

[文章编号] 1007-3949(2000)-02-0103-04

• 实验研究 •

Calcineurin 在大鼠心脏缺血预处理中的作用

李淑莲¹, 齐永芬, 陈亚红, 张英, 王晓红, 唐朝枢

(北京医科大学第一医院心血管研究所, 北京市 100034;

1. 开封医学专科学校病理生理学教研室, 河南省开封市 475001)

[关键词] 缺血; Calcineurin; 环孢霉素 A; 再灌注损伤; 大鼠

[摘要] 为观察环孢霉素(syclosporin A)对缺血预处理心脏保护作用的影响,探讨 Calcineurin 信号通路在心脏缺血预处理中的作用,制备离体大鼠心肌缺血/再灌注模型,测定心功能和心肌 Calcineurin 活性。结果发现,缺血预处理明显减轻缺血/再灌注的心功能抑制,与单纯缺血/再灌注比较,冠状动脉灌流量、收缩期左室内压最大变化速率和舒张期左室内压最大变化速率分别减少 39% ($P < 0.05$)、33% ($P < 0.01$) 和 52% ($P < 0.05$), 心肌钙含量下降 21% ($P < 0.01$)。Calcineurin 抑制剂环孢霉素 A 可抵消缺血预处理的心肌保护作用。此外,缺血 45 min/再灌 15 min 使心肌 Calcineurin 活性升高,与对照组相比较,Calcineurin 活性增加 1.9 倍 ($P < 0.01$)。单纯缺血预处理组心肌 Calcineurin 的活性较对照组增加 2.3 倍 ($P < 0.01$)。环孢霉素 A 预先处理心脏则完全阻断了缺血预处理诱导的 Calcineurin 激活,与缺血预处理组相比较,其活性下降 75% ($P < 0.01$)。以上提示 Calcineurin 途径介导了缺血预处理的心脏保护作用。

[中图分类号] R541.4

[文献标识码] A

The Role of Calcineurin in Ischemia Preconditioning of Rat Heart

LI Shu-Lian, QI Yong-Fen, CHEN YA-Hong, ZHANG Ying, WANG Xiao-Hong, and TANG Chao-Shu

(Institute of Cardiovascular Disease Research, the First Hospital, Beijing Medical University, Beijing 100034, China)

MeSH Ischemia; Calcineurin; Cyclosporin A; Reperfusion Injury; Rat

ABSTRACT **Aim** To observe the effect of cyclosporin A (an inhibitor of calcineurin) on cardioprotection induced by ischemia preconditioning (IPC) and explore the role of calcineurin (CaN) signal pathway in IPC. **Methods** The model of ischemia/reperfusion (I/R) was produced in isolated rat heart. The cardiac functions and the activity of myocardium calcineurin were measured. **Results** It was found that IPC apparently attenuated the inhibition of cardiac function induced by I/R. Compared with I/R group, in IPC group coronary perfusion flow (CPF), +LVdp/dt max and -LVdp/dt max decreased by 39% ($P < 0.01$), 33% ($P < 0.01$) and 52% ($P < 0.01$) respectively. Myocardial calcium content decreased by 21% ($P < 0.01$). However CsA, the inhibitor of CaN, can contract the cardioprotection effect of IPC. In addition, the activity of cardiac calcineurin was activated by cardiac I/R, compared with control group, the activity of CaN increased by 1.9 folds; ischemia preconditioning alone activated the activity of cardiac calcineurin and increased by 2.3 folds ($P < 0.01$) compared with control group. Before ischemia preconditioning administration of CsA completely blocked the activation of calcineurin stimulated by IPC. Compared with IPC group, its activity decreased by 75% ($P < 0.01$). **Conclusion** The results suggest that IPC-induced cardioprotective effects are mediated by calcineurin pathway.

预先反复短暂缺血可使心肌在后续的长期缺血中得到保护的现象称为缺血预处理 (ischemia preconditioning, IPC)。缺血预处理现象在多种动物及人的心脏都获得证实,但其作用机理尚未完全阐明^[1,2]。

大量实验资料提示细胞蛋白激酶 C 激活及蛋白激酶 C 介导的蛋白磷酸化增强是预处理细胞保护的共同环节,但蛋白激酶 C 共同途径学说不能解释预处理细胞保护的全部现象^[2]。现已发现丝裂素活化蛋白激酶系统也介导了 IPC 的细胞保护作用,并提出 IPC 现象的细胞内信号转导多途径的观点^[1~3]。Calcineurin (CaN, 钙调神经磷酸酶) 是一种分布广泛、参与多种细胞功能调节的多功能 Ca^{2+} 依赖蛋白磷酸酶,是 Ca^{2+} 介导的细胞内信号转导途径中的重要

