



DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2013.08.008

<http://xbyx.xysm.net/xbwk/fileup/PDF/201308804.pdf>

应激对心肌缺血预适应保护作用的影响

许华山^{1,2}, 陈胜喜², 罗万俊², 蒋海河²

(1. 郑州大学第一附属医院心血管外科, 郑州 450052; 2. 中南大学湘雅医院心胸外科, 长沙 410008)

[摘要]目的: 探讨应激反应对心肌缺血预适应保护的影响。方法: 30 只家兔随机分为 5 组: 缺血预适应组 (IPC 组)、缺血再灌注组 (IR 组)、依托咪酯组 (Etom 组)、甲基强的松龙组 (MP 组) 和假手术组 (Sham 组), 以心肌梗死面积/缺血面积、血清肌酸激酶 (CK) 活性、肌钙蛋白 I (cTnI) 浓度为检测指标, 同时检测血清皮质醇动态变化。结果: IPC 组、MP 组、IR 组、Etom 组心肌梗死面积/缺血面积分别为 (5.86±2.81)%, (11.28±3.62)%, (26.79±4.53)%, (18.19±3.72)%, CK 活性分别增加 (255±89), (314±160), (855±371), (768±404) U/L, cTnI 增高值分别为 (3.6±0.6), (6.1±2.2), (8.1±3.6), (6.4±1.6) μg/L。各指标组间比较, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$), Etom 组皮质醇反应明显钝化。结论: 钝化皮质醇反应可明显削弱 IPC 的保护作用, 甲基强的松龙有一定程度的心肌保护作用, 提示 IPC 保护作用中可能有应激反应参与。

[关键词] 缺血预适应; 皮质醇; 依托咪酯

Role of stress in myocardial protection of ischemic preconditioning

XU Huashan^{1,2}, CHEN Shengxi², LUO Wanjun², JIANG Haihe²

(1. Department of Cardiovascular Surgery, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052;

2. Department of Cardiothoracic Surgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

ABSTRACT

Objective: To determine the role of stress in myocardial protection of ischemic preconditioning (IPC).**Methods:** Thirty rabbits were randomly divided into an IPC group, an etomidate (Etom) group, an ischemic/reperfusion (IR) group, a methylprednisolone (MP) group and a sham group. The ratio of infarction size versus risk area (infarct/risk) was calculated. The elevations of the serum creatine kinase (CK) activity and cardiac troponin I (cTnI) concentrations as well as the serum cortisol concentrations were measured.**Results:** The percentages of infarct/risk in the IPC group, the MP group, the IR group, and the Etom group were (5.86±2.81)%, (11.28±3.62)%, (26.79±4.53)%, and (18.19±3.72)%, respectively. The elevations of the serum CK activity in the IPC group, the MP group, the IR group, and the Etom group were (255±89), (314±160), (855±371), and (768±404) U/L, respectively. The elevations of serum cTnI concentrations in the IPC group, the MP group, the IR group, and the Etom group were (3.6±0.6),

收稿日期 (Date of reception): 2013-02-17

作者简介 (Biography): 许华山, 博士, 副主任医师, 主要从事心血管外科的研究。

通信作者 (Corresponding author): 蒋海河, Email: lgq186snoopy@126.com

(6.1 ± 2.2), (8.1 ± 3.6), and (6.4 ± 1.6) $\mu\text{g/L}$, respectively. Those indicators among the groups were significantly different ($P < 0.05$). Cortisol reaction was markedly diminished in the Etom group.

Conclusion: A blunted cortisol reaction can markedly reduce the benefit of IPC while methylprednisolone shows cardioprotective effects, suggesting that stress might be involved in the myocardial protection of IPC.

KEY WORDS ischemic precondition; cortisol; etomidate

心肌缺血预适应对心肌起保护作用, 缺血预适应机制在预适应细胞固有保护通路起关键作用。缺血预适应发生中有两大基本因素: 全身的应激反应和细胞固有保护机制。近35年的研究多集中在细胞固有保护机制, 伴随预适应必然产生的各种程度的应激反应在心肌保护中的作用没有人分解出来。缺血预适应可能是非特异性的应激反应对心肌细胞固有保护作用的调制, 是应激反应的保护作用在细胞水平的延伸。本研究拟将应激的独立作用分离出来, 考察失去应激反应的兔缺血预适应心肌保护作用的变化。

