DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.06.019
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)06-0557-04

论著

钙增敏剂MCI-154对内毒素休克大鼠左心室肌原纤维ATP酶活性的影响

梅建民,胡德耀,陈惠孙,刘良明,肖 南,刘建仓 (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MCI-154对内毒素休克大鼠左心室肌原纤维ATP酶活性的影响。方法 利用心室肌原纤维制备,测定其在不同钙浓度的激活液中的ATP酶活性。结果 内毒素休克组心肌肌原纤维在不同pCa(-log[Ca^{2+}])溶液中的ATP酶活性及最大ATP酶活性均明显低于假休克组,ATP酶-pCa曲线向右移位约0.35个pCa单位,曲线的中位值pCa_{50}(产生50%最大ATP酶活性所对应的pCa)明显降低。5×10^{-5} mol/L甲腈吡酮对上述异常无明显的纠正作用。内毒素休克大鼠心室肌原纤维经含1×10^{-5} mol/L的MCI-154的激活液处理后,各pCa点ATP酶活性及最大ATP酶活性均明显增加,显著高于内毒素休克组和甲腈吡酮组;ATP酶-pCa曲线向左移位约0.4个pCa单位,pCa_{50}值增加,显著高于内毒素休克组和甲腈吡酮组值,与假休克组值无明显差别。结论 内毒素休克后,心肌肌原纤维活力下降,ATP酶活性降低;钙增敏剂MCI-154可通过增加心肌收缩蛋白对钙的敏感性而提高心肌肌原纤维活力,增加ATP酶活性。

关键词:内毒素休克;心肌肌原纤维;钙增敏剂;MCI-154
中图法分类号:R337;R631.4 文献标识码:A

Effects of calcium sensitizer, MCI-154, on ATPase activity of left ventricular myofibrils in rats with endotoxic shock

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

Abstract: **Objective** To study the effects of a calcium sensitizer, MCI-154, on the adenosine triphosphatase (ATPase) activity of left ventricular myofibrils in rats with endotoxic shock. **Methods** After the preparation of ventricular fibrils, the ATPase activity in the activation solutions containing different concentrations of calcium ions [expressed as pCa(-log Ca^{2+})] was determined. **Results** The ATPase activity in all the concentrations of calcium and the highest ATPase activity were significantly higher in the endotoxic shock group than in the sham shock group. The relationship curve of ATPase activity and pCa units was shifted to the right by about 0.35 pCa unit. pCa50 (pCa required to produce 50% of highest ATPase activity) was significantly reduced. 5×10^{-5} mol/L milrinone failed to counteract the changes mentioned above. After the left ventricular myofibrils were treated with 1×10^{-5} mol/L of MCI-154, the ATPase activity in all kinds of pCa and the highest ATPase activity were significantly higher than those of the endotoxic shock group and milrinone-treated group and the ATPase activity-pCa units with relationship curve was shifted to the left by 0.4 pCa unit. pCa50 was significantly increased. **Conclusion** Calcium sensitizer, MCI-154, can reverse the endotoxin-induced damages and the ATPase activity of left ventricular myofibrils through increasing the sensitivity of their contractile protein to calcium.

Key words: endotoxic shock; myofibril preparation/left ventricle; calcium sensitizer; rat

钙增敏剂MCI-154可增加正常心肌肌钙蛋白钙结合亚单位(TnC)与钙的亲和力[1,2],TnC与钙结合越多,横桥(Cross bridge)形成就会增多,心肌三磷酸腺苷酶(Adenosinetriphosphatase,ATPase)活性亦相应增加。但目前尚不清楚钙增敏剂MCI-154用于内毒素休克机体时是否也能增加心肌ATPase活性。本实验利用肌原

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,现在北京军区总医院肝胆外科,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。电话:(010)66721629-8090
收稿日期:1999-06-11;修回日期:2000-03-13

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

纤维制备，研究了钙增敏剂哒嗪酮(6-[4-(4′-pyridyl)aminophenyl]-4,5-dihydro-3(2H)-pyridazinone hydrochloride，MCI-154)对内毒素休克大鼠左心室肌原纤维ATPase活性的影响，旨在从生化角度探讨钙增敏剂MCI-154改善内毒素休克心功能的机制。

