DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.05.017

低压缺氧对大鼠膈肌肌浆网钙摄取功能的影响

刘 刚* 钱桂生 (第三军医大学附属新桥医院呼吸内科研究所) 重庆, 400037

提 要 目的: 探讨慢性低压缺氧大鼠膈肌肌浆网 Ca^{2+} 摄取功能的适应性变化。方法: 建立慢性低压缺氧大鼠模型,利用双波长荧光光度计,用 Fura-2荧光指示剂检测大鼠膈肌肌浆网 Ca^{2+} 摄取功能。结果: 慢性低压缺氧大鼠膈肌肌浆网 Ca^{2+} 摄取功能明显增强。结论: 慢性低压缺氧能增强大鼠膈肌兴奋-收缩耦联特性。

关键词 高原;缺氧;肌;肌浆网; Ca^{2+} ;大鼠

中图法分类号 R348.2; R845.22

缺氧是影响机体自身平衡的常见原因之一。不同程度的缺氧会导致机体结构和功能不同的变化。目前,急性和慢性中、重度缺氧对心肌、骨骼肌的影响研究较多。但有关膈肌对缺氧适应性变化的研究甚少。本研究采用模拟中高度高原(海拔 3 000 m)复制慢性低压缺氧模型,检测大鼠膈肌肌浆网(Sarcoplasmic reticulum, SR)钙摄取动力学的变化,以探讨低压缺氧时大鼠膈肌兴奋-收缩耦联特性的适应性变化。

1 材料与方法

1.1 实验动物

Wisatr大鼠 12只,体重(220± 10) g,购自本校动物中心。随机分为 2组。① 对照组(n= 6);② 低压缺氧组(n= 6): 大鼠置本校低压舱内,模拟海拔 3000 m,缺氧 8 h/d 5 d/周,共 6周。两组动物均常规饲养。

1.2 取样

大鼠用 10% 乌拉坦液按 1 ml/100 g腹腔注射麻醉,速取膈肌,置预冷的标准 Hanks液中,洗净血迹,去除膈肌肌腱和脂肪,称重,分离肌浆网备用。缺氧组在缺氧后 12 h内取样。

1.3 肌浆网囊泡的分离

参照 Carl[1]方法加以改进。

样本置缓冲液中(SR缓冲液含蔗糖 0.25 mol/L, Tris-HCl 10 mmol/L, pH7.0, EDTA-Na 0.1 mol/L),制备组织匀浆,匀浆用双层纱布过滤后,10000× g离心 20 min,弃沉淀,上清再 40000× g离心 45 min,沉淀用 0.6 mol/L KCl混悬,然后再 40000× g离心 45 min,最后沉淀物(即 SR)用不含 EDTA的上述 SR缓冲液混悬。Lorry法蛋白定量,调蛋白浓度 8 mg/ml,液氮速冻后,置 -70℃冰箱保存备用。SR提取过程在 0~ 4℃之间进行。

1.4 肌浆网 Ca^{2+} 摄取功能测定

参照 Kargacin等[2,3]进行。

1.4.1 试剂及仪器

游离型 Fura-2购自 Sigma公司, Luminescence Spectrometer LS 50B,美国 PE公司。

1.4.2 双波长荧光光度计设置参数

激发波长 340/380 nm,发射波长 510 nm, 340/380 nm荧光强度每秒检测 1次(检测在室温下进行)。

1.4.3 Ca^{2+} 浓度计算

$$[ION]_1 = Kd \times (Rt - Rmin) / (Rmax - Rt) \times Sf_2 / Sb_2$$

$[ION]_2$为 t时间 Ca^{2+} 浓度

Kd为 Fura-2对 Ca^{2+} 的离解常数

Rt为 Fura-2在 t时间的荧光强度比值

Rmin为 Fura-2在没有 Ca^{2+} 时完全结合型的荧光强度比值

Rmax为 Fura-2在饱和 Ca^{2+} 时完全结合型的荧光强度比值

$S_{FB} = Sf_2 / Sb_2$为 380 nm处游离型 Fura-2与结合型 Fura-2荧光强度之比值

1.4.4 SR对 Ca^{2+} 摄取检测

反应液(mmol/L)含 Tris-HCl 20, pH6.8, KCl 100, $MgCl_2$ 5,草酸钾 5, $CaCl_2$ 0.1, ATP-Na_2 4, Fura-2 2μm/ml和 SR蛋白囊(Protein capsula) 20μg/ml,反应体积 2 ml室温,反应液置石英杯中,用磁力搅拌籽混匀,待基线平衡后,用 Ca^{2+} (10 mmol/L, 5μl)触发反应,测定 340/380 nm比值变化,再计算 Ca^{2+} 浓度变化(用 LS 508 B, Ca^{2+} 计算软件)。

