

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.01116

河豚毒素停搏液对大鼠离体缺血再灌注损伤心肌功能及其桥粒蛋白表达的影响

Influence of tetrodotoxin on cardiac function and desmoplakin expression of rats with myocardial ischemia/reperfusion injury

尧林, 杨双强*, 曹建光

重庆医科大学附属第一医院胸心外科, 重庆 400016

[摘要] 目的: 观察 Na⁺ 通道阻滞剂河豚毒素(tetrodotoxin, TTX)停搏液对离体大鼠缺血再灌注损伤心肌桥粒蛋白(desmoplakin)表达及心功能的影响, 探讨其对缺血再灌注损伤心肌的可能保护机制。方法: 20只 Wistar 大鼠随机分为 St. Thomas-2 停搏液灌注组(STH-2组, n=10)和 TTX 停搏液灌注组(TTX组, n=10), 分别应用相应的停搏液停搏, 建立大鼠离体心脏 Langendorff-Neely 灌注模型; 待搏动稳定, 灌注 30 min 后停搏 60 min, 再灌注 60 min, 观察各组心脏停搏前后的心率(HR)、冠状动脉流量(CAF)、左心室收缩末期压力(LVESP)和压力变化速率(±dp/dt)的恢复率, 采用免疫组化和 Western 印迹法检测心肌桥粒蛋白的分布及量的变化。结果: 恢复灌注后, 与 TTX 组比较, STH-2 组心肌桥粒蛋白分布紊乱, 表达明显减少(P<0.01), 心功能指标(HR、CAF、LVESP 和 ±dp/dt)的恢复率也明显降低(P<0.01 或 P<0.05)。结论: 河豚毒素停搏液有利于缺血再灌注损伤心肌功能的恢复, 效果优于经典的 STH-2 停搏液, 其保护作用可能与其保护心肌桥粒蛋白表达有关。

[关键词] 河豚毒素; 停搏液; 桥粒蛋白; 心功能; 心肌保护

[中图分类号] R 654.21 **[文献标志码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2008)09-1116-03

心肌缺血-再灌注损伤(myocardial ischemia/reperfusion injury)是制约体外循环心脏直视手术等治疗效果的关键因素之一, 因此, 心肌缺血-再灌注损伤的预防和处理是目前相关研究的热点。不少研究^[1-3]发现包含 Na⁺ 通道阻滞剂河豚毒素(tetrodotoxin, TTX)的心脏停搏液能够减轻心肌缺血再灌注损伤。我们的前期研究^[4-7]也证实 TTX 心脏停搏液对心肌缺血再灌注损伤的保护作用效果强于经典的 St. Thomas-2(STH-2)停搏液, 可能与其保护心肌粘合连接及保护结蛋白表达有关, 但确切机制仍不清楚。

桥粒蛋白(desmoplakin)是细胞间连接的重要结构之一, 使单个的心肌细胞连接成一个合胞体, 是心脏收缩射血的基础^[8]。Yang 等^[9]研究发现桥粒蛋白的正常表达对维持心肌组织的完整性及发挥良好的心肌功能至关重要。为探讨 TTX 心脏停搏液心肌保护作用的可能机制, 本研究进一步观察 TTX 停搏液对离体大鼠缺血再灌注损伤心肌的桥粒蛋白表达及心功能的影响, 并与 STH-2 停搏液进行对比。

1 材料和方法

1.1 主要材料及试剂 TTX 购自泰州市康特生物工程公司; 桥粒蛋白一抗购自美国 ARP 公司; 免疫组化试剂盒及生物素标记的二抗购自武汉博士德公司; 辣根过氧化物酶标记的二抗购自北京中杉公司; Western 印迹相关产品购自江苏碧云天公司。灌流系统为澳大利亚 LE 12306 离体心脏灌流

系统。K-H 液(Krebs-Henseleit buffer)组成如下(mmol · L⁻¹): NaCl 119, NaHCO₃ 25, KCl 4.75, MgSO₄ 1.2, KH₂PO₄ 1.18, CaCl₂ 1.4, Glucose 11, 95% O₂ + 5% CO₂ 混合气持续氧合, 维持 pH 7.8; STH-2 心脏停搏液组成(mmol · L⁻¹): NaCl 110, KCl 16, MgCl₂ 16, CaCl₂ 2.0, Glucose 11, 维持 pH 7.8; TTX 停搏液成分: TTX 用 K-H 液稀释成质量浓度为 20.00 μmol · L⁻¹。

