论著

文章编号:1000-5404(2010)10-1068-03

缺血预处理改善心肌钙超载后胰岛素抵抗

陈焕文[1],杜 铭[1],李勇刚[2] (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院心胸外科[1];400011 重庆,重庆医科大学附属儿童医院心胸外科[2])

[摘要] 目的 步探讨缺血预处理对心肌细胞钙超载后胰岛素敏感性的影响。**方法** 采用 Langendorff 灌流装置逆行主动脉插管灌注,胶原酶消化法分离获取成年大鼠心肌细胞。将心肌细胞分 5 个组:正常对照组,实验组 1(ionomycin 0.5 μmol/L),实验组 2(ionomycin 0.5 μmol/L + IP),实验组 3(ionomycin 1.0 μmol/L),实验组 4(ionomycin 1.0 μmol/L + IP),应用同位素示踪技术观察胰岛素刺激大鼠心肌细胞的葡萄糖摄取效应,评价心肌细胞的胰岛素敏感性。**结果** 各组心肌细胞活性比率无明显降低($P>0.05$)。对照组心肌细胞静息[Ca^{2+}]i 为(117.80 ± 22.41) nmol/L,实验 1,2 组心肌细胞经过(ionomycin 0.5 μmol/L)处理 1 h 后,[Ca^{2+}]i 明显高于对照组,但两组间无统计学差异(260.49 ± 33.06) nmol/L,(278.03 ± 23.46) nmol/L *vs* (117.80 ± 22.41) nmol/L;实验 3,4 组心肌细胞经过(ionomycin 1.0 μmol/L)处理 1 h 后,实验 3,4 组心肌细胞[Ca^{2+}] i 明显高于实验 1,2 组和对照组,但两组间无统计学差异(391.91 ± 20.01) nmol/L,(379.91 ± 23.92) nmol/L *vs* (260.49 ± 33.06) nmol/L,(278.03 ± 23.46) nmol/L *vs* (117.80 ± 22.41) nmol/L,($P<0.05$)。胰岛素(20 IU/L)能促进各组心肌细胞的葡萄糖摄取,分别为(56.86 ± 6.89) μmol/10^5 cells/10min,(31.10 ± 7.62) μmol/10^5 cells/10 min,(40.12 ± 6.90) μmol/10^5 cells/10 min,(22.26 ± 5.92) μmol/10^5 cells/10 min,(32.33 ± 6.06) μmol/10^5 cells/10 min。胰岛素刺激各实验组心肌细胞葡萄糖摄取较对照组心肌细胞葡萄糖摄取降低($P<0.05$),胰岛素刺激实验组 2,4 心肌细胞的葡萄糖摄取虽较对照组降低,但是与无缺血预处理相比葡萄糖摄取有所增加($P<0.05$)。**结论** 缺血预处理对 ionomycin 导致的心肌细胞的钙超载没有影响,但是能改善钙超载心肌细胞的胰岛素抵抗。

[关键词] 心肌细胞;胰岛素抵抗;缺血预处理

[中图法分类号] R364.12; R654.2; R977.15 **[文献标志码]** A

Ischemic preconditioning improves myocardial insulin resistance after calcium overload in rat cardiac myocytes

Chen Huanwen[1], Du Ming[1], Li Yonggang[2] ([1]Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, [2]Department of Cardio-thoracic Surgery, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400011, China)

[Abstract] Objective To investigate the effect of ischemic preconditioning (IP) on insulin sensitivity after cardiomyocyte calcium overload. **Methods** Adult rat cardiac myocytes were obtained through Langendorff perfusion with retrograde aortic infusion and collagenase digestion. Myocardial cells were divided into 5 groups, normal control group, experimental group 1 (ionomycin 0.5 μmol/L), experimental group 2 (ionomycin 0.5 μmol/L + IP), experimental group 3 (ionomycin 1.0 μmol/L), the experimental group 4 (ionomycin 1.0 μmol/L + IP). The glucose uptake of cardiomyoctyes stimulated by insulin was detected with isotopic tracer technique. **Results** Rate of cardiac cell activity in each group had no significant decrease ($P>0.05$). Resting [Ca^{2+}]i in normal cardiac muscle cells was (117 ± 22.41) nmol/L, while for the cells of experimental groups 1 and 2, it was significantly higher than normal cells, but there was no significant difference between them after 1 hour's treatment of 0.5 μmol/L ionomycin [(260.00 ± 33.06) and (278 ± 23.46) nmol/L respectively]. The [Ca^{2+}]i in experimental groups 3 and 4 was (391.00 ± 20.01), and (379.00 ± 23.92) nmol/L respectively, which were significantly higher than those of experimental groups 1 and 2, and control group ($P<0.05$). But there was no obvious difference between them. Insulin of 20 IU/L promoted glucose uptaking in the myocardial cells in each group, which were (56.86 ± 6.89), (31.10 ± 7.62), (40.12 ± 6.90), (22.26 ± 5.92), and (32.33 ± 6.06) μmol/(10^5 cells · 10 min) respectively in control, and experimental groups 1, 2, 3 and 4. There were significantly lesser glucose uptake in the insulin-stimulated myocardial cells from all experimental groups than in the cells of the control group ($P<0.05$). Insulin-stimulated