经典的去应激的动物模型是切除小鼠的肾上腺, 其血流动力学受到很大影响; 静脉用依托咪酯6~8 h内会出现明显的肾上腺皮质抑制作用, 1~3 h内抑制最强, 进一步研究发现该作用由于依托咪酯抑制了肾上腺皮质对促肾上腺皮质释放激素(ACTH)的反应而减少皮质激素的合成, 因而有“肾上腺皮质内科切除”作用^[1-2]。本研究用依托咪酯建立去应激动物模型, 对比去应激兔的缺血预适应心肌保护指标的变化, 并进一步研究其可能的机制。

1 材料与方 法

1.1 动物与分组

日本大白兔30只, $1.5 \sim 2.5$ (2.0 ± 0.3) kg, 雌雄不拘, 由中南大学实验动物学部提供。将30只大白兔随机分为5组($n=6$): 1) 缺血预适应组(IPC组), 左冠状动脉前降支束扎5 min, 复灌10 min, 随后行30 min束扎, 复灌180 min; 2) 缺血再灌组(IR组), 直接行前降支束扎30 min后复灌180 min; 3) 依托咪酯组(Etom组), 麻醉前60 min和30 min各静脉注射一次依托咪酯(0.5 mg/kg), 麻醉后改静脉泵入 [$0.1 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{min})$], 余同IPC组操作; 4) 甲基强的松龙组(MP组), 术前30 min腹腔注射甲基强的松龙(15 mg/kg)后同IR组操作; 5) 假手术组(Sham组), 麻醉后正常开胸, 对冠状动脉不进行缺血操作, 各时间点采血查皮质醇浓度。

1.2 试剂和仪器

2, 3, 5-氯化三苯基四氮唑(TTC)和伊文氏蓝购自上海灵锦精细化工有限公司, 皮质醇放射免疫试剂盒购自北京科美东雅生物工程公司, 血清肌钙蛋白I(cTnI)放射免疫试剂盒和心肌肌酸激酶(CK)试剂盒购自天津九鼎医学生物工程公司。

1.3 手术过程

大白兔术前1 d用脱毛剂脱毛备皮, 术前腹腔注射10%水合氯醛(3.5 mL/kg), 约30 min后四肢张力消失, 固定。耳缘静脉抽血0.3 mL后建立静脉输液通道。游离右颈总动脉置管接血压监测仪。呼吸机调试好备用(潮气量为 10 mL/kg , 视有无破胸膜适当调整, 呼吸频率为 $60 \sim 80 \text{ min}^{-1}$, 吸呼比为 $1.25 \sim 2.5$), 碘伏消毒, 铺自制2洞孔巾。触甲状软骨下0.5 cm T形剪开气管, 置入气管插管, 接备好的动物呼吸机。自剑突至胸骨上窝剪开胸骨置牵开器暴露心脏, 剪开心包, 于前降支越过心表静脉处为标志, 过4-0无创prolene线, 而后将线穿过细胶管, 收紧可阻断冠状动脉, 松开可行复灌。180 min结束后, 重新结扎前降支, 于左房注入1%伊文氏蓝灌注染色非缺血区, 10%氯化钾右房注入使心脏迅速停搏, 立即摘取心脏置 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存。实验过程中各时间点采血, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 静置, 于实验结束后以 6000 r/min 离心5 min得血清, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存集体送检。

1.4 各组干预后指标检测

1.4.1 CK及cTnI检测

于麻醉后和再灌180 min后分别采血, 采用酶动力学分析法, 在全自动生化分析仪上(340 nm)测定CK。cTnI采用放射免疫分析法。

1.4.2 心肌梗死面积测定

心脏冷冻30 min后垂直长轴切成厚约2 mm的薄片, 用2%的TTC染色液避光温浴30 min ($37 \text{ }^\circ\text{C}$), 4%多聚甲醛固定后数码相机拍照, 以软件计量梗死区、缺血区面积, 计算梗死区/缺血区面积比。

1.4.3 缺血预适应过程中血清皮质醇变化

分别于以下时间点采血： t_{00} (麻醉前60 min 注射依托咪酯后)、 t_0 (麻醉前30 min 第2次注射依托咪酯后)、 t_1 (麻醉前)、 t_2 (预适应前)、 t_3 (预适应后)、 t_4 (扎冠状动脉30 min后)、 t_5 (复灌30 min)、 t_6 (复灌60 min)、 t_7 (复灌120 min)、 t_8 (复灌180 min后)，每次采血0.3 mL。皮质醇检测采用放射免疫分析法。

