维普资讯 http://www.cqvip.com

· 论著 ·

热休克蛋白 27 介导异氟醚预处理延迟相对缺血/再灌注损伤兔心肌的保护作用研究

冉珂 朱蓉 卢向航 邹定全 李辉 常业恬

【摘要】 **目的** 探讨热休克蛋白 27(HSP27)在异氟醚预处理延迟相对缺血/再灌注(I/R)兔心肌保护中的作用机制。**方法** 将 30 只新西兰大白兔随机分成假手术组(C 组)、I/R 组和体积分数为 2% 的异氟醚预处理组(S 组)3 组,每组 10 只。C 组吸入纯氧 2 h,24 h 后仅行左冠状动脉(冠脉)套线而不阻断血流 160 min;I/R 组吸入纯氧 2 h,24 h 后结扎左冠脉前降支阻断血流 40 min,再灌注 120 min;S 组吸入 2% 的异氟醚和纯氧 2 h,24 h 后处理同 I/R 组。再灌注后抽血测定各组丙二醛(MDA)含量;用伊文思蓝和氯化三苯四唑(TTC)染色法测定心肌梗死面积;用蛋白质免疫印迹法(Western blotting)测定各组 HSP27 和核转录因子-κB(NF-κB)的蛋白表达。**结果** 异氟醚预处理延迟相可降低 I/R 损伤心肌梗死面积〔(19.7±2.8)%比(37.8±1.75)%〕,上调 HSP27 表达〔(84.5±4.3)灰度值比(53.1±3.8)灰度值〕,下调 NF-κB 表达〔(58.6±4.2)灰度值比(119.3±5.6)灰度值〕,降低 MDA 含量〔(5.24±0.45)kU/L 比(9.42±0.83)kU/L〕,差异均有统计学意义(P 均<0.05)。**结论** HSP27 介导了异氟醚预处理延迟相对 I/R 心肌的保护作用。

【关键词】 异氟醚; 预处理延迟相; 缺血/再灌注损伤,心肌; 热休克蛋白 27

Protective effect of heat-shock protein 27 on myocardium with isoflurane preconditioning in myocardial ischemia/reperfusion injury of myocardium in rabbit

RAN Ke, ZHU Rong, LU Xiang-hang, ZOU Ding-quan, LI Hui, CHANG Ye-tian. Department of Anesthesiology, Second Xiangya Hospital of South University, Changsha 410011, *Hunan, China*

Corresponding author: CHANG Ye-tian (Email: changyetian@sohu.com)

【**Abstract**】 **Objective** To investigate the mechanism and the protective effect of heart-shock protein 27 (HSP27) on rabbit myocardium with isoflurane preconditioning in myocardial ischemia/reperfusion (I/R) injury. **Methods** Thirty New Zealand white rabbits were randomly assigned to three groups (each $n=10$): ①Sham operation group (C group); ②I/R group; ③Two percent in volume isoflurane group (S group). S group was exposed to 2.0% isoflurane-pure oxygen for 2 hours. C group and I/R group were exposed 2 hours to pure oxygen to serve as untreated controls. Twenty-four hours later the rats in I/R group and S group underwent 40 minutes of coronary occlusion followed by 120 minutes of reperfusion. At the end of the reperfusion, infarct size (IS) was defined by Evan's blue and triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining. Blood samples were taken from arterial line for determination of malondialdehyde (MDA) levels. Western Blotting was used to determine the expression of HSP27 and nuclear factor-κB (NF-κB) in myocardium. **Results** Isoflurane preconditioning could decrease I/R induced myocardial infarct size 〔(19.7±2.8)% vs. (37.8±1.7)%〕. This was accompanied by an increase in the expression in HSP27 〔(84.5±4.3) gray scale value vs. (53.1±3.8) gray scale value〕 and a decrease in NF-κB 〔(58.6±4.2) gray scale value vs. (119.3±5.6) gray scale value〕 and MDA 〔(5.24±0.45)kU/L vs. (9.42±0.83) kU/L〕. **Conclusion** The expression of HSP27 induced by isoflurane preconditioning plays an important role in protecting myocardium against ischemia/reperfusion injury.

