

三磷酸腺苷后处理通过 RISK 信号通路和 mKATP 减轻兔心肌缺血再灌注损伤

王芳¹, 廉哲勋¹, 张磊², 李妮妮³, 高妮妮¹

(1. 青岛大学医学院附属医院心内科, 山东省青岛市 266003;

2. 淄博市中心医院, 山东省淄博市 255000; 3. 莱芜钢铁有限公司医院, 山东省莱芜市 271100)

[关键词] 三磷酸腺苷; 缺血再灌注损伤; 细胞凋亡; 线粒体 ATP 敏感性钾通道; 再灌注损伤挽救激酶

[摘要] **目的** 探讨再灌注损伤挽救激酶(RISK)信号通路和线粒体 ATP 敏感性钾通道(mKATP)在三磷酸腺苷(ATP)后处理减轻兔心肌缺血再灌注损伤中的作用。**方法** 选择 60 只雄性大耳白兔随机为缺血再灌注损伤组(IRI 组)、ATP 后处理组、PI3K 抑制剂 Wortmannin + ATP 后处理组(Wortmannin + ATP 组)、ERK1/2 抑制剂 PD98059 + ATP 后处理组(PD98059 + ATP 组)、选择性 mKATP 抑制剂 5-HD + ATP 后处理组(5-HD + ATP 组), 每组 12 只, 建立心肌缺血再灌注模型。采用依文思蓝和四氮唑蓝双重染色测定心肌梗死面积, TUNEL 法检测心肌细胞凋亡, Western blot 检测心肌 Akt、p-Akt、ERK1/2 及 p-ERK1/2 蛋白的表达。**结果** ATP 后处理组心肌梗死面积、心肌细胞凋亡指数明显低于 IRI 组($P < 0.01$)。Wortmannin + ATP 组、PD98059 + ATP 组和 5-HD + ATP 后处理组心肌梗死面积、心肌细胞凋亡指数与 IRI 组比较差异无统计学意义。Western blot 检测显示, ATP 后处理组 p-Akt、p-ERK1/2 表达水平明显高于 IRI 组($P < 0.05$)。**结论** ATP 后处理可通过缩小心肌梗死面积和减少心肌细胞凋亡发挥对缺血再灌注心肌的保护作用, 其机制可能与 RISK 信号通路及 mKATP 有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Role of RISK Signal Pathway and mKATP in ATP-induced Cardioprotection Against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury

WANG Fang¹, LIAN Zhe-Xun¹, ZHANG Lei², LI Ni-Ni³, and GAO Ni-Ni¹

(1. Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Medical School of Qingdao University, Qingdao, Shandong 266003, China; 2. The Central Hospital of Zibo City, Zibo, Shandong 255000, China; 3. Laiwu Iron and Steel Co., Ltd. Hospital, Laiwu, Shandong 271100, China)

[KEY WORDS] Adenosine Triphosphate; Ischemia/Reperfusion Injury; Apoptosis; Mitochondrial ATP-sensitive Potassium Channel; Reperfusion Injury Salvage Kinase

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the roles of reperfusion injury salvage kinase (RISK) signaling pathway and mitochondrial ATP-sensitive potassium channels (mKATP) in the postconditioning effect of adenosine triphosphate (ATP) for rabbits with myocardial ischemia/reperfusion injury (IRI). **Methods** Sixty white male rabbits were exposed to 40 min of ischemia followed by 180 min of reperfusion. Rabbits were intravenously injected 3 mg/kg of ATP (ATP group) or saline (IRI group) immediately after reperfusion within 30 min. The Wortmannin + ATP, PD98059 + ATP, and 5-hydroxydecanoic acid sodium salt (5-HD) + ATP groups were respectively injected with Wortmannin (PI3K inhibitor, 0.6 mg/kg), PD98059 (ERK1/2 inhibitor, 0.3 mg/kg), and 5-HD (a mKATP blocker, 5 mg/kg) 5 min before ATP administration. Myocardial infarction size was measured by Evans blue and NBT staining. Myocardial apoptosis index was determined by TUNEL methods. Expressions of myocardial Akt, p-Akt, ERK1/2 and p-ERK1/2 were detected by Western blot. **Results** The myocardial infarction size and apoptosis index were significantly lower in ATP group than those in IRI group, Wortmannin + ATP group, PD98059 + ATP group and 5-HD + ATP group ($P < 0.01$). Western blot showed that the expressions of p-Akt and p-ERK1/2 were significantly higher in ATP group than those in other four groups ($P < 0.05$).

