维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2002)03-0274-02

缺血预处理时心肌细胞β-肾上腺素能受体的调节

覃 数，陈运贞
（重庆医科大学临床学院心内科 重庆 400016）

【摘 要】目的：研究缺血预处理对肾上腺素能受体(βAR)数量及亲和力(Kd)的影响。期望能为设计药物预处理提供基础资料。方法：本实验以大白鼠为模型，采用放射配基结合实验，测定反复短暂缺血再灌注时心肌细胞膜βAR的数量与亲合力。结果：缺血预处理的反复短暂缺血再灌注阶段导致βAR数量增加和亲合力下降。结论：缺血预处理导致βAR数目增加及亲和力的降低，涉及缺血预处理的保护机制。

【关键词】缺血预处理；心肌；β-肾上腺素能受体
【中国图书分类法分类号】R363 【文献标识码】A 【收稿日期】2001-12-03

Regulation of β-adrenergic receptor activity during ischemic preconditioning

QIN Shu, et al
(Department of Cardiology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: The aims of this study were to detect the regulations of adrenergic receptors during ischemic preconditioning to offer the basic material for designing pharmocological preconditioning. *Methods*: By using radioligand bind assay, membrane recptors of the heart muscle cells were quantited in Bmax and Kd value of β AR pre and post three cycles of 5 min ischemia. *Results*: The ischemic preconditioning increased Bmax and Kd value of β AR. *Conclusion*: The ischemic preconditioning increased Bmax and Kd value of β AR, which may be one of the main mechanisms of ischemic preconditioning.

【Key words】Ischemic preconditioning; Myocardium; β-adrenergic receptor

急性心肌缺血与交感神经兴奋关系密切，后者对心肌的作用又依赖于儿茶酚胺递质的存在和受体的活性。因此，对缺血预处理阶段时肾上腺素能受体数目与功能的研究有重要意义。文献报道兔的缺血预处理，不影响持续缺血期（Sustained ischemia）βAR的下调（Down-Regulation），只是使细胞内腺苷酸环化酶降解延迟（Delaying），从而发挥保护作用[1]；而大白鼠的急性心肌缺血βAR则表现为上调（Up-Regulation）[2]。缺血预处理阶段βAR如何变化，其意义如何有待阐明。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与材料

液闪仪（Beckman LS1801），低温超速离心机，JY92-Ⅱ超声波细胞粉碎机，内切式匀浆器。

1.2 主要药品

^{3}H-双氢心得舒（^{3}H-Dihydroalprenolol ^{3}H-DHA），比放45Ci/mmol，放化纯度＞95%（中国原子能研究院同位素研究所产品）。

1.3 缺血预处理模型

参见文献[3]。

1.4 动物分组

Wistar大白鼠（雌雄不分），体重200～300g，54只，共分为3组：①对照组（n=18）假手术后1h，取心肌制膜；②短暂缺血再灌注组Ⅰ（n=18）阻断冠脉5min再灌注5min，重复3次，30min后，取心肌制膜（反应缺血预处理后有效保护期间内受体状态）。③短暂缺血再灌注组Ⅱ（n=18）阻断冠脉5min再灌注5min，重复3次，3h后取心肌制膜（反应缺血预处理后已经脱离有效保护期间受体状态）。

1.5 心肌细胞膜制备

动物模型到实验的终点，迅速开胸取出心脏，冷生理盐水（4℃）灌洗，冲去残血。剪碎后，每克组织加4℃冷缓冲液20ml（Tris 5mmol/L、蔗糖0.25mol/L、EGTA 1mmol/L、pH 7.5）。用内切式匀浆器粉碎（10000r/min×30s×2，两次中间停60s），再用超声波粉碎机处理3min（每20s停40s），全部过程在冰浴中进行。匀浆离心，在4℃条件下，第1次用800g离心10min（去除细胞核等致密物质），小心将上清液，移至另一离心管，用20000g离心1h，弃上清液，用4℃冷Tris-Hcl缓冲液（50mmol/L Tris-Hcl、25mmol/L $MgCl_2$、

作者介绍：覃 数（1957- ），男，副教授，博士。
主要研究方向：心肌缺血与保护机制。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表1 反复短暂缺血再灌注对β AR的影响（$\bar{x}\pm s$）

组别(N=18×3)	Bmax(fmol/mg.p)	Kd(nmol/L)
假手术组	492 ± 78	1.03 ± 0.24
反复短暂缺血再灌注后30min组	1190 ± 182.5	2.40 ± 0.65★
反复短暂缺血再灌注后3h组	1410 ± 140●	5.60 ± 1.30●

