

[文章编号] 1000-4718(2008)12-2289-06

· 论 著 ·

钙调神经磷酸酶的抑制参与大鼠心脏 缺血后处理的保护作用*

姚树桐^{1,2}, 刘秀华^{1△}, 赵秀梅¹, 荣飞¹⁽¹⁾中国人民解放军总医院病理生理研究室, 北京 100853; ⁽²⁾泰山医学院病理生理学教研室, 山东 泰安 271000

[摘要] 目的: 研究缺血后处理(I-postC)对缺血/再灌注(I/R)大鼠心肌钙网蛋白(CRT)及其下游钙调神经磷酸酶(CaN)信号转导途径的影响,探讨I-postC保护I/R心脏的机制。方法:采用Wistar大鼠在体心脏I/R模型,检测血流动力学及血浆乳酸脱氢酶(LDH)和肌酸激酶(CK-MB)含量,以TTC法和TUNEL法分别检测心肌梗死面积和细胞凋亡,发色底物法测定心肌CaN活性,免疫印迹法检测心肌组织CaN和CRT蛋白表达。结果:CaN抑制剂环孢霉素A显著缩小I/R所致的心肌梗死面积($P < 0.05$),抑制细胞凋亡($P < 0.01$),但对心功能无明显改善($P > 0.05$);与I/R组比较,I-postC组心功能改善($P < 0.01$),心肌梗死范围缩小($P < 0.01$),LDH和CK-MB漏出减少($P < 0.01$),细胞凋亡率降低($P < 0.01$),并显著抑制I/R诱导的心肌组织CaN活性升高($P < 0.05$)及CaN和CRT表达上调($P < 0.05$),与缺血预处理组比较差异无显著,但对I/R心肌的保护作用强于单纯环孢霉素A组。结论:I-postC至少部分通过抑制CRT-CaN信号途径,减轻大鼠心肌I/R损伤。

[关键词] 缺血后处理;再灌注;钙调神经磷酸酶;钙网蛋白**[中图分类号]** R363 **[文献标识码]** A

Inhibition of calcineurin is involved in cardioprotection induced by ischemic postconditioning in rats

YAO Shu-tong^{1,2}, LIU Xiu-hua¹, ZHAO Xiu-mei¹, RONG Fei¹⁽¹⁾Department of Pathophysiology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China; ⁽²⁾Department of Pathophysiology, Taishan Medical College, Taian 271000, China. E-mail: xiuhualiu98@yahoo.com.cn

[ABSTRACT] **AIM:** To demonstrate the mechanisms underlying cardioprotection induced by ischemic postconditioning (I-postC) via studying the alteration of calreticulin (CRT)/calcineurin (CaN) signaling pathway in rat heart subjected to ischemia/reperfusion (I/R). **METHODS:** The model of myocardial I/R injury *in vivo* was made by occluding the left anterior descending artery for 45 min followed by 24 h of reperfusion in Wistar rats. Hemodynamics and activity of lactate dehydrogenase (LDH) and creatine kinase-MB (CK-MB) in plasma were measured. Myocardial infarct size was measured by 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining and cardiomyocyte apoptosis was detected using *in situ* TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL). The activity of CaN, the expressions of CaN and CRT in myocardium were detected by enzyme reaction phosphorus measurement and Western blotting analysis, respectively. **RESULTS:** Cyclosporin A, the inhibitor of CaN, limited significantly myocardial infarct size and cardiomyocyte apoptosis induced by I/R, but had no significant effect on cardiac function. I-postC ameliorated significantly the cardiac dysfunction induced by I/R. Compared with those in I/R group, the myocardial infarct size, the LDH and CK-MB activities in plasma and the cardiomyocyte apoptotic index were significantly reduced in I-postC group. In addition, I/R-induced upregulation of CaN activity, CaN and CRT expression were relieved by I-postC. No significant difference was found between I-postC and ischemic preconditioning groups. I-postC had stronger protective effect on the reperfused heart compared with cyclosporin A. **CONCLUSION:** The findings indicate that I-postC protects myocardium against I/R injury, at least in part, via inhibiting the CRT/CaN signaling pathway.

