

内源性 κ - 阿片肽介导的缺血后处理心肌保护作用 *

武 敏¹ 郭海涛² 时全星² 李 娟² 师建国^{1△} 裴建明^{2△}

(1 第四军医大学基础部病理学教研室 陕西 西安 710032 2 第四军医大学基础部生理学教研室 陕西 西安 710032)

摘要 目的 研究内源性 κ - 阿片受体 (κ -OR) 的激动剂强啡肽在触发缺血后处理 (postconditioning, Postcon) 中的抗凋亡作用及潜在机制。方法 除了假手术组, SD 大鼠 (每组 6 只) 制作缺血再灌注模型, 进行了左冠状动脉前降支闭塞 30 分钟后, 再灌注 2 小时伴有或不伴有缺血后处理。在再灌注前 5 分钟静脉注射选择性 κ - 受体拮抗剂 nor-binaltorphimine (nor-BNI)。氯化三苯四染色测定心肌梗死面积。用分光光度计测定血浆中肌酸激酶 (CK)、乳酸脱氢酶 (LDH) 水平和心肌细胞凋亡蛋白酶 -3 (caspase-3) 活性。TUNEL 法检测心肌细胞凋亡。ELISA 法检测血清和心肌中强啡肽含量。结果 缺血 / 再灌注 (I/R) 组的梗死面积, caspase-3 活性, 细胞凋亡指数, CK 和 LDH 活性等明显高于假手术组 ($P<0.01$)。与 I/R 组相比, Postcon 明显减少梗死面积, caspase-3 活性, 细胞凋亡指数, CK 及 LDH 活性 ($P<0.01$)。Postcon 可使强啡肽含量显著增加 ($P<0.01$)。除强啡肽含量外, 上述所有的作用均被 nor-BNI 所阻断。结论 心脏保护和后处理的抗凋亡作用是通过激活 κ -OR, 至少部分通过增加强啡肽的水平来介导的。

关键词 后处理 凋亡 心脏 κ - 阿片受体 强啡肽

中图分类号 Q95-3 541.4 **文献标识码** A **文献编号** 1673-6273(2011)20-3809-07

Endogenous K opioid Peptide Mediated Ischemic Postconditioning for Cardioprotection*

WU Min¹, GUO Hai-tao², SHI Quan-xing², LI Juan², SHI Jian-guo^{1△}, PEI Jian-ming^{2△}

(1 Department of Pathology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032 2 Department of Physiology, National Key Discipline of Cell Biology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032)

ABSTRACT Objective: To investigate the mechanism of dynorphin, an endogenous kappa opioid receptor (κ -OR) agonist in postconditioning (Postcon). **Methods:** Sprague Dawley (SD) rats (n=6) underwent a 30-min left anterior descending occlusion followed by 2h of reperfusion with or without a Postcon stimulus. The selective κ -OR antagonist nor-binaltorphimine (Nor-BNI) was administered i.v. 5 min before reperfusion. Infarct size was determined by triphenyltetrazolium chloride staining. Blood plasma of creatine kinase (CK) and lactate dehydrogenase (LDH) and myocardial caspase-3 activity were analyzed by spectrophotometrically. Myocardial apoptosis was analyzed by detection of TUNEL. Immunoreactive dynorphin in blood serum and myocardium was measured by an antigen-competitive ELISA. **Results:** Infarction size, caspase-3 activity, apoptotic index, CK and LDH were significantly higher in ischemic/reperfusion (I/R) group than that in vehicle group ($P<0.01$). Postcon reduced infarction size, caspase-3 activity, apoptotic index, CK and LDH ($P<0.01$ vs. I/R). Dynorphin content significantly increased after Postcon ($P<0.01$). All indexes described above were abolished by Nor-BNI, with the exception of dynorphin content. **Conclusion:** Cardiac protection and anti-apoptotic effect of Postcon is mediated by activation of κ -OR. Effect of Postcon is mediated, at least partially, by enhanced dynorphin expression.

Key words: Postconditioning; Apoptosis; Heart; κ opioid receptor; Dynorphin

Chinese Library Classification (CLC): Q95-3 541.4 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273 (2011) 20-3809-07

前言

心肌再灌注早期的短循环缺血再灌注对缺血性损伤具有抵抗作用, 产生保护心脏防止梗死的作用, Zhao ZQ 等称这种心肌保护现象为“后处理”(Postcon)^[1], 后处理与缺血预处理(IPC)同样有效^[2]。临床上用于减轻心肌缺血 / 再灌注 (I / R) 损伤的保护策略往往受限于对缺血发生的预测。后处理是指在心肌缺血再灌注发生后的保护策略, 与预处理相比, 有更高的临

床适用价值, 尤其是在心肌缺血和心脏手术后。因为心肌细胞的再生能力极为有限, 所以减少在心肌缺血再灌注损伤中心肌细胞死亡显得尤为重要。除坏死之外, 心肌缺血再灌注导致的心肌细胞死亡还包括心肌细胞凋亡。凋亡是再灌注过程中心肌梗死后细胞死亡的重要组成部分^[3]。尽管凋亡与坏死相比在再灌注损伤中所占比重较小, 但凋亡是可调节的过程, 是一个很好的潜在的治疗干预靶点。后处理可限制由缺血再灌注诱导的细胞死亡如凋亡、自噬和坏死等^[4,5]。

* 基金项目 国家自然科学基金 (30971060, 30900535) 国家重大新药项目基金 (2009ZX09301-009-BD10)

作者简介 武敏 (1981), 女, 医师, 硕士研究生, 主要从事缺血性心脏病的研究。

Tel : (029) 15929551046, E-mail minmindmin@163.com

△通讯作者 裴建明, Tel : (029) 84774519, jmpei8@fmmu.edu.cn 师建国, Tel : (029) 84774464, shijq2000@yahoo.com.cn

(收稿日期 2011-04-15 接受日期 2011-05-11)

正如后处理的心肌保护机制,后处理包括促发、介导和终止作用。在后处理中经典的配体促发因子包括腺苷、缓激肽、阿片肽、促红细胞生成素和肾上腺素的激动剂^[6]。例如,G 蛋白偶联的腺苷受体在后处理与预处理一样有减少心肌梗死面积的作用。后处理通过激活阿片受体来减少心肌梗死面积^[7]。阿片肽是内源性后处理促发因子,最近研究表明在缺血前给予的阿片肽,与 G 蛋白偶联受体相互作用可以有效的减少心肌凋亡^[8]。因为后处理通过与预处理类似的途径产生心肌保护作用,激活 G 蛋白偶联受体可能是后处理产生抗凋亡效应的一个重要机制^[6]。因此,对阿片受体激活是否参与后处理的抗凋亡作用进行研究,具有重要意义。

