

运动预处理后内源性阿片肽对大鼠心肌缺血再灌注损伤的延迟性保护作用*

王 强¹ 闻剑飞¹ 汪 辉¹ 陆保云¹ 宋 旭¹

摘要

目的:探讨运动预处理后内源性阿片肽(EOP)对大鼠心肌缺血再灌注损伤延迟性保护作用及机制。

方法:健康雄性SD大鼠75只,随机分成假手术组(sham组)、缺血再灌注模型组(I/R组)、运动预处理组(EP组)、运动预处理+纳洛酮(naloxine)组(EPN组)、运动预处理+白屈菜赤碱(chelerythrine)组(EPC)。在运动预适应模型基础上,结扎左冠状动脉前降支复制大鼠心肌缺血再灌注模型,采用多道生理记录仪描记血流动力学参数,用酶联免疫法(ELISA)检测血清心肌钙蛋白 I (cTn I)和心肌环氧化酶-2(COX-2),用化学比色法检测心肌诱导型一氧化氮合酶(iNOS)活性,用黄嘌呤氧化法检测心肌超氧化物歧化酶(Mn-SOD)活性,用原子分光光度法检测心肌中钙离子(Ca^{2+})浓度。

结果:①与I/R组相比,EP组在再灌注期左室收缩压(LVSP)、左室内压最大上升速率($+\text{dp}/\text{dt}_{\text{max}}$)降低幅度明显减小($P < 0.05$);与EP组相比,EPC组在再灌注60min后 $+\text{dp}/\text{dt}_{\text{max}}$ 值下降幅度明显,且差异具有显著性($P < 0.05$)。②与I/R组相比,EP组血清cTn I明显减少,具有显著性差异($P < 0.05$);与EP组相比,EPN组和EPC组中血清cTn I值明显升高,有显著性意义($P < 0.05$)。③与I/R组相比,EP组、EPN组和EPC组心肌中Mn-SOD、iNOS和COX-2活性明显升高,差异有显著性($P < 0.05$);与EP组相比,EPC组心肌COX-2和iNOS显著降低($P < 0.05$),EPN组心肌COX-2显著降低($P < 0.05$)。④与I/R组相比,EP组心肌细胞胞浆中 Ca^{2+} 浓度明显降低,具有显著性差异($P < 0.05$),EPN组和EPC组心肌细胞胞浆中 Ca^{2+} 浓度有降低趋势,但差异不显著;与EP组相比,EPN组和EPC组中心肌细胞胞浆中 Ca^{2+} 浓度明显升高,有显著性意义($P < 0.05$)。

结论:运动预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤有保护作用,内源性阿片肽可能通过蛋白激酶C(PKC)及下游信号途径减轻心肌细胞钙超载和改善微循环,发挥延迟性保护效应。

关键词 运动预处理;阿片肽;心肌缺血再灌注;延迟心肌保护

中图分类号:R542.2, R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2015)-10-995-07

Delayed cardioprotection of endogenous opioid peptides in rats with myocardial ischemic reperfusion injury after exercise preconditioning/WANG Qiang, WEN Jianfei, WANG Hui, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2015, 30(10): 995—1001

Abstract

Objective: To explore the delayed protective effect and mechanism of endogenous opioid peptides (EOP) in rats with myocardial ischemic reperfusion injury after exercise preconditioning.

Method: Seventy-five health male SD rats were randomly divided into sham; ischemic reperfusion injury (I/R), exercise precondition (EP), exercise precondition + naloxone (EPN) and exercise precondition + chelerythrine (EPC) group. After establishing of EP animal model, the rats were ligated ramus descending coronary artery to induce myocardial ischemic reperfusion. Then the parameter of hemodynamics were traced, and serum cardiac troponin I (cTn I), myocardium cyclooxygenase (COX-2) was detected by enzyme linked immunosorbent assay

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2015.10.004

*基金项目:安徽省高校省级优秀青年人才基金重点项目(2012SQRW126ZD);安徽省高校省级自然科学基金项目(KJ2012Z326)

1 合肥师范学院体育科学学院,230601

作者简介:王强,男,副教授; 收稿日期:2015-05-26

(ELISA), myocardium iNOS was detected by colorimetric method, myocardium manganese-superoxide dismutase (Mn-SOD) was detected by xanthine hydrocarbonylation and myocardium Ca^{2+} density was detected by atom absorption spectrophotometry.