[KEY WORDS] Ischemic postconditioning; Reperfusion; Calcineurin; Calreticulin

[收稿日期] 2007-10-07 [修回日期] 2008-01-29

* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 30670822; No. 30770902); 国家自然科学基金重大国际合作资助项目 (No. 30620130111); 国家重点基础研究发展计划资助项目 (No. 2007CB512003)

△通讯作者 Tel: 010-66939763; E-mail: xiuhualiu98@yahoo.com.cn

心肌缺血/再灌注(ischemia reperfusion, I/R)损伤是冠心病、心脏手术及器官移植术中常见的一种病理过程,调动机体内源性保护机制,是减轻I/R损伤的最有效措施。20世纪80年代中期提出的缺血预处理(ischemic preconditioning, IPC)是一种对抗I/R损伤的有效内源性心脏保护形式,可以降低心脏缺血再灌注心律失常的发生率和严重程度,减少心肌梗死面积,促进心脏功能的恢复^[1]。但由于这种预处理需在缺血前施予,而在临床实践中,患者往往在出现严重缺血导致心肌梗死后就诊,使其临床应用价值受限。2003年,Zhao等^[2]提出另外一种内源性心脏保护形式-缺血后处理(ischemic postconditioning, I-postC),即在心肌缺血后持续再灌注前给予多次短暂的再灌注/缺血处理,具有缩小心肌梗死面积、改善心脏功能等与IPC相似的的心脏保护作用,但是,I-postC的心脏保护作用机制尚未完全清楚。本室前期工作发现,内质网钙结合分子伴侣钙网蛋白(calreticulin, CRT)参与I-postC的心脏保护,提示CRT介导的钙稳态调控是I-postC心脏保护机制的重要途径,但是,I-postC时CRT心脏保护的下游信号途径尚不清楚。钙调神经磷酸酶(calcineurin, CaN)是Ca²⁺/钙调素依赖性蛋白磷酸酶,通过其蛋白去磷酸化作用调节多种细胞内信号反应及细胞凋亡等过程^[3,4]。心肌缺血损伤时钙超载可激活CaN,以环孢霉素A(cyclosporine A, CsA)或他克莫司(FK506)抑制其活性,明显缩小大鼠心肌梗死面积^[5],提示抑制CaN活化可能是对抗缺血/再灌注损伤的机制之一。来自心肌肥大的研究表明,CRT调控CaN介导的心肌细胞肥大^[6],我们认为,I-postC通过CRT调控CaN信号途径,减轻大鼠心肌I/R损伤。本工作在大鼠在体心脏I/R损伤模型上,观察I-postC对CRT及其下游CaN信号途径的影响,探讨心肌I-postC减轻I/R损伤的分子机制。

材 料 和 方 法

1 药品和试剂

环孢霉素A软胶囊购自诺华制药公司;钙调素(calmodulin, CaM)、soybean trypsin inhibitor(STI)、磷酸对硝基苯酯(p-nitrophenyl phosphate, PNPP)和bovine serum albumin(BSA)购自Sigma;氯化三苯基四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC)购自上海化学试剂公司;细胞凋亡测定试剂盒购自Roche;蛋白电泳分子量(7-175 kD)标记为Bio-Rad产品,兔抗小鼠CRT多克隆抗体和CaN单克隆抗体分别购自Stressgen和Boster,兔抗人 β -actin单克隆抗体和SC-2048增强化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)试剂盒购自Santa Cruz,辣根过氧化酶标记山羊抗兔IgG购自北京中杉金桥生

物技术有限公司;其余试剂均为国产分析纯。

2 动物模型制备

清洁级健康雄性Wistar大鼠,体重(280±20)g,购自军事医学科学院实验动物中心。术前禁食12h,自由饮水,以2%戊巴比妥钠(2.3 mL/kg)腹腔注射麻醉后固定于鼠台,气管插管,连接微型动物呼吸机(浙江大学医疗器械厂生产)支持呼吸,频率50-60 beats/min,潮气量4-6 mL/次。连接SMUP-PC1型生物信号处理系统,以MFL Lab200心电软件(复旦大学医学院生理教研室研制)记录标准导联心电图。按照我室既往报道的垫扎法复制心肌I/R^[7]和I-postC^[8]模型。

3 实验分组

随机分为6组,每组8只。①假手术(sham)组:开胸后穿线但不结扎左冠状动脉前降支;②缺血/再灌注(I/R)组:球囊充盈致缺血45 min,抽空球囊行再灌注24 h结束实验;③缺血后处理(I-postC)组:缺血45 min后,再灌注30 s,缺血30 s,反复3轮,然后再灌注24 h结束实验;④CsA+I/R组:每天灌胃给予CsA 25 mg/kg,连续3 d(最后1次于术前2 h给药)后按I/R组程序操作;⑤CsA+I-postC组:每天灌胃给予CsA 25 mg/kg,连续3 d后按I-postC组程序操作;⑥缺血预处理(IPC)组:缺血5 min,再灌注5 min,反复3轮,而后按I/R组程序操作。

4 观察指标

4.1 血流动力学监测 于实验结束时,右侧颈总动脉插管经压力传感器与SMUP-PC1型生物信号处理系统相连。以MFL Lab200心功能软件记录心率(heart rate, HR)、平均动脉压(mean arterial pressure, MAP)、左心室内压最大变化速率($\pm dp/dt_{max}$)和左室舒张末压(left ventricular end-diastolic pressure, LVEDP)等血流动力学指标。