1.4.5 统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$表示,用 SPSS(Statistics package for social science)软件,采用配对及非配对 t检验。

2 结果

慢性低压缺氧组大鼠膈肌肌浆网 Ca^{2+} 摄取功能明显高于正常组,见表 1及图 1, 2。

正常组膈肌 SR Ca^{2+} 摄取速率在 100 s后逐渐稳定,而缺氧组膈肌 SR Ca^{2+} 摄取速率在 70 s后即趋于稳定(P> 0.05),见表 1。

* 刘 刚,男,35岁,主治医师,博士研究生

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

表 1 低压缺氧对大鼠膈肌肌浆网 Ca^{2+} 摄取功能的影响 (n= 6, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Effects of hypobaric hypoxia on the calcium uptake of diaphragmatic sarcoplasmic reticulum in rat (n= 6, $\bar{x}\pm s$)

Time(s)	Ca^{2+} concentration out of SR vesicles (nmol/L)		Velocity of Ca^{2+} uptake by SR (%)	
	Normal group	Hypoxia group	Normal group	Hypoxia group
0	1 151.65± 104.59	1 189.59± 72.54		
10	738.55± 10.13	736.73± 17.87	35± 5.8	38± 3.60
20	725.12± 11.98	567.03± 11.72	37± 5.8▲	52± 2.75**▲
30	564.02± 13.95	436.63± 8.82	52± 4.5▲	63± 2.90**▲
40	436.10± 30.75	361.45± 15.67	62± 5.0▲	70± 1.57**▲
50	434.92± 12.20	285.35± 9.63	62± 3.8▲	76± 2.22**▲
60	350.28± 11.78	245.52± 11.20	69± 3.0▲	79± 1.48**▲
70	321.12± 15.61	230.32± 6.41	72± 2.2▲	81± 1.61**▲
80	299.10± 10.30	223.22± 6.59	74± 3.1▲	81± 1.13**▲
90	278.53± 6.51	207.70± 13.47	76± 2.8▲	82± 2.03**
100	238.33± 9.74	206.83± 12.34	79± 2.1▲	83± 1.89**
110	232.95± 6.53	204.92± 3.98	80± 2.1	83± 1.07**
120	226.07± 12.29	206.75± 5.19	80± 2.5	83± 1.17