1.5 统计学处理

采用SPSS11.0统计软件完成，数据采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，多组间比较采用方差分析，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 镜下病理变化

光镜下早期梗死的病理表现为细胞水肿，肌原纤维溶解或胞浆不匀，Sham组、IPC组、MP组光镜下胞浆均匀，IR组，Etom组有肌原纤维溶解(图1)。

2.2 心肌保护指标的检测

Etom组与IPC组梗死面积/危险面积、CK升高值及cTnI升高值比较，差异有统计学意义($P<0.05$)；MP组与IPC组上述指标比较，差异无统计学意义($P>0.05$)；MP组与IR组上述指标比较，差异有统计学意义($P<0.05$)；图2，表1)。

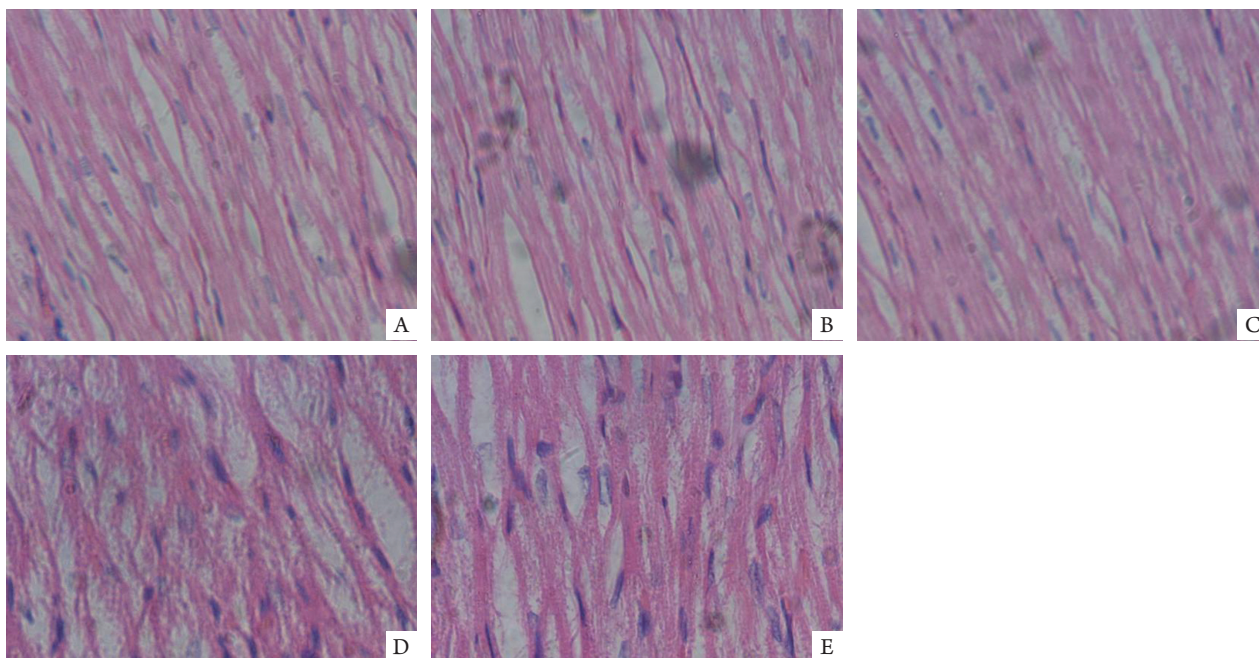


图1 复灌180 min后心肌光镜下表现(HE, $\times 400$)。A: Sham组; B: IPC组; C: MP组; D: IR组; E: Etom组。

Figure 1 Myocardial histopathology differences 180 min after the reperfusion through optical microscope (HE, $\times 400$). A: Sham group; B: IPC group; C: MP group; D: IR group; E: Etom group. A, B, C show a uniformed cytoplasm, where D, E show a pumped cell and dissolved myofibril.