4.2 心肌缺血和梗死范围的测定 实验结束后原位结扎左冠状动脉前降支,经主动脉逆行灌注1%伊文思蓝2-3 mL,将非缺血区蓝染,显示出缺血区心肌。取出心脏,去除左右心房,置于-20℃冷冻20 min,垂直其长轴横切为5片厚约2 mm的心肌片,按顺序置入2% TTC磷酸缓冲液(pH 7.4)中,避光37℃孵育10 min,此时梗死区呈灰白色,非梗死区呈深红色,其后置于10%甲醛液中4℃固定24 h,以两块载玻片封片,随后经扫描仪扫描成图像,以Image-Pro Plus图像分析软件(Version 4.1, Media Cybernetics)测量心肌总面积、缺血面积及梗死面积,心肌缺血范围以缺血面积占心室总面积的百分比表示,梗死范围以梗死区面积占缺血区心肌面积百分比表示。

4.3 血浆心肌酶测定 经动脉插管抽取血液约5 mL,肝素抗凝,2 500 r/min离心10 min,收集血浆,液氮速冻,-20℃保存,送本院生化科以全自动生化

分析仪(日立公司)测定乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)和肌酸激酶(creatine kinase - MB, CK - MB)活性。

4.4 心肌细胞凋亡测定 于实验结束后立刻开胸,取相应缺血区(左室前壁中间段)心肌组织,制备冰冻切片。以末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记(terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP - biotin nick end labeling, TUNEL)法按试剂盒说明进行心肌组织切片细胞凋亡的原位检测。光镜下正常心肌细胞核呈蓝绿色,凋亡细胞核呈深浅不一的棕褐色。每张切片于凋亡细胞分布区域各取 5 个高倍视野,计算出平均每 100 个细胞中的凋亡细胞数,并以百分数表示作为凋亡指数(apoptotic index, AI)。

4.5 心肌组织 CaN 活性测定^[9] 取心尖部组织 200 mg,加 0.6 mL 匀浆液(50 mmol/L Tris - HCl, 0.5 mmol/L DTT, 0.2 g/L BSA, 50 mg/L STI, 5 mg/L leupeptin, 5 mg/L aprotinin, 50 mg/L PMSF, pH 7.4)制成组织匀浆。14 000 r/min 离心 15 min (4 ℃),考马斯亮蓝法测定组织蛋白含量。取上清液 20 μL,加入底物 I 液[50 mmol/L Tris - HCl(pH 7.4), 0.5 mmol/L DTT, 0.2 g/L BSA, 10 mmol/L PNPP, 2 mmol/L CaCl₂, 0.3 μmol/L CaM]或底物 II 液[50 mmol/L Tris - HCl(pH 7.4), 0.5 mmol/L DTT, 0.2 g/L BSA, 10 mmol/L PNPP, 3 mmol/L EGTA] 380 μL,30 ℃水浴 30 min,立即在分光光度计上 410 nm 读取 A 值(空白底物液调零),每样本的底物 I 液测出的 A 值与底物 II 液测出的 A 值之差代表 CaN 活力,结果以比活力(ΔA_{410 nm}/mg protein)表示。

4.6 Western blotting 分析 按本室以往报道的方法^[10]提取心肌组织总蛋白,Bradford 法蛋白定量后分装,-70 ℃保存。取上述蛋白提取液上清(含蛋白 200 μg)进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS - PAGE, 8%分离胶),将电泳分离后的蛋白质电转移至硝酸

纤维素膜上,经封闭、洗脱后分别加入 CRT(1:1 000)多克隆抗体或 CaN(1:100)单克隆抗体,室温孵育 4 h,洗膜后以相应的 II 抗室温孵育 1 h,并以兔抗人 β - actin(1:200)单克隆抗体同上操作,作为上样对照。抗原 - 抗体复合物用 ECL 法显示,暗室 X 光胶片曝光,采用 Image - Pro Plus 图像分析软件分析蛋白条带的积分光密度值(integrated absorbance, IA = 平均光密度值 × 面积),以靶蛋白 IA 值/β - actin IA 值的比值反映靶蛋白相对水平。

5 统计学处理

采用 SPSS 12.0 统计软件对实验数据进行分析,数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较应用单因素方差分析(One way - ANOVA),组间两两比较应用 *q* 检验,用 Pearson 法对 CRT 蛋白表达与 CaN 活性做相关分析。

