

内毒素休克大鼠心脏 IP₃ I 型及 III 型受体表达的变化及意义

王雪莲¹, 刘冬妍², 李颖², 刘沛³

(1. 中国医科大学附属盛京医院感染科, 辽宁 沈阳 110004; 2. 附属盛京医院检验科; 3. 附属第一医院传染科)

[摘要] 目的: 建立内毒素休克动物模型留取心脏检测 1,4,5 三磷酸肌醇(IP₃) I 型及 III 型受体表达的变化, 探讨内毒素休克中心脏收缩性下降的可能机制。方法: 股静脉注射脂多糖(LPS)建立内毒素休克动物模型, 留取心脏标本用免疫组化方法检测大鼠心脏 IP₃ I 型受体及 III 型受体的表达。结果: IP₃ I 型受体的表达与对照组相比升高, 早期的增强最为明显, 早期与对照组及同剂量内毒素组后期之间差异有统计学意义($P < 0.01$)。除闰盘处表达增强外, 还可见沿细胞膜异位表达。IP₃ III 型受体的表达较对照组也见增强($P < 0.01$), 但未见异位表达, 5 mg/kg 内毒素组的增强高于 10 mg/kg 组, ($P < 0.01$), 处死组增强最明显, 与对照组及 10 mg/kg 组之间差异显著($P < 0.01$)。结论: IP₃ I 型和 III 型受体表达的变化可能影响心肌收缩性, 进而参与内毒素休克中平均动脉压的调节。

[关键词] 内毒素休克; 心脏; IP₃ I 型受体; IP₃ III 型受体

[中图分类号] R441.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-4646(2007)05-0508-03

The expression of IP₃ I receptor and IP₃ III receptor in the heart of rat with endotoxic shock

WANG Xue-lian¹, LIU Dong-yan², LI Ying², LIU Pei³

(1. Department of Infectious Diseases, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Shengjing Hospital; 3. Department of Infectious Diseases, The First Affiliated Hospital)

[Abstract] **Objective:** To probe for the possible mechanism of myocardial depression in endotoxic shock by establishing the animal model of endotoxic shock and detecting the change of the expression of IP₃ receptor type I and III. **Methods:** The animal model of endotoxic shock was established by injecting lipopolysaccharide of different doses via femoral vein, heart sample was prepared and the expression of IP₃ receptor type I and III was detected by immunohistochemistry. The change of IP₃ receptor type I and III expression was observed with statistical analysis. **Results:** The expression of IP₃ receptor type I and III was elevated after injecting lipopolysaccharide compared with the control group. The overexpression of them was the most in the early stage of endotoxic shock. The expression of IP₃ receptor type I was seen along the cell membrane of myocyte besides intercalated disc. The difference of IP₃ receptor type III expression between different dose groups of lipopolysaccharide was statistically significant, and the difference between control group and 10 mg/kg group was statistically significant, too. **Conclusion:** The change of IP₃ receptor type I and III expression may affect the myocardial contractility, and may be involved in the regulation of mean arterial pressure in endotoxic shock.

[Key words] endotoxic shock; heart; IP₃ receptor type I; IP₃ receptor type III

感染性休克的主要特征是体内重要器官的低灌注状态, 血流动力学改变包括低血压、低外周血管阻力、血管对缩血管物质反应性下降、血流重新分布等。感染性休克早期心脏收缩性增强, 而晚期心脏收缩性下降。心脏可以表达 1,4,5-三磷酸肌醇(inositol 1,4,5-triphosphate, IP₃)及其受体, 它参与肌浆网内细胞储备钙的释放, 决定细胞内钙离子水平, 并进而影响心肌细胞的收缩性。本实验应用免疫组化方法研究大鼠心脏 IP₃ I 型和 III 型受体表达的变化, 探讨感染性休克中心脏收缩性下降的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

内毒素(脂多糖, lipopolysaccharide, LPS)O127B8 (Sigma 公司); SABC 即用型免疫组化试剂盒(北京中山生物技术有限公司); 兔抗羊 IP₃ I 型及 III 型受体多克隆抗体(Santa Cruz 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 动物模型制备: 健康雄性 Wistar 大鼠, 分别股静脉注射小剂量 LPS 5 mg/kg 和大剂量 LPS 10 mg/kg, 观察平均动脉压的变化, 在平均动脉压很快下降并随即回升至最高时处死大鼠作为处死组, 以代表内毒素休克早期, 详见文献[1]。