【**Key words**】 isoflurane; delayed preconditioning; myocardium; ischemia/reperfusion injury; heat-shock protein 27

缺血/再灌注(I/R)损伤是目前临床亟待解决的迫切问题。现已证实异氟醚预处理对心肌 I/R 损伤早期具有保护效应[1],最近发现,异氟醚预处理还可产生延迟相保护效应[2-3],但其作用机制尚未完全阐明,能否通过激活心肌细胞内源性保护机制而增强心肌抗损伤能力,尚未见报道。热休克蛋白 27(HSP27)是一种小分子 HSP,以心肌细胞和神经元等未分化细胞表达最为丰富[4]。研究表明,在离体心肌 HSP27 过度表达具有抗 I/R 损伤的作用[5],提示其在心肌中具有重要生理功能。因此,本研究拟通过观察异氟醚预处理延迟相对心肌细胞 HSP27 表达的影响,探讨异氟醚预处理延迟相对心肌保护的作

基金项目:湖南省自然科学基金资助项目(03JJY3053)

作者单位:410011 湖南长沙,中南大学湘雅二医院麻醉科

通讯作者:常业恬,教授,博士生导师(Email:changyetian@sohu.com)

作者简介:冉珂(1975-),男(汉族),河南省人,医学博士,主治医师,主要从事心肌保护的研究(Email:rankerk@126.com)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

用机制。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料：健康雄性新西兰大白兔 30 只，体重 2.0～2.5 kg，由中南大学湘雅医学院动物部提供。兔抗人核转录因子-κB(NF-κB)抗体为美国 Lab Vision 公司产品；兔抗人 HSP27 抗体为武汉博士德生物工程公司产品；伊文思蓝、氯化三苯四氮(TTC)、戊巴比妥钠、丙烯酰胺均为美国 Sigma 公司产品；二抗为辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG(1.0 g/L)；丙二醛(MDA)试剂盒为南京建成生物工程研究所产品；琼脂糖、Tris 等为国产试剂。

1.2 动物分组及 I/R 模型制备：30 只兔按随机数字表法分为假手术组(C 组)、I/R 组和异氟醚预处理组(S 组)，每组 10 只。以戊巴比妥钠 30 mg/kg 耳缘静脉注射麻醉后固定，气管切开插管，行纯氧机械通气，潮气量 15 ml/kg，呼吸频率 35 次/min。连接皮下电极监测标准Ⅱ导联心电图，并在左颈内动脉穿刺置管持续监测左室压力变化。左前第 4 肋间开胸，切开心包，用丝线结扎左冠状动脉(冠脉)中部阻断血流造成心肌缺血，以心室壁出现发绀、膨出、同时伴有心电图 ST 段抬高为阻断成功。C 组吸入纯氧 2 h，24 h 后仅行左冠脉套线但不阻断血流共计 160 min；I/R 组吸入纯氧 2 h，24 h 后行左冠脉前降支阻断 40 min，再灌注 120 min；S 组吸入体积分数为 2%的异氟醚＋纯氧 2 h，24 h 后处理同 I/R 组。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 MDA 测定：各组分别于再灌注结束即刻从颈内动脉抽取动脉血 2 ml，分离血清，采用硫代巴比妥酸盐法测定血清中 MDA。

1.3.2 心肌梗死面积测定：再灌注结束后再次阻断冠脉，自颈内动脉逆向注入质量分数为 2%的伊文思蓝 2 ml 进行心肌染色，以区分缺血(无蓝色区)和非缺血组织(蓝色区)。迅速取出心脏，将其水平切成约 2 mm 的薄片，以滤纸吸干心肌薄片中水分，剪除右室和非缺血组织后分别测定其质量，然后将缺血心肌片用体积分数为 0.5%的 TTC 磷酸缓冲液(pH7.4，37 C)孵育 15 min 以确定梗死组织，再将坏死区(灰白色区)和非坏死区(深红色区)分离并测定其质量，缺血和梗死面积以其占左室质量的百分比表示，并计算心肌缺血和梗死面积。