结 果

1 I - postC 对大鼠心肌 I/R 损伤的影响

1.1 动物一般情况及血流动力学 整个实验过程 I/R 组、CsA + I/R 组和 CsA + I - postC 组分别死亡大鼠 3 只、2 只和 2 只,其它各组无大鼠死亡。除 CsA + I/R 和 CsA + I - postC 组 MAP 低于 I - postC 组外(*P* < 0.01),其它各组 MAP 无显著差异(*P* > 0.05);与 sham 组比较,I/R 组左心室收缩(+ dp/dt_{max})和舒张(- dp/dt_{max})功能均较 sham 组降低(均 *P* < 0.01),LVEDP 较 sham 组升高(*P* < 0.05);I - postC 改善 I/R 所致的左心功能下降,+ dp/dt_{max}、- dp/dt_{max}分别较 I/R 组高 58.6% 和 52.9% (*P* < 0.01),LVEDP 较 I/R 组降低 21.8% (*P* < 0.01),与 IPC 组结果相近(*P* > 0.05);CsA + I/R 组和 CsA + I - postC 组左心功能无明显改善,+ dp/dt_{max}、- dp/dt_{max}均低于 I - postC 组(均 *P* < 0.01),与 I/R 组比较无显著差异(*P* > 0.05),见表 1。

表 1 缺血后处理对大鼠血流动力学的影响

Tab 1 Effect of I - postC on hemodynamics in rats ($\bar{x} \pm s$, *n* = 8)

Group	MAP(mmHg)	HR(beat/min)	+ dp/dt _{max} (mmHg/s)	- dp/dt _{max} (mmHg/s)	LVEDP(mmHg)
Sham	122.20 ± 11.69	411.50 ± 31.83	1 766.60 ± 424.61	1 350.67 ± 286.07	31.43 ± 6.36
I/R	118.95 ± 5.23	433.36 ± 28.55	1 135.99 ± 211.02**	912.37 ± 178.38**	39.06 ± 4.26*
I - postC	118.06 ± 10.06	428.42 ± 26.33	1 802.02 ± 221.94##	1 394.92 ± 149.81##	30.56 ± 6.48##
CsA + I/R	103.98 ± 7.04###	455.07 ± 16.53	1 022.62 ± 128.24##	762.53 ± 62.65##	35.41 ± 3.94
CsA + I - postC	104.84 ± 6.92###	414.23 ± 37.79	1 086.94 ± 132.50##	812.89 ± 79.61##	31.29 ± 7.49#
IPC	122.23 ± 9.21	448.66 ± 21.55	1 356.96 ± 239.13###	1 126.72 ± 262.52###	33.48 ± 6.63#

* *P* < 0.05, ** *P* < 0.01 vs sham group; # *P* < 0.05, ## *P* < 0.01 vs I/R group; ### *P* < 0.01 vs I - postC group. I/R: ischemia reperfusion; I - postC: ischemic postconditioning; IPC: ischemic preconditioning; CsA: cyclosporine A.

1.2 I - postC 对大鼠心肌梗死面积的影响 TTC 染色结果显示,sham 组大鼠心肌无缺血,其余各组心肌缺血范围均在 57% - 69% 之间,差异无显著(*P* >

0.05)。I/R 组梗死区/缺血区面积百分比为(25.0 ± 10.4)%,I - postC 组明显缩小 I/R 引起的心肌梗死面积,其梗死区/缺血区面积为(12.1 ± 3.2)%,较

I/R 组低 51.6% ($P < 0.01$)。CaN 抑制剂 CsA 明显缩小心肌梗死面积, CsA + I/R 组梗死区/缺血区面积为 $(14.0 \pm 7.5)\%$, 较 I/R 组低 44.4% ($P < 0.05$), 较 I - postC 组高 14.9%, 但后两者差异无显著 ($P > 0.05$); CsA 与 I - postC 联合应用, 梗死区/缺血区面积为 $(12.8 \pm 4.9)\%$, 较 I/R 组明显降低 ($P < 0.05$), 但与 I - postC 组和 CsA + I/R 组三者比较差异无显著 ($P > 0.05$)。I - postC 组与 IPC 组 $[(6.9 \pm 1.4)\%]$ 比较无显著差异 ($P > 0.05$), 见图 1。

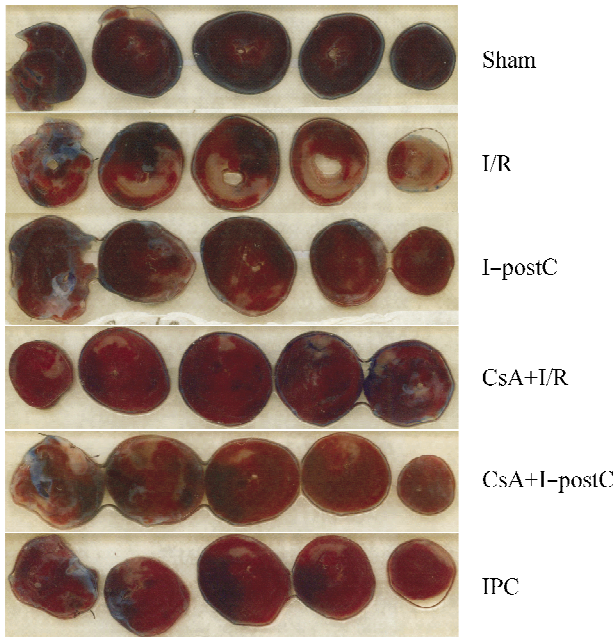


Fig 1 Effect of I - postC on myocardial infarct size in rats. I/R; ischemia reperfusion; I - postC; ischemic postconditioning; IPC; ischemic preconditioning; CsA; cyclosporine A.
图 1 I - postC 对大鼠心肌梗死面积的影响