[收稿日期] 2012-11-07

[作者简介] 王芳, 硕士研究生, 研究方向为冠心病, E-mail 为 wf8522@126.com。通讯作者廉哲勋, 主任医师, 研究方向为冠心病的介入诊断与治疗, E-mail 为 lianzhexun@medmail.com.cn。

Conclusions ATP postconditioning attenuated IRI by reducing the myocardial infarction size and apoptosis, which is mediated through activation of RISK signaling pathway and opening of mKATP.

研究表明,细胞凋亡是导致缺血再灌注损伤的重要因素,抑制再灌注时诱发的细胞凋亡,即可减轻心肌缺血再灌注损伤。研究证实,缺血预处理与缺血后处理对心肌的保护作用由一系列复杂机制参与,其中再灌注损伤挽救激酶(reperfusion injury salvage kinase, RISK)信号通路和线粒体 ATP 敏感性钾通道(mitochondrial ATP-sensitive potassium channel, mKATP)介导的抗细胞凋亡作用引人注目^[1-4]。我们前期研究证明,ATP 后处理可明显缩小心肌梗死面积及减少细胞凋亡,从而发挥抗心肌缺血再灌注损伤的保护作用^[5-7]。本研究通过复制在体兔急性心肌缺血再灌注模型,旨在观察 ATP 后处理是否通过 RISK 信号通路及 mKATP 发挥心肌保护作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物、主要药物和试剂

雄性大耳白兔 60 只,体重 2.0~2.5 kg,由山东农业科学院提供,动物合格证号为 SCXK(鲁)20100005。Wortmannin、PD98059、5-HD、伊文思蓝、氯化硝基四氮唑蓝(NBT)购于 Sigma 公司;ATP 二钠注射液购于天津药业焦作有限公司,批号 11101241;TUNEL 试剂盒购于德国 Roche 公司;兔抗 p-Akt(Ser473)、抗 Akt、抗 p-ERK1/2 和抗 ERK1/2 均购于北京博奥森生物技术有限公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔 IgG 抗体购于北京中山生物技术公司。

1.2 动物模型的制备及分组

采用 25% 乌拉坦(5 mL/kg)腹腔注射麻醉大耳白兔,描记肢体导联心电图,经右颈总动脉插入左心室导管,使用生物信号及压力测试系统(MFLlab200)监测主动脉及左心室血液动力学参数。沿胸骨左缘剪断第 3、4 肋骨,无气胸开胸,暴露心脏,提起心包并剪开,在左心耳下确定冠状动脉左前支位置,于左心室中上 1/3 水平用双股 4-0 号丝线钩绕该血管,以单股线结扎造成缺血(另一股线再灌注后用),结扎时用细小硬质胶管垫于血管与结扎线之间,结扎成功后,关闭胸腔,待 40 min 后重新打开,剪开结扎线,再灌注心肌 180 min。模型制作成功标准:结扎后心电图 II 导联 ST-T 段明显抬高,再灌注后抬高的 ST-T 段下降 1/2 以上;结扎

后左心室前壁由红色明显变暗,再灌注成功时恢复为红色。将 60 只大耳白兔随机分为 5 组,每组 12 只。缺血再灌注组(IRI 组):结扎冠状动脉左前降支 40 min,再灌注 180 min;ATP 后处理组:方法同 IRI 组,于再灌注开始时自耳缘静脉给予 ATP 3 mg/kg,共持续 30 min,持续再灌注 180 min;Wortmannin + ATP 组、PD98059 + ATP 组和 5-HD + ATP 组:方法同 IRI 组,分别于再灌注开始前 5 min 静脉注射 Wortmannin 0.6 mg/kg、PD98059 0.3 mg/kg、5-HD 5 mg/kg,再灌注开始时静脉给予 ATP 3 mg/kg,共持续 30 min,持续再灌注 180 min。IRI 组给予生理盐水。

