

• 论著 •

药理预适应对兔急性心肌缺血保护作用的研究

安立敏^{1,2}, 胡 健¹, 夏经纲¹, 刘立新², 谭乃杰², 冯甲隶³, 宗志宏³

(1. 中国医科大学附属第一医院心内科, 沈阳 110001; 2. 天津泰达国际心血管病医院心内科; 3. 中国医科大学)

【摘要】 目的: 观察金纳多和硝酸甘油注射液药理预适应对在体兔心肌缺血/再灌注后热休克蛋白 70 (HSP70) 表达的诱导作用并探讨其心肌保护作用机制。**方法** 新西兰大白兔 20 只, 随机分为 4 组, 每组 5 只。假手术组开胸后只穿线不结扎, 生理盐水组、金纳多组和硝酸甘油组建立心肌缺血/再灌注模型, 并于缺血前 0.5 h 分别给予生理盐水、金纳多注射液和硝酸甘油注射液预处理。采用蛋白质免疫印迹法 (Western blot) 检测各组缺血区和非缺血区心肌组织 HSP70 含量, 并检测血清一氧化氮 (NO)、丙二醛 (MDA) 含量及总超氧化物歧化酶 (T-SOD)、肌酸激酶 (CK) 活性变化。**结果** 假手术组 HSP70 很少表达; 其余 3 组 HSP70 含量均有明显表达, 其中, 生理盐水组缺血区和非缺血区 HSP70 表达分别达假手术组的 2.5 和 2.1 倍, 金纳多组达 17.6 和 20.7 倍, 硝酸甘油组达 28.1 和 29.1 倍。生理盐水组血清 T-SOD 水平明显降低, MDA 和 CK 水平明显升高 (P 均 < 0.01)。金纳多和硝酸甘油组 T-SOD 水平轻度下降, 与假手术组和生理盐水组比较差异均有显著性; MDA 和 CK 水平均明显低于生理盐水组, NO 明显高于生理盐水组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。硝酸甘油组 T-SOD、CK 活性和 NO 含量均明显高于金纳多组 (P 均 < 0.01), 两组 MDA 水平差异无显著性。**结论** 金纳多和硝酸甘油注射液可诱导心肌缺血/再灌注后 HSP70 过量表达, 从而对心肌起保护作用; 金纳多和硝酸甘油的抗氧化作用和细胞保护作用可能与 HSP70 有关。

【关键词】 金纳多; 硝酸甘油; 缺血/再灌注损伤; 心肌; 热休克蛋白 70**中图分类号:** R256.2; R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-9691(2006)02-0104-04

Study on protective effects of pharmacological preconditioning on rabbits with myocardial ischemia/reperfusion AN Li-min^{1,2}, HU Jian¹, XIA Jing-gang¹, LIU Li-xin², TAN Nai-jie², FENG Jia-li³, ZONG Zhi-hong³. 1. Department of Cardiology, First Affiliated Hospital, Chinese Medical University, Shenyang 110001, Liaoning, China; 2. Department of Cardiology, Teda International Cardiovascular Hospital, Tianjin 300457, China; 3. Chinese Medical University (AN Li-min works at Teda International Cardiovascular Hospital, Tianjin 300457, China)