1.3 I - postC 对血浆 LDH 和 CK - MB 活性的影响

I/R 组血浆 LDH、CK - MB 活性均较 sham 组显著升高, 分别为 sham 组的 2.0 和 1.5 倍 (均 $P < 0.01$)。I - postC 明显减少 I/R 所致心肌 LDH 和 CK - MB 漏出, 其血浆 LDH 和 CK - MB 活性分别较 I/R 组低 37.6% 和 34.3% (均 $P < 0.01$)。应用 CsA 后, CsA + I/R 组和 CsA + I - postC 组血浆 LDH 和 CK - MB 活性均较 I/R 降低 ($P < 0.05$), 与 I - postC 组三者比较差异无显著 ($P > 0.05$), 见图 2。

1.4 I - postC 对心肌细胞凋亡指数的影响 Sham 组 AI 为 $(2.7 \pm 0.9)\%$, I/R 导致细胞凋亡显著增加, AI 为 sham 组的 7.9 倍 ($P < 0.01$)。I - postC 可显著减轻细胞凋亡, AI 较 I/R 组降低 74.3% ($P < 0.01$)。CsA + I/R 组 AI 较 I/R 组明显降低 ($P < 0.01$), 但较 I - postC 组高 94.5% ($P < 0.01$); CsA + I - postC 组 AI 较 I/R 组和 CsA + I/R 组均明显降低 ($P < 0.01$), 但与 I - postC 组比较差异无显著 ($P >$

0.05)。I - postC 组与 IPC 组比较无显著差异 ($P > 0.05$), 见图 3。

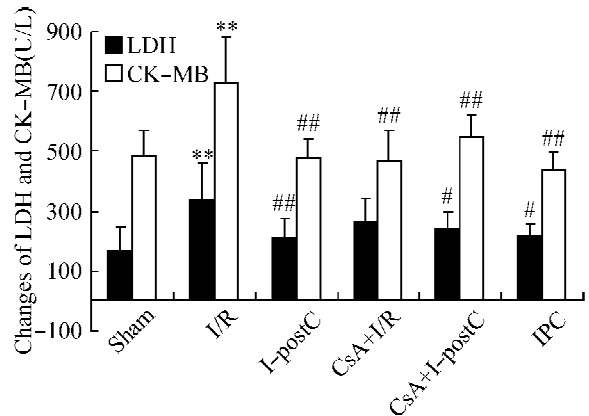


Fig 2 Effect of I - postC on the activity of LDH and CK - MB in plasma. $\bar{x} \pm s$. $n = 6$. ** $P < 0.01$ vs sham group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs I/R group.

图 2 I - postC 对血浆 LDH 和 CK - MB 活性的影响

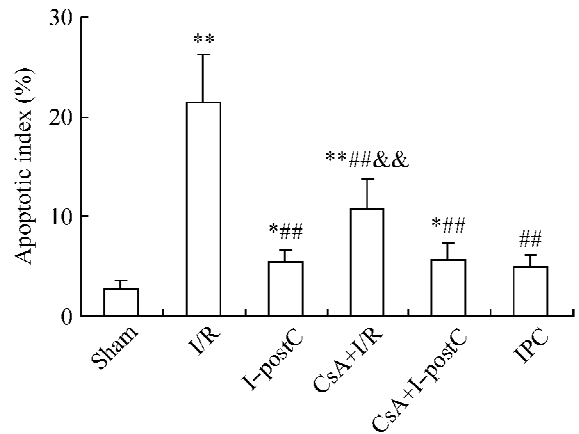


Fig 3 Effect of I - postC on cardiomyocyte apoptotic index. $\bar{x} \pm s$. $n = 8$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs sham group; ## $P < 0.01$ vs I/R group; && $P < 0.01$ vs I - postC group.

