

异紫堇啡碱对 PGF₂ 诱导心肌细胞肥大的作用

蒋青松^{1,2}, 王会玖¹, 吴 芹¹, 陆远富¹, 李 梨², 杨丹莉¹, 周岐新², 黄燮南¹

(1. 遵义医学院 药理学教研室, 贵州 遵义 563003; 2. 重庆医科大学 药理学教研室, 重庆 400016)

[摘要] 目的 从细胞水平研究异紫堇啡碱对 PGF₂ 诱导心肌肥大的作用。方法 利用培养的新生大鼠心肌细胞,以细胞直径大小和蛋白含量为心肌肥大反应的指标,用 Fura 2/AM 为荧光指示剂测定心肌细胞内钙浓度。结果 异紫堇啡碱 10⁻⁴ mol/L 可明显抑制 PGF₂ 诱导的心肌细胞肥大和细胞内钙增加。结论 异紫堇啡碱可抑制 PGF₂ 诱导心肌细胞肥大,该作用可能与其抑制细胞内钙增加有关。

[关键词] 异紫堇啡碱;PGF₂;心肌细胞肥大;细胞内钙

[中图分类号] R972 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2715(2004)02-0114-03

Effects of isocorydine on cardiomyocyte hypertrophy induced by Prostaglandin F₂

JIANG Qing-song^{1,2}, WANG Hui-jiu¹, WU Qin¹, LU Yuan-fu¹, LI Li², YANG Dan-li¹, ZHOU Qi-xin², HUANG Xie-nan¹

(1. Department of Pharmacology, Zunyi Medical College, Zunyi Guizhou 563003, China; 2. Department of Pharmacology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effects of isocorydine on cardiac myocyte hypertrophy induced by prostaglandin F₂. **Methods** Neonatal rat cardiomyocyte hypertrophic response was assayed by measuring cell diameter and protein content. Using Fura 2/AM as a fluorescent indicator, the intracellular free calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) was measured. **Results** Isocorydine at 10⁻⁴ mol/L could inhibit cardiomyocyte hypertrophy and the increase of $[Ca^{2+}]_i$ induced by prostaglandin F₂. **Conclusion** Cardiomyocyte hypertrophic response induced by prostaglandin F₂ could be abolished by isocorydine partly, which may be related to its inhibitory effects on the increase of $[Ca^{2+}]_i$.

[Key words] isocorydine; prostaglandin F₂; cardiomyocyte hypertrophy; calcium

异紫堇啡碱(Isocorydine, ISOC)系从罂粟科植物秃疮花、紫金龙等植物中提取出来的生物碱,在心血管系统具有广泛的药理作用^[1,2]。我们的研究表明,其扩血管及心脏作用均与抑制受体中介的钙释放和钙内流,使细胞内钙减少有关^[3,4]。很多研究表明,细胞内钙的增加是致心肌肥厚的最基本信号,故本研究拟利用 Wistar 乳鼠心肌细胞培养,从细胞水平研究 ISOC 对 PGF₂ 诱导心肌细胞肥大的作用,为该药

的临床应用提供基础实验依据。

1 材料

1.1 药品与试剂 ISOC 由陕西澄县人民医院连秀峰老师提供,纯度 95% 以上;PGF₂ 为 Cayman Chemical 产品;Fura 2/AM、EGTA 均为 Sigma 产品;Triton X-100 和牛血清白蛋白(BSA)均为华美生物工程公司产品;小牛血清购自上海第二医科大学实验中心;DMEM 为 GIBCO 产品,胰蛋白酶为上海佰奥生物科技有限公司产品;RIPA 裂解液购至美国 Upstate 公司;Bradford 蛋白浓度测定试剂盒为江苏碧云天产品。D-Hank's 的成分为(mmol/L):NaCl 137.0, KCl 5.0, Na₂HPO₄ 0.6, KH₂PO₄ 0.4, NaHCO₃ 3.0, Glucose 5.6。pH 7.30-7.40。在 D-Hank's 液中加入 CaCl₂ 1.30mmol/L 和 MgCl₂ 0.5 mmol/L 即为