【Abstract】 Objective: To observe the effects of ginaton and nitroglycerin injection on expression of heat shock protein 70 (HSP70) and cardioprotective mechanism in rabbits with ischemia/reperfusion (I/R). **Methods:** Twenty New Zealand white rabbits were randomly divided into four groups, 5 rabbits being in each group. The model was not replicated in the sham-operated group. Myocardial I/R models were replicated in animals in normal saline, ginatone and nitroglycerin injection groups and were administered with normal saline, ginatone and nitroglycerin injection respectively 0.5 hour before ischemia. Western blot was used to measure HSP70 of ischemia and non-ischemia myocardium and the expression of HSP70 was analyzed semiquantitatively. Serum nitric oxide (NO), malondialdehyde (MDA) contents and total superoxide dismutase (T-SOD), creatine kinase (CK) activity were measured. **Results:** HSP70 was less expressed in sham-operated group and more expressed in normal saline group, ginaton group and nitroglycerin injection group. Expression of HSP70 of ischemia and non-ischemia myocardium in normal saline group was 2.5- and 2.1-fold, in ginaton group 17.6- and 20.7-fold and in nitroglycerin group 28.1- and 29.1-fold to that in the sham-operated group, respectively. The activity of T-SOD was lower while MDA and CK levels were higher in the normal saline group than those in the sham-operated group (all $P < 0.01$). In ginaton group and nitroglycerin group, T-SOD slightly decreased compared with sham-operated group and normal saline group, MDA and CK levels decreased and NO levels increased significantly compared with those of normal saline group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). T-SOD, CK and NO levels were higher in nitroglycerin group than those of the ginaton group (all $P < 0.01$), but no significant difference in MDA level was found between the two groups. **Conclusion:** Ginaton and nitroglycerin injection can induce expression of HSP70 excessively after I/R; their cardioprotective mechanism may be related to HSP70.

【Key words】 ginaton; nitroglycerin; myocardial ischemia/reperfusion; heat shock protein 70

热休克蛋白 70(heat shock protein 70, HSP70) 是一组具有内源性保护作用的应激性蛋白质,可以在多种应激状态下产生。某些药物通过药理预适应作用可以诱导 HSP70 的产生,从而调动机体内源性的保护机制^[1,2]。金纳多(ginaton)注射液是第 4 代银杏叶提取物 EGB761,具有较强的抗氧化及细胞保护作用,实验研究证明,金纳多注射液通过其主要成分银杏黄酮甙结合氧化游离基而产生抗氧化和抗脂质过氧化的作用^[3,4]。硝酸甘油注射液作为一氧化氮(NO)的供体或释放剂,在体内可通过代谢释放出 NO,具有改善心肌缺血、抗血小板凝聚及阻碍中性粒细胞与血管内皮细胞黏附的作用,在抗心肌缺血方面起到了重要的作用。本研究中试图通过药理预适应作用来观察金纳多和硝酸甘油注射液对心肌缺血/再灌注后 HSP70 的诱导作用,进一步探讨其心肌保护作用的机制。

1 材料和方法

1.1 心肌缺血/再灌注模型制备:参照文献[5]方法:用质量分数为 20%的乌拉坦注射液 5 ml/kg 耳缘静脉缓慢注射麻醉动物;气管插管连接小动物呼吸机备用(如不损伤胸膜,可不必启动);取胸骨正中切口,局部用质量分数为 1%的利多卡因注射液麻醉,逐层开胸暴露心脏;确定冠状动脉(冠脉)左室支,在其中点位置结扎,30 min 后再通;各组再灌注时间均为 3 h;实验过程中应用心电图机监测肢体 I 导联的动态变化,以冠脉结扎前后 ST 段及 T 波的动态变化及缺血后心肌颜色变化为标准判断模型是否建立成功。

1.2 实验动物分组与处理:选取新西兰大耳白兔 20 只,雌雄不拘,体重 2.5~3.0 kg,由中国医科大学实验动物中心提供。按随机数字表法分为 4 组,每组 5 只。①假手术组 5 只:麻醉开胸后选冠脉左室 1 支,穿线但不结扎。②生理盐水组:缺血前 0.5 h 经耳缘静脉滴注生理盐水,速度 0.5 ml/min。③金纳多组:缺血前 0.5 h 给予金纳多注射液 50 mg/kg 加至生理盐水 250 ml 中耳缘静脉滴注,滴注速度为 $0.55 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 。④硝酸甘油组:缺血前 0.5 h 给予硝酸甘油注射液 1.25 mg 加生理盐水 250 ml,以 $1 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 耳缘静脉滴注。