★反复短暂缺血再灌注后30min组与假手术组比较，Bmax和Kd均有显著增加($P<0.005$，$P<0.05$)。

●反复短暂缺血再灌注后3h组，Bmax和Kd继续增加，但是幅度较小，与30min组比较无明显差别($P=0.08$，$P=0.07$)。

pH 7.5）悬浮沉淀，重新离心，条件同上。蛋白定量沉淀再次悬浮后，用考马斯亮兰法进行蛋白定量，调其浓度为2mg/ml，分装保存于-20℃，1周内使用。

1.6 受体配基结合反应和结合配基的分离

β AR结合实验：取0.1ml的细胞膜悬浊液，与不同浓度的^{3}H-双氢心得舒（终浓度为 1.25，2.5，5，10，15，25nmol/L）在Tris-Hcl缓冲液中进行反应，总体积0.4ml，各浓度均作平行测定，非特异结合加入1mmol/L的心得安（以上操作在冰浴中进行），置于37℃温浴中10min，再移入冰浴中，随后经玻璃纤维滤膜真空抽滤，15ml冰缓冲液，分3次冲洗。滤膜经80℃烘干，置于二甲苯闪烁液中（5ml/液闪瓶），暗处过夜，作放射计数。

1.7 数据处理与统计分析

本实验采用放射配基分析法测定受体的最大结合数目与受体亲合力。根据Scatchard作图，直线的横截距为受体的最大结合数目（Bmax），直线的斜率（1/Kd）反应放射配基与受体的亲合力。数据结果都表示为均数±标准误，两组结果比较作 t 检验。

2 结 果

反复短暂缺血再灌注30min后，大鼠心肌β AR的Bmax和Kd值与假手术组比较明显增高（492±78 fmol/mg.p→119±182.50fmol/mg.p，$P<0.005$，1.03±0.24→2.4±0.65，$P<0.05$），反复短暂缺血再灌注3h后Bmax和Kd仍然继续有上升，但是与30min时比较无统计学意义（1190±182.50fmol/mg.p→1410±140fmol/mg·p，$P=0.08$，2.40±0.65→5.60±1.30，$P=0.07$），见表1。

3 讨 论

本实验证明多次短暂缺血与再灌，可导致β AR上调。然而交感神经兴奋，血儿茶酚胺浓度增高，β AR下调，已被广泛接受；如心力衰竭时伴有交感神经兴奋，血儿茶酚胺浓度增高，β AR下调。不过已有证据表明，心力衰竭的β AR下调可能有与儿茶酚胺水平增高无关的其它机制参与，例如心肌肥厚、心肌坏死和其它未知因素；理由是放射性自显影提示，心衰时β AR下调，仅见于心内膜下区域[4]；而衰竭心肌培养细胞β ARK的mRNA表达是增强的[5]。此外，急性心肌缺血时伴有交感神经兴奋性增高，血儿茶酚胺浓度增高，缺血心肌局部循环血儿茶酚胺聚集浓度高达100－1000倍，心肌有肾上腺素能受体过度激活的情况，已为实验所证实。因此，β AR的调节不能简单地归结于激动剂使之下调，拮抗剂使之上调。在急性缺血应激状态时，儿茶酚胺使β AR上调可能系备用受体(Spare receptor)动员，对心肌细胞具有保护作用。因为大量动员出来的β AR是一种低亲合力受体，可以缓冲儿茶酚胺增加心肌耗氧量的不利作用。

在缺血预处理有效保护期间内，Kd值增加（Kd，放射配基与受体的解离常数，其值与受体亲和力成反比），表示迅速动员，数量增多的β AR亲和力是降低的；而反复短暂缺血再灌注后3h，超过缺血预处理的保护期间，β AR继续上调，提示缺血预处理的心肌保护与低亲合力的β AR有关。

反复短暂缺血再灌注后3h，心肌产生和维持β AR的增数调节对左心功能具有一定的代偿意义，因左室大块心肌缺血缺氧，可导致左室功能减退，β AR上调有助于改善左室功能，在提高心排血量的效应中，小动脉及静脉阻力下降，减轻左室前、后负荷也有利于提高心泵功能。此外，在缺血预处理的有效保护期外，β AR仍然进行增数调节，提示β AR可能与缺血预处理的晚期保护[Second window of protection]有关，因为3h以后β AR继续增多，可能已经涉及到蛋白的合成与表达[Preconditioning-associated protein synthesis],而缺血预处理相关蛋白又被认为是缺血预处理晚期保护的重要物质[6,7]。

