

缺血预适应的研究进展

Research progress of ischemic preconditioning

杨明富 金鸿宾

YANG Ming-fu, JIN Hong-bin

【关键词】 缺血预适应; 骨骼 【Key words】 Ischemic preconditioning; Skeleton

1986 年 Murry 等^[1]首次提出:心肌在经受了一次或多次短暂的缺血再灌注后对随后更长时间致死性缺血再灌注损伤的耐受性增强。并将此现象命名为缺血预适应(Ischemic preconditioning IPC)。经过 15 年大量的动物实验及临床试验,对 IPC 的特点、触发因素、发生机理及结果进行了深入的研究,使人们对缺血再灌注损伤及 IPC 有了深一步的认识。

1 缺血预适应的特点

1.1 普遍性

1.1.1 种属的普遍性 IPC 普遍存在于哺乳动物中。已证实在狗、猪、兔、雪貂、大鼠、豚鼠及人类中均存在 IPC 的保护作用。最近 Vanden 等^[2]在培养的鸡胚心室肌细胞中也证实了 IPC 保护作用的存在。认为鸡胚心室肌细胞有成年哺乳动物心室肌细胞的特点。

1.1.2 组织的普遍性 IPC 并非心脏独有的现象。已发现在骨骼肌、神经系统的海马细胞、小肠细胞及肾脏都存在 IPC 的保护作用。

1.2 缺血预适应的远程作用(remote effective)

Przydlenk 等^[3]发现:在犬,短暂的冠状动脉回旋支的阻闭可使随后前降支持续阻闭时该范围的心肌对缺血的耐受性增强。更有趣的是 Birnbaum 等^[4]研究发现降低兔股动脉血流 55%~60%并予腓肠肌每秒 1 次的电刺激预处理后兔的心脏对随后 30min 的冠状动脉缺血及 4 小时的再灌注的耐受性明显增强。随后的研究还发现短暂的肾缺血、及肠系膜动脉的阻闭都使随后冠状动脉阻闭引起的心肌梗塞范围缩小。

1.3 间窗

诱导 IPC 产生的时间尚无统一标准。1~4 次持续 2~3 分钟的缺血普遍有效。但少于 2 分钟的缺血刺激则不能产生 IPC 的保护效果。不同种的动物、不同的组织、不同的预适应模式及实验方法所要求的缺血时间及次数有所差异。在体猪心脏前降支阻闭 2 分钟 4 次,间隔 2 分钟再灌注能产生保护作用^[5]。大鼠后肢用止血带制造的缺血模型中 3 次 5 分钟的缺血,间隔 5 分钟再灌注明显有效地保护随后 2.5 小时的缺血及 2 小时再灌注诱导的损伤^[6]。人心房肌标本低氧灌注 5 分钟及 Langendorff 灌注的大鼠心脏用无氧台氏液灌注 5 分

钟再给 5 分钟的复氧灌注均能产生保护作用。

IPC 的保护作用维持 1~2 小时,在随后持续缺血超过 3 小时或再灌注超过 2 小时后保护作用消失。

1.4 经典式 IPC 效应与延迟相 IPC 效应

最近的研究表明:IPC 由两个阶段组成:早期的 IPC:指由缺血预处理诱发的即时保护作用。在预处理后数分钟发生,持续 2~4 小时消失。它又被称为经典式 IPC。延迟相 IPC:指在 IPC 的刺激后 24 小时出现的保护作用,可持续 24~72 小时。又称为第二窗保护。是心肌的亚急性适应的一种形式。延迟相的保护作用已确定存在于心肌及骨骼肌。Wanh 等^[7]的研究发现对大鼠的提睾肌进行 45 分钟的缺血预处理间隔 24 小时后再给予 4 小时的缺血及 60 分钟的再灌注。与单纯的缺血再灌注组比较。IPC 明显减轻了血管痉挛及毛细血管无再灌注现象。

1.5 全或无反应

早期的研究已经显示 IPC 的诱导呈“全或无”反应。即阈下刺激没有保护效应,而 IPC 的保护作用一旦产生就能提高相应组织器官对缺血的耐受性。但在保护期内,缺血刺激则不加强或延长保护反应。IPC 保护作用消失后缺血刺激可重建 IPC 保护。

然而近期的报道有相反的结果。Cave 等^[8]报告:心肌舒张功能及收缩功能的恢复与预处理次数成正比。Shattock 等^[9]报告在猪心脏一次 IPC 与多次 IPC 对梗塞范围的保护效果相同,呈全或无。然而限制 S-T 段上抬的作用在 2 次预处理较 1 次预处理更明显。Lawson 等^[10]描述在大鼠 IPC 的抗心律失常保护作用随预处理次数的增加而加强。

从以上结果中可以看出:当用梗塞范围的大小作为终点指标时,无一例外表现出全或无现象。但是,使用收缩功能或其它终点指标的研究却显示出矛盾的结果。笔者考虑:这与所用动物、选择的终点指标以及实验条件和方法的差别有关。是否这些指标确实是“剂量依赖性”尚需严格的实验加以证实。