1.2 动物分组及处理 成年 Wistar 大鼠 20 只, 雌雄不拘, 体质量 200~250 g, 购自第三军医大学大坪医院实验动物中心。20 只大鼠随机分为 STH-2 组和 TTX 组(n=10), 分别用 STH-2、TTX 停搏液停搏。离体鼠心 Langendorff-Neely 灌注模型的建立: 腹腔注射肝素盐水 200 U, 20 min 后脱颈处死大鼠, 迅速取下心脏, 用 37℃、95% O₂ + 5% CO₂ 混合气持续氧合的 K-H 液经主动脉根部逆行灌注, 压力 60 mmHg (1 mmHg=0.133 kPa), 稳定 15 min, 左心房插管, 左心室置入测压管, 灌注液转流, 转为工作心脏灌注模型, 灌注压 15 mmHg, 后负荷 52~60 mmHg, 稳定 5 min, 测定心率(HR)、冠状动脉流量(CAF)、左心室收缩末期压力(LVESP)和压力变化速率(±dp/dt), 工作 15 min 后, 主动脉根部按 2 ml/100 g 体质量注入 4℃冷心脏停搏液使心脏停搏, 并观察心脏停搏时间, 停搏 30 min 后再经主动脉根部按 2 ml/100 g 体质量注入心脏停搏液停搏, 停搏过程中同时给予冰盐水纱布冷敷, 停搏 60 min 后给予 37℃、95% O₂ + 5% CO₂ 混合气持续

[收稿日期] 2008-01-25 **[接受日期]** 2008-06-21

[作者简介] 尧林, 硕士生. E-mail: yao130lin@163.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 023-89011132, E-mail: yysqiang@163.com

氧合的 K-H 液经主动脉根部逆行复灌,观察心脏复搏时间,15 min 后转为工作心脏灌注模型,共复灌 60 min,并在工作心脏灌注稳定后 40 min 测定上述各项心功能指标,计算心功能的恢复率。20 min 后停止实验,取部分左心室肌 50 mg, -80℃ 保存,用于心肌桥粒蛋白的检测。

1.3 免疫组化检测心肌组织桥粒蛋白 取 3 mm×3 mm×3 mm 大小心肌组织行冰冻切片, SABC 法行免疫组化染色,染色步骤完全按照说明书进行,光学显微镜观察桥粒蛋白的分布情况并采集图像,采用 Image-pro plus 6.0 图像分析系统进行半定量检测,用平均光密度(D)值表示桥粒蛋白的相对含量。

1.4 Western 印迹检测心肌组织桥粒蛋白 取 50 mg 心肌组织,提取总蛋白,BCA 法定量,蛋白电泳分离、转膜,封闭,抗原抗体反应及 ECL 显色,整个过程完全按照说明书进行,采用 Quantity one 图像分析系统采集图像并行半定量分析。

1.5 统计学处理 采用多功能生理记录仪(ADInstru-

ments/8sP, Australia)测定血流动力学参数,Chart4 图形、数据处理软件进行信号采集和统计。血流动力学参数的恢复率用复搏后的参数除以停跳前的相应参数。数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用两独立样本的 *t* 检验,用 SPSS 12 软件进行统计学分析。

2 结果

2.1 停搏时间和复搏时间 与 STH-2 组相比,TTX 组的停搏时间(s)和复搏时间(s)均明显缩短,差异有统计学意义 [(9.49±0.49) vs (8.55±0.68), *P*<0.01; (10.88±0.61) vs (10.12±0.66), *P*<0.05]。

2.2 心功能指标恢复率的比较 心脏停搏前,两组心功能指标(HR、CAF、LVESP 和 $\pm dp/dt$)无统计学差异;心脏复搏后 40 min,TTX 组上述各项心功能指标的恢复率均明显优于 STH-2 组,差异有统计学意义(*P*<0.01 或 *P*<0.05, 表 1)。

表 1 再灌注期间两组心功能指标恢复率比较

指标	停搏前		复搏后		恢复率(%)	
	TTX 组	STH-2 组	TTX 组	STH-2 组	TTX 组	STH-2 组
HR f/min^{-1}	256.7±5.1	256±5.4	219.9±7.8	198.8±5.7	85.7±2.0**	77.7±1.6
CAF($\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$)	15.5±0.6	15.5±0.5	14.2±0.6	13.7±0.5	91.8±2.3**	88.3±1.8
LVESP p/mmHg	95.6±0.6	95.5±0.7	81.3±0.6	78.5±0.6	85.0±0.9**	82.2±0.8
+ dp/dt_{max} ($\text{mmHg}\cdot\text{s}^{-1}$)	196.1±4.7	195.5±4.7	183.5±4.7	176.3±3.5	93.6±2.2*	90.3±3.3
- dp/dt_{max} ($\text{mmHg}\cdot\text{s}^{-1}$)	166.1±4.7	165.2±4.6	154.2±3.9	145.8±4.2	92.9±2.6*	88.4±4.7

