

降钙素基因相关肽在整体大鼠心肌缺血预适应中的作用及其与 ATP 敏感钾通道的关系

欧阳伟¹袁钱学贤²袁李志梁²袁傅向阳²袁王素华² 第一军医大学珠江医院¹核医学科袁心内科袁广东 广州 510282

摘要 目的 明确降钙素基因相关肽(CGRP)是否在整体大鼠心肌缺血预适应(IPC)中起作用。方法 将96只SD大鼠随机分为8组。所有动物均接受30min缺血/2h再灌注缺血预适应方案。由3次5min缺血/5min再灌注组成。30min缺血前20min静脉注射CGRP(10 μg/kg, i.v.)。预适应前30min静脉注射优降糖(1.0 mg/kg, i.v.)。首次预适应缺血前静脉注射CGRP多抗(PcAb, 5mg/kg, i.v.)。梗死大小由硝基四唑氮蓝染色判定。并以坏死区占危险区的百分比表示。血浆CGRP浓度用放射免疫法测定。结果 首次和第3次预适应缺血的血浆CGRP浓度均较对照组显著增加($P < 0.01$)。且后者增加更为明显($P < 0.01$)。IPC能明显缩小心肌梗死范围和几乎完全抑制缺血和再灌注时室性心律失常的发生。先用CGRP-PcAb能明显减弱上述作用。CGRP预适应具有IPC样心肌保护作用。但程度不及IPC。明显预适应先用GLI均能取消IPC和CGRP预适应缩小心肌梗死范围的作用。但对室性心律失常无影响。结论 CGRP在整体大鼠缺血预适应中可能起重要作用。CGRP预适应限制心肌梗死范围的作用可能由ATP敏感钾通道介导。

关键词 降钙素基因相关肽;缺血预适应;心肌保护;再灌注损伤;钾离子通道;心肌梗塞;心律失常

中图分类号 R541.4;R516 文献标识码 A 文章编号 1000-2588(2001)01-0025-04

欧阳伟¹, QIANXue-xian², LIZhi-liang², FUXiang-Yang², WANG Su-hua²
 (Departments of ¹Nuclear Medicine and ²Cardiology, Guangzhou Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510282, China)

Abstract The aim of this study was to investigate whether calcitonin gene-related peptide (CGRP) plays a role in ischemic preconditioning (IPC) in an intact rat model. Ninety-six SD rats were randomly divided into 8 groups, all of whom were subjected to 30-min regional ischemic followed by 2-h reperfusion, after preconditioning disposal. The IPC protocol consisted of 3 cycles of 5-min regional ischemia and 3 cycles of 5-min reperfusion. The preconditioning disposal for different groups were as the following: CGRP (10 μg/kg, i.v.) was given 20 min before 30-min ischemia (CGRP group); glibenclamide (GLI) was given 30 min before CGRP (GLI+CGRP group) or IPC (GLI+IPC group); CGRP polyclonal antibody (PcAb, 2.5mg/kg) was given 20 min before first ischemic insult (PcAb group). Plasma CGRP level was determined by radioimmunoassay (RIA), and the infarct size by nitrobluetetrazolium, expressed as percentage of the area at risk. Compared with control group, the mean plasma CGRP level at the end of first and especially the third ischemic insult was markedly increased in IPC group ($P < 0.01$), and obvious reduction of the infarct size and declined incidence of ventricular arrhythmia during 30-min ischemia and the subsequent 2-h reperfusion were noted. These effects, however, were attenuated by pretreatment with CGRP-PcAb. Pretreatment with CGRP also resulted in the reduction of the infarct size and inhibition of ventricular arrhythmia, only not so obvious as IPC did. GLI pretreatment completely abolished the infarct-limiting effect of CGRP or IPC, but did not affect the antiarrhythmic effects. As an endogenous myocardial protective substance, CGRP may play an important role in IPC, and its infarct-limiting effect was probably mediated by ATP-sensitive K channel.