图 3 I - postC 对大鼠心肌细胞凋亡指数的影响

2 I - postC 对心肌组织 CaN 活性的影响

I/R 组心肌组织 CaN 活性显著升高, 为 sham 组的 1.5 倍 ($P < 0.01$)。I - postC 明显抑制 I/R 所致的 CaN 活性升高, 较 I/R 组降低 28.3% ($P < 0.05$)。CsA 显著抑制 CaN 活性, CsA + I/R 组和 CsA + I - postC 组均较 I/R 组 CaN 活性降低 ($P < 0.05$), 但与 I - postC 组三者比较差异无显著 ($P > 0.05$)。I - postC 组与 IPC 组比较无显著差异 ($P > 0.05$), 见图 4。

3 I - postC 对心肌组织 CRT 和 CaN 表达的影响

采用 CRT、CaN 特异性抗体进行免疫印迹检测, 以 β - actin 校准后的蛋白条带 IA 值分别反映 CRT、CaN 蛋白的相对含量。结果显示 (图 5): sham 组有 CRT 和 CaN 基础表达, I/R 诱导 CRT 和 CaN 表达明显增多, 其相对蛋白含量分别为 sham 组的 2.0 倍和 1.7 倍 ($P < 0.05$); I - postC 则明显抑制 I/R 所致的 CRT 和 CaN 表达升高, 分别较 I/R 组低 30.4% 和

32.0% ($P < 0.05$);应用 CsA 后,CRT 和 CaN 表达量均下调,CsA + I/R 组 CRT 表达较 I/R 组低 25.5%,但无显著差异($P > 0.05$),CaN 表达较 I/R 组降低($P < 0.05$),与 I - postC 组比较差异无显著($P > 0.05$);CsA + I - postC 组 CRT 和 CaN 表达均较 I/R 组明显降低($P < 0.05$),但与 I - postC 组比较差异无显著($P > 0.05$)。I - postC 组与 IPC 组比较无显著差异($P > 0.05$)。

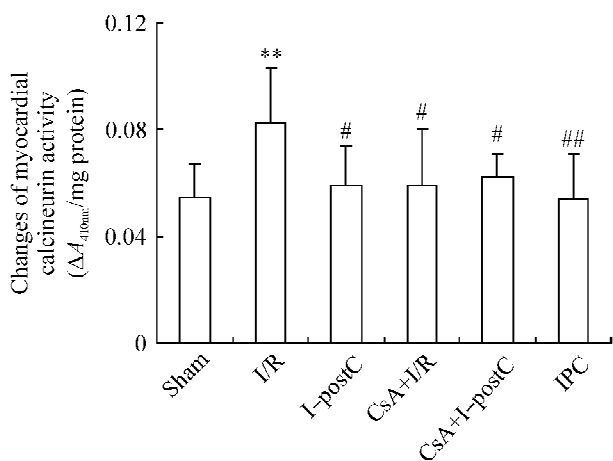


Fig 4 Effect of I - postC on myocardial CaN activity in rats. $\bar{x} \pm s$. $n = 6$. ** $P < 0.01$ vs sham group; # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$ vs I/R group.

图 4 I - postC 对大鼠心肌 CaN 活性的影响

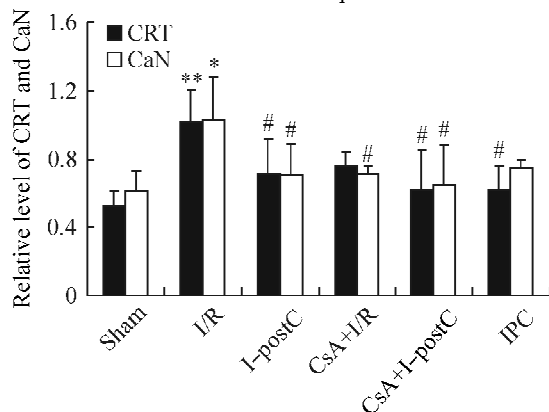
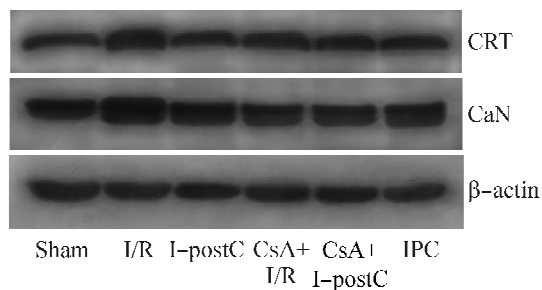


Fig 5 Effect of I - postC on myocardial CRT and CaN expression induced by I/R in rats. $\bar{x} \pm s$. $n = 4$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs sham group; # $P < 0.05$ vs I/R group.