Result: ① As compared with group I/R, reduce range of left ventricular systolic pressure(LVSP), $\pm dp/dt_{\max}$ decreased significantly in group EP during reperfusion 60min ($P < 0.05$); As compared with group EP, $\pm dp/dt_{\max}$ decreased significantly in group EPC during reperfusion 60min ($P < 0.05$). ② As compared with group I/R, serum cTn I decreased significantly in group EP ($P < 0.05$); As compared with group EP, cTn I level in serum increased in group EPN and EPC ($P < 0.05$). ③ As compared with group I/R, Mn-SOD, COX-2, iNOS in myocardium increased significantly in group EP, EPN and EPC ($P < 0.05$). As compared with group EP, COX-2, iNOS in myocardium decreased significantly in group EPC ($P < 0.05$), COX-2 in myocardium decreased significantly in group EPN ($P < 0.05$). ④ As compared with group I/R, Ca^{2+} level in myocardial sarcoplasmic reticulum decreased significantly in group EP ($P < 0.05$), myocardial sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} decreased without statistical significance in group EPN and EPC ($P > 0.05$); As compared with group EP, Ca^{2+} level in cardiac muscle cell endochylema was increased significantly in group EPN and EPC ($P < 0.05$).

Conclusion: EOP mitigates myocardial ischemic reperfusion injury significantly via improving microcirculation and maintaining intracellular calcium homeostasis, by activating protein kinase C(PKC) and down stream signal way may play a crucial role in EP delayed phase.

Author's address School of Physical Education,Hefei Normal University,230601

Key word exercise preconditioning; opioid peptides; myocardial ischemic reperfusion; delayed cardioprotection

1986年Murry等^[1]在犬心肌缺血-再灌注模型中发现,预先反复多次、短暂施予缺血预处理(ischemic preconditioning, IP)可以减轻随后缺血-再灌注造成的心肌坏死、心律失常和心肌舒缩功能障碍等损伤。随着研究的不断深入和拓展,人们陆续发现药物预适应、低氧预适应、运动预适应、肢体远端缺血预适应等也可以产生类似IP的心肌保护效应。高强度、短时间间歇运动可以造成心肌相对缺氧-复氧模拟IP诱导心肌保护作用,这种由运动预处理引发的心肌保护效应称为运动预适应(exercise preconception, EP)。研究发现,EP对心肌缺血再灌注的保护作用与IP相似,可分为早期保护时相和延迟保护时相,前者发生在运动预处理后即刻并持续1—2h,后者出现在运动预处理后12—24h,并可以持续数日^[2]。近年来,EP心脏保护现象日益受到关注,但其发生机制还有待深入研究。

内源性阿片肽是一大类在体内具有镇痛效应的物质,迄今为止共发现确定了脑啡肽、强啡肽、内啡肽、孤啡肽和内吗啡肽5个亚族。阿片肽及其受体广泛分布于神经系统,后来发现包括心血管系统在内的多个外周系统能分泌阿片肽并表达相应受体。大量研究证实,内源性阿片肽在IP心脏保护早期和

延时性保护作用中发挥保护效应,并可能由心肌细胞膜上 δ 、 κ 受体介导^[3-5]。Galvão等^[6]研究发现,运动预处理能减少大鼠心肌缺血再灌注期心肌梗死面积,而使用特异性阿片受体阻断剂纳洛酮能部分消除EP的心肌保护效应。我们前期的研究发现,吗啡联合运动预处理大鼠可以对心肌缺血再灌注产生延迟性心肌保护效应,且二者具有协同作用,这一效应可被阿片受体阻断剂纳洛酮取消,表明内源性阿片肽在EP延迟性心肌保护中的重要作用^[7]。那么,EP延迟性保护过程中内源性阿片肽发挥怎样的作用,以及作用机制如何尚未见报道。因此,本实验采用在体心肌缺血再灌注模型,观察运动预处理延迟时相细胞内源性保护蛋白的变化以及对心肌缺血再灌注损伤的作用,进一步探讨内源性阿片肽及受体在EP延迟相中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

健康雄性SD大鼠90只(由扬州大学比较医学动物中心提供),体重为(220 $\pm$ 20)g,常规分笼饲养,5只/笼,自由饮水摄食,室温控制在26—28℃,相对湿度40%—60%,自然采光。大鼠购回后,按照10m/

min的速度进行10min/d跑台运动,适应1周,剔除不能正常运动的个体,选取75只,按体重分层,随机分成假手术组(sham)、缺血再灌注模型组(IR)、运动预适应组(EP)、运动预适应+纳洛酮阻断组(EPN)、运动预适应+白屈菜赤碱组(EPC)。

①sham组,大鼠静置于跑台上,连续3d不运动,最后一次结束后24h麻醉进行手术,只穿线不结扎;②IR组,大鼠静置于跑台上,连续3d不运动,最后一次结束后24h麻醉进行手术,穿线结扎冠状动脉前降支,复制I/R模型;③EP组,采用短期运动预适应模型,连续进行3d间歇性跑台运动,最后一次运动结束后24h麻醉进行手术,穿线结扎冠状动脉前降支,复制I/R模型;④EPN组,运动方案同EP组,最后一次运动前15min静脉注射纳洛酮(0.1mg/kg),运动结束后24h再麻醉进行手术,穿线结扎冠状动脉前降支,复制I/R模型;⑤EPC组,运动方案同EP组,最后一次运动后24h腹腔注射白屈菜赤碱(1mg/kg),再麻醉进行手术,穿线结扎冠状动脉前降支,复制I/R模型。

