

地塞米松诱导金属硫蛋白表达对大鼠缺血/再灌注损伤心肌的保护作用研究

庄梅 方颖 吴立荣 雷大卫

【摘要】 目的 探讨地塞米松诱导金属硫蛋白(MT)表达对大鼠缺血/再灌注(I/R)损伤心肌的延迟保护作用。方法 将 32 只 SD 大鼠随机分成地塞米松组和对照组,分别予腹腔注射地塞米松和蒸馏水预处理。预处理 24 h 后构建 Langendorff 离体心脏 I/R 动物模型,缺血 30 min 后再灌注 60 min。用蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测 MT 表达;动态观测缺血前及再灌注期间血流动力学指标[左心室发展压(LVDP)、左室内压上升和下降最大速率($\pm dp/dt \max$)、冠状动脉循环流出量(CF)]、心律失常的变化;测定心肌梗死面积、冠状动脉流出液肌酸激酶同工酶(CK-MB)漏出率、心肌丙二醛(MDA)、总超氧化物歧化酶(T-SOD)、铜锌-SOD(CuZn-SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)水平及心肌细胞膜 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶、 $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATP}$ 酶活性。结果 与对照组比较,地塞米松组 MT 的表达水平显著增加(3.085 ± 1.065 比 1.028 ± 0.016 , $P < 0.05$);再灌注期间 LVDP、 $\pm dp/dt \max$ 及 CF 均得到明显改善(P 均 < 0.05);再灌注性室性心律失常评分明显减少[(2.00 ± 1.41) 分比 (6.63 ± 4.24) 分, $P < 0.05$];心肌梗死面积明显缩小[(28.38 ± 11.22) % 比 (47.39 ± 8.30) %, $P < 0.01$];冠状动脉流出液 CK-MB 的漏出率明显降低[(8.69 ± 4.16) U/g 比 (18.15 ± 5.59) U/g, $P < 0.01$];心肌组织 MDA 含量降低($P < 0.05$),T-SOD、CuZn-SOD、CAT、GSH-Px 均明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);心肌细胞膜的 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶、 $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATP}$ 酶活性增加($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$)。结论 地塞米松可能通过上调 MT 的表达,对大鼠 I/R 损伤心肌起到延迟保护作用。

【关键词】 地塞米松; 金属硫蛋白; 缺血/再灌注损伤,心肌; 心肌保护

Protective effects of metallothionein induced by dexamethasone against ischemia/reperfusion injury of myocardium of isolated rat heart ZHUANG Mei, FANG Ying, WU Li-rong, LEI Da-wei. Department of Cardiology, The Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China

【Abstract】 Objective To investigate the protective effects of metallothionein (MT) induced by dexamethasone (DEX) against ischemia/reperfusion (I/R) injury of myocardium of isolated rat heart. **Methods** Thirty-two Sprague-Dawley (SD) rats were divided randomly into the DEX and control groups. In the former group, the rats were pretreated with DEX, and in latter group distilled water was given before their hearts were isolated for Langendorff perfusion and I/R. MT was assessed by Western blotting. The left ventricular developed pressure (LVDP), maximal change rate of intraventricular pressure rise/down ($\pm dp/dt \max$), coronary artery flow (CF) and reperfusion arrhythmias were observed dynamically before ischemia and during 60-minute reperfusion following 30-minute ischemia. The hearts were perfused with triphenyltetrazolium (TTC) after 60-minute reperfusion. The myocardial infarct size was measured with Adobe Photoshop. The levels of MB isoenzyme of creatine kinase (CK-MB), malonaldehyde (MDA), total superoxide dismutase (T-SOD), CuZn-SOD, catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px) and the activities of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$, $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$ were detected. **Results** Compared with control group, the expression of MT was significantly increased (3.085 ± 1.065 vs. 1.028 ± 0.016 , $P < 0.05$), the LVDP, $\pm dp/dt \max$ and CF were greatly improved (all $P < 0.05$), the accumulated point of ventricular arrhythmia and the infarct size were significantly reduced in DEX group [(2.00 ± 1.41) scores vs. (6.63 ± 4.24) scores and (28.38 ± 11.22) % vs. (47.39 ± 8.30) %, respectively, both $P < 0.01$]. The level of CK-MB was significantly lowered in the DEX group compared with control group [(8.69 ± 4.16) U/g vs. (18.15 ± 5.59) U/g, $P < 0.01$], and myocardium MDA content was decreased ($P < 0.05$). Moreover, the levels of T-SOD, CuZn-SOD, CAT, GSH-Px, and the activities of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ and $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$ were significantly increased ($P < 0.05$ or/and $P < 0.01$) in DEX group. **Conclusion** DEX induces upregulation of MT, which attenuates I/R injury in rat heart.

