

[文章编号] 1007-3949(2007)15-02-0093-04

• 实验研究 •

酪氨酸激酶和蛋白激酶 C 参与高铁血红素诱导的抗大鼠心肌缺血再灌注损伤

汪 洋¹, 徐和靖², 王万铁¹, 陈莹莹³, 沈岳良³, 杜友爱²

(温州医学院 1. 病理生理学教研室, 2. 生理学教研室, 浙江省温州市 325035;

3. 浙江大学医学院生理学教研室, 浙江省杭州市 310006)

[关键词] 病理学与病理生理学; 血红素氧合酶 1; 高铁血红素; 酪氨酸激酶; 蛋白激酶 C; 缺血再灌注

[摘要] 目的 研究酪氨酸激酶和蛋白激酶 C 参与高铁血红素诱导血红素氧合酶 1 在对抗心肌缺血再灌注损伤中的作用及其机制。方法 离体大鼠心脏行 Langendorff 灌注, 给予 30 min 缺血和 2 h 再灌注, 观察心室收缩功能、乳酸脱氢酶、肌酸激酶和心肌梗死面积等指标。结果 腹腔注射高铁血红素 24 h 后, 可明显改善缺血再灌注心脏的收缩功能, 减少再灌注期乳酸脱氢酶和肌酸激酶释放, 缩小心肌梗死面积。在腹腔注射高铁血红素前给予酪氨酸激酶抑制剂 Genistein 和蛋白激酶 C 抑制剂 Chelerythrine 可阻断高铁血红素引起的心肌梗死面积缩小和心功能的改善。结论 高铁血红素可诱导血红素氧合酶 1 活性增加并对抗心肌缺血再灌注损伤, 其作用与酪氨酸激酶和蛋白激酶 C 的激活有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Involvement of Tyrosine Kinase and Protein Kinase C in Hemin Reduces Ischemia/Reperfusion Injury in Rat Hearts

WANG Yang, XU He-Jing, WANG Wan-Tie, CHEN Ying-Ying, SHEN Yue-Liang, and DU You-Ai

(Department of Pathophysiology, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China)

[KEY WORDS] Heme Oxygenase 1; Hemin; Protein Kinase C; Tyrosine Kinase; Ischemia/Reperfusion

[ABSTRACT] **Aim** To investigate tyrosine kinase (TK) and protein kinase C (PKC) are related to hemin, a heme oxygenase 1 (HO-1) inducer, reduces ischemia/reperfusion (I/R) injury and which mechanisms are involved in the cardioprotective effects. **Methods** Infarct size was measured in isolated rat hearts following occlusion of the left anterior descending coronary artery for 30 min and subsequent reperfusion for 2 h. The ventricular function, lactate dehydrogenase (LDH) and creatine kinase (CK) during ischemia/reperfusion period were also observed. **Results** Infarct size, LDH and CK were reduced in the hemin (50 micrograms/kg) group compared with the control group. The myocardial performance was also improved in hemin group. Both Genistein, the inhibitor of PTK and Chelerythrine, the inhibitor of PKC blocked the infarct size-limiting effect and improvement in myocardial performance induced by hemin. **Conclusion** These data suggest that the involvement of PTK and PKC have been implicated in hemin induced cardioprotection in rat hearts.

近年来关于抗心肌缺血再灌注损伤方面的研究已很多^[1], 研究表明在多种脏器的损伤中, 血红素氧合酶 1(heme oxygenase 1, HO-1) 表现出强大的抗氧化特性。一氧化碳(carbon monoxide, CO) 作为体内重要的气体信使分子, 最早被认为主要参与血管功能的调节^[2], 而近来有文献报道一氧化碳预处理后可对抗缺血再灌注心肌损伤^[3]。而体内一氧化碳主要来源于血红素氧合酶 1 的催化作用。虽然增加体内

