DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.06.013
第22卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 6
2000年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2000

文章编号:1000-5404(2000)06-0541-04

论著

肾上腺素、异丙肾上腺素及三磷酸腺苷对大鼠心肌细胞 Cl^-/HCO_3^- 交换的增强作用及其意义

黄 坚[1],夏前明[1],钱桂生[1],李隆贵[2] (第三军医大学附属新桥医院:[1]全军呼吸内科研究所;[2]心血管内科;重庆 400037)

提 要:目的 研究肾上腺素、异丙肾上腺素及三磷酸腺苷对大鼠心肌细胞阴离子交换蛋白 Cl^-/HCO_3^- 交换活性的影响,探讨其病理生理意义。方法 计算机辅助微量荧光检测法测定培养的正常及心衰心肌细胞 Cl^-/HCO_3^- 交换活性。结果 心衰心肌细胞 pHi 的恢复斜率大于正常心肌细胞,肾上腺素、异丙肾上腺素及三磷酸腺苷对碱负载的正常及心衰心肌细胞 pHi 的恢复斜率均分别显著大于对照。结论 心衰心肌细胞 Cl^-/HCO_3^- 交换活性大于正常心肌细胞,肾上腺素、异丙肾上腺素及三磷酸腺苷增强了正常及心衰心肌细胞 Cl^-/HCO_3^- 交换活性。

关键词:Cl^-/HCO_3^- 交换;阴离子交换蛋白;肾上腺素;异丙肾上腺素
中图法分类号:R322.11;R977 文献标识码:A

Intensifying effect of adrenaline, isoprenaline and ATP on Cl^-/HCO_3^- exchange in cardiac myocytes of rats and its significance in rats

HUANG Jian, XIA Qian-ming, QIAN Gui-sheng, LI Long-gui (Research Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To study the intensifying effect of adrenaline, isoprenaline and ATP on the exchanging activity of Cl^-/HCO_3^- of the anion exchanger of rat cardiomyocytes and its pathophysiological significance. Methods The exchanging activity of Cl^-/HCO_3^- of the anion exchanger was examined with computer-assisted microfluorescence technique. Results The recovery rate of pHi from base loading was larger in the myocardial cells in congestive heart failure (CHF) than in normal cardiac myocytes. After the treatment of adrenaline, isoprenaline and ATP, the recovery rate of pHi from base loading was larger in the normal cardiomyocytes and the myocardial cells in CHF than in the control without the treatment of 3 agents. Conclusion The exchanging activity of Cl^-/HCO_3^- is larger in the myocardial cells in CHF than in normal cardiomyocytes. The administration of adrenaline, isoprenaline and ATP can intensity the exchanging activity of Cl^-/HCO_3^- in both normal and diseased cardiac myocytes.

Key words: Cl^-/HCO_3^- exchange; anion exchanger; adrenaline; isoprenaline

心肌细胞 pHi(intracellular pH)影响心肌兴奋-收缩偶联、跨膜信号转导、Ca^{2+} 稳态、代谢及生长过程。Cl^-/HCO_3^- 交换是心肌细胞唯一的排碱机制[1]。近年来发现心肌细胞存在一种带3样蛋白,初步研究提示它具有 Cl^-/HCO_3^- 交换功能,泵出 HCO_3^-,同时泵入 Cl^-,使细胞内酸化[2~4]。但有关报道甚少。本实验采用计算机辅助微量荧光法研究肾上腺素、异丙肾上腺素及三磷酸腺苷对正常及心衰大鼠心肌细胞阴离子交换蛋白 Cl^-/HCO_3^- 交换活性的影响,并探讨其意义。

1 材料与方法

1.1 研究对象

1.1.1 培养2~3周的大鼠心肌细胞 来自正常成年 Wistar

作者简介:黄 坚(1965—),男,博士,主治医师,讲师,主要从事心力衰竭发病机制及防治方面的研究,发表论文10篇,现在第四军医大学流行病学教研室 西安,710032。电话:(023)68755603

收稿日期:2000-01-05;修回日期:2000-03-10

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

大鼠，共30只，体重150～250 g，雌雄不拘。

1.1.2 心衰心肌细胞 来自冠脉结扎心肌梗塞愈后心衰大鼠，共26只，体重200～300 g，雌雄不拘。

1.2 主要试剂及仪器

主要试剂为BCECF/AM（Eugene公司）、Nigericin（Sigma公司）、氨氯吡咪（amiloride，Sigma公司）、DIDS（Sigma公司），异丙肾上腺素、肾上腺素及三磷酸腺苷均为国产医用注射针剂。其余试剂为国产分析纯级。主要仪器为PE L50B型荧光磷光发光分光光度仪（PE公司）。

