基础研究 文章编号:0253-3626(2010)04-0535-03

腺苷 A1 受体激动剂延迟预处理对兔心肌缺血再灌注损伤的保护作用

冉 珂,卢向航,李 晋,徐军美,常业恬
(中南大学湘雅二医院麻醉科,长沙 410011)

【摘 要】目的:探讨腺苷 A1 受体激动剂 2- 氯环戊腺苷(2-chloro-N^6-cyclopentyladenosine,CCPA)延迟预处理对兔心肌缺血再灌注损伤的保护机制。方法:30 只健康新西兰雄性大白兔随机分成 3 组:假手术组(C 组)、缺血再灌注组(I/R 组)、CCPA 组(P 组),每组 10 只。C 组仅行左冠脉套线而不阻断 160 min,I/R 组行左冠脉阻断 40 min,再灌注 120 min,P 组在静注 CCPA0.1 mg/kg 24 h 后处理同 I/R 组。各组分别于左冠前降支阻断前 20 min(T_1)、左冠前降支阻断 20 min(T_2)、左冠前降支阻断 40 min(T_3)、心肌再灌注 1 h(T_4)心肌再灌注 2 h(T_5)5 个时点抽取颈内动脉血测定血清中 IL-10 含量。再灌注 120 min 后,测心肌热休克蛋白 70(Heat shock protein 70,HSP70)蛋白表达和心梗面积,电镜下观察细胞超微结构变化。结果:与 I/R 组比,P 组 IL-10 含量和 HSP70 表达增高($P<0.05$),心肌梗死面积减少($P<0.05$),细胞结构损伤减轻。结论:CCPA 延迟预处理通过增高心肌 HSP70 表达和 IL-10 水平来减轻缺血再灌注损伤发挥心肌保护作用。

【关键词】腺苷 A1 受体激动剂;延迟相预处理;心肌;缺血再灌注
【中国图书分类法分类号】R365;R364 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-03-10

Protection of adenosine A1 receptor agonist delayed preconditioning for myocardial ischemia reperfusion injury in rabbits

RAN Ke, et al
(*Department of Anesthesiology, the Second Xiangya Hospital, Central South University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the protection mechanism of adenosine A1 receptor agonist (2-chloro-N^6-cyclopentyladenosine, CCPA) delayed preconditioning for rabbit myocardium during ischemia reperfusion. *Methods*: Thirty New Zealand male white rabbits were randomly assigned to Sham group, I/R group and CCPA group, with ten in each. Group CCPA was given CCPA 0.1 mg/kg before myocardial ischemia. Twenty-four hours later the I/R and CCPA underwent 40 min of coronary occlusion followed by 2 h of reperfusion. Blood samples were taken from arterial line at 20 min before occlusion (T_1), 20 min after occlusion (T_2), 40 min after occlusion (T_3), 1 h after reperfusion (T_4) and 2 h after reperfusion (T_5) for determination of the plasma levels of IL-10. At the end of the reperfusion, infarct size (IS) and area at risk (AAR) were defined by Evans blue and TTC staining. The heart was harvested and levels of the HSP70 were determined by Western blot analysis, and ultrastructures were observed under the electron microscopy. *Results*: The IL-10 and HSP70 levels of group CCPA was higher than those of group I/R. The CCPA ($P<0.05$) reduced infarct size(22.1% ± 3.8%) of the left ventricular area at risk compared with the I/R (41.8% ± 4.3%)($P<0.05$). The injury of group I/R was severer than that of group CCPA under the light microscope. *Conclusion*: CCPA can increase the levels of HSP70 and IL-10 during ischemia-reperfusion, which maybe the molecular mechanism of CCPA delayed preconditioning on cardioprotection.

【Key words】Adenosine A1 receptor agonist(CCPA); Delayed preconditioning; Myocardium; Ischemia reperfusion

缺血预处理对心肌具有延迟保护作用[1]已经得到肯定,最近发现,腺苷 A1 受体激动剂 2- 氯环戊腺苷(2-chloro-N^6-cyclopentyladenosine,CCPA)预处理也可对心肌产生延迟保护效应[2,3],但其作用机制不十分清楚。热休克蛋白 70(Heat shock protein,HSP70)是热休克等多种损伤性应激诱导心肌合成的一组与细胞抗损伤机制密切相关的热休克蛋白,过表达的 HSP70 对心肌有抗缺血再灌注损伤的作用[4,5],但 CCPA 预处理对心肌的延迟相保护机制是否与 HSP70 相关目前未见报道,因此,本研究拟通过观察 CCPA 延迟预处理在缺血再灌注损伤中对心肌细胞 HSP70 蛋白表达的影响,探讨 CCPA 预处理对心肌延迟保护的作用机制。