血红素氧合酶 1 的表达表现出的抗氧化性与其催化产物相关, 但血红素氧合酶 1 增加诱发心肌保护作用的细胞内机制还不明了。本研究观察血红素氧合酶 1 诱导剂高铁血红素对抗心肌缺血损伤的作用, 并探讨酪氨酸激酶(tyrosine kinases, TK) 和蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC) 是否参与其中。

1 材料与方法

1.1 实验动物和药品

雄性 SD 大鼠, 体重 230~250 g, 由浙江大学医学院实验动物中心提供。高铁血红素、TK 抑制剂 Genistein 和 PKC 抑制剂 Chelerythrine 购自 Sigma 公司。高铁血红素用 NaOH 溶解后, 磷酸盐调至 pH 7.4, 再用 0.85% NaCl 稀释至 12.5 g/L 作为贮备液,

[收稿日期] 2006-10-16 [修回日期] 2007-02-01

[基金项目] 浙江省教育厅科研基金(20041095)

[作者简介] 汪洋, 硕士, 讲师, 主要研究方向为心血管病理生理, E-mail 为 wangydh995@163.com。通讯作者杜友爱, 教授, 硕士研究生导师, 主要研究方向为心血管生理。王万铁, 教授, 硕士研究生导师, 主要研究方向为脏器缺血再灌注损伤防治机制。

所有操作均在避光情况下进行。

1.2 离体心脏 Langendorff 灌流模型

用木锤击昏大鼠后,迅速取出心脏,置于4℃改良K-H液中除去血液,然后迅速转移、固定于Langendorff灌流装置,以改良K-H液行常规恒压灌流(76 mmHg)。改良K-H液组成:NaCl 118.0 mmol/L, KCl 4.7 mmol/L, K₂HPO₄ 1.2 mmol/L, MgSO₄ 1.2 mmol/L, NaHCO₃ 25.0 mmol/L, CaCl₂ 1.25 mmol/L, 葡萄糖10.0 mmol/L, pH 7.4, 以95% O₂+5% CO₂饱和,维持灌流液温度37℃。采用左心室内水囊传递压力测定心室内压,通过MedLab生物信号采集处理系统(南京美易科技有限公司)记录左心室收缩曲线,并计算左心室舒张末压(left ventricular end diastolic volume, LV-EDP)、左心室发展压(left ventricular developed pressure, LVDP)、最大左心室收缩速率(+ dp/dt_{max})和最大左心室舒张速率(- dp/dt_{max})等指标。

1.3 离体心脏缺血再灌注模型

在离体心脏冠状动脉左前降支靠近分支处穿线,稳定5 min后,用丝线结扎左前降支使心肌缺血,松开结扣为再灌注处理。

1.4 心肌梗死面积测定

灌流结束后,在左前降支结扎处重新结扎,从主动脉逆行推注1%伊文斯蓝,使非缺氧区染成蓝色,心脏冰冻后,自心尖向心底平行于房室沟方向将左心室切成相等厚度的6片,将切片放在1% TTC溶液(TTC溶于pH7.8的Na₂HPO₄/NaH₂PO₄缓冲液)中孵育15 min后,在切面上看见红色的非梗死区和灰白色的梗死区。将切片扫描后,用Image图像分析软件计算梗死面积,以梗死区心肌面积占危险区面积的百分比表示。

1.5 离体心脏冠状动脉流量和酶学指标测定

在相应时点收集冠状动脉流出液,用全自动生化分析仪(美国Beckman公司, CX-4型)分析其中乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)和肌酸激酶(creatine kinase, CK)的释放量。

1.6 碳氧血红蛋白的测定

应用双波长分光光度计间接测定大鼠血中一氧化碳含量。取SD大鼠,分别腹腔注射生理盐水、高铁血红素。24 h后木锤击晕迅速取10 mL全血,经溶血处理后加入Na₂S₂O₄(保险粉),使样品中多组份的血红蛋白转化成为Hb和碳氧血红蛋白(carboxyhemoglobin, COHb)两种组份,在420 nm和432 nm波长处测定吸光度(A值),依比尔定律建立综合方

