DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.11.018

文章编号: 1000-5404(1999)11-0821-04

钙增敏剂 MCI-154对内毒素休克大鼠心肌钙稳态的影响

梅建民,胡德耀,陈惠孙,刘良明,田昆仑,肖 南 (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对内毒素休克大鼠心肌钙稳态的影响。方法: 甲腈吡酮或 MCI-154治疗内毒素休克大鼠后 1、3、5 h,分别测定心肌组织、线粒体、肌浆网(SR)的钙含量;离体分离内毒素休克大鼠心肌细胞,分别与 1×10⁻³、1×10⁻²、1×10⁻¹ mmol/L甲腈吡酮或 MCI-154孵育,利用 Fura 2-AM测定心肌细胞胞浆钙浓度([Ca^{2+}]i)。结果: 内毒素休克后,心肌组织、线粒体、SR钙含量明显增加。甲腈吡酮治疗后,上述指标进一步升高;而 MCI-154治疗后,心肌组织、线粒体、SR钙含量无明显增加,治疗后 3、5 h值同单纯生理盐水(NS)治疗组无明显差别,显著低于甲腈吡酮治疗组值。内毒素休克大鼠心肌细胞 [Ca^{2+}]i明显高于对照组,甲腈吡酮与内毒素休克心肌细胞孵育后,[Ca^{2+}]i随药物浓度增大而显著升高;不同浓度的 MCI-154均不明显升高心肌细胞 [Ca^{2+}]i。结论: MCI-154用于内毒素休克治疗时,不进一步加重心肌钙稳态失衡及心肌细胞内钙超载。

关键词 内毒素休克;钙稳态;钙超载;钙增敏剂; MCI-154

中图法分类号 R631.402.3 文献标识码 A

实验研究显示,钙增敏剂 MCI-154在治疗脓毒症/感染性休克机体心功能障碍方面很可能具有良好的应用前景[1,2]。但要得出 MCI-154较传统强心药物更具优越性、更安全的结论,尚需进一步弄清 MCI-154对脓毒症/感染性休克机体心肌钙稳态的影响如何。本实验研究了 MCI-154治疗内毒素休克大鼠后心肌组织及某些亚细胞器钙含量的变化,观察了 MCI-154对内毒素休克心肌细胞胞浆钙浓度([Ca^{2+}]i)的影响,旨在为其应用于脓毒症/感染性休克的临床治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 MCI-154治疗内毒素休克大鼠后心肌组织、线粒体及肌浆网(Sarcoplasmic reliculum, SR)钙含量的变化

Wistar大鼠 91只,体重 200~250 g,雌雄不拘,动物随机分为 4组: 正常对照组(n=7);内毒素休克组(n=28);甲腈吡酮治疗组(n=28); MCI-154治疗组(n=28)。腹腔注射 10 mg/kg大肠杆菌内毒素(*E. coli*, O111: B4, Sigma),复制内毒素休克模型,8 h后,1.5%戊巴比妥钠 30 mg/kg腹腔注射麻醉,作右股动、静脉插管,动物肝素化(500 U/kg)。动脉导管连于四道记录仪(RM-6 200,日本光电)测定平均动脉压(Mean arterial pressure, MAP),静脉导管连于蠕动泵(LKB-7662, Sweden),以 0.1 ml/min速度分别输入 50 ml/kg生理盐水(NS)(内毒素休克组)、1 mg/kg甲腈吡酮+50 ml/kg NS(甲腈吡酮治疗组)、0.2 mg/kg MCI-154+50 ml/kg NS(MCI-154治疗组)。断头活杀正常大鼠(n=7),或分别于内毒素注射后 8 h及治疗开始后 1、3、5 h分批(n=7)活杀大鼠,迅速开胸取出心脏,NS洗净血液,用剪刀将心室室肌分成 3~4块,置于液氮中保存备用。按董林旺等[3]、吉勇等[4]的方法分离线粒体、SR, Lowry法测定蛋白,利用原子分光光度计(岛津 AA-646)测定心肌组织、线粒体和 SR的钙含量[3,4]。