1.2 主要仪器和试剂

高速低温离心机(TGL-16G-A,上海安亭),多道生理记录仪(BL-420S,成都泰盟),紫外可见分光光度计(SHIMADZU,日本岛津),原子吸收分光光度计(AA-7000,日本岛津)。心肌肌钙蛋白I检验试剂盒(美国,武汉优尔生公司进口分装),诱导型一氧化氮合酶检验试剂盒(美国,武汉优尔生公司进口分装)。

1.3 动物模型的建立

1.3.1 大鼠心肌缺血再灌注模型的建立:大鼠以戊巴比妥钠(30g/L, 5ml/kg)腹腔注射麻醉,仰卧位固定于手术台,气管插管,采用微型动物呼吸机机械通气,右颈动脉插管至左心室,连接多道生理记录仪记录血流动力学指标,监测肢体II导联心电图,于胸骨左侧第4—5肋间开胸,暴露心脏,剪开心包膜,除sham组冠状动脉左前降支只穿线不结扎,其余各组在冠脉左前降支距左心耳下缘2mm处进针,穿过表层于肺动脉圆锥旁出针,用直径约2mm的PE管穿过结扎线,稳定15min后行缺血30min再灌注60min,复制心肌缺血再灌注模型,以心电图ST段明显抬高,T波倒置,结扎线以下心肌组织由红色变为

苍白或紫绀为心肌缺血标志。

1.3.2 大鼠运动预适应模型的建立:利用本课题组前期研究^[7]建立运动预适应动物模型,EP组、EPN组和EPC组大鼠进行连续3d的间歇性跑台运动,运动速度为35m/min,坡度为0°,运动时间为60min,按照运动15min,休息5min为一组,重复3组,以模拟反复多次的短暂心肌缺血再灌注。每次训练开始前,先进行5min适应跑,从15m/min逐渐增加到35m/min,训练后5min内再从35m/min逐渐降至15m/min。

1.4 动物取材与样本制备

于缺血前30min,缺血后30min以及再灌注60min后记录心电图和血流动力学指标。再灌注60min后,经腹主动脉取血5ml,静置30min后离心,取上清液-20℃保存备用。再灌注60min后,取血结束后即刻取出心脏,经预冷的灭菌生理盐水清洗后,置于液氮中,-80℃冻存备用。

1.5 指标测试与方法

1.5.1 血流动力学指标:经右侧颈总动脉插管至左心室,由生理压力传感器输出至多道生理记录仪,自动读取左室舒张末期压(left ventricular end diastolic pressure, LVEDP),左室收缩压(left ventricular systolic pressure, LVSP)和左室内压最大变化速率($\pm dp/dt_{max}$)。

1.5.2 血清心肌肌钙蛋白I(cardiac troponin I, cTn I)的测定:采用酶联免疫吸附法(ELISA)测定血清cTn I,按试剂盒上说明要求测定。

1.5.3 心肌Mn-SOD、COX-2、iNOS的测定:心肌组织在含有1μg/L蛋白酶抑制剂(protease inhibitor)的磷酸缓冲盐溶液(PBS)中匀浆,低温离心机(4℃)上高速离心15min(12000r/min),取上清出储存于-80℃冰箱中。按照NOS试剂盒说明采用化学比色法测定心肌诱导型一氧化氮合酶(iNOS)活性。按照超氧化物歧化酶试剂盒说明采用黄嘌呤氧化酶法在紫外可见光分光光度计上测定Mn-SOD。按照环氧化酶-2(COX-2)试剂盒采用酶联免疫法测定COX-2活性。按总蛋白定量试剂盒采用BCA法进行蛋白质定量。

1.5.4 心肌细胞内Ca²⁺浓度测定:使用去离子水按照100:1稀释心肌匀浆液,采用原子吸收分光光度

法在 WFX-1F 原子吸收分光光度计上测定心肌组织中 Ca^{2+} 浓度。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 18.0 统计软件处理实验数据, 所用数据均以均数 $\pm$ 标准差表示, 组间两两比较采用单因素方差检验。