1.3 研究方法及主要步骤

1.3.1 细胞培养方法参照文献[5]方法稍加修改。

1.3.2 心衰模型建立 结扎左冠状动脉主干或左前降支＋左旋支，6～8周后造成心肌梗塞愈后心力衰竭模型，以血流动力学、心肌组织HE染色及透射电镜检查确定心力衰竭的存在。

1.3.3 溶液的配制 pH标准缓冲液配制参照文献[6]。pH梯度依次为6.6、6.8、7.0、7.2、7.4、7.6、7.8、8.0。Nigericin储备液：配成14 μmol/μl，临用前1 ml标准缓冲液加1 μl。BCECF/AM储备液：用二甲基亚砜稀释为1 μg/μl，临用前1 ml缓冲液加1 μl。氨氯吡咪配制成187.9 mmol/L储备液。DIDS配制成125.4 mmol/L储备液。Cl^-/HCO_3^-交换活性测定缓冲液配制参照文献[7]方法。

1.3.4 pH标准曲线的制作 参照文献[6]方法。采用FLWINLAB程序，将495 nm/440 nm荧光强度比值（FIR）与相应的pH值进行直线回归与相关分析，制作pH标准曲线。

1.3.5 Cl^-/HCO_3^-交换活性测定

1.3.5.1 将培养的心肌细胞单层玻片插入支架。

1.3.5.2 置支架于含缓冲液1无菌比色杯中（含BCECF/AM 1 μg/μl），37℃ CO_2孵箱孵育1 h。

1.3.5.3 将支架置缓冲液1孵育20 min，使细胞碱负荷。

1.3.5.4 置测定室，应用PE仪器配套的FLWINLAB程序在室温下测定荧光强度。激光波长495 nm、440 nm，发射波长530 nm，狭缝10 nm。设定测定时间为20～25 min。

1.3.5.5 将支架插入另一含缓冲液2的测定杯中，继续测定。

1.3.5.6 再将支架插入含另一缓冲液3的测定杯中，继续测定。

1.3.5.7 采用FLWINLAB程序，根据标准pH曲线，将495 nm/440 nm荧光强度比值转换为相应的pH值，并计算出碱负荷后pHi恢复率（△pH/min）。

每次实验均在缓冲液3中加入2.8 mmol/L氨氯吡咪，以抑制Na^+/H^+交换。加入DIDS以观察Cl^-/HCO_3^-交换活性。

1.3.6 药物增强实验 均选择原液，使药物终浓度在1.0×10^{-5}～1.0×10^{-1} mol/L。测定方法及步骤同Cl^-/HCO_3^-交换活性测定，在缓冲液3中加入相应的药物。

1.4 统计学处理

资料以$\bar{x}\pm s$表示，用Student t检验作组间差异显著性检验，以$P<0.05$作为显著性界限。

2 结果

2.1 心肌细胞pHi标准曲线

pH在6.6～8.0范围内与FIR值呈显著正相关（$r=0.988$，$P<0.01$）。

2.2 培养的正常大鼠及心衰心肌细胞Cl^-/HCO_3^-交换活性

见图1，正常心肌细胞在高碳酸氢钠液（B1液）中负载BCECF/AM后pHi升至7.5～7.8左右，形成曲线第一段；换成无氯液（B2液）后pHi无变化或略下降，形成第二段；在换成含氯液（B3液）并加入终浓度为2.8 mmol/L氨氯吡咪，形成第三段，pHi起始骤然下降，随即不变或略有上升，然后缓慢下降，此即Cl^-/HCO_3^-交换段。Cl^-/HCO_3^-交换活性受DIDS抑制，浓度范围在1.2×10^{-6}～2.0×10^{-4} mol/L，50%抑制浓度为2.1×10^{-5} mol/L。正常心肌细胞中培养2～3周者与培养1 h者Cl^-/HCO_3^-交换活性差异不显著。但心衰心肌细胞Cl^-/HCO_3^-交换活性显著大于正常心肌细胞，见表1、2。