研究表明后处理的心肌保护作用与内源性阿片受体激活相关。后处理增加了心脏的脑啡肽水平,后处理的心脏保护作用伴随着局部阿片肽对阿片受体的激活作用,因此,维持充足的脑啡肽,可能是这个过程重要组成部分^[9]。心肌细胞可以合成、储存和释放内源性阿片肽^[10],心脏有三种经典的阿片受体(μ , δ 和 κ)^[11],阿片肽是阿片受体的内源性配体,在心脏组织和分离的心肌细胞发现脑啡肽和前脑啡肽 mRNA, β -内啡肽和前阿片黑皮质素前体 mRNA 以及强啡肽原基因^[13,14,15]。受体结合实验发现 κ -阿片受体是心脏的主要阿片受体亚型^[16]。基于以上研究表明,后处理可通过阿片受体促发,而减少心肌细胞坏死,从而介导心肌保护。但是, κ -阿片受体是否促发后处理的抗凋亡作用还未见报道。因此,我们观察内源性 κ -阿片受体激动剂--强啡肽,是否促发后处理,特别是是否通过减少缺血再灌注心肌的凋亡产生心肌保护作用。

1 材料和方法

1.1 材料

成年 SD 大鼠 300 $\pm$ 50 g,由第四军医大学动物中心提供。Nor-BNI 购于 Cookson (Ellisville, MO, 美国),用之前溶于 0.85% 生理盐水中。TUNEL 测定盒购于德国 Roche 公司。Caspase-3 活性测定盒购于碧云天。大鼠强啡肽 ELISA 测定盒购于 Usen 公司分装。CK 和 LDH 活性测定盒购于南京建成。

1.2 方法

1.2.1 缺血再灌注模型制作 SD 大鼠腹腔注射戊巴比妥钠 (60 mg/kg) 麻醉,手术操作按照以前描述的方法^[17]。气管插管,连于呼吸机(江湾 I 呼吸机,第二军医大学)。动脉血压经过一个充满生理盐水导管插入股动脉持续监测 (AB-621G, 日本)。ECG 和心率经 II 导联检测。PE50 导管插入左外颈静脉建立给药途径,用压力传感器 (RM6200, Nihon Kohden, 日本) 经右颈动脉插入左心室检测左室压,所有信号输入记录系统 (RM6200, Nihon Kohden, 日本),于 4,5 肋间行左胸切开术,切开心包膜。使用 5-0 号丝线在做冠状动脉前降支下穿线,之后行冠脉阻断和再灌注,丝线一端穿入一细小 PE 管垫于血管与结扎线之间以备进行缺血再灌注 (I/R) 处理。拉紧结扎线使细小 PE 管压迫左冠状动脉而致血流阻断。稳定 15 min 后,用血管钳夹闭 PE 管,缺血 30 min,之后松开血管钳,使冠脉再灌注 2 h。凋亡和心脏酶漏在再灌注后测定。

1.2.2 实验设计 实验设计在图 1 中详细说明。除假手术组外,其他大鼠 30 分钟阻断后,再灌注 2 h 伴随或不伴后处理,在再

灌注开始行使后处理 (3 个循环的 10 sec 再灌注和 10 sec 的再阻断)。选择性 κ -OR 阻断剂 nor-BNI (2 mg/kg),在再灌注前 5 分钟自静脉给予。

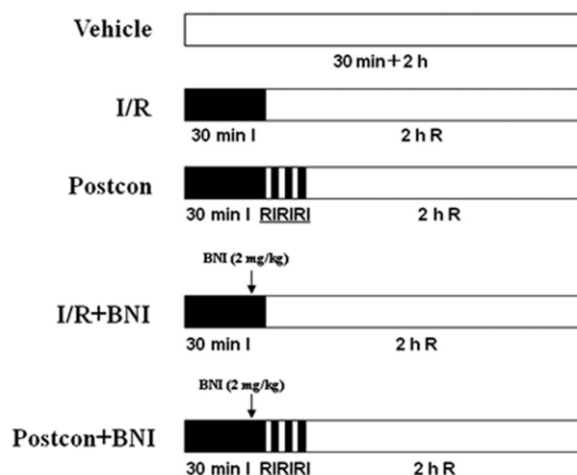


图 1 简要图例说明实验设计

Fig. 1 Schematic illustration depicting the experimental protocol.

I 缺血 R 再灌注 I/R 缺血再灌注 Postcon 后处理 BNI nor-BNI, κ -受体阻断剂

I = ischemia; R = reperfusion; I/R = ischemia/reperfusion; Postcon = Postconditioning; BNI = nor-binaltorphimine.

1.2.3 心肌梗死面积测定 心肌梗死面积测定使用 Evans 蓝和 2,3,5-氯化三苯四唑 (TTC)。简言之,再次阻断 LAD,用 1 ml 的 2% Evans 蓝溶液在再灌注 2 h 后自导管注入心脏。心脏取下,称重和 -20℃ 冻存。心脏从心尖横向切开厚度约 2 mm。心脏切片在 1% 的 TTC 溶液 (TTC 溶于磷酸盐溶液中, pH7.4, 37℃) 中孵育 15 min,之后 10% 福尔马林溶液中固定过夜。使用 CCD 相机对心脏切片进行拍照。用 Sigma 扫描对心肌梗死面积 (infarct size, IS) 进行数字测量。正常心肌被 Evans 蓝染成蓝色,而 I/R 心肌 (area at risk, AAR) 不会染成蓝色。在 AAR 内部, I/R 但有活力的心肌被 TTC 染成红棕色,在 I/R 但心肌细胞死亡即 (梗死) 不会被 TTC 染色。IS 被计算为 IS/AAR $\times$ 100%。

1.2.4 心肌酶漏测量 在再灌注末期,收集血样来测量心肌酶漏,包括 CK 和 LDH。血样离心 (3000 rpm, 10 min) 后获得血浆,分光光度计 (分光光度计 DU640, USA) 测定 CK 和 LDH 水平。