1.3 标本采集及指标测定

灌注结束后,取缺血区左心室前壁全层心肌组织,4% 多聚甲醛固定(24 h 以内),常规脱水,透明,石蜡包埋,连续切片数张,厚约 4~5 μm ,供 TUNEL 检测。缺血区左心室前壁心肌组织 100 mg,液氮冷冻后置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。每组 12 只大耳白兔其中 6 只用于心肌梗死范围测定,另 6 只用于留取心肌组织进行细胞凋亡检测和蛋白测定。

1.3.1 心肌梗死范围测定 再灌注 180 min 后再次结扎冠状动脉左前降支,左心室内缓慢推注 3% 伊文思蓝 4 mL 以鉴别缺血危险区(无蓝色)和非缺血区(蓝色)。处死动物,速取心脏,冰冷生理盐水冲洗后剪去心房及右心室, -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰冻 20 min,将左心室自心尖向心底部横切成厚约 2 mm 的组织切片,放弃心尖和心底部部分,以朝向心尖部的切面作为面积分析切面,放入 0.05% NBT 磷酸盐缓冲液中,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min,冷生理盐水洗去残余染料,非梗死心肌呈紫蓝色,梗死心肌不着色,4% 多聚甲醛固定,各标本用固定焦距数码相机照相。德国 OPTON VIDAS 图像分析系统测定梗死范围,即以梗死面积之和占总面积的百分比为心肌梗死范围。

1.3.2 细胞凋亡测定 采用 TUNEL 试剂盒检测各组标本心肌细胞凋亡,按照试剂盒说明书操作。标记前用 DNA 酶处理切片做阳性对照,用标记液代替 TdT 酶反应液做阴性对照。每张切片随机选取 10 个视野($\times 400$),计数凋亡细胞个数和所有细胞个数,以凋亡细胞个数占所有细胞个数的百分比作为心肌细胞凋亡指数,反映各组心肌细胞凋亡情况。

1.3.3 心肌组织 Western blot 检测 将 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存的左心室肌样品取出,而后提取心肌组织总

蛋白,取上述蛋白提取液,采用 12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳进行分离,然后转至 PVDF 膜上,室温摇动封闭(TBS-T + 5% 脱脂奶粉)2 h,分别加入兔抗 p-Akt (Ser473)、兔抗 Akt (Ser473)、兔抗 p-ERK1/2 抗体和兔抗 ERK1/2 抗体(分别按 1:300、1:300、1:500、1:500 稀释)以及内参兔抗 β -微管蛋白多克隆抗体(1:500 稀释),4°C 过夜,室温下洗膜后加入辣根过氧化物酶耦联鼠抗兔抗体(1:3 000 稀释),最后用化学发光底物进行发光显迹。

1.4 统计学方法

各项观察指标以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较应用 SNK-q 检验,以 P

<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血液动力学变化

再灌注 3 h 各组间心率和平均动脉压差异无统计学意义;ATP 后处理组 + dp/dt 和 - dp/dt 与 IRI 组、Wortmannin + ATP 组、PD98059 + ATP 组及 5-HD + ATP 组比较明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),而 IRI 组、Wortmannin + ATP 组、PD98059 + ATP 组及 5-HD + ATP 组组间各指标比较差异无统计学意义(表 1)。

表 1. 再灌注 180 min 各组血液动力学比较($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 1. Comparison of hemodynamic parameters in each group

