

降钙素基因相关肽预适应对在体大鼠心肌 缺血/再灌注损伤的保护作用

欧阳伟 钱学贤 付向阳 李志梁 王素华

(第一军医大学附属珠江医院心内科, 广州 510282)

Calcitonin Gene-Related Peptide-Induced Preconditioning Protects Against Ischemia-Reperfusion Injury in Intact Rat Heart

OU-YANG Wei, QIAN Xue-Xian, FU Xiang-Yang, LI Zhi-Liang and WANG Su-Hua

(Department of Cardiology, Zhujiang Hospital, the First Military Medical University, Guangzhou 510282, China)

ABSTRACT

Aim Calcitonin gene-related peptide (CGRP), a principal transmitter in cardiac and vascular sensory nerves, is released from the heart during ischemia, which protected the myocardium against ischemia-reperfusion injury in isolated rat hearts. The purpose of this study was to investigate whether CGRP-induced preconditioning has cardioprotective effects in intact rat hearts.

Methods 36 SD rats were at random divided into three groups of control, ischemic preconditioning (IPC) and CGRP. CGRP (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) was given 20 min before 30 min ischemia. All animals were subjected to 30 min of regional ischemia followed by 2 h of reperfusion. The preconditioning protocol consisted of 3 cycles of 5 min regional ischemia and 3 cycles of 5 min of reperfusion. Infarct size as a percentage of the area at risk was determined with nitro blue tetrazolium.

Results Both of IPC and CGRP-induced preconditioning markedly reduced the incidences of ventricular arrhythmias during ischemia and reperfusion. Both of IPC (15.7%, $P < 0.01$) and CGRP-induced preconditioning (28.8%, $P < 0.01$) also resulted in a signifi-

cant reduction in infarct size when compared to control (54.0%).

Conclusion These results support the hypothesis that CGRP-induced preconditioning has cardioprotective effects in intact rat hearts.

KEY WORDS Calcitonin gene-related peptide; Ischemia-reperfusion injury; Myocardial protection; Pharmacological preconditioning

摘要 为探讨降钙素基因相关肽预适应对在体大鼠心肌缺血/再灌注损伤模型是否具有保护作用,用 36 只 SD 大鼠随机分为三组:对照组、缺血预适应组和降钙素基因相关肽组。后组持续缺血前 20 min 静脉注射降钙素基因相关肽(10 $\mu\text{g}/\text{kg}$)。所有动物均接受 30 min 缺血/2 h 再灌注。预适应方案由 3 次 5 min 缺血/再灌注组成。梗塞大小由硝基四唑氮兰染色判定,并以坏死区占危险区的百分数表示。结果发现,缺血预适应和降钙素基因相关肽预适应均能显著地降低缺血和再灌注所致的室性心动过速或心室纤维性颤动的发生。缺血预适应(15.7%, $P < 0.01$)和降钙素基因相关肽预适应(28.8%, $P < 0.01$)也均能较对照组(54.0%)显著降低缺血/再灌注后的心肌梗塞面积。本研究结果证实降钙素基因相关肽预适应在在体大鼠模型中也具有心肌保护作用。

关键词 降钙素基因相关肽; 缺血/再灌注损伤; 心肌保护; 药物预适应

自从 1986 年 Murry 等^[1]在犬模型中首先描述了心肌缺血预适应(ischemic preconditioning, IPC)以来,已证实这种现象普遍存在于包括人在内的各种哺乳动物中^[2]。虽然 IPC 的作用机理目前尚未完全阐明,但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、儿茶酚胺、乙酰胆碱等)在 IPC 中起重

要作用^[2]。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重要效应递质,短暂缺血即能引起明显释放^[3]。离体大鼠心脏试验表明,CGRP预适应具有明显心肌保护作用^[4,5],但在在体大鼠模型中是否具有心肌保护作用迄今尚未见文献报道。本文就此进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