1.2 MCI-154对内毒素休克大鼠心肌细胞 [Ca^{2+}]i的影响

Wistar大鼠 28只,体重 200 g左右,雌雄不拘,实验前随机分 4组:① 正常对照组(n=7);② 内毒素休克组(n=7);③ 甲腈吡酮组(n=7),内毒素休克大鼠心肌细胞与不同浓度的甲腈吡酮孵育;④ MCI-154组(n=7),内毒素休克大鼠心肌细胞与不同浓度的 MCI-154孵育。参照 Sipido等[5]的方法稍作修改后分离各组心肌细胞: 活杀大鼠后迅速取出心脏,悬挂于 Langendof装置上,先用 37℃无钙台氏液灌流 5 min,再用 37℃含 0.8 mg/ml胶原酶Ⅰ(Sigma)和 0.24 mg/ml蛋白酶XIV(Sigma)的台氏液灌流 10 min,最后用 37℃ 0.2 mol/L $CaCl_2$ 的低钙台氏液灌流 5 min。在含 1%的牛血清的低钙台氏液中振荡心脏,使心肌细胞分散,过 200目筛网,制成细胞悬液,500 r/min离心 3 min,心肌细胞悬浮于 1%牛血清的正常台氏液中,用倒置显微镜观察心肌细胞,调节浓度达 1×10⁶/ml。取细

基金项目: 全军"九五"攻关项目(96L041)

作者简介: 梅建民,男,33岁,博士,现在北京军区总医院肝胆外科,北京 100700

收稿日期: 1999-05-12;修回日期: 1999-09-30

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

胞悬液 9滴加 4 g/L台盼蓝 1滴,混匀后 3 min,在血球计数板上随机计数 50个细胞的着色率,以此检验心肌细胞成活率。参照唐朝枢等[6]的方法稍作修改测定 $[Ca^{2+}]_i$:将 1 mmol/L的 Fura 2-AM(Sigma) 10μl和 25% (W/W) Pluronic F-127(Sigma) 20μl,加入 2 ml的细胞悬液中,室温振荡 30 min,然后用正常台氏液洗去游离染料(500 r/min,3 min),利用荧光分光光度计(RF-540,日本),测定正常心肌细胞、内毒素休克心肌细胞及不同浓度强心药物(1×10⁻³、1×10⁻²、1×10⁻¹mmol/L)与内毒素休克心肌细胞孵育 10 min后的 $[Ca^{2+}]_i$。激发波长为 360 nm和 380 nm,发射波长为 505 nm, $[Ca^{2+}]_i = KD \times (R - R_{min}) / (R_{max} - R)$,其中 R为两激发波长时所测得的荧光比值,$R_{max}$和 R_{min}分别为细胞经 0.5% (V/V) Triton X-100和 0.2 mol/L EGTA处理后两激发波长所测得的荧光比值,KD为 Ca^{2+}-Fura 2复合物的解离常数,为 228 nmol/L。

1.3 数据处理及统计学分析

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

2 结果

2.1 心肌组织、线粒体及 SR钙含量的变化

内毒素注射后 8 h,大鼠出现休克症状,内毒素休克组、甲腈吡酮组、MCI-154组 MAP(kPa)分别为: 7.2±0.9, 6.9±1.3, 7.4±1.1 明显低于对照组值 12.8±1.0($P < 0.01$)。各组治疗后 MAP均上升,但甲腈吡酮组、MCI-154组上升的幅度明显高于内毒素休克组,治疗后 3、5 h,内毒素休克组、甲腈吡酮治疗组及 MCI-154组 MAP分别为: 9.2±1.4, 8.3±1.2; 11.8±1.6, 10.6±1.5; 11.5±1.9, 10.2±2.1 甲腈吡酮组、MCI-154组 MAP明显高于内毒素休克组($P < 0.05$),甲腈吡酮组、MCI-154组无明显差别($P > 0.05$)。内毒素休克后,心肌组织、线粒体及 SR钙含量明显高于对照组($P < 0.05$),见表 1。甲腈吡酮治疗后 1、3、5 h,上述指标进一步上升,而 MCI-154治疗后 1、3、5 h心肌组织、线粒体及 SR钙含量上升的幅度明显小于甲腈吡酮组,虽高于内毒素组,但无统计学差异($P > 0.05$),3、5 h值明显低于甲腈吡酮组值($P < 0.05$)。