分 组	心率(次/分)	平均动脉压(mmHg)	+ dp/dt(mmHg/s)	- dp/dt(mmHg/s)
IRI 组	238.8 ± 7.3	72.5 ± 4.2	2924.3 ± 157.7	2325.0 ± 374.6
ATP 后处理组	240.2 ± 6.7	71.0 ± 5.2	4432.2 ± 221.8 ^b	4129.0 ± 136.9 ^a
Wortmannin + ATP 组	240.0 ± 6.1	72.0 ± 6.9	2872.8 ± 152.6	2162.0 ± 270.3
PD98059 + ATP 组	243.2 ± 7.5	70.5 ± 6.9	2753.8 ± 178.3	2074.7 ± 279.7
5-HD + ATP 组	237.8 ± 7.1	72.2 ± 5.9	2783.5 ± 128.9	2206.3 ± 197.5

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与其余 4 组比较。

2.2 心肌梗死面积比较

ATP 后处理组心肌梗死面积明显小于 IRI 组、Wortmannin + ATP 组、PD98059 + ATP 组及 5-HD + ATP 组 ($P < 0.01$),但 IRI 组、Wortmannin + ATP 组、PD98059 + ATP 组及 5-HD + ATP 组组间心肌梗死面积比较差异无统计学意义(表 2)。

2.3 心肌细胞凋亡比较

IRI 组、Wortmannin + ATP 组、PD98059 + ATP 组及 5-HD + ATP 组均可见较多心肌细胞凋亡;ATP 后处理组心肌细胞凋亡明显减少。ATP 后处理组心肌细胞凋亡指数明显低于 IRI 组、Wortmannin + ATP 组、PD98059 + ATP 组及 5-HD + ATP 组 ($P < 0.05$);IRI 组、Wortmannin + ATP 组、PD98059 + ATP 组及 5-HD + ATP 组心肌细胞凋亡指数比较差异无统计学意义(表 2 和图 1)。

2.4 心肌 Akt、p-Akt、ERK1/2 及 p-ERK1/2 蛋白的表达

ATP 后处理组 p-Akt、p-ERK1/2 蛋白表达水平明显高于 IRI 组、Wortmannin + ATP 组、PD98059 + ATP 组及 5-HD + ATP 组 ($P < 0.05$),而 IRI 组、Wortmannin + ATP 组、PD98059 + ATP 组及 5-HD + ATP 组 p-Akt、p-ERK1/2 蛋白表达水平比较差异无

统计学意义;ATP 后处理组 Akt、ERK1/2 蛋白表达水平与 IRI 组、Wortmannin + ATP 组、PD98059 + ATP 组及 5-HD + ATP 组比较差异无统计学意义(图 2)。

表 2. 各组心肌梗死面积及凋亡指数比较($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 2. Comparison of myocardial infarct size and apoptotic index in each group

分 组	心肌梗死面积	凋亡指数
IRI 组	29.10% ± 2.95%	27.00% ± 5.76%
ATP 后处理组	12.79% ± 1.87% ^b	10.33% ± 5.96% ^a
Wortmannin + ATP 组	26.54% ± 2.71%	20.67% ± 4.32%
PD98059 + ATP 组	27.93% ± 3.18%	25.50% ± 4.85%
5-HD + ATP 组	26.68% ± 4.65%	21.17% ± 3.60%

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与其余 4 组比较。

3 讨论

研究显示,有多种机制参与心肌缺血再灌注损伤,其中线粒体损伤机制受到研究者重视^[8]。缺血再灌注损伤引起不可逆的细胞凋亡,心肌细胞凋亡引起的心肌细胞丢失参与梗死灶的发生、发展,加重心脏泵功能损害。研究证明,线粒体与心肌缺血再灌注损伤诱导的细胞凋亡密切相关^[9]。