1.3.3 心肌组织的蛋白质免疫印迹分析(Western blotting)：参考文献[4]方法提取心肌蛋白，将提取的心肌蛋白贮存于-70 C下备用。各样本取100 μg心肌蛋白，于质量分数为 12.5%的聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳，分离的心肌蛋白随后通过电转印装置转印至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上，将膜在封闭液中室温下作用 3 h，再分别加入兔抗人 HSP27 抗体和兔抗人 NF-κB 抗体，4 C孵育过夜，然后加入羊抗兔二抗，室温下孵育 1 h，最后进行增强化学发光反应。结果用 GIS-700D 型凝胶图像系统进行扫描分析，记录其平均灰度值。

1.4 统计学处理：实验数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，用 SPSS13.0 统计软件进行单因素方差分析，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 血清 MDA 变化(表 1)：与 C 组比较，I/R 组和 S 组血清 MDA 含量均显著升高(P 均<0.05)；但 S 组血清 MDA 含量明显低于 I/R 组($P<0.05$)。

表 1 各组血清 MDA 含量及心肌 HSP27 和 NF-κB 的蛋白表达量变化($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Changes of MDA content in blood and expression of HSP27 and NF-κB in myocardial tissues in each group($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	MDA (kU/L)	蛋白表达量(灰度值)	
			NF-κB	HSP27
C 组	10	3.84±0.76	17.4±3.5	28.7±5.1
I/R 组	10	9.42±0.83*	119.3±5.6*	53.1±3.8*
S 组	10	5.24±0.45*△	58.6±4.2*△	84.5±4.3*△

注：与 C 组比较：*$P<0.05$；与 I/R 组比较：△$P<0.05$

2.2 心肌梗死面积的变化(表 2)：I/R 组和 S 组缺血面积间比较差异无统计学意义($P>0.05$)，但S 组较 I/R 组梗死面积显著减小($P<0.05$)。

2.3 心肌 HSP27 和 NF-κB 的蛋白表达变化(表 1，图 1，图 2)：I/R 组和 S 组心肌 HSP27 和 NF-κB 的蛋白表达均较 C 组明显增高(P 均<0.05)，S 组 NF-κB蛋白表达低于 I/R 组($P<0.05$)，HSP27蛋白表达高于 I/R 组($P<0.05$)。

表 2 异氟醚预处理延迟相对 I/R 损伤心肌缺血面积及梗死面积的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Effects of IS/AAR and AAR/LV level induced by Isoflurane delayed preconditioning I/R myocardium($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	LV(g)	AAR(g)	IS(g)	AAR/LV(%)	IS/AAR(%)
C 组	10	3.16±0.68	…	…	…	…
I/R 组	10	2.93±0.44	0.88±0.35	0.33±0.06	33.6±3.1	37.8±1.7
S 组	10	3.12±0.73	1.07±0.32	0.21±0.05	34.3±2.2	19.7±2.8△

注：与 I/R 组比较：△$P<0.05$；LV 为左室心肌，AAR 为缺血心肌，IS 为梗死心肌，AAR/LV 为缺血面积，IS/AAR 为梗死面积；…为未发现

维普资讯 http://www.cqvip.com

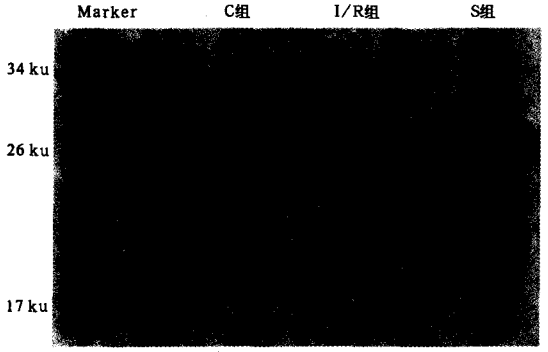

图 1 各组兔心肌 HSP27 蛋白表达的变化

Figure 1 Changes of expression of HSP27 protein in myocardial tissues in each group