程,求出血中COHb含量。

1.7 实验分组

SD大鼠随机分为4组,每组8只: ①缺血再灌注组腹腔注射生理盐水; ②高铁血红素组腹腔注射高铁血红素50 mg/kg; ③¹²⁵I-Genistein+高铁血红素组腹腔注射TK抑制剂Genistein 0.5 mg/kg, 20 min后腹腔注射高铁血红素50 mg/kg; ④Chelerythrine+高铁血红素组静脉注射PKC抑制剂Chelerythrine 1 mg/kg, 20 min后腹腔注射高铁血红素50 mg/kg。各组处理24 h后,取离体心脏行Langendorff灌流,平衡30 min后,给予30 min缺血120 min再灌注。

1.8 统计学分析

各组资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用one-way ANOVA和Newman-Keuls post hoc test进行统计学分析。

2 结果

2.1 高铁血红素对缺血再灌注心脏的影响

腹腔注射高铁血红素24 h后,血中COHb含量为6.81% ± 0.72%,明显高于腹腔注射生理盐水组(4.22% ± 0.76%; $P < 0.01$)。心脏缺血再灌注后,左心室舒张末压明显增高,左心室发展压、±dp/dt_{max}则下降。实验前24 h给予高铁血红素,左心室舒张末压增高的现象明显受抑制($P < 0.01$; 表1);而左心室发展压、±dp/dt_{max}在缺血和再灌注期均明显增高($P < 0.01$; 表2-4)。高铁血红素对缺血再灌注心脏的心率没有明显影响。缺血再灌注5 min时,乳酸脱氢酶和肌酸激酶显著增高,而高铁血红素可部分抑制乳酸脱氢酶和肌酸激酶的增高($P < 0.01$),高铁血红素可明显缩小缺血再灌注心脏的梗死面积($P < 0.01$; 表5)。

2.2 Genistein对高铁血红素心肌保护作用的影响

腹腔注射高铁血红素前给予Genistein,可明显对抗高铁血红素抑制左心室舒张末压的作用(表1),并取消高铁血红素增高左心室发展压和±dp/dt_{max}的作用(表2-4)。同时冠状动脉流出液中乳酸脱氢酶和肌酸激酶的含量增加,缺血再灌注心脏的梗死面积增大(表5)。

2.3 Chelerythrine对高铁血红素心肌保护作用影响

腹腔注射高铁血红素前给予Chelerythrine后,左心室舒张末压明显增高($P < 0.01$; 表1),左心室发展压和±dp/dt_{max}显著降低($P < 0.01$; 表2-4)。而冠状动脉流出液中乳酸脱氢酶和肌酸激酶含量增加,心肌梗死面积增大($P < 0.01$; 表5)。

表 1. 各组左心室舒张末压的改变 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$, mmHg)

分 组	缺血前	缺血 (min)		再灌注 (min)					
		5	30	5	10	30	60	90	120
缺血再灌注组	7.6±1.3	9.7±1.7	11.6±1.6	22.7±2.0	24.1±3.6	25.4±3.4	27.5±2.6	30.0±2.4	31.7±3.3
高铁血红素组	7.9±1.2	7.9±2.7	11.8±2.2	15.3±3.3 ^a	15.3±2.9 ^a	15.8±2.5 ^a	16.9±2.5 ^a	18.7±2.1 ^a	19.8±1.7 ^a
Genistein+ 高铁血红素组	7.6±2.2	8.9±1.3	11.2±3.2	20.1±2.3 ^b	22.3±2.8 ^c	24.2±2.6 ^c	25.9±1.7 ^c	27.9±3.5 ^c	29.7±3.3 ^c
Chelerythrine+ 高铁血红素组	8.1±1.5	9.3±1.6	12.2±2.1	22.3±3.2 ^c	23.2±3.2 ^c	25.5±3.2 ^c	27.6±3.1 ^c	29.6±2.8 ^c	32.1±1.6 ^c