作者介绍:冉 珂(1975-),男,主治医师,博士,研究方向:心肌保护。
通讯作者:刘 流,男,副主任医师,E-mail:liuliucs06@126.com。

1　材料与方法

1.1　动物与试剂

健康雄性新西兰大白兔 30 只，体质量 2.0~2.5 kg，由中南大学湘雅医学院实验动物学部提供。抗 HSP70 单抗（1:1 000）、伊文思蓝、氯化硝基四氮唑蓝（TTC）均为美国 Sigma 公司产品，IL-10 的 ELISA 试剂盒为深圳晶美生物公司产品。

1.2　方法

1.2.1　缺血再灌注模型制备　参考文献[6]方法制备兔缺血再灌注模型。

1.2.2　动物分组　将 30 只大白兔随机分成 3 组：假手术组（C 组）、缺血再灌注组（I/R 组）、CCPA 预处理组（P 组），每组 10 只。C 组仅行左冠脉套线而不阻断 160 min；I/R 组行左冠状动脉前降支阻断 40 min，再灌注 120 min；P 组静注 CCPA 0.1 mg/kg，24 h 后处理同 I/R 组。

1.3　IL-10 的测定

各组分别于左冠前降支阻断前 20 min（T_1）、左冠前降支阻断 20 min（T_2）、左冠前降支阻断 40 min（T_3）、心肌再灌注 1 h（T_4）心肌再灌注 2 h（T_5）5 个时点取颈内动脉血测定 IL-10（夹心 ELISA 法）的水平。

1.4　心肌梗死面积

3 组大白兔再灌注 2 h 后，每组取 7 只立即杀死取材参考文献[6]方法用伊文思蓝和 TTC 染色测量心肌梗死面积。

1.5　心肌组织病理学检查

再灌注结束后，分别取各组心尖区心肌组织 1 mm × 1 mm × 1 mm 备透射电镜下行超微结构检查。

1.6　心肌免疫印迹分析

参考文献[5]方法提取心肌蛋白。提取的心肌蛋白储存于 -70℃备用。各样本取 100 μg 心肌蛋白于 12.5% 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳，分离的心肌蛋白随后通过电转印装置转印至 PVDF 膜，膜在封闭液中室温作用 3 h。再加入 HSP70 抗体，4℃孵育过夜，用 TTBS 缓冲液冲洗 15 min × 4 次后，加入二抗 IgG，室温摇动孵育 1 h，再用 TTBS 缓冲液充分冲洗，最后进行增强化学发光反应。将 PVDF 膜上显影的条带扫描入电脑，经图像分析系统处理，得出相对灰度值，以此表示 HSP70 水平。

1.7　统计学处理

所有数据以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，用 SPSS13.0 统计学软件进行单因素方差分析，以 $P \leqslant 0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　心肌超微结构变化

C 组心肌细胞完整，排列整齐，线粒体形态正常；I/R 组心肌细胞水肿，心肌纤维排列紊乱，线粒体肿胀；P 组心肌细胞水肿减轻，心肌纤维排列稍紊乱，线粒体轻度肿胀（图 1）。

2.2　血浆 IL-10 浓度变化

与 C 组比较，I/R 组和 P 组在缺血再灌注后血浆 IL-10 浓度均上升（$P<0.05$）；但与 I/R 组比较，P 组 IL-10 浓度明显增高（$P<0.05$）（表 1）。

2.3　心肌梗死面积

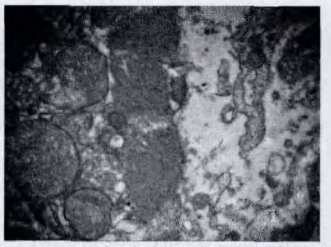
缺血面积 I/R 组和 P 组间无明显统计学差异（$P>0.05$），但 P 组心肌梗死面积显著降低于 I/R 组（$P<0.05$）（表 2）。