1 材料与方法

1.1 动物模型及分组

Wistar大鼠32只，体重(200±15)g，雌雄不拘，实验前随机分为4组，分别为：a：假休克组(n=8)；b：内毒素休克组(n=8)；c：甲腈吡酮组(n=8)，内毒素休克大鼠心室肌肌原纤维经甲腈吡酮处理；d：MCI-154组(n=8)，内毒素休克大鼠心室肌原纤维经MCI-154处理。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(*E. coli*，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(NS)。

1.2 左心室肌原纤维的制备

参照Pagani和Solaro[3]的方法制备左心室肌原纤维，主要步骤包括反复匀浆、破膜及清除细胞内游离钙等过程。将肌原纤维置于悬浮液中，成份(mmol/L)：KCl 80，$MgCl_2$ 5，EGTA 10，imidazole 20，pH 7.0。以上操作均在4℃条件下进行。采用Lowry法定蛋白含量。

1.3 左心室肌原纤维ATP酶活性的测定

将肌原纤维悬浮液分成7份，每份1 ml，4℃条件下2 000 g离心10 min，弃上清，然后分别加入激活液(含不同Ca^{2+}浓度的悬浮液，Ca^{2+}浓度以pCa，$-\log[Ca^{2+}]$表示)，各pCa点所需加入的$CaCl_2$按Fabiato的计算程序[4](湖南医科大学心血管生理研究室提供)确定，使7份激活液中pCa分别为7.0、6.5、6.0、5.5、5.0、4.5、4.0，c组每个pCa点均含5×10^{-5} mol/L的甲腈吡酮，d组每个pCa点均含1×10^{-5} mol/L的MCI-154。置于30℃恒温水浴中预温5 min后，加入1 mmol/L Na_2ATP启动反应，10 min后，加入10%三氯醋酸中止反应，1 000 g离心10 min，取上清液，利用定磷法测定无机磷含量，酶活性单位以μmol. P_i/mg. pr. hr表示。以pCa 4.0时的ATP酶活性为最大活性，算出其它pCa点酶的相对活性，然后以相对ATP酶活性为纵轴，pCa为横轴，按Hill方程：$T=[Ca^{2+}]^n/(K^n+[Ca^{2+}]^n)$进行回归，可得ATP酶-pCa曲线。方程中T为相对ATP酶活性，为不同pCa点的ATP酶活性与最大ATP酶活性的百分比，n为回归斜率，K为待求的Hill系数，为产生50%的最大ATP酶活性的Ca^{2+}浓度，其负对数(−logK)即为pCa_{50}值，pCa_{50}是衡量TnC钙敏感性的定量指标[5]。

1.4 数据处理及统计学分析

所有实验数据均以$\bar{x}\pm s$表示，组间比较采用方差分析及t检验进行。

2 结果

2.1 ATP酶活性的变化

各组ATP酶活性变化见表1。b组和c组各pCa点上的值及最大ATP酶活性均明显低于a组($P<0.05$、0.01)，两组间无明显差别($P>0.05$)。d组各pCa点ATP酶活性及最大ATP酶活性均明显高于b、c组($P<0.05$、0.01)，与a组无明显差别($P>0.05$)。

表1 ATP酶活性的变化(μmol/mg. h)

Tab 1 Changes of ATPase activity(μmol/mg. h)

Group	pCa(calcium concentration，$-\log[Ca^{2+}]$)						
	7.0	6.5	6.0	5.5	5.0	4.5	4.0
a	0.82±0.12	6.71±1.74	17.35±2.47	36.15±3.46	45.34±5.68	51.39±5.90	52.60±4.76
b	0.68±0.09 #	4.18±1.32 ##	12.94±2.63 ##	23.90±3.07 ##	34.79±4.20 #	43.69±4.06 #	44.61±6.53 #
c	0.67±0.11 #	4.36±1.46 ##	12.67±2.72 ##	24.75±3.23 ##	35.20±3.89 #	43.07±5.57 #	45.26±6.24 #
d	0.91±0.15 *	6.96±1.86 **	18.29±2.77 **	36.80±4.67 **	44.45±5.92 *	50.04±5.67 *	51.37±4.55 *

a：sham shock group；b：endotoxic shock group；c：milrinone group；d：MCI-154 group.