a 为 $P < 0.01$, 与缺血再灌注组比较; b 为 $P < 0.05$, c 为 $P < 0.01$, 与高铁血红素组比较。

表 2. 各组左心室发展压的改变 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

分 组	缺血 (min)		再灌注 (min)					
	5	30	5	10	30	60	90	120
缺血再灌注组	53.3% ±8.3%	61.3% ±10.0%	72.3% ±9.7%	77.0% ±10.2%	69.5% ±10.3%	62.8% ±7.5%	55.6% ±10.7%	50.0% ±8.9%
高铁血红素组	56.9% ±10.0%	84.8% ±8.5% ^a	95.9% ±8.4% ^a	98.8% ±6.8% ^a	95.3% ±10.3% ^a	88.1% ±7.6% ^a	81.8% ±10.1% ^a	75.0% ±10.2% ^a
Genistein+ 高铁血红素组	54.2% ±9.1%	64.4% ±8.2% ^b	80.2% ±8.0% ^b	82.6% ±6.9% ^b	78.5% ±9.1% ^b	68.9% ±9.3% ^b	62.8% ±7.8% ^b	58.6% ±8.7% ^b
Chelerythrine+ 高铁血红素组	56.1% ±10.1%	64.5% ±9.7% ^b	78.9% ±9.1% ^b	81.1% ±8.2% ^b	73.6% ±9.3% ^b	64.5% ±8.8% ^b	57.9% ±10.0% ^b	51.0% ±8.3% ^b

a 为 $P < 0.01$, 与缺血再灌注组比较; b 为 $P < 0.01$, 与高铁血红素组比较。

表 3. 各组最大左心室收缩速率的改变 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

分 组	缺血 (min)		再灌注 (min)					
	5	30	5	10	30	60	90	120
缺血再灌注组	49.0% ±8.5%	56.8% ±11.2%	62.5% ±12.6%	66.1% ±10.3%	63.8% ±8.1%	59.5% ±8.4%	56.1% ±12.2%	48.1% ±8.7%
高铁血红素组	57.0% ±11.6%	80.5% ±11.4% ^a	93.3% ±11.3% ^a	99.9% ±8.0% ^a	91.5% ±11.3% ^a	84.3% ±8.9% ^a	78.6% ±10.0% ^a	73.1% ±11.1% ^a
Genistein+ 高铁血红素组	57.5% ±10.5%	67.3% ±8.6% ^b	76.3% ±9.3% ^c	79.8% ±5.5% ^c	76.6% ±7.8% ^c	71.2% ±6.9% ^c	67.5% ±8.3% ^b	61.2% ±8.7% ^b
Chelerythrine+ 高铁血红素组	50.1% ±11.8%	66.6% ±7.0% ^c	78.1% ±8.8% ^c	78.4% ±8.3% ^c	71.5% ±9.1% ^c	63.3% ±10.5% ^c	59.3% ±10.5% ^c	53.9% ±10.2% ^c

