文章编号：1000-5404(2005)08-0713-03

论著

腺苷受体激动剂预处理对保存大鼠心脏的影响及其与 NF-κB 的关系

李军尧，唐　瑛　（广州军区武汉总医院急诊科，武汉 430070）

提　要：目的　探讨腺苷 A1 受体激动剂预处理延迟效应对低温 St.Thomas 液保存大鼠心脏的影响及其与心肌核转录因子-κB(nuclear factor kb, NF-κB)的关系。**方法**　Wistar 大鼠随机分 6 组：A、C、D 组以高选择性 A1 受体激动剂 CCPA(2-chloro-N6-cyclopen-tyladenosine)预处理，其中 D 组在预处理前 15 min 注射 NF-κB 抑制剂(pyrrolidindiethyldithiocarbamate, PDTC)；B、E 组仅注射生理盐水；F 组注射 PDTC 后再注射生理盐水。24 h 后 A、B 组 4 ℃ St.Thomas 液保存 4 h，复灌 1 h，而另 4 组低温缺血 3 h，复灌 1 h。观测心功能、磷酸肌酸激酶同工酶(CK-MB)、三磷酸腺苷(ATP)等。**结果**　A 组左室内压上升与下降最大速率恢复率($\pm dp/dt_{max}$)为(62.83 ± 17.27)%、(66.81 ± 18.99)%，心肌 ATP 含量(3.67 ± 1.42) × 10^{-3} μmol/g；而 B 组 $\pm dp/dt_{max}$ 分别为(40.41 ± 18.29)%、(44.70 ± 25.14)%，ATP 含量(1.46 ± 0.54) × 10^{-3} μmol/g；A 组明显高于 B 组，差异有显著性($P < 0.01$，$P < 0.05$)。C 组 $\pm dp/dt_{max}$ 恢复率、ATP 都明显高于 D、E、F 组($P < 0.01$，$P < 0.05$)，而 D、E、F 组间无明显差异。**结论**　以腺苷 A1 受体激动剂能诱导预处理的延迟效应，改善低温 St.Thomas 液保存离体大鼠心脏的保存效果，而该效应的信号传递与心肌核转录因子-κB 的活化有关。

关键词：腺苷；预处理；供心保存；核转录因子-κB
中图法分类号：R322.11；R341.31；R914.4　　**文献标识码**：A

Effects of adenosine A1 receptor-induced delayed preconditioning on heart preservation and its relation with NF-κB

LI Jun-yao, TANG Ying (Emergency Department, Wuhan General Hospital of Guangzhou Area Command, Wuhan 430070, China)

Abstract: Objective　To study the potential improvement of donor heart storage by A1 adenosine receptor-induced delayed preconditioning and its relation with NF-κB. **Methods**　A total of 64 male Wistar rats were randomly divided into 6 groups. Group A was pretreated with 2-chloro-N6-cyclopen-tyladenosine (CCPA), and Group B was only injected saline. Twenty-four hours later, the hearts in groups A and B were stored in St.Thomas solution for 4 h at 4 ℃ and reperfused with K-H buffer for 1 h. Group C was administered with CCPA after 15-minute saline injection, and Group D was injected with inhibitor of nuclear factor κB, pyrrolidindiethyldithiocarbamate (PDTC) first and 15 min later injected with CCPA. Group E was only injected with saline and Group F with PDTC. Twenty-four hours later, the rat hearts were isolated, perfused with H-K buffer solution on the Langendorff apparatus, and subjected to hypothermic ischemia for 180 min with intermittent perfusion of modified St. Thomas solution, and reperfused with 37 ℃ H-K buffer for 60 min. Left ventricular function, myocardial CK-MB leakage, tissue levels of adenosine triphosphate were measured. **Results**　The recovery rate of $\pm dp/dt_{max}$ left ventricle in Group A were much higher than that of Group B, while that in Group C were much higher than that in groups D, E and F ($P < 0.05$). **Conclusion**　CCPA may trigger myocardial delayed preconditioning and has some beneficial effects on Wistar rat donor heart preserved in 4 ℃ with modified St.Thomas solution, in which NF-κB may play an essential role in the signaling.