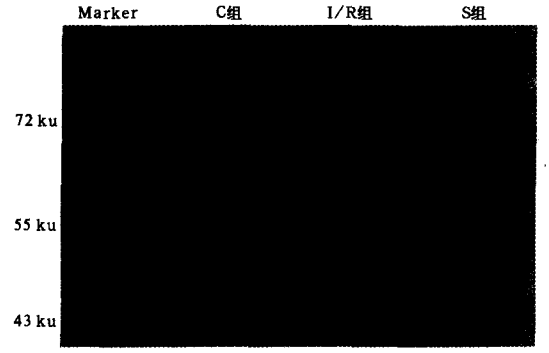

图 2 各组兔心肌 NF-κB 蛋白表达的变化

Figure 2 Changes of expression of NF-κB protein in myocardial tissues in each group

3 讨 论

生物体在各种应激作用下(包括物理、化学和微生物),能启动一组特殊的基因,即热休克基因,产生一组结构上高度保守的特殊蛋白质,即 HSP,以增强对自身细胞的保护作用,使之免受应激因子的损害[6]。HSP 按其分子质量的大小以及同源程度,可分为 HSP90 家族、HSP70 家族、小分子 HSP 家族及泛素家族共 4 个家族[7]。HSP27 属于小分子 HSP 家族,热休克、氧化应激及缺血、缺氧等均可诱导其表达,静息状态下,细胞中该蛋白几乎不表达或表达程度很低。在本研究中,C 组心肌中的 HSP27 表达最弱也证实了这一点。

研究表明,细胞内大量氧自由基(OFR)生成及脂质过氧化物反应增强是心肌 I/R 损伤的主要机制之一[8]。OFR 具有极强的化学活性,通过与细胞膜不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应,使细胞膜的流动性降低和通透性增加,细胞膜的完整性及选择性离子通透性功能遭到破坏[9]。MDA 是脂质过氧化产物,其含量越高表明机体氧化损伤程度越重,是反映机体抗氧化能力的重要指标。Mehlen 等[10]发现,HSP27 可抑制肿瘤坏死因子-α(TNF-α)诱发的活性氧生成,提高细胞内谷胱甘肽的水平,降低细胞脂质过氧化以及细胞内蛋白质氧化,显著提高细胞抗氧化能力。本研究结果显示,异氟醚预处理延迟相可显著提高心肌中的 HSP27 表达,降低 MDA 含量,提示异氟醚预处理通过上调 HSP70 蛋白表达,降低细胞脂质过氧化,进而增强心肌细胞抗氧化能力,降低 I/R 损伤程度。

有研究发现,NF-κB 是细胞凋亡中重要的信号转导因子,在细胞凋亡过程中,伴随有 NF-κB 的激活,由于 Fas、FasL 等促凋亡基因的启动子含有 NF-κB结合位点,NF-κB 可能是激活心肌 Fas、FasL 等促凋亡基因表达的重要转录因子,作为介导细胞凋亡信号转导通路,其激活可促进上述基因的表达,而通过抑制 NF-κB 的活化,可上调抗凋亡因子 Bcl-2 的表达幅度,抑制天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3(caspase-3)蛋白表达,来降低 I/R 诱导心肌细胞凋亡,起到抗凋亡的作用[11-13]。HSP27 可通过抑制 NF-κB 活化,进而抑制caspase-3的激活[14-15]。本研究结果显示,异氟醚预处理可显著增高 I/R 心肌 HSP27 表达,显著降低 NF-κB 表达,提示异氟醚预处理延迟相通过诱导 HSP27 表达的增高来抑制 NF-κB 的表达,进而改变细胞凋亡相关基因的活化,从而增强心肌抗凋亡能力,抑制心肌细胞凋亡。

参考文献:

1 徐军美,常业恬,胡冬煦,等. K_{ATP}通道参与介导吸入麻醉药诱导的兔在体心肌预适应[J]. 中国危重病急救医学,2001,13(10):589-592.

2 Tanaka K, Ludwig L M, Krolikowski J G, et al. Isoflurane produces delayed preconditioning against myocardial ischemia and reperfusion injury: role of cyclooxygenase-2[J]. Anesthesiology, 2004, 100(3): 525-531.