a 为 $P < 0.01$, 与缺血再灌注组比较; b 为 $P < 0.05$, c 为 $P < 0.01$, 与高铁血红素组比较。

表 4. 各组最大左心室舒张速率的改变 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

分 组	缺血 (min)		再灌注 (min)					
	5	30	5	10	30	60	90	120
缺血再灌注组	44.4% ±12.9%	52.5% ±12.0%	61.5% ±11.0%	66.5% ±9.8%	62.4% ±8.1%	54.8% ±6.2%	49.3% ±7.6%	41.9% ±7.3%
高铁血红素组	66.6% ±10.7% ^a	74.4% ±10.6% ^a	80.0% ±9.3% ^a	88.8% ±10.4% ^a	86.8% ±10.5% ^a	81.4% ±9.0% ^a	75.0% ±8.2% ^a	69.3% ±8.2% ^a
Genistein+ 高铁血红素组	51.8% ±6.7% ^c	60.2% ±9.3% ^b	71.0% ±8.1% ^b	76.1% ±10.4% ^b	66.8% ±10.2% ^c	61.2% ±7.7% ^c	56.4% ±6.4% ^c	49.7% ±7.9% ^c
Chelerythrine+ 高铁血红素组	49.5% ±10.8% ^c	57.8% ±9.9% ^c	69.8% ±9.7% ^b	64.4% ±10.1% ^c	57.0% ±6.3% ^c	51.5% ±7.2% ^c	44.3% ±7.1% ^c	40.1% ±7.2% ^c

a 为 $P < 0.01$, 与缺血再灌注组比较; b 为 $P < 0.05$, c 为 $P < 0.01$, 与高铁血红素组比较。

表 5. 各组缺血再灌注期乳酸脱氢酶、肌酸激酶和心肌梗死面积的改变 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

分 组	梗死面积	乳酸脱氢酶 (u/L)	肌酸激酶 (u/L)
缺血再灌注组	52.5% ±6.8%	35.4% ±5.5%	24.0% ±5.2%
高铁血红素组	27.1% ±3.8% ^a	17.0% ±5.0% ^a	5.0% ±4.8% ^a
Genistein+ 高铁血红素组	57.9% ±8.7% ^b	34.8% ±9.9% ^b	28.6% ±7.7% ^b
Chelerythrine+ 高铁血红素组	53.9% ±8.6% ^b	32.9% ±7.0% ^b	23.6% ±5.9% ^b

a 为 $P < 0.01$, 与缺血再灌注组比较; b 为 $P < 0.01$, 与高铁血红素组比较。

3 讨 论

血红素氧合酶(HO)在体内催化亚铁血红素产生三种产物——铁、胆红素和一氧化碳。本实验通过测定产物一氧化碳浓度,反映高铁血红素可诱导大鼠体内血红素氧合酶 1 产生增加,并抵抗心肌缺血再灌性损伤。一氧化碳可调控血管张力和微血管血流,抑制细胞的粘附和聚集,调节细胞凋亡^[1]。本研究发现,高铁血红素诱导的心肌保护作用可通过释放一氧化碳等物质,引起一系列信号转导(如

PKC、TK 等), 最终起到细胞保护作用。而在药物性预处理(如 NO 供体、腺苷、阿片激动剂)的心肌保护作用中同样涉及到 PKC 等途径^[4,5]。大量实验表明, 预处理心肌保护作用中, PKC-epsilon 亚型转位到心肌细胞膜上, 且 PKC 在缺血前和缺血过程中长时间激活是必须的^[6]。PKC 活化后的心肌保护作用可能与减少缺血引起的联接子 Connexin 43 磷酸化的发生, 改变缝隙联接相关的细胞间电通讯状态^[7]; 降低缺血时的能量消耗^[8], 减少细胞内钙超载^[9]有关。

Fryer 等^[10]指出在缺血预处理心肌保护作用中, PKC 作为 KATP 通道的上游信号分子起作用。本研究利用工具药 Genistein 证明, 在高铁血红素诱导的心肌保护作用中 TK 的激活起了重要的作用。而其具体的机制可能通过改变 TK 和酪氨酸磷酸酶的平衡, 增加酪氨酸残基磷酸化, 抑制细胞凋亡或坏死, 增加细胞的存活率完成的^[11]。

本研究证明, 高铁血红素可诱导心肌血红素氧合酶 1 活性增加对抗心肌缺血再灌注损伤, TK 和 PKC 的激活可能参与了高铁血红素的心肌保护作用。但 TK 和 PKC 是否作为 mitoKATP 通道的上游信号分子参与高铁血红素诱导的心肌保护作用还有待于进一步实验予以证实。

[参考文献]