Key words: adenosine; preconditioning; heart preservation; nuclear factor-κB

选择有效的供心保存方法在心脏移植中至关重要，近年研究表明某些药物预处理的延迟效应持续时间较长，可能更适合于供心的保存。本实验试图探究腺苷 A1 受体激动剂预处理的延迟效应对低温心麻液，即 St.Thomas 液(St.Thomas hospital cardioplegic solution)，保存大鼠离体心脏的影响及其机制。

作者简介：李军尧(1963－)，男，湖北省天门市人，主治医师，主要从事外科急救方面的研究。电话：13507134428

收稿日期：2004-12-13；修回日期：2005-02-05

1 材料与方法

1.1 材料

健康成年雄性 Wistar 大鼠 64 只，体质量 250～300 g，中南大学湘雅医学院提供。高度选择性腺苷 A1 受体激动剂 2-氯环戊腺苷(2-chloro-N6-cyclopen-tyladenosine，CCPA)，分子量 369.8，编号 C7938；NF-κB 抑制因子四氢吡咯二硫代氨基甲酸酯(pyrrolidindiethyldithiocarbamate，PDTC)分子量 164.3，编号 P8765，均系 Sigma 公司产品[1,2]。

1.2 分组及预处理

64 只 Wistar 大鼠分为 6 组。A、B 组(各 10 只)模拟临床供心保存过程，观察腺苷 A1 受体激动剂预处理对大鼠心脏保存的影响；其中 A 组腹腔注射 CCPA(75 μg/kg)作预处理；B 组仅组生理盐水作为对照组。C、D、E、F 组(各 11 只)用以观察 PDTC 对 CCPA 预处理的影响；其中 C 组腹腔注射 1 ml 生理盐水 15 min 后再腹腔注射 CCPA(75 μg/kg)，D 组在注射 PDTC(150 mg/kg)15 min 后在以 CCPA 作预处理(75 μg/kg)，而 E、F 组仅分别注射 1 ml 生理盐水、PDTC(150 mg/kg)。

1.3 实验方法

预处理 24 h 后以改良 Langendorff 装置制成离体灌注心脏，主动脉逆行灌注充氧、37 ℃ Krebs-Henseleit (K-H)液(O_2 95%，CO_2 5%)，压力 75 mmHg。右室心外膜起搏，频率 240 次/min。带囊导管插入左室，调整舒张末压 2～10 mmHg。平衡灌注后，用 4 ℃改良 St. Thomas 液诱导心脏停搏。A、B 组于该液中浸泡保存 240 min(4～6 ℃)，而 C、D、E、F 组在 12～16 ℃环境中缺血 180 min，并每 30 分钟重复灌注 1 次 4 ℃改良 St. Thomas 液。然后，各组都以充氧、37 ℃ K-H 液复灌 60 min。在制作模型时 C、D、E、F 组各失败 1 只，另外因恒温装置故障 F 组删除 2 只，即成功 58 只。

1.4 观测指标

Power Lab 生理记录仪记录左室压力上升和下降最大速率($\pm dp/dt_{max}$)、再以其基础值为 100%，计算变化率(%)。全自动生化分析仪(日立 7107A)测定冠脉回流液中磷酸肌酸激酶(CK-MB)。取左室前壁心肌，以虫荧光素酶、邻苯三酚自氧化、硫代巴比妥酸法分别测定心肌三磷酸腺苷(ATP)、丙二醛(MDA)和锰-超氧化物歧化酶(Mn-SOD)含量或活性。

1.5 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，以 SPSS 10.0 软件作组间 t 检验和单因素方差分析。

2 结果

2.1 左室 $\pm dp/dt_{max}$ 基础值和恢复率

6 组基础值无明显差异，低温缺血-复灌后都有明显下降，但 A 组的恢复率高于 B 组，C 组高于 E 组，且差异有显著性($P<0.05$，$P<0.01$)。当以 PDTC 抑制 NF-κB 的活化后，D 组恢复率明显低于 C 组，差异亦有显著性($P<0.05$，$P<0.01$)，而 D、E、F 组间无明显差异(表 1)。