2 结果

2.1 血流动力学变化

各组在缺血期(I期)和再灌注期(R期), LVSP 和 $\pm\text{dp}/\text{dt}_{\text{max}}$ 较缺血前(B期)均下降, LVEDP 较缺血前则上升; 与 sham 组相比, I/R 组、EPN 组和 EPC 组在缺血 30min 和再灌注 60min 后 $\pm\text{dp}/\text{dt}_{\text{max}}$ 较显著降低, 有显著性意义 ($P < 0.05$), I/R 组、EP 组、EPN 组和 EPC 组 LVSP 值在再灌注 60min 后均降低, 但无显著性差异; EP 组 $\pm\text{dp}/\text{dt}_{\text{max}}$ 值在缺血 30min 和再灌注 60min 降低, 但无显著性意义, EP 组在缺血 30min 和再灌注 60min 后 LVEDP 和 EPC 组再灌注 60min LVEDP 明显上升, 有显著性意义 ($P < 0.05$), 其他各组均有上升趋势, 但差异不显著; 与 I/R 组相比, EP 组、EPN 组和 EPC 组在缺血后 LVSP、LVEDP 和 $\pm\text{dp}/\text{dt}_{\text{max}}$ 降低幅度减小, 但没有显著性差异, EP 组在再灌注期 LVSP、 $\pm\text{dp}/\text{dt}_{\text{max}}$ 降低幅度明显减小 ($P < 0.05$); 与 EP 组相比, EPN 组和 EPC 组在缺血期 $\pm\text{dp}/\text{dt}_{\text{max}}$ 和 LVSP 有降低趋势, LVEDP 则有增加趋势, 但均无显著性差异, 但在再灌注 60min 后 EPC 组 $\pm\text{dp}/\text{dt}_{\text{max}}$ 值下降幅度明显, 且具有显著性差异 ($P < 0.05$)。与 EPN 相比, EPC 组各项指标变化不显著。表明运动预适应在一定程度上可以改善延迟时相缺血再灌注心肌的舒缩功能, 而内源性阿片肽及受体和 PKC 可能部分参与介导了这一保护作用。见表 1。

2.2 血清心肌肌钙蛋白 I 浓度的变化

血清 cTn I 是衡量心肌损伤快速、敏感的指标, sham 组血清 cTnI 浓度为 0.11 ± 0.04 (ng/ml), I/R 组为 27.64 ± 5.55 (ng/ml), EP 组为 17.51 ± 4.09 (ng/ml), EPN 组为 23.32 ± 4.18 (ng/ml), EPC 组为 22.74 ± 4.44 (ng/ml)。与 sham 组相比, 各组血清 cTn I 均明显升高, 有显著性差异 ($P < 0.05$); 与 I/R 组相比, EP 组血清 cTn I 明显减少, 具有显著性差异 ($P < 0.05$), EPN 组和 EPC 组血清 cTn I 降低, 但差异不显著; 与 EP

表 1 血流动力学指标在缺血前、缺血 30min 和再灌注 60min 后的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别/时相	LVSP (kPa)	LVEDP (kPa)	$+\text{dp}/\text{dt}_{\text{max}}$ (kPa/s)	$-\text{dp}/\text{dt}_{\text{max}}$ (kPa/s)
sham 组				
B	21.25 ± 4.14	0.64 ± 0.28	$+352 \pm 78$	-284 ± 63
I	21.13 ± 4.39	0.61 ± 0.32	$+346 \pm 74$	-291 ± 77
R	20.47 ± 5.72	0.62 ± 0.34	$+335 \pm 81$	-284 ± 75
I/R 组				
B	20.79 ± 4.55	0.62 ± 0.31	$+346 \pm 83$	-279 ± 69
I	15.61 ± 8.73^{①}	0.73 ± 0.28^{①}	$+275 \pm 98^{①}$	-216 ± 104^{①}
R	13.49 ± 8.68	0.74 ± 0.30^{①}	$+243 \pm 99^{①}$	-197 ± 107^{①}
EP 组				
B	21.39 ± 5.01	0.59 ± 0.31	$+348 \pm 85$	-287 ± 69
I	18.27 ± 9.34	0.63 ± 0.34	$+305 \pm 97$	-249 ± 84
R	17.95 ± 9.62	0.64 ± 0.35	$+296 \pm 113^{②}$	-232 ± 98
EPN 组				
B	20.53 ± 4.97	0.60 ± 0.29	$+339 \pm 75$	-277 ± 66
I	17.09 ± 9.58	0.67 ± 0.35	$+282 \pm 92^{①}$	-243 ± 97^{①}
R	15.83 ± 8.63	0.70 ± 0.33	$+267 \pm 94^{①}$	-226 ± 93^{①}
EPC 组				
B	21.33 ± 5.05	0.62 ± 0.30	$+348 \pm 68$	-286 ± 72
I	16.77 ± 10.42	0.70 ± 0.35	$+287 \pm 95^{①}$	-235 ± 85^{①}
R	14.61 ± 9.75	0.72 ± 0.37^{③}	$+255 \pm 114^{①③}$	-216 ± 105^{①}

与 sham 组比较: ① $P < 0.05$; 与 I/R 组比较: ② $P < 0.05$; 与 EP 组比较: ③ $P < 0.05$

组相比, EPN 组和 EPC 组中血清 cTn I 值明显升高, 有显著性意义 ($P < 0.05$); 与 EPN 组相比, EPC 组血清 cTn I 有升高趋势, 但差异不显著。表明运动预适应具有维持缺血再灌注心肌细胞超微结构的完整, 减少心肌酶的漏出, 发挥延迟性保护作用, 并且可能是由内源性阿片肽及受体触发和 PKC 参与介导了上述保护过程。