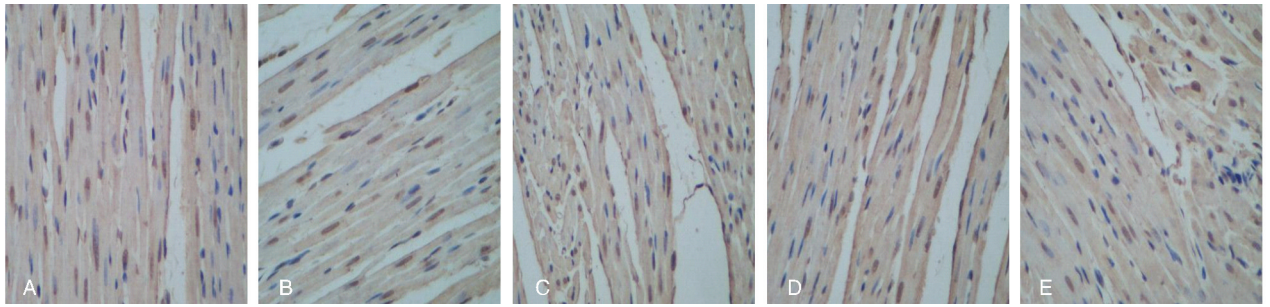


图 1. TUNEL 法检测凋亡心肌细胞(×400) A 为 IRI 组, B 为 ATP 后处理组, C 为 Wortmannin + ATP 组, D 为 PD98059 + ATP 组, E 为 5-HD + ATP 组。