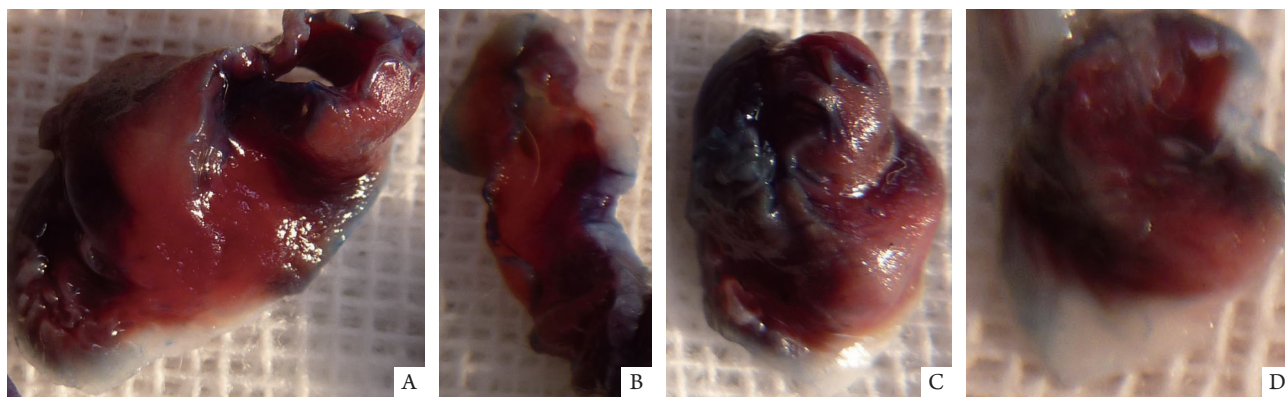


图2 TTC染色: 暗蓝的为非缺血区, 棕红为缺血区, 白色为梗死区。A: MP组; B: IPC组; C: Etom组; D: IR组。

Figure 2 TTC dyeing: non-ischemic area is dark blue, ischemic area is brown red, infarction area is white. A: MP group; B: IPC group; C: Etom group; D: IR group.

2.3 各组血清皮质醇浓度随时间变化

以冠状动脉结扎的30 min及以后的时间段来看, IPC组预先动员了皮质醇的分泌, MP组也是

提前达到了较高的浓度, Etom组在酶水平抑制了皮质醇的合成, 皮质醇反应钝化, 心肌保护作用也明显减少(图3)。

表1 各组梗死面积/危险面积, 肌酸激酶升高值、肌钙蛋白I升高值($n=6, \bar{x}\pm s$)

Table 1 Infarct/risk ratios, increase of CK and cTnI in each group ($n=6, \bar{x}\pm s$)

组别	梗死面积/危险面积/%	CK升高值/(U/L)	cTnI升高值/($\mu\text{g/L}$)
IPC组	5.86 \pm 2.81	255 \pm 89	3.6 \pm 0.6
IR组	26.79 \pm 4.53*	855 \pm 371*	8.1 \pm 3.6'
Etom组	18.19 \pm 3.72*	768 \pm 404*	6.4 \pm 1.6'
MP组	11.28 \pm 3.62 [▲]	314 \pm 160 [▲]	6.1 \pm 2.2 [▲]
Sham组	—	120 \pm 41	1.8 \pm 0.2

与IPC组比较, * $P<0.05$; 与IR组比较, [▲] $P<0.05$ 。

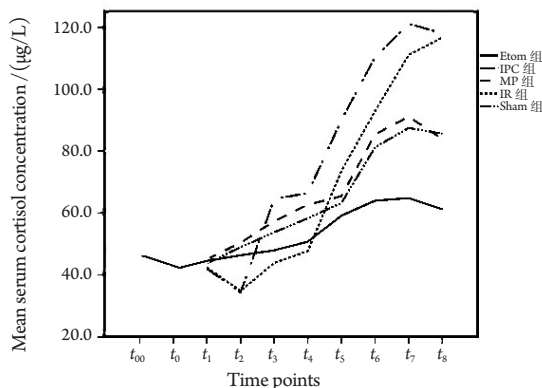


图3 各组血清皮质醇浓度随时间的变化曲线。IPC和IR组随冠状动脉的缺血复灌显示皮质醇反应, 而Etom组皮质醇反应钝化。

Figure 3 Dynamic changes of serum cortisol concentrations. IPC and IR groups show an instantly reaction through the ischemic and reperfusion process of anterior descending branch of coronary artery, where Etom group shows a blunted reaction.