1.2.5 TUNEL 检测 心肌凋亡定量检测使用 TUNEL 试剂盒。简言之,甲醛固定左心室,石蜡包埋后横向 4 mm 切片,二甲苯梯度脱蜡,乙醇脱水。然后加入 20 l 的 TUNEL 反应混合液加到样品上,切片避光 37℃ 孵育 60 min。20 l DAPI 加入到样品中,在湿盒中室温下孵育 10 min (染细胞核)。免疫荧光显微镜 (Nikon, 日本) 拍照,计数细胞总数和凋亡阳性细胞。高倍镜下随机选取 6 个视野计算凋亡心肌细胞数。

1.2.6 Caspase-3 活性测定 按照技术说明书测定 caspase-3 蛋白酶的活性。在再灌注结束从 AAR 取心肌组织,在冰的缓冲液中进行匀浆,16000g 低温高速离心 10 min,上清悬液加入 10 μ l 的 caspase-3 酶底物 (Ac-DEVDpNA, 2 mmol/l) 37℃ 孵育 1.5 h。紫外分光光度计测定 405 nm 波长的吸光度。

1.2.7 血清和心肌中强啡肽的水平测定 每只大鼠的血清分为 3 个 100 μ l,使用前 -20℃ 保存。心肌组织去除脂肪组织和大血管后液氮中速冻,之后保存到 -80℃ 冰箱。使用前取出心肌组织在含有 1 μ g/L 蛋白酶抑制剂 (protease inhibitor, Sigma)的磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 中匀浆,低温离心机 (4℃) 上高速离心 15 min (12,000 rpm),取上清 10 μ l 用于测定其中的蛋白含量。蛋白含量的测定使用 BCA 试剂盒 (Bicinchoninic Acid Assay Kit, Pierce),其他上清吸出储存于 -80℃ 冰箱中。测定血清和心肌中强啡肽的含量前,取出血清和心肌匀浆的上清按照 ELISA 试剂盒的技术说明书进行测定。

1.3 统计分析

实验所得数据使用 ORIGIN8 软件进行分析。数据用 mean $\pm$ SD 表示。组间比较使用 t 检验,不同组间比较使用单因素方

差分析。

2 结果

2.1 血流动力学参数

表 1 显示心率 (heart rate, HR),平均动脉压 (mean arterial blood pressure, MABP),左室压 (left ventricular pressure, LVP),左室收缩功能 (+LVdp/dtmax) 和舒张功能 (-LVdp/dtmax) 在基础水平、缺血 25 min 和再灌注 2 h 等时间点的数值。HR 在各组间没有显著差异。与基础水平相比 MABP、LVP、+LVdp/dtmax 和 -LVdp/dtmax 等在缺血 25 min 后显著降低 ($P<0.01$),而在再灌注 2 h 后显著升高 ($P<0.05$),但并未恢复到基础水平。在所有组间全身血流动力学无显著差异。I/R 组和处理组也无显著差异。

图 1 血流动力学变化 (n = 6, mean $\pm$ SD)

Table 1 Hemodynamic variables during the course of the experiment (n = 6, mean $\pm$ SD).

Group	Baseline					25 min Ischemia					2 h Reperfusion				
	Heart Rate (beats/min)	MABP (mmHg)	LVP (mmHg)	+LVdp/dtmax (mmHg/s)	-LVdp/dtmax (mmHg/s)	Heart Rate (beats/min)	MABP (mmHg)	LVP (mmHg)	+LVdp/dtmax (mmHg/s)	-LVdp/dtmax (mmHg/s)	Heart Rate (beats/min)	MABP (mmHg)	LVP (mmHg)	+LVdp/dtmax (mmHg/s)	-LVdp/dtmax (mmHg/s)
Vehicle	343 $\pm$ 16	125 $\pm$ 10	138 $\pm$ 12	4540 $\pm$ 258	3990 $\pm$ 246	351 $\pm$ 20	122 $\pm$ 9	133 $\pm$ 12	4426 $\pm$ 286	3860 $\pm$ 235	347 $\pm$ 15	118 $\pm$ 8	128 $\pm$ 17	4387 $\pm$ 224	3748 $\pm$ 214
I/R	335 $\pm$ 10	124 $\pm$ 10	137 $\pm$ 13	4478 $\pm$ 246	4053 $\pm$ 232	323 $\pm$ 19	81 $\pm$ 9** #	100 $\pm$ 16** #	3192 $\pm$ 335** #	2619 $\pm$ 283** #	320 $\pm$ 17	110 $\pm$ 9* #SS	121 $\pm$ 16* #SS	3680 $\pm$ 314** #SS	3249 $\pm$ 300** #SS
Postcon	344 $\pm$ 24	124 $\pm$ 14	135 $\pm$ 18	4729 $\pm$ 366	3812 $\pm$ 349	332 $\pm$ 22	80 $\pm$ 17** #	99 $\pm$ 19** #	3216 $\pm$ 353** #	2746 $\pm$ 329** #	325 $\pm$ 24	114 $\pm$ 21* SS	122 $\pm$ 18* #SS	3929 $\pm$ 366** #SS	3412 $\pm$ 349* #S
I/R+BNI	352 $\pm$ 20	128 $\pm$ 26	136 $\pm$ 26	4658 $\pm$ 293	3982 $\pm$ 420	343 $\pm$ 25	82 $\pm$ 21** #	98 $\pm$ 15** #	3100 $\pm$ 323** #	2690 $\pm$ 364** #	328 $\pm$ 35	109 $\pm$ 18* #SS	120 $\pm$ 24* #SS	3478 $\pm$ 336** #SS	3174 $\pm$ 325** #S
Post-con+BNI	355 $\pm$ 20	124 $\pm$ 14	136 $\pm$ 15	4646 $\pm$ 325	3696 $\pm$ 336	351 $\pm$ 25	79 $\pm$ 13** #	98 $\pm$ 23** #	3165 $\pm$ 332** #	2715 $\pm$ 287** #	334 $\pm$ 26	112 $\pm$ 26* SS	119 $\pm$ 19* #SS	3636 $\pm$ 345** #SS	3277 $\pm$ 347* #S

I/R = ischemia/reperfusion; Postcon = postconditioning; BNI = nor-Binaltorphimine; HR = heart rate; MABP = mean arterial blood pressure; LVP = left ventricular pressure; +LVdp/dtmax = maximum rate rise in left ventricular pressure; ?LVdp/dtmax = maximal fall in left ventricular pressure. $P<0.05$ vs. Vehicle (*), vs. baseline (#) and vs. 25 min ischemia (\$). $P<0.01$ vs. Vehicle (**), vs. Baseline (##) and vs. 25 min ischemia (\$\$).

