

内源性降钙素基因相关肽在整体大鼠心肌缺血预适应中的作用

欧阳伟 钱学贤 李志梁 付向阳 王素华

(第一军医大学珠江医院心内科, 广州 510282)

主题词 降钙素基因相关肽, 内源性; 心肌缺血; 心肌梗死; 再灌注损伤; 心律失常; 模型, 心血管; 大鼠

摘要 为确定预适应缺血时释放的内源性降钙素基因相关肽是否在整体大鼠心肌缺血预适应中起重要作用, 分别用放射免疫法测定缺血预适应、降钙素基因相关肽多克隆抗体及对照组的血浆降钙素基因相关肽浓度。并用硝基四唑氮兰染色判定梗死区面积, 以坏死区占危险区的百分数表示。结果表明, 缺血预适应组第一次和第三次缺血末的血浆降钙素基因相关肽浓度均较对照组显著增高($P < 0.01$), 以后者增加更为明显。缺血预适应能明显抑制缺血/再灌注所致的室性心律失常的发生和降低缺血/再灌注后的心肌梗死区面积, 预先用降钙素基因相关肽多克隆抗体能明显减弱上述作用。提示降钙素基因相关肽在心肌缺血预适应中可能起重要作用。

The Roles of Endogenous Calcitonin Gene-Related Peptide on Myocardial Ischemic Preconditioning in Intact Rat

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

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

MeSH Calcitonin Gene-Related Peptide, Endogenous; Myocardial Ischemia; Myocardial Infarction; Reperfusion Injury; Arrhythmia; Models, Cardiovascular; Rats

ABSTRACT Aim To investigate whether the release of endogenous calcitonin gene-related peptide (CGRP) during preconditioning ischemic insult played an important role in myocardial ischemic preconditioning (IPC) in the intact rat model.

Methods Plasma CGRP concentration at the end of first or third ischemic insult was determined with radioimmunoassay. Infarct size as a percentage of the area at risk was determined with nitro blue tetrazolium. **Results** Mean plasma CGRP levels at the end of first and third ischemic insult were markedly increased in the IPC compared with control ($P < 0.01$), and it was markedly higher at the end of third ischemia than first in the IPC group ($P < 0.05$). IPC markedly reduced the incidences of ventricular arrhythmias during 30 min ischemia and 2 h reperfusion, which were markedly attenuated by pretreatment with CGRP-PcAb. There was a marked reduction infarct size in IPC group ($P < 0.01$) which was markedly attenuated by pretreatment with CGRP-PcAb ($P < 0.01$).

Conclusion Calcitonin gene-related peptide plays an important role in myocardial ischemic preconditioning.

近年来的研究发现, 心肌缺血时内源性心肌保护物质的释放在心肌缺血预适应(ischemic preconditioning, IPC)中起重要作用^[1]。降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)是感觉神经末梢释放的一种重要效应递质。研究发现, 一次短暂缺血发作就可引起 CGRP 明显释放^[2], 提示 CGRP 可能是一种内源性心肌保护物质。离体和整体大鼠试验表明, CGRP 预适应具有明显的心肌保护作用^[3,4]。但预适应缺血时释放的内源性 CGRP 是否在整体大鼠心肌 IPC 中起重要作用目前尚未见文献报道。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 285 ± 23 (250~350)g, 由第一军医大学动物中心提供; CGRP 多克隆抗体(polyclonal antibody, PcAb)由第一军医大学珠江医院心内科实验室制备^[5]; CGRP 放射免疫试剂盒由北京东亚免疫技术研究所提供。

1.2 大鼠缺血/再灌注模型的建立

缺血/再灌注模型的建立详见文献[4]。

1.3 实验分组

将48只 SD 大鼠随机分为四组, 每组12只。①对照组: 连续三次5 min 假性缺血/再灌注, 然后30 min

缺血/2 h 再灌注,首次假性缺血前即刻注射生理盐水。②PcAb 组:首次假性缺血前 20 min 注射 PcAb (2.5 mg/kg),其他同对照组。③IPC 组:连续三次 5 min 缺血/再灌注,然后 30 min 缺血/2 h 再灌注,首次缺血前 20 min 注射生理盐水。④PcAb+IPC 组:首次缺血前 20 min 注射 PcAb (2.5 mg/kg),其他同 IPC 组。

