DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.04.014

论著

文章编号:1000-5404(2000)04-0334-04

钙增敏剂MCI-154对内毒素休克大鼠心肌钙敏感性的影响

梅建民,胡德耀,陈惠孙,刘良明,肖 南,卢儒权 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第二研究室,重庆 400042)

提 要:目的 研究钙增敏剂对内毒素休克大鼠心肌钙敏感性的影响。方法 利用皂素溶液浸浴假休克或内毒素休克大鼠右心室乳头肌,制备裸露心肌纤维标本,用不同pCa(-log[Ca^{2+}])的含或不含强心药物的激活液进行顺序激活,记录Ca^{2+}激活张力。结果 同假休克组相比,内毒素休克大鼠裸露乳头肌钙最大激活张力(T_{max})明显降低,张力-pCa曲线向右移位,曲线中位值pCa_{50}(产生50%T_{max}所对应的pCa)降低。甲腈吡酮对上述异常无明显的纠正作用。内毒素休克大鼠裸露乳头肌经含1×10^{-5} mol/L的MCI-154的激活液处理后,T_{max}明显增加,张力-pCa曲线向左移位,pCa_{50}值增加,明显高于内毒素休克组和Milrinone组值,接近假休克组值。MCI-154的上述作用还具有剂量依赖性。结论 大鼠内毒素休克后,心肌收缩蛋白对钙的敏感性降低,MCI-154可明显增加内毒素休克大鼠心肌收缩蛋白对钙的敏感性,增加心肌钙最大激活张力。

关键词:内毒素休克;裸露乳头肌;钙增敏剂;MCI-154;大鼠
中图法分类号:R631.405.3 文献标识码:A

Effects of calcium sensitizer on myocardial calcium sensitivity during endotoxic shock in rats

MEI Jian-ming, HU De-yao, CHEN Hui-sun, LIU Liang-ming, XIAO Nan, LU Ru-quan (Research Institute of Field Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To study the effects of calcium sensitizer MCI-154 on myocardial sensitivity to calcium during endotoxic shock in rats. **Methods** Papillary muscle of the right venticle of rats with sham shock or endotoxic shock was incubated in saponin solution to prepare the specimen of naked myocardial fibers. The tension of naked myocardial fibers was recorded after they were activated sequentially with different pCa(-log[Ca^{2+}]) activating solutions with or without cardiotonic agents. **Results** The maximal activated tension (T_{max}) of the naked fibers of papillary muscle was significantly lower in the rats with endotoxic shock than in those with sham shock. The curve of Tmax-pCa relationship was shifted rightward. pCa_{50} of the curve (the value of pCa to produce 50% T_{max}) was reduced in the endotoxic group. Milrinone was unable to correct the above abnormalities. When the naked fibers of the papillary muscle of the rats with endotoxic shock were treated with the activating solution containing 10^{-5} mol/L NCI-154, the T_{max} was significantly increased and the Tmax-pCa relationship curve was shifted leftward. And the value of pCa_{50} was increased correspondingly approaching to that of the sham shock group. Such effect of MCI-154 was concentration-dependent. **Conclusion** The sensitivity o myocardial contractile protein to calcium is decreased in the rats with endotoxic rats. MCI-154, a calcium sensitizer, is able to reverse the decreased sensitivity significantly and increase the Tmax of the myocardium.

Key words: endotoxic shock; naked fiber; papillary muscle; calcium sensitizer; MCI-154; rat

研究显示[1],内毒素休克后,心肌细胞对钙敏感性降低是心肌收缩功能降低的原因之一。钙增敏剂可通过与心肌肌钙蛋白钙结合亚单位(TnC)Ca^{2+}结合位点相互作用,增加TnC对钙的亲和力,增强心肌收缩力,改善心功能[2~4]。但有关钙增敏剂对内毒素休克心肌钙敏感性的作用效果如何尚未见报道。我们先前的研究发现,钙增敏剂MCI-154用于内毒素休克家兔的治疗时,能明显改善心功能,对内毒素休克所引起的循环