健康雄性SD大鼠,体重 279 ± 20 g,由第一军医大学动物中心提供;CGRP由军事医学科学院基础医学研究所提供;硝基四唑蓝(mine blue tetrazolium, NBT)为Serva产品;Evans blue为Sigma产品;DH-140B动物人工呼吸机由浙江医科大学实验仪器厂提供;LH-662型传感器调理仪由南京爱德科技实业公司提供;NSA-Ⅱ型生理信号处理系统由海军神经生物学研究中心提供。

1.2 大鼠心肌缺血/再灌注模型的制作

SD大鼠用3%戊巴比妥钠(60 mg/kg)腹腔注射麻醉。气管插管,室内空气人工呼吸,频率65~70次/min,潮气量3~4 mL。实验期间维持血pH、血 O_2 分压、血 CO_2 分压和肛温在正常范围。从颈动脉插管监测血压。从颈静脉插管以补液和给药。持续记录心电图变化。于左侧第三、四肋间距正中中线外5 mm处开胸暴露心脏。以肺动脉圆锥与左心耳之间的左冠状静脉为标志,用穿有3-0缝合线的3/8弯针跨腔钩绕左冠状动脉前降支支,线两端共穿过一根聚乙烯小管以形成闭环。拉紧闭环并用止血钳固定即产生缺血,放松闭环即发生再灌注。结扎前1 min给予肝素(250 u/kg)。缺血的标志为:①左心室前壁发绀;②ST段抬高和R波增高。再灌注的标志为:①发绀区充血发红;②抬高的ST段和增高的R波恢复正常。

1.3 实验分组

将36只SD大鼠随机分为三组,每组12只。

1.3.1 对照组 先行3次5 min假性缺血/再灌注(仅穿线不结扎),然后行30 min缺血/2 h再灌注,持续缺血前20 min静脉注射生理盐水。

1.3.2 缺血预适应组 先行3次5 min缺血/再灌注,然后行30 min缺血/2 h再灌注,持续缺血前20 min静脉注射生理盐水。

1.3.3 降钙素基因相关肽组 先行3次5 min假性缺血/再灌注,然后行30 min缺血/2 h再灌注,持续缺

血前20 min静脉注射CGRP(10 μ g/kg)。

1.4 梗塞大小的测定

用Evans Blue+NBT双重染色^[6],用称重法^[7]测量梗塞大小。

在再灌注末,再次拉紧闭环使冠状动脉阻塞。从静脉导管中注入5% Evans blue 1 mL,用氯化钾杀死大鼠。小心切除心脏,用敷料吸干心脏,放置-4℃冰箱,30 min后取出。将心脏均匀切为7~8片。发现灌注区染为蓝色,非灌注区不染色。在解剖显微镜下小心将蓝色区与未染色区分离。将未染色区置于pH 7.4、0.5 g/L的NBT溶液中,并放于37℃水箱孵化20 min。坏死区因无脱氢酶故不染色,未坏死区因含有完整脱氢酶故染为紫蓝色。在解剖显微镜下,小心将染色区与未染色区分离。将蓝色区、紫蓝色区和未染色区用电子天平称重。蓝色区、紫蓝色区和未染色区之和即为心脏重量。紫蓝色区和未染色区之和为危险区(area at risk, AAR),未染色区为梗塞区(infarct size, IS)。梗塞大小用梗塞区在危险区所占的百分比表示。

1.5 心律失常的记录和分析

用生理信号处理系统中的心电图描记软件持续记录心电图,将缺血前5 min、持续缺血和再灌注时的心电变化分段(每段320 s)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性心动过速(ventricular tachycardia, VT)或心室纤维性颤动(ventricular fibrillation, VF)的发生频率、开始时间、持续时间和发生次数。VT或VF的诊断根据Lambeth Conventions所拟定的标准确定^[8]。

发生频率(frequency):是指在每组大鼠中,发生VT或VF的大鼠百分数。

开始时间(onset):是指缺血或再灌注开始至发生VT或VF的时间。

持续时间(duration):是指每只大鼠缺血或再灌注时VT或VF的总持续时间。

发生次数(number):是指每只大鼠缺血或再灌注时VT或VF的发生次数。

1.6 退出试验的标准

有下列情况之一的大鼠退出试验:①灌注染色后,危险区不足心脏重的15%;②结扎冠状动脉失败或未发生再灌注者;③过度出血并导致血压下降者;④呼吸心跳停止超过30 s者;⑤实验过程中血压低于9.3 kPa或心率低于240次/min者。