#：$P<0.05$，##：$P<0.01$ *vs* a；*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* b and c

2.2 ATP酶-pCa曲线的变化

各组ATP酶-pCa曲线均呈S形，见图1。随激活液中Ca^{2+}浓度的增加，相对ATP酶活性值升高，但b组pCa 7.0～4.5点上的相对ATP酶活性值上升的幅度明显小于a组($P<0.05$、0.01)，曲线向右移位约0.35 pCa单位。c组ATP酶-pCa曲线与b组类似，pCa 7.0～4.5点上的值与b组无明显差别($P>0.05$)，明显低于a组值($P<0.05$、0.01)，曲线亦向右移位约0.32个pCa单位。d组pCa 7.0～4.5点上的相对ATP酶活性显著高于b、c组($P<0.05$、0.01)，与a组无明显差别($P>0.05$)，曲线向左移位约0.4 pCa单位。各组pCa_{50}值分别为：5.807±0.118；b：5.458±0.094；c：5.482±0.078；d：5.816±0.131。b、c组pCa_{50}值明显低于a组($P<0.05$)，d组pCa_{50}值明显高于b、c组($P<0.05$)，与a组无明显差别($P>0.05$)。

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

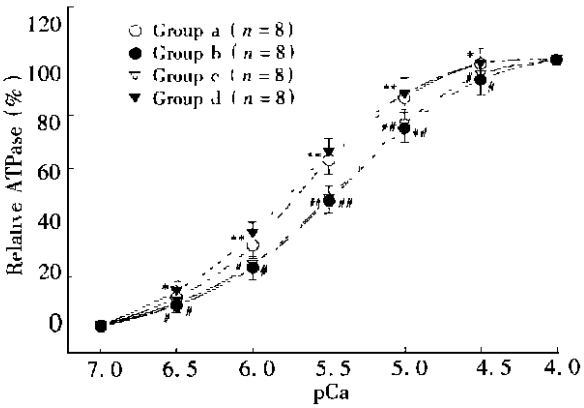


图 1　ATP 酶-pCa 曲线的变化

Fig 1　Changes of ATPase-pCa curves

group a: sham shock group; group b: endotoxic shock group; group c: milrinone group; group d: MCI-154 group. #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$ *vs* group a; * $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* group b and c

3　讨论

肌原纤维制备包括反复匀浆、破膜及清除细胞内游离钙等过程。因此, 肌原纤维 ATP 酶活性反映的是溶液中的 Ca^{2+} 与 TnC 结合后, 引起 TnC 构型变化, 触发横桥形成后肌动球蛋白的 ATP 酶活力。ATP 酶活性增高, 表明 TnC 与钙的亲和力增加, 横桥形成的量增加, ATP 酶再生率升高。肌原纤维制备比裸露心肌纤维的制备简单, 测定药物对肌原纤维 ATP 酶活性的影响, 可以检验该药物是否具有钙增敏效果, 因而是研究药物钙增敏性的一种有效而易行的方法。

