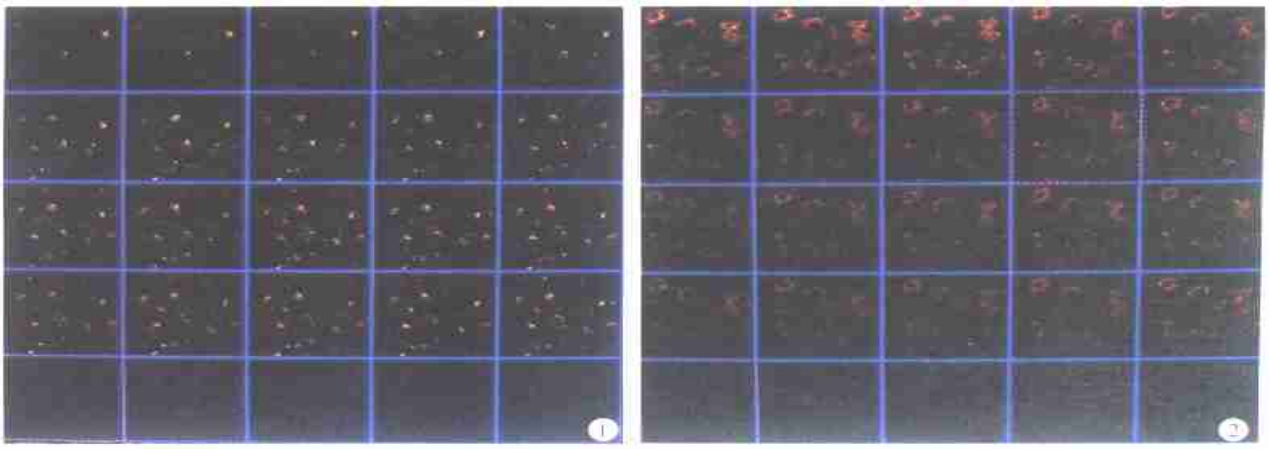


图 1　去氧肾上腺素作用后肝细胞荧光强度的动态变化

Fig 1　Dynamic changes of fluorescence intensity after adminstration of phenylephedrine to hepatocytes

图 2　苯妥拉明预处理后去氧肾上腺素对肝细胞荧光强度的影响

Fig 2　Effects of pretreating with phenylephedrine on the fluorescence intensity after adminstration with phentolamine to hepatocytes

2.3　肝细胞内钙分布的观察

由扫描荧光图可见, 肝细胞内的荧光强度分布是不均匀的, 不同区域的荧光强度不同。胞浆近胞膜区域的分布似乎强于近胞核区域。在药物作用后不同区域的荧光强度变化亦不尽相同。由此表明细胞内存在着钙分布的亚分区现象, 见图 3A、B。