** : $P < 0.01$ *vs* normal; ▲: $P < 0.05$ *vs* former point

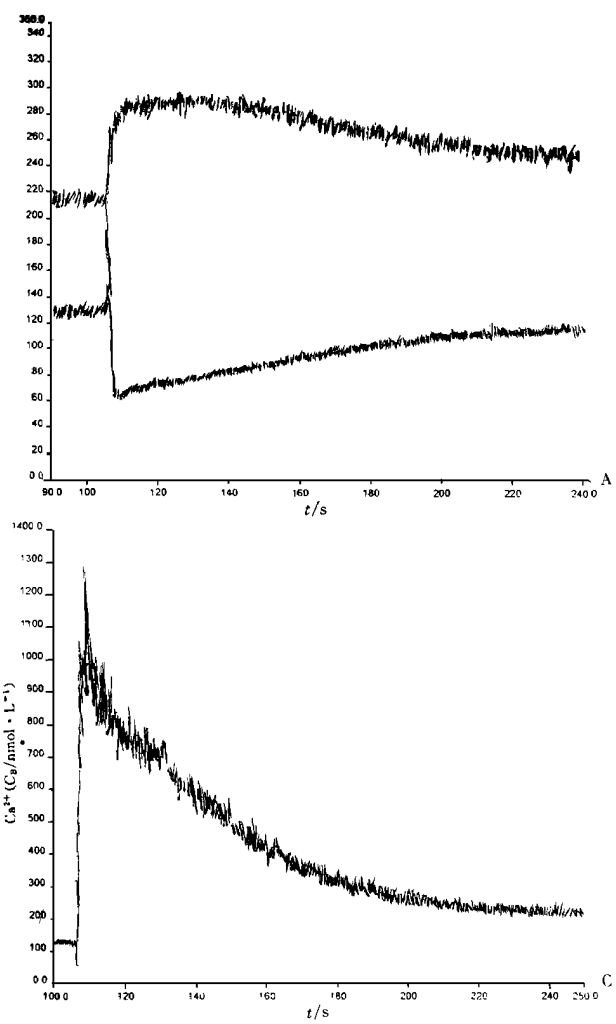


图 1 正常大鼠膈肌肌浆网 Ca^{2+} 摄取

A: 上部曲线 340 nm 荧光强度, 下部曲线 380 nm 荧光强度 B: 340/380 nm 荧光强度比值 C: 肌浆网囊外 Ca^{2+} 浓度

Fig 1 Ca^{2+} uptake by diaphragmatic SR in normal rats monitored with fura-2

A: Upper (fluorescence intensity at 340 nm), Lower (fluorescence intensity at 380 nm) B: Fluorescence ratio of 340/380 nm C: Ca^{2+} concentration out of SR vesicles

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

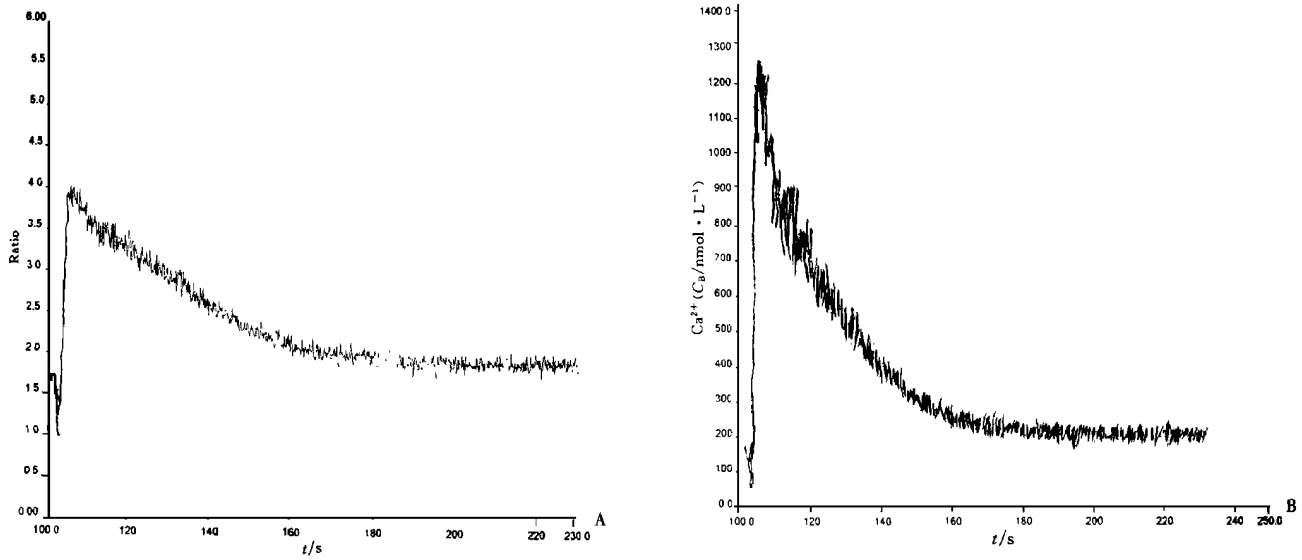


图 2　中度高原缺氧大鼠膈肌肌浆网 Ca^{2+} 摄取

A: 340/380 nm 荧光强度比值　　B 肌浆网囊外 Ca^{2+} 浓度

Fig 2　Ca^{2+} uptake by diaphragmatic SR after moderate hypobaric hypoxia in rats