1.3 观察指标及检测方法

1.3.1 血清 NO、丙二醛(MDA)含量和总超氧化物歧化酶(T-SOD)、肌酸激酶(CK)活性检测:实验结束后立即经左心房取动脉血 5 ml,3 000 r/min (离心半径 10 cm)离心 5 min,取血清备用。采用硝酸还原酶法测定 NO 含量;硫代巴比妥酸(TBA)法测定 MDA 含量;黄嘌呤氧化酶法(羟胺法)测定 T-SOD 活性;化学比色法测定 CK 活性。试剂均为南京建成生物公司生产。

1.3.2 心肌组织 HSP70 表达:采用蛋白质免疫印迹法(Western blot)检测 HSP70。分别取缺血和非缺血区全层心肌组织 2 mm×3 mm×4 mm 各 2 块(假手术组取相对应缺血和非缺血区心肌),制成匀浆后 30 000 r/min(离心半径 5 cm)离心 5 min,取上清,用酚试剂法进行蛋白质定量(Sigma 蛋白质分析试剂盒),煮沸 5 min;样品加入质量分数为 4%的十二烷基硫酸钠(SDS)-聚丙烯酰胺凝胶中电泳,将蛋白质从 SDS-聚丙烯酰胺凝胶转移至硝酸纤维素滤膜上,在质量分数为 5%的脱脂奶粉磷酸缓冲液中过夜封闭,加入一抗(兔抗 HSP70 抗体博士德公司),置 37℃水浴摇床温育 2 h,再将二抗(羊抗兔 HSP70 抗体,北京中山公司)与硝酸纤维素滤膜温浴 1 h,利用电泳凝胶成像分析系统对图像进行分析,Fluorchen 2.0 软件处理数据,进行半定量分析,结果以密度扫描值(IDV)表示。

1.4 统计学分析:数据采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,SPSS 10.0 统计软件对数据进行完全随机两总体均数 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 心肌组织 HSP70 表达(图 1,表 1):假手术组极少表达;生理盐水组表达明显,缺血区和非缺血区 HSP70 表达分别是假手术组的 2.5 和 2.1 倍;金纳多组缺血区和非缺血区 HSP70 表达明显增加,分别是假手术组的 17.6 和 20.7 倍,硝酸甘油组缺血区和非缺血区 HSP70 表达分别是假手术组的 28.1 和 29.1 倍。各组缺血区表达明显多于非缺血区,差异具有显著性。

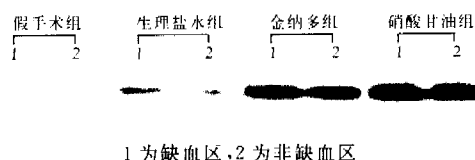


图 1 Western blot 检测各组心肌组织 HSP70 表达
Figure 1 Protein expression of HSP70 in myocardium in each group by Western blot

通讯作者:胡健(1984-),男,教授,博士研究生导师,主任医师
(Email:hujian913@medmail.com.cn)

作者简介:安立敏(1967-),女(汉族),辽宁沈阳人,医学硕士,副主任医师,主要从事心血管病介入及临床工作,已发表论文 10 余篇
(Email:anlimin123@eyou.com 或 anlimin3@sina.com)。

表 1 各组心肌组织 HSP70 表达的

半定量结果($\bar{x} \pm s, n=5$)Table 1 Semi-quantitative detection of HSP70 in myocardium in each group($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	缺血区	非缺血区
假手术组	28.12 $\pm$ 0.73	23.42 $\pm$ 0.54**
生理盐水组	69.92 $\pm$ 1.19	49.41 $\pm$ 0.77**
金纳多组	494.29 $\pm$ 4.68	484.47 $\pm$ 5.20*
硝酸甘油组	790.92 $\pm$ 17.80	682.06 $\pm$ 10.72**