[通信作者] 杜 铭,电话:(023)89011131,E-mail: ljdyt@sina.com

myocardial cells in experimental groups 2 and 4 though had lower glucose uptake than the control group, but their glucose uptake were higher in comparison with non-ischemic preconditioning group ($P<0.05$). **Conclusion** IP has no effect on ionomycin-induced calcium overload in myocardial cells, but can improve myocardial insulin resistance after calcium overload.

[Key words] cardiomyocyte; insulin resistance; ischemic preconditioning

Corresponding author: Du ming, Tel: 86-23-89011131, E-mail: ljdyt@sina.com

胰岛素能促进其靶器官——心脏的葡萄糖摄取和利用,并抑制心肌脂肪酸代谢,从而提高心脏的代谢效率[1]。在不同的病理生理状态下,心肌可能与骨骼肌、肝脏、脂肪组织等靶器官、组织一样,发生胰岛素抵抗并导致重要而广泛的生理效应障碍,严重影响心肌的代谢和功能。胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)是组织细胞对胰岛素生物反应性和/或敏感性降低。经典的胰岛素抵抗定义是指机体敏感细胞、组织、器官对胰岛素刺激下糖摄取效应的降低。李永刚等[2]通过体外培养大鼠心肌细胞建立模拟心肌细胞缺血再灌注模型,研究发现心肌细胞模拟缺血再灌注后存在胰岛素抵抗。缺血再灌注伴随心肌细胞内钙超载这一现象。我们通过研究发现[3]:心肌细胞钙超载是导致缺血再灌注后心肌细胞胰岛素抵抗的始动因素之一。

缺血预处理最先称为"缺血预处理(ischemic preconditioning, IP)"的心肌预处理,能使心肌细胞耐受缺血再灌注损伤。但是其机制并不清楚,可能有数条信号通路参与IP的保护机制。那么缺血预处理是否通过改善钙超载后胰岛素抵抗来保护心肌细胞目前并不清楚。本研究在我们既往研究的基础上,采用成年大鼠心肌细胞为研究对象,应用同位素示踪技术观察胰岛素刺激大鼠心肌细胞的葡萄糖摄取效应,评价缺血预处理对钙超载后心肌细胞的胰岛素敏感性的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

成年SD大鼠,体质量180~280 g,雌雄不拘,由四川大学华西实验动物中心提供。胶原酶A(Boehringer Mannheim,德国),Fura-2(Sigma,美国),伊屋诺霉素(ionomycin)(Sigma,美国),Triton X-10(AMRESCO,美国),EGTA (Sigma,美国),2-[1,2-^{3}H]-脱氧葡萄糖(^{3}H-DG,8.0 mCi/mmol,PE公司,美国),生物合成人胰岛素(诺和诺德,丹麦),其余试剂为GIBCO公司(美国)产品。

1.2 心肌细胞钙超载模型及缺血预处理模型建立及其评价

1.2.1 心肌钙超载模型建立[4-6] 采用Langendorff灌流装置逆行主动脉插管灌注,胶原酶消化法分离获取成年大鼠心肌细胞。将心肌细胞分5个组:对照组:心肌细胞于37 ℃ 5% CO_2孵箱孵育;实验组1:心肌细胞于37 ℃ 5% CO_2孵箱孵育,与ionomycin (0.5 μmol/L)作用1 h;实验组2,经历缺血预处理后,心肌细胞于37 ℃ 5% CO_2孵箱孵育,与ionomycin (0.5 μmol/L)作用1 h;实验组3:心肌细胞于37 ℃ 5% CO_2孵箱孵育,与ionomycin (1.0 μmol/L)作用1 h;实验组4:经历缺血预处理后,心肌细胞于37 ℃ 5% CO_2孵箱孵育,与ionomycin (1.0 μmol/L)作用1 h。