【Key words】 dexamethasone; metallothionein; myocardial ischemia/reperfusion injury; myocardial protection

基金项目:贵州省科技基金资助项目(J20072099)

作者单位:550004 贵州,贵阳医学院附属医院心内科

作者简介:庄梅(1967-),女(瑶族),广东省人,医学硕士,副主任医师,Email:zhuangmei@sina.com。

金属硫蛋白(MT)是体内最强的羟自由基清除剂,具有稳定细胞膜、调节细胞 Ca^{2+} 稳定等生物效应^[1]。研究表明,在大鼠心肌缺血/再灌注(I/R)等多种心脏损伤的模型上,MT 的过表达均可明显降低氧自由基(OFR)引起的脂质过氧化损伤,减轻心肌结构和功能改变^[2]。糖皮质激素可诱导大鼠肝脏合成 MT^[3],但其对心脏的作用如何尚不清楚。本研究通过建立大鼠离体心脏 I/R 模型,探讨地塞米松预处理诱导心肌 MT 表达的水平及其对大鼠心肌 I/R 损伤时的保护作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂:MT 单克隆抗体(美国Sigma 公司),二喹甲胺法(BCA 法)蛋白检测试剂盒以及其他蛋白质免疫印迹法(Western blotting)所使用试剂(美国Pierce Biotechnology 公司),辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗鼠 IgG(美国 Santa Cruz Biotechnology 公司);丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、过氧化氢酶(CAT)、ATP 酶测试盒(南京建成生物工程研究所)。

1.2 动物分组及预处理:成年雄性 SD 大鼠 32 只,体重 240~301 g,由贵阳医学院实验动物中心提供。按随机数字表法分成两组,每组 16 只。地塞米松组参照文献[4]方法腹腔注射地塞米松 0.8 mg/kg 进行预处理,对照组腹腔注射等量蒸馏水。

1.3 离体心脏 I/R 模型制备:大鼠预处理 24 h 后,腹腔注射戊巴比妥(30 mg/kg)麻醉、肝素 500 U 抗凝,开胸取心脏,浸入 0~4 °C Krebs-Henseleit 缓冲液(K-H 液)中,主动脉插管并悬挂于 Langendorff 灌注装置上,用 K-H 液进行灌注。切开肺动脉根部,使冠状动脉(冠脉)循环流出液引流充分。平衡灌注 20 min 后停止灌注,缺血 30 min 后再灌注 60 min。

1.4 左心室功能、再灌注性室性心律失常、心肌梗死面积测定:每组随机抽取 8 只大鼠,用多导生理记录仪测定缺血前及再灌注 10、20、30、40、50 和 60 min 左心室发展压(LVDP)、左室内压上升和下降最大速率($\pm dp/dt \max$)、冠脉循环流出量(CF)、室性期前收缩(PVC)、室性心动过速(VT)、心室扑动(VF)、心室纤颤(Vf)的数值。参考 Curtis 等^[5]和 Ravingerova 等^[6]的方法对心律失常进行评分(0~6 分)以量化分析其严重程度。再灌注结束后给予氯化三苯四唑(TTC)6 ml 行冠脉逆灌注,用体积分数为 4%的甲醛溶液固定 24 h。沿心脏长轴把心脏切成 1 mm 厚的薄片,将梗死心肌(被染成灰白色)的

影像录入电脑,计算梗死面积。

1.5 冠脉流出液肌酸激酶同工酶(CK-MB)活性测定:用全自动生化仪测定 CK-MB 活性,计算漏出率。

$$\text{漏出率} = \text{CK-MB} \times \text{CF} / \text{心肌总湿重}$$

1.6 蛋白检测:另 8 只大鼠心脏再灌注结束后取左心室部分全层心肌-80 °C 冻存,检测 MT 蛋白、MDA、总 SOD(T-SOD)、铜锌-SOD(CuZn-SOD)、 Na^+-K^+-ATP 酶、 $Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP$ 酶、GSH-Px、CAT 的检测。

1.6.1 Western blotting 检测心肌 MT 蛋白:取心肌组织 100 mg,加 1 ml 组织蛋白提取液(T-PER)进行匀浆,离心取上清液;用 BCA 法进行蛋白质定量,用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离、转膜;以 β -肌动蛋白(β -actin)作为内参照。在凝胶成像系统上分析处理,MT 含量以蛋白条带的积分吸光度(A)值与 β -actin A 值的相对比值表示。

