基础研究 文章编号:0253-3626(2010)08-1163-04

胰岛素后处理对离体大鼠心肌的保护作用及其机制

王为新,杨双强,辛 东,欧 袁
(重庆医科大学附属第一医院胸心外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨胰岛素(Insulin)后处理对离体大鼠心肌的保护作用及其可能机制。方法:将 32 只 Wistar 大鼠随机分成 4 组,对照组(Control 组),缺血再灌注组(I/R 组),低剂量胰岛素后处理组(L-POST 组),高剂量胰岛素后处理组(H-POST 组),每组 8 只。Control 组开胸取左心室肌作为缺血前对照;I/R 组、L-POST 组、H-POST 组建立离体心脏 Langendorff-Neely 灌注模型,预灌注 K-H 缓冲液 30 min 后,灌注 4℃ STH-2 心脏停搏液,停搏心脏并低温维持 30 min,复灌 K-H 缓冲液 60 min 后,取左心室肌备用;L-POST 组和 H-POST 组于复灌期给予含胰岛素的 K-H 液灌注。采用免疫组化和 Western blot 分别检测大鼠心肌内皮型一氧化氮合酶(Endothelial nitric oxide synthase,eNOS)、蛋白激酶 C(Protein kinase C,PKC)的分布和量的变化;TUNEL 法检测心肌细胞凋亡指数(Apoptotic index,AI)。结果:与 Control 组相比,I/R 组、L-POST 组、H-POST 组内皮型一氧化氮合酶(Endothelial nitric oxide synthase,eNOS)、蛋白激酶 C(Protein kinase C,PKC)表达量明显增多($P<0.05$),AI 明显增高($P<0.05$);与 I/R 组相比,L-POST 组和 H-POST 组 eNOS、PKC 表达量明显增加($P<0.05$),AI 明显减少($P<0.05$);与 L-POST 组相比,H-POST 组 eNOS、PKC 表达量增加($P<0.05$),AI 明显减少($P<0.05$)。结论:胰岛素后处理具有减轻心肌缺血/再灌注损伤的作用,其机制可能与增加 eNOS、PKC 表达,抑制细胞凋亡有关,高剂量胰岛素对缺血/再灌注心肌细胞较低剂量胰岛素具有更显著的保护作用。

【关键词】胰岛素后处理;缺血/再灌注损伤;内皮型一氧化氮合酶;蛋白激酶 C;凋亡
【中国图书分类法分类号】R654.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-12-26

Effects and mechanisms of insulin postconditioning on myocardial protection in isolated rat hearts

WANG Wei-xin, et al
(*Department of Cardiaothoracic Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

作者介绍:王为新(1981-),男,硕士,
研究方向:心肌保护。
通讯作者:杨双强,男,教授,E-mail:yysqiang@163.com。

【Abstract】*Objective*: To explore the effects and mechanisms of insulin postconditioning on myocardial protection in isolated rat hearts. *Methods*: 32 Wistar rats were randomly divided into

表达,降低细胞降解 ECM 和 BM 的能力,影响 A549 细胞的侵袭能力;而且可以减少细胞表面微绒毛的数量,大大减弱 A549 细胞的粘附和侵袭能力。

本组实验以肺腺癌 A549 细胞株为研究对象,采用硫代磷酸修饰的 MMP7 反义核酸,通过脂质体导入培养的 A549 细胞,其转染后细胞粘附、侵袭能力明显下降。由于 MMP7 与肺癌细胞侵袭能力密切相关,可能成为今后 NSCLC 治疗的一个非常有希望的靶点。

参 考 文 献

[1] Liu D, Nakano J, Ishikawa S, et al. Overexpression of matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) correlates with tumor proliferation, and a poor prognosis in non-small cell lung cancer [J].Lung Cancer, 2007, 58(3): 384-391.

[2] Lynch C C, Vargo-Gogola T, McDonnell S, et al. Matrix metalloproteinase 7 mediates mammary epithelial cell tumorigenesis through the ErbB4 receptor[J]. Cancer Res, 2007, 67(14): 6760-6767.

[3] Miyamoto S, Yano S, Sugimoto S, et al. Matrix metalloproteinase-7 facilitates insulin-like growth factor bioavailability through its proteinase activity on insulin-like growth factor binding protein[J].Cancer Res, 2004, 64(2): 165-171.