2.2 梗死面积

在 I/R 组心肌梗死非常显著。与 I/R 组相比,后处理可显著减少心肌梗死面积 ($P<0.01$)。该作用可完全被 nor-BNI (2 mg/kg) 所阻断 (图 2A 和图 2B)。

2.3 后处理对血浆中 CK 和 LDH 的影响

与假手术组相比,局部心肌缺血 30 min 后再灌注 2 h 可显著增加血液中 LDH 和 CK 的释放量 ($P<0.01$) (图 3A 和图 3B)。后处理显著减少 I/R 诱导的 LDH 和 CK 的释放 ($P<0.01$)。然而这一作用可被 nor-BNI (2 mg/kg) 阻断。以上数据表明后处理的心肌保护作用是通过激活 κ -OR 实现的。在后面的研究我们着重研究其参与后处理的抗凋亡作用。

2.4 后处理的抗凋亡作用

心肌凋亡使用 TUNEL 法测定 (图 4A 和图 4B)。局部心肌缺血和再灌注导致心肌细胞的凋亡显著增加 ($P<0.01$ vs. vehic-

le),后处理显示具有显著的抗凋亡作用 ($P<0.01$ vs. I/R)。这一作用可被 nor-BNI (2 mg/kg, $P<0.01$ vs. Postcon) 完全阻断。以上结果显示后处理是通过激活 κ -OR 来发挥抗凋亡作用的。

2.5 后处理对 caspase-3 活性的影响

既然 caspase-3 在 I/R 诱导的细胞凋亡中起着重要的作用,我们检测 caspase-3 是否参与后处理的抗凋亡作用。I/R 组的心肌 caspase-3 的活性与假手术组相比显著增加 ($P<0.01$),而后处理后 caspase-3 的活性显著降低 ($P<0.01$ vs. I/R)。这一作用也可被 nor-BNI 所阻断。

2.6 后处理可增加血清和大鼠心脏的强啡肽的含量

局部心肌缺血和再灌注可显著降低血清 (图 4) 和心肌 (图 5) 中的强啡肽的含量。而后处理可显著增加心肌和血清中的强啡肽的含量 ($P<0.01$ vs. I/R)。而这一作用可被 κ -OR 阻断剂 nor-BNI (2 mg/kg, $P>0.05$ vs. Postcon)所阻断。

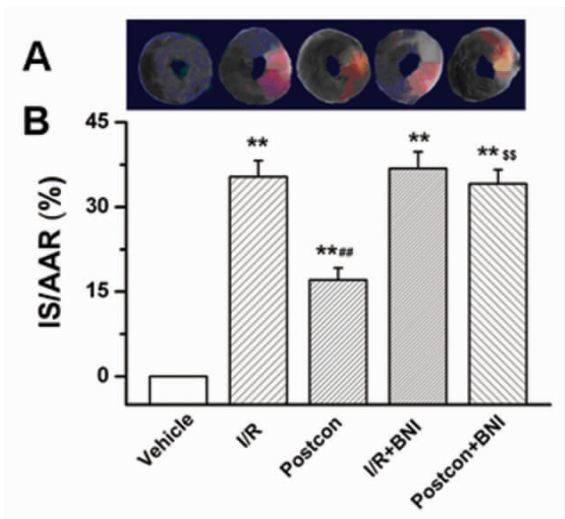


图2 后处理和 κ -OR 阻断剂对心脏 I/R 心肌梗死面积的影响 (A)心脏切片的图片;(B)心肌梗死面积 (IS) 与 I/R 心肌 (AAR) 的比值的统计。n = 6, P<0.01 vs. vehicle (**), vs. I/R (##) and vs. Postcon (\$\$)。 Vehicle = 对照 I/R = 缺血再灌注 Postcon = 后处理 BNI = nor-BNI, κ -受体阻断剂

Fig. 2 Effects of postconditioning and κ opioid receptor antagonist on infarct area in myocardial I/R rats. (A) Representative photographs of heart sections. (B) Summary of myocardial infarct size (IS) expressed as a percent of total area at risk (AAR, n = 6, mean $\pm$ SD). P<0.01 vs. vehicle (**), vs. I/R (##) and vs. postconditioning (\$\$). I/R = ischemia/reperfusion; Postcon = postconditioning; BNI = nor-binaltorphimine.

3 讨论

本研究发现后处理具有心肌保护作用。后处理的保护作用在以往的研究中,比如在大鼠^[18],兔子^[19],和人类^[20]均有报道。在阻断的冠脉再开放的第一时间,再灌注中的大部分有害作用被启动^[21]。在 Kin 等制作的大鼠模型中,作者认为 3 个 10/10 sec 的后处理循环减少肿瘤坏死因子 α 和 IL-6 与心肌 ARR 处的

凋亡细胞数减少是一致的。You L 等证明缺血后处理可减少兔子的 I/R 诱导的心肌细胞凋亡^[19]。在临床试验中,Zhao WS 等发现 3 个 60/60 sec 的后处理可显著减少血浆溶液中的 Fas/APO-1 和 Fas 的配体(心肌凋亡的代表标志)。这些有益作用与支架手术 7 天后左心室功能的提高相伴随^[20]。