基金项目:全军"九五"攻关项目(96L041)
作者简介:梅建民(1966-),男,湖北省麻城市人,博士,主治医师,主要从事休克的病理生理及防治方面的研究,发表论文17篇,现在北京军区总医院肝胆外科工作,北京 100700.
电话:(010)66721629-8090
收稿日期:1999-09-25;修回日期:2000-01-14

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

紊乱有一定的纠正作用[5,6]。为进一步探讨钙增敏剂改善内毒素休克机体心功能的机制,本试验研究了 MCI-154 对内毒素休克心肌钙敏感性的影响。

1　材料与方法

1.1 大鼠内毒素休克模型

Wistar 大鼠,体重 120~150 g,雌雄不拘,试验前随机分组,内毒素休克模型按本实验室常用方法完成,即 10 mg/kg 大肠杆菌内毒素(Endotoxin, O111:B4, Sigma)腹腔内注射,8 h 后进行实验。假休克组腹腔内注射同 10 mg/kg 内毒素等容量的生理盐水。

1.2　大鼠裸露乳头肌的制备

参照黄焰等[7]的方法进行。断头活杀大鼠,迅速开胸取心脏置于连续通气(95%O_2 和 5%CO_2)的 25℃ 生理盐水溶液中,成份(mmol/L):NaCl 130, KCl 4, $CaCl_2$ 2.5, Glucose 10, Tris 10, pH 7.0。剪开右心室,用小剪刀游离一束直径小于 1 mm 的乳头肌,结扎腱端,游离后放入高精度离体乳头肌灌流槽,肌端固定于肌槽不锈钢拉钩上,腱端与高精度等长张力换能器(Stathan UC2, Gould, USA)连接,肌肉收缩的张力信号经载波放大器(AP-600G)输入四道记录仪(RM6200 型,日本光电公司)进行描记记录。肌肉在 25℃ 生理盐液中平衡 15 min 后,先用 25℃ 含皂素(Saponin)的蜕膜液(Skinned solution)作 30 min 浸浴处理,再用 25℃ 无钙松弛液(Relaxing solution)洗去蜕膜液,逐步调节肌肉长度至 130%自然长度,稳定 10 min 后,进行下一步实验。

1.3　大鼠裸露乳头肌钙敏感性的测定

动物分为 4 组,每组 8 只,分别为:①假休克组(Ⅰ组);②内毒素休克组(Ⅱ组);③甲脯吡酮组(Ⅱ组),动物处理同②组,灌流裸露乳头肌的激活液(Activating solution)含 5×10^{-5}mol/L 的甲腈吡酮;④MCI-154 组(Ⅳ组),动物处理同②组,灌流裸露乳头肌的激活液中含 1×10^{-5}mol/L 的 MCI-154(本实验室结果:MCI-154 增加正常大鼠乳头肌收缩力的效价约为甲腈吡酮的 5 倍)。依次用 $pCa(-\log[Ca^{2+}])$为 7.0、6.5、6.0、5.5、5.0、4.5、4.0 的含或不含强心药物的激活液(25℃)灌流裸露乳头肌,每一个 pCa 点大约作用 5 min 后,再开始下一个 pCa 液。实验结束后,用滤纸吸干乳头肌表面液体并称重(mg),测量乳头肌长度(mm),按肌肉比重 1.0 计算出乳头肌横截面积(CSA),乳头肌产生的张力经 CSA 校正后获得张力数据(mN/mm^2)。以每条乳头肌在 pCa 4.0 时的张力为最大收缩力(T_{max}),其它 pCa 点张力值除以 T_{max} 算出 pC 点的相对张力(%),然后以相对张力为纵轴,pCa 为横轴,按 Hill 方程:$T=[Ca^{2+}]^n/(K_e+[Ca^{2+}]^n)$,进行回归可得张力-pCa 曲线。方程中 T 为相对张力,即不同 pCa 的张力与 T_{max} 的百分比,n 为回归斜率,K 为待求的 Hill 系数,为产生 50%T_{max} 的 Ca^{2+} 浓度,其负对数(−logK)即为 pCa_{50}。pCa_{50} 值是衡量 TnC 钙敏感性的定量指标[7]。