3 Shi Y, Hutchins W C, Su J, et al. Delayed cardioprotection with isoflurane: role of reactive oxygen and nitrogen[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005, 288(1): H175-H184.

4 Yan L J, Christians E S, Liu L, et al. Mouse heat shock transcription factor 1 deficiency alters cardiac redox homeostasis and increases mitochondrial oxidative damage[J]. EMBO J, 2002, 21(19): 5162-5172.

5 Hollander J M, Martin J L, Belke D D, et al. Overexpression of wild-type heat shock protein 27 and a nonphosphorylatable heat shock protein 27 mutant protects against ischemia/reperfusion injury in a transgenic mouse model[J]. Circulation, 2004, 110(23): 3544-3552.

6 Merck K B, Groenen P J, Voorter C E, et al. Structural and functional similarities of bovine alpha-crystallin and mouse small heat-shock protein, a family of chaperones[J]. J Biol Chem, 1993, 268(2): 1046-1052.

7 Snoeckx L H, Cornelussen R N, Van Nieuwenhoven F A, et al. Heat shock proteins and cardiovascular pathophysiology[J].

维普资讯 http://www.cqvip.com

Physiol Rev, 2001, 81(4): 1461 - 1497.
8 Lee W H, Gounarides J S, Roos E S, et al. Influence of peroxynitrite on energy metabolism and cardiac function in a rat ischemia reperfusion model [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003, 285(4): H1385 - H1395.
9 赵自刚，牛春雨，张静，等. 肠系膜淋巴管结扎对失血性休克大鼠肺损伤的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2007, 19(5): 274 - 278.
10 Mehlen P, Kretz-Remy C, Preville X, et al. Human hsp27, Drosophila hsp27 and human alpha B - crystallin expression mediated increase in glutathione is essential for the protective activity of these proteins against TNF alpha - induced cell death [J]. EMBOJ, 1996, 15(1): 2695 - 2706.
11 Zhao X, Eghbali-Webb M. Gender - related differences in basal and hypoxia - induced activation of signal transduction pathways controlling cell cycle progression and apoptosis, in cardiac fibroblasts [J]. Endocrine, 2002, 18(2): 137 - 145.
12 Maulik N, Sasaki H, Addya S, et al. Regulation of cardiomyocyte apoptosis by redox - sensitive transcription factors [J]. FEBS Lett, 2000, 17, 485(1): 7 - 12.
13 朱桂军，刘俊峰，于占彪，等. 二烯丙基三硫对急性肺损伤小鼠肿瘤坏死因子-α表达及核转录因子-κB活性的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2007, 19(4): 205 - 208.
14 Kammanadiminti S J, Chadee K. Suppression of NF - kappaB activation by Entamoeba histolytica in intestinal epithelial cells is mediated by heat shock protein 27 [J]. J Biol Chem, 2006, 281(36): 26112 - 26120.
15 Wang X, Qin Z H, Leng Y, et al. Prostaglandin A1 inhibits rotenone induced apoptosis in SH - SY5Y cells [J]. J Neurochem, 2002, 83(5): 1094 - 1102.