[收稿日期] 2004-02-19; **[修回日期]** 2004-04-19

[作者简介] 蒋青松(1972—),女,贵州省织金县人,硕士,讲师,在读博士。研究方向:心血管药理。

[通讯作者] 黄燮南,男,硕士,教授,博士及硕士生导师,遵义医学院院长。Tel:(0852)8205416;Email:1kj600@sohu.com

Hank's 液。

1.2 仪器 RF-5000 荧光分光光度计(日本岛津公司);BI2000 医学图象分析系统(成都泰盟有限公司);酶标仪(Bio-Tek Instruments);SMZ-1 型控温振荡器(深圳天南海北实业公司);TMS-1015 倒置显微镜(日本奥林巴斯公司);TH-201 CO₂ 孵箱(日本)。

2 方法

2.1 心肌细胞培养 取出生后 1~4d 的 Wistar 大鼠心脏于 D-Hank's 液中,将心室肌剪成 1~3mm³ 小块并移入离心管,加入 0.125% 胰蛋白酶于 37℃ 恒温摇床中消化 30min,弃上清,加入 D-Hank's 液吹打至浑浊,用 200 目不锈钢筛过滤,同时加入含 20% 小牛血清的 DMEM 终止消化。然后 1000rpm 离心 5min,将细胞沉淀用含 20% 小牛血清的 DMEM 悬浮,调细胞密度至 1.5~3 × 10⁶ 个/ml,分别接种于 25ml 培养瓶内(用于检测细胞内钙含量)或调细胞密度至 0.5~1 × 10⁵ 个/ml 于 6 孔板(用于 HE 染色检测细胞直径)及 24 孔板(用于测定细胞蛋白质含量),然后置于 37℃、5% CO₂ + 95% O₂ 的二氧化碳培养箱中培养。18~30h 后见培养细胞贴壁生长,48h 可见细胞出现自发搏动。培养前 2d 加入 0.1mmol/L 5-³BrdU 抑制成纤维细胞生长。于细胞培养 48h 后更换培养液,72h 换无血清培养液并加 PGF₂ 10⁻⁷mol/L 孵育 48h 后用于检测。

2.2 心肌细胞直径测量 取有心肌细胞生长的玻片,冷 D-Hank's 液漂洗血清及杂质,4% 多聚甲醛固定 15min,晾干,常规 HE 染色后用 BI2000 医学图象分析系统测量单个细胞直径,每孔测 5 个视野,每个视野测 10~15 个细胞,取其平均值。每组重复 3 次。

2.3 心肌细胞蛋白含量检测 将 24 孔板内培养好的心肌细胞用 0.125% 胰蛋白酶消化,细胞计数。然后用 0.01mol/L PBS 离心 3 次(1000 × g, 2min)。弃上清,加入 RIPA 裂解缓冲液,超声破碎细胞,每管 30s × 2 次,冰上操作。再以 12000 × g 离心 20min,取上清液根据蛋白检测试剂盒说明书操作,测定心肌细胞蛋白质含量,并根据每孔细胞数计算单个心肌细胞的蛋白含量。

2.4 心肌细胞内游离钙浓度([Ca²⁺]_i)测定^[5] 将培养瓶内培养好的心肌细胞用 0.125% 胰蛋白酶消化制成细胞悬液,经台盼兰染色,如成活率在 90% 以上,可用于负载。即在上述细胞悬液中加入 5μmol/L 的 Fura 2/AM,37℃ 恒温避光振荡 50min,离心弃上清,再用含 0.2% BSA 的 Hank's 液冲洗 2 次。然后