1.4　不同浓度的 MCI-154 对内毒素休克大鼠裸露乳头肌钙敏感性的影响

动物分成 3 组,每组 8 只:①$10^{-6}$mol/L MCI-154 组(a 组);②:10^{-5}mol/L　MCI-154 组(b 组),同 1.3 中的Ⅳ组;③$10^{-4}$mol/L MCI-154 组(c 组)。①组每个 pCa 点含 10^{-6}mol/L 的 MCI-154;②组每个 pCa 点含 10^{-5}mol/L 的 MCI-154;③组每个 pCa 点含 10^{-4}mol/L 的 MCI-154。实验操作步骤及数据处理同 1.3。

1.5　液体配制

松弛液:成份(mmol/L)KCl 140, $MgCl_2$ 5, EGTA 10,咪唑 25, Na_2ATP 5,磷酸肌酸(CP)10,磷酸肌酸激酶(CPK)0.1 mg/ml, pH 7.2;蜕膜液:在松弛液中加入 500 μg/ml 的皂素;激活液:在松弛液中加入不同浓度的 $CaCl_2$,根据确定的 pCa 值计算出溶液中所需的 $CaCl_2$ 量,计算过程采用 Fabiato"computer programs for calculating total"计算程序(湖南医科大学心血管生理学研究室提供)完成。实验用溶液均用双蒸水当日配制,4℃ 冰箱保存,其中 Na_2ATP、CP、CPK 在临用前加入,溶液 pH 用 1 mol/L KOH 调至 7.2,药品用 1/10 万电子天秤称量。皂素、CP、CPK、$CaCl_2$、EGTA、Na_2ATP 均为 Sigma 公司产品,MCI-154 由第二军医大学药学院提供,Milrinone 购自重庆医学工业公司,其它试剂均为分析纯。

1.6　统计学处理

实验结果经统计学处理后以 $\bar{x}\pm s$ 表示,用 t 检验分析不同组间的差异性。

2　结果

2.1　MCI-154 对内毒素休克大鼠裸露乳头肌钙反应性的影响

各组大鼠乳头肌重量、长度、CSA 均无明显差别($P>0.05$),各组 T_{max} 见表 1。Ⅱ和Ⅱ组 Tmax 均低于Ⅰ组($P<0.05$),Ⅳ组 Tmax 明显高于Ⅱ和Ⅱ组($P<0.05$),与Ⅰ组 T_{max} 无明显差别($P>0.05$)。各组张力-pCa 曲线均呈 S 形,见图 1,Ⅱ组 pCa 6.5~4.5 点上的相对张力明显低于Ⅰ组($P<0.05$, 0.01),曲线向右移位;Ⅱ组 pCa 6.5~4.5 点上的相对张力亦明显低于Ⅰ组($P<0.05$),且与Ⅱ组无明显差别($P>0.05$),曲线亦向右移位;Ⅳ组 pCa 6.5~4.5 点上的相对张力上升的幅度明显增加,显著高于Ⅱ和Ⅱ组值($P<0.05$, 0.01),接近假休克组。各组 pCa_{50} 值见表 1,Ⅱ、Ⅱ组 pCa_{50} 值明显低于Ⅰ组($P<0.05$),Ⅳ组 pCa_{50} 明显高于Ⅱ及Ⅱ组($P<0.05$),与Ⅰ组无明显差别($P>0.05$)。

2.2　MCI-154 的剂量依赖效应

3 组 T_{max} 分别为(mN/mm^2):a 组:19.63±1.71;b 组:21.30±1.77;c 组:21.78±19.91。b 和 c 组 T_{max} 明显高于 a 组($P<0.05$)。各组张力-pCa 曲线呈 S 形,见图 2,b 组 pCa 6.5、6.0、5.5、5.0 点上的相对张力高于 a 组($P<0.05$);c 组 pCa 6.5~4.5 点上的相对张力明显高于 a 组($P<0.05$、$P<0.01$),且 pCa 6.5、6.0、5.5 点上的相对张力高于 b 组($P<0.05$)。3 组的 pCa50 值分别为:a 组:5.72±0.28;b 组:5.84±0.19;c 组:6.15±0.22。c 组 pCa_{50} 值高于 a 及 b 组($P<0.05$),b 组 pCa_{50} 值亦高于 a 组($P<0.05$)。