2.3 心肌 Mn-SOD、COX-2、iNOS 活性变化

心肌 Mn-SOD、COX-2、iNOS 是重要的保护蛋白, 它们所触发保护作用对减轻心肌缺血再灌注损伤有重要作用。与 sham 组相比, I/R 组心肌中 Mn-SOD 活性明显降低, 有显著性意义 ($P < 0.05$), 其余各组差异不显著; 与 I/R 组相比, EP 组、EPN 组和 EPC 组心肌中 Mn-SOD 活性明显升高, 有显著性差异 ($P < 0.05$); 与 EP 组相比, EPN 组和 EPC 组心肌 Mn-SOD 有降低趋势, 但差异不明显; EPN 组与 EPC 组间差异不显著。与 sham 组相比, 各组心肌中 COX-2 活性均显著升高 ($P < 0.05$); 与 I/R 组相比, EP 组、EPN 组和 EPC 组心肌 COX-2 活性均明显升高, 有显著性差异 ($P < 0.05$); 与 EP 组相比, EPN 组心肌 COX-2 活性有降低趋势, 但差异不显著, EPC

组心肌 COX-2 则显著降低 ($P < 0.05$); EPC 组与 EPN 组心肌中 COX-2 活性变化不明显。与 sham 组相比, EP 组、EPN 组和 EPC 组心肌中 iNOS 活性明显升高, 有显著性差异 ($P < 0.05$), I/R 组差异不显著; 与 I/R 组相比, EP 组、EPN 组和 EPC 组心肌中 iNOS 活性明显升高, 有显著性差异 ($P < 0.05$); 与 EP 组相比, EPN 组与 EPC 组心肌中 iNOS 活性明显降低, 有显著性差异 ($P < 0.05$); EPN 组与 EPC 组差异不显著。见表 2。

表 2 大鼠心肌 Mn-SOD、COX-2、iNOS 变化 ($\bar{x} \pm s$, U/mg)

组别	Mn-SOD	COX-2	iNOS
sham 组	2.45±1.76	3.73±1.87	0.51±0.18
I/R 组	1.74±0.92 ^①	5.81±2.02 ^①	0.47±0.15
EP 组	2.47±1.46 ^②	12.49±4.39 ^{①②}	1.18±0.36 ^{①②}
EPN 组	2.26±1.33 ^②	9.84±3.36 ^{①②}	0.75±0.24 ^{①②③}
EPC 组	2.15±1.57 ^②	8.82±3.27 ^{①②③}	0.69±0.25 ^{①②③}

①与 sham 组比较 $P < 0.05$; ②与 I/R 组比较 $P < 0.05$; ③与 EP 组比较 $P < 0.05$

2.4 心肌细胞内 Ca²⁺浓度变化

心肌细胞胞浆中 Ca²⁺是心肌细胞内重要的信号分子,同时也介导了心肌缺血再灌注损伤。sham 组心肌细胞内 Ca²⁺浓度为 5.72±2.06 (mmol/mg), I/R 组为 13.17±3.49 (mmol/mg), EP 组为 7.96±2.70 (mmol/mg), EPN 组为 11.74±3.20 (mmol/mg), EPC 组为 10.35±2.69 (mmol/mg)。与 sham 组相比,各组心肌细胞胞浆中 Ca²⁺浓度均明显升高,有显著性差异 ($P < 0.05$); 与 I/R 组相比, EP 组心肌细胞胞浆中 Ca²⁺浓度明显降低,具有显著性差异 ($P < 0.05$), EPN 组和 EPC 组心肌细胞胞浆中 Ca²⁺浓度有降低趋势,但差异不显著; 与 EP 组相比, EPN 组和 EPC 组中心肌细胞胞浆中 Ca²⁺浓度明显升高,有显著性意义 ($P < 0.05$); EPN 组与 EPC 组间心肌细胞胞浆中 Ca²⁺差异不显著。

3 讨论

3.1 运动预适应对心肌缺血再灌注的延迟性保护作用

运动预适应与许多预适应手段一样不仅可以模拟心肌缺血预适应保护效应,而且在保护时相上有相近性,即预适应早期保护时相(发生在预适应后 30min—3h)和延迟性保护时相(发生在预适应后 24h—72h)。Domenech 等^[2]研究发现,对犬实施反复