腺苷、阿片肽、缓激肽和促红细胞生成素等多种内源性配体促进后处理介导的组织保护作用。新的研究证据表明在心肌再灌注时内源性的配体结合可促进后处理的保护作用。研究表明后处理与内源性腺苷受体的激活有关^[22,23]。Penna C 等认为后处理的启动涉及缓激肽的激活及其下游信号通路^[24]。在缓激肽受体基因敲除小鼠,后处理的抑制梗死的作用被削弱。后处理诱导的抑制心脏梗死的保护作用可能通过激活细胞膜多种受体如腺苷和缓激肽受体来发挥作用的^[25]。阿片肽可开放 ATP 依赖的钾离子通道^[26],对心脏产生保护作用,Chien GL 等认为激活纳洛酮异构体可阻断被麻醉的兔子的心脏的 IPC 作用^[27]。然而失活的纳洛酮异构体对 IPC 没有作用。IPC 可显著降低心肌细胞的 TUNEL 阳性表达,和抑制缺血区域的基因组 DNA 分裂。选择性 δ -OR 阻断剂,Naltrindone (NTI) 预处理可逆转 IPC 的抗凋亡作用^[8]。Zatta AJ 等认为内源性阿片肽,脑啡肽可能参与在后处理的过程中^[9]。据 Jang 等报道在在体实验中使用非选择性阿片受体阻断剂纳洛酮可阻断后处理引起的梗死减少的作用。U50,488H (选择性 κ -OR 激动剂) 在再灌注前 5 min 给予,可显著减少大鼠和小鼠心脏的梗死面积^[28]。Chen 等认为在离体大鼠 I/R 心脏由吗啡诱导后处理是通过 κ -OR 激活,而不是激活 δ -OR^[29]。因此,实验证据逐渐支持外源性给予激动剂使 κ -OR 激活在再灌注早期可发挥保护作用。本课题组早期研究发现在大鼠心脏给予 κ -OR 阻断剂可取消后处理的药理学效应^[30,31]。这些现象暗示后处理通过激活 κ -OR 可能对抗 I/R 损伤具有保护心脏作用。Wang J 等认为使用 κ -OR 阻断剂 nor-BNI 可阻断后处理诱导的心脏保护作用^[32]。但他们并没有阐明是否后处理在心肌保护中的抗凋亡作用是否是由 κ -OR

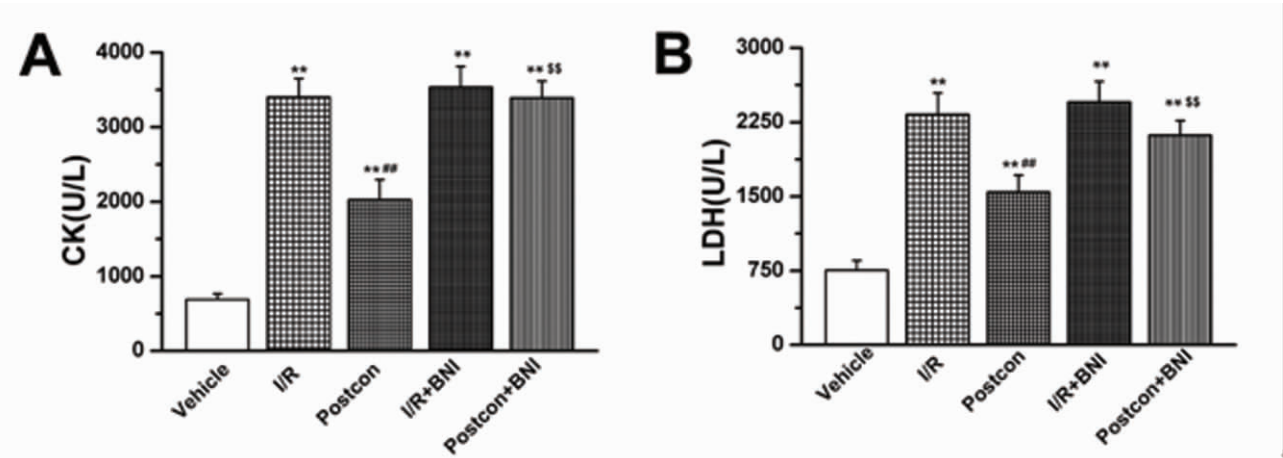


图3 后处理和 κ -OR 阻断剂对血浆 CK 和 LDH 的影响 (A) CK 的含量变化;(B) LDH 的含量变化。n = 6, P<0.01 vs. vehicle (**), vs. I/R (##) and vs. Postcon (\$\$)。 Vehicle = 对照 I/R = 缺血再灌注; Postcon = 后处理 BNI = nor-BNI, κ -受体阻断剂

Fig. 3 Effects of postconditioning and κ opioid receptor antagonist on plasma creatine kinase (CK) (A) and lactate dehydrogenase (LDH) (B) in myocardial I/R rats (n = 6, mean $\pm$ SD). P<0.01 vs. vehicle (**), vs. I/R (##) and vs. postconditioning (\$\$). I/R = ischemia/reperfusion; Postcon = postconditioning; BNI = nor-binaltorphimine.

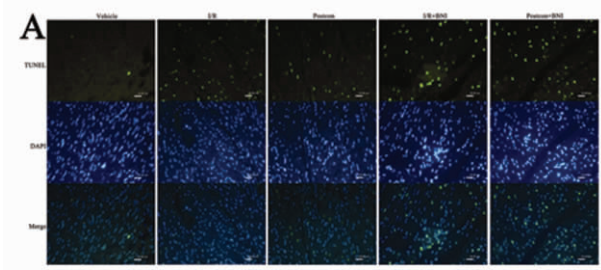


图 4A 后处理对心肌细胞凋亡的影响

TUNEL 细胞凋亡阳性 (绿色) ;DAPI 代表细胞核 (蓝色) ;merge 前两者合并 (黄色) 。Vehicle = 对照 ;I/R = 缺血再灌注 ;Postcon = 后处理 ;
BNI = nor-BNI, κ - 受体阻断剂

Fig.4A Effect of postconditioning on cardiomyocyte apoptosis. Representative apoptotic staining from six experiments. TUNEL: cardiomyocyte apoptotic staining; DAPI: nuclei staining; Merge: TUNEL staining merges with DAPI staining.

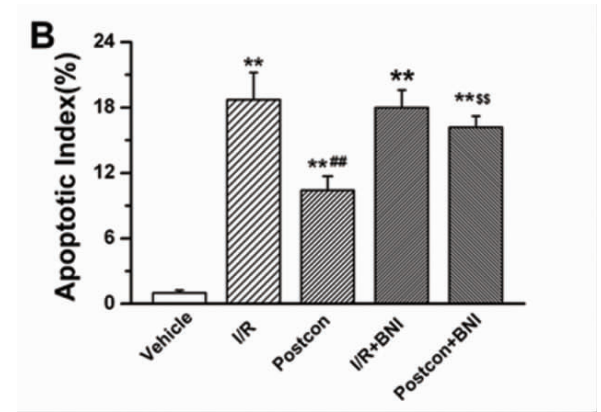


图 4B 后处理对心肌细胞凋亡的影响

对 TUNEL 的图片进行统计,图片代表各组中凋亡细胞占总细胞数的比例。P<0.01 vs. 对照 (**), vs. I/R (##) and vs. Postcon (\$\$)。Vehicle = 对照 ;I/R = 缺血再灌注 ;Postcon = 后处理 ;BNI = nor-BNI, κ - 受体阻断剂

Fig. 4B Effect of postconditioning on cardiomyocyte apoptosis. Bar chart shows the percentage of apoptotic cells as assessed by TUNEL staining in each group (n=6 in each group). Values are the mean $\pm$ SD. P<0.01 vs. vehicle (**), vs. I/R (##) and vs. postconditioning (\$\$). I/R = ischemia/reperfusion; Postcon = postconditioning; BNI = nor-binaltorphimine.