图 5 I - postC 对 I/R 诱导大鼠心肌 CRT 和 CaN 表达的影响

讨 论

近年来随着临床冠脉内溶栓术、经皮冠脉腔内

血管成形术及冠脉搭桥术等治疗方法的广泛应用,心肌再灌注损伤愈来愈引起人们的重视。由于冠心病患者已经发生心肌缺血,针对已缺血心肌设法减轻再灌注损伤,无疑具有重要的临床意义。近年来发现的可以在缺血后实施的 I - postC 具有缩小心肌梗死面积、保护冠状动脉内皮、改善心脏功能等心脏保护作用,具有良好的临床应用前景^[2]。本工作在健康雄性 Wistar 大鼠在体心脏 I/R 模型上证实,于缺血后再灌注前实施的反复 3 轮再灌注/缺血 (30 s/30 s) 的 I - postC 明显减轻缺血 45 min 再灌注 24 h 所致的心肌损伤,表现为心肌梗死面积缩小,血浆 LDH 和 CK - MB 漏出减少,心肌细胞凋亡率降低,心泵功能改善,与 IPC 有相似的保护作用,表明 I - postC 具有减轻再灌注所致心肌坏死、凋亡和心功能障碍的心脏保护作用,与文献^[1]报道一致。

I - postC 的细胞保护机制涉及钙稳态调节及细胞凋亡抑制。CRT 是内质网 (endoplasmic reticulum, ER) 内常驻分子伴侣,协助蛋白质正确折叠及转运^[12],同时还是 ER 内重要的钙结合蛋白,参与细胞内钙稳态的调控,包括 ER 钙的储存、释放等^[13]。近年来发现,CRT 在氧化应激中参与细胞凋亡调控,CRT 过表达促进大鼠 H9c2 型心肌细胞内质网 Ca^{2+} 释放及细胞外 Ca^{2+} 内流,加重胞浆钙超载,增加细胞对 H_2O_2 诱导氧化应激致凋亡的敏感性^[14]。课题组在乳鼠心肌细胞缺氧/复氧模型上证实,I - postC 抑制缺氧/复氧所致的 CRT 过表达,降低细胞凋亡率^[15],提示抑制 CRT 过表达可能是 I - postC 心脏保护机制之一。本实验结果显示,I/R 诱导 CRT 表达明显增多,于缺血后再灌注前实施 I - postC 则明显抑制 I/R 所致的 CRT 表达上调,提示 I - postC 抑制 CRT 过表达,减轻心肌细胞凋亡。

I - postC 抑制 CRT 过表达、减轻心肌细胞凋亡的下游信号通路尚不清楚,研究显示 CaN 是 CRT 的下游信号分子^[16]。CaN 为丝/苏氨酸蛋白磷酸酶家族成员,是目前所知的唯一依赖于 Ca^{2+} /CaM 的蛋白磷酸酶,由催化亚单位 CnA 及调节亚单位 CnB 组成。CaN 是钙依赖信号途径的中心环节,当胞浆内钙增高时可被激活,发挥蛋白去磷酸化作用,参与多种细胞内信号反应及细胞凋亡等过程^[3]。近年来发现,CaN 在组织细胞氧化应激和缺血/再灌注损伤中具有重要作用。研究显示,CaN 可引起细胞死亡的 Bcl - 2 拮抗剂 (Bcl - 2 - antagonist of cell death, BAD) 去磷酸化并从胞浆转位到线粒体中,引起细胞色素 C 的大量释放,诱发细胞凋亡^[17],提示抑制 CaN 活化可能与 I/R 心肌保护有关。Ikeda 等^[5]与 Nathan 等^[18]分别在大鼠心脏和脑 I/R 模型上证实,缺血和再灌注均可导致 CaN 活性增强,以 CsA 抑制其活性则明显减轻心肌和脑的 I/R 损伤。但 CsA 是

否能够改善 I/R 心脏功能还存在争议, Laudi 等^[19]报道, CsA 虽可显著缩小缺血 30 min 再灌注 24 h 所致的大鼠心肌梗死面积, 但对心功能无改善作用。在本实验中也发现了类似现象, CsA 虽可明显缩小心肌梗死面积、抑制心肌细胞凋亡, 但对心功能无明显改善, 甚至消除了 I - postC 改善心功能的作用, 其机制尚不清楚。Arnaudeau 等^[20]报道人类胚胎肾细胞中过表达 CRT, 通过增加胞浆游离钙而激活 CaN, 增加细胞凋亡敏感性, 提示 CRT 通过调控 CaN 参与细胞凋亡过程。本实验证实, I/R 显著诱导 CaN 蛋白表达上调和活性增加, CaN 活性与 CRT 表达呈正相关($r=0.64, P<0.01$); 应用 CsA 后, 可抑制 I/R 诱导的 CaN 表达上调和活性增加, 其对 CaN 表达的抑制可能与心肌细胞 I/R 损伤减轻后反馈抑制有关。I - postC 和 IPC 显著抑制 I/R 诱导的 CaN 表达上调和活性增加, 且其抑制程度与 CsA 相似。本工作还发现, I - postC 对 45min 缺血/24 h 再灌注所致的心肌梗死面积和细胞凋亡的抑制程度强于单纯应用 CsA, 而联合给予 I - postC 和 CsA 处理对 I/R 心肌的保护作用不比单独 I - postC 处理强, 提示 I - postC 至少部分通过抑制 CaN 介导的细胞凋亡减轻心肌 I/R 损伤。