1.2.2 缺血预处理模型建立 实验组2,4经历缺血预处理1次,即缺血2 min,再灌注3 min。缺血再灌注方法详见文献[2]。

1.2.3 模型评价 心肌细胞的活性评价及细胞内钙的测定详见文献[5]。

1.3 心肌细胞葡萄糖摄取测定

根据胰岛素浓度不同又将各组再各自分为2个亚组:①基础组:胰岛素浓度为0 IU/L;胰岛素组:胰岛素浓度为20 IU/L。其具体操作步骤及测定方法详见文献[3]。

1.4 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用SPSS 11.0统计软件进行数据处理。两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用方差分析LSD法检验。

2 结果

2.1 心肌细胞活力的影响

0.4%台盼蓝排斥实验显示各组间心肌细胞活性比率约73%,且无显著性差异($P>0.05$)。

2.2 各组心肌细胞内游离钙离子浓度

对照组心肌细胞静息$[Ca^{2+}]i$为(117.80±22.41)nmol/L,实验1,2组心肌细胞经过(ionomycin 0.5 μmol/L)处理1 h后,$[Ca^{2+}]i$明显高于对照组,但两组间无统计学差异(260.49±33.06)nmol/L,(278.03±23.46)nmol/L *vs* (117.80±22.41)nmol/L;实验3,4组心肌细胞经过(ionomycin 1.0μmol/L)处理1 h后,实验3,4组心肌细胞$[Ca^{2+}]i$明显高于实验1,2组和对照组,但两组间无统计学差异(391.91±20.01)nmol/L,(379.91±23.92)nmol/L *vs* (260.49±33.06)nmol/L,(278.03±23.46) nmol/L *vs* (117.80±22.41)nmol/L($P<0.05$)。

2.2 心肌细胞的葡萄糖摄取

表1结果显示胰岛素(20 IU/L)能促进各组心肌细胞的葡萄糖摄取,胰岛素刺激各实验组心肌细胞葡萄糖摄取较对照组心肌细胞葡萄糖摄取降低($P<0.05$),胰岛素刺激实验组2、4心肌细胞的葡萄糖摄取虽较对照组降低,但是与无缺血预处理相比葡萄糖摄取有所增加($P<0.05$)。

表1 心肌细胞的葡萄糖摄取 ($\bar{x}\pm s$, $n=15$)

组别	胰岛素0 IU/L	胰岛素20 IU/L
对照组	13.12±3.62	56.86±6.89[a]
实验组1	13.08±3.09	31.10±7.62[ab]
实验组2	11.09±2.99	40.12±6.90[abc]
实验组3	17.62±6.20	22.26±5.92[abc]
实验组4	10.22±2.97	32.33±6.06[bd]

a: $P<0.05$,与胰岛素0 IU/L比较;b: $P<0.05$,与对照组比较;c: $P<0.05$,与实验组1比较;d: $P<0.05$,与实验组3比较

3 讨论

缺血预处理是近年来研究较多的心肌保护措施，是指心肌对短暂性缺血损伤的一种内在快速适应性反应，此种反应使心肌能在其后长时程缺血过程中免遭进行性损害。

对采用单次或多次的效果仍有争论。研究[7]发现，大鼠心脏接受单次即可诱导出心肌保护的效果，再延长缺血时间或增加缺血刺激次数反而降低心肌细胞膜的稳定性，并不能提高心肌保护的效果。罗红鹤等[8]通过体外循环换瓣的患者研究发现，单次缺血预处理即可取得良好的心肌保护作用。因此本研究采用单次缺血预处理建立模型研究。

本研究结果显示：缺血预处理能改善钙超载后心肌细胞胰岛素抵抗。众多研究发现，缺血预处理使心肌细胞耐受缺血再灌注损伤，保护心肌功能。葡萄糖作为心肌细胞的重要能量底物，心肌葡萄糖代谢的盛衰是决定缺血再灌注心肌功能恢复的关键所在。与其他胰岛素敏感组织一样，心肌葡萄糖代谢受胰岛素调控。心肌葡萄糖代谢的盛衰也可以说是由胰岛素作用效能而决定。我们推测：缺血预处理改善钙超载后胰岛素抵抗可能是缺血预处理使心肌细胞耐受缺血再灌注损伤及保护心肌功能作用途径之一。