2.2 CK-MB 释放情况

复灌 1 h 后 A 组仍然低于 B 组，C 组漏出量明显低于 D、E、F 组，且差异有显著性($P<0.05$)，而 D、E、F 组间差异无显著性(表 2)。

表 1 左室压力变化速率最大值基础值及恢复率($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 The baseline and recovery rate of left ventricular $+dp/dt_{max}$ ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	$+dp/dt_{max}$		$-dp/dt_{max}$	
		Baseline (Pkag/s)	Recovery (%)	Baseline (Pkag/s)	Recovery (%)
A	10	159.10±26.30	62.83±17.27#	257.96±25.02	66.81±18.99##
B	10	162.56±27.71	40.41±18.29	150.34±28.08	44.70±25.14
C	11	141.68±18.51	72.62±16.28	130.57±38.16	68.16±19.22
D	11	169.09±48.42	55.62±18.11*	132.89±36.37	43.01±21.67**
E	11	151.84±26.03	51.38±13.87*	149.88±22.70	49.60±12.21**
F	11	153.82±15.46	54.06±18.98	142.73±16.71	47.20±18.74**

#：$P<0.05$，##：$P<0.01$，*vs* group B；*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，*vs* group C

2.3 心肌 ATP 含量

A 组明显高于 B 组，C 组明显高于 D、E、F 组，差异均有显著性($P<0.01$)，而 D、E 和 F 组间差异无显著性(表 2)。

2.4 心肌 MDA

C 组均低于其余 3 组，且差异都有显著性($P<0.05$)，而 D、E、F 组间差异无显著性(表 2)。

2.5 Mn-SOD

C 组明显高于其余 3 组($P<0.01$)，而 D、E、F 3 组间差异无显著性(表 2)。

表 2 冠脉回流液中 CK-MB 活性和心肌 ATP、MDA 含量($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 The myocardial content of ATP, MDA and Mn-SOD activity and leakage of CK-MB ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	MDA (nmol/g)	ATP (10^{-3} μmol/g)	CK-MB (IU/l)	Mn-SOD (IU/mg)
A	10	-	3.46±1.42##	92.30±34.85#	-
B	10	-	1.46±0.54	162.40±51.99	-
C	11	15.76±3.47	5.12±0.87	65.63±24.29	67.81±19.12
D	11	25.67±11.08**	1.31±0.53**	129.70±41.15	32.16±19.82**
E	11	27.28±8.57**	1.27±0.33**	138.81±39.92	43.89±13.87**
F	11	27.00±8.97**	1.13±0.33**	95.75±49.163	1.03±13.05**

#：$P<0.05$，##：$P<0.01$，*vs* group B；**：$P<0.01$，*vs* group C

3 讨论

在同种异体心脏移植中，选择有效的供心保存方法显得至关重要。虽然改变保存液的成分可以提高供心保存效果，但当缺血保存较长时其效果仍不尽人意。近年研究表明某些药物能够模拟缺血预处理的延迟保护效应，维持有效时间长达 24 h 之久[3]，更适合于供心的保存。以腺苷 A1 受体激动剂预处理兔 24～72 h 均可产生延迟性保护作用[1]。在获取供心 24 h 前以其作预处理，可能对供心保护十分有利，但能否改善 St. Thomas 液对离体大鼠心脏的保存效果尚需进一步研究。

本实验结果显示 A 组以 CCPA 激动腺苷 A1 受体

即可触发大鼠心脏产生预处理的延迟效应，并改善 St. Thomas 液保存供心的效果。即保存 4h 后心脏功能恢复明显优于单纯改良 St. Thomas 液保存组（B 组），且 CK-MB 漏出量减少，心肌 ATP 恢复较快。同样，C 组以 CCPA 预处理 24 h 后，缺血 180 min、复灌 60 min 对心肌所造成的损伤较单纯改良 St. Thomas 液保护的 E 组轻，即左心室压力变化最大速率恢复率较高，心肌 ATP 恢复较快，CK-MB 漏出较少。本研究结果还提示以 CCPA 预处理产生延迟保护效应的同时伴有心肌 Mn-SOD 活性上升，心肌 MDA 减少。文献[4]报道如果阻碍蛋白质的合成，延迟效应则会随之消失。然而，蛋白质分子表达上调需要核转录因子的参与。目前已发现与基因表达有关的转录因子除 NF-κB 外还有 AP-1、TRE、OCT-1、CRE 和 SPL[2] 等。这些因子是否都参与预处理的基因表达，尚不完全清楚。但是 PDTC 仅对 NF-κB 具有强烈的抑制作用[2]。本实验结果表明虽然24 h 前所用的 PDTC 本身心肌再灌注损伤无明显影响，但可阻止以 CCPA 激活腺苷 A1 受体触发心肌预处理延迟效应，以致心功能恢复率、心肌 ATP 和心肌 CK-MB 漏出量与未作预处理相近，同时伴随 Mn-SOD 活性下降。这说明 PDTC 通过抑制 NF-κB 阻止合成新的蛋白质分子，从而取消延迟保护效应。有关 NF-κB 的活化的机制比较复杂。体内 NF-κB 抑制因子（IκBα）控制 NF-κB 的活性，当其磷酸化后就可解除对 NF-κB 的抑制状态。缺血预处理通过腺苷等信号分子始动级联反应，使 IκBα 磷酸化[5]。至于活化的 NF-κB 又怎样促使相关基因表达还需要进一步探讨。