Key words calcitonin gene-related peptide; ischemic preconditioning; cardioprotection; potassium channel; reperfusion injury; myocardial infarct; arrhythmia

自从1986年Murry等在犬缺血/再灌注模型中首先发现心肌缺血预适应(ischemic preconditioning, IPC)现象以来,已有越来越多的证据表明缺血时释放的内源性心肌保护物质如腺苷、茶酚胺、乙酰胆碱等在IPC中起重要作用,且这些物质的心肌保护作用机制与心肌中ATP敏感钾通道(ATP₁)密切相关。

有关降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)是心脏和血管感觉神经末梢释放的一种重要效应递质,在离体豚鼠心脏中,短暂缺血即可引起明显的CGRP释放,提示CGRP可能是一种内源性心肌保护物质。有研究表明,在离体大鼠模型中,CGRP预适应不仅对缺血/再灌注所致的心肌损伤具有保护作用,而且对阿霉素、皮质素-1、氧自由基或长时间心跳停搏所致的心肌损伤也具有心肌保护作用。本文旨在阐明在完整大鼠模型中

收稿日期:2000-10-25
 作者简介:欧阳伟(1963-),男,江西婺源人,1998年毕业于第一军医大学,主治医师,副主任医师,电话:2025143893

源性 CGRP 是否在心肌缺血预适应中起作用
 GRP 预适应是否能模拟缺血预适应的心肌保护作用
 GRP 预适应的心肌保护作用是否由 K_{ATP} 敏感钾通道介导

1 材料与方法

1.1 材料

健康雄性 SD 大鼠体重 250~350 g 平均 271.1±32.6 g 由第一军医大学动物中心提供 α-CGRP 由军事医学科学院基础所提供 α-CGRP 多克隆抗体 monoclonal antibody, PcAb 由第一军医大学珠江医院心内科实验室制备 α-CGRP 放射免疫试剂盒由北京东亚免疫技术研究所提供硝基四唑氮蓝 NBT 为 Serva 产品 优降糖 10% 吐温 -80 和无水酒精溶解 EvansBlue 均为 Sigma 产品 DH-140B 动物人工呼吸机为浙江医科大学医学仪器实验厂产品 LH-662 型传感器调理仪为南京隆海科技实业公司产品 NSA-III 型生理信号处理系统为海军神经生物学研究中心产品

1.2 动物模型的复制

详见参考文献 [8]。

1.3 实验分组

将 96 只 SD 大鼠随机分为 8 组 每组 12 只 对照组先行 3 次 5 min 假性缺血 / 再灌注 然后接受 30min 缺血 / 2h 再灌注 IPC 组先行 3 次 5min 缺血 / 再灌注 然后缺血 30 min 再灌注 2 h GLI+IPC 组首次缺血前 30min 静脉注射 GLI 0.3mg/kg·b.w. 其他同 IPC 组 α-CGRP 组静脉注射 CGRP 10 μg/kg·b.w. 20min 后行 30min 缺血 / 2h 再灌注 GLI+CGRP 组静脉注射 CGRP 前 30min 静脉注射 GLI 0.3mg/kg·b.w. 其他同 CGRP 组 GLI 组静脉注射 GLI 0.3mg/kg·b.w. 60min 后行 30min 缺血 / 2h 再灌注 PcAb 组首次假性缺血前 20min 注射 PcAb 2.5mg/kg·b.w. 其他同对照组 PcAb+IPC 组首次缺血前 20min 注射 PcAb 2.5mg/kg·b.w. 其他同 IPC 组

对照组 GLI+IPC GLI+CGRP 和 GLI 组在给药前持续缺血前即刻 缺血末和再灌注末分别测血糖 对照组 IPC 组和 PcAb+IPC 组首次缺血或假性缺血末及第 3 次缺血或假性缺血末抽血 用放射免疫法测血浆 CGRP 浓度

1.4 心律失常的记录和分析

用生理信号处理系统中的心电描记软件持续记录心电图 缺血前 5 min 持续缺血和再灌注时的心电变化分段 20s / 段 储存在电脑中 以后用该系统中的信号处理软件分段统计室速 室颤 室颤的发生频率 frequency 开始时间 (onset) 持续

时间 (duration) 和发生次数 (number) VF 或 VT 的诊断根据 Lambeth Conventions 所拟定的标准确定

1.5 梗死大小的测定

经 EvansBlue+NBT 双重染色 用称质量法 测量梗死大小 梗死大小用坏死区 (IS) 在危险区 AR 中所占的百分比表示

1.6 退出试验的标准

有下列情况之一的大鼠退出试验 当灌注染色后 AR 不足心脏质量的 15% 灌注结扎冠状动脉失败或未发现再灌注者 过度出血并致血压下降者 呼吸心跳停止超过 30 s 者 实验过程中血压低于 9.3kPa 或心率低于 240b/min

1.7 统计学处理

所有结果用平均值 ± 标准差 表示 两组均值的比较用非配对 t 检验 两组以上的均值比较用随机设计的方差分析 + t 检验 当 P < 0.05 时 统计学上有显著性差异