Figure 1. The apoptotic cardiomyocytes were detected with TUNEL method

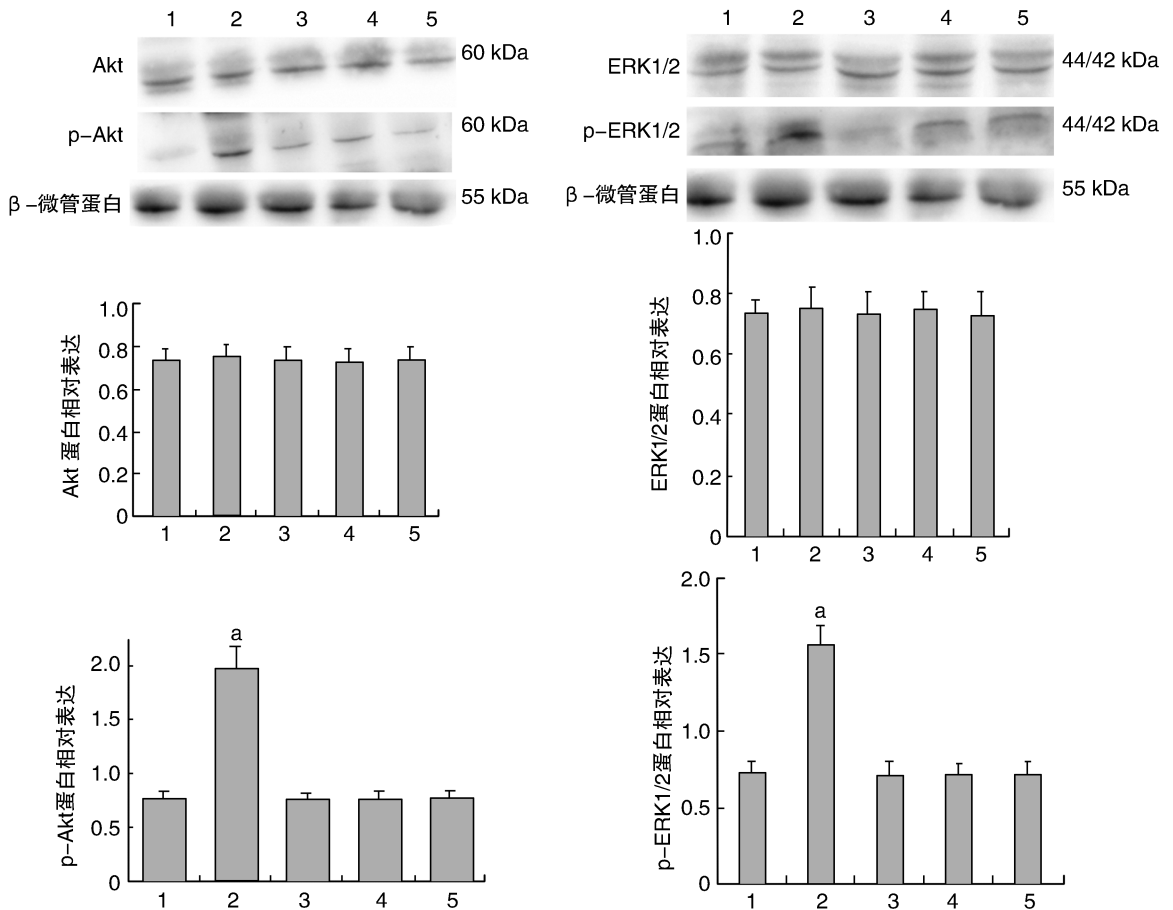


图 2. Western blot 检测各组心肌组织 Akt、p-Akt、ERK1/2、p-ERK1/2 蛋白表达水平 1 为 IRI 组, 2 为 ATP 后处理组, 3 为 Wortmannin + ATP 组, 4 为 PD98059 + ATP 组, 5 为 5-HD + ATP 组。a 为 $P < 0.05$, 与其余 4 组比较。

Figure 2. Western blot analysis of myocardial Akt, p-Akt, ERK1/2 and p-ERK1/2 in each group

RISK 信号通路(PI3K/Akt 和 ERK1/2)通过激活下游效应器,减少再灌注导致的细胞凋亡^[10,11],其中 mKATP 通道是目前公认发挥心脏保护作用多条传导通路的终末效应器。mKATP 激动剂预处理限制心肌细胞凋亡已在不同动物种属的活体、离体及心脑细胞的实验研究中得到证实^[12]。Yang 等^[13]发现,缺血后处理缩小心肌梗面积的效应可能与 PI3K、

鸟苷酸环化酶的激活以及与腺苷受体的结合率有关。Kin 等^[14]发现缺血后处理时冠状动脉内腺苷滞留时间延长,非选择性腺苷受体(adenosine receptor, AR)及 A2AR 和 A3AR 阻断剂可取消其缩小心肌梗死面积的作用,提示内源性 A2A 和 A3A 亚基可能是 RISK 通路上游刺激因子,推测延迟洗脱腺苷可能与 AR 结合,在再灌注期通过 G 蛋白耦联受

体激活 RISK 通路。我们前期研究证实,ATP 后处理通过激活 AR 发挥心肌保护作用^[5]。ATP 后处理通过抑制核因子 κ B 在细胞核中的结合活性,防止细胞质中 KB-a 蛋白丢失,下调肿瘤坏死因子 α 表达,减少心肌细胞凋亡^[6,7]。但 ATP 后处理是否通过 RISK 信号传导通路及其下游靶点 mKATP 介导抗缺血再灌注诱导的细胞凋亡而发挥心肌保护作用未有研究。

本研究发现,给予 PI3K 抑制剂、ERK 抑制剂后,与 ATP 后处理组比较,心肌梗死面积明显扩大,心肌凋亡指数明显增多,提示 PI3K/Akt 和 ERK1/2 信号通路的激活参与 ATP 后处理心肌保护机制。研究证实,再灌注时 PI3K/Akt 和 ERK1/2 其中任何一条通路被阻断,其保护作用消失,而只有同时激活两条通路才能介导心肌保护作用。

心肌缺血首先出现心肌酶漏出、收缩耦联障碍,进一步则可导致不可逆的细胞损伤和死亡,因此线粒体损伤与抗损伤机制受到重视,而 mKATP 是一组将细胞膜电活动与细胞代谢联系在一起的重要通道,在调节细胞功能中起关键作用。当线粒体基质 ATP 不足时,此通道开放,线粒体产生内向钾离子电流,线粒体基质体积短时增大,呼吸链活性显著增强,开放 mKATP 通道介导抑制心肌细胞凋亡对缺血心肌细胞起保护作用。研究证明,给予 mKATP 通道特异性拮抗剂 5-HD 后抵消了药物后处理的保护作用^[3]。本研究结果也表明,在心肌缺血再灌注之前给予 mKATP 特异性抑制剂 5-HD 后,ATP 后处理的心肌保护作用消除,5-HD + ATP 组心肌梗死面积及心肌凋亡指数改变类似 IRI 组,提示 ATP 后处理的心肌保护作用与 mKATP 的激活有关。