短暂的大强度间歇性跑台运动,可降低即刻和 24 小时后心肌缺血再灌注的心肌梗死面积。翟庆峰等^[8]利用大鼠进行多次短时间大强度间歇跑台运动建立运动预适应模型,通过离体和在体实验证实,EP 能对大强度运动所致的心脏相对缺血再灌注损伤起到延迟性保护作用。本研究组在前期的研究^[7]对大鼠进行大强度间歇跑台运动(每天运动 60min,速度 35m/min,运动 15min 休息 5min,重复 3 组,共 3d),成功建立大鼠 EP 模型,并证实 EP 的延迟性保护作用,进一步研究发现,EP 与外源性阿片类药物吗啡预处理有协同效应,协同保护作用可以被阿片受体阻断剂取消。提示 EP 保护机制可能涉及阿片受体后信号通路。据此本实验利用已经建立的 EP 模型,观察运动预处理后内源性阿片肽的变化,探讨 EP 延迟性保护作用机制。

3.2 阿片肽及受体介导的心肌缺血预适应延迟性保护作用

多项研究证实^[9-10],哺乳动物心肌组织和独立的心肌细胞中存在脑啡肽、强啡肽和相应前体物质,其含量会受到心脏生理和病理变化的影响,当心脏受到应激刺激时脑啡肽和强啡肽合成、释放增加,同时其受体表达亦上调。研究表明^[11-12],心肌细胞膜和亚细胞器膜均存在阿片受体,人体心脏表达 δ 、 κ 、 μ -OR 三种受体,成年大鼠心脏则以 δ 、 κ -OR 为主。大量研究证实了内源性阿片物质及受体参与介导了 IPC 延迟性保护作用。Watson 等^[13]研究证实,非肽类 δ 阿片受体激动剂 ARD-353 能减少 12h 和 48h 后大鼠心肌梗死面积。Fryer 等^[14]发现, δ 1 阿片受体激动剂 TAN-67 用药后 24—48h 可产生心脏保护作用。而且这一保护效应可被选择性 δ 1 阿片受体拮抗剂 BNTX 所取消,亦可被选择性线粒体 KATP 通道拮抗剂 5-HD 所取消。这些结果表明, δ 1 阿片受体激动剂介导的延迟心脏保护作用为线粒体 KATP 通道所介导的。Fryer 等^[9]已经证实, δ 1 阿片受体激动剂 TAN-67 介导了延迟性心脏保护作用,而且这一保护效应可被 ERK 选择性阻滞剂 PD098095 和 P38 选择性阻断剂 SB203580 所取消,表明 ERK 和 P38 参与了心肌缺血预适应延迟性心脏保护的细胞信号转导。上述研究说明,内源性阿片肽及受体参与介导了心肌缺血预适应心肌保护的作用。

3.3 内源性阿片肽介导的运动预适应对心肌缺血

再灌注延迟性保护作用及可能机制

心肌缺血-再灌注损伤时,心肌的功能、代谢和结构均发生明显变化,主要表现为心肌舒缩功能下降、心律失常、心肌ATP合成障碍和心肌细胞超微结构破坏等。血清心肌肌钙蛋白I是目前临床上公认衡量心肌受损的“金标准”,具有灵敏性高、特异性强、出现早、持续时间长等特点^[15]。正常生理状态下,cTn I主要以结合的形式存在于肌原纤维上,少部分游离在细胞胞浆中,cTn I不能自由穿过细胞膜,血液中含量极低,当细胞膜结构受损,可弥散至细胞间质,从而进入血液循环。心肌缺血再灌注导致氧化损伤,细胞膜受损,同时细胞内钙超载,胞内高钙可激活钙蛋白酶钙依赖性降解酶,引起胞内肌纤维挛缩和断裂,心肌细胞胞浆中游离肌钙蛋白增加,cTn I漏出增加。本研究结果显示,心肌缺血再灌注引起血清cTn I升高,运动预处理24h后能减少IPC的cTn I漏出,这一保护作用可以被阿片受体阻断剂纳洛酮阻断,表明EP晚期在维持心肌缺血再灌注时细胞超微结构完整性,减少I/R损伤中发挥重要作用,上述效应可能部分由阿片肽及受体介导。

左室收缩压、左室舒张末期压和左室内压最大上升/下降速率等血流动力学参数是评估心脏舒缩功能的基本指标。心肌缺血再灌注发生时,心肌能量代谢障碍,ATP合成不足,引起心肌收缩力减弱,LVSP减小,射血期泵血减少,心脏后负荷增加,导致LVEDP增加,心肌收缩力的降低使反映心脏收缩能力的参数+dp/dt_{max}减小,细胞内钙超载导致心肌纤维挛缩断裂,心肌顺应性和舒张功能下降,表现为-dp/dt_{max}减小。本研究结果显示,运动预处理24h后能减轻心肌缺血再灌注引起心脏舒缩功能障碍,使各项血流动力学指标相对稳定,表明由内源性阿片肽及受体介导EP具有维持心肌在缺血和再灌注期的舒缩功能,而这一效应可能与细胞内抗氧化能力增强和钙稳态维持有关。