2 结果

2.1 一般情况

用 96 只大鼠完成了本实验 实验中有 17 只大鼠未满足实验的入选标准而退出研究 退出的大鼠数按最初的随机分组原则重新补上

2.2 血压和心率变化

CGRP 组和 GLI+CGRP 组静脉注射 CGRP 10min 后 平均动脉压分别较相应的基础值降低了 3.7 和 2.9kPa P < 0.01 心率分别较基础值升高了 16 和 12 次 / min 但无统计学差异 给药 20min 后 两组平均动脉压和心率均基本恢复到基础值水平 其它各组上述两参数与其相应的基础值相比均无统计学差异

2.3 血浆 CGRP 浓度变化

表 1 显示 PC 组第 1 次和第 3 次缺血末的血浆 CGRP 浓度均较对照组和 PcAb+IPC 组显著性增高 (P < 0.01) 对照组和 PcAb+IPC 组第 3 次假性缺血或缺血末的血浆 CGRP 浓度与第 1 次无明显不同 但 IPC 组第 3 次缺血末的血浆 CGRP 浓度较第 1 次显著性增高

表 1 第 1 次和第 3 次预适应缺血时的血浆 CGRP 浓度 μg/L

Group	First ischemia	Third ischemia
Control	148 ± 0*	156 ± 6
IPC	237 ± 7	377 ± 7*
PcAb+IPC	137 ± 4*	145 ± 8

CGRP: Calcitonin gene-related peptide; IPC: Ischemic preconditioning; PcAb: CGRP polyclonal antibody; * P < 0.01 vs IPC group; # P < 0.05 vs first ischemia

2.4 血糖的变化

表 2 显示对照组血糖在 4 个测定值之间均无显著性差别。GLI+IPC 组、GLI+CGRP 组和 GLI 组缺血末和再灌注末时的血糖均较相应基础值显著性降低($P < 0.01$)。

表 2 血糖结果 (mmol/L)

Group	Baseline	Pre-ischemia	End-ischemia	End-reperfusion
Control	6.8 \pm 0.0	6.9 \pm 0.8	6.9 \pm 0.3	6.5 \pm 0.8
GLI+IPC	6.5 \pm 0.7	6.1 \pm 0.8	4.1 \pm 0.4*	3.7 \pm 0.5*
GLI+CGRP	6.6 \pm 0.7	6.2 \pm 0.7	3.8 \pm 0.4*	3.4 \pm 0.5*
GLI	6.8 \pm 0.8	6.5 \pm 0.9	3.9 \pm 0.5*	3.6 \pm 0.5*

* $P < 0.01$ vs baseline. GLI: Glibenclamide

2.5 室性心律失常变化

表 3 显示 PC 几乎完全抑制了 30min 缺血和 2 h

表 3 30min 缺血和 2 h 再灌注时的室性心律失常

Group	VT+VF of 30-min ischemia				VT+VF of 2-h reperfusion			
	Frequency (%)	Onset (min)	Duration (min)	Number	Frequency (%)	Onset (min)	Duration (min)	Number
Control	100	9	135	32	100	8	24	12
IPC	4**	原	原	原	0**	原	原	原
GLI+IPC	8**	原	原	原	4**	原	原	原
PcAb+IPC	71#	12	112	25	62##	11	22	11
CGRP	46#	15	62	14	37##	25	11	5
GLI+CGRP	50#	16	66	17	50##	26	11	6
PcAb	92	9	139	31	96	8	26	11
GLI	92	9	139	34	92	8	25	14

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs PC group; VT: Ventricular tachycardia; VF: Ventricular fibrillation

表 4 梗死区大小

Group	Body Weight (g)	Heart Weight (g)	AAR (g)	IS (g)	IS/AAR (%)
Control	284 \pm 1	1.02 \pm 0.07	0.25 \pm 0.04	0.13 \pm 0.03	53 \pm 4
IPC	289 \pm 7	1.07 \pm 0.09	0.27 \pm 0.05	0.04 \pm 0.04*	16 \pm
GLI+IPC	289 \pm 8	1.07 \pm 0.09	0.29 \pm 0.04	0.14 \pm 0.04#	58 \pm 7
PcAb+IPC	289 \pm 1	1.09 \pm 0.08	0.26 \pm 0.03	0.09 \pm 0.04#	34 \pm 3#
CGRP	286 \pm 7	1.04 \pm 0.08	0.26 \pm 0.03	0.08 \pm 0.04**#	29 \pm 3**#
GLI+CGRP	289 \pm 8	1.07 \pm 0.09	0.27 \pm 0.04	0.15 \pm 0.04*	55 \pm 7*
PcAb	286 \pm 3	1.04 \pm 0.08	0.24 \pm 0.05	0.14 \pm 0.05	54 \pm 5
GLI	289 \pm 4	1.08 \pm 0.09	0.28 \pm 0.04	0.15 \pm 0.03	54 \pm 7