表 1 MCI-154或甲腈吡酮治疗内毒素休克大鼠后心肌组织、线粒体、肌浆网钙含量的变化(μg/mg)

Tab 1 Changes of Ca^{2+} contents of myocardial tissue, mitochondria and sarcoplasmic reticulum following administration of MCI-154 or milrinone(μg/mg)

	Group	Before treatment	Time after treatment (h)		
			1	3	5
Myo-Ca^{2+}	Control	0.11±0.02	——	——	——
	Endotoxin shock	0.17±0.02#	0.18±0.03#	0.20±0.02#	0.21±0.04#
	Milrinone treatment	0.19±0.03#	0.21±0.02#	0.26±0.05##*	0.28±0.06##*
	MCI-154 treatment	0.18±0.02#	0.19±0.03#	0.21±0.02#	0.23±0.02#
Mito-Ca^{2+}	Control	0.73±0.12	——	——	——
	Endotoxin shock	1.02±0.27#	1.12±0.30#	1.15±0.28#	1.20±0.29#
	Milrinone treatment	1.04±0.33#	1.28±0.24#	1.48±0.27##*	1.66±0.35##*
	MCI-154 treatment	0.97±0.21#	1.16±0.25#	1.21±0.23#	1.24±0.29#
SR-Ca^{2+}	Control	0.22±0.03	——	——	——
	Endotoxin shock	0.26±0.01#	0.27±0.02#	0.29±0.03#	0.30±0.02#
	Milrinone treatment	0.29±0.02#	0.33±0.02#	0.36±0.05##*	0.38±0.04##*
	MCI-154 treatment	0.28±0.02#	0.29±0.03#	0.31±0.04#	0.32±0.02#

Myo-Ca^{2+}: Calcium content of myocardial tissue; Mito-Ca^{2+}: Calcium content of myocardial mitochondria; SR-Ca^{2+}: Calcium content of myocardial sarcoplasmic reticulum; # : $P < 0.05$, ## : $P < 0.05$ *vs* Control; * : $P < 0.05$ *vs* Endotoxin shock or MCI-154

2.2 $[Ca^{2+}]_i$的变化

分离出的正常及内毒素大鼠休克心肌细胞,>90%的细胞排斥台盼蓝染色,说明绝大部分心肌细胞存活,可以用于实验研究。大鼠内毒素休克后, $[Ca^{2+}]_i$明显上升,显著高于对照组($P < 0.01$),见表 2。1×10⁻³、1×10⁻²、1×10⁻¹mmol/L甲腈吡酮与内毒素休克大鼠心肌细胞孵育 10 min后, $[Ca^{2+}]_i$明显增加,1×10⁻⁵、1×10⁻⁴mmol/L点值显著高于对照组及 1×10⁻³ mmol/L点值($P < 0.05, 0.01$)。而 1×10⁻³、1×10⁻²、1×10⁻¹ mmol/L MCI-154与内毒素休克心肌细胞孵育 10 min后, $[Ca^{2+}]_i$上升的幅度不大,每个浓度点的值与对照组无明显差

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

别 ($P > 0.05$),且 1× 10^{-2}、1× 10^{-1} mmol/L点值明显低于甲　　腈吡酮组值 ($P < 0.01$)。

表 2　MCI-154或甲腈吡酮对内毒素休克大鼠心肌细胞 [Ca^{2+}]i的影响 (nmol/L)

Tab 2　Effects of MCI-154 on milrinone on Cytosolic Ca^{2+} of myocytes in endotoxic shock rats (nmol/L)

Group	Pre treatment	Treatment with MCI-154 or milrinone(mmol/L)		
		1× 10^{-3}	1× 10^{-2}	1× 10^{-1}
Control	178.8± 11.4	——	——	——
Endotoxin shock	225.5± 26.1##	——	——	——
Milrinone treatment	——	251.0± 23.9	280.5± 24.8**+	291.6± 27.5**++
MCI-154 treatment	——	227.6± 19.5	235.2± 23.8@@	242.8± 26.4@@

##: $P < 0.01$ *vs* Control; *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ *vs* Endotoxin shock; +: $P < 0.05$, ++: $P < 0.01$ *vs* the value of 1 × 10^{-3} mol/L; @@: $P < 0.01$ *vs* Milrinone treatment