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

表1 甲腈吡酮和MCI-154对内毒素休克大鼠裸露心肌 T_{max}、pCa_{50}值的影响

Tab 1 Effects of milrinone and MCI-154 on maximal activated tension(T_{max}), Ca^{2+} sensitivity (pCa_{50}) of naked right ventricular papillary muscles in endotoxic shock rats

	Group			
	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ
T_{max} (mN/mm^2)	22.12±1.62	18.47±1.70#	19.01±2.18#	21.30±1.77*
pCa_{50}	5.82±0.18	5.47±0.16#	5.49±0.21#	5.84±0.19*

Ⅰ: Sham shock group; Ⅱ: Endotoxic shock group; Ⅲ: Milrinone group; Ⅳ: MCI-154 group; #: $P<0.05$ *vs* Ⅰ; *: $P<0.05$ *vs* Ⅱ and Ⅲ

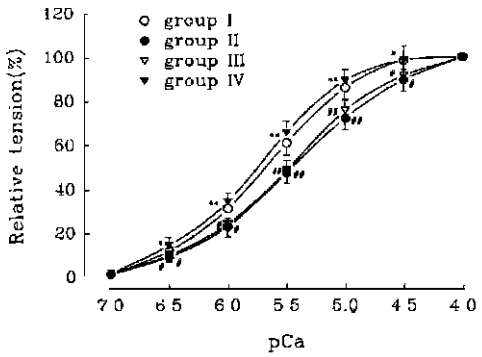


图1 MCI-154和Milrinone对内毒素休克大鼠裸露乳头肌张力-pCa曲线的影响

Fig 1 Changes of relative tension (%) of naked papillary muscles from endotoxic shock rats following administration of milrinone or MCI-154

#: $P<0.05$, ##: $P<0.01$ vs Ⅰ; *: $P<0.05$ vs Ⅱ and Ⅲ

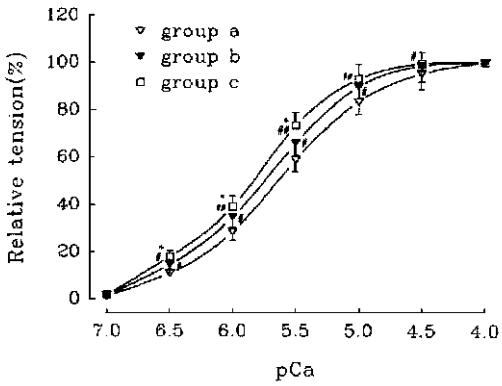


图2 不同浓度的MCI-154对内毒素休克大鼠裸露乳头肌张力-pCa曲线的影响

Fig 2 Effect of MCI-154 of different concentration on relative tension (%) of naked papillary muscles from endotoxic shock rats

a: 1×10^{-6} mol/L MCI-154 group; b: 1×10^{-5} mol/L MCI-154 group; c: 1×10^{-4} mol/L MCI-154 group; #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$ *vs* a; *: $P<0.05$ *vs* b

3 讨论

利用皂素制备的心肌标本,心肌肌膜、肌浆网膜和线粒体膜上的胆固醇被溶解,膜上出现小孔,Ca^{2+}、ATP、EGTA等小分子可自由出入,而线粒体、肌浆网内的酶不能流出[8]。这样就消除了灌流液与心肌细胞之间的离子屏障,细胞内也不具备调节钙离子浓度的能力,灌流液中的钙浓度相当于完好肌纤维的细胞内浓度,灌流液中的钙能直接作用于收缩蛋白成份,触发肌张力的变化。此方法既可确定钙敏感性指标pCa_{50},同时又能进行肌肉收缩功能的研究[7],因而,是目前研究强心药物钙增敏效果的常用制备[8]。