本实验利用肌原纤维制备, 测定了内毒素休克大鼠心肌肌原纤维在不同钙浓度下的 ATP 酶活性, 并观察了钙增敏剂 MCI-154 对内毒素休克大鼠心肌肌原纤维 ATP 活性的影响, 目的是想了解脓毒症/感染性休克后心肌 ATP 酶活性及心肌收缩蛋白对钙的敏感性是否降低, 以及 MCI-154 对上述异常是否有一定的纠正作用。结果显示: 内毒素休克后心肌肌原纤维 ATP 酶活性在各钙浓度点上的值均明显低于假休克组, 其中最大 ATP 酶活性(pCa 4.0, 饱和钙浓度)亦明显低于假休克组; ATP 酶活性-pCa 曲线向右移位, 移位幅度约 0.35 pCa 单位, 曲线的 pCa_{50} 值下降。ATP 酶特别是最大 ATP 酶活性降低, 说明心肌肌原纤维的活力下降, 钙激活引起的肌动蛋白、肌球蛋白相互作用形成的横桥量减少, ATP 酶再生率降低。造成上述异常的可能原因如下: ① 肌球蛋白 ATP 酶受损。内毒素休克时, 心脏冠脉低灌注或不均匀灌注[6], 心肌缺血缺氧, 能量供应和利用障碍, 心肌 ATP 酶受损。至于内毒素是否可直接损害心肌肌原纤维 ATP 酶, 目前尚无此方面的文献报道。② 心肌收缩蛋白对钙的敏感性降低。内毒素休克时, 心肌细胞内酸中毒, H^+ 与 Ca^{2+} 竞争 TnC 钙结合位点, 造成 TnC 对钙的亲和力降低[7]; 另外, 心肌缺血缺氧, 肌酸激酶活性降低, 激活肌酶激酶的底物 ADP 受限, 横桥周围无机磷的积聚, 一方面引起心肌收缩蛋白对钙的敏感性降低[7], 另一方面还可使横桥从强结合状态变为弱结合状态, 导致钙激活引起的 ATP 酶活性降低[8]。本实验显示的 ATP 酶-pCa 曲线右移及 pCa_{50} 值降低, 说明内毒素休克后出现了心肌收缩蛋白对钙敏感性降低。钙激活引起的 TnC 构型变化减弱, 横桥产量降低。甲腈吡酮不能提高内毒素休克大鼠心肌肌原纤维在各钙浓度点上的 ATP 酶活性及最大 ATP 酶活性, 不能纠正 ATP 酶-pCa 曲线右移, pCa_{50} 值不增加。此结果提示传统强心药不能提高脓毒症/感染性休克心肌 TnC 与钙的亲和力, 不能促进肌动蛋白和肌球蛋白的相互作用。与甲腈吡酮不同, 钙增敏剂 MCI-154 作用于内毒素休克心肌肌原纤维后, 能提高各钙浓度点上的 ATP 酶活性, 提高最大 ATP 酶活性, ATP 酶-pCa 曲线左移, 移位幅度约 0.4 个 pCa 单位, 曲线的 pCa_{50} 值增加。这些实验结果表明 MCI-154 能提高内毒素休克心肌肌原纤维活力, 提高 TnC 与钙的亲和力, 促进肌动蛋白和肌球蛋白的相互作用, 增加横桥形成的量, 增加 ATP 酶的再生率。内毒素休克大鼠心肌肌原纤维经 MCI-154 处理后, 各钙浓度点的 ATP 酶活性及最大 ATP 酶活性能恢复到假休克组水平。说明心肌收缩蛋白对钙敏感性降低是造成内毒素休克后心肌肌原纤维 ATP 酶活性降低的主要原因。本实验结果同 MCI-154 作用于正常心肌的实验结果相符[9, 10], 说明 MCI-154 用于脓毒症/感染性休克时亦能通过提高心肌收缩蛋白对钙的敏感性而增强心功能。

本实验利用心肌肌原纤维制备, 证明了内毒休克后, 心肌肌原纤维存在因收缩蛋白对钙敏感性降低所致的 ATP 酶活性降低; MCI-154 能提高心肌收缩蛋白对钙的敏感性, 促进肌动蛋白和肌球蛋白的相互作用而提高肌原纤维的活力, 增加肌原纤维 ATP 酶活性。本实验表明钙增敏剂 MCI-154 比较适合于脓毒症/感染性休克心功能障碍的治疗, 值得开展临床试验。

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

参考文献:

[1] Liao R, Gwathmey J K. Effects of MCI-154 and caffeine on Ca^{2+}-regulated interactions between troponin subunits from bovine heart[J]. J Pharmacol Exp Ther, 1994, 270(2): 831—839.

[2] Sata M, Sugiura S, Yamashita H, *et al*. MCI-154 increases Ca^{2+} sensitivity of reconstituted thin filament: A study using a novel *in vitro* motility assay technique[J]. Circ Res, 1995, 76(4): 626—633.