对照组和 IPC 组首次缺血或假性缺血末和第三次缺血或假性缺血末抽血,用放射免疫法测血浆 CGRP 浓度。

有下列情况之一的大鼠退出试验,退出的大鼠按最初随机原则重新补上: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 70 mmHg 或心率低于 240 次/min。

1.4 梗死区面积的测定

用 Evans Blue + 硝基四唑氮兰双重染色,用称重法测量梗死区大小^[4],以坏死区占危险区的百分数表示。

1.5 心律失常的记录

室性心律失常的记录和处理详见我们以前的报道^[4]。

1.6 统计学处理

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+ q 检验。率的比较用四表格的确切概率法。 $P < 0.05$ 为统计学上的显著性差异。

2 结果

2.1 血压和心率变化

对照组、IPC 组、PcAb 组和 PcAb+IPC 组四组大鼠 30 min 缺血前即刻、再灌注前即刻和再灌注末时的平均动脉压和心率与其相对应的基础值相比均无显著性差别。

2.2 血浆降钙素基因相关肽浓度变化

从表 1 (Table 1) 可以看出,IPC 组第一次和第三次缺血末的血浆 CGRP 浓度较对照组显著增高 ($P < 0.01$)。对照组第三次假性缺血末的血浆 CGRP 浓度与第一次无明显不同,但 IPC 组第三次缺血末的血浆 CGRP 浓度较第一次显著增高 ($P < 0.05$)。

2.3 缺血和再灌注所致的室性心律失常变化

从表 2 (Table 2) 可以看出,IPC 均能完全抑制持续缺血和再灌注所致室颤和室速的发生,预先用 CGRP-PcAb 均能明显减弱上述作用。另外,除持续

缺血时室颤和室速的开始时间和再灌注时室颤和室速的发生率外,PcAb+IPC 组的其他参数与对照组均无显著性差别。

表 1. 第一次和第三次预适应缺血时的血浆降钙素基因相关肽的浓度

Table 1. Plasma CGRP levels for first and third preconditioning ischemia ($\bar{x} \pm s$, pg/L)

Groups	First ischemia	Third ischemia
Control	147.8±29.7	156.3±36.4
IPC	236.6±57.3 ^a	377.0±77.4 ^{ab}

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

表 2. 30 min 缺血和 2 h 再灌注时的室性心律失常

Table 2. Ventricular arrhythmia during 30 min occlusion and 2 h reperfusion

Index	Control	PcAb	IPC	PcAb+IPC
Occlusion				
Frequency (%)	100	92	4 ^{ab}	71
Onset (min)	9±2	9±3	—	12±3 ^d
Duration (s)	135±28	139±28	—	112±35
Number	32±13	31±11	—	25±10
Reperfusion				
Frequency (%)	100	96	0 ^{ab}	62 ^d
Onset (s)	8±4	8±3	—	11±5
Duration (s)	24±8	26±9	—	22±12
Number	12±6	11±5	—	11±6

a: $P < 0.01$, d: $P < 0.05$, compared with control group; b: $P < 0.01$, compared with PcAb+IPC group

2.4 梗死区面积的变化

体重、心脏重和危险区重在对照组、IPC 组、PcAb 组和 PcAb+IPC 组间均无显著性差别。IPC 组的坏死区重 (0.04±0.04 g) 和坏死区/危险区重的百分数 (14.8±10.0%) 均较对照组 (0.13±0.03 g, 52.8±14.2%, $P < 0.01$) 显著降低,预先用 CGRP-PcAb 能明显减弱上述作用 (0.09±0.04 g, 33.5±12.7%, $P < 0.01$),但 PcAb+IPC 组的坏死区重 ($P < 0.01$) 和坏死区/危险区重的百分数 ($P < 0.01$) 仍较对照组为低。

3 讨论

我们的研究表明,在整体大鼠模型中,预适应缺血时的血浆 CGRP 浓度较对照组显著增加,且第三

次预适应缺血时增加程度较第一次更为明显。这提示在大鼠模型中,一次 IPC 所致心肌保护作用强度不及三次 IPC 明显的原因,可能与内源性保护物质需积聚到一定的程度才能发挥作用有关。IPC 时血浆降钙素基因相关肽浓度升高的原因主要与局部心肌缺血有关,后者可使心肌 pH 值下降以及乳酸堆积^[5]。另外,缺血引起的缓激肽和前列腺素的增加也可促进降钙素基因相关肽的释放^[6]。