3　讨论

心肌细胞内钙动态平衡 (钙稳态)是心肌细胞兴奋-收缩偶联的重要物质基础,钙稳态的异常将导致心功能障碍的发生。近年来,心肌钙稳态的改变在脓毒症/感染性休克中的危害已受到重视,有研究显示[3],感染性休克时心肌细胞及心肌线粒体钙含量分别较对照组增加了 190% 和 330%。本研究亦显示,内毒素休克后,心肌组织、线粒体、SR内钙含量及心肌细胞 [Ca^{2+}]i 均显著高于对照组,说明脓毒症/感染性休克机体心肌发生了钙稳态失衡,其表现是心肌细胞内存在严重钙超载 (Calcium overload)。文献报道,脓毒症/感染性休克时心肌细胞钙超载可能与下列因素有关:① 心肌肌膜受损,钙通道发生改变,钙内流增加[7];② 心肌细胞膜 Ca^{2+}-ATP酶[8]及 Na^{+}-Ca^{2+} 交换系统功能障碍[9],钙外流减少;③ 线粒体及 SR功能受损,对胞浆钙的调控能力减弱[10]。心肌细胞钙超载是造成脓毒症/感染性休克心功能障碍的重要原因之一,因为心肌细胞钙超载时,需消耗额外能量以便在舒张期将细胞内多余的钙泵出胞外,另外,线粒体钙超载会损害其氧化磷酸化功能,因此,钙超载会进一步加重休克所引起的心肌能量供应和利用障碍,损害心肌的收缩和舒张功能,更严重的还会造成心肌细胞结构的损害。

在选择正性肌力强心药物以改善脓毒症/感染性休克机体心功能时,既要考虑药物的强心效果,也应注意药物对心肌细胞钙稳态的影响。目前临床上应用的传统强心药物,不管开始是什么途径,其最终共同通路都是增加心肌细胞内钙浓度,因而这些药物应用于脓毒症/感染性休克的治疗时,都会进一步加重心肌细胞内钙超载。本实验证实,磷酸二酯酶 (PDE)抑制剂强心药物甲腈吡酮用于内毒素休克治疗后,虽也能升高血压,对内毒素休克有一定的治疗作用,但心肌组织、线粒体、SR钙含量均明显升高,显著高于单纯 NS治疗组。这说明目前临床使用的传统强心药物应用于脓毒症/感染性休克的治疗是有弊端的。理想的强心药物应是在增加心肌收缩力,改善心功能时,不进一步加重心肌细胞内钙的超载,对心肌细胞钙稳态的影响小或不影响。近年来发现的新型强心药物钙增敏剂很可能符合这一治疗要求。

钙增敏剂是在研究 PDE抑制剂类强心药物过程中发现的,大多数钙增敏剂是通过增加肌钙蛋白 (TnC)钙结合位点与钙的亲和力而增强心功能,且有部分 PDE抑制作用。MCI-154是目前所发现的钙增敏剂中效果最强的一种,其药理特点是通过提高 TnC对钙的结合力,促进肌动蛋白和肌球蛋白相互作用,增加肌动球蛋白 ATP酶再生而提高心肌收缩力。分析脓毒症/感染性休克心功能障碍的特点,即一方面是心肌细胞内钙超载,心肌细胞内不缺乏可利用之钙,另一方面存在心肌收缩蛋白对钙敏感性降低;结合 MCI-154的上述药理特点,我们推测 MCI-154很可能是治疗脓毒症/感染性休克心功能障碍的较为理想的强心药。我们先期的实验已证实 MCI-154用于内毒素休克家兔治疗时,能明显改善心功能[1],对内毒素休克所引起的循环紊乱有一定的纠正作用[2]。但 MCI-154是否影响心肌钙稳态尚有争议,有实验显示 MCI-154有少量升高 cAMP作用,但也有人认为 MCI-154同 PDE抑制作用完全无关[11]。本实验测定了 MCI-154治疗内毒素休克大鼠后心肌组织、线粒体及 SR钙含量的变化,结果显示 MCI-154治疗后,上述指标无明显增加;1× 10^{-3}、1× 10^{-2}、1× 10^{-1} mmol/L的 MCI-154同内毒素休克大鼠心肌细胞孵育后,[Ca^{2+}]i增加的幅度很小,与未加强心药物孵育的内毒素休克心肌细胞的 [Ca^{2+}]