综上所述，反复短暂缺血再灌注所导致的β AR改变，有可能是缺血预处理的重要机制[8]，但是否为缺血预处理的关键或启动机制仍然不清楚。

(下转第279页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

intestinal polypeptide)基因表达增强，这种基因的表达产物可通过调节脑源性神经营养因子(Brain-derived neural factor BDNF)的表达而调节神经元可塑性[9]；耐药性癫痫鼠DNA拓扑异构酶III表达增强，其可能的作用是增强DNA的复制、转录、重组、和修复功能，是突触可塑性增强的物质基础；此外，我们还发现许多功能类似的基因表达增强，如转录因子HBF-1mRNA(HBF-1 mRNA for transcription factor)、基本转录因子62kD亚基(basic transcription factor 62kD subunit)、转录因子TFIIE -a (transcription factor TFIIE- alpha)、转录因子WSTF (transcription factor WSTF)等基因，这些基因从不同的环节参与了DNA的修复、复制，是神经元突触可塑性重要的物质基础，这些基因的表达增强，支持难治性癫痫中突触可塑性增强是其重要成因的假说。

实验结果提示，难治性癫痫的耐药机制是复杂的，有多个系统、多种基因参与了耐药机制的形成，其中，突触可塑性增强是其重要的成因，如何逆转这些基因的改变来防治难治性癫痫，尚有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Edwards FA. Dancing dendrites[J]. Nature, 1998;394(6689): 129-130.

[2] Laux T, Fukami K, Thelen M, et al. GAP43, MARCKS, and CAP23 modulate PI(4,5)P(2) at plasmalemmal rafts, and regulate cell cortex actin dynamics through a common mechanism[J]. J Cell Biol, 2000;149(7):1455-`472.

[3] De Lanerolle NC, Kim JH, Robbins RJ, et al. Hippocampal interneuron loss and plasticity in human temporal lobe epilepsy [J]. Brain Res, 1989;495:387-395.

[4] Matus A. Postsynaptic actin and neuronal plasticity[J]. Curr Opin Neurobiol, 1999;9(5):561-565.

[5] Shu T, Valentino KM, Seaman C, et al. Expression of the netrin-1 receptor, deleted in colorectal cancer (DCC),is largely confined to projecting neurons in the developing forebrain[J]. J Comp Neurol, 2000;416(2):201-212.

[6] Cr è me I, Lange R, Christoph A, et al. Inactivation of the NCAM gene in the mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning[J]. Nature, 1994;367:455-466.

[7] Mulkey RM, Endo S, Shenolikar S, et al. Involvment of a calcineurin/inhibitor-1 phosphatase cascade in hippocampal long -term depression[J]. Nature, 1994;369:486-488.

[8] Boshans RL, Szanto S, van Aelst L, et al. ADP-ribosylation factor 6 regulates actin cytoskeleton remodeling in coordination with Rac1 and RhoA[J]. Mol Cell Biol, 2000;20(10):3685-3694.

[9] Pellegri G, Magistretti PJ, Martin JL. VIP and PACAP potentiate the action of glutamate on BDNF expression in mouse cortical neurones[J]. Eur J Neurosci, 1998;10(1):272-280.

(上接第275页)

参 考 文 献

[1] Iwase T, Murakami, T Tomita T, et al. Ischemic preconditioning is associated with a delay in ischemia-induced reduction of β -adrenergic signal transduction in rabbit hearts[J]. Circulation, 1993;88:2827-2837.

[2] 徐成斌，王炳银，吕宝璋，等. 急性缺血时大鼠心肌βIAR变化及意义. 北京医科大学学报[J]. 1993;25(1):49-50.

[3] 覃 数，陈运贞. 大白鼠实验性心肌缺血再灌注模型制备与心电图改变的特点[J]. 重庆医科大学学报，1998;23(1): 8-10.

[4] Murphree SS, Saffitz JE. Distribution of β -adrenergic receptors infailing human myocardium:implication for mechanisms of down-regulation[J]. Circulation, 1989;79:1214-1225.

[5] Ungerer M, Bohm M, Elce JS. Altered expression of β -adrenergic receptor kinase and β 1-adrenergic receptors in the failing human heart[J]. Circulation, 1993;87:454-463.

[6] Das DK, Engelman RM, Kimura Y, et al. Molecular adaptation of cellular defences following preconditioning of the heart by repeated ischaemia[J]. Cardiovasc Res, 1993;27:578-584.

[7] Sun JZ, Tang XL, Knowlton AA, et al. Late preconditioning against myocardial stunning.An endogenous protective mechanism that confers resistans to postischemic dysfunction 24h after brief ischemia in conscious pigs[J]. J Clin Invest, 1995; 95:388-403.

[8] Lochnor A. Genade S.Ischemic preconditioning and beta-adrenergic signal transduction pathway[J]. Circulation, 1999;100 (9):958-966.