

心肺复苏后心功能障碍与心肌内质网 Ca^{2+} 调控蛋白表达关系的研究

黄煜 何庆

【摘要】 目的 探讨心肌内质网 Ca^{2+} 调控蛋白表达与心肺复苏(CPR)后心功能障碍的关系。方法 38 只 SPF 级雄性 SD 大鼠按随机数字表法分为对照组(12 只)和心搏骤停组(26 只)。静脉弹丸式注射氯化钾 $40 \mu\text{g/g}$ 诱导心搏骤停, 8 min 后进行 CPR; 对照组大鼠仅麻醉后置管并监测指标, 不诱导心搏骤停。在复苏后进行有创血流动力学监测 1 h, 采用超声心动图测定心功能。分别于自主循环恢复(ROSC)后 5 min 和 60 min 时采集心肌标本, 采用蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测内质网 Ca^{2+} ATP 酶(SERCA2a)、磷酸化受磷蛋白(p-PLB)和兰尼定受体(RyR)水平。结果 心搏骤停组 ROSC 率为 92.3%(24/26), 平均复苏时间为 (68 ± 39) s。心搏骤停组复苏后 1 h 心功能明显下降, 与对照组相比, 射血分数、短轴缩短率(FS)、左室内压上升或下降最大速率($\pm \text{dp/dt max}$)明显降低[射血分数: 0.548 ± 0.060 比 0.809 ± 0.043 , $F=71.692$, $P=0.000$; FS: $(34.4 \pm 4.4)\%$ 比 $(46.0 \pm 3.5)\%$, $F=55.443$, $P=0.000$; $+\text{dp/dt max}$ (mmHg/s): $4\ 718 \pm 743$ 比 $7\ 098 \pm 394$, $P<0.01$; $-\text{dp/dt max}$ (mmHg/s): $-3\ 824 \pm 612$ 比 $-6\ 187 \pm 473$, $P<0.01$]。与对照组相比, 心搏骤停组 ROSC 后 5 min 及 60 min PLB 磷酸化水平(灰度值)均显著降低(5 min: 0.64 ± 0.15 比 1.29 ± 0.13 , $P<0.01$; 60 min: 0.95 ± 0.08 比 1.30 ± 0.09 , $P<0.05$), 而内质网 SERCA2a 活性(灰度值)和 RyR 水平(灰度值)差异均无统计学意义(SERCA2a 5 min: 1.01 ± 0.18 比 1.24 ± 0.07 , 60 min: 1.03 ± 0.14 比 1.25 ± 0.06 ; RyR 5 min: 0.96 ± 0.13 比 0.97 ± 0.13 , 60 min: 0.88 ± 0.14 比 0.99 ± 0.11 , 均 $P>0.05$)。结论 内质网 PLB 磷酸化水平异常与 CPR 后心功能障碍密切相关。

【关键词】 心肺复苏; 内质网 Ca^{2+} 调控蛋白; 受磷蛋白; 心肌顿抑

The relationship between sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} modulation proteins and postresuscitation myocardial dysfunction Huang Yu, He Qing. Department of Critical Care Medicine, the Third People's Hospital of Chengdu Second Affiliated Hospital of Chengdu, Chongqing Medical University, Chengdu 610031, Sichuan, China
Corresponding author: He Qing, Email: 123hq@163.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the relationship between sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} modulation proteins and postresuscitation myocardial dysfunction. **Methods** Thirty-eight SPF male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into control group ($n=12$) and cardiac arrest (CA) group ($n=26$). CA was induced by intravenous bolus of potassium chloride ($40 \mu\text{g/g}$), and cardiopulmonary resuscitation (CPR) was conducted 8 minutes later. No CA was induced in control group except catheter placement for monitoring cardiopulmonary parameters after anesthesia. Invasive hemodynamic parameters were monitored for 1 hour after CPR. Echocardiogram was performed to evaluate cardiac function. Myocardial samples were harvested 5 minutes and 1 hour after restoration of spontaneous circulation (ROSC), and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA2a), phosphorylated phospholamban (p-PLB) and ryanodine receptor (RyR) were determined by Western Blot. **Results** ROSC rate of CA group was 92.3% (24/26), and mean recovery time was (68 ± 39) seconds. Cardiac function was significantly impaired in CA group at 1 hour after resuscitation, and ejection fraction, fraction shortening (FS), the maximal rate of left ventricular pressure increase/decline ($\pm \text{dp/dt max}$) were significantly decreased compared with those in control group [ejection fraction: 0.548 ± 0.060 vs. 0.809 ± 0.043 , $F=71.692$, $P=0.000$; FS: $(34.4 \pm 4.4)\%$ vs. $(46.0 \pm 3.5)\%$, $F=55.443$, $P=0.000$; $+\text{dp/dt max}$ (mmHg/s): $4\ 718 \pm 743$ vs. $7\ 098 \pm 394$, $P<0.01$; $-\text{dp/dt max}$ (mmHg/s): $-3\ 824 \pm 612$ vs. $-6\ 187 \pm 473$, $P<0.01$]. Compared with control group, the expression levels of p-PLB (gray value) was significantly decreased at 5 minutes and 60 minutes (5 minutes: 0.64 ± 0.15 vs. 1.29 ± 0.13 , $P<0.01$; 60 minutes: 0.95 ± 0.08 vs. 1.30 ± 0.09 , $P<0.05$) after resuscitation in CA group, while the level of sarcoplasmic SERCA2a (gray value) and RyR (gray value) showed no significant differences (SERCA2a 5 minutes: 1.01 ± 0.18 vs. 1.24 ± 0.07 , 60 minutes: 1.03 ± 0.14 vs. 1.25 ± 0.06 ; RyR 5 minutes: 0.96 ± 0.13 vs. 0.97 ± 0.13 , 60 minutes: 0.88 ± 0.14 vs. 0.99 ± 0.11 , all $P>0.05$). **Conclusions** The impairment of the p-PLB is closely related to postresuscitation myocardial dysfunction.