A: Fluorescence ratio of 340/380 nm　　B: Ca^{2+} concentration out of SR vesicles

3　讨论

Ca^{2+} 在肌肉兴奋-收缩耦联中起着关键作用。既往常用 Ca^{2+} 放射性同位素示踪法作肌浆网 Ca^{2+} 动力学的研究。然而,此法需较大量的 SR蛋白囊标本,且受敏感性较差、放射核素非特异性结合等因素影响,故不能准确反映肌浆网 Ca^{2+} 动力学状况。

Kargacin等 1988年应用 Ca^{2+} 特异性结合荧光探针 Fura-2游离酸对骨骼肌肌浆 Ca^{2+} 摄取功能进行研究,并于 1994年用同样方法对心肌肌浆网 Ca^{2+} 摄取动力学进行成功研究,表明使用 Fura-2游离酸指示剂来检测肌浆 Ca^{2+} 的动态变化是一个快速、准确的方法。本实验对膈肌 SR Ca^{2+} 摄取动力学检测的结果也证实了这点。

大量肌纤维特性的研究发现,不同的快慢性肌纤维有不同的 Ca^{2+} 摄取动力学[4]。慢肌纤维和快肌纤维的 Ca^{2+} 摄取机制有显著差异[5]。本实验慢性低压缺氧组膈肌 SR Ca^{2+} 摄取能力增强,可能与纤维类型转变有关。肌肉对缺氧的适应变化除缺氧因素外,肌肉本身功能活动可能起重要作用[6]。缺氧条件下,肢体肌肉为降低全身氧耗而活动减少,这可能是骨骼肌氧化能力降低的重要原因。而膈肌与肢体肌相反,因缺氧而致肺通气量增加,膈肌活动增强。晚近报道慢性低压缺氧一月 (海拔 5000 m),Ⅱ A纤维比例明显增加,膈肌氧化能力增强[7]。

慢性低压缺氧大鼠 SR Ca^{2+} 摄取功能增强,可能与 SR Ca^{2+} -ATP酶活性增强有关。孙希武等研究海拔 5000 m、8000 m减压低氧对心肌 SR Ca^{2+} 摄取及 Ca^{2+} -ATP酶活性和 Ca^{2+} -ATP mRNA表达的影响,结果表明,缺氧程度越重,时间越长, SR Ca^{2+} 摄取功能低下越明显。心肌缺氧后,首先引起细胞内微环境的变化,即细胞内酸中毒,这种变化可抑制 SR Ca^{2+} -ATP酶活性和 Ca^{2+} 摄取能力。较长时间缺氧后,心肌 SR Ca^{2+} 摄取能力进一步降低,而导致细胞内 Ca^{2+} 超负荷,细胞内 ATP分解供能和钙泵之间脱耦联,导致心肌细胞功能的进一步损伤,这些均说明海拔 5000 m缺氧对心肌 SR Ca^{2+} 摄取功能损伤明显,而机体不能适应。但目前尚无有关缺氧状态下膈肌 SR Ca^{2+} 摄取功能的研究报道。

本实验模拟海拔高度为 3000 m,此时动物动脉血氧饱和度约 90%,系轻度缺氧状态。膈肌缺氧程度在海拔 5000 m时其氧化酶活性增强,线粒体密度增加,毛细血管密度增大,无明显组织损伤表现。肢体活动少,而膈肌活动强度却增加,即作适应性运动锻炼。结果表明在低压缺氧下 SR Ca^{2+} 摄取功能增强,因此我们推测轻度缺氧后 SR Ca^{2+} -ATP酶活性可能增加。

本研究结果表明,利用双波长荧光分光光度计,用 Fura-2游离酸是检测 SR Ca^{2+} 动态变化的好方法。海拔 3000 m缺氧一月后,大鼠膈肌 SR Ca^{2+} 摄取功能明显增强,其原因尚有待进一步探讨。

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

参考文献

1 Carl S L, Feix K, Caswell A H. Immunolocalization of triadin, DHP receptors in adult and developing skeletal muscle of rats. Muscle& Nerve, 1995, 18(11): 1232

2 Kargacin M E, Scheid C R, Honeyman T W. Continuous monitoring of Ca^{2+} uptake in membrane vesicles with fura-2. Am J Physiol, 1988, 255(5 Pt1): C694

