维普资讯 http://www.cqvip.com

10-14

第24卷 第1期 重庆医科大学学报 Vol.24 No.1
1999 ACTA UNIVERSITATIS SCIENTIAE MEDICINAE CHONGQING 1999

Ca^{2+}对心肌的保护作用:一种临床可接受的心肌保护

R542.2

临床学院心内科 王悦喜* 陈运贞

提 要 内源性Ca^{2+}是PKC激活的强力因子,心肌长时间缺血前应用外源性Ca^{2+}能否激活PKC而保护心肌呢?在90min心肌缺血和180min再灌注前分别给大鼠如下处理:3次短暂心肌缺血;3次IPC前静注异搏定;3次IPC前静注灯盏花素乙(Chelerythrine,CHE);静脉注射$CaCl_2$;灯盏花－$CaCl_2$,静注$CaCl_2$前、静脉注射灯盏花素乙,静脉注射Ca^{2+}与IPC能起到相同的心肌保护作用、二组心肌坏死面积较对照组明显减小;IPC对心肌的保护作用可被异搏定消除;$CaCa^{2+}$及心肌缺血预处理对心肌的保护作用均可被灯盏花素乙所抑制.静注$CaCl_2$能激活PKC而对鼠心肌起保护作用,临床很有希望在PTCA、心脏移植等术前用静注$CaCl_2$对心肌进行保护。

关键词 钙;心肌;保护 心肌缺血 预处理 IPC
中图分类号 R311

心肌缺血预处理(IPC)赋予心肌对其以后较长时间缺血、再灌注损伤的耐受性。虽然短暂的心肌缺血在实验模型中证实有心肌保护作用、但临床上因不能直接行IPC操作或IPC的保护心肌作用又限制在特定的时间窗内而限制其推广及应用.所以,目前主要致力于寻找一种安全、有效、临床上易接受,并能应用于有计划的长时间缺血事件之前的药物预处理。

Ca^{2+}是经典PKC(cPKC,包括PKCα、PKCβⅠ、PKCBⅡ、PKCγ亚型)激活所必需的重要的内源性刺激剂[1]。临床上常用而安全的静脉注射Ca^{2+}是否参与由PKC介导的心肌保护作用?所以作者在Wistar大鼠90min缺血和180分钟再灌注前静脉注射$CaCl_2$作为预处理观察其:(1)较长时间缺血前应用Ca^{2+}能否减小心肌坏死面积,(2)Ca^{2+}对心肌的保护作用是否由PKC所介导。

1 材料与方法

1.1 鼠心肌缺血预处理、缺血－再灌注模型的制作

Wistar大鼠64只,体重150 250g,雌雄不拘.用20%乌拉坦(0.5ml/100g)腹腔麻醉,必要时术中适量追加。分离、切开气管,气管内插管.开胸时用人工呼吸机(DHG30.浙江医科大学医学仪器厂生产)行人工呼吸,潮气量1.2ml/100g、通气频率70/min.左旁正中切断第2.4肋骨,暴露心脏、切开心包,在左心耳与肺动脉圆锥间用眼科缝针穿过1号缝线,缝线两侧各套一线环.缝线打一结后与线环一道穿过胸壁置于两侧胸壁外,以备缺血.再灌注时用。迅速逐层缝合胸壁、挤压胸壁使其恢复负压、拔出气管内插管、关闭呼吸机,使大鼠恢复自主呼吸。稳定30min,拉紧两侧缝线时心电图肢端导联ST段弓背向上抬高为阻断左冠脉血流成功;一定时间后拉两侧线环心电图弓背向上抬高的ST下降为冠脉血流再通.

1.2 实验设计

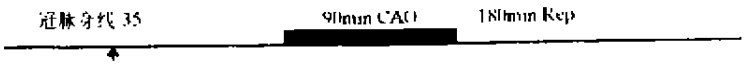
将64只Wistar大鼠随机分成6组。假手术组:12只,开胸、左冠状动脉穿线35min后开始90min心肌缺血(CAO)、180min心肌再灌注(Rep.R.);心肌缺血预处理组:12只,开胸、3次心肌缺血预处理(IPC),每次缺血5min,其间间隔5分钟后,开始90min心肌缺血和180min再灌注;异搏定－心肌缺血预处理组:10只,从股静脉内注射异搏定,10μg/100g(注射速度5μg/min)后,开始3×5min IPC、90min心肌缺血和180min再灌注;灯盏花－心肌缺血预处理组:10只,从股静脉内给注射灯盏花,0.4mg/100g(注射速度0.2mg/min)后,开始3×5min IPC、90min心肌缺血和180min再灌注;$CaCl_2$预处理组:10只,从股静脉内给注射3次$CaCl_2$,注射速度1.6μmol/min,每次持续5min,间隔5min再灌注,开始90min心肌缺血和180min再灌注;灯盏花＋$CaCl_2$组:从股静脉注射灯盏花,剂量同上,5min后再从股静脉给注射$CaCl_2$3次,剂量亦同上,开始90min心肌缺血和180min再灌注。详见图.