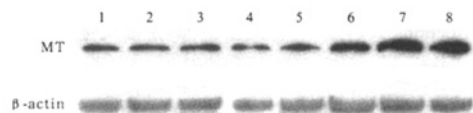
1.6.2 心肌 MDA、T-SOD、CAT、GSH-Px 测定:取心肌组织制备匀浆,用 BCA 法测定心肌组织蛋白含量,硫代巴比妥法测定 MDA,黄嘌呤氧化酶法测定 T-SOD、CuZn-SOD,紫外分光法测定 CAT,5'-联硫代-双-2-硝基苯甲酸(DTNB)法测定 GSH-Px。

1.6.3 细胞膜 Na^+-K^+-ATP 酶和 $Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP$ 酶活性测定:取心肌组织,采用无机磷比色法测定 Na^+-K^+-ATP 酶和 $Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP$ 酶活性,操作按试剂盒说明书要求,单位用每小时每克蛋白分解 ATP 产生 1 mmol 无机磷的量表示。细胞膜蛋白含量采用 BCA 法测定。

1.7 统计学处理:用 SPSS 12.0 软件处理,数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。心功能指标用重复测量设计的方差分析,两组间定量资料比较用独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Western blotting 检测心肌组织中 MT 的相对含量(图 1):地塞米松预处理后,大鼠心肌 MT 表达增加,与对照组比较差异有统计学意义(3.085 ± 1.065 比 1.028 ± 0.016 , $P < 0.05$)。



1~4:对照组;5~8:地塞米松组
图 1 Western blotting 法检测两组大鼠心肌组织 MT 蛋白的表达

2.2 血流动力学指标(图 2):两组大鼠离体心脏缺血前左心室功能(LVDP、±dp/dt max)、CF 的基线值比较差异无统计学意义(P 均 >0.05);再灌注期间地塞米松组 LVDP、±dp/dt max、CF 均较对照组显著升高,差异有统计学意义(P 均 <0.05)。

2.3 再灌注性室性心律失常(表 1):地塞米松组心律失常评分显著低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 1 两组心律失常评分及心肌梗死面积比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	心律失常评分(分)	心肌梗死面积(%)	CK-MB 漏出率(U/g)
对照组	8	6.63±4.24	47.39±8.30	18.15±5.59
地塞米松组	8	2.00±1.41 ^a	28.38±11.22 ^b	8.69±4.16 ^b

注:与对照组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$

2.4 心肌梗死面积(表 1):地塞米松组心肌梗死面积较对照组明显减小($P<0.01$)。

2.5 冠脉流出液 CK-MB 的漏出率(表 1):地塞米松组 CK-MB 漏出率较对照组明显减少($P<0.01$)。

2.6 心肌组织抗氧化酶活性的变化(表 2):与对照组比较,地塞米松组抗氧化酶 T-SOD、CuZn-SOD、CAT 及 GSH-Px 含量显著增高,脂质过氧化产物 MDA 含量显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

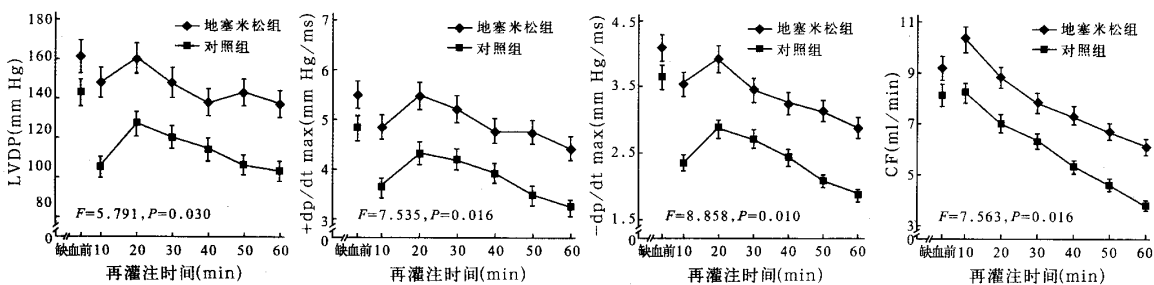
2.7 心室肌细胞膜 Na⁺-K⁺-ATP 酶和 Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活性变化(表 2):地塞米松组心室肌细胞膜的 Na⁺-K⁺-ATP 酶、Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活性较对照组显著升高($P<0.01$ 和 $P<0.05$)。