1.2.2 标本的留取: 观察 6 h 或动物死亡时开胸取心室, 固定、包埋, 切 4 μm 厚的切片用于免疫组化。

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30170849)

[作者简介] 王雪莲(1971 -), 女, 讲师, 博士。

E-mail: syhelen7518@yahoo.com.cn

1.2.3 免疫组化技术检测心脏 IP₃ I 型及 III 型受体的表达:常规免疫组化 SABC 方法操作。

1.2.4 免疫组化记分方法:着色强度评分:无 0 分;弱 1 分;中 2 分;强 3 分;阳性细胞率评分:<20% 0 分;20%~40%1 分;41%~60%2 分;>60%3 分。评分值:(着色强度评分+阳性细胞率评分)/2。

1.3 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,SPSS10.0 ONE-WAY ANOVA 软件进行统计分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠心肌细胞 IP₃ I 型受体的表达

对照组 IP₃ I 型受体呈低水平表达,主要定位于心肌细胞闰盘,可见浅棕黄色颗粒。小剂量 LPS 组 IP₃ I 型受体的表达明显增强 ($P < 0.01$),着色加深,而且表达面积增大。注 LPS 后 IP₃ I 型受体的表达与对照组相比均升高 ($P < 0.01$),处死组的增强最为明显,与对照组和大剂量 LPS 组之间差异有统计学意义 ($P < 0.01$),除闰盘处大量表达外,还可见沿细胞膜分布的棕黄色颗粒(图 1)。



A: 对照组;B:大剂量 LPS 组;C:小剂量 LPS 组;D:处死组

图 1 心脏 IP₃ I 型受体的表达 SABC 法 × 400

Fig.1 The expression of IP₃ I receptor in the heart SABC × 400

2.2 大鼠心肌细胞 IP₃ III 型受体的表达

对照组 IP₃ III 型受体的表达量高于 IP₃ I 型受体表达量。注射 LPS 后 IP₃ III 型受体的表达较对照组均增强,但未见异位表达,小剂量 LPS 组的增强高于大剂量 LPS 组,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),处死组增强最明显,对照组与各组之间差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)(图 2)。



A:对照组;B:大剂量 LPS 组;C:小剂量 LPS 组;D:处死组

图 2 心脏 IP₃ III 型受体的表达 SABC 法 × 400

Fig.2 The expression of IP₃ III receptor in the heart SABC × 400

2.3 免疫组化评分结果(图 3)

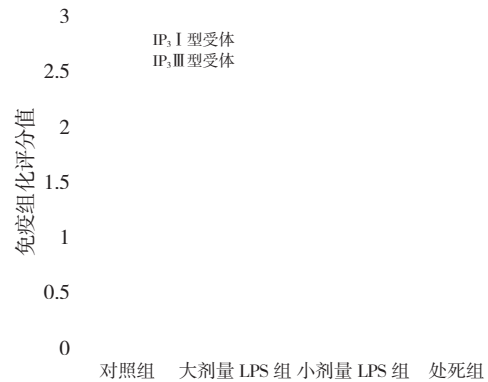


图 3 各组免疫组化评分

Fig.3 The immunological mark of the different groups

3 讨论

细胞的肌醇磷脂途径是近年来发现的有别于腺苷环化酶蛋白激酶系统的另一重要信号转导途径。IP₃ 是细胞内一种重要的第二信使,与其特异性受体结合后介导胞内钙释放入胞浆,在调节多种生物细胞的功能活动中发挥重要作用。在心肌细胞胞浆钙浓度的调节中 IP₃ 是不可缺少的,它的变化可以影响心肌收缩性^[2]。

心脏能表达 IP₃ I, II 及 III 型受体,有学者认为 II 型受体表达最多^[3],也有学者认为 III 型受体表达最多^[4]。II 型受体在心室肌细胞内的表达部位是细胞核周区域^[5],在肌浆网处表达的量很少。IP₃ 的生成部位通常位于肌浆网附近,而且通常仅作用于生成区域附近^[6]。I 型受体在普肯耶细胞和其他传导细胞内表达量高于心房和心室肌细胞,心房肌细

胞内表达的量又高于心室,它定位于心肌细胞的闰盘上,这提示 IP₃ I 型受体可能参与细胞间信息传递,也可能参与钙内流。III 型受体的表达主要位于心肌细胞肌浆网,它可能参与细胞内储备钙的释放。