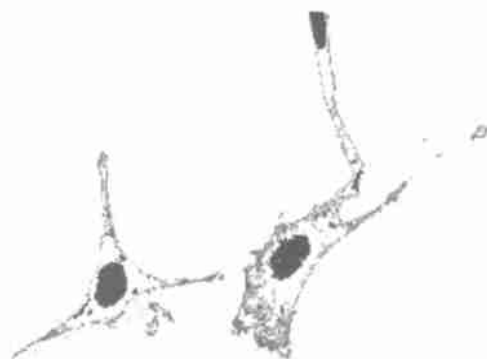
用 Hank's 液重新悬浮,调细胞密度至 10⁶ 个/ml,用于检测细胞内[Ca²⁺]_i。荧光分光光度计的发射波长为 500nm,激发发射光栅为 5nm 和 10nm,激发波长为 340~380nm。根据公式 $[Ca^{2+}]_i = K_d \times (F - F_{min}) / (F_{max} - F)$ 计算[Ca²⁺]_i 浓度。式中 K_d 为 Fura 2/AM 与 Ca²⁺ 结合反应的解离常数(224nmol/L);F 为细胞的荧光强度;F_{max} 是加入 0.98g/L Triton X-100 测得的最大荧光值;F_{min} 为加入 EGTA 5mmol/L 后测得的最小荧光值。

2.4 统计学处理 实验结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 t 检验进行统计学处理。

3 结果

3.1 ISOC 对 PGF₂ 诱导心肌细胞肥大的影响 加入 PGF₂ 10⁻⁷mol/L 后,HE 染色见心肌细胞明显增大,出现核分裂相,细胞肿胀,分界不清(图 1, a、b)。用 BI2000 医学图象分析系统测量心肌细胞直径明显增大($P < 0.001, n = 3$)。加入不同剂量 ISOC 5min 后再加入 PGF₂,心肌细胞直径有所恢复,但仅 10⁻⁴mol/L 具有显著性差异($P < 0.05, n = 3$)。ISOC 3 × 10⁻⁵ 及 10⁻⁵mol/L 亦使心肌细胞缩小,但无统计学意义($P > 0.05, n = 3$)。HE 染色亦显示,加入 ISOC 10⁻⁴mol/L 后,细胞明显缩小,肿胀减轻(图 1, c)。心肌细胞蛋白质含量检测与细胞直径大小结果一致,加入 PGF₂ 10⁻⁷mol/L 后心肌细胞蛋白质含量明显增加,ISOC 10⁻⁴mol/L 能明显抑制 PGF₂ 的作用($P < 0.001, n = 3$)(表 1)。

3.2 ISOC 对 PGF₂ 诱导心肌细胞肥大[Ca²⁺]_i 的影响 在本实验条件下,测得心肌细胞静息[Ca²⁺]_i 为 149.9 ± 29.3nmol/L,加入 PGF₂ 10⁻⁷mol/L 孵育 48h 后[Ca²⁺]_i 明显升高,为 274.3 ± 42.3nmol/L($P < 0.001, n = 6$)。ISOC 10⁻⁴mol/L 可明显抑制 PGF₂ 引起的[Ca²⁺]_i 升高($P < 0.05, n = 6$)。但 ISOC 3 × 10⁻⁵ 及 10⁻⁵mol/L 无此作用(表 1)。



a. 正常心肌细胞



b. PGF₂ 10⁻⁷ mol/L 诱导肥大心肌细胞

c. 异紫堇啡碱 10⁻⁴ mol/L + PGF₂ 10⁻⁷ mol/L

图 1. 异紫堇啡碱对 PGF₂ 诱导心肌细胞肥大的影响(HE 染色, 400 ×)

表 1 异紫堇啡碱(ISOC)对 PGF₂ 诱导心肌细胞肥大细胞直径、蛋白质含量及细胞内游离钙([Ca²⁺]_i)的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Effects of isocorydine on the cell diameter and protein content and the intracellular free calcium concentration ([Ca²⁺]_i) of cardioomyocyte hypertrophy induced by Prostaglandin F₂ ($\bar{x} \pm s$)