始动的。

众所周之,凋亡在 I/R 后的心肌细胞死亡中起重要的作用。在啮齿类动物模型实验中细胞凋亡在再灌注后细胞死亡中非常重要。Yaoita 等评估 caspase 抑制剂在 I/R 大鼠模型中的作用时发现 ZVAD-fmk (一种光谱的 caspase 抑制剂) 可降低 21 % 的梗死面积和减少 72 % 的细胞凋亡。而保护左心室功能可能是由于抑制了 caspase 对收缩结构的损害^[33]。本研究同样发现内源性激活 κ -OR 启动了后处理的心脏保护作用。后处理不仅显著减少心脏的坏死,同时还减少心肌的凋亡。更有趣的是抗凋亡作用可被再灌注前给予的 nor-BNI 所阻断,说明 κ -OR 的激活启动了后处理的抗凋亡作用。本课题组前期的实验发现 U50,488H 处理可减少心肌细胞的凋亡,这一作用支持本

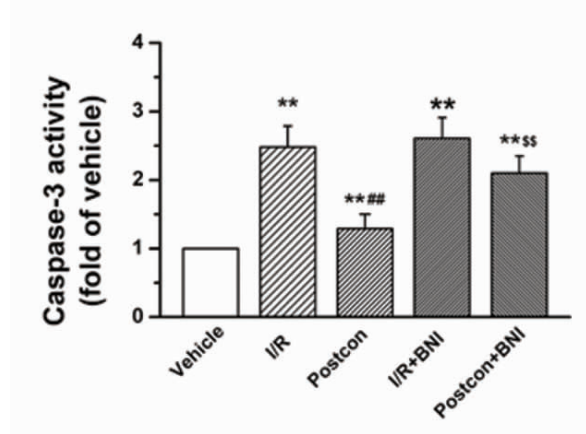


图 5 后处理对 caspase-3 活性的影响

n=6, P<0.01 vs. vehicle (**), vs. I/R (##) and vs. Postcon (\$\$). Vehicle = 对照 ;I/R = 缺血再灌注 ;Postcon = 后处理 ;BNI = nor-BNI, κ - 受体阻断剂

Fig. 5 Effect of postconditioning on caspase-3 activity. n=6 in each group, values are the mean $\pm$ SD. P<0.01 vs. vehicle (**), vs. I/R (##) and vs. postconditioning (\$\$). I/R = ischemia/reperfusion; Postcon = postconditioning; BNI = nor-binaltorphimine.

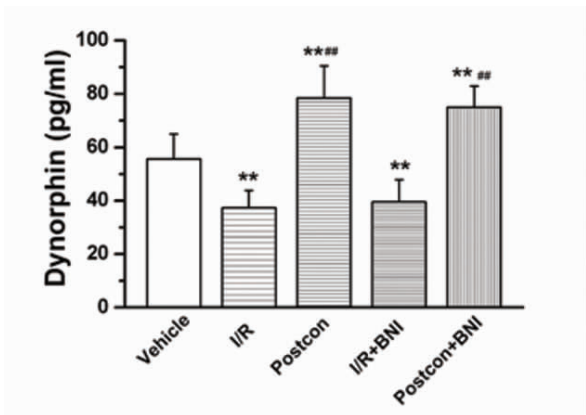


图 6 后处理对血浆中的强啡肽的影响

n=6, P<0.01 vs. Vehicle (**), vs. I/R (##)。Vehicle = 对照 ;I/R = 缺血再灌注 ;Postcon = 后处理 ;BNI = nor-BNI, κ - 受体阻断剂

Fig. 6 Effect of postconditioning on the plasma dynorphin was analyzed by an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) technique (n=6 in each group). Values are the mean $\pm$ SD. P<0.01 vs. Vehicle (**), vs. I/R (##). I/R = ischemia/reperfusion; Postcon = postconditioning; BNI = nor-binaltorphimine.

研究中 κ -OR 启动后处理的抗凋亡作用。

众所周之,caspase 是凋亡的重要分子的启动子和操纵子。Caspase-3 是 caspase 的其中之一效应子,被认为是凋亡的最终杀手。大量的研究表明心脏 I/R 能导致 caspases 包括 caspase-3 的激活^[34],且发生在心肌细胞死亡之前。我们发现后处理显著抑制 caspase-3 的活性,并且这一作用可被 nor-BNI 阻断。这些结果可为内源性激活 κ -OR 并启动后处理的抗凋亡提供进一步的证据。后处理后的长时间缺血可能改变内源性内分泌物比如腺苷和缓激肽等的产生。Kin H^[22]等表明内源性腺苷的释放参与后处理的心脏保护。而且阿片受体也参与 I/R 损伤的心脏保护作用^[35]。Romano 等^[36]发现在心脏再灌注时选择性 κ -OR 激动剂 U50,488H 可显著提高功能的恢复,而 nor-BNI

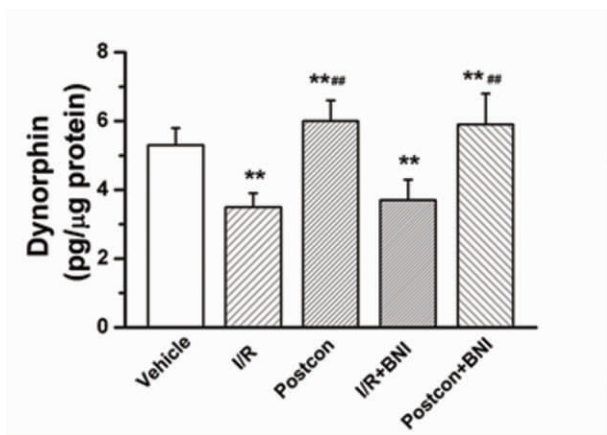


图7 后处理对心室肌中的强啡肽的影响

n=6, P<0.01 vs. Vehicle (**). Vehicle = 对照 I/R = 缺血再灌注 Postcon = 后处理 BNI = nor-BNI, κ - 受体阻断剂