本实验利用裸露乳头肌制备,研究了大鼠内毒素休克后心肌收缩蛋白钙敏感性的变化,结果显示:内毒素休克后,大鼠裸露乳头肌钙最大激活张力降低,张力-pCa曲线向右移位,曲线的pCa_{50}值明显低于假休克组。这些结果表明内毒素休克后,心肌收缩蛋白对钙的敏感性降低。这与很多利用离体心肌条和心肌细胞进行的实验结果一致。有关脓毒症/感染性休克时心肌收缩蛋白对钙敏感性降低的机制目前尚不清楚,可能与下列因素有关:①脓毒症/感染性休克时心肌缺血缺氧[9],心肌能量供应和利用障碍可能是原因之一。心肌缺血缺氧后,肌酸激酶活性降低,激活肌酸激酶的底物ADP受限,导致横桥(Cross bridge)周围无机磷的积聚,使横桥循环从强结全状态变为弱结合状态,钙激活引起的心肌收缩力降低[3]。②可能与脓毒症/感染性休克时发生的机体内酸中毒,特别是心肌细胞内酸中毒有关,心肌细胞内酸中毒后,H^+与Ca^{2+}竞争TnC上的钙结合位点,引起TnC对钙的亲和力降低[3]。③可能与钙超载有关。脓毒症/感染性休克后,心肌细胞内发生钙超载[10],心肌细胞钙超载后,心肌收缩和舒张期钙波动的正常生理变化发生异常,心肌收缩蛋白激活呈现不一致性,外钙激活引起的整体收缩力降低。可见,脓毒症/感染性休克时,很多因素可导致心肌收缩蛋白对钙敏感性的降低,因此,提高心肌收缩蛋白对钙的敏感性,同时避免进一步加重心肌细胞内钙超载,对增加心肌收缩力,改善脓毒症/感染性休克机体的心功能是很有意义的。但目前临床上使用的强心药都不具备此功能[4]。本实验亦显示磷酸二酯酶抑制剂类强心药甲腈吡酮作用于内毒素休克大鼠裸露乳头肌后,不能提高裸露乳头肌在pCa 7.0~4.5点上的相对张力,不能纠正pCa-张力曲线向右移位,曲线的pCa_{50}值明显低于假休克组,与不加药物的内毒素休克组无明显区

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

别。与甲腈吡酮相反,MCI-154 却可使内毒素休克大鼠裸露乳头肌 T_{max} 及 pCa 7.0~4.5 浓度点上的相对张力增加,曲线向左移位,pCa_{50} 值明显升高。MCI-154 的上述作用还具有剂量依赖效应。上述结果表明:同作用于正常心肌一样,MCI-154 用于内毒素休克心肌后,亦能提高 TnC 对钙的亲和力,纠正心肌收缩蛋白对钙敏感性的降低。这可能是 MCI-154 用于内毒素休克治疗后,增加心肌收缩力,改善心功能的最主要机制。本研究提示,在治疗脓毒症/感染性休克时,钙增敏剂可能较目前临床上应用的传统强心药更具优越性,更符合治疗逻辑。

(致谢:感谢湖南医科大学心血管生理学研究室黄焰博士的大力支持!)

参考文献:

[1] Hung J, Lew W Y W. Cellular mechanisms of endotoxin-induced myocardial depression in rabbits[J]. Circ Res, 1993, 73(1):125—134.

[2] Kitada Y, Kobayashi M, Narimatsu A, et al. Potent stimulation of myofilament force and adenosine triphosphatase activity of canine cardiac muscle through a direct enhancement of troponin C Ca^{2+} binding by MCI-154, a novel cardiotonic agent [J]. J Pharmacol Exp Ther, 1989, 250(1):272—277.

[3] Kitada Y. MCI-154, a cardiac Ca^{2+} sensitizer, reverses the depression in maximal Ca^{2+}-activated force by inorganic phosphate and acidic pH in skinned fibers of guinea pig heart[J]. Cardiovasc Drugs Ther, 1997, 11(5):611—618.