参考文献：

[1] Takano H, Bolli R, Black R G Jr, *et al*. A1 or A3 adenosine receptors induce late preconditioning against infarction in conscious rabbits by different mechanisms[J]. Circ Res, 2001, 88(5): 520 - 528.

[2] Xuan Y T, Tang X L, Banerjee S, *et al*. Nuclear factor -κB plays an essential role in the late phase of ischemic preconditioning in conscious rabbits [J]. Circ Res, 1999, 84(9): 1095 - 1109.

[3] 朱水波，孙宗全，殷桂林，等. 腺苷与单磷酯 A 联合预处理对供心保存的实验研究[J]. 中华器官移植杂志，2003，24(6)：338 - 340.

[4] Meldrum D R, Cleveland J C, Rowland R T Jr, *et al*. Early and delayed preconditioning: differential mechanisms and additive protection[J]. Am J physiol, 1997, 273(2P2): H725 - H733.

[5] Zhang J, Bolli R, Tang X L, *et al*. Direct demonstration of both tyrosine and serine phosphorylation of IκBα during ischemic preconditioning in conscious rabbits[J]. Circulation, 1999, 100(12): 1 - 56.

（编辑 薛国文）

文章编号：1000-5404(2005)08-0715-01

个案与短篇

实时荧光定量 PCR 在献血员筛检中的应用

Appliacation of Real-time quantitative PCR in screening blood donor

谭春泽 （中国人民解放军第 181 医院输血科，桂林 541002）

我科 2002 年 1 月至 2003 年 12 月在部队进行无偿献血 5 260 人次，其中 125 人份不合格。作者将其中 ALT 单项不合格的 75 份标本进行了 HBV-DNA 实时荧光定量 PCR 检测分析，阳性率达 4.0%。现报告如下

1 材料与方法

1.1 标本

来自部队 5 260 份无偿献血员标本，经初、复检 75 份 ALT 单项不合格（赖氏法大于 25 单位为不合格）标本，留取血清 0.5 ml，置 - 30 ℃冰箱保存备检

1.2 试剂

HBsAg、抗 HCV、抗 HIV、抗 TP 初筛 ELISA 试剂盒（广东中山生物技术有限公司），复检 ELISA 试剂盒（厦门新创生物技术有限公司）为批检合格产品。ALT 试剂盒（北京中生和长春汇力），HBV-DNA 实时荧光定量 PCR 试剂盒（上海申友公司）

1.3 仪器

PTC-2000 型实时荧光定量 PCR 仪（加拿大），StatFax-2100 型酶标仪、RT-2600 型洗板机（均为美国），ASD-400C 半自动生化分析仪（长春业力）。

1.4 方法

HBsAg、抗 HCV、抗 HIV、抗 TP、ALT 均严格按操作说明书同时进行初、复检和结果判定。将其中 ALT 大于 25U（赖氏单位）单项不合格的 75 份标本按 ALT 的赖氏单位数分 3 组进行 HBV-DNA 实时荧光定量 PCR 检测分析。

2 结果

5 260份献血员标本共检出125人份不合格，其中34份

（下转 719 页）

作者简介：谭春泽（1962 - ），男，湖南省部队中专，主管技师，主要从事临床免疫与输血检验方面的研究。电话：0773-2081498

收稿日期：2005-01-12；修回日期：2005-02-13