- [1] 张梅, 黄体钢, 杨万松, 陈元禄, 周丽娟. 预处理对心肌细胞的保护作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2000, 8 (2): 127-130.
- [2] Maines MD. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1997, 37: 517-554.
- [3] Clark JE, Naughton P, Shurey S, Green CJ, Johnson TR, Mann BE, et al. Cardioprotective actions by a water-soluble carbon monoxide-releasing molecule [J]. *Circ Res*, 2003, 93 (2): e2-8.
- [4] Stein AB, Tang XL, Guo Y, Xuan YT, Dawn B, Bolli R. Delayed adaptation of the heart to stress: late preconditioning [J]. *Stroke*, 2004, 35 (Suppl 1): 2 676-679.
- [5] Gross GJ, Auchampach JA. Blockade of ATP-sensitive potassium channels prevents myocardial preconditioning in dogs [J]. *Circ Res*, 1992, 70 (2): 223-233.
- [6] Hanlon PR, Fu P, Wright GL. Mechanisms of erythropoietin-mediated cardioprotection during ischemia-reperfusion injury: role of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase signaling [J]. *FASEB J*, 2005, 19 (10): 323-325.
- [7] Hatanaka K, Kawata H, Toyofuku T. Down-regulation of connexin 43 in early myocardial ischemia and protective effect by ischemic preconditioning in rat hearts in vivo [J]. *Jpn Heart J*, 2004, 45 (6): 1 007-019.
- [8] Xu P, Wang J, Kodavatiganti R. Activation of protein kinase C contributes to the isoflurane-induced improvement of functional and metabolic recovery in isolated ischemic rat hearts [J]. *Anesth Analg*, 2004, 99 (4): 993-1 000.
- [9] Stamm C, del Nido PJ. Protein kinase C and myocardial calcium handling during ischemia and reperfusion: lessons learned using Rhod-2 spectrofluorometry [J]. *Thorac Cardiovasc Surg*, 2004, 52 (3): 127-134.
- [10] Fryer RM, Schultz JE, Hsu AK, Gross GJ. Importance of PKC and tyrosine kinase in single or multiple cycles of preconditioning in rat hearts [J]. *Am J Physiol*, 1999, 276 (4 Pt 2): H1 229-235.
- [11] Brown TJ, Shuford WW, Wang WC, Nadler SG, Bailey TS, Marquardt H, et al. Characterization of a CD43/leukosialin-mediated pathway for inducing apoptosis in human T-lymphoblastoid cells [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271 (44): 27 686-695.

(此文编辑 文玉珊)

国际运动障碍学会继续医学教育暨帕金森病学术研讨会 会议通知

为更好地了解国内外帕金森病及运动障碍疾病临床治疗的循证医学、临床与基础研究的最新动态和发展趋势, 兹定于 2007 年 10 月 15 日~ 19 日在上海召开“国际运动障碍学会继续医学教育暨帕金森病学术研讨会”。会议的主要议题是帕金森病及运动障碍疾病的病因和发病机制、临床诊断、治疗进展及相关前沿基础研究成果。会议主要邀请国内外著名的帕金森病专家主讲帕金森病的临床诊断与治疗的循证医学及作精彩的学术报告。大会由国际运动障碍学会亚太地区执行委员会、中华医学会神经病学分会帕金森病及运动障碍学组主办, 上海医学会神经内科专科委员会、上海医学会老年医学专科委员会、上海交通大学医学院附属瑞金医院承办。本次会议将授予国家级继续医学教育 iv 类学分 10 分。

会议费用: 900 元/人(含会议资料及餐费)。住宿代为安排, 费用自理。

报名回执请于 2007 年 9 月 30 日前寄至: 上海瑞金二路 197 号, 上海交通大学医学院附属瑞金医院神经内科主任办公室(邮编: 200025); 或传真: 021-64454473 和 E-mail(rjsn197@yahoo.com.cn), 联系人: 杜敏老师。