[4] Mathew L, Kats S D. Calcium sensitising agents in heart failure[J]. Drugs Aging, 1998, 12(3):191—204.

[5] 梅建民,胡德耀,陈惠孙,等 . 钙增敏剂 MCI-154 对内毒素休克家兔心功能的影响[J]. 第三军医大学学报,1998,20(3):194—196.

[6] 梅建民,胡德耀,陈惠孙,等 . 钙增敏剂 MCI-154 对内毒素休克家兔治疗作用的实验研究[J]. 第三军医大学学报,1998,20(6):492—495.

[7] 黄　焰,贺振翻,　李云霞 . 大鼠皂素蜕膜心肌肌钙蛋白 Ca^{2+} 敏感性的实验研究[J]. 中国应用生理杂志,1996,12(1):1—5.

[8] Miller D J, Steele D S. The 'calcium sensitising' effects of ORG 3009 in saponin or Triton-skinned rat cardiac muscles[J]. Br J Pharmacol, 1990, 100:843—849.

[9] Groeneveld A B, van Lambalgen A A, van-den Bos G C, et al. Maldistribution of heterogeneous coronary blood flow during canine endotoxic shock[J]. Cardiovasc Res, 1991, 25(1):80—88.

[10] 董林旺,佟利家,张　力,等 . 败血症休克时心肌和心肌线粒体钙转运的变化[J]. 生理学报,1993,45(2):158—163.

(编辑　冷怀明)

(上接 333 页)

2　结果

80 例可评价疗效的患者中 CR 4 例、PR 32 例、NC 30 例、PD 14 例。CR+PR 为 36 例,总有效率为 45%。其中肺腺癌 CP+PR 为 25 例,有效率 49%;肺鳞癌 CR+PR 为 11 例,有效率 37.9%。CR 者缓解期 4~16 个月,中位缓解期 6.2 个月,PR 者缓解期 3.4~5.6 个月,中位缓解期 4.2 个月。

不良反应含 VDS 联合化疗方案的不良反应为骨髓抑制、消化道反应、脱发、末梢神经炎。

3　讨论

非小细胞肺癌由于对多种抗肿瘤药物不敏感,如何改进方案,提高疗效仍是目前国内外临床专家研究的课题。既往常用的 CAP 方案的有效率在 28%,PE 方案的有效率在 32%[1]。最近国内有报道[2] CAP 方案有效率也可达 46.8%,但由于 CAP 方案含有 ADM,引起心脏毒性,对已存在心脏功能异常的患者尤为不利,限制了临床的使用。我们对含 VDS+顺铂的化疗方案应用于临床治疗 NSCLC 总有效率在 45%,比过去的方案有效率有提高,与国内外结果相近[2~4]。我们认为含 VDS 的联合化疗方案对 NSCLC 有较好疗效,特别是腺癌,可以作为首选化疗方案。

本组病人在用药中采用快速滴注,液体快速冲洗再加用激素滴注的方法,使药物尽快进入大静脉,减轻了药物对血管壁的刺激,因此静脉炎少见。VDS 治疗 NSCLC 疗效肯定,血液学毒性及神经毒性较长春新碱及长春花碱轻,与 CAP 方案比较无心脏毒性,值得临床推广应用。

关键词:非小细胞肺癌;长春地辛
中图法分类号:R734.2,R730.53　　文献标识码:B

参考文献:

[1] 汤钊猷 . 现代肿瘤学[M]. 上海:上海医科大学出版社,1993.638.

[2] 熊建萍,王韵倩,周绪堂 .VDS-DDP 方案与 CAP 方案治疗非小细胞肺癌的疗效比较[J]. 中国肿瘤临床,1997,24(2):118—121.

[3] Folman R S. Experience with mitomycin in the treatment of Non-small cell lung cancer[J]. Oncolgy, 1993, 50(1):24—30.

[4] 徐光川,管忠震 . 硫酸长春地辛Ⅱ期临床试验总结[J]. 癌症,1998,17(3):197—200.

(编辑　薛国文)

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