Fig. 7 Effect of postconditioning on the ventricular myocardial dynorphin was analyzed by an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) technique (n=6 in each group). Values are the mean $\pm$ SD. P<0.01 vs. vehicle (**). I/R = ischemia/reperfusion; Postcon = postconditioning; BNI = nor-binaltorphimine

可显著抑制恢复。他们研究表明 κ -OR 激动剂可提供显著的心肌保护。研究发现在再灌注前给 κ -OR 激动剂 U50,488H 可显著减少大鼠的心肌细胞凋亡^[32]。本研究提供了间接的证据就是提高内源性 κ -OR 激动剂强啡肽可能在心肌保护中的起一定的作用。在应激状态,阿片肽水平可增加以及最终释放到外周循环^[37]。心肌缺血可促进阿片肽的合成和释放^[9]。强啡肽的增加比甲硫氨酸脑啡肽 (met-enkephalin, ME), 更明显, 尽管这并没有统计学意义^[38]。为什么内源性阿片肽水平在缺血器官增加? 据推测在梗死心室组织中内源性阿片肽 (endogenous opioid peptides, EOPs) 水平的增加可能在于拮抗缺血时儿茶酚胺的大量释放。因此, 心脏在应激如缺血时可能涉及分泌过程, 在这个过程中 EOPs 从心肌释放并与心肌的阿片受体直接相互作用从而通过防止钙超载来发挥抑制细胞损伤起到保护心脏的作用。有研究显示 β - 肾上腺素能受体^[39]的激活介导的信号通路可能被激活的 κ -OR 显著抑制^[40]。研究发现 κ -OR 可抑制肾上腺素能受体激活效应^[41,42]。后处理可能促进阿片肽的生成的作用部分是通过保护负责前脑啡肽的加工和合成中的酶^[9]。Zhang SZ 等发现远距预处理 (RPC) 大鼠的血浆强啡肽水平明显增高, 而且静脉注射强啡肽和 U50,488H 可模拟 RPC 的心脏保护作用^[43]。RPC 和 U50,488H 诱导的心脏保护作用还可被 nor-BNI 所减弱。我们研究发现后处理可同时增加血清和心肌中的强啡肽的水平。尽管后处理的心脏保护作用, 比如减少酶漏, 抑制凋亡作用均被 nor-BNI 所阻断, 而强啡肽水平并没有被 nor-BNI 所阻断。这些结果表明后处理诱导内源性 κ -OR 激动剂强啡肽的释放以及强啡肽可能参与这种形式的心脏保护。进一步的研究证明强啡肽在循环中的水平可能在心肌细胞中发挥生物学效应。总之, 这些数据表明后处理的保护作用包括抗凋亡与激活 κ -OR 以及维持强啡肽的足够供给相关。

后处理的强啡肽增加可能源于多种可能包括 1) 增加的前

强啡肽原 mRNA 相对地导致强啡肽前体的翻译 2) 通过增加强啡肽原前体加工成有受体活性的强啡肽 3) 减少强啡肽的降解程度。根据 Zatta AJ 等的研究, 内源性阿片肽的增加最大的原因是由于总蛋白的合成^[9]。所以强啡肽从心脏生成、加工和释放所需要的信号机制需要进一步研究。

最近, 临床使用阿片肽治疗心血管疾病已经吸引了越来越多的注意。 κ -OR 激动剂参与 I/R 的研究为治疗缺血性心脏病提供了一个新的视野。本研究首次阐明 κ -阿片肽启动后处理抗凋亡作用的机制。我们发现心脏保护作用和后处理的抗凋亡作用是由激活 κ -OR 来介导的。而心脏保护作用和后处理的抗凋亡作用至少部分是通过增加强啡肽的表达来介导的。

参考文献 (References)

- [1] 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: H579-H588
- [2] Granfeldt A, Lefer DJ, Vinten-Johansen J. Protective ischaemia in patients: preconditioning and postconditioning [J]. *Cardiovasc Res*, 2009, 83: 234-246
- [3] van Dijk A, Krijnen PA, Vermond RA, et al. Inhibition of type 2A secretory phospholipase A2 reduces death of cardiomyocytes in acute myocardial infarction [J]. *Apoptosis*, 2009, 14: 753-763
- [4] Dosenko VE, Nagibin VS, Tumanovska LV, et al. Protective effect of autophagy in anoxia-reoxygenation of isolated cardiomyocyte [J]? *Autophagy*, 2006, 2: 305-306
- [5] Penna C, Perrelli MG, Raimondo S, et al. Postconditioning induces an anti-apoptotic effect and preserves mitochondrial integrity in isolated rat hearts [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1787: 794-801
- [6] Gross ER, Gross GJ. Ligand triggers of classical preconditioning and postconditioning [J]. *Cardiovasc Res*, 2006, 70:212-221
- [7] Jang Y, Xi J, Wang H, et al. Postconditioning prevents reperfusion injury by activating delta-opioid receptors [J]. *Anesthesiology*, 2008, 108: 243-250
- [8] Okubo S, Tanabe Y, Takeda K, et al. Ischemic preconditioning and morphine attenuate myocardial apoptosis and infarction after ischemia-reperfusion in rabbits: role of delta-opioid receptor [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004, 287:H1786-H1791
- [9] Zatta AJ, Kin H, Yoshishige D, et al. Evidence that cardioprotection by postconditioning involves preservation of myocardial opioid content and selective opioid receptor activation [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008, 294: H1444-H1451
- [10] Barron BA. Cardiac opioids [J]. *Proc Soc Exp Biol Med*, 2000, 224: 1-7
- [11] Li R, Wong GT, Wong TM, et al. Intrathecal morphine preconditioning induces cardioprotection via activation of delta, kappa, and mu opioid receptors in rats [J]. *Anesth Analg*, 2009, 108: 23-29
- [12] Millington WR, Rosenthal DW, Unal CB, et al. Localization of pro-opiomelanocortin mRNA transcripts and peptide immunoreactivity in rat heart [J]. *Cardiovasc Res*, 1999, 43: 107-116
- [13] Pintus G, Pinna GG, Ventura C. Evaluation of opioid peptide gene expression by solution hybridization RNase protection [J]. *Boll Soc Ital Biol Sper*, 1994, 70: 213-219