[4] 郑晓飞.RNA 实验技术手册[M].第 1 版,北京:科学技术出版社,2004, 188-189.

[5] Klisovic R B, Stock W, Cataland S, et al. A phase Ⅰ biological study of MG98, an oligodeoxynucleotide antisense to DNA methyltransferase 1, in patients with high-risk myelodysplasia and acute myeloid leukemia[J].Clin Cancer Res, 2008, 14(8): 2444-2449.

[6] Liu H F, Teng X C, Zheng J C, et al. Effect of NHE1 antisense gene transfection on the biological behavior of SGC-7901 human gastric carcinoma cells[J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(14): 2162-2167.

[7] Swee M, Wilson C L, Wang Y, et al. Matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) controls neutrophil egress by generating chemokine gradients[J]. J Leukoc Biol, 2008, 83(6): 1404-1412.

[8] Gershtein E S, Korotkova E A, Shcherbakov A M, et al. Matrix metalloproteinases 7 and 9 and their types 1 and 4 tissue inhibitors in tumors and plasma of patients with colorectal cancer[J]. Bull Exp Biol Med, 2007, 143(4): 459-462.

[9] 徐 飞,王志新,陈正堂.非小细胞肺癌组织基质溶解素的表达与微血管密度的关系[J].重庆医学,2004,33(7):994-996.

[10] Felner K J, Wieczorek R, Kline M, et al. Malignant mesothelioma masquerading as a multinodular bronchioloalveolar cell adenocarcinoma with widespread pulmonary nodules[J]. Int J Surg Pathol, 2006, 14(3): 229-233.

(责任编辑:冉明会)

control group, ischemia/reperfusion group (I/R group), low dose insulin postconditioning group (L-POST group) and high dose insulin postconditioning group(H-POST group), with 8 rats in each group. Langendorff and neely perfusion models were steadily established, then the rat hearts were arrested by cardioplegia (St.Thomas No.2 solution, STH-2) after perfusion for 30 min. These arrested hearts were remained for 30 min at 4℃ and then underwent reperfusion for 60 min. In L-POST group and H-POST group, the arrested hearts were reperfused by Krebs-Henseleit buffer solution (K-H) with insulin. The content changes of myocardial eNOS and PKC were detected by immunohistochemistry and Western blot(WB), the AI (Apoptosis index, AI) of cardiomyocyte was detected by TUNEL. *Results*: Compared with control group, higher expression of eNOS and PKC and higher AI were detected in I/R group、L-POST group and H-POST group ($P<0.05$); compared with I/R group, higher expression of eNOS and PKC and lower AI were detected in L-POST group and H-POST group($P<0.05$); compared with L-POST group, higher expression of eNOS and PKC, and lower xpression of AI were detected in H-POST group ($P<0.05$). *Conclusion*: The insulin postconditioning could protect heart from myocardial ischemia/reperfusion injury, which might be associated with increased eNOS, PKC, and inhibited apoptosis. The effect of high dose insulin postconditioning is better than that of the low dose.

[Key words] Insulin postconditioning; Ischemia/reperfusion injury; eNOS; PKC; Apoptosis

近几年，国内外学者将药物用于在再灌注时或再灌注前，观察药物能否模拟缺血后处理发挥保护作用，即药物后处理，有研究证实药物后处理具有缺血后处理类似的心肌保护作用[1,2]。研究发现胰岛素在缺血再灌注损伤治疗中疗效肯定，但是对于在再灌注时应用胰岛素即胰岛素后处理的研究不多，故本研究采用离体大鼠心肌缺血再灌注模型，予以胰岛素后处理，通过检测内皮型一氧化氮合酶(Endothelial nitric oxide synthase, eNOS)、蛋白激酶 C(Protein kinase C, PKC)、凋亡指数(Apoptotic index, AI)等指标，观察高低剂量胰岛素对缺血再灌注心肌的影响，并初步探讨胰岛素后处理可能的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

实验于 2008 年 6~9 月间在第三军医大学新桥医院心脏中心实验室完成。成年雄性 wistar 大鼠 32 只，体重 250 ~ 300 g(第三军医大学大坪医院实验动物中心)；胰岛素注射液(江苏万邦生化医药股份有限公司)；eNOS 多克隆抗体、PKC 多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司)；生物素标记二抗及免疫组化试剂盒(武汉博士德公司)；辣根过氧化物酶标记的二抗(北京中杉公司)；彩色预染蛋白分子量标准、PVDF 膜、Bradford 法蛋白定量试剂盒(江苏碧云天公司)；原位末端转移酶标记法(Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling, TUNEL)试剂盒(Roche 公司)；ML870B2 Langendorff 离体心脏灌流系统(澳大利亚 AD Instruments 公司)。