3 讨论

随着冠脉血运重建技术的逐步完善,使严重缺血的心肌在恢复血供上有了较多可靠的方法。但在实验研究和临床实践中均发现,短时间心肌供血中断后,在一定时间内恢复血供可发生 I/R 损伤,表现为心肌电活动异常、收缩性降低、损伤标志物含量急剧增高。目前认为 I/R 损伤与 OFR 引起生物膜脂质过氧化及细胞内钙超载等导致细胞不可逆损伤有关^[7-8]。如何有效地诱导机体内源性保护物质,减轻心肌的 I/R 损伤以应用于临床,一直是缺血心肌保护领域中的研究热点。

MT 参与了对心肌 I/R 损伤的第一线防御^[9],其作为一种强的心血管系统内源性细胞保护物质的作用正备受关注。已知包含锌^[10]在内的多种重金属、细胞因子、应激、激素等均可诱导机体合成 MT。近有临床研究提示,在顽固性充血性心力衰竭的患者中运用小剂量的糖皮质激素短期替代治疗可显著改善患者心功能^[11]。同时也有动物研究发现,糖皮质激素和硫酸锌可协同升高动物肝脏合成 MT 水平^[12],但确切机制尚不清楚。本研究通过采用中等剂量地塞米松预处理,24 h 后构建 Langendorff 离体心脏 I/R 动物模型,用 Western blotting 检测两组大鼠心肌 MT 的水平,结果显示地塞米松预处理后可显著上调 MT 的表达。

有研究发现 MT 可减轻心肌的 I/R 损伤^[13-14],其保护作用主要通过清除自由基、增强抗氧化酶的活性以对抗膜脂质过氧化;促进 Na⁺-K⁺-ATP 酶和



与对照组同期比较,^a $P<0.05$

图 2 两组大鼠心肌 I/R 期间血流动力学的变化比较

表 2 两组大鼠心肌 SOD、CAT、GSH-Px、MDA、Na⁺-K⁺-ATP 酶、Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	T-SOD (kU/g)	CuZn-SOD (kU/g)	CAT (U/g)	GSH-Px (U)	MDA ($\mu\text{mol/g}$)	Na ⁺ -K ⁺ -ATP 酶 ($\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	Ca ²⁺ -Mg ²⁺ -ATP 酶 ($\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)
对照组	8	19.41±2.90	7.34±1.20	15.82±4.19	50.32±9.13	1.62±0.39	0.554±0.064	0.664±0.098
地塞米松组	8	25.29±4.74 ^a	11.86±2.13 ^b	28.93±13.22 ^a	71.27±14.61 ^b	1.21±0.18 ^a	0.800±0.150 ^b	0.868±0.220 ^a

注:与对照组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$

Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活性以稳定细胞膜、减轻细胞钙超载等途径来实现^[2,9,15-16]。本研究结果也显示:与对照组比较,地塞米松组大鼠的心脏在再灌注期间 LVDP、±dp/dt max 及 CF 得到明显改善,再灌注性室性心律失常明显减少,心肌梗死面积明显缩小,冠脉流出液 CK-MB 的漏出率亦明显降低。提示 MT 过表达参与介导地塞米松预处理对大鼠心肌 I/R 损伤的延迟保护效应。地塞米松组心肌 MDA 水平显著降低, T-SOD 尤其是 CuZn-SOD、CAT、GSH-Px、Na⁺-K⁺-ATP 酶和 Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活性显著升高,提示地塞米松诱导 MT 表达减轻心肌 I/R 损伤可能与其清除氧自由基、稳定细胞膜、抑制细胞钙超载及增强抗氧化酶的活性有关。

参考文献

[1] Coyle P, Philcox J C, Carey L C, et al. Metallothionein: the multipurpose protein[J]. Cell Mol Life Sci, 2002, 59(4): 627-647.

[2] Kang Y J. The antioxidant function of metallothionein in the heart[J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1999, 222(3): 263-273.

[3] Sato M, Yamaki J, Hamaya M, et al. Synergistic induction of metallothionein synthesis by interleukin-6, dexamethasone and zinc in the rat[J]. Int J Immunopharmacol, 1996, 18(2): 167-172.

[4] 章元沛. 药理学实验[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 231-232.

[5] Curtis M J, Walker M J. Quantification of arrhythmias using scoring systems: an examination of seven scores in an in vivo model of regional myocardial ischaemia[J]. Cardiovasc Res, 1988, 22(9): 656-665.