1.3 测量、记录实验中心率与平均动脉压

* 男,1963－06出生,博士生

维普资讯 http://www.cqvip.com

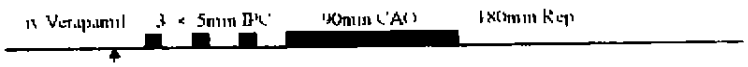
假手术组:



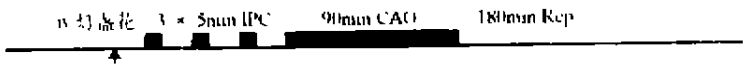
IPC 组:



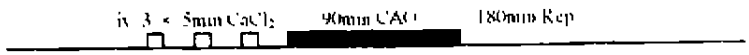
异搏定+IPC 组:



灯盏花+IPC 组:



$CaCl_2$ 预处理组:



灯盏花+$CaCl_2$ 预处理组:

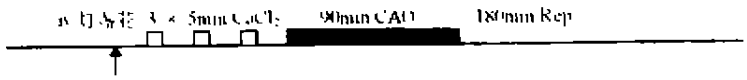


图 各组预处理、缺血－再灌注具体时间设计模拟图

用电脑大鼠血压、心率仪(MRS.Ⅲ，上海高血压研究所监制)分别于开胸前、冠状动脉血流阻断前、阻断后30min和90min、再灌注60min和180min记录心率(次/min)，鼠尾平均动脉压(mmHg)。

1.4 心律失常的记录

本实验的目的主要是观察Ca^{2+}对心梗面积的影响。在实验过程中同时还记录不同时段的肢导心电图，以观察室速(VT)和室颤(VF)的发生率。记录时间在阻断冠脉血流后30min内每5min记一次和再灌注3min内，因为再灌注3min以内为心律失常的易发期。

1.5 坏死心肌范围的测量

再灌注180min，深麻醉下将鼠杀死、取出心脏，剪去左、右心房和右心室，沿心脏短轴横行切断左心室肌，厚度约为2mm，立即放入含1%TTC的PBS液内衡温37°C、染色15min[2]。取出心肌、放入含10%福尔马林液的盐水溶液内固定30min。仔细沿正常心肌(被TTC染成红色)和坏死心肌(不被TTC染色而为灰黄色)分界处切开，分别称出坏死心肌和左心室心肌的总重量，计算出坏死心肌占左心室心肌的百分比[3]。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表1 各组实验中在各时段内所测心率血压值

组 别	麻醉后	冠脉阻塞前	冠脉阻塞的		冠脉再灌注	
			30min	90min	60min	180min
		心	率(bpm)			
IPC组	340±4	338±5	339±4	339±3	337±2	339±4
假手术组	342±3	340±6	339±2	338±3	338±4	339±3
$CaCl_2$组	339±5	338±3	337±4	334±5	337±6	339±2
Vera.+IPC组	338±6	331±3	330±2	328±2	333±4	335±2
灯盏花+IPC组	341±3	340±2	337±6	335±4	338±3	341±4
灯盏花+$CaCl_2$组	336±3	333±7	331±8	335±2	337±8	335±6
			平均动脉压(mmHg)			
IPC组	84±3	85±4	82±3	79±4	74±3	70±6
假手术组	83±4	86±5	82±3	79±4	76±4	72±5
$CaCl_2$组	84±6	83±2	81±3	79±6	74±5	70±2
Vera.+IPC组	86±5	85±3	81±4	81±3	75±2	71±6
灯盏花+IPC组	85±2	84±4	80±2	80±4	72±6	70±3
灯盏花+$CaCl_2$组	81±5	82±4	84±1	85±9	71±6	69±7

1.6 统计学分析

计量资料用均数±标准差表示。用方差分析组间心肌坏死范围。$P<0.05$为有显著性差异，$P<0.01$为有非常显著性差异;$P>0.05$为无统计学意义。

2 结果

2.1 心率和平均动脉压的变化

各组所测的心率、鼠尾平均动脉压值详见表1，用均数±标准差表示。各组在相应时段内心率和平均动脉压无显著性差异($P>0.05$)。

2.2 预处理对坏死心肌的影响

假手术组，用异搏定、灯盏花素乙、灯盏花素乙－$CaCl_2$干预组心肌坏死面积比心肌缺血预处理组和$CaCl_2$干预组明显增多($P<0.01$)，详见表2。而假手术组和用异搏定、灯盏花素乙干预组间心肌坏死面积无显著性差异($P>0.05$);心肌缺血预处理组和$CaCl_2$干预组间心肌坏死面积也无显著性差异($P>0.05$)。