1.7 统计学方法

所有结果用 $\bar{x}\pm s$ 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加 *q* 检验。率的比较用四格表的确切概率法。 $P<0.05$ 为有统计学上的显著性差异。

2 结果

2.1 血压和心率的变化

Table 1. Change of heart rate (HR, /min) and mean artery pressure (MAP, kPa) before and after ischemia-reperfusion in rats ($\bar{x}\pm s$).

During	Control group		IPC group		CGRP group	
	HR	MAP	HR	MAP	HR	MAP
Baseline	320±28	118±9	312±24	108±13	324±31	122±10
For 10 min before ischemia	319±30	119±10	315±19	104±8	340±40	94±9 ^a
Pre-ischemia	317±25	114±13	310±20	105±7	320±29	117±12
End-ischemia	317±18	113±16	309±21	102±7	317±24	115±16
End-reperfusion	314±21	112±8	301±29	100±10	315±30	114±9

a: $P<0.05$, compared with during baseline.

2.2 缺血所致的室性心律失常变化

表 2(Table 2)显示三组大鼠在持续缺血时的 VT 或 VF 的发生频率、开始时间、持续时间和发作次数。从表中可以看出,在持续缺血所致的 VF 或 VT 中,IPC 组 (VF 从对照组的 100%降至 0%, $P<0.01$; VT 从 100%降至 16.6%, $P<0.01$)和 CGRP 组 (VF 从 100%

表 1(Table 1)显示三组大鼠平均动脉压 (mean artery pressure, MAP)或心率。从表 1 (Table 1)中可以看出,除 CGRP 组缺血前 10 min 的 MAP 较基础值显著降低($P<0.05$)外,三组其他各点的血压和心率与相应的基础值比较均无明显差别。

降至 41.6%, $P<0.01$; VT 从 100%降至 50%, $P<0.05$)的发生频率较对照组显著降低。另外,CGRP 组 VF 或 VT 开始时间较对照组显著延迟($P<0.01$),持续时间较对照组显著缩短($P<0.05$, $P<0.01$),发生次数较对照组显著减少($P<0.01$, $P<0.05$)。

Table 2. Ventricular arrhythmias during 30 min occlusion ($\bar{x}\pm s$).

Indices	Control group		IPC group		CGRP group	
	VF	VT	VF	VT	VF	VT
Frequency(%)	100	100	0 ^b	17 ^b	42 ^b	50 ^a
Onset (min)	9±2	9±2	—	—	16±4 ^b	14±5 ^b
Duration(s)	45±13	234±47	—	—	20±8 ^a	105±88 ^b
Number	23±10	42±15	—	—	7±4 ^b	20±9 ^a

a: $P<0.05$. b: $P<0.01$, compared with control group.

2.3 再灌注所致室性心律失常的变化

表 3(Table 3)显示三组大鼠在再灌注时的 VF 或 VT 的发生频率、开始时间、持续时间和发作次数。从表中可以看出,在再灌注所致的 VT 或 VF 中,IPC 组 (VF 和 VT 均从对照组的 100%降至 0%, $P<0.01$)和 CGRP 组 (VF 从

100%降至 33.3%, $P<0.01$; VT 从 100%降至 41.6%, $P<0.01$)的发生频率均较对照组显著降低。另外,CGRP 组的 VF 或 VT 的开始时间均较对照组显著延迟($P<0.01$),持续时间均较对照组显著缩短($P<0.05$),发作次数均较对照组显著减少($P<0.05$)。

Table 3. Ventricular arrhythmias during 2 h reperfusion($\bar{x}\pm s$).

Indices	Control group		IPC group		CGRP group	
	VF	VT	VF	VT	VF	VT
Frequency(%)	100	100	0 ^b	0 ^b	33 ^b	41 ^a
Onset (min)	8±3	8±4	—	—	25±3 ^b	25±8 ^b
Duration(s)	16±7	35±15	—	—	6±4 ^a	15±10 ^a
Number	10±4	18±10	—	—	4±2 ^b	6±5 ^a

a: $P<0.05$; b: $P<0.01$, compared with control group.