3 讨论

应激是动物长期进化来的非特异性保护反应, 在机体的整体神经体液水平中起心肺动员作用, 这有利于对动物逃跑和搏斗反应的支持。去肾上腺皮质小鼠游泳试验证实小鼠应激反应对机体生存的重要性, 这种应激反应在细胞水平的作用和机制仍然是目前研究的焦点^[3-5], 伴随缺血预适应的应激反应与细胞内保护通路的联系开辟了另一个研究领域。

缺血预适应的心肌保护作用首先在狗身上发现和证实^[1], 其主要机制为细胞固有保护通路的启动, 但是伴随预适应必然启动的应激系统在预适应保护中的作用没有人提出疑问。经典的缺血预适应的心肌保护作用仅仅是预适应心肌细胞内的

固有保护通路的作用, 还是非特异性的应激反应保护作用在细胞水平的延伸? 本研究证实, 钝化了皮质醇反应(应激反应)的心肌缺血预适应的各保护指标明显降低, 提示应激反应在预适应保护中的重要作用, 推想当年的经典缺血预适应心肌保护作用可能是应激反应在细胞水平的延伸, 如果不是对心肌进行预适应缺血处理, 而是采取其他如电刺激、电离刺激、远距离伤害刺激激发应激反应, 考察心肌对缺血的耐受, 是否也可以有一定的保护作用? Glanemann等^[6-8]证实远距离伤害可以对肝脏缺血产生保护作用, 提示应激反应对肝脏缺血起保护作用; 血清皮质醇浓度是反映应激反应的可靠指标, 素有肾上腺皮质内科切除药物之称的依托咪酯能可逆性阻断皮质醇合成, 从而钝化应激反应, 试验中笔者发现应用依托咪酯后血清皮质醇浓度较IPC明显削弱, 但仍高于生理正常水平, 与Dmello等^[9]和Jung等^[10]的研究吻合; 钝化了应激反应后行IPC处理发现心肌保护各项指标明显升高($P<0.05$), 同时, 甲基强的松龙组心肌保护的指标明显下降($P<0.05$), 提示缺血预适应保护作用的实现可能与应激的主要反应成分皮质醇的参与有关。肾上腺皮质激素对器官起保护作用, Glanemann等^[6]在兔身上证实甲基强的松龙对肝脏有保护作用, 其作用甚至达到缺血预适应的程度, 并认为这种作用可能与皮质激素的膜稳定、削弱白细胞黏附和吞噬功能有关。

皮质醇是应激动员的主导激素, 它在器官组织水平的保护作用概括起来包括: 1)以血糖升高为目标的能量动员代谢, 包括糖异生、脂肪动员、蛋白分解的氨基酸动员; 2)抗炎, 降低炎性损伤; 3)糖皮质激素的允许作用, 皮质醇的升高可以使伴随应激反应产生的交感儿茶酚反应更有效率^[11]。

皮质醇在细胞水平的保护作用较为复杂, 有观点认为, 应激激发的皮质醇进入到靶细胞内和皮质醇受体(GR)结合, 皮质醇-GR复合物和靶基

因结合, 促进细胞内多种内源性保护介质的合成和释放, 使细胞产生适应性反应, 从而增强对缺血缺氧的抵抗和耐受^[12]。细胞内通路研究比较成熟的是G偶联蛋白-蛋白激酶C(PKC)-ATP敏感钾通道学说^[13-18], 皮质醇诱导的机体内源性保护介质与膜上的G偶联受体结合后激活磷酸酶C, 其产物进一步激活PKC, 而缺血预适应信号转导中PKC的激活是细胞固有保护通路的中心环节, 进一步使线粒体膜钾通道开放是其保护作用的终末效应^[19-20]。PKC的枢纽作用还表现在它也参与细胞凋亡通路的调控。PKC是保护通路的核心, 皮质醇的心肌保护作用可能始于PKC膜向迁移, 这种迁移可增加PKC与膜部G偶联蛋白的接触机会, 使PKC的激活大大的易化。以PKC为核心的预适应保护机制学说只是客观保护机制的一种可能性, 预适应保护机制可能是许多激酶参与的多条路径交织的庞大的网络系统, 皮质醇与细胞内部保护通路的联系有待进一步研究。