【Key words】 Cardiopulmonary resuscitation; Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase; Phospholamban; Myocardial stunning

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.10.003

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81071539); 四川省中医药局科研项目(0080329)

作者单位: 610031 四川, 重庆医科大学附属成都第二临床学院 / 成都市第三人民医院重症医学科(黄煜、何庆); 610041 成都, 四川大学华西医院急诊医学科(黄煜、何庆) 通信作者: 何庆, Email: hq123@163.com

目前有关提高心肺复苏(CPR)生存率治疗措施的研究进展缓慢,除基础生命支持方法改进和亚低温治疗^[1-4]外,心搏骤停患者死亡的重要原因是复苏后心功能障碍^[5]。有研究发现,心肌间隙连接蛋白 Connexin43(Cx43)和心肌线粒体的改变均与复苏后的心肌损伤相关^[6-7]。此外,心肌内质网功能也是影响心肌收缩功能的重要环节。在生理情况下,心肌内质网对胞质 Ca^{2+} 水平的调控是兴奋-收缩耦联的关键环节^[8],而其功能主要取决于相关 Ca^{2+} 调控蛋白。心肌内质网通过 Ca^{2+} ATP 酶(SERCA2a)对 Ca^{2+} 的摄取和兰尼定受体(RyR)对 Ca^{2+} 的释放使胞质内 Ca^{2+} 水平呈周期性变化,从而保持肌原纤维规律性地收缩和舒张。而受磷蛋白(PLB)为 SERCA2a 功能的关键调控蛋白,去磷酸化的 PLB 与 SERCA2a 结合导致其关闭并从 SERCA2a 上释放而使 Ca^{2+} 摄入通道开放^[9-10]。研究发现,内质网和线粒体一样是保护心肌缺血/再灌注(I/R)损伤的关键靶点^[11];心脏 I/R 导致内质网 Ca^{2+} 调控功能异常,从而引起心肌收缩功能障碍^[12-13],胞质 Ca^{2+} 水平异常除引起肌原纤维过度收缩及心肌细胞死亡外,还会引起线粒体内 Ca^{2+} 水平升高并导致其损伤和能量代谢障碍,并进一步导致心肌收缩功能障碍^[14-15]。本研究拟探讨 CPR 后心功能障碍与内质网 Ca^{2+} 调控蛋白的关系,报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组及模型制备:健康 SPF 级雄性 SD 大鼠 38 只,体质量 350~425 g,由四川达硕生物科技有限公司提供,动物许可证号:SCXK2008-24。将大鼠按随机数字表法分为对照组(12 只)和心搏骤停组(26 只)。腹腔注射戊巴比妥钠 45 mg/kg 麻醉大鼠,气管切开插管并行机械通气[潮气量 3 mL/kg,呼吸频率为 100 次/min,吸入氧浓度(FiO_2)1.00]。左颈动脉插管监测血压;右颈动脉插管至左心室监测左室内压力波形;左颈外静脉插管至右心房监测右房压,股静脉置管以静脉给药和补液;同时监测 II 导联心电图。用电热毯维持动物体温 37℃左右。术后 30 min 用静脉弹丸式注射氯化钾(KCl) 40 $\mu\text{g/g}$ 的方法诱导心搏骤停^[16-17],同时停止机械通气。心搏骤停的判定标准为平均动脉压(MAP) <20 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa)。在停跳 8 min 后,按原参数恢复机械通气,同时开始以 200 次/min 的频率进行传统胸外心脏按压,并使冠状动脉灌注压(CPP)维持在(25 \pm 3) mmHg(CPP=动脉舒张压-右房压)。自主循环恢复(ROSC)的判定标准为 MAP >60 min 并