2.3 药物对心肌细胞Cl^-/HCO_3^-交换活性的影响

30 μmol/L异丙肾上腺素（Isoprenaline）、40 μmol/L肾上腺素（Adrenaline）及0.3 mmol/L三磷酸腺苷（ATP）对正常心肌细胞Cl^-/HCO_3^-交换活性有显著的增强作用，这三种药物对心衰心肌细胞亦有类似作用，且浓度偏低，分别为20 μmol/L、30 μmol/L及0.2 mmol/L，见表1、2及图2、3。

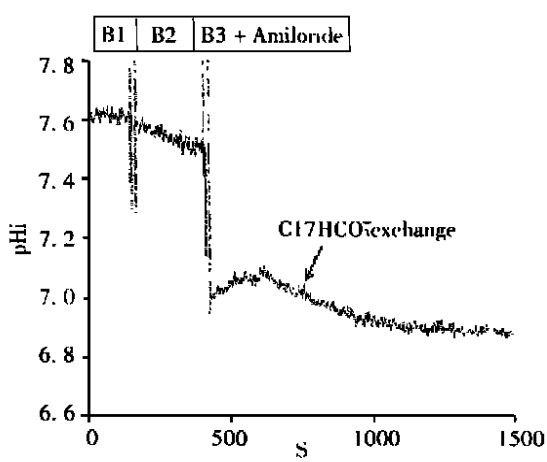


图1 培养的正常心肌细胞Cl^-/HCO_3^-交换活性

Fig 1 Exchanging activity of Cl^-/HCO_3^- in cultured normal cardiomyocytes

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

表 1　药物对正常心肌细胞 Cl^-/HCO_3^- 交换活性的影响

Tab 1　Drug's effects on Cl^-/HCO_3^- exchanging activity of normal cardiomyocytes

Recovery rate of pHi	ATP(n=22)	Isoprenaline(n=20)	Adrenaline(n=19)	Normal(2~3 wks)(n=18)	Normal(1 h)(n=16)
△pH/min	0.1090±0.0278**	0.0968±0.0248**	0.0893±0.0224**	0.0649±0.0185	0.0672±0.0201

**: $P<0.01$ *vs* normal (2~3 wks)

表 2　药物对心衰心肌细胞 Cl^-/HCO_3^- 交换活性的影响

Tab 2　Drug's effects on Cl^-/HCO_3^- exchanging activity of cardiomyocytes with CHF

Recovery rate of pHi	ATP(n=18)	Isoprenaline(n=16)	Adrenaline(n=17)	Control with CHF(n=17)	Normal(1 h)(n=16)
△pH/min	0.1105±0.0249**	0.1075±0.0293*	0.1116±0.0296**	0.0835±0.0236△	0.0672±0.0201

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control with CHF; △: $P<0.05$ *vs* normal (1 h)

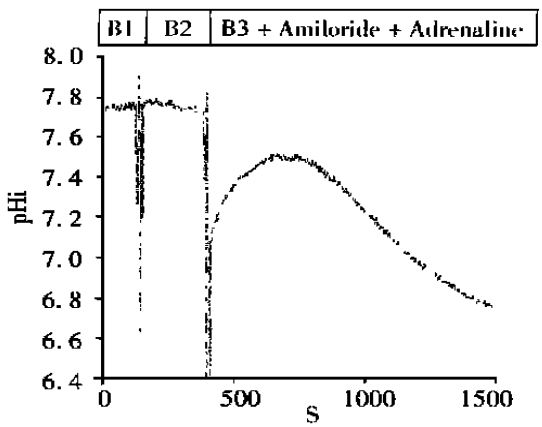


图 2　肾上腺素增强正常心肌细胞 Cl^-/HCO_3^- 交换活性

Fig 2　Adrenaline enhancing Cl^-/HCO_3^- exchanging activity of normal cardiomyocytes

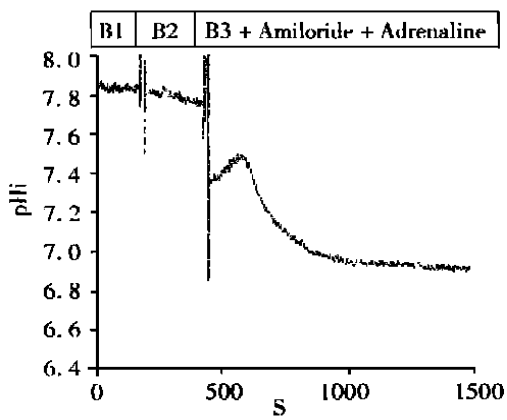


图 3　肾上腺素增强心衰心肌细胞 Cl^-/HCO_3^- 交换活性

Fig 3　Adrenaline enhancing Cl^-/HCO_3^- exchanging activity of cardiomyocytes with CHF