（收稿日期：2007 - 07 - 10 修回日期：2007 - 10 - 17）
（本文编辑：李银平）

· 病例报告 ·

连续性血液滤过抢救心搏骤停复苏后并发急性肾功能衰竭 1 例

潘淼 陈蕊田 吴菊霜

【关键词】 心搏骤停； 呼吸停止； 心肺复苏； 连续性肾脏替代治疗

我院应用连续性肾脏替代治疗(CRRT)成功抢救 1 例心搏骤停复苏后并发急性肾功能衰竭(ARF)患者。

1 病例介绍

患者男性，82 岁，以“反复胸闷、心悸 20 余年，眩晕 3 h”为主诉，于 2007 年 6 月 12 日入院。20 年前诊断为“冠心病、心房颤动、Ⅲ度房室传导阻滞”。近 3 年来，血压明显升高，并常出现活动后气喘症状，诊断为“高血压病 3 级、高血压肾病，冠心病、陈旧性心内膜下心肌梗死、心功能不全”。入院查体：体温 38.8 ℃，脉搏 38 次/min，呼吸频率 20 次/min，血压 210/100 mm Hg（1 mm Hg = 0.133 kPa），意识清，贫血貌，双瞳孔等大等圆，对光反射存在，颈部无抵抗，双肺闻及较多湿啰音，心界左下扩大，心率48 次/min，律不齐，主动脉瓣区闻及 3 级舒张期杂音，腹平软，肝、脾未触及，腹水征阴性，双下肢无水肿。血液白细胞计数10.4×10⁹/L，血红蛋白 90 g/L，肌酐(Cr)166 μmol/L，尿素氮(BUN)10.6 mmol/L，K^+ 4.66 mmol/L，二氧化碳结合力(CO_2CP)20.7 mmol/L，脑钠素 9 μg/L，尿蛋白微量；心电图示：缓慢型心房颤动伴Ⅲ度房室传导阻滞，频发室性期前收缩，Q - T 间期延长；心脏彩超示：左室节段运动障碍，左室舒张功能减退，主动脉瓣关闭不全(重度)；X 线胸片示：双肺炎症。入院后 5 d 突发意识不清、心搏、呼吸骤停、口唇发绀、休克，紧急给予人工呼吸、心电除颤、心肺复苏等抢救，心搏、呼吸恢复，予气管切开、呼吸机辅助通气，并植入临时心脏起搏器；入院后 6 d 出现少尿或无尿，Cr 220～440 μmol/L，BUN 16 ～ 20 mmol/L，CO_2CP 10.7 mmol/L，诊断为 ARF。给予连续性静-静脉血液滤过(CVVH)治疗，前稀释置换液量为2 000 ml/h，肝素用量2～4 mg/h，持续治疗8 d，保持液体平衡。8 d后复查 Cr 和 BUN 分别降至 76 μmol/L和8.6 mmol/L，尿量2 500～3 000 ml/24 h，停止 CRRT，于 2007 年 7 月8 日行永久性心脏起搏器安置术。随访患者恢复良好，生命体征稳定。

2 讨 论

连续性血液净化是通过血液滤过器模仿肾小球滤过功能，将血液中的水、电解质及部分代谢废物消除，输入置换液，相当于肾小管重吸收功能，从而快速纠正体内水、电解质紊乱和酸碱失衡，以及稀释性低蛋白血症，部分消除细胞因子或炎症介质，部分替代肝、肾功能，迅速改善临床症状，缓解病情[1]。CRRT 具有维持患者血流动力学稳定、调节机体液体平衡、溶质清除率高、清除炎症介质，恢复肾功能等特点[2-3]。

CRRT 在复杂性 ARF 中的应用指征：应依据患者临床病情(如其他器官的损害情况)和尿量减少情况，而不是依据生理指标是否达到尿毒症水平。有时水负荷可能比氮质血症危害更大，早期或预防性行 CRRT 可能由于控制水、电解质及酸碱平衡，而更有利于促进肾功能恢复，复杂性 ARF 治疗是尽可能降低或避免发生尿毒症并发症。本患者心功能极差，对水负荷耐受差，但由于及时进行 CRRT，避免了心肺复苏后心力衰竭的加重，从而改善预后。

作者单位：352100 福建省宁德市医院
作者简介：潘淼(1966 -)，男(汉族)，福建省人，副主任医师。

参考文献：
1 江建强，马国英. 连续性肾脏替代治疗顽固性心力衰竭伴肾功能衰竭 11 例[J]. 中国危重病急救医学, 2006, 18(10): 602.
2 季大玺，龚德华. 应重视连续性血液净化在急性肾衰竭中的治疗作用[J]. 中国血液净化, 2004, 3(11): 581 - 582.
3 刘琮，刘晓红，何颜霞，等. 连续性血液净化治疗在儿童感染性休克中的应用研究[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2006, 13(3): 168 - 171.

（收稿日期：2007 - 08 - 27）
（本文编辑：李银平）