* *P*<0.05, ** *P*<0.01 vs STH-2 组。TTX:河豚毒素;STH-2;St. Thomas-2;HR:心率;CAF:冠状动脉流量;LVESP:左心室收缩末期压力; $\pm dp/dt$:压力变化速率。1 mmHg=0.133 kPa

2.3 心肌组织桥粒蛋白表达的比较 免疫组化结果(图 1)显示 STH-2 组心肌组织中桥粒蛋白分布紊乱,表达较 TTX 组明显减少;半定量分析结果也表明 STH-2 组心肌组织中桥粒蛋白表达量明显减少(0.045 11±0.008 40 vs 0.054 67±0.005 70, *P*<0.01),差别具有统计学意义。Western 印迹检测结果(图 2)也显示 STH-2 组桥粒蛋白表达量明显少于 TTX 组(650.8±12.99 vs 928.9±12.84, *P*<0.01),差异有统计学意义。

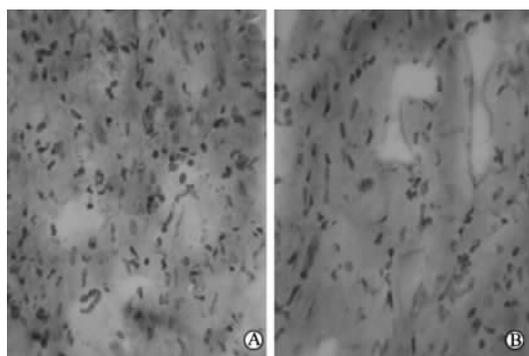


图 1 心肌组织桥粒蛋白表达的免疫组化染色结果
A,STH-2 组;B,TTX 组。Original magnification,×400

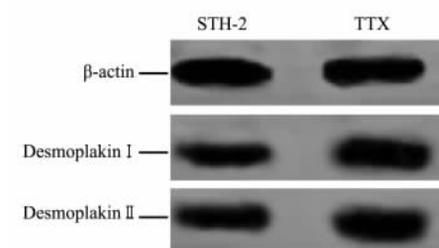


图 2 心肌组织桥粒蛋白表达的 Western 印迹结果
TTX:河豚毒素;STH-2;St. Thomas-2

3 讨论

桥粒呈斑点状,其质膜内叶层的胞质面有致密而深染的附着斑附着。桥粒蛋白是附着斑的主要蛋白之一,表达于细胞间连接处,又称为桥粒相关转膜糖蛋白^[10]。附着斑的胞质面有许多结蛋白丝附着。相邻细胞内的结蛋白等中间纤维即通过桥粒蛋白相互连接形成整体细胞骨架网络,起支持和抵抗外界压力与张力的作用,是心脏进行收缩的基础;而且与细胞分裂、增殖、分化等功能密切相关。心脏要正常射血

必须靠细胞间连接将单个的细胞连接成有机整体,而桥粒蛋白是连接心肌细胞的重要结构之一。可见,对心肌桥粒的深入研究将对心肌保护及其技术产生深远影响。

膜片钳实验证实缺血缺氧时心肌细胞的持续钠离子内流显著增加,TTX可通过阻断持续的钠离子流对心肌产生保护作用^[2]。TTX停搏液的主要成分TTX具有直接阻断Na⁺通道的作用,且过程可逆^[11],因此TTX对Na⁺通道阻断更迅速,再灌注后Na⁺通道功能恢复更快,停搏和复搏时间均明显短于STH-2组,减少了能量的消耗。心肌缺血时能量代谢发生障碍,TTX停搏液能迅速阻断Na⁺通道,停搏后细胞内外离子浓度接近静息时水平,从而使维持细胞离子内稳态的离子泵耗能降到最低限度,节省能量。前期研究^[5,12]业已证实TTX停搏液可明显减少心肌能量的消耗。离子泵转运功能障碍,Ca²⁺进入细胞激活Ca²⁺依赖性蛋白酶,再灌注时,经一系列反应产生大量的超氧阴离子和过氧化氢;同时ATP减少使Ca²⁺进入线粒体增多,线粒体功能受损,氧自由基生成增多,清除减少,最终导致心肌损伤。TTX能选择性阻断失活缓慢的Na⁺电流,衰减Na⁺窗口电流,减轻Na⁺超载和Ca²⁺超载,从而避免了对线粒体的损伤,增加了能量的供应;减轻了对自由基生成的促进作用;避免了对各种酶类的激活,其中由Ca²⁺超载引起的钙蛋白酶(calpain)激活可能具有重要作用^[13]。Post等^[14]研究证实心肌细胞缺血再灌注损伤可引起细胞内游离钙离子浓度升高,引起calpain表达活性显著增加,最终导致细胞结构破坏和功能障碍^[14-15]。