2.4　各组心肌 HSP70 的表达

C 组心肌 HSP70 灰度值为（16.8 ± 3.3），表达水平较低；I/R 组 HSP70 灰度值为（27.2 ± 4.8），与 C 组比较，表达上升



C 组心肌细胞完整，排列整齐，线粒体形态正常



I/R 组心肌细胞水肿，心肌纤维排列紊乱，线粒体肿胀



P 组心肌细胞水肿减轻，心肌纤维排列稍紊乱，线粒体轻度肿胀

图 1　各组心肌超微结构变化

表 1　各组兔血浆 IL-10 水平变化（$\bar{x} \pm s$，n=10）

指标	组别	T_1	T_2	T_3	T_4	T_5
IL-10 (pg/ml)	C 组	3.1 ± 1.0	2.7 ± 1.5	3.2 ± 0.8	3.3 ± 1.2	2.9 ± 1.8
	I/R 组	3.4 ± 1.4	5.6 ± 1.8	7.5 ± 4.1*	9.5 ± 3.6*	12.1 ± 3.1*
	P 组	3.2 ± 1.3	5.4 ± 2.0	11.9 ± 3.6*	15.2 ± 2.3*#	19.4 ± 2.5*#

与 C 组比较，*$P<0.05$；与 I/R 组比较，#$P<0.05$

表 2　各组心肌梗死面积及缺血面积变化（$\bar{x} \pm s$，n=7）

组别	左室心肌(g)	缺血心肌(g)	梗死心肌(g)	缺血面积(%)	梗死面积(%)
C 组	3.16 ± 0.68	–	–	–	–
I/R 组	3.23 ± 0.37	1.25 ± 0.33	0.52 ± 0.07	38.7 ± 2.0	41.8 ± 4.3
P 组	3.07 ± 0.56	1.16 ± 0.37	0.26 ± 0.05	38.3 ± 4.1*	22.1 ± 3.8#

与 I/R 组比较，*$P>0.05$，#$P<0.05$

（$P<0.05$）；P 组 HSP70 灰度值为（42.4 ± 3.5），表达高于 I/R 组（$P<0.05$）（图 2）。

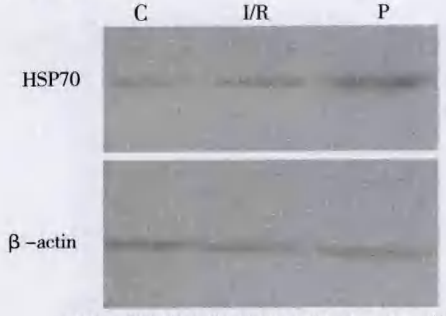


图 2 各组兔心肌 HSP70 Western blot 结果

3 讨 论

HSP 是指细胞在应激原诱导下生成的一类在进化上高度保守、广泛存在于原核及真核细胞内的蛋白质。HSP70 在正常细胞中表达较低，而当细胞遭受到脂多糖、热休克、缺血预处理等刺激时 HSP70 表达增强，本研究中 C 组表达最低证实了这一点。HSP70 是一种“分子伴侣”，直接参与新蛋白的折叠和装配[7]，可保持正常蛋白处于功能状态，使遭受破坏的蛋白质解聚，重新折叠成具有生物活性的多肽或蛋白。HSP70 对心肌保护的作用机制主要是充分发挥了这种“分子伴侣”的功能。本研究中，与 I/R 组比，P 组心肌 HSP70 表达有显著增高，提示 CCPA 预处理的延迟相保护作用与诱导 HSP70 表达增高有关。有研究认为，HSP70 是通过抑制能引发心肌炎性反应和细胞凋亡、坏死的核转录因子 -κB（NF-κB）的活性来发挥心肌保护作用[8]，但是 HSP70 直接减弱 NF-κB 活化还未见报道。因此，CCPA 预处理是否通过 HSP70 抑制 NF-κB 的活性来发挥心肌保护作用这有待进一步研究。

研究发现引发心肌缺血再灌注损伤的机制之一是许多促炎性因子（如 TNF-α、IL-6 等）引发过度的炎症反应[9]。IL-10 是一种对多种细胞组群具有强大效应的多能性细胞因子，可抑制许多促炎性因子（如 TNF-α、IL-6 等）的合成，并上调其它抗炎性因子（如 IL-8 等）的生成，在心肌缺血损伤中具有抑制炎性反应的作用，如果 IL-10 表达缺失，则炎症反应加重，表现为 PMN 浸润增强，ICAM-1 和 TNF-α 的聚集和表达增加，心肌梗死面积扩大，损伤加重[10,11]。Meng 等[12]研究表明 HSP70 具有减少 TNF-α 的表达及减轻炎性反应而保护损伤心肌。本研究中，P 组 IL-10 的水平上调，心肌梗死面积缩小，提示 CCPA 预处理通过 HSP70 高表达，促进 IL-10 产生，以降低 TNF-α 的表达，从而抑制炎症反应对心肌的损伤，发挥延迟相保护作用。