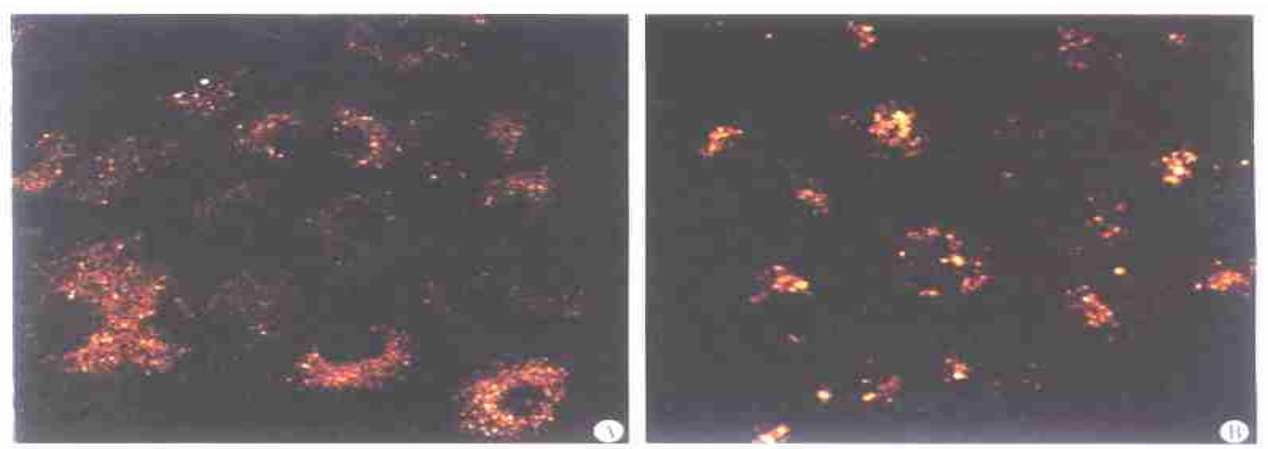


图 3A、B　肝细胞内荧光强度分布的亚分区现象

Fig 3A、B　The second subarea of fluorescence intensity in hepatocytes

3　讨论

正常细胞内游离钙浓度为 50 ~ 150 nmol/L, 胞外钙离子浓度为 1.2 ~ 1.3 mmol/L, 相差达 10 000 倍。胞外钙内流和胞内钙库动员形成的钙震荡(钙峰或钙波)在各种生理过程中起重要作用[2]。肝脏中存在着大量的神经末稍, 其中 80%是交感神经, 主要分泌儿茶酚胺类神经递质。去氧肾上腺素是儿茶酚类的一种, 其作用机制是与细胞表面 α 受体结合从而动员细胞内钙释放, 使细胞内游离钙浓度升高, 从而引发一系列信号变化机制。本实验应用荧光染料 Fluo-3 的乙酰羟甲基酯(AM)的形式来显示胞内游离钙。Fluo-3/AM 的本身或游离状态均无荧光, 与钙结合后荧光增强 50 ~100 倍, 为所有钙荧光探针中变化最大者。Kd 值为 400 nmol/L, 可用于测量高达 5 ~ 10 μmol/L 的胞内钙。但 Fluo-3 和钙结合后所显示的荧光强度并不与钙的含量成正比, 不能用它来测量钙的浓度。从实验中可见去氧肾上腺素作用后, 在前 2 min 内反应强烈, 可使胞内荧光强度迅速升高一倍, 并维持较长时间。这种钙

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

振荡波形在反复试验后发现为一种特征性变化。而在酚妥拉明阻滞α受体后，去氧肾上腺素作用明显减弱，基本不引起荧光强度的明显变化。在扫描图中还可观察到细胞内钙的亚分区现象，这可能与细胞内细胞器的分布及存在不同功能区域相关，钙分布的不同可能存在着不同的作用机制[3]。最近 Rasmussen 等提出了 Ca^{2+} 信号的"时空模型"(Spatial-temporal model)。认为 Ca^{2+} 作为信号有严格的时间顺序、空间顺序和限制。在反应的初始阶段和持续阶段，Ca^{2+} 信号起作用的空间区域不一样。本实验表明应用激光共聚焦扫描显微镜来观察细胞内钙分布的变化有明显的优点，将有利于细胞内信号机制的进一步阐明[4]。

参考文献：

[1] Tsugorka A, Rios L A. Imaging elementary events of calcium release in ske-letal muscle cells[J]. Science, 1995, 269(): 1 723—1 726.

[2] Isobe M, Katsuramaki T, Hirata K, *et al*. Beneficial effects of inducible nitric oxide synthase inhibitor on reperfusion injury in the pig liver[J]. Transplantation, 1999, 68(6): 803—813.

[3] Taggart M J, Lee Y H, Morgan K G. Cellular redistribution of PKCα, rhoA, and ROKα following smooth muscle agonist stimulation[J]. Exp Cell Res, 1999, 251(1): 92—101.