- [14] Spampinato S, Canossa M, Ventura C, et al. Heterogeneity of immunoreactive dynorphin B-like material in human, rat, rabbit and guinea-pig heart [J]. *Life Sci*, 1991, 48: 551-559
- [15] Canossa M, Ventura C, Vaona I, et al. Prodynorphin mRNA expression in adult cultured rat ventricular cardiac myocytes [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1993, 1172: 247-250
- [16] Tai KK, Jin WQ, Chan TK, et al. Characterization of [³H]U69593 binding sites in the rat heart by receptor binding assays [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1991, 23: 1297-1302
- [17] Cheng L, Ma S, Wei LX, et al. Cardioprotective and antiarrhythmic effect of U50,488H in ischemia/reperfusion rat heart [J]. *Heart Vessels*, 2007, 22: 335-344
- [18] Yaoita H, Ogawa K, Maehara K, et al. Attenuation of ischemia/reperfusion injury in rats by a caspase inhibitor [J]. *Circulation*, 1998, 97: 276-281
- [19] You L, Li L, Xu Q, et al. Postconditioning reduces infarct size and cardiac myocyte apoptosis via the opioid receptor and JAK-STAT signaling pathway [J]. *Mol Biol Rep*, 2011, 38: 437-443
- [20] Zhao WS, Xu L, Wang LF, et al. A 60-s postconditioning protocol by percutaneous coronary intervention inhibits myocardial apoptosis in patients with acute myocardial infarction [J]. *Apoptosis*, 2009, 14: 1204-1211
- [21] Piper HM, Abdallah Y, Schafer C. The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection [J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 61: 365-371
- [22] Kin H, Zatta AJ, Lofye MT, et al. Postconditioning reduces infarct size via adenosine receptor activation by endogenous adenosine [J]. *Cardiovasc Res*, 2005, 67: 124-133
- [23] Philipp S, Yang XM, Cui L, et al. Postconditioning protects rabbit hearts through a protein kinase C-adenosine A2b receptor cascade [J]. *Cardiovasc Res*, 2006, 70: 308-314
- [24] Penna C, Mancardi D, Rastaldo R, et al. Intermittent activation of bradykinin B2 receptors and mitochondrial KATP channels trigger cardiac postconditioning through redox signaling [J]. *Cardiovasc Res*, 2007, 75: 168-177
- [25] Xi L, Das A, Zhao ZQ, et al. Loss of myocardial ischemic postconditioning in adenosine A1 and bradykinin B2 receptors gene knockout mice [J]. *Circulation*, 2008, 118: S32-S37
- [26] Cohen MV, Yang XM, Liu GS, et al. Acetylcholine, bradykinin, opioids, and phenylephrine, but not adenosine, trigger preconditioning by generating free radicals and opening mitochondrial K(ATP) channels [J]. *Circ Res*, 2001, 89: 273-278
- [27] Chien GL, Van Winkle DM. Naloxone blockade of myocardial ischemic preconditioning is stereoselective [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1996, 28: 1895-1900
- [28] Peart JN, Gross ER, Reichelt ME, et al. Activation of kappa-opioid receptors at reperfusion affords cardioprotection in both rat and mouse hearts [J]. *Basic Res Cardiol*, 2008, 103: 454-463
- [29] Chen Z, Li T, Zhang B. Morphine postconditioning protects against reperfusion injury in the isolated rat hearts [J]. *J Surg Res*, 2008, 145: 287-294
- [30] Rong F, Peng Z, Ye MX, et al. Myocardial apoptosis and infarction after ischemia/reperfusion are attenuated by kappa-opioid receptor agonist [J]. *Arch Med Res*, 2009, 40: 227-234
- [31] Tong G, Sun Z, Wei X, et al. U50,488H postconditioning reduces apoptosis after myocardial ischemia and reperfusion [J]. *Life Sci*, 2011, 88: 31-38
- [32] Wang J, Gao Q, Shen J, et al. Kappa-opioid receptor mediates the cardioprotective effect of ischemic postconditioning [J]. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 2007, 36: 41-47
- [33] Communal C, Sumandea M, de Tombe P, et al. Functional consequences of caspase activation in cardiac myocytes [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99: 6252-6256
- [34] Ertracht O, Liani E, Bachner HN, et al. The cardioprotective efficacy of TVP1022 in a rat model of ischemia/reperfusion [J]. *Br J Pharmacol*, 2011
- [35] Schultz JE, Gross GJ. Opioids and cardioprotection [J]. *Pharmacol Ther*, 2001, 89: 23-137
- [36] Romano MA, McNish R, Seymour EM, et al. Differential effects of opioid peptides on myocardial ischemic tolerance [J]. *J Surg Res*, 2004, 119(1):46-50
- [37] Briand LA, Blendy JA. Molecular and genetic substrates linking stress and addiction [J]. *Brain Res*, 2010, 1314: 19-234
- [38] Romano MA, Seymour EM, Berry JA, et al. Relative contribution of endogenous opioids to myocardial ischemic tolerance [J]. *J Surg Res*, 2004, 8: 2-37
- [39] Sethi R, Saini HK, Guo X, et al. Dependence of changes in beta-adrenoceptor signal transduction on type and stage of cardiac hypertrophy [J]. *J Appl Physiol*, 2007, 102: 78-984
- [40] Pepe S, van den Brink OW, Lakatta EG, et al. Cross-talk of opioid peptide receptor and beta-adrenergic receptor signalling in the heart [J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 3: 14-422
- [41] Bian JS, Zhang WM, Pei JM, et al. The role of phosphodiesterase in mediating the effect of protein kinase C on cyclic AMP accumulation upon kappa-opioid receptor stimulation in the rat heart [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2000, 292: 065-1070
- [42] Shan D, Wang H, Su Y, et al. kappa-opioid receptor stimulation inhibits cardiac hypertrophy induced by beta1-adrenoceptor stimulation in the rat [J]. *Eur J Pharmacol*, 2007, 555: 100-105
- [43] Zhang SZ, Wang NF, Xu J, et al. Kappa-opioid receptors mediate cardioprotection by remote preconditioning [J]. *Anesthesiology*, 2006, 105: 550-556