本研究发现, I - postC 显著减轻大鼠心肌 I/R 损伤, 其保护作用与 IPC 相似, I - postC 抑制 I/R 诱导的 CRT 过表达, 与 CaN 活性正相关, 且其对 I/R 心肌保护作用强于单纯应用 CsA, 提示 I - postC 至少部分通过抑制 CRT - CaN 途径, 减轻大鼠心肌 I/R 损伤; CRT 调控 CaN 参与 I - postC 心脏保护的分子机制正在研究中。

[参 考 文 献]

[1] Murry CE, Jennings RB, Reimer KA, et al. Preconditioning with ischemia: A delay of lethal cell injury in ischemic myocardium [J]. *Circulation*, 1986, 74(5): 1124 - 1136.

[2] Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, 285(2): H579 - H588.

[3] Wu HY, Tomizawa K, Oda Y, et al. Critical role of calpain - mediated cleavage of calcineurin in excitotoxic neurodegeneration [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(6): 4929 - 4940.

[4] 陈金星, 惠汝太, 张 芊, 等. 卡托普利对高血压心脏钙调蛋白磷酸酶与核因子 κ Bp65 蛋白表达的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2007, 23(1): 40 - 43.

[5] Ikeda Y, Miura T, Sakamoto J, et al. Activation of ERK and suppression of calcineurin are interacting mechanisms

of cardioprotection afforded by delta - opioid receptor activation [J]. *Basic Res Cardiol*, 2006, 101(5): 418 - 426.

[6] Lynch J, Guo L, Gelebart P, et al. Calreticulin signals upstream of calcineurin and MEF2C in a critical Ca^{2+} - dependent signaling cascade [J]. *J Cell Biol*, 2005, 170(1): 37 - 47.

[7] 赵秀梅, 孙 胜, 刘秀华. 垫扎球囊法复制大鼠在体心肌缺血/再灌注模型 [J]. *中国微循环*, 2007, 11(3): 206 - 208.

[8] 孙 胜, 赵秀梅, 刘秀华. 大鼠在体心脏缺血后处理模型的建立与优化 [J]. *中国微循环*, 2007, 11(6): 401 - 403.

[9] Shirotani T, Shima K, Iwata M, et al. Calcium accumulation following middle cerebral artery occlusion in stroke - prone spontaneously hypertensive rats [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1994, 14(5): 831 - 836.

[10] Liu XH, Wu XD, Han Y, et al. Signal pathway of cardioprotection induced by monophosphoryl lipid A in rabbit myocardium [J]. *Pathophysiology*, 2002, 8(3): 193 - 196.

[11] Vinten - Johansen J, Zhao ZQ, Jiang R, et al. Myocardial protection in reperfusion with postconditioning [J]. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2005, 3(6): 1035 - 1045.

[12] Ellgaard L, Frickel EM. Calnexin, calreticulin, and ERp57: teammates in glycoprotein folding [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2003, 39(3): 223 - 247.

[13] Michalak M, Robert Parker JM, Opas M. Ca^{2+} signaling and calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum [J]. *Cell Calcium*, 2002, 32(5 - 6): 269 - 278.

[14] Ihara Y, Urata Y, Goto S, et al. Role of calreticulin in the sensitivity of myocardial H9c2 cells to oxidative stress caused by hydrogen peroxide [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006, 290(1): C208 - C221.

[15] 祝筱梅, 刘秀华, 蔡莉蓉. 缺氧后处理对缺氧/复氧心肌细胞的保护作用及其机理研究 [J]. *中国微循环*, 2007, 11(4): 223 - 230.

[16] Lynch J, Michalak M. Calreticulin is an upstream regulator of calcineurin [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 311(4): 1173 - 1179.

[17] Wang HG, Pathan N, Ethell IM, et al. Ca^{2+} - induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD [J]. *Science*, 1999, 284(5412): 339 - 343.

[18] Nathan M, Friehs I, Choi YH, et al. Involvement of nuclear factor of activated T - cells (NFATc) in calcineurin - mediated ischemic brain damage *in vivo* [J]. *Yao Xue Xue Bao*, 2005, 40(4): 299 - 305.

[19] Laudi S, Weimann J, Haschke M, et al. Worsening of long - term myocardial function after successful pharmacological pretreatment with cyclosporine [J]. *J Physiol Pharmacol*, 2007, 58(1): 19 - 32.

[20] Arnaudeau S, Frieden M, Nakamura K, et al. Calreticulin differentially modulates calcium uptake and release in the endoplasmic reticulum and mitochondria [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(48): 46696 - 46705.