维持 5 min 以上。持续复苏 6 min 以上仍未恢复自主循环则视为复苏失败,放弃复苏。在复苏成功后的监测过程中以 3 mL/h 的速度静脉补入林格液。

对照组大鼠在手术完成后不诱导心搏骤停,仅进行相同时间的血流动力学监测。

本实验动物处置方法符合动物伦理学标准。

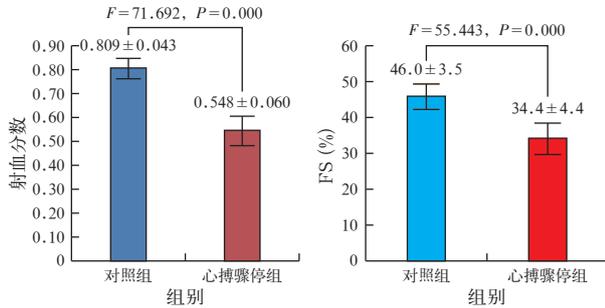
1.2 监测指标及方法:记录心搏骤停大鼠 ROSC 率和复苏时间;复苏后持续监测两组血流动力学指标 1 h,包括:心率、MAP、右房压及反映心脏收缩、舒张功能的左室内压上升或下降最大速率($\pm \text{dp/dt max}$)。在复苏前采集动脉血标本进行血气分析。在复苏前及 ROSC 后 1 h 通过二维超声心动图计算射血分数和短轴缩短率(FS)以评估心功能。分别于 ROSC 后 5 min 和 60 min 腹腔注射戊巴比妥钠 150 mg/kg 处死大鼠,取左室前壁心肌组织于 -70℃速冻保存以供进一步检测。

1.3 内质网 Ca^{2+} 调控蛋白的测定:采用蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)测定 SERCA2a、磷酸化 PLB(p-PLB)和 RyR 水平。用蛋白裂解液处理心肌标本,离心取上清液。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白并转至聚偏二氟乙烯膜上,Tris-HCl 缓冲盐溶液(TBS)洗膜 5 min 后于 25 mL 封闭缓冲液中摇动 1 h,再用 TBS/吐温洗 3 次。加入一抗室温孵育 1~2 h 或 4℃过夜;再加入碱性磷酸酶(AP)或辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗室温孵育 1 h。用化学发光法显示目标条带的灰度值,各蛋白表达以其与标准参照蛋白的灰度值比值表示。

1.4 统计学分析:所有统计分析采用 SPSS 17.0 统计软件处理。如计量资料符合正态分布,结果以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组间比较采用单因素方差分析;随时间点变化的各种血流动力学指标的组间比较采用重复测量的方差分析。如数据不符合正态分布,采用基于秩次的单因素方差分析。ROSC 率用频数进行描述。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组大鼠监测指标比较:两组大鼠各血流动力学指标、心功能指标和血气分析指标基线水平比较差异无统计学意义(均 $P>0.05$;表 1)。心搏骤停组 ROSC 率为 92.3%(24/26),平均复苏时间为(68 \pm 39) s。复苏后 1 h 心搏骤停组射血分数和 FS 均显著低于对照组(均 $P<0.01$;图 1)。复苏后有创心功能动态监测结果显示,心搏骤停组 $\pm \text{dp/dt max}$ 均显著低于对照组(均 $P<0.01$;图 2),可见大鼠在心搏骤停-CPR 后出现了心功能障碍。