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

i无明显差别,且 1× 10^{-2}、1× 10^{-1} mmol/L浓度点值明显低于对应浓度点的甲腈吡酮组值。这些结果说明MCI-154不是通过增加心肌细胞内钙浓度而达强心目的的,用于内毒素休克治疗时不进一步加重细胞内钙超载。本研究表明,MCI-154可能是治疗脓毒症/感染性休克心功能障碍较为理想的强心药物,其临床应用前景诱人。

参考文献

[1] 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.

[2] 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.

[3] 董林旺,佟利家,张 力,等.败血症休克时心肌和线粒体钙转运的变化[J].生理学报,1993,45(2):158-160.

[4] 吉 勇,吴立玲,苏静怡,等.败血症休克时心肌钙释放功能的变化[J].北京医科大学学报,1996,28(12):103-105.

[5] Sipido K R, Callewaert G, Carmeliet E. Inhibition and rapid recovery of Ca^{2+} current during Ca^{2+} release from sarcoplasmic reticulum in guinea pig vertricular myocytes [J]. Cir Res, 1995, 76(1): 102-109.

[6] 唐朝枢,李兆萍,樊 贵.内皮素对离体大鼠心肌细胞的影响[J].生理学报,1992,44(1):15-18.

[7] Brackett D J, Lerner M R, Wikson M F, *et al*. Evaluation of *in vivo* free radical activity during endotoxic shock using scavenge, electron microscopy, spin traps, and electron paramagnetic resonance spectroscopy [J]. Adv Exp Med Biol, 1994, 366: 407-409.

[8] Wu L L, Liu M S. Heart sarcolemmal Ca^{2+} transport in endotoxin shock: Ⅰ. Impairment of ATP-dependent transport[J]. Mol Cell Biochem, 1992, 112(3): 125-133.

[9] Liu M S, Xuan Y T. Mechanisms of endotoxin-induced impairment in Na^+-Ca^{2+} exchange in (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 20) canine myocardium [J]. Am J Physiol, 1986, 251(6 Pt 2): R1078-1085.

[10] 杨 青,吴立玲,唐朝枢.败血症大鼠心肌肌浆网 Phospholamban蛋白磷酸酶活性变化[J].生理学报,1995,47(4):457-460.

[11] 林 勇.具有钙敏感性新型强心药物的研究进展[J].生理科学进展,1992,23(1):41-42.

(编辑 薛国文)

Effects of MCI-154, a calcium sensitizer, on myocardial calcium homeostasis in endotoxic shock in rats

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

Abstract Objective: To investigate the effects of MCI-154, a calcium sensitizer, on myocardial calcium homeostasis during endotoxic shock in rats. Methods: The calcium content of the myocardium, mitochondria and sarcoplasmic reticulum (SR) were measured in the rats with endotoxic shock 1, 3 and 5 h after the administration of milrinone or MCI-154. The myocardial cells of the rats were isolated and cultured with 1× 10^{-3}, 1× 10^{-2}, 1× 10^{-1} mmol/L of milrinone or MCI-154 respectively and then the cytosolic calcium concentration (Ca^{2+}) was determined with Fura 2-AM. Results: The calcium content of the myocardium, mitochondria and SR was significantly increased in endotoxic rats. It was further increased after the administration of milrinone but showed no significant further increase after that of MCI-154. The Ca^{2+} was obviously higher in the endotoxic rats than in the control. After incubated with different concentrations of milrinone, Ca^{2+} of the myocardial cells was significantly increased dose-dependently but no significant increase was found after the myocardial cells were incubated with MCI-154. Conclusion: The disorder of myocardial calcium homeostasis or calcium overloading will not be aggravated when MCI-154 is used to treat sepsis or septic shock.

Key words endotoxic shock; calcium homeostasis; calcium overloading; calcium sensitizer; MCI-154; rat

Foundation item: "Ninth five" obligatory budget of PLA(96L041)

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