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (39730220)

[作者简介] 李淑莲,女,进修生,1989年毕业于河南医科大学,现任河南开封医学专科学校病理生理学教研室讲师。唐朝枢,男,教授,博士生导师,1945年生,多年从事病理生理学教学和科研工作,在国内发表数百篇论文。

因子^[4,5]。本工作在离体大鼠心肌缺血/再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)模型上观察 CaN 阻断剂环孢霉素 A(cyclosporin A, CsA)对 IPC 心脏保护作用的影响,并观察 IPC 过程中 CaN 活性的变化,以探讨 Ca^{2+} - CaN 去磷酸化细胞内信号转导途径在心脏缺血预处理中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

Wistar 大鼠由北京医科大学实验动物部提供;主要生物化学试剂和三磷酸腺苷测定药盒均购于 Sigma 公司。³²P-三磷酸腺苷为 NEN DoPont 产品。

1.2 离体大鼠心脏灌注模型制备

雄性 Wistar 大鼠,体重 200 ± 50 g,戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔注射麻醉,股静脉注射 1% 肝素(0.2 mL)抗凝。快速摘取心脏悬挂于 Langendorff 灌注装置上,以 37°C 、95% O_2 - 5% CO_2 平衡的 Krebs-Henseleit(KH)液经主动脉逆插管以 80 mmHg 恒压灌注。

1.3 分组

平衡预灌注 15 min 后随机分 5 组(每组 6 例)。

对照组:大鼠心脏持续灌注 120 min; ④单纯 I/R 组:大鼠心脏停灌 45 min、再灌注 15 min; ④IPC 组:5 min 停灌/5 min 再灌重复 3 次预处理之后,停灌 45 min/再灌 15 min; IPC+CsA 组:预处理前 5 min 开始及 3 次再灌注的 KH 液中加入 CsA,终浓度 1.0 $\mu\text{mol/L}$,然后停灌 45 min/再灌注 15 min; I/R+CsA 组:操作同单纯 I/R 组,但再灌注的 KH 液中含 CsA 1 $\mu\text{mol/L}$ 。

另取一批雄性 Wistar 大鼠分 4 组($n=5$)。对照组:大鼠心脏持续灌注 120 min; ④I/R 组:大鼠心脏停灌 45 min/再灌注 15 min; ④单纯 IPC 组:5 min 停灌/5 min 再灌重复 3 次预处理; CsA+IPC 组:预处理前 5 min 开始及 3 次再灌注的 KH 液中加入 CsA,终浓度 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 。

1.4 观察指标

1.4.1 心功能 从左心耳插入球囊导管至左心室,经换能器在生理多导仪上检测收缩期左室内压最大变化速率(+dp/dt max)和舒张期左室内压下降最大速率(-dp/dt max)。

1.4.2 心肌损伤指标 收集再灌 15 min 内的全部冠状动脉流出液并记录总量;以自动生物化学分析仪测乳酸脱氢酶活性;考马氏亮蓝法测心肌蛋白漏出量和比色法测肌红蛋白(Mb)漏出量。灌注结束后,留取 100 mg 心尖组织用试剂药盒测定心肌三

磷酸腺苷含量。余下部分心肌组织制备匀浆,离心取上清用硫代巴比妥酸法测定心肌组织脂质过氧化产物丙二醛(MDA)含量,部分心肌经硝酸消化后在原子吸收分光光度计上测定组织钙含量。

1.5 心肌组织 Calcineurin 活性测定^[6]

灌注结束后取心尖部肌肉 200 mg,加 2 mL 匀浆液(mmol/L: 50 Hepes, pH7.4, 28 mercaptoethanol, 0.5 PMSF, 0.1 Leupeptide, 0.1 Na-p-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone, 2 benzamidine),离心后上清液置于反应缓冲液中(mmol/L: 50 Hepes, pH7.4, 0.6 CaCl_2 , 28 mercaptoethanol, 50 nmol/L Calmodulin, 3 g/L BSA, 30 nmol/L Calyculin A),取 50 μL 含匀浆上清液的反应液加到 25 μL ³²Pi 标记的反应底物液中, 30°C 反应 30 min,以冷 Trichloroacetic acid(TCA) 15 μL 终止反应。将反应体系置冰上 15 min 后离心,取上清 45 μL 点样于 Whatman P81 paper,干燥 15 min 后液闪计数,计算 CaN 活性,以每分钟 mmol ³²Pi/g Pr 表示。