2.3 心律失常发生率

仅假手术组有1只大鼠在90min缺血后、180min再灌注的前2min记录到室性心动速，经胸外叩击恢复为窦性心律，其它各组均未记录到VT、VF等室性心律失常。

表2 各组实验心观坏死范围比较

组 别	坏死心肌占左心室肌百分比
假手术组	42.73±5.8
IPC组	18.75±7.2*
$CaCl_2$组	19.33±3.6*
Vera+IPC组	47.28±7.9
灯盏花+IPC组	44.14±4.5
灯盏花+$CaCl^{2+}$组	46.43±1.4

注：*与假手术组相比$P<0.01$，Vera代表异搏定，IPC－心肌缺血预处理组

3 讨论

本实验的主要结果是:(1)短暂的细胞外[Ca^{2+}]升高，有心肌缺血预处理样心肌保护效应;(2)Ca^{2+}通道阻滞剂异搏定能消除心肌缺血预处理对心肌的保护作用;(3)PKC抑制剂灯盏花素乙不仅能消除IPC对心肌的保护作用;而且可消除外源性Ca^{2+}对心肌的保护作用。

3.1 细胞内Ca^{2+}增加和心肌缺血预处理

Miyawaki等[4]离对离体心脏行反复短时间

维普资讯 http://www.cqvip.com

内改变灌流液内[Ca^{2+}]的实验结果证实Ca^{2+}对心肌有保护作用，并能被异搏定所抑制。故作者设想在在体动物实验中是否静脉注射Ca^{2+}也有预处理样的心肌保护作用？静脉注射Ca^{2+}通道拮抗剂异搏定能否消除缺血预处理对心肌的保护作用。

细胞外[Ca^{2+}]增加可致细胞内[Ca^{2+}]增加，Marban等实验证实细胞外[Ca^{2+}]增加系经Ca^{2+}交换等方式而致使细胞内[Ca^{2+}]增加[5]。许多实验证实短暂缺血时细胞内[Ca^{2+}]即有短暂、轻、中度增高。Smith等最近用荧光检测法发现5分钟预处理缺血可使离体心肌细胞内的[Ca^{2+}]增加2.4倍，推测[Ca^{2+}]在缺血预处理细胞保护作用中起重要作用。

本文静脉注射Ca^{2+}通道阻滞剂异搏定后，IPC心肌坏死面积由18.75%±7.2%增加为47.28%±7.9%，$P<0.01$；用PKC抑制剂灯盏花素乙后，IPC心肌坏死面积由18.75%±7.2%增加为44.14%±4.5%，$P<0.01$；静注$CaCl_2$组心肌坏死面积比未注射组明显减小(19.33%±3.6% VS 42.73%±5.8%，$P<0.01$)，而在静注$CaCl_2$之前再给PKC抑制剂灯盏花素乙则消除了Ca^{2+}对心肌的保护作用，心梗面积由19.33%±3.6%增加为46.43%±1.4%，$P<0.01$。这些结果提示Ca^{2+}、PKC都是预处理保护心肌的重要介质[6]，而Ca^{2+}对心肌的保护作用是经信息通道的共同通道PKC发挥作用的。因本文在心肌预处理时间内未测定细胞内Ca^{2+}浓度，推测异搏定在阻滞Ca^{2+}内流的同时，也可能减轻细胞内酸中毒、抑制Ca^{2+}交换[7]，使Ca^{2+}内流减少也可能是消除预处理对心肌保护作用的原因之一。

3.2 细胞内[Ca^{2+}]增加对心肌的保护机制

Ca^{2+}是cPKC(classic PKC，经典PKC)激活所需要的重要的内源性激动剂，而PKC又是预处理保护细胞必经的共同信息通道[8]。由此可见，细胞内[Ca^{2+}]的升高在心肌细胞保护过程中起着非常重要的作用。静脉注射Ca^{2+}保护心肌的确切机制尚不完全清楚，可能是Ca^{2+}刺激引起心肌细胞内对抗缺血、再灌注损伤的其它内源性保护物质的累积[7]，如细胞内Ca^{2+}浓度增加激活磷脂酶C[1]，该酶又催化多磷酸肌醇水解，进而激活二酰基甘油[9]使PKC活化。激活的PKC使细胞碱性化、肌浆网吸收Ca^{2+}、抑制L型Ca^{2+}通道后则又减低细胞内Ca^{2+}浓度；使肌纤维对Ca^{2+}敏感度增加、保持肌纤维功能；使收缩蛋白磷酸化、调整肌力；使5'核苷酸激活、腺苷释放增加等等，最终达到保护心肌细胞功能[4]。