心肌缺血-再灌注损伤的始动因素是能量代谢障碍,直接的损伤因素是氧自由基,结果导致细胞内钙超载,并形成恶性循环,其发生机制包括氧自由基、钙超载、白细胞损伤和微循环障碍等。心肌缺血再灌注损伤过程中细胞内钙超载是导致细胞发生凋亡、胀亡、坏死等不可逆损伤的主要病理生理过程之

一。因此,降低再灌注期胞内和线粒体内钙超载是心肌缺血再灌注损伤干预的主要靶向。本研究结果显示,运动预适应组心肌细胞钙离子浓度明显低于模型组,阿片肽阻断组和PKC抑制剂组细胞内钙离子浓度显著高于运动预适应组,表明运动预适应延迟时相具有维持心肌内钙稳态的作用,并且内源性阿片肽及受体和PKC参与触发和介导了这一保护效应。安静状态下,细胞浆中PKC无活性,活化后的PKC可移位于细胞膜和线粒体,并能磷酸化细胞膜KATP通道和/或线粒体KATP通道,活化的细胞膜KATP通道,使胞内K⁺外流,心肌细胞膜超极化,电压依赖性Ca²⁺通道关闭,Ca²⁺内流减少,减轻缺血再灌注期胞内钙超载。

一氧化氮合成酶分为内皮型NOS(eNOS)、神经型NOS(nNOS)和诱导型NOS(iNOS)。大量研究证实,iNOS参与了缺血预适应延迟相和运动预适应延迟相心脏保护作用。Xuan等^[16]研究发现,对兔子进行缺血预处理,早期能引起cNOS活性增加,而iNOS活性不变,24h后iNOS的活性增加,而cNOS活性不变,预处理24h后iNOS的上调可被N-ω-硝基左旋精氨酸所抑制,说明延迟相iNOS是被NO所触发。有研究发现^[17],运动预处理能显著降低犬24h后缺血再灌注心律不齐发生率,而预先给予iNOS抑制剂,犬的心律不齐发生率上升,抑制剂组的死亡率明显高于运动预处理组,说明iNOS在运动预适应延迟保护相发挥重要作用。有研究证实^[18],阿片类药物预处理能诱导机体合成iNOS,并介导了心肌缺血预适应延迟时相的保护作用。本研究结果显示,运动预适应24h后心肌细胞中iNOS表达量增加,阿片受体阻断剂纳洛酮和PKC抑制剂白屈菜赤碱均可取消运动预适应引起的iNOS合成增加的效应,说明运动预适应导致心肌细胞iNOS合成增加是由内源性阿片肽及受体触发的,而PKC参与介导了胞内的信号转导。iNOS通过催化左旋精氨酸使NO合成增加,NO可直接激活肌细胞膜KATP通道,增加K⁺外流,缩短心肌动作电位时程,减少心律不齐的发生,并作用于L-型钙通道,减少Ca²⁺内流,减轻I/R心肌细胞钙超载。Shinmura等^[19]研究发现,iNOS催化的NO可通过特殊信号途径激活COX-2,后者催化花生四烯酸生成PGL₂,PGL₂可激活 mito-

K_{ATP},延缓线粒体的钙超载,并阻止线粒体通透性转化孔开放,从而发挥心肌保护效应。本研究观察到,运动预适应能升高心肌细胞内COX-2表达,纳洛酮和白屈菜赤碱均能抑制其合成,表明运动预适应延迟时相COX-2合成是由内源性阿片肽及受体触发,并由PKC介导的。COX-2催化细胞内花生四烯酸合成PG和TXA₂,二者对维持血管功能稳定有重要作用。汤碧娥等^[20]研究发现,用环氧化酶-2抑制剂Celecoxib阻断了U50488H激活κ-阿片受体所介导的延迟相心肌保护作用。在阿片肽及受体介导的延迟性保护过程中,COX-2及下游信号物质可能对心肌缺血再灌注造成的微循环障碍发挥终末调节作用。

内源性抗氧化系统是生理状态下保持细胞氧化还原稳态的基础,Mn-SOD是重要的内源性自由基清除剂,过度的氧化应激导致细胞脂质过氧化增加,MDA生成增多,增加细胞抗氧化能力是對抗心肌缺血再灌注损伤的基本策略之一。本研究结果显示,运动预适应能提高延迟时相心肌细胞内Mn-SOD活性,减少MDA的生成量,减轻脂质过氧化损伤,这一保护效应可被PKC抑制剂白屈菜赤碱阻断,阿片受体阻断剂纳洛酮则无此效应,表明由运动预处理的延迟性心脏保护作用可能部分是由抗氧化剂发挥的,而且PKC参与介导了由EP引起的胞内抗氧化酶的合成,内源性阿片肽及受体并不是抗氧化酶合成的触发物。