2 缺血预适应研究常用的终点指标

对 IPC 终点指标的选择在不同的组织有所差别。然而通用的是反应组织坏死程度及功能恢复的指标。

2.1 组织坏死程度的研究指标

对于组织坏死程度的研究普遍应用于各种动物及不同器

官组织中。并且通常从器官、细胞及细胞器三个水平来进行,此外还有组织坏死标记物的测定。

2.1.1 器官水平的研究指标 最有说服力的指标是梗死范围的大小。而不同的器官所用的方法不尽相同。

Zahir 等^[11]采用远端带蒂的骨骼肌皮瓣,用钳夹血管蒂造成缺血,在预处理及缺血再灌注后将皮瓣重新原位缝合后继续喂养 5 天,然后用计算机数字显影观察皮瓣坏死区的大小。

在骨骼肌的研究中更为常用的是腓肠肌。通常用止血带结扎下肢或钳夹股动脉造成缺血,预处理及缺血再灌注后取下整块腓肠肌测定其重量进行对比。

2.1.2 细胞水平及细胞器水平的研究指标 在预处理及缺血再灌注完毕后,将组织冲洗、包埋、切片、染色后供镜检使用。细胞变化主要用光学显微镜观察而细胞器的研究只能凭借电子显微镜。

Ashraf 等^[12]将光镜下缺血再灌注的心肌细胞损伤半定量的分为 4 级:1 级,正常:心肌纤维完整,核浆染色均匀一致,肌原纤维之间有边界清楚、排列整齐的线粒体,闰盘无分离;2 级,轻度损伤:除了线粒体附近可见空泡外其余同上;3 级,中度损伤:胞浆中各细胞器染色变浅,染色质堆积成堆,心肌纤维呈波浪状,细胞浆呈颗粒状。4 级,重度损伤:除具备中度损伤的特点外,细胞可见收缩带坏死。

电镜下的改变按期可分为:1 期,可逆改变:糖原颗粒数量、体积减少,细胞及细胞器水肿,以线粒体最明显;2 期,中度损伤:除上述表现外,还有线粒体内部断裂,核染色质出现无定型的絮状物聚集,核边缘加深;3 期,严重损害:染色质稀疏,线粒体断裂成节段,肿胀的线粒体内可见磷酸钙沉淀。

2.1.3 组织坏死标记物的测定 心肌、骨骼肌、肾脏及神经系统的坏死都会释放出乳酸脱氢酶(LDH),肌肉的坏死还会释放出磷酸肌酸激酶(CPK),而心肌还有特异的标记酶 CPK-MB 及特殊标记结构肌钙蛋白 I 和 T 等物质释放。通常采用相应组织器官的静脉血或收集组织灌流液作为标本进行测定。

2.2 功能的研究

主要测定肌肉组织的收缩舒张功能。心肌的指标有左室发展压、心肌增厚指数等。骨骼肌则有强直张力(tetanic tension)、收缩最大速度、腕部的屈曲力等^[13,14]。

2.3 其它的终点指标

在骨骼肌重要的终点指标还包括血管痉挛及毛细血管的无再灌注现象^[15]。这两项指标主要反应缺血再灌注对毛细血管的影响及 IPC 的保护作用。

心肌中一个不可缺少的也是其特有的指标是心律失常。

3 骨骼肌缺血预适应的发生机理

骨骼肌的缺血预适应效应涉及诱因、触发因子、信号通路及效应子等方面。

3.1 诱因

引起预适应效应的诱因除缺血外已证实的还有:低温处理及器官保养液的灌注^[16]、热预适应^[17]等。

3.2 触发因子

上述诱因作用于骨骼肌后诱导产生一系列的内源性物质

称为触发因子,它们作用于骨骼肌细胞膜上各自相应的受体,启动信号通路。触发因子包括腺苷^[18]、一氧化氮(NO)^[19]及去甲肾上腺素^[20]等。其中对腺苷的研究尤为深入。Papanastasiou^[18]的研究显示:用腺苷 1000microg/kg 预处理大鼠后能产生与缺血预处理相同的对腓肠肌的保护作用。用腺苷 A1 受体的激动剂取得同样效果。腺苷由 ATP 分解而来,在缺血时可大量产生。

3.3 信号通路

是指能将细胞外的分子信号经细胞膜传入细胞内发挥效应的一系列酶促反应通路。其中对受体-蛋白激酶 C(PKC)信号通路的研究比较深入。上述触发因子在细胞膜上的受体均有一个共同的特征即与细胞膜上鸟苷酸三磷酸结合蛋白(G 蛋白)偶联,受体与相应的配基结合后活化 G 蛋白使其与 GTP 结合,G 蛋白-亚基-GTP 复合物可以激活磷脂酶 C(PLC)后者使细胞内的磷脂酰肌醇-4,5 二磷酸水解成二脂酰甘油(DAG)及三磷酸肌醇(IP3)。DAG 和 IP3 都是细胞内的第二信使,其中 DAG 在 Ca²⁺ 存在的情况下激活 PKC,PKC 的底物谱非常广,使一大批蛋白质磷酸化激活或失活。而发挥各自相应的生物效应。同时,被激活的 PKC 向核内移动,启动基因转录及表达过程。Hopper 等^[21]加用 PKC 的抑制剂 chelerythrine 和 polymyxin 能完全阻断预缺血的抗梗塞效应。而 PKC 激活剂 phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA)则能模拟预缺血的缩小梗塞范围的作用。

此外,受体-酪氨酸蛋白激酶途径,有丝分裂原激活的蛋白激酶家族等均参与了预缺血过程中