心肌细胞内Ca^{2+}离子浓度增加对心肌细胞保护作用似乎与细胞内[Ca^{2+}]超载代表缺血、再灌注细胞功能失调和死亡相矛盾[10]。作者认为在缺血、再灌注早期，心肌细内[Ca^{2+}]浓度升高是PKC活化所必需的，而被激活的PKC则又通过上述等途径降低细胞内[Ca^{2+}]达到保护心肌细胞作用，与细胞内[Ca^{2+}]增加对细胞的损害并不矛盾；亦不能排除目前尚未发现的其它物质或途径参与细胞的保护作用。

本实验用Ca^{2+}拮抗剂异搏定能消除IPC对心肌的保护作用，用PKC抑制剂灯盏花素乙亦消除了IPC、Ca^{2+}对心肌的保护作用，说明Ca^{2+}、PKC都是心肌细胞保护所必需的物质，而且是通过Ca^{2+}激活PKC发挥作用。用静脉注射Ca^{2+}的方法进行心肌缺血预处理、为临床开展PTCA、冠状动脉搭桥、心脏移植术等术前心肌保护开辟了广阔的前景。

然而，必须强调的是：本文是从正常大鼠心脏得到的结果，Ca^{2+}在冠心病患者体内应用的利、弊有待进一步研究。

参考文献

1.Nishizuka Y. Science 1992;258:607
2. Lie JT, et al.The Jouurnal of Thoracic and Cardiovascular Surgery. 1975;69:599
3.Donnelly TJ, et al. Circulation. 1992;85:769
4.Miyawaki H, et al. Circ Res. 1996;79:137
5.Ellingsen O, et al. Acta Physiol Scand. 1992;145:99
6.Steenbergen C, et al. Circ Res.1987;60:700
7.Meldrum DR, et al. J Thorac Cardiovasc Surg 1996; 112: 778
8.Goto M, et al. Circ Res. 1995;77:611
9.Nishizuka Y. Science. 1984;225:1365
10.Tani M. Annu Rev Physiol. 1990;52:543

(收稿日期 1998-05-10)

维普资讯 http://www.cqvip.com

Cardial preconditioning with calcium: clinically accessible myocardial protection

Wang Yuexi, et al
Department of cardiology, college of clinical medicine

Cardiac preconditioning is mediated by protein kinase C (PKC). Although endogenous calcium is a potent stimulus of PKC, it remains unknown whether preischemic administration of exogenous calcium can induce PKC. mediated myocardial protection against ischemia.reperfusion injury. Cacium chloride ($CaCl_2$) was administered through femoral vein at a rate of 1.6μmol · ml^{-1} · min.1. Calcium.mediated cardiadaption was then linked to PKC by means of the PKC inhibitor Chelerythrine(CHE. 0.4mg/100g). Results indicated that preischemic $CaCl_2$ administration reduced myocardial infarction size as effectivelly as ischemic preconditioning(IPC). Benificial effects of $CaCl_2$ were eliminated by concurrent PKC inhibitor. These results suggest that $CaCl_2$, a safe and routinely administered agent, can induce PKC－mediated cardiac preconditioning. Calcium.induced cardioadaptation to ischemia.reperBned ischemic events such as PTCA and electic cardiac operations

KEY WORDS Calcium; Myocardium; Protection

14-17

三七总皂甙对粒单系造血祖细胞增殖调控机理的研究*

基础医学院组胚教研室 姜 蓉** 王亚平
基础医学院生理教研室 王莎莉

R331.2
R285.5

提 要 采用造血祖细胞体外培养与造血生长因子生物活性检测等实验血液学技术，研究三七总皂甙(TSPN)，对小鼠粒单系造血祖细胞(CFU－GM)增殖调控的影响及其机理。结果表明：在有粒单系集落刺激因子(GM－CSF)存在的条件下，TSPN能促进正常或贫血小鼠CFU－GM的集落形成；经TSPN诱导制备的肌条件培养液，L细胞条件培养液和脾细胞条件培养液能显著提高CFU－GM的集落产率。研究提示，TSPN可能通过诱导机体产生造血调控因子或协同这些因子促进机体单系血发生。

关键词 三七总皂甙；粒单系造血祖细胞；血细胞发生
中图分类号 R331.2

三七为中医临床"补气、活血"要药，三七皂甙是主要有效成份[1]。我们既往工作证明：三七总皂甙对多能造血干细胞的增殖有明显刺激作用，并能促进其向粒单系细胞分化[2]。亦能防止$^{60}Co\gamma$射线照射所致的血细胞数减少[3]。本文采用造血祖细胞体外培养和造血生长因子生物活性检测等方法，研究三七总皂甙对粒单系造血祖细胞增殖调控的影响，旨在探讨三七"补气、活血"的生物学机理，为阐述祖国传统医学的气血理论提供实验依据。

1 材料与方法

*本课题由四川省中医药局科研基金资助

**女，1962－09出生，实验师