在本实验中我们发现两者的表达均明显增强,而且在内毒素休克的早期它们的增强最为明显,而后期虽较对照组增强但较早期有所下降,变化与平均动脉压的变化相一致,IP₃ I 型受体与 IP₃ 结合的能力远大于 IP₃ III 型受体^[7]。这说明在内毒素休克过程中,心室肌细胞内 IP₃ 与 I 型受体结合增加,早期可能导致钙内流或细胞内钙释放增加,细胞收缩功能增强,从而使平均动脉压上升。我们推测在感染性休克早期心肌细胞通过异位表达的 IP₃ I 型受体调节细胞内钙水平使其上升来增强心肌细胞收缩力,而到内毒素休克后期可能由于钙消耗过多,导致钙储备衰竭,或者是钙稳态失调,导致心肌细胞收缩功能下降,心脏收缩性持续下降,并导致平均动脉压持续下降直至死亡。

我们发现 IP₃ I 型受体在内毒素休克大鼠心脏中除表达量明显增加外,还存在异位表达,除在心肌细胞的闰盘表达外,也在心肌细胞的细胞膜附近表达,而且此处表达的量要明显多于其他部位。这可能提示内毒素休克中异位表达的 IP₃ I 型受体参与细胞膜上某些通道的开放,或是参与细胞间的信息

传递,进而可能会影响心肌细胞的收缩性。IP₃ I 型受体的异位表达及其意义需要进一步的实验研究来探讨。

参考文献:

[1] 王雪莲,赵悦,马力,等.内毒素诱导感染性休克动物模型的建立及血 TNF 测定[J].中国医科大学学报,2004,33(5):390-392.

[2] LIPP P, LAINE M, TOVEY SC, et al. Functional inositol 1,4,5-triphosphate receptors that may modulate excitation-contraction coupling in the heart [J]. *Curr Biol*, 2000, 10(5):939-942.

[3] GARCIA KD, SHAH T, GARCIA J. Immunolocalization of type 2 inositol 1,4,5-triphosphate receptors in cardiac myocytes from newborn mice[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, 287(4):C1048-1057.

[4] HATTORI M, SUZUKI AZ, HIGO T, et al. Distinct roles of IP₃R type 1 and 3 in Ca²⁺ signaling[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(12):11967-11975.

[5] MACKENZIE L, BOOTMAN M, LAINE M, et al. The role of inositol 1,4,5-triphosphate receptors in Ca²⁺ signaling and the generation of arrhythmia in rat atrial myocytes [J]. *J Physiol*, 2002, 541 (Pt2): 395-409.

[6] WOODCOCK EA, MATKOVICH SJ. Ins(1,4,5)P₃ receptors and inositol phosphates in the heart-evolutionary artifacts or active signal transducers? [J]. *Pharmacol Ther*, 2005, 107(2):240-251.

[7] TOVEY SC, DYER JL, GODFREY RE, et al. Subtype identification and functional properties of inositol 1,4,5-triphosphate receptors in heart and aorta [J]. *Pharmacol Res*, 2000, 42(6):581-590.

[收稿日期] 2007-01-19

(上接第 507 页)

Antisense oligonucleotides to NF-κ B improve survival in bleomycin-induced pneumopathy of the mouse [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, 162(4):1561-1568.

[4] 胡永斌, 曾庆富. 肺纤维化中转录因子激活及其信号转导途径 [J]. *临床与实验病理学杂志*, 2002, 18(5):540-542.

[5] 黄山英, 宋良文. 效应细胞、细胞因子及相关基因调控在肺纤维化发生中的作用研究进展 [J]. *国外医学·呼吸系统分册*, 2005, 25(5):328-330.

[6] GURUJEYALAKSHMI G, WANG Y, GIRI SN. Taurine and niacin block lung injury and fibrosis by down regulating bleomycin-induced activation of transcription nuclear factor-kappa B in mice [J]. *J Phar-*

macol Exp Therapeut, 2000, 293(1):82-90.

[7] CASTRANOVA V, PORTER D, MILLECCHIA L, et al. Effect of inhaled crystalline silica in a rat model: time course of pulmonary reactions [J]. *Mol Cell Biochem*, 2002, 234-235(1-2):177-184.

[8] MIO T, NAGAI S, KITAICHI M, et al. Proliferative characteristics of fibroblast line from open lung biopsy specimens of patients with IPF (UIP) [J]. *Chest*, 1992, 102(3):832-837.

[9] 谷丽, 朱元珩. 特发性肺间质纤维化与肺肌成纤维细胞 [J]. *国外医学·呼吸系统分册*, 2005, 25(5):361-363.

[收稿日期] 2007-03-07