分组(mol/L)	心肌细胞直径(μm) (n=3)	心肌细胞蛋白质含量(pg/个细胞) (n=3)	[Ca ²⁺] _i (nmol/L) (n=6)
对照组	28 ±6	274.50 ±27.17	149.9 ±29.3
PGF ₂ 10 ⁻⁷	71 ±10 ^{***}	460.71 ±26.45 ^{***}	274.3 ±42.3 ^{***}
PGF ₂ 10 ⁻⁷ + ISOC 10 ⁻⁴	56 ±12 [#]	389.00 ±17.64 ^{###}	228.2 ±14.2 [#]
PGF ₂ 10 ⁻⁷ + ISOC 3 ×10 ⁻⁵	68 ±23	429.00 ±59.48	262.3 ±28.1
PGF ₂ 10 ⁻⁷ + ISOC 10 ⁻⁵	71 ±22	449.00 ±32.00	260.2 ±38.9

^{***}:与对照组比较, P < 0.001; # :与 PGF₂ 10⁻⁷ mol/L 组比较, P < 0.05; ### : P < 0.001。

4 讨论

心肌肥厚是指心肌细胞增大而无细胞分裂,以细胞内蛋白合成增加和细胞体积增大为主要特征,是心肌细胞对高血压、瓣膜病、急性心肌梗塞及先天性心脏病等常见临床疾病的一种基本应答。由于人出生后不久心肌细胞就失去分裂能力,所以成年心肌细胞只能以这种机制来适应负荷的增加。虽然初期心肌肥厚是一种有益的适应性反应,但长期应激所致持续性心肌肥厚可导致扩张性心肌病、心衰和猝死,是心血管疾病常见死亡原因之一。

关于心肌肥厚发生机制,多年来一直是心血管疾病研究领域的热点,但是至今还没有一个明确的结论。一般观点认为心肌肥厚是心脏对急、慢性血流动力学超负荷的一种基本的代偿性反应,是一个多因素参与的复杂的病理生理过程。在心肌肥厚众多的参与因子中,心脏局部肾素-血管紧张素系统(RAS)已经被提示在心室的肥厚和重构过程中有重要作用^[6]。但对另一个血管活性物质 PGF₂ 在心肌肥厚过程中的作用研究较少。现有资料表明^[7,8],缺血或压力超负荷等应激性反应可使心肌 PGF₂ 形成增加,导致心肌肥厚。而前列腺素合成酶抑制剂可完全阻断肺动脉高压或肾上腺素受体激动剂引起的心肌

肥大。提示 PGF₂ 参与了心肌适应性代偿肥大过程。离体实验中也已证实,PGF₂ 可刺激新生大鼠心肌细胞增生肥大。我们的实验结果与之一致。同时,PGF₂ 亦引起细胞内钙明显增加,提示在 PGF₂ 诱导的心肌肥厚过程中钙的参与有着重要作用。ISOC 高浓度(10⁻⁴ mol/L)可明显抑制 PGF₂ 诱导的心肌细胞直径增大和蛋白质含量增加,亦可抑制 PGF₂ 引起的细胞内钙增加,说明 ISOC 抑制心肌细胞肥大的作用至少部分与其抑制细胞内钙增加有关,并可一定程度上逆转 PGF₂ 诱导的心肌肥大,但其作用具体环节尚需进一步实验研究明确。

[参考文献]

- [1] 张作华. 异紫堇啡碱对心血管系统的作用[J]. 中草药, 1984, 15(1): 20-22.
- [2] 李力恒, 杨烈, 张孟君, 等. 异紫堇定抗兔实验性心律失常的作用[J]. 云南中医杂志, 1990, 11(4): 37-38.
- [3] 蒋青松, 黄燮南, 孙安盛, 等. 异紫堇啡碱对血管平滑肌钙内流核钙释放的影响[J]. 中国药理学通报, 1998, 14(6): 546-548.
- [4] 黄燮南, 吴芹, 雷开键, 等. 异紫堇啡碱对培养乳鼠心肌内游离钙的影响[J]. 遵义医学院学报, 2002, 25(2): 97-99.