Krebs-Henseleit 缓冲液 (Krebs-Henseleit buffer solution, K-H) 成分(mmol/L): NaCl 119, $NaHCO_3$ 25, KCl 4.75, $MgSO_4$ 1.2, KH_2PO_4 1.18, $CaCl_2$ 1.4, Glucose 11.0。37℃ 950 ml/L O_2+50 ml/L CO_2 混合气持续氧合，维持 pH7.4(自行配制)；STH-2 心脏停搏液成分(mmol/L): NaCl 110, KCl 16, $MgCl_2$ 16, $CaCl_2$ 2.0, pH=7.8(自行配制)。

1.2 方法

1.2.1 实验模型的建立和分组 将 32 只 Wistar 大鼠按体重均衡原则随机分成 4 组：对照组(Control 组)，缺血再灌注组(I/R 组)，低剂量胰岛素后处理组(L-POST 组)，高剂量胰岛素后处理组(H-POST 组)，每组 8 只。所有大鼠均行腹腔注射肝素盐水 1 mg/100 g 体重，1%戊巴比妥钠 30 ~ 35 mg/kg，麻醉完全后迅速开胸取下心脏。Control 组取左心室肌作为缺血前空白对照，剩余 3 组建立离体鼠心 Langendorff 灌注模型。用 37℃ 950 ml/L O_2+50 ml/L CO_2 混合气持续氧合的 K-H 缓冲液经主动脉根部逆行灌注，压力 60 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa)，稳定 5 min，左心房插管，左心室置入测压管，灌注液转流，转为工作心脏灌注模型，灌注压 15 mmHg，后负荷 52 ~ 60 mmHg，稳定工作 30 min 后，主动脉根部按 2 ml/100 g 质量注入 4℃ STH-2 心脏停搏液使心脏停搏，于相应配伍的心脏保存液中，维持 4℃保存，停搏 30 min 后 I/R 组给予 37℃ K-H 液经主动脉根部逆行复灌，L-POST 组和 H-POST 组仅于再灌注期给予含胰岛素 (浓度分别为 50 U/L、20 U/L)的 K-H 灌注液灌注。复灌 5 min 后转为工作心脏灌注模型，稳定 60 min，停止试验，取下心脏，取左心室肌 200 ~ 300 mg，-80 ℃保存备用。

1.2.2 心肌 eNOS、PKC 的免疫组化检测 取 3 mm × 3 mm × 3 mm 大小心肌组织行石蜡切片，SP 法行免疫组化染色，所有操作步骤均按说明书进行。光学显微镜观察心肌 eNOS 和 PKC 的分布情况并采集图像，eNOS 和 PKC 以胞浆染成棕黄色或棕褐色为阳性。采用 image-proplus 6.0 图像分析系统进行半定量检测，用平均吸光度 A 值表示 eNOS 和 PKC 的相对含量。

1.2.3 心肌 eNOS、PKC 的 Western blot 检测 取 100 mg 心肌组织，提取总蛋白，BCA 法定量，取 100 μg 待测蛋白按序加样，SDS-PAGE 电泳后转移到 PVDF 膜上，50 g/L 脱脂牛奶常温下封闭 1 h，滴加相应一抗 eNOS 多克隆抗体(1:500)、PKC 多克隆抗体(1:500)，4℃孵育过夜，HRP 标记的山羊抗

兔二抗(1:1 000)37℃孵育 1 h,ECL 显色,采用 quantity one 图像分析系统检测各组目的蛋白及其内参蛋白的吸光度值,计算两者的比值,以此作为各组蛋白的相对表达量,重复 4 次。