心肌超微结构的变化是反应心肌受损伤程度的有效指标[13]，与线粒体结构和功能的变化相关。线粒体是细胞能量合成的重要场所，在发生心肌缺血时，由于氧和能量物质的缺乏，造成线粒体的膜完整性和空间结构遭到破坏，进而破坏细胞超微结构，表现在线粒体水肿和线粒体膜不完整。Kabakov 等[14]研究表明 HSP70 超表达可减少细胞内 ATP 耗竭从而起保护细胞的作用。本研究中，P 组细胞超微结构损伤明显轻于 I/R 组，提示 CCPA 预处理的延迟相保护作用也可通过维持线粒体能量合成来保持细胞生理功能的正常性，从而减轻心肌损伤程度。

综上所述，CCPA 延迟预处理促进心肌 HSP70 表达，抑制炎症反应，这可能是其心肌保护作用的分子学机制之一。

参 考 文 献

[1] 王悦喜，陈运贞，刘元生.热休克心肌缺血预处理对 I/R 心肌的第二窗保护作用[J].重庆医科大学学报，2001，26(1)：32-33.

[2] Guo Y，Stein A B，Wu W J，et al.Late preconditioning induced by NO donors，adenosine A1 receptor agonists，and delta1-opioid receptor agonists is mediated by iNOS[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol，2005，289(5)：2251-2257.

[3] Dana A，Baxter G F，Yellon D M. Delayed or second window preconditioning induced by adenosine A1 receptor activation is independent of early generation of nitric oxide or late induction of inducible nitric oxide synthase[J]. J Cardiovasc Pharmacol，2001，38(2)：278-287.

[4] George I，Geddis M S，Lill Z，et al. Myocardial function improved by electromagnetic field induction of stress protein hsp70[J].J Cell Physiol，2008，216(3)：816-823.

[5] Williamson C L，Dabkowski E R，Dillmann W H，et al. Mitochondria protection from hypoxia/reoxygenation injury with mitochondria heat shock protein 70 overexpression[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol，2008，294(1)：H249-256.

[6] 冉 珂，段开明，邹定全，等.异氟醚预处理延迟相对兔心肌缺血再灌注损伤核因子 -κB 的影响[J].中华急诊医学杂志，2008，17(8)：834-837.

[7] Benjamin I J，McMillan D R.Stress（heat shock）proteins：molecular chaperones in cardiovascular biology and disease[J]. Circ Res，1998，83(2)：117.

[8] 王成夭，王焱林，陈 锋，等.当归对大鼠缺血再灌注心肌 HSP70 和 NF-κB 的影响[J].武汉大学学报（医学版），2005，26(1)：31-34.

[9] 冉 珂，段开明，邹定全，等.异氟醚预处理延迟相对兔心肌缺血/再灌注损伤的保护作用[J].临床麻醉学杂志，2008，24(8)：683-686.

[10] Yang Z，Zingarelli B，Szabo C. Crucial role of endogenous interleukin-10 production in myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. Circulation，2000，101(9)：1019-1026.

[11] Dybdahl B，Wahba A，Haaverstad R，et al.On-pump versus off-pump coronary artery bypass grafting：more heat-shock protein 70 is relea sed after on-pump surgery[J].Eur J Cardiothorac Surg，2004，25(6)：985-992.

[12] Meng X，Harken A H. The interaction between Hsp70 and TNF-α expression：a novel mechanism for protection of the myocardium against post-injury depression[J]. Shock，2002，17(5)：345-353.

[13] Ohtake M，Morino S，Kaidoh T，et al. Three-dimensional structural changes in cerebral microvessels after transient focal cerebral ischemia in rats：scanning electron microscopic study of corrosion casts[J]. Neuropathology，2004，24(3)：219-227.

[14] Kabakov A E，Budagova K R，Latchman D S，et al. Stressful preconditioning and HSP70 overexpression attenuate proteotoxicity of cellular ATP depletion[J]. Am J Physiol Cell Physiol，2002，283(2)：521-534.

（责任编辑：冉明会）