[4] Jaggar J H, Stevenson A S, Nelson M J. Voltage dependence of Ca^{2+} sparks in intact cerebral arteries[J]. Am J Physiol, 1998, 274(6 Pt 1): C1 755—1 761.

(编辑 汪勤俭)

经验与短篇

文章编号：1000-5404(2001)03-0348-01

93 对新生儿及其生母血铅水平观察

Measurement of blood plumbum levels in newborns and their mothers

赵文利，孔祥英，刘力健 （第三军大学附属西南医院儿科，重庆 400038）

我们对在我院出生的部分新生儿脐血及其母亲静脉血铅含量进行测定，并探讨二者关系，以期为早期阻断宫内铅暴露提供依据。

1 对象和方法

对象：1998年7月至8月在我院出生的健康新生儿及其生母93对。

标本采集：新生儿出生时取脐静脉血同时取其母静脉血各1 ml，置于肝素抗凝管中密闭冷藏待测。所用注射器试管均经特殊处理以预防铅污染。

全血铅测定采用微量血无火焰原子吸收光谱法测定。

统计学处理方法：血铅水平用 $\bar{x}\pm s$ 表示，t 检验，相关性分析。

2 结果

93对母子血铅均值分别为(87.98±37.71) μg/L、(103.45±38.69) μg/L，二者相关性分析显示显著正相关($r=0.43$, $P<0.01$)。新生儿脐血铅含量>100 μg/L共50例，占53.76%，最高值为232 μg/L。孕妇血铅水平均<300 μg/L，均未达到成年人生理阈限值(300 μg/L)，无一例铅中毒。

3 讨论

研究证实血铅水平≥100 μg/L，将影响儿童的生长发育，因此美国等许多发达国家均已通过立法强制进行6岁以上儿童血铅水平的筛查，但是新生儿血铅调查尚缺乏可靠的数据。本研究发现，重庆市区新生儿血铅均数在103.45 μg/L，其中高于或等于目前国际公认的儿童铅中毒诊断标准的比例为53.76%。这一平均血铅值远高于目前美国儿童的血铅水平36 μg/L[1]，也高于无锡[2]儿童平均血铅水平(86.07±31.53) μg/L和兰州[3]新生儿血铅均值71 μg/L。提示生命在早期阶段已受到铅的危害是相当普遍的现象。

成人的生理阈限值为300 μg/L[4]，本此调查孕妇血铅均值为87.98 μg/L，无1例超过此阈值，可见孕妇尚无铅中毒。但是，正是这群孕妇娩出的新生儿中铅中毒者比例为53.76%。新生儿脐血铅水平明显高于母血铅，相关性分析显示二者显著正相关($r=0.43$, $P<0.01$)，提示新生儿脐血铅随着母血铅升高而增高。已有研究表明胎盘对血铅无屏障功能，如果考虑到胎儿宫内铅暴露的生物阈限值，则现行成年女性血铅阈值是否值得商榷。

关键词：全血铅；铅中毒；母静脉血

中图法分类号：R446.11 文献标识码：B

参考文献：

[1] Pirkle J L, Brody D J, Gunter E W, *et al*. The decline in blood levels in the United States. JAMA, 1994, 272(4): 284—291.

[2] 陈雅芬，蒋新液，李兆康 等. 儿童血铅水平对智商的影响分析[J]. 中国妇幼保健, 2000, 15(6): 376—377.

[3] 雷晓燕，熊海金. 新生儿血铅水平与环境因素的相关性研究[J]. 中华儿科杂志, 2000, 38(6): 373—376.

[4] 吕 京，崔 涛，谢广云 等. 低浓度铅负荷妊娠母鼠及仔鼠体内铅的动态观察[J]. 中华儿科杂志, 1998, 36(8): 498—490.

(编辑 王 红)

作者简介：赵文利(1973—)，女，重庆市人，硕士研究生，医师，主要从事哮喘治疗机制方面的研究 电话：(023)68753765

收稿日期：2000-04-17；修回日期：2000-10-25

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