要研究一种内源性物质的生理作用,常需用这种物质的特异性受体阻断剂或特异性抗体来阻断或中和该物质。目前已清楚,在体内存在着多种降钙素基因相关肽受体亚型^[7],但其受体阻断剂却只有一种,即 hCGRP8-37,且这种阻断剂仅能部分而不是全部阻断 α -降钙素基因相关肽的生物学作用^[8]。为了弥补这些不足,国外已开发出降钙素基因相关肽单抗或 PcAb,并用于研究降钙素基因相关肽的生理作用^[9]。我们制备了 CGRP-PcAb,并已纯化出 IgG,纯度达 90% 以上,效价达 1:50000,与血中 10 多种激素均无交叉反应^[5]。我们的研究表明,预先用 CGRP-PcAb 能显著减弱 IPC 所致的心肌保护作用,不仅减弱 IPC 限制心肌梗死范围作用,而且也减弱其抗室性心律失常作用。这表明,内源性降钙素基因相关肽可能是一种心肌保护物质,其在大鼠 IPC 中可能起重要作用。

内源性降钙素基因相关肽在心肌 IPC 中参与心肌保护作用的机理目前尚不清楚。已有研究表明,目前许多内源性保护物质参与心肌保护作用的机理均与蛋白激酶 C、G 蛋白偶联受体和/或 ATP 敏感钾通道激活有关^[1]。有研究发现,在成年哺乳动物的心室肌中,降钙素基因相关肽能增加蛋白激酶 C 活性^[4]。在另一项离体试验中,蛋白激酶 C 抑制剂能取消降钙素基因相关肽预适应的心肌保护作用^[4]。提示降钙素基因相关肽保护心肌的机理可能与蛋白激酶 C 激活有关。另外,血管中 ATP 敏感钾通道开放是降钙素基因相关肽重要降压作用机理之一,但有

研究发现,在离体试验中,降钙素基因相关肽不能直接开放心房肌内的 ATP 敏感钾通道^[10]。因此,有关这方面的问题还有待于今后进一步研究。

参考文献

- 1 James RP. Protection of the heart by ischemia preconditioning: mechanisms and possibilities for pharmacological exploitation. *TIPS*, 1994, **15**(1): 19-25
- 2 Franco-cereceda A. Calcitonin gene-related peptide and tachykinins in relation to local sensory control cardiac contractility and coronary vascular tone. *Acta Physiol Scand*, 1988, **133**(Suppl 596): 53-63
- 3 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
- 4 欧阳伟,钱学贤,付向阳,等. 降钙素基因相关肽预适应对整体大鼠心肌缺血/再灌注损伤的保护作用. *中国动脉硬化杂志*, 1998, **6**(3): 228-232
- 5 欧阳伟,钱学贤,李志梁,等. 降钙素基因相关肽抗血清的制备和纯化. *第一军医大学学报*, 1998, **18**(1): 64
- 6 Franco-cereceda A, Saria A, Lundberg JM. Differential release of calcitonin gene-related peptide and neuropeptide Y from the isolated heart by capsaicin, ischaemia, nicotine, bradykinin and ouabain. *Acta Physiol Scand*, 1989, **135**: 173-187
- 7 Erangelista S, Tramontans M, Maggi CA. Pharmacological evidence for the involvement of multiple calcitonin gene-related peptide(CGRP) receptors in the antisecretory and antinuclear effect of CGRP in rat stomach. *Life Sci*, 1992, **50**: PL3-8
- 8 Maggi CA, Chiba T, Guilianni S. Human α -calcitonin gene-related peptide-(8-37) as an antagonist of exogenous and endogenous calcitonin gene-related peptide. *Eur J Pharmacol*, 1991, **192**: 85-88
- 9 Wong HC, Tache Y, Liloyd KCK, et al. Monoclonal antibody to rat α -CGRP: Production, characterization, and in vivo immunoneutralization activity. *Hybridoma*, 1993, **12**(1): 93-105
- 10 Kim D. Calcitonin gene-related peptide activates the muscarinic-gated K⁺ current in atrial cells. *Pflugers Arch*, 1991, **418**(4): 338-345

(此文1998-10-05收到,1999-02-13修回)

(此文编辑 朱雯霞)