1.2.4 原位凋亡细胞检测 再灌注结束,迅速剪下心脏,置于冰的 PBS 中,分离左心室前壁缺血区,40 g/L 的多聚甲醛固定 12 h,石蜡包埋。应用 TUNEL 凋亡检测试剂盒,严格按照 TUNEL 凋亡检测试剂盒说明书进行操作。以已知阳性切片作为阳性对照,在染色过程中用 PBS 代替 TdT 反应液作为阴性对照。每张切片于缺血部位随机选取 8 个高倍视野,分别记数凋亡心肌细胞数和心肌细胞总数,并进行汇总,以凋亡心肌细胞数占心肌细胞总数的百分比作为 AI,AI= 凋亡细胞数/心肌细胞总数 × 100%。

1.3 统计学处理

使用 SPSS 12.0 统计学软件进行分析。实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间组间比较用单因素方差分析,组间两两多重比较用 Student-Newman-Keuls 法,$P<0.05$ 为存在统计学差异。

2 结 果

2.1 心肌组织中 eNOS 和 PKC 的改变

免疫组化结果显示,I/R 组、L-POST 组和 H-POST 组心肌组织中 eNOS 和 PKC 分布紊乱,较 Control 组其表达量较明显增多,半定量分析显示具有差异性($P<0.05$)。L-POST 组和 H-POST 组 eNOS 和 PKC 表达量较 I/R 组明显增多,染色较深,半定量分析显示具有差异性($P<0.05$)。H-POST 组 eNOS 和 PKC 分布较 L-POST 组广泛,染色较深,半定量分析显示具有差异性($P<0.05$)(图 1,图 2,表 1)。蛋白印记半定量分析结果显示 L-POST 组和 H-POST 组的 eNOS 的表达量分别为 45.73 ± 2.46 和 50.52 ± 3.83,PKC 的表达量分别为 40.59 ± 7.43 和 46.52 ± 1.90。与 Con 组相比,I/R 组、L-POST 组和 H-POST 组的 eNOS、PKC 表达量明显增多,差异具有统计学意义($P<0.05$),与 I/R 组相比,L-POST 组和 H-POST 组 eNOS、PKC 表达量明显增多,差异具有统计学意义($P<0.05$),与 L-POST 组相比,H-POST 组 eNOS、PKC 表达量明显增多,差异具有统计学意义($P<0.05$,图 3,表 1)。

2.2 心肌细胞凋亡测定结果

光镜下观察,对照组心肌细胞未见明显凋亡,L-POST 组和 H-POST 组可见凋亡心肌细胞散在分布,I/R 组可见凋亡心肌细胞呈弥散分布。与 Control 组相比,I/R 组、L-POST 组和 H-POST 组 AI 明显增高($P<0.05$),与 I/R 组相比较,L-POST 组和 H-POST 组 AI 明显降低($P<0.05$),L-POST 组 AI 较 H-POST 组明显增高($P<0.05$,表 1)。

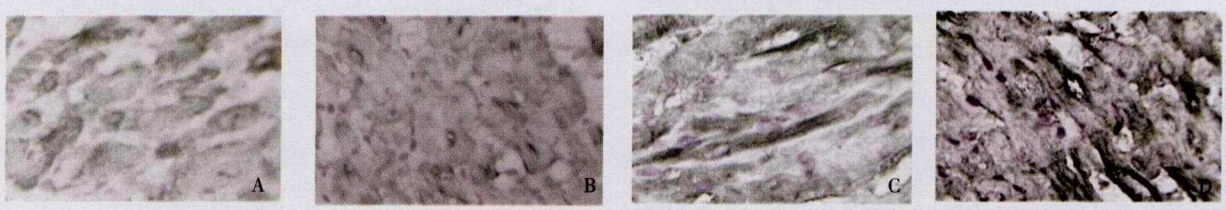
3 讨 论

缺血后处理即指心肌发生缺血后,开始再灌注时进行的数次短暂再灌注/缺血的循环,以此来减轻再灌注损伤的现象,目前缺血后处理已成为心肌保护研究的重点之一[3]。胰岛素是由胰岛 β 细胞分泌的一种蛋白质类激素,实验室及临

表 1 各组心肌组织细胞凋亡指数及 eNOS、PKC 的表达($n=8, \bar{x} \pm s$)