本研究证明,ATP 后处理的心肌保护作用可能与 RISK 信号通路及其下游靶点 mKATP 介导的抗缺血再灌注诱导的细胞凋亡并促进心肌细胞存活有关,且 ATP 作为临床常用药,经静脉注入体内后可在短时间内(0.6 ~ 10 s)代谢为腺苷,腺苷能迅速透过细胞膜进入细胞外液,导致局部腺苷聚集发挥作用,推测 ATP 在再灌注期通过腺苷介导的 G 蛋白耦联受体激活 RISK 通路及其下游靶点 mKATP 发挥保护作用。

综上所述,ATP 后处理通过腺苷介导的 G 蛋白耦联受体激活 RISK 通路及其下游靶点 mKATP 减轻缺血区心肌细胞凋亡,但其如何通过 mKATP 调节线粒体功能的具体机制有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] du Toit EF, Genis A, Opie LH, et al. A role for the RISK pathway and K(ATP) channels in pre- and post-conditioning induced by levosimendan in the isolated guinea pig heart[J]. *Br J Pharmacol*, 2008, 154 (1): 41-50.
- [2] Okorie MI, Bhavsari DD, Ridout D, et al. Postconditioning protects against human endothelial ischaemia-reperfusion injury via subtype-specific KATP channel activation and is mimicked by inhibition of the mitochondrial permeability transition pore[J]. *Eur Heart J*, 2011, 32: 1 266-274.
- [3] Sumi S, Kobayashi H, Yasuda S, et al. Postconditioning effect of granulocyte colony-stimulating factor is mediated through activation of risk pathway and opening of the mitochondrial KATP channels[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010, 299 (4): H1 174-182.
- [4] 高航, 田明慧. 厄贝沙坦对大鼠心肌缺血再灌注 PI3K/Akt 通路与细胞凋亡的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2011, 21 (30): 3 746-749.
- [5] Lian ZX, Liu F, Liu S, et al. Cardioprotection of ischemic postconditioning and ATP- postconditioning in rabbits is associated with the activation of adenosine receptors[J]. *Eur Heart J*, 2006, 27: 72.
- [6] 王永彬, 廉哲勋, 单亮, 等. ATP 后处理对兔缺血再灌注心肌细胞凋亡及 NF- κ B 表达的影响[J]. *山东医药*, 2007, 47: 17-19.
- [7] 李妮妮, 廉哲勋, 葛毅萍, 等. 缺血后处理和三磷酸腺苷后处理对心肌缺血再灌注损伤的影响[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2010, 12: 256-259.
- [8] 衣绍蕊, 张英杰. 线粒体途径保护心肌缺血再灌注损伤的研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2012, 20 (9): 861-864.
- [9] Machado NG, Alves MG, Carvalho RA, et al. Mitochondrial involvement in cardiac apoptosis during ischemia and reperfusion: Can we close the box[J]? *Cardiovasc Toxicol*, 2009, 9: 211-227.
- [10] Hausenloy DJ, Yellon DM. New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: Targeting the reperfusion injury-salvage kinase (RISK)-pathway[J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 61: 448-460.
- [11] Hausenloy DJ, Lecour S, Yellon DM. Reperfusion injury salvage kinase and survivor activating factor enhancement pro-survival signaling pathways in ischemic postconditioning: two sides of the same coin[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 14: 893-907.
- [12] Yamada M. Mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels, protectors of the heart[J]. *Physiol*, 2010, 588: 283-286.
- [13] Yang XM, Philipp S, Downey JM, et al. Postconditioning's protection is not dependent on circulating blood factors or cells but involves adenosine receptors and requires PI3-kinase and guanylate cyclase activation[J]. *Basic Res Cardiol*, 2005, 100: 57-63.
- [14] Kin H, Zaita AJ, Lofey MT, et al. Postconditioning reduces infarct size via adenosine receptor activation by endogenous adenosine[J]. *Cardio Vasc Res*, 2005, 67: 124-133.

(此文编辑 文玉珊)