另外本研究还发现：缺血预处理能改善钙超载后心肌细胞胰岛素抵抗并不是通过降低细胞内钙浓度而实现。我们猜测：缺血预处理可能改善胰岛素受体及受体后信号的转导。

胰岛素与受体的α亚单位结合后，首先激活β亚基上的酪氨酸激酶，使β亚基上的酪氨酸自身磷酸化，同时使胰岛素受体底物1（insulin receptor substrate-1，IRS-1）磷酸化，然后启动磷脂酰肌醇3激酶（phosphatidylinositol-3-kinase，PI-3K），最终作用于GLUT4，使其从细胞质转位到胞膜[9-11]。同时，与受体结合的胰岛素促进磷酸丝氨酸磷酸化酶-1（Phosphoserine Phosphatase1，PP-1）调节亚基的特殊位点磷酸化，使此酶激活。GLUT4内在活性受到PP-1的专一调节，激活PP-1使GLUT4通过去磷酸化转为活性形式，使其具有内在活性[12-14]。这就意味着最初的胰岛素磷酸化信号传导必须转变为去磷酸化的活化GLUT4。活化的抑制因子-1（Inhibitor 1）能与PP-1的催化亚单位结合使其失活。不难看出改善胰岛素受体及任何受体后信号分子活性可能会改善细胞胰岛素抵抗。

田轶魁等[15]研究发现，缺血预处理通PI-3K对抗心肌细胞凋亡，发挥其保护作用。与Hausenloy等[16]研究结果一致。PI-3K也是胰岛素作用葡萄糖转运蛋白4转位的中间信号分子。缺血预处理是否通过激活心肌细胞内PI-3K改善钙超载后胰岛素抵抗？而且，胰岛素受体有无变化，其他信号分子是否激活？因此，缺血预处理究竟通过什么途径改善钙超载后心肌细胞胰岛素抵抗，还有待进一步研究。

综上所述，缺血预处理对ionomycin导致的心肌细胞的钙超载没有影响，但是能改善钙超载心肌细胞的胰岛素抵抗，其分子机制还有待进一步研究。

参考文献：

[1] Zaha V, Francischetti I, Doenst T. Insulin improves postischemic recovery of function through PI3K in isolated working rat heart[J]. Mol Cell Biochem, 2003, 247(1/2): 229-232.

[2] 李勇刚，陈焕文，张尔永，等. 模拟缺血再灌注后心肌细胞的胰岛素抵抗现象[J]. 中华胸心血管外科杂志，2007，23(5)：335-337.

[3] 陈焕文，李勇刚，石应康. 葡萄糖转运蛋白4活性与钙超载后心肌细胞胰岛素抵抗[J]. 细胞与分子免疫学杂志，2010，26(2)：164-166.

[4] 李洪，肖颖彬. 成年大鼠心室肌细胞的分离、培养与鉴定[J]. 第三军医大大学报，2004，26(7)：644-646.

[5] 陈焕文，石应康，李勇刚，等. 如何建立成年大鼠心肌细胞钙超载模型[J]. 华西医学，2006，21(2)：308-309.

[6] 沈洪兴，陈玉林，路卫，等. 烧伤血清导致大鼠离体心室肌细胞钙超载的研究[J]. 中华实验外科杂志，2001，18(3)：255-256.

[7] 覃数，陈运贞. 不同缺血预处理对心肌细胞的影响[J]. 中国循环杂志，1998，13(1)：42-44.

[8] 罗红鹤，陈振光，苏春华，等. 单次缺血预处理在心脏瓣膜置换术中的心肌保护作用[J]. 中华胸心血管外科杂志，2004，20(6)：352-353.

[9] Zick Y. Molecular basis of insulin action[J]. Novartis Found Symp, 2004, 262: 36-50.

[10] Castillo J, Ammendrup-Johnsen I, Codina M, *et al*. IGF-I and insulin receptor signal transduction in trout muscle cells[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2006, 290(6): R1683- R1690.

[11] Ishiki M, Klip A. Minireview: recent developments in the regulation of glucose transporter-4 traffic: new signals, locations, and partners[J]. Endocrinology, 2005, 146(12): 5071-5078.

[12] Dent P, Lavoinne A, Nakielny S, *et al*. The molecular mechanism by which insulin stimulates glycogen synthesis in mammalian skeletal muscle[J]. Nature, 1990, 348(6299): 302-308.

[13] Kandror K V. A long search for Glut4 activation[J]. Sci STKE, 2003, 2003(169): PE5.

[14] Furtado L M, Somwar R, Sweeney G, *et al*. Activation of the glucose transporter GLUT4 by insulin[J]. Biochem Cell Biol, 2002, 80(5): 569-578.

[15] 田轶魁，张浩，徐美林，等. 缺血预处理对体外循环后心肌细胞凋亡及PI3K/Akt通路的影响[J]. 天津医药，2009，37(4)：299-301.

[16] Hausenloy D J, Yellon D M. Reperfusion injury salvage kinase signalling: taking a RISK for cardioprotection[J]. Heart Fail Rev, 2007, 12(3/4): 217-234.

（**收稿**：2009-12-02；**修回**：2010-04-07）

（编辑 王 红）