1.6 ³²P 标记的底物液制备^[7]

³²P 标记的磷酸化组蛋白由 PKA 催化亚基催化组蛋白 II-S 磷酸化而成。90 mg 组蛋白溶于 15 mL 50 mmol/L Hepes 缓冲液(10 mmol/L Mg acetate, 1 mmol/L DTT)中。然后,加入 0.6 mL 40 mmol/L DTT, 30 μg PKA, 5 $\mu\text{mol/L}$ 三磷酸腺苷和 30 μCi γ -³²P-三磷酸腺苷到上述组蛋白溶液中, 25°C 孵育 1 h,加 TCA 终止反应。离心,弃上清,沉淀用 15% 的冷 TCA 洗 2 次后溶于 7.5 mL 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液中,然后置于 PBS 溶液中透析 4 h,换含 2.8 mmol/L mercaptoethanol 的 50 mmol/L Hepes pH7.4 缓冲液透析过夜。³²P 标记的底物液 4°C 保存备用。

1.7 统计学处理

实验结果以均数 \pm 标准差表示,以单因素方差分析和组间 q 检验进行统计学处理。

2 结果

2.1 离体灌注心脏冠状动脉灌流量和心功能的变化

与对照组相比较,缺血再灌注(I/R 组)使大鼠冠状动脉灌流量降低 36% ($P < 0.05$),大鼠心脏 + dp/dt max 及 - dp/dt max 分别降低 58% 和 72% ($P < 0.01$)。缺血预处理(IPC 组)明显减轻 I/R 的心功能抑制,其冠状动脉灌流量、+ dp/dt max 及 - dp/dt max 分别较单纯 I/R 组增加 67% ($P < 0.05$)、93% 和 126% ($P < 0.01$)。但 IPC 前给予 CaN 的抑制剂 CsA

(CsA+ IPC 组) 可部分抵消 IPC 的上述作用, 与 IPC 组比较, 冠状动脉灌流量、+ dp/dt max 和 - dp/dt max 分别下降 38%、40% 和 41% ($P < 0.05$), 其值与单纯 I/R 组相近 ($P > 0.05$)。再灌注同时给予 CsA (CsA+ I/R 组) 对 I/R 引起的改变无明显影响, 结果见表 1 (Table 1) 所示。

表 1. 缺血预处理对大鼠冠状动脉灌流量、左室 + dp/dt max 和 - dp/dt max 的影响。

Table 1. Effects of IPC on CPF, LV+ dp/dt max and - dp/dt max ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$).

Groups	CPF (mL/min)	+ dp/dt max	- dp/dt max
Control	7.83 \pm 2	1 958 \pm 277	1 429 \pm 435
I/R	4.98 \pm 1.33 ^a	814 \pm 318 ^b	407 \pm 130 ^b
IPC	8.34 \pm 1.62 ^c	1 569 \pm 240 ^d	919 \pm 271 ^c
CsA+ IPC	5.20 \pm 1.55 ^e	948 \pm 194 ^e	545 \pm 75 ^f
CsA+ I/R	5.13 \pm 1.06	910 \pm 222	426 \pm 77

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, compared with control group; c: $P < 0.05$, d: $P < 0.01$, compared with I/R group; e: $P < 0.05$, f: $P < 0.01$, compared with IPC group.

2.2 心肌损伤指标的变化

缺血/再灌注引起心肌损伤, 表现为细胞内酶 (乳酸脱氢酶)、蛋白和肌红蛋白大量漏出; 心肌脂质过氧化终产物和心肌钙含量增加而心肌能量生成 (三磷酸腺苷含量) 减少。IPC 明显减轻上述损伤, 与单纯 I/R 组比较, 其心肌蛋白、肌红蛋白和乳酸脱氢酶漏出分别减少 39%、33% 和 52% ($P < 0.01$); 心肌钙含量下降 21% ($P < 0.01$)。但 CaN 抑制剂 CsA 可抵消 IPC 的保护作用, CsA+ IPC 组心脏的上述各项指标均高于 IPC 组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) 而接近

表 2. 实验各组冠状动脉灌洗液中肌红蛋白、心肌蛋白含量和乳酸脱氢酶活性。

Table 2. Contents of Mb, myocardium protein and LDH activity ($\bar{x} \pm s$).