- [5] Gryinkieneicz K, Poenie M, Tsien Ry. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties[J]. J Biol Chem, 1985, 260:3340.
- [6] Varagic J, Frohlich ED. Local cardiac renin-angiotensin system: hypertension and cardiac failure[J]. J Mol Cell Cardiol, 2002, 34(11):1435-1442.
- [7] Lai J, Jin K, Yang R, et al. Prostaglandin F₂ induces cardiac myocyte hypertrophy in vitro and cardiac growth in vivo[J]. Am. J. Physiol, 1996; 271(Heart Circ. Physiol. 40): 2179-2208.
- [8] John WA, Darren SM, Maggie KY, et al. Prostaglandin F₂ stimulates hypertrophic growth of cultured neonatal rat ventricular myocytes[J]. J Biol Chem, 1996, 271(2): 1179-1186.

[责任编辑:万启惠]

微波技术结合 CCQ 治疗剂加碘仿治疗残髓炎 52 例疗效观察

夏 青

(成都铁路分局医院 口腔科,四川 成都 610081)

[关键词] 微波;CCQ 治疗剂;碘仿;残髓炎

[中图分类号] R781.32 [文献标识码] B [文章编号] 1000-2715(2004)02-0117-01

经过牙髓治疗的牙齿,根管内残留活髓组织继发感染,引起炎症病变者,称为残髓炎。由于其症状不典型,易造成误诊,而且治疗也比较困难。笔者利用微小技术,CCQ 治疗剂加碘仿,一次性完成治疗残髓炎,取得满意效果,现小结如下。

1 材料与方法

1.1 一般资料 残髓炎患者 52 人,男 32 人,女 20 人,年龄最小 15a,最大 62a,所有患牙均已做过牙髓或根管治疗。

1.2 适应症选择 无严重心脏病、无安装心脏起搏器者。

1.3 操作方法 选用合适根管长度及粗细的微波辐射器探针插入根管达根尖部。电流 35~45mA,连续 5~8 次。立刻作根管预备,以 CCQ 治疗剂加碘仿充填根管,用扩大针导入使之完全充满于根管内,勿重压,以免超填,垫底、充填。

2 结果

2.1 疗效评定标准 治愈:自觉症状消失,有正常咀嚼功能; 无效:自觉症状仍存在,影响咀嚼功能。

2.2 疗效 治愈 50 例,治愈率 96.2%,无效 2 例(占 3.8%)。

3 讨论

残髓炎传统治疗方法采用重新失活或局麻下拔髓,待炎症消失后重作牙髓或根管治疗,但失活剂在剂量和时间上均不宜掌握,易引起药物性尖周炎,局

麻下拔出残髓如遇有侧支根管则不易拔尽残髓,至残髓炎复发且费时。微波技术的特点是被照射物按其组成物质的热吸收特性就地生热,物体内外同时均匀发热,无须热传导过程。微波治疗则是利用了内生热效应,可使约 3mm 治疗区域温度达到 65~100℃,从而使残髓组织产生高热、凝固、坏死以达到治疗目的,同时微波还具有灭菌、消炎、活血止痛等功效,经其照射过的部位循环加强,局部供血改善,水肿消失,伤口不易感染,目前已有报导利用微波可一次性完成根管治疗,从而也避免了根管消毒剂对机体的副作用。

对于严重心脏病尤其安装了心脏起搏器的患者,由于在使用微波针状辐射器内照射时,腔体电流为 35~45mA,可使根管内形成较强电场,且此辐射电场有较大的外透力,因而在上述病人治疗中应慎用或禁用。

CCQ 牙髓治疗剂由液剂和粉剂所组成。液剂:邻甲氧酚——甲酚树脂,具有良好的抗菌作用;粉剂:氢氧化钙、硫酸钡等,可以中和炎症所产生的酸性物质而促进愈合、减少疼痛、促进修复性牙本质的生成。两者混合,5~20min 硬化,使用时操作简单。

碘仿与甲醛对需氧菌及厌氧菌均有较好的抑菌及杀菌作用,碘仿还可以以游离碘离子的形式对不能消除的感染部分起治疗作用。碘仿与 CCQ 治疗剂混合后,对其硬化影响不大,因而在外力作用下(适度),使得完全地充填于根管中,达到更好的治疗效果。综上所述,用此方法具有简单、快速、安全、有效、副作用等优点。

[责任编辑:杨明富]