综上所述,运动预适应延迟性心脏保护作用部分是由内源性阿片肽及受体触发的,PKC参与介导了这一保护过程。运动预适应引起内源性阿片肽释放,并与心肌细胞膜上特异性受体结合,除发挥早期保护效应外,同时可能通过激活胞内PKC,并经由其下游信号促进iNOS和/或COX-2表达,二者通过减少胞内和线粒体钙超载和改善微循环,保持细胞结构完整和功能正常,维持心脏舒缩功能,发挥延迟性保护作用。运动预适应也可提高延迟时相细胞抗氧化能力,减轻缺血再灌注期自由基氧化损伤,而这一保护作用并非由内源性阿片肽及受体介导。

参考文献

- [1] Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium[J]. *Circulation*, 1986, 74(5):1124—1136.
- [2] Domenech R, Macho P, Schwarze H, et al. Exercise induces early and late myocardial preconditioning in dogs[J]. *Cardiovasc Res*, 2002, 55(3):561—566.
- [3] Schultz JE, Rose E, Yao Z, et al. Evidence for involvement of opioid receptors in ischemic preconditioning in rat hearts[J]. *Am J Physiol*, 1995, 268(5 pt 2):H2157—H2161.
- [4] Gross GJ. Role of opioids in acute and delayed preconditioning[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2003, 35(7):709—718.
- [5] Fryer RM, Hsu AK, Eells JT, et al. Opioid-induced second window of cardioprotection: potential role of mitochondrial KATP channels[J]. *Circ Res*, 1999, 84(7):846—851.
- [6] Galvão TF, Matos KC, Brum PC, et al. Cardioprotection conferred by exercise training is blunted by blockade of the opioid system[J]. *Clinics (Sao Paulo)*, 2011, 66(1):151—157.
- [7] 王强,闻剑飞.运动联合吗啡预处理对大鼠心肌缺血再灌注延迟保护作用实验研究[J].*西安体育学院学报*,2011,28(2):213—217.
- [8] 翟庆峰,刘洪涛,王天辉.运动预适应对大鼠心肌相对缺血再灌注损伤的延迟性保护作用[J].*中华劳动卫生职业病杂志*,2005,23(1):38—41.
- [9] Springhorn JP, Claycomb WC. Translation of heart preproenkephalin mRNA and secretion of enkephalin peptides from cultured cardiac myocytes[J]. *Am J Physiol*, 1992, 263(5 Pt 2):H1560—1566.
- [10] Caffrey JL, Boluyt MO, Younes A, et al. Aging, cardiac preproenkephalin mRNA and enkephalin peptides in the Fisher 344 rat[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1994, 26(6):701—711.
- [11] Valtchanova-Matchouganska A, Ojewole JA. Involvement of opioid delta (delta)- and kappa (kappa)-receptors in ischemic preconditioning in a rat model of myocardial infarction[J]. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 2002, 24(3):139—144.
- [12] Sobanski P, Krajnik M, Shaqura M, et al. The presence of mu-, delta-, and kappa-opioid receptors in human heart tissue[J]. *Heart Vessels*, 2014, 29(6):855—863.
- [13] Watson MJ, Holt JD, O'Neill SJ, et al. ARD-353 [4-((2R,5S)-4-(R)-(4-diethylcarbamoylphenyl)(3-hydroxyphenyl)methyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-ylmethyl]benzoic acid], a novel nonpeptide delta receptor agonist, reduces myocardial infarct size without central effects[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006, 316(1):423—430.
- [14] Fryer RM, Hsu AK, Gross GJ. ERK and p38 MAP kinase activation are components of opioid-induced delayed cardioprotection[J]. *Basic Res Cardiol*, 2001, 96(2):136—142.
- [15] 郭玮,潘柏申.心肌钙蛋白-心肌损伤确定的生化标志物[J].*上海医学检验杂志*,2000,15(1):8—10.
- [16] Xuan YT, Tang XL, Qiu Y, et al. Biphasic response of cardiac NO synthase isoforms to ischemic preconditioning in conscious rabbits[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000, 279(5):H2360—H2371.
- [17] Hajnal A, Nagy O, Litvai A, et al. Nitric oxide involvement in the delayed antiarrhythmic effect of treadmill exercise in dogs[J]. *Life Sci*, 2005, 77(16):1960—1971.
- [18] 师恩祎,江晓菁,白茜,等.吗啡预处理晚期的心肌保护作用及其与诱导型一氧化氮合酶的关系[J].*中华医学杂志*,2004,84(11):891—895.
- [19] Shinmura K, Xuan YT, Tang XL, et al. Inducible nitric oxide synthase modulates cyclooxygenase-2 activity in the heart of conscious rabbits during the late phase of ischemic preconditioning[J]. *Circ Res*, 2002, 90(5):602—608.
- [20] 汤碧娥,陈莹莹,郭玮,等.COX-2参与U50488H诱导的延迟性心肌保护作用[J].*浙江大学学报(医学版)*,2006,35(2):165—170.