本研究结果再次证实TTX停搏液对缺血再灌注损伤心肌的保护作用优于经典的STH-2停搏液,有利于心肌功能的恢复,其保护作用可能与保护心肌桥粒蛋白表达有关,具体机制仍有待进一步的研究探讨。

(志谢 本研究统计学处理部分得到重庆医科大学统计学教研室的大力支持和帮助,在此表示衷心感谢!)

[参考文献]

- [1] Kostetskii I, Li J, Xiong Y, Zhou R, Ferrari V A, Patel V V, et al. Induced deletion of the N-cadherin gene in the heart leads to dissolution of the intercalated disc structure[J]. *Circ Res*, 2005, 96:346-354.
- [2] Saint D A. The role of the persistent Na⁺ current during cardiac

ischemia and hypoxia[J]. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 2006, 17 Suppl 1:S96-S103.

- [3] Saint D A. The cardiac persistent sodium current: an appealing therapeutic target[J]? *Br J Pharmacol*, 2008, 153:1133-1142.
- [4] 尧林, 杨双强, 曹建光. 河豚毒素停搏液对心肌粘合连接的影响[J]. *第四军医大学学报*, 2008, 29:1096-1099.
- [5] 杨朝坤, 杨双强, 谭松涛, 汪斌, 陈力. 河豚毒素停搏液减轻大鼠心肌细胞内钙超载作用的实验研究[J]. *第三军医大学学报*, 2005, 27:192-195.
- [6] 谭松涛, 杨朝坤, 杨双强. 极化心脏停搏液对离体大鼠心脏的保护作用[J]. *中国胸心血管外科临床杂志*, 2003, 10:280-283.
- [7] 曹建光, 杨双强, 杨庆军, 尧林. TTX停搏液对离体鼠心结蛋白作用及机制的研究[J]. *北京医学*, 2008, 30:427-430.
- [8] Lechler T, Fuchs E. Desmoplakin: an unexpected regulator of microtubule organization in the epidermis[J]. *J Cell Biol*, 2007, 176:147-154.
- [9] Yang Z, Bowles N E, Scherer S E, Taylor M D, Kearney D L, Ge S, et al. Desmosomal dysfunction due to mutations in desmoplakin causes arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy[J]. *Circ Res*, 2006, 99:646-655.
- [10] Lapouge K, Fontao L, Champlaud M F, Jaunin F, Frias M A, Favre B, et al. New insights into the molecular basis of desmoplakin- and desmin-related cardiomyopathies [J]. *J Cell Sci*, 2006, 119(Pt 23):4974-4985.
- [11] 贾宏钧, 王钟林, 杨期东. 离子通道与心脑血管疾病——基础与临床[M]. 北京:人民卫生出版社, 2001:113-118.
- [12] 谭松涛, 杨双强, 杨朝坤. Na⁺通道阻滞极化停搏液在离体大鼠心脏保存中的保护作用[J]. *第一军医大学学报*, 2005, 25:1283-1285, 1289.
- [13] Mazzanti M, Assandri R, Ferroni A, DiFrancesco D. Cytoskeletal control of rectification and expression of four substates in cardiac inward rectifier K⁺ channels[J]. *FASEB J*, 1996, 10:357-361.
- [14] Post J A, Verkleij A J, Langer G A. Organization and function of sarcolemmal phospholipids in control and ischemic/reperfused cardiomyocytes[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1995, 27:749-760.
- [15] Maltsev V A, Undrovinas A I. Cytoskeleton modulates coupling between availability and activation of cardiac sodium channel [J]. *Am J Physiol*, 1997, 273(4 Pt 2):H1832-H1840.

[本文编辑] 贾泽军