3 Kargacin M E, Kargcin G J. Methods for determining cardiac sarcoplasmic reticum Ca^{2+} pump kinetics form fura-2 measurements. Am J Physiol, 1994, 267(Cell Physiol 36): 1145

4 Schloffino S, Reggiani C. Molecular diversity of myofibrillar proteins: Gene regulation. Physiol Rev, 1996, 76(2): 371

5 Lunde P K, Sejersted O M. Intracellullar calcium signalling in striated muscle cell. Scand J Clin Lab Invest, 1997, 57(7): 559

6 Powers S K, Criswell D, Lieu F K, *et al*. Diaphragmatic fiber type specific adaptation to endurance exercise. Respir Physiol, 1992, 89(2): 195

7 王东林,毛宝龄,钱桂生,等.慢性缺氧大鼠膈肌纤维类型适应性变化.中国应用生理杂志, 1998, 14(1): 34

(收稿: 1999-03-10;修回: 1999-05-10)

(编辑 王 红)

Effects of hypobaric hypoxia on calcium uptake of sarcoplamic reticulum in rats

Liu Gang, Qian Guisheng (Department of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037)

Abstract Objective: To observe the adaptive changes in calcium uptake of diaphragmatic sarcoplasmic reticulum in rat in response to moderate hypobaric hypoxia. Methods: After the model of hypobaric hypoxia was established in rats, calcium uptake by diaphragmatic sarcoplasmic reticulum was determined with dual-excitation fluorometer using Fura-2 free acid as the tracer. Results: The function of calcium uptake of diaphragmatic sarcoplasmic reticulum was significantly increased after chronic hypobaric hypoxia. Conclusion: Chronic moderate hypobaric hypoxia enhances the excitation-contraction coupling in the diaphragm in rats.

Key words altitude; hypoxia; diaphragm; sarcoplasmic reticulum; calcium; rat

---

(上接 346页)

消毒后,只要在根管中置入有持续消毒杀(抑)菌作用的药物,根尖病变仍可愈合[1]。因此,我们在尽可能的消除了所有根管内的感染坏死物或用 FC液固定少量残余根髓,覆盖根管口和进入根管内的药物会沿着根管壁及牙本质小管通过扩散和毛吸作用至尖周区,起到消除病变的作用。替硝唑对各种厌氧菌有特效,且性能稳定,血药浓度高、药效持久、毒副作用小且无其它配伍禁忌[2]。头孢氨苄霉素是广谱抗菌素,药效强而久。鱼肝油能安抚止痛,促进病灶钙化,利于创面愈合。与报道[3]相比,本组有较高的成功率(92.86%),表明本法及所用药物符合根管治疗原理。

3.2 对本疗法的评价

优点: 操作简便,不扩大根管,在彻底清理和加强根管系统化学消毒后,不须严密充填根管,便可达到治愈的目的;疗效好,疗程短,一般治疗 2次即可永久充填,减少了病人复诊次数;适应症宽,无年龄及牙位的选择,药物配方简便,易于获取;失败后可重复本法治疗或改做常规根管充填。

失败原因分析: 4例牙折,多因死髓牙脆性增强,牙体缺损多或制洞过大所致; 2例牙龈窦道与清理、消毒根管不彻底有关; 1例深牙周袋多为咬合创伤所致。

操作注意: 尽量彻底清理和消毒根管,术毕适当降 ,酌情壳冠保护,以防止牙折。

关键词 新根管疗法;替硝唑头孢氨苄霉素糊剂;尖周炎

中图法分类号 R781.341

参考文献

1 张承禹,戴杏梅. MED糊剂治疗尖周病疗效观察.口腔医学纵横, 1993, 9(3): 159

2 强永久,刘 玲.替硝唑空管糊剂治疗尖周病.牙体牙髓牙周病学杂志, 1995, 5(3): 166

3 刘宗惠,邬黎明,马素玲.林可霉素氧化锌糊剂一次法充填根管后的近期疗效观察.口腔医学纵横, 1993, 9(1): 56

(收稿: 1998-02-19;修回: 1999-03-03)

(编辑 张大春)

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