2.4 梗塞大小的变化

表 4 (Table 4) 显示三组大鼠体重、心脏重、危险区重和梗塞区重的结果。从表中可以看出,三组大鼠的体重、心脏重和危险区重之间均无显著性差别。但 IPC 组的梗塞区重(0.04 ± 0.04 g 对 0.14 ± 0.04 g, $P<0.01$)和梗塞区重/危险区重($15.7\%\pm9.0\%$ 对 $54.0\%\pm14.7\%$,

$P<0.01$)均较对照组显著降低。CGRP 组的梗塞区重(0.08 ± 0.04 g 对 0.14 ± 0.04 g, $P<0.05$)和梗塞区重/危险区重($28.8\%\pm13.2\%$ 对 $54.0\%\pm14.7\%$, $P<0.01$)也均较对照组显著降低。IPC 组的梗塞区重和梗塞区重/危险区重较 CGRP 组降低更明显。

Table 4. Infarct size data for control, IPC and CGRP groups.

Groups	BW (g)	HW (g)	AAR (g)	IS (g)	IS/AAR (%)
Control	285±24	1.04±0.08	0.25±0.04	0.14±0.04	54.0±14.7
IPC	284±27	1.07±0.09	0.27±0.05	0.04±0.04 ^b	15.7±9.0 ^b
CGRP	286±27	1.04±0.08	0.26±0.03	0.08±0.04 ^{bc}	2.88±13.2 ^{bc}

BW; body weight; HW; heart weight; AAR; area at risk; IS; infarct size. b: $P<0.01$, compared with control group; c: $P<0.05$, compared with IPC group.

3 讨论

心肌 IPC 是 1986 年 Murry 等^[1]在研究犬缺血/再灌注模型中首先提出的。他们发现预先给犬左冠状动脉回旋枝连续 4 次 5 min 缺血/再灌注,可使其后持续缺血 40 min 产生的心肌梗塞范围较对照组明显缩小。这表明对短暂缺血的快速适应反应可减慢随后长时间缺血时的心肌死亡速度。以后在犬、兔、猪、大鼠和人等哺乳动物中进行的其它研究也证实了这种现象的存在^[2]。IPC 除能限制心肌梗塞范围外,还有抗心律失常和改善心功能的作用。后一作用可能与心肌梗塞范围缩小有关。本研究也证实在整体大鼠模型中,IPC 具有限制心肌梗塞范围和抗心律失常作用。

缺血预适应保护心肌的机制目前尚未完全弄清,但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、儿茶酚胺、乙

酰胆碱等)在 IPC 中起重要作用。预先用这些物质能模拟 IPC 的心肌保护作用^[2]。目前已有大量证据显示,IPC 的心肌保护作用与 G 蛋白偶联受体活化、蛋白激酶 C 活化或 ATP 依赖性钾通道(ATP-dependent potassium channels)活化有密切关系^[2]。

降钙素基因相关肽是心脏和血管感觉神经末梢释放的一种重要效应递质,是迄今降压作用最强的多肽。在离体豚鼠心脏中,5 min 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^[3]。除降血压作用外,CGRP 还具有保护血管内皮细胞和缺血心肌的作用^[9,10]。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^[4],而且对阿霉素、内皮素-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^[11~14]。另外,在离体

大鼠模型中,用选择性 CGRP 受体拮抗剂 CGRP_{8~37}能取消 IPC 的心肌保护作用^[5]。本研究在整体大鼠模型中也发现,CGRP 预适应具有显著的心肌保护作用,它不仅具有缩小心肌梗塞范围,而且还具有抗室性心律失常作用。本研究进一步支持 CGRP 可能是一种内源性心肌保护物质,在 IPC 中可能起重要作用。