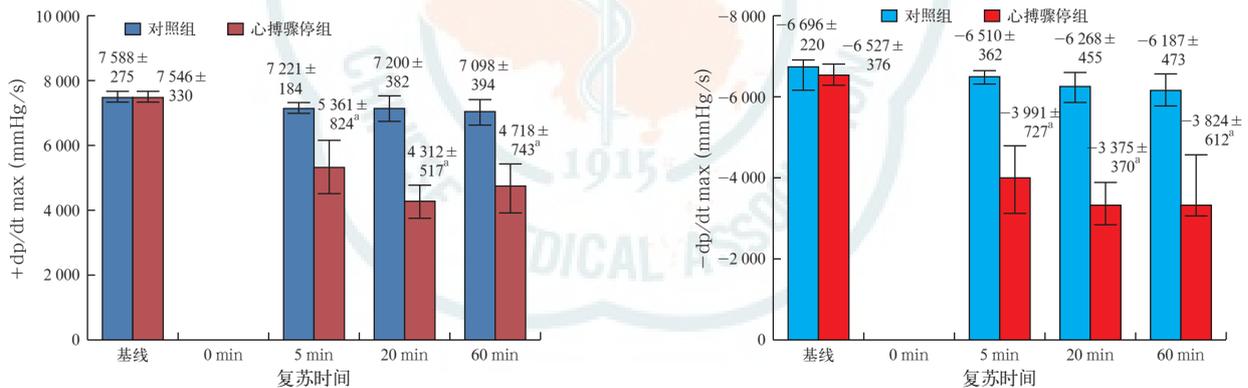


注:ROSC 为自主循环恢复,FS 为短轴缩短率
图 1 超声心动图测定 ROSC 后 1 h 心搏骤停大鼠心功能

表 1 心搏骤停与对照组大鼠血流动力学、心功能和血气分析指标基线情况比较($\bar{x} \pm s$)

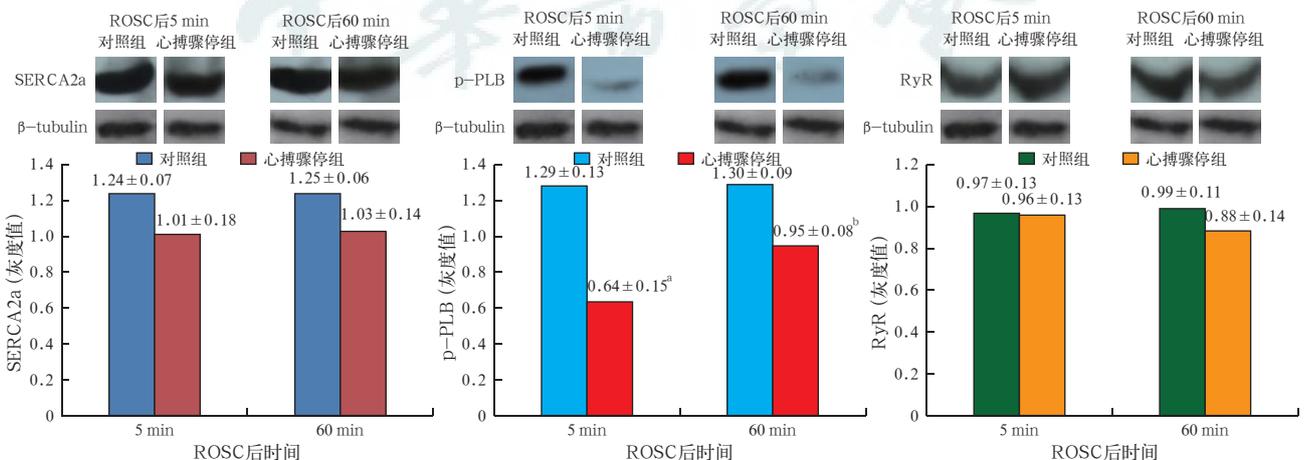
组别	动物数 (只)	心率 (次/min)	MAP (mmHg)	+dp/dt max (mmHg/s)	-dp/dt max (mmHg/s)	射血分数	FS (%)	pH 值	PaCO ₂ (mmHg)	PaO ₂ (mmHg)
对照组	12	380 ± 29	132 ± 14	7 588 ± 275	-6 696 ± 220	0.822 ± 0.037	47.5 ± 4.5	7.45 ± 0.02	30 ± 4	115 ± 25
心搏骤停组	26	370 ± 38	130 ± 25	7 546 ± 330	-6 527 ± 376	0.811 ± 0.033	45.7 ± 3.5	7.46 ± 0.04	34 ± 5	120 ± 28
F 值		0.021	0.008	0.003	0.042	0.001	0.007	0.003	0.012	0.010
P 值		0.887	0.929	0.958	0.844	0.974	0.936	0.958	0.911	0.919