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs PC group; * $P < 0.01$ vs CGRP group; AAR: Area at risk; IS: Infarct size

3 讨论

要确定某种物质在心肌 IPC 中起作用,该物质至少必须具有下列三个条件:在短暂预适应缺血时,这种物质的血浆浓度是升高的;这种物质的受体拮抗剂或其特异性抗体能阻断 IPC 所致的心肌保护作用;预先用外源性这种物质能模拟 IPC 样心肌保护作用。我们的研究表明,GRP 完全具备上述三个条件。

在离体心脏模型中,已有研究发现短暂缺血可

再灌注的 VT+VF 的发生。预先用 CGRP-PcAb 均能明显减弱上述作用。但预先用 GLI 不能减弱上述作用。CGRP 预适应也能明显抑制 30min 缺血和 2 h 再灌注的 VT+VF 的发生。预先用 GLI 不能减弱其作用。CGRP 预适应还能使 30min 缺血和 2 h 再灌注 VT+VF 的开始时间延迟,持续时间缩短,发作次数减少。

2.6 梗死区大小的变化

表 4 显示,组大鼠的体质量、心脏质量和 AAR 之间均无显著性差别。PC 组的 IS 和 IS/AAR 均较对照组显著性降低。预先用 GLI 能完全逆转上述作用。预先用 CGRP-PcAb 也能部分逆转上述作用。CGRP 组的 IS 和 IS/AAR 也较对照组显著性降低,但程度均不及 IPC 组明显。预先用 GLI 能完全逆转其作用。

引起 CGRP 明显释放。预先用 CGRP 或促 CGRP 释放剂具有明显的心肌保护作用。预先用 CGRP 拮抗剂能阻断这种保护作用。我们在整体大鼠心脏模型中,也发现预适应缺血可导致血浆 CGRP 浓度明显升高。预先用 CGRP-PcAb 能中和升高的血浆 CGRP,并能明显减弱 IPC 所致的缩小心肌梗死范围和抗室性心律失常作用。我们还发现 CGRP 预适应能导致 IPC 样的心肌保护作用,但程度不及 IPC 明显。上述研究表明,GRP 的确是一种内源性心肌保护物质。

其在大鼠心肌缺血预适应中可能起重要作用。本研究还发现袁第 3 次预适应缺血时的血浆 CGRP 浓度较第 1 次增加更为明显。这提示内源性保护物质可能需积聚到一定的程度才能发挥作用。袁也解释了在大鼠模型中 1 次预适应所致心肌保护作用强度不及 3 次预适应明显的原因。遥

已有充分的证据^[1]表明袁PC 的心肌保护作用与 G 蛋白偶联受体^[2]蛋白激酶 C 和 K_{ATP} 激活密切相关。而由心肌缺血时释放的内源性保护物质 湍腺苷^[3]缓激肽^[4]乙酰胆碱等^[5]也多是上述机制发挥作用的。袁因此推测袁CGRP 也可能是通过上述机制发挥作用的。遥有研究报道^[6]袁CGRP 预适应对内皮素 -1 以及氧自由基所致心肌损伤的保护作用能被蛋白激酶 C 抑制剂所阻断。袁提示 CGRP 预适应的心肌保护作用可能与蛋白激酶 C 激活有关。遥

由于 K_{ATP} 激活在 IPC 的心肌保护作用中起重要作用。遥因此袁我们研究了 K_{ATP} 激活在 CGRP 预适应中的作用。遥本研究表明袁先用 K_{ATP} 阻断剂 GLI 能完全阻断 CGRP 预适应缩小心肌梗死范围的作用。袁但对 CGRP 预适应的抗心律失常作用无明显影响。袁提示 CGRP 预适应缩小心肌梗死范围的作用也可能是由 K_{ATP} 介导的。遥有研究证明袁激活血管平滑肌中的 K_{ATP} 是 CGRP 降压作用机制之一。袁但有一项研究表明 CGRP 并不能激活离体心房肌中的 K_{ATP}^[7]。遥因此推测 CGRP 可能是通过激活蛋白激酶 C 通路而间接激活 K_{ATP} 的。袁但确切的机制还有待于进一步的研究。遥

参考文献院

咱1] James RP. Protection of the heart by ischemia preconditioning,

mechanisms and possibilities for pharmacological exploitation [J]. Trends Pharmacol Sci, 1994,15(1):19-25.