降钙素基因相关肽(CGRP)预适应保护心肌的机理目前尚不清楚。已有研究表明,目前已知的许多内源性保护物质的预适应作用都是由蛋白激酶 C 介导的^[2]。晚近的一项研究发现^[15],在成年哺乳动物的心室肌中,CGRP 能增加蛋白激酶 C 的活性。在另一项离体试验中,蛋白激酶 C 抑制剂 H₇ 能取消 CGRP 预适应的心肌保护作用^[12]。另外,血管中 ATP 依赖性钾离子通道被激活是 CGRP 重要降压作用机制之一^[16],但 CGRP 是否能够通过直接激活心肌内的 ATP 依赖性 K⁺通道而发挥心肌保护作用还有待于今后进一步研究。

参考文献

- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 1986, **74**: 1 124~136.
- James RP. Protection of the heart by ischemia preconditioning: mechanisms and possibilities for pharmacological exploitation. *TIPS*, 1994, **15**: 19~25.
- Franco-cereceda A. Calcitonin gene-related peptide and tachykinins in relation to local sensory control of cardiac contractility and coronary vascular tone. *Acta Physiol Scand*, 1988, **133** (Suppl 596): 3~63.
- Xiao ZS, Li YJ, Deng HW. Ischemic preconditioning mediated by calcitonin gene-related peptide in isolated rat hearts. *中国药理学报*, 1996, **17**: 445~448.
- Li YJ, Xiao ZS, Peng CF, et al. Calcitonin gene-related peptide-induced preconditioning protects against ischemia-reperfusion injury in isolated rat hearts. *Eur J Pharmacol*, 1996, **12**: 163~167.
- Hide EJ, Thiemeermann C. Limitation of myocardial infarct size in the rabbit by ischemic preconditioning is abolished by sodium 5-hydroxydecanoate. *Cardiovasc Res*, 1996, **31**: 941~946.
- Schultz JEJ, Yao Z, Cavero I, et al. Glibenclamide-induced blockade of ischemic preconditioning is time dependent in intact rat heart. *Am J Physiol*, 1997, **272**: H2 607~615.
- Walker MJA, Curtis MJ, Hearse DJ, et al. The lambeth conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia, infarction, and reperfusion. *Cardiovasc Res*, 1988, **22**: 447~455.
- Ren YS, Ma TG, Wang HB, et al. Protective effects of calcitonin gene-related peptide (CGRP) on myocardial cell injury and calcium and magnesium contents following severe hypoxia and simulated reperfusion. *Med Sci Res*, 1993, **21**: 177~178.
- Tang YH, Lu R, Li YJ, et al. Effect of calcitonin gene-related peptide-induced preconditioning on attenuated endothelium-dependent vasorelaxation induced by lysophosphatidylcholine. *中国药理学报*, 1997, **18**: 405~407.
- Yang DL, Tang YH, Li YJ, et al. Protection of calcitonin gene-related peptide induced preconditioning against myocardial injury due to adriamycin in isolated rat heart. *J Chin Pharmacol*, 1996, **5**: 150~153.
- Peng CF, Li YJ, Deng HW, et al. The protective effects of ischemic and calcitonin gene-related peptide-induced preconditioning on myocardial injury by endothelin-1 the isolated perfused rat heart. *Life Sci*, 1996, **59**: 1 507~514.
- Tao ZW, Li YJ, Deng HW. Attenuation of myocardial injury due to oxygen free radicals(OFR) by pretreatment with OFR or calcitonin gene-related peptide. *中国药理学报*, 1997, **18**: 312~316.
- Lu EX, Peng CF, Li YJ, et al. Calcitonin gene-related peptide-induced preconditioning improves preservation with cardioplegia. *Ann Thorac Surg*, 1996, **62**: 1 748~751.
- Bell D, Schluter KD, Zhou XJ, et al. Hypertrophic effects of calcitonin gene-related peptide(CGRP) and amylin on adult mammalian ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*, 1995, **27**: 2 433~443.
- Brayden JE, Quayle JM, Standen NB, et al. Role of potassium channels in the vascular response to endogenous and pharmacological vasodilators. *Blood Vessels*, 1991, **28**: 147~153.

(1998-05-30 收到, 1998-08-12 修回。编辑: 胡必利)