3　讨论

本实验表明, 培养的正常大鼠及心衰心肌细胞存在非钠依赖性 Cl^-/HCO_3^- 交换, 受 DIDS 抑制, 最大抑制浓度高于文献[4]报道, 原因可能为细胞状态不同和方法学的差异造成, 本实验培养心肌细胞时间较长, 测定细胞群, 探针为 BCECF/AM; 后者采用 SNARF-1/AM 探针测定分离 1~3 d 的单个细胞。

结果表明心梗愈后心衰大鼠心肌细胞 Cl^-/HCO_3^- 交换活性明显高于培养 2~3 周和 1 h 的心肌细胞。这种差异可除外由于培养环境介质所导致, 因为培养 2~3 周的心肌细胞 Cl^-/HCO_3^- 交换活性与新分离的正常大鼠心肌细胞无明显差异。心衰心肌细胞 Cl^-/HCO_3^- 交换活性增强的机制可能与心肌细胞膜阴离子交换蛋白数量增加有关。充血性心力衰竭时神经体液过度激活, 血浆儿茶酚胺、血管紧张素 II 浓度显著升高, 通过受体介导机制可激活蛋白激酶 C, 进而磷酸化转录因子, 促进基因及蛋白表达[8]。心肌细胞阴离子交换蛋白表达亦可能通过上述机制。

本实验结果表明, 异丙肾上腺素和肾上腺素对心肌细胞 Cl^-/HCO_3^- 交换活性均有增强作用。Desilets 等[9]亦有类似报道。提示异丙肾上腺素可激活心肌细胞膜阴离子交换蛋白的交换活性。本实验还证实肾上腺素也有同样的增强作用。尚未见到类似报道。异丙肾上腺素及肾上腺素增强 Cl^-/HCO_3^- 交换活性的机制可能与其激活腺苷酸环化酶有关。Desilets 等[9]证实异丙肾上腺素诱导的心肌细胞酸化可由 10 μmol/L forskolin 重复。用 Ca^{2+} 清除剂 BAPTA 使心肌细胞预负载, 胞外介质中不含 Ca^{2+}, 可观察到同样的酸化效应。

本研究发现 ATP 使心肌细胞内显著酸化, 表明了它增强了阴离子交换蛋白活性。其他作者[6]亦有类似报道。本实验 ATP 终浓度显著高于文献中使用的浓度, 可能与采用的样品细胞数量较多及荧光探针不同有关。ATP 激活 Cl^-/HCO_3^- 交换蛋白, 使细胞酸化的机制可能是经嘌呤能受体 3(P_3)介导。Puceat 等[10]证实 ATP 在 1 min 内诱导了心肌细胞一种 80×10^3 Cl^-/

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

HCO_3^- 交换蛋白酪氨酸位点磷酸化，用酪氨酸蛋白激酶抑制剂可阻止磷酸化作用。

肾上腺素是体内重要的神经体液因子，可增强心肌细胞兴奋-收缩偶联，具有正性肌力作用。但同时使代谢作用增强，H^+、CO_2 及 HCO_3^- 产生增多，继而导致心肌细胞 pHi 改变。在正常生理情况下，肾上腺素增强 Cl^-/HCO_3^- 交换活性，排出过多的 CO_2 水化产生的 HCO_3^-，具有代偿意义，使心肌细胞的酸碱缓冲容量扩大，有利于细胞应付内外环境 pH 的突然或剧烈变化，以维持心肌收缩力[10]。但在病理情况如心力衰竭时，阴离子交换蛋白表达增加及/或肾上腺素等神经体液因子使 Cl^-/HCO_3^- 交换活性过度增强，将引起细胞内酸中毒，后者可导致细胞内 Ca^{2+} 超负荷，引起心律失常，并导致兴奋—收缩偶联障碍。这可能是心力衰竭发生发展的病理生理机制之一。ATP 是细胞能量的供应者，心衰时 ATP 生成减少，可能减少了对心肌细胞 Cl^-/HCO_3^- 交换活性的增强作用，继而减少了酸碱缓冲容量，但其病理生理意义有待进一步探讨。

参考文献：

[1] Korichneva I, Puceat M, Cassoly R, *et al*. Cl^-/HCO_3^- exchange in developing neonatal rat cardiac cells: Biochemical identification and immunolocalization of band 3-like proteins[J]. Circ Res, 1995, 77(3): 556—564.