注:与缺血区比较:* $P<0.05$,** $P<0.01$

2.2 血清 T-SOD 活性变化(表 2):生理盐水组、金纳多组和硝酸甘油组血清 T-SOD 活性均较假手术组明显降低,金纳多组和硝酸甘油组均较生理盐水组明显增高,而硝酸甘油组明显高于金纳多组,差异均有显著性(P 均 <0.01)。

2.3 血清 MDA 含量变化(表 2):与假手术组比较,生理盐水组 MDA 含量明显增高($P<0.01$),金纳多组和硝酸甘油组无明显变化;金纳多组和硝酸甘油组血清 MDA 含量较生理盐水组均明显降低(P 均 <0.01),但两组间比较差异无显著性。

2.4 血清 CK 活性变化(表 2):与假手术组比较,生理盐水组和硝酸甘油组血清 CK 活性均明显增高(P 均 <0.01),而金纳多组无明显变化;金纳多组和硝酸甘油组血清 CK 活性较生理盐水组均明显降低(P 均 <0.01);且硝酸甘油组明显高于金纳多组($P<0.01$)。

2.5 血清 NO 含量变化(表 2):与假手术组比较,硝酸甘油组血清 NO 含量明显增高($P<0.01$),其余两组均无明显变化;金纳多组和硝酸甘油组均明显高于生理盐水组($P<0.05$ 和 $P<0.01$),且硝酸甘油组明显高于金纳多组($P<0.01$)。

3 讨论

HSP70 是在细胞内产生并发挥重要作用的一种应激性蛋白质,是机体内源性保护物质之一,其细胞保护机制可能是分子伴侣、抗氧化应激、抗凋亡及抗炎等^[6-8],其抗氧化作用是通过提高细胞膜上蛋白转运功能来减少细胞钙内流,抑制钙超载,还可以通过促进机体内源性抗氧化物触酶和氧自由基关键酶

的产生而发挥作用^[6]。HSP70 在正常情况下很少表达,但在各种应激状态下如缺血、缺氧、热休克、运动、心力衰竭、氧化应激等情况下可以大量表达。心肌缺血是机体的应激性反应之一,反复短暂的心肌缺血能诱导 HSP70 表达,对随后较长时间缺血所致的缺血/再灌注损伤起到保护作用,称为心肌缺血预适应。这种心肌保护作用分为急性期和延缓期,急性期心肌保护作用发生快而短暂,仅持续 1~2 h 左右,延缓期保护作用发生在急性期保护作用消失后约 12~24 h,可持续 2~3 d,又称为“第二窗口保护”^[9-11]。HSP70 的心肌保护作用可以改善缺血后心肌的机械功能和内皮功能,如增加心排血量、左室舒张末期压力及冠脉血流量。本实验中采用更接近于临床的在体兔心肌缺血/再灌注模型,观察到心肌缺血 30 min 后再灌注 3 h 可以诱导 HSP70 明显表达,且心肌缺血区表达明显多于非缺血区,这一现象与 Ashok 等^[12]报道的心肌局部热处理后 HSP70 表达多于非热处理区的研究结果相一致。

用外源性物质的药理作用模拟缺血预适应而产生的心肌保护作用称为药理预适应。研究发现,用参麦注射液对大鼠进行预处理可以诱导心肌 HSP70 的表达而对心肌产生保护作用^[1]。Masamichi 等^[2]在鼠心脏移植时应用 NO 释放剂 FK 注射液诱导 HSP70 表达,通过其抗凋亡作用对移植后的心肌细胞起到保护作用。本实验中采用临床常用的药物银杏叶提取物 EGB761(金纳多注射液)和 NO 释放剂(硝酸甘油注射液)对在体兔缺血心肌进行药理预适应作用,观察到二者均能明显诱导 HSP70 过量表达,并且使血清中 T-SOD 活性明显增高,MDA 和 CK 水平降低,NO 含量增高,说明缺血心肌的抗氧化能力增强,细胞损伤减轻,表明金纳多和硝酸甘油注射液急性期抗氧化和细胞保护作用与 HSP70 有关,且 HSP70 的细胞保护作用程度与其表达量有关。本研究中,虽然生理盐水组 HSP70 也有表达,但远不如金纳多组和硝酸甘油组表达量多,因此其保护作用也不如金纳多组强,这一结果与 Hutter 等^[13]的研究结果一致。金纳多诱导 HSP70 表达的机制可