Groups	Mb (mg/L)	Protein (mg/L)	LDH activity (u/L)
Control	0.79 \pm 0.17	88.9 \pm 35.7	158 \pm 32
I/R	2.12 \pm 0.44 ^b	255.7 \pm 75 ^b	743 \pm 127 ^b
IPC	1.41 \pm 0.4 ^c	156.8 \pm 33.7 ^d	360 \pm 116 ^d
CsA+ IPC	2.47 \pm 0.68 ^e	302.7 \pm 72.1 ^f	663 \pm 116 ^f
CsA+ I/R	2.14 \pm 0.34	218.9 \pm 34.2	708 \pm 115

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, compared with control group; c: $P < 0.05$, d: $P < 0.01$, compared with I/R group; e: $P < 0.05$, f: $P < 0.01$, compared with IPC group.

表 3. 实验各组心肌丙二醛、三磷酸腺苷和钙含量。

Table 3. Contents of calcium, MDA and ATP in all experimental groups ($\bar{x} \pm s$).

Groups	MDA (nmol/g)	ATP (nmol/g)	Calcium (nmol/g)
Control	1.23 \pm 0.16	4.24 \pm 0.55	2.04 \pm 0.15
I/R	2.16 \pm 0.46 ^a	2.45 \pm 0.58 ^b	2.78 \pm 0.17 ^b
IPC	1.9 \pm 0.32	3.35 \pm 0.56 ^c	2.21 \pm 0.2 ^d
CsA+ IPC	2.38 \pm 0.38	2.45 \pm 0.32	2.72 \pm 0.24 ^e
CsA+ I/R	2.14 \pm 0.5	2.38 \pm 0.31	2.65 \pm 0.24

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, compared with control group; c: $P < 0.05$, d: $P < 0.01$, compared with I/R group; e: $P < 0.05$, compared with IPC group.

单纯 I/R 组。在再灌注时给予 CsA (CsA+ I/R 组) 对 I/R 引起的损伤无明显影响, 各指标与单纯 I/R 相近 ($P > 0.05$)。结果见表 2 (Table 2) 和表 3 (Table 3)。

2.3 心肌组织 Calcineurin 活性变化

45 min 停灌/15 min 再灌注刺激心脏 CaN 活性, 与对照组相比较增加 1.9 倍 (22.06 \pm 3.72 比 11.7 \pm 2.24, $P < 0.01$)。单纯 IPC (5 min 停灌 \rightarrow 5 min 再灌注重复 3 次) 激活心脏 CaN, 较对照组 CaN 活性增加 2.3 倍 (26.68 \pm 2.56 比 11.27 \pm 2.24, $P < 0.01$)。预先给予 CsA 可完全阻断 IPC 诱导的 CaN 活性, 与 IPC 相比较其活性下降 75% (6.6 \pm 2.25 比 26.68 \pm 2.56, $P < 0.01$)。

3 讨论

不仅短暂的缺血能诱导心肌适应性保护作用, 加热、内毒素、内皮素、去甲肾上腺素和血管紧张素等多种理化和药物及毒素的预先小剂量处理, 均能诱导与缺血预处理相似的保护作用^[1]。实验资料表明这些预处理因素均在不同程度上激活细胞蛋白激酶 C, 蛋白激酶 C 引起底物蛋白磷酸化参与了心肌适应性反应^[1,2]。分析这些预处理因素刺激心肌细胞时除激活蛋白激酶 C 外, 均可引起胞浆 $[Ca^{2+}]$ 的增加, 因而推测细胞内 Ca^{2+} 信号转导途径亦可能参与了 IPC 的心肌保护反应。近年证实磷酸酶 1、2A、2B 和 2C 可引起多种底物蛋白的去磷酸化而参与细胞内信号转导, 其中只有磷酸酶 2B (calcineurin) 是 Ca^{2+} /Calmodulin 依赖的。 Ca^{2+} /Calmodulin 激活 CaN, 后者通过使其多种底物蛋白如转录因子 NF-ATs 和收缩蛋白轻链等去磷酸化, 从而参与基因表达和细胞收缩等多种功能反应^[6,8]。

本工作在大鼠离体心脏灌流模型上发现 IPC 明显减轻后继 I/R 引起的心肌损伤。其作用表现为增加心肌收缩功能, 增加冠状动脉灌流量和降低心肌组织损伤(乳酸脱氢酶、肌红蛋白和心肌组织蛋白漏出)、降低心肌钙超载, 减轻能量(三磷酸腺苷)的严重缺失, 同时还观察到 IPC 诱导心肌 CaN 活性成倍增加。而预先应用 CaN 抑制剂 CsA 则阻断了 IPC 诱导的 CaN 的激活, 并消除了 IPC 的心脏保护作用。所观察的各项指标(IPC+CsA 组)均劣于 IPC 组而接近单纯 I/R 组。本研究提示 CaN 途径介导了 IPC 的心脏保护作用。