[2] Richards S M, Jaconi M E, Vassort G, *et al*. A spliced variant of AE1 gene encodes a truncated form of Band 3 in heart: the predominant anion exchanger in ventricular myocytes[J]. J Cell Sci, 1999, 112(Pt 10): 1 519—1 528.

[3] 黄 坚，钱桂生，李隆贵，等. 大鼠心肌细胞阴离子交换蛋白免疫细胞化学定位的研究[J]. 第三军医大学学报，1999, 21(9): 654—657.

[4] Puceat M, Korichneva I, Cassoly R, *et al*. Identification of band 3-like protein and Cl^-/HCO_3^- exchanged in isolated cardiomyocytes[J]. J Biol Chem, 1995, 270(3): 1 315—1 322.

[5] Hoffmann P, Richards D, Heinroth-Hoffmann I, *et al*. Arachidonic acid disrupts calcium dynamics in neonatal rat cardiac myocytes[J]. Cardiovasc Res, 1995, 30(6): 889—898.

[6] Puceat M, Clement O, Vassort G. Extracellular MgATP activates the Cl^-/HCO_3^- exchanger in single rat cardiac cells[J]. J Physiology, 1991, 444: 241—256.

[7] Weill A E, Tisher C C, Conde M F, *et al*. Mechanisms of bicarbonate transport by cultured rabbit inner medullary collecting duct cells[J]. Am J Physiol, 1994, 266(3 Pt 2): F466—F476.

[8] Yamazaki T, Komuro I, Kudoh S, *et al*. Angiotensin Ⅱ partly mediates mechanical stress-induced cardiac hypertrophy[J]. Circ Res, 1995, 77(2): 258—265.

[9] Desilets M, Puceat M, Vassort G. Chloride dependence of pH modulation by β-adrenergic agonist in rat cardiomyocytes[J]. Circ Res, 1994, 75(5): 862—869.

[10] Puceat M, Vassort G. Neurohumoral modulation of intracellular pH in the heart[J]. Cardiovasc Res, 1995, 29(2): 178—183.

（编辑 薛国文）

经验与短篇

文章编号：1000-5404(2000)06-0544-01

骨肉瘤 P-糖蛋白表达及其与预后的研究

Expression of P-glycoprotein in osteosarcoma and its prognostic significance

牟江洪，王 东，陈 俐，李增鹏 （第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所病理科，重庆 400042）

人体多种肿瘤均有 P-gp 的高表达，P-gp 介导的多药耐药性（即经典多药耐药性）[1,2] 可能是肿瘤化疗不敏感的重要原因，也是影响预后的重要因素。因此我们用 SP 法检测 80 例骨肉瘤中 P-gp 的表达，以期探讨其与骨肉瘤临床病理及预后的关系。

1 材料与方法

1.1 临床资料

选取我院 1968～1993 年间长骨中央型骨肉瘤 80 例，其中男性 52 例，女性 28 例，男女比约为 2∶1，年龄 11～68 岁，平均 23 岁；肿瘤大小 5～25 cm，平均 10 cm，其中手术切除标本 75 例，活检标本 5 例，均为术前未化疗标本。组织学分级参照 Price 三级法，组织学分型参照 Dahlin's 分型及 WHO 新分型。全部病例均有随访，随访时间 1～25 年，总体 2 年生存率为 33.8%，5 年生存率为 18.3%。

1.2 免疫组化方法

抗人 P-gp 的鼠单克隆抗体 JSB1 及 S-P 免疫组化试剂盒均为 ZYMED 公司产品（购自北京中山生物技术公司）。80 例骨肉瘤标本均经 10%中性福尔马林液固定，常规石蜡包埋，5 μm 石蜡切片。S-P 免疫组化染色，方法及步骤参照试剂盒说明进行，

（下转 548 页）

作者简介：牟江洪（1973—），男，四川省自贡市人，医师，主要从事骨肿瘤方面的研究。电话：(023)68757374

收稿日期：1999-04-19；修回日期：2000-02-28

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