[6] Ravingerova T, Tribulova N, Slezak J, et al. Brief, intermediate and prolonged ischemia in the isolated crystalloid perfused rat heart: relationship between susceptibility to arrhythmias and

degree of ultrastructural injury[J]. J Mol Cell Cardiol, 1995, 27(9): 1937-1951.

[7] 林丽娜, 王万铁, 徐正祚, 等. 地塞米松对家兔失血性休克/再灌注损伤的防治作用[J]. 中国危重病急救医学, 2001, 13(6): 362-364.

[8] 唐维平, 司良毅, 张乐之, 等. 再灌注损伤大鼠心肌细胞核³H-Ryanodine 结合特性的变化[J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17(3): 146-149.

[9] Kang Y J, Li G, Saari J T, et al. Metallothionein inhibits ischemia-reperfusion injury in mouse heart[J]. Am J Physiol, 1999, 276(3 Pt 2): H993-997.

[10] 沈炳玲, 秦毅, 颜利求. 锌对家兔心肌缺血/再灌注损伤的保护作用[J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16(9): 560-561.

[11] 卢亮, 厉伟民. 肾上腺皮质功能变化在顽固性充血性心力衰竭患者中的临床意义[J]. 中国危重病急救医学, 2003, 15(8): 489-491.

[12] 徐丽霞, 彭新君, 黄海英. 硫酸锌和地塞米松磷酸钠对家兔肝脏锌含量的影响[J]. 微量元素与健康研究, 2002, 19(2): 1-2, 28.

[13] Wang G W, Zhou Z, Klein J B, et al. Inhibition of hypoxia/reoxygenation induced apoptosis in metallothionein overexpressing cardiomyocytes[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001, 280(5): H2292-2299.

[14] Kang Y J, Li Y, Sun X, et al. Antiapoptotic effect and inhibition of ischemia/reperfusion-induced myocardial injury in metallothionein-overexpressing transgenic mice[J]. Am J Pathol, 2003, 163(4): 1579-1586.

[15] Wang G W, Schuschke D A, Kang Y J. Metallothionein-overexpressing neonatal mouse cardiomyocytes are resistant to H₂O₂ toxicity[J]. Am J Physiol, 1999, 276(1 Pt 2): H167-H175.

[16] Wang G W, Klein J B, Kang Y J. Metallothionein inhibits doxorubicin induced mitochondrial cytochrome c release and caspase-3 activation in cardiomyocytes[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2001, 298(2): 461-468.

(收稿日期: 2007-09-15 修回日期: 2007-12-11)
(本文编辑: 李银平)

• 启事 •

第八届呼吸支持技术(2008)暨第二届呼吸治疗高级研修班通知

呼吸支持技术高级研修班是首都医科大学附属北京朝阳医院-北京呼吸疾病研究所王辰教授负责的国家级继续教育项目。迄今已经成功举办 7 届, 培养学员数千人。7 年的历练与沉淀, 已发展成具有一定品牌效应的国内一流的危重病研修班。

研修班秉承“实用技术与最新进展相结合”的办学宗旨, 着眼于实用性, 邀请王辰、席修明、刘大为、杜斌、邱海波、安友仲、许媛等国内知名专家授课。授课内容力求新颖、实用, 将危重病医学的热点、难点问题浓缩为基础理论、危重病医学指南、感染、ARDS、无创通气与撤机、呼吸治疗六大板块, 以专题讲座为主, 辅以互动答疑、病例讨论、呼吸机模式、力学波现场演示等环节, 全方位立体化的展示我国危重病医学的新发现、新进展。

举办时间: 研修班将于 2008 年 10 月中下旬在北京举行。学费及资料费共计 1 200 元/人, 住宿费和伙食费由组委会统一安排, 费用自理。

联系人: 呼吸支持技术高级研修班会务组, 杜敏捷医生。

通信地址: 北京市朝阳区工体南路 8 号, 北京朝阳医院-北京呼吸疾病研究所, 邮编: 100020; 电话: 010-65060167, 010-85231893; 传真: 010-65060167; Email: sunbing@vip.sohu.net (请注明邮件主题为“2008 呼吸支持技术高级研修班”)。您可通过邮寄回执、传真或者发送 Email 报名参加。

详情更新请登陆北京朝阳医院网站(www.bjcyh.com.cn)、北京呼吸疾病研究所网站(www.birm.cn)查询, 也可于以上网站下载报名表。

(北京朝阳医院-北京呼吸疾病研究所)