表 2 各组血清 T-SOD 活性、MDA 含量、CK 活性和 NO 含量比较($\bar{x} \pm s, n=5$)Table 2 Comparison of serum T-SOD activity, MDA content, CK activity and NO content in each group($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	T-SOD(kU/L)	MDA(μ mol/L)	CK(kU/L)	NO(μ mol/L)
假手术组	422.06 $\pm$ 32.86	5.75 $\pm$ 1.72	4.74 $\pm$ 0.56	99.16 $\pm$ 39.50
生理盐水组	135.85 $\pm$ 14.33**	12.52 $\pm$ 1.70**	12.54 $\pm$ 1.10**	78.67 $\pm$ 13.04
金纳多组	316.69 $\pm$ 33.75***	7.67 $\pm$ 1.32**	5.53 $\pm$ 0.59**	110.99 $\pm$ 27.13#
硝酸甘油组	370.78 $\pm$ 12.70*** $\Delta\Delta$	6.33 $\pm$ 1.11**	7.59 $\pm$ 0.77*** $\Delta\Delta$	162.50 $\pm$ 19.48*** $\Delta\Delta$

注:与假手术组比较:** $P<0.01$;与生理盐水组比较:# $P<0.05$,** $P<0.01$;与金纳多组比较: $\Delta\Delta P<0.01$

能与蛋白激酶(PKC)-NO-HSP 途径有关^[4],因此金纳多组中血清 NO 含量增高可能与此有关。硝酸甘油可通过 NO 激活途径诱导 HSP70 表达,由 NO 而产生的变性和未折叠的蛋白质与结构型 HSP70 结合物竞争导致热休克因子-1(HSF-1)释放,激活的 HSF-1 可致 HSP70 的合成和积累增加^[14]。

近年来在研究心肌保护方面多注重于调动心脏内源性的保护机制。HSP70 是人们较为重视的内源性保护途径之一,用缺血的方法产生心肌保护作用在临床中应用不便,但是药理预适应安全且无创伤,对防治心血管病与药物研究有重要的理论和实用价值,为寻找新的心肌保护药物开辟了途径,已成为近几年来该领域研究的热点,具有广泛的应用前景。

参考文献:

- [1]王晓霞,陈志强,刘丽华.参麦注射液对大鼠心肌缺血再灌注的保护效应及其与热休克蛋白的关系[J].循环医学杂志,2002,12:11-15.
- [2]Masamichi K, Tohru T, Tsuyoshi T, et al. Prior induction of heat shock proteins by a nitric oxide donor attenuates cardiac ischemia/reperfusion injury in the rat[J]. Transplantation, 2000, 69:2530-2537.
- [3]Maitra I, Marcocci L, Droy-Lefaux M T, et al. Peroxyl radical scavenging activity of Ginkgo Biboba extract EGB761 [J]. Biochem Pharmacol, 1995, 49:1649-1655.
- [4]张煜.银杏叶提取物预防离体大鼠心肌缺血再灌注性损伤[J].中国临床药理学杂志,2000,9:163-165.
- [5]李国营,田家民,于连发,等.兔心肌缺血及缺血再灌注模型的制备[J].解剖学研究,2002,24:237-238.
- [6]袁志强,彭毅志.热休克蛋白 70 与细胞保护作用[J].国外医学临床生物化学与检验学分册,2002,23:287-288.
- [7]毛定安,杨于嘉,俞燕.热休克蛋白 70 对感染性脑水肿核转录因子-κB 及其抑制蛋白的影响[J].中国危重病急救医学,2005,17:644-646.
- [8]毛定安,虞佩兰,杨于嘉.热休克蛋白 70 对感染性脑水肿大鼠白介素和肿瘤坏死因子的影响及意义[J].中国危重病急救医学,2003,15:593-595.
- [9]饶曼人,陈修.抗心肌缺血药(药理部分)[M]//陈修,陈维洲,曾贵云.心血管药理学.第 3 版.北京:人民卫生出版社,2003:546-559.
- [10]Knowlton A A, Brecher P, Apstein C S. Rapid expression of heat shock protein in the rabbit after brief cardiac ischemia[J]. J Clin Invest, 1991, 87:139-147.
- [11]Tanaka M, Fujiwara H, Yamasaki K, et al. Ischemic preconditioning elevates cardiac stress protein but does not limit infarct size 24 or 48 hours later in rabbits[J]. Am J Physiol, 1994, 267:H1476-1482.
- [12]Ashok G, Chunjie Y, Gregory K, et al. Cardioprotection by local heating: improved myocardial salvage after ischemia and reperfusion[J]. Ann Thorac Surg, 1998, 65:1241-1247.
- [13]Hutter M M, Sievers R E, Barbosa V, et al. Heat shock protein induction in rat hearts: a direct correlation between the amount of heat shock protein induced and the degree of myocardial protection[J]. Circulation, 1994, 89:353-358.
- [14]Xu Q, Hu Y, Kleindienst R, et al. Nitric oxide induces heat shock protein 70 expression in vascular smooth muscle cells via activation of heat shock factor 1[J]. J Clin Invest, 1997, 100:1089.

(收稿日期:2005-11-08)

(本文编辑:郭方)

• 消息 •

2006 年第 14 届亚太危重病医学会议征文通知

由亚太危重病医学学会(Asia-Pacific Association of Critical Care Medicine, APACCM)主办,中国病理生理学会危重病医学专业委员会(Chinese Society of Critical Care Medicine, CSCCM)和中国科协承办的第 14 届亚太危重病医学大会,暨第 7 届全国危重病医学学术会议将于 2006 年 8 月 26—29 日在北京国际会议中心隆重召开。中国病理生理学会理事长、中国科学院院士韩启德教授任大会名誉主席。CSCCM 主任委员陈德昌教授任大会主席。本届大会将邀请欧美、亚太地区以及国内 50 余名知名学者就当今危重病医学领域热点问题作专题报告。会议主要内容涉及全身性感染、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、急性肾功能衰竭、液体复苏与组织灌注、微循环、机械通气、持续肾脏替代治疗、营养支持、神经功能评价与支持及伦理学等。大会前,中国病理生理学会危重病医学专业委员会将进行全国委员会的换届选举工作,同时还安排专题讲座、大会发言及墙报,充分展示近年来危重病医学领域的重要进展,会议还设立了优秀青年论文奖。

本次国际会议已经建立英文网站,论文摘要征集已开始,希望国内学者踊跃投稿,在本届大会上充分展示我国危重病医学工作者的风貌,并积极与会,参与新一届学会的组织建设工作,进一步推动我国危重病医学事业的蓬勃发展。

欧洲危重病医学会(ESICM)和美国危重病学会(SCCM)将于 2006 年 8 月 24—26 日举办会前培训课程,内容:①危重病入紧急事件处理培训课程;②危重病医学基础培训(FCCS);③灾难医学救治基础(FDM, SCCM)。结业时将由上述学会分别颁发相应证书。

组委会联系人:马朋林, Email: plma1019@yahoo.com; 电话: 010-66775088(办)。论文投稿联系人:李志强, Email: dubin@apaccm2006.org.cn; 电话: 010-88062211(办)。本次会议网页: http://www.apaccm2006.org.cn。

(亚太危重病医学会议组委会)