注:MAP 为平均动脉压,± dp/dt max 为左室内压上升或下降最大速率,FS 为短轴缩短率,PaCO₂ 为动脉血二氧化碳分压,PaO₂ 为动脉血氧分压;1 mmHg=0.133 kPa



注:± dp/dt max 为左室内压上升或下降最大速率;与对照组比较,^aP<0.01

图 2 心搏骤停组与对照组大鼠复苏前后不同时间点 ± dp/dt max 的变化比较



注:ROSC 为自主循环恢复,SERCA2a 为内质网 Ca²⁺ATP 酶,β-tubulin 为 β-微管蛋白,p-PLB 为磷酸化受磷蛋白,

RyR 为兰尼定受体;与对照组比较,^aP<0.01,^bP<0.05

图 3 蛋白质免疫印迹试验检测心搏骤停组和对照组大鼠 ROSC 后 5 min 及 60 min 时心肌内质网 Ca²⁺调控蛋白表达的变化比较

2.2 两组大鼠内质网 Ca²⁺调控蛋白表达变化比较(图 3):ROSC 后 5 min 及 60 min,心搏骤停组 p-PLB 表达水平较对照组均显著下降(P<0.01 和 P<0.05),而两组间在 ROSC 后各时间点 SERCA2a、RyR 蛋白表达水平比较差异均无统计学意义。

3 讨论

心肌内质网的 Ca²⁺调控功能是心肌兴奋-收缩耦联机制中的重要环节^[8]。在近年来大鼠心脏 I/R 模型研究中发现,心脏 I/R 过程可导致心肌收缩与

舒张功能下降,其机制与内质网 Ca^{2+} 调控功能下降及相关蛋白表达改变有关,主要表现为 SERCA2a 表达水平下降、PLB 磷酸化水平降低^[12-13]。Kim 等^[18]在猪的体内和体外研究中发现,内质网 Ca^{2+} 摄取蛋白功能异常是再灌注后数小时内心肌顿抑的重要机制;而心肌内质网 Ca^{2+} 摄取功能的上调能通过调控胞质中 Ca^{2+} 浓度在心脏 I/R 过程中起保护作用。心搏骤停-CPR 为全身性急性 I/R 模型。本研究发现,心搏骤停组心功能在 CPR 后各时间点较对照组明显下降,同时心肌 p-PLB 表达水平也显著下降,而 SERCA2a 水平无显著差异。可以推测,复苏后出现的心功能障碍与心肌内质网 Ca^{2+} 摄取相关蛋白 PLB 的磷酸化状态相关,p-PLB 水平下降进而导致 SERCA2a 的 Ca^{2+} 摄取功能下降。心搏骤停组 RyR 表达水平与对照组相比并无显著差异,表明内质网 Ca^{2+} 释放功能异常可能与复苏后心功能障碍并无明显关系。该结果与 Singh 等^[12]在心肌 I/R 模型中发现的 RyR 水平下降不同。因此,心搏骤停-CPR 模型心肌损伤的病理生理机制与普通心脏再灌注模型并不相同,可能与两者缺血部位和缺血时间不同相关。

除上述机制外,近年来的研究还发现,在心脏再灌注早期(5 min 内),由于胞质中 Ca^{2+} 超载和内质网 Ca^{2+} 调控功能异常,导致胞质中 Ca^{2+} 振荡和 Ca^{2+} 峰值持续高水平,并引起肌原纤维过度收缩、心肌功能障碍和心肌损伤,5 min 后胞质中 Ca^{2+} 恢复^[11,14,19]。Valverde 等^[20]在完整的离体心脏急性 I/R 模型中也发现,再灌注发生后数分钟内内质网中 Ca^{2+} 水平下降,而胞质中 Ca^{2+} 水平升高,并导致动作电位异常。胞质中 Ca^{2+} 水平增高,并且通过线粒体钙离子单向转运蛋白(MCU)通道进入线粒体,导致线粒体内 Ca^{2+} 水平升高,继而进一步引起线粒体通透性转换孔(MPTP)通道开放、线粒体损伤、呼吸链功能障碍和氧自由基生成^[21]。本研究中,ROSC 后 5 min,心搏骤停组 p-PLB 水平较对照组显著下降,可以认为,其机制还可能是通过引起复苏早期可逆性胞质内 Ca^{2+} 水平上升,进一步导致复苏后心功能障碍。

综上所述,CPR 后心功能障碍的具体机制目前尚不完全清楚。本研究发现 CPR 后心功能障碍与心肌内质网 Ca^{2+} 摄取相关蛋白 PLB 的磷酸化水平异常密切相关,这也可能是改善 CPR 患者结局的重要靶点。

参考文献

[1] 李银平,秦俭,范振兴,等.自主循环恢复后轻度低温对心室纤颤兔心功能和心肌结构的影响[J].中国危重病急救医学,2011,23(12):743-748.