参考文献

- Bloomfield R, Noble DW. Etomidate, pharmacological adrenalectomy and the critically ill: a matter of vital importance[J]. *Crit Care*, 2006, 10(4): 161.
- Payen JF, Dupuis C, Trouve-Buisson T, et al. Corticosteroid after etomidate in critically ill patients: a randomized controlled trial[J]. *Crit Care Med*, 2012, 40(1): 29-35.
- Goligorsky MS. The concept of cellular "fight-or-flight" reaction to stress[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2001, 280(4): F551-561.
- Pareja M, Sanchez O, Lorita J, et al. Activated epidermal growth factor receptor (ErbB1) protects the heart against stress-induced injury in mice[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2003, 285(2): R455-462.
- Enthoven L, de Kloet ER, Oitzl MS. Effects of maternal deprivation of CD1 mice on performance in the water maze and swim stress[J]. *Behav Brain Res*, 2008, 187(1): 195-199.
- Glanemann M, Strenziok R, Kuntze R, et al. Ischemic preconditioning and methylprednisolone both equally reduce hepatic ischemia/reperfusion injury[J]. *Surgery*, 2004, 135(2): 203-214.
- Hausenloy DJ. Cardioprotection techniques: preconditioning, postconditioning and remote conditioning (basic science)[J]. *Curr Pharm Des*, 2013, 19(25): 4544-4563.
- Wang M, Shen J, Feng B, et al. Remote ischemic preconditioning promotes early liver cell proliferation in a rat model of small-for-size liver transplantation[J]. *J Surg Res*, 2013, 179(1): e245-253.
- Dmello D. Supplemental corticosteroids after intubation using etomidate in severe sepsis and septic shock[J]. *Crit Care Med*, 2012, 40(6): 2003-2004.
- Jung B, Clavieras N, Nougaret S, et al. Effects of etomidate on complications related to intubation and on mortality in septic shock patients treated with hydrocortisone: a propensity score analysis[J]. *Crit Care*, 2012, 16(6): R224.
- Wong DL, Tai TC, Wong-Fauhl DC, et al. Stress and adrenergic function: HIF1alpha, a potential regulatory switch[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2010, 30(8): 1451-1457.
- Vargas VE, Kaushal KM, Monau TR, et al. Extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) signaling pathway plays a role in cortisol secretion in the long-term hypoxic ovine fetal adrenal near term[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2013, 304(8): R636-643.
- Philip AM, Daniel Kim S, Vijayan MM. Cortisol modulates the expression of cytokines and suppressors of cytokine signaling (SOCS) in rainbow trout hepatocytes[J]. *Dev Comp Immunol*, 2012, 38(2): 360-367.
- Romero DG, Welsh BL, Gomez-Sanchez EP, et al. Angiotensin II-mediated protein kinase D activation stimulates aldosterone and cortisol secretion in H29SR human adrenocortical cells[J]. *Endocrinology*, 2006, 147(12): 6046-6055.
- Henning RJ, Li Y. Cocaine produces cardiac hypertrophy by protein kinase C dependent mechanisms[J]. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2003, 8(2): 149-160.
- Manning JR, Carpenter G, Porter DR, et al. Fibroblast growth factor-2-induced cardioprotection against myocardial infarction occurs via the interplay between nitric oxide, protein kinase signaling, and ATP-sensitive potassium channels[J]. *Growth Factors*, 2012, 30(2): 124-139.
- Makary S, Voigt N, Maguy A, et al. Differential protein kinase C isoform regulation and increased constitutive activity of acetylcholine-regulated potassium channels in atrial remodeling[J]. *Circ Res*, 2011, 109(9): 1031-1043.
- Chai Y, Zhang DM, Lin YF. Activation of cGMP-dependent protein kinase stimulates cardiac ATP-sensitive potassium channels via a ROS/calmodulin/CaMKII signaling cascade[J]. *PLoS One*, 2011, 6(3): e18191.
- Dindia L, Faught LE, Leonenko Z, et al. Rapid cortisol signaling in response to acute stress involves changes in plasma membrane order in rainbow trout liver[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2013, 304(11): E1157-1166.
- Billing AM, Fack F, Turner JD, et al. Cortisol is a potent modulator of lipopolysaccharide-induced interferon signaling in macrophages[J]. *Innate Immun*, 2011, 17(3): 302-320.

(本文编辑 彭敏宁)

本文引用: 许华山, 陈胜喜, 罗万俊, 蒋海河. 应激对心肌缺血预适应保护作用的影响 [J]. 中南大学学报: 医学版, 2013, 38(8): 804-808. DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2013.08.008

Cite this article as: XU Huashan, CHEN Shengxi, LUO Wanjun, JIANG Haihe. Role of stress in myocardial protection of ischemic preconditioning[J]. *Journal of Central South University. Medical Science*, 2013, 38(8): 804-808. DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2013.08.008