咱2] Xiao ZS, Li YJ, Deng HW. Ischemic preconditioning mediated by calcitonin gene-related peptide in isolated rat hearts [J]. Acta Pharmacol Sini, 1996,17(5):445-8.

咱3] Yang DL, Tang YH, Li YJ, 湍. Protection of calcitonin gene-related peptide induced preconditioning against myocardial injury to adriamycin in isolated rat heart [J]. J Clin Pharm Sci, 1996,5(1):150-3.

咱4] Peng CF, Li YJ, Deng HW, 湍. The protective effects of ischemic and calcitonin gene-related peptide-induced preconditioning on myocardial injury by endothelin-1 in the isolated perfused rat heart [J]. Life Sci, 1996,59(18):1507-14.

咱5] Tao ZW, Li TJ, Deng HW. Attenuation of myocardial injury due to oxygen free radicals (OFR) by pretreatment with OFR or calcitonin gene-related peptide [J]. Acta Pharmacol Sini, 1997,18(4):312-6.

咱6] Lu EX, Peng CF, Li YJ, 湍. Calcitonin gene-related peptide-induced preconditioning improves preservation with cardioplegia [J]. Ann Thorac Surg, 1996,62(6):1748-51.

咱7] 欧阳伟, 袁学贤, 李志梁等. 降钙素基因相关肽抗血清的制备和纯化 [J]. 第一军医大学学报, 1998,18(1):649 援

咱8] Schultz JE, Yao Z, Caverio I, 湍. Dibenzamide-induced blockade of ischemic preconditioning is time dependent in intact rat heart [J]. Am J Physiol, 1997,272(6Pt2):H2607-15.

咱9] Hide EJ, Thiernemann C. Limitation of myocardial infarct size in the rabbit by ischaemic preconditioning is abolished by sodium 5-hydroxydecanoate [J]. Cardiovasc Res, 1996,31(6):941-6.

咱10] Walker MJA, Curtis MJ, Hearse DJ, 湍. The lambeth conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia, infarction, and reperfusion [J]. Cardiovasc Res, 1988,22(7):447-55.

咱11] Kim D. Calcitonin gene-related peptide activates the muscarinic-gated K⁺ current in atrial cells [J]. Pflugers Arch, 1991,418(4):338-45.

我国将参与乳癌国际研究

近日从国际乳腺癌临床治疗最新进展通报会上了解到袁中国将加入有 50 多个国家组成的国际乳腺癌临床试验协作组袁开展大规模三苯氧胺国际临床试验袁探讨三苯氧胺在乳腺癌术后辅助治疗中的疗效和最佳期限。遥

三苯氧胺是一种雌激素受体拮抗剂袁作为辅助性治疗袁可以降低乳腺癌术后患者复发的风险。遥据了解袁目前全世界已有约 100 万乳腺癌患者接受辅助性三苯氧胺治疗袁取得一定疗效袁特别是对早期乳腺癌患者减少复发袁改善长期生存率效果显著。遥但是袁患者究竟服用多长时间疗效最佳袁而不会因为服药时间不足贻误治疗袁或造成不必要的长期服用。遥一项对服用三苯氧胺 10 年人群的观察结果显示袁由于副作用引起的超额死亡率仅有 2%。遥使用三苯氧胺 3 年乳腺癌死亡率下降 90%。遥相比之下袁由上述副反应引起的危险性很小。遥英国一项最新的研究发现袁乳腺癌患者术后每日服用三苯氧胺连续 5 年袁可显著降低复发率袁提高生存率袁疗效优于只服用 2~3 年者。遥另一项研究证明袁三苯氧胺对提高患者 10 年生存率具有肯定效果。遥

目前全球每年新发现的乳腺癌患者超过 100 万袁各国科学家正联手用最科学的研究方法探明服用三苯氧胺的最佳期限。遥中国医科院肿瘤医院作为此次国际乳腺癌临床协作组中国地区协作中心袁将联合国内多家医院参与此次临床研究。遥