- [2] 韩奕,李春盛.4℃生理盐水诱导低温对猪心搏骤停复苏后肾脏的影响[J].中华危重病急救医学,2013,25(2):76-79.
- [3] 余学义,蒋龙元,方向韶.现场早期头部低温治疗对心肺复苏成功率及神经功能的影响[J].岭南急诊医学杂志,2013,18(3):166-167.
- [4] 詹磊,何庆,周亚雄.胸外心脏按压人员不同报数方式对心肺复苏质量的影响[J].中国危重病急救医学,2010,22(2):76-78.
- [5] Chang WT, Ma MH, Chien KL, et al. Postresuscitation myocardial dysfunction: correlated factors and prognostic implications [J]. Intensive Care Med, 2007, 33(1): 88-95.
- [6] 刘亚华,张杰,代正,等.山莨菪碱对心搏骤停猪氧化应激致心肌线粒体损伤的保护作用[J].中华危重病急救医学,2013,25(5):290-293.
- [7] 黄煜,何庆,詹磊.胞二磷胆碱提高心肺复苏效果和减轻心肌损伤的作用研究[J].中华危重病急救医学,2013,25(2):80-83.
- [8] Zhang T, Guo T, Mishra S, et al. Phospholamban ablation rescues sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} handling but exacerbates cardiac dysfunction in CaMK II delta (C) transgenic mice [J]. Circ Res, 2010, 106(2): 354-362.
- [9] Zucchi R, Ronca F, Ronca-Testoni S. Modulation of sarcoplasmic reticulum function: a new strategy in cardioprotection? [J]. Pharmacol Ther, 2001, 89(1): 47-65.
- [10] Periasamy M, Bhupathy P, Babu GJ. Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase pump expression and its relevance to cardiac muscle physiology and pathology [J]. Cardiovasc Res, 2008, 77(2): 265-273.
- [11] Piper HM, Kasseckert S, Abdallah Y. The sarcoplasmic reticulum as the primary target of reperfusion protection [J]. Cardiovasc Res, 2006, 70(2): 170-173.
- [12] Singh RB, Chohan PK, Dhalla NS, et al. The sarcoplasmic reticulum proteins are targets for calpain action in the ischemic-reperfused heart [J]. J Mol Cell Cardiol, 2004, 37(1): 101-110.
- [13] Chohan PK, Singh RB, Dhalla NS, et al. L-arginine administration recovers sarcoplasmic reticulum function in ischemic reperfused hearts by preventing calpain activation [J]. Cardiovasc Res, 2006, 69(1): 152-163.
- [14] Piper HM, Abdallah Y, Kasseckert S, et al. Sarcoplasmic reticulum-mitochondrial interaction in the mechanism of acute reperfusion injury. Viewpoint [J]. Cardiovasc Res, 2008, 77(2): 234-236.
- [15] Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury [J]. N Engl J Med, 2007, 357(11): 1121-1135.
- [16] Abella BS, Zhao D, Alvarado J, et al. Intra-arrest cooling improves outcomes in a murine cardiac arrest model [J]. Circulation, 2004, 109(22): 2786-2791.
- [17] Angelos MG, Butke RL, Panchal AR, et al. Cardiovascular response to epinephrine varies with increasing duration of cardiac arrest [J]. Resuscitation, 2008, 77(1): 101-110.
- [18] Kim SJ, Kudej RK, Yatani A, et al. A novel mechanism for myocardial stunning involving impaired Ca^{2+} handling [J]. Circ Res, 2001, 89(9): 831-837.
- [19] Abdallah Y, Gkatzoflia A, Pieper H, et al. Mechanism of cGMP-mediated protection in a cellular model of myocardial reperfusion injury [J]. Cardiovasc Res, 2005, 66(1): 123-131.
- [20] Valverde CA, Korniyev D, Ferreiro M, et al. Transient Ca^{2+} depletion of the sarcoplasmic reticulum at the onset of reperfusion [J]. Cardiovasc Res, 2010, 85(4): 671-680.
- [21] Hajnóczky G, Csordás G. Calcium signalling: fishing out molecules of mitochondrial calcium transport [J]. Curr Biol, 2010, 20(20): R888-891.

(收稿日期:2014-06-11)

(本文编辑:李银平)