在 T 细胞 Calcineurin 激活参与免疫反应; 在心肌细胞 CaN 可能通过对转录因子 NF-AT3 去磷酸化, 而使后者转位入细胞核, NF-AT3 与锌指(zinc finger)转录因子 GATA4 相互作用导致了基因转录活化、基因表达增加而介导心肌肥大反应^[9]; 在血管平滑肌细胞通过磷脂酶 C 偶联到细胞表面受体而使 NF-AT 介导的转录增加参与血管舒缩反应与增殖^[10]; 在血管内皮细胞调节血管内皮通透性^[6]。CaN/CaM-CaN 介导心脏 IPC 适应性反应的机制目前尚不清楚, 与蛋白激酶 C 途径和丝裂素活化蛋白激酶途径间是否存在交联(cross-talk)关系尚需进一步研究。

参考文献

- [1] 刘秀华. 预处理保护作用的普遍性及其机理探讨[J]. 生理科学进展, 1998, 29: 39-41
- [2] 刘秀华, 王士雯, 杨军, 等. 丝裂素活化蛋白激酶系统参与大鼠心脏缺血预处理的保护机制[J]. 中华医学杂志, 1999, 79: 542-546
- [3] Liu XH, Pang YZ, Tang CS, et al. Effect of hypoxic preconditioning on protein kinase C-mediated protein phosphorylation of vascular smooth muscle cells[J]. *Pathophysiology*, 1997, 4: 191-195
- [4] Guerini D. Calcineurin: not just a simple protein phosphatase[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 235: 271-275
- [5] Klee B, Ren H, Wang X. Regulation of the calmodulin stimulated protein phosphatase Calcineurin [J]. *J Bio Chem*. 1998, 273: 367-370
- [6] Verin AD, Cooke C, Herenyiova M, et al. Role of Ca^{2+} /calmodulin-dependent phosphatase 2B in thrombin-induced endothelial cells contractile responses[J]. *Am J Physiol*, 1998, 275: L788-L799
- [7] Ranger AM, Grushy MJ, Hodge MR, et al. The transcription factor NF-ATc is essential for cardiac valve formation[J]. *Nature*, 1998, 392(6672): 186-196
- [8] De-La-Pompa JL, Timmerman LA, Takimoto H, et al. Role of the NF-ATc transcription factor in morphogenesis of cardiac valves and septum[J]. *Nature*, 1998, 392(6672): 182-186
- [9] Molkenkin JD, Lu JR, Antos CL, et al. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy[J]. *Cell*, 1998, 93: 215-228
- [10] Boss V, Abbott KL, Wang XF, et al. The cyclosporin A sensitive nuclear factor of activated T cells (NFAT) proteins are expressed in vascular smooth muscle cells. Differential localization of NFAT isoforms and induction of NFAT-mediated transcription by phospholipase C-coupled cell surface receptors[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273: 19664-671

(1999-11-26 收到, 2000-05-18 修回)
(此文编辑 朱雯霞)

•读者•作者•编者•

本刊加入万方数据资源系统(ChinaInfo)数字化期刊群的声明

为了实现科技期刊编辑、出版发行工作的电子化, 推进科技信息交流的网络化进程, 本刊现已入网“万方数据资源系统(ChinaInfo)数字化期刊群”, 所以, 向本刊投稿并录用的稿件文章, 将一律由编辑部统一纳入万方数据资源系统(ChinaInfo), 进入因特网提供信息服务。凡有不同意见者, 请另投它刊。本刊所付稿酬包含刊物内容上网服务报酬, 不再另付。

万方数据资源系统(ChinaInfo)数字化期刊群是国家“九五”重点科技攻关项目, 截止 1999 年底已有 1000 种期刊全文上网(网址: <http://www.chinainfo.gov.cn/periodical>)。本刊全文内容按照统一格式制作编入万方数据资源系统(ChinaInfo), 读者可上因特网进入万方数据资源系统(ChinaInfo)免费(一年后开始酌情收费)查询浏览本刊内容, 也欢迎各界朋友通过万方数据资源系统(ChinaInfo)向我刊提出宝贵意见、建议, 或征订本刊。

中国动脉硬化杂志编辑部

2000 年 3 月