[3] Pagani E D, Solaro R J. Methods for measuring functional properties of sarcoplasmic reticulum and myofibril in a small samples of myocardium[A]. In: Schwartx A ed. Methods in pharmacology[M]. New York: Plenum Publishing Corporation, 1984. 49—61.

[4] Fabiato A, Fabiato F. Calculator programs for computing the composition of the solutions containing multiple metals and ligands used for experiments in skinned muscle cells[J]. J Physio (Paris), 1979, 75: 463—505.

[5] 黄 焰, 贺振翮, 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]. 中国应用生理学杂志, 1996, 12(7): 1—5.

[6] Hauptmann S, Klosterhalf B, Weiss J, *et al*. Morphology of cardiac muscle in septic shock: Observation with a porcine model[J]. Virchows Arch, 1995, 426(5): 487—491.

[7] Abe Y, Kitada Y, Narimatsu A. Effect of a calcium-sensitizing positive inotropic agent MCI-154 and its combined use with enalapril on postischemic contractile dysfunction of dog hearts [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 1995, 26(4): 653—659.

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

[9] Iwamoto H. Effect of a cardiotonic agent, MCI-154, on the contractile properties of skinned skeletal muscle fibers[J]. Eur J Pharmacol, 1998, 341(2~3): 243—252.

[10] Abe Y, Ishis R, Onishi K, *et al*. Calcium sensitization in perfused beating guinea pig heart by a positive inotropic agent MCI-154[J]. J Pharmacol Exp Ther, 1996, 276(2): 433—439.

(编辑 王 红)

经验与短篇

文章编号: 1000-5404(2000)06-0560-01

口咽及颈部肿瘤立体定向放射治疗摆位方法研究

A new method of setting and immobilzation for stereotactic radiotherapy of oropharynx and cervical tumors

肖 红, 庞学利, 王 希 (第三军医大学附属西南医院肿瘤科, 重庆 400038)

立体定向放射治疗中, 重复摆位的准确性是影响肿瘤治疗效果的重要因素[1], 对于口咽及颈部肿瘤, 由于无法应用头环进行固定和治疗, 应用体部定位框架常规方法也无法进行准确固定。我院创用一种新的摆位方法成功进行了口咽和颈部肿瘤的X-刀治疗, 收到了满意的近期治疗效果, 现介绍如下。

1 材料与方法

1.1 临床资料

患者8例, 男性5例, 女性3例, 平均年龄52岁。其中甲状腺癌术后颈部常规放疗(挡喉)后, 肿瘤咽喉内复发2例; 喉癌放疗后复发2例; 舌根癌放疗后复发伴口咽部疼痛3例, 其中1例为二程放疗后复发; 颈4、5椎管内肿瘤术后复发外侵1例。组织病理学诊断髓外恶型神经鞘瘤2例, 鳞状细胞癌6例。瘤体最大径2.5~5.0 cm, 中位数3.0 cm。

1.2 体位固定与摆位方法

本组采用的固定装置为大恒STAR-1000型X-刀治疗系统之体部定位框架及热塑性塑料固定面罩。在体部定位框架的中部, 固定一具有一定斜度的头枕, 在框架底部头枕四角外侧适当位置分别钻孔, 插入螺杆, 供固定面罩用。患者仰卧于体部定位框架上, 采用面罩技术将患者头颈部及头枕一并固定于体部定位框架, 进行CT扫描定位。

1.3 照射方法与剂量

采用大恒STAR-1000型SRT系统进行治疗。采用非共面弧型聚焦照射, 单靶点照射3例, 多靶点照射2例。单次剂量4~6 Gy, 中位剂量5 Gy, 隔日1次, 照射次数3~8次, 总剂量20

(下转564页)

作者简介: 肖 红(1962—), 女, 四川省开江县人, 主管技师, 主要从事肿瘤的放射治疗方面的研究。电话: (023)68754000—73078

收稿日期: 1999-02-04; 修回日期: 1999-08-01

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