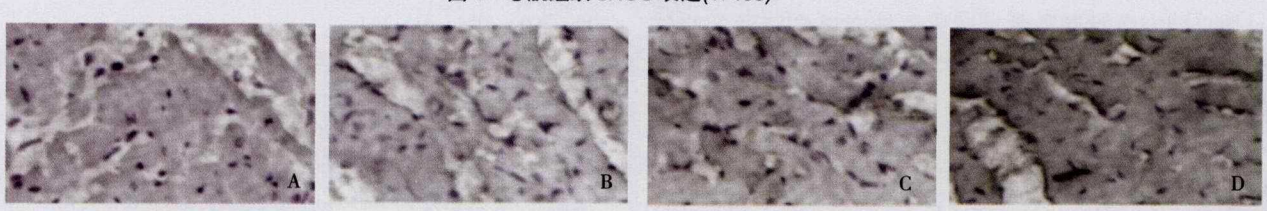
组别	eNOS(%)		PKC(%)		AI(%)
	Western blot	免疫组化	Western blot	免疫组化	
Con	17.88 ± 0.41	0.15 ± 0.01	15.11 ± 8.57	0.08 ± 0.06	3.30 ± 0.1
I/R	33.67 ± 3.92[a]	0.19 ± 0.02[a]	29.26 ± 2.71[a]	0.15 ± 0.02[a]	18.46 ± 8.55[a]
L-POST 组	45.73 ± 2.46[b]	0.25 ± 0.06[b]	40.59 ± 7.43[b]	0.21 ± 0.03[b]	14.78 ± 5.57[b]
H-POST 组	50.52 ± 3.83[c]	0.29 ± 0.04[c]	46.52 ± 1.90[c]	0.26 ± 0.04[c]	9.38 ± 2.41[c]

与 Control 组比较,[a]: $P<0.05$,[b]: $P<0.05$,[c]: $P<0.05$;与 I/R 组比较,[b]:$P<0.05$,[c]:$P<0.05$;与 L-POST 组比较,[c]: $P<0.05$



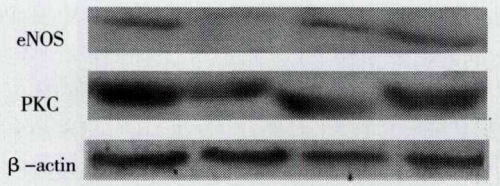
A. Con 组;B. I/R 组;C. L-POST 组;D. H-POST 组

图 1 心肌组织 eNOS 表达(× 400)



A. Con 组;B. I/R 组;C. L-POST 组;D. H-POST 组

图 2 心肌组织 PKC 表达(× 400)



1. Con 组；2. I/R 组；3. L-POST 组；4. H-POST 组

图 3　心肌组织 eNOS、PKC 的 Western Blot 检测结果

床实践均证明其具有减轻心肌缺血再灌注损伤的作用[4,5]。本实验将胰岛素应用于后处理中，发现：高、低剂量胰岛素后处理组的 eNOS 及 PKC 与 I/R 组相比明显增高，具有统计学意义；高、低剂量胰岛素后处理组 AI 较缺血再灌注组明显降低（$P<0.05$），证明了在大鼠离体灌注心脏模型中，胰岛素后处理具有减轻心肌缺血再灌注损伤，保护心肌的作用。

有研究证实：在动物的离体、在体心模型实验中，在再灌注之前，单纯给予数次短暂灌注/缺血处理后，缺血后处理组 eNOS 的表达较 I/R 组明显增高。于缺血后处理组加入 eNOS 阻滞剂（LNAME），发现可抵消缺血后处理减少心肌梗死面积的作用，因此 eNOS 激活可能是缺血后处理心肌保护作用的机制之一[6,7]。本研究检测了在胰岛素后处理的情况下 eNOS 的表达情况：与 I/R 组相比，高、低剂量胰岛素组的 eNOS 的表达水平均明显增高（$P<0.05$），这表明胰岛素通过激动 eNOS 可能是胰岛素后处理对缺血再灌注损伤心肌的保护效应机制之一。

PKC 是一种在组织中广泛分布的磷酸化酶，具有广泛的生理功能，是一种细胞内信息传递的主要物质和媒介，它的激活可引发底物蛋白质磷酸化、细胞内钙稳态、线粒体 ATP 敏感性钾离子通道、腺苷、缓激肽、受体的信息传递等一系列变化，是一种重要的机体内源性保护中间环节，通过催化多种蛋白质磷酸化，进而对细胞产生保护作用，减轻细胞损伤。Zatta 等[8]研究证实：在缺血后处理中，通过升高心肌损伤区 PKC，限制 PKC 的易位发挥心肌保护作用，表明在缺血后处理心肌的保护作用中依赖于 PKC 途径。在本实验中，与 I/R 组相比，胰岛素各组的 PKC 的表达水平均上调（$P<0.05$），减轻了缺血/再灌注对心肌的损伤作用，说明胰岛素激动 PKC，促使其表达增高可能是胰岛素后处理对缺血/再灌注损伤心肌的保护机制之一。

ECLA（Estudios cardiologicos latinoamerica，ECLA）研究小组以单纯葡萄糖－胰岛素－氯化钾溶液治疗急性心梗，分为大剂量胰岛素组和常规胰岛素组，其剂量分别为 50 U/L 和传统的、临床常规应用的 20 U/L，研究表明一年随访结果见到早期单纯大剂量胰岛素可减少急性心梗死亡率 28% 至 48%，明显优于常规剂量组，提示大剂量胰岛素挽救缺血心肌较优[9]。又有研究以在体兔心脏缺血/再灌注为模型，选用大剂量胰岛素（50 U/L）与低剂量胰岛素（20 U/L）对缺血/再灌注心脏的影响进行了比较，实验结果表明高剂量胰岛素对缺血/再灌注心肌细胞的保护作用显著大于低剂量，前者可能是临床应用的较佳浓度[10]。为了明确胰岛素后处理中是否存在剂量依赖性，本实验亦采用高、低两种胰岛素剂量（50 U/L 和 20 U/L）行后处理，研究发现高剂量组胰岛素于再灌注后的 eNOS、PKC 的表达均显著高于低剂量组，AI 则显著低于低剂量组，表明高剂量胰岛素能更好的减轻缺血/再灌注对离体大鼠心肌的损伤，具有更好的保护作用，其机制可能与较高剂量胰岛素水平能够更好的加强 eNOS、PKC 表达，减少细胞凋亡相关。50 U/L 的胰岛素是否是胰岛素后处理的最佳浓度，有待于进一步实验证实。

参　考　文　献

[1] Chiari P C, Bienengraeber M W, Pagel P S, et al. Isoflurane protects against myocardial infarction during early reperfusion by activation of phosphatidylinositol-3-kinase signal transduction: evidence for anesthetic-induced postconditioning in rabbits[J]. Anesthesiology, 2005, 102(1): 102-109.

[2] Lemoine S, Beauchef G. Signaling pathways involved in desflurane-induced postconditioning in human atrial myocardium in vitro[J]. Anethesiology, 2008, 109(6): 1036-1044.

[3] Zhao Z Q, Corvera J S, Halkos M E, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning[J]. AM J Physiol Heart Circ Physiol, 2003, 285(2): H579-588.

[4] Stanley A W Jr, Moraski R E, Russell R O, et al. Effects of glucose-insulin-potassium on myocardial substrate availability and utilization in stable coronary artery disease. Studies on myocardial carbohydrate, lipid and oxygen arterial-coronary sinus differences in patients with coronary artery disease[J]. Am J cardiol, 1975, 36(7): 929-937.

[5] Jonassen A K, Sack M N, Mjos O D, et al. Myocardial protection by insulin at reperfusion requires early administration and is mediated via Akt and p70s6 kinase cell-survival signaling[J]. Circ Res, 2001, 89(12): 1191-1198.

[6] Tsang A, Hausenloy D J, Mocanu M M, et al. Postconditioning: a form of 'modified reperfusion' protects the myocardium by activating the phosphatidyL-Postnositol 3-kinase-Akt pathway[J]. Circ Res, 2004, 95(3): 230-232.

[7] Yang X M, Proctor J B, Cui L, et al. Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by targeting cell signaling pathways[J]. J Am Coil Cardiol, 2004, 44(5): 1103-1110.

[8] Zatta A J, Kin H, Lee G, et al. Infarct-sparing effect of myocardial postconditioning is dependent on protein kinase C signaling[J]. Cardiovasc Res, 2006, 70(2): 315-324.

[9] Diza R, Panlnsso E A, Piegns L S, et al. Metabolic modulation infarction: remarkable results from a new prospective, randomized trial[J]. Circulation, 1998, 98(21): 2223-2226.

[10] 马兰香，高　晖，赵新国，等. 高、低剂量极化液对缺血/再灌注心肌细胞凋亡及相关基因的影响[J]. 心脏杂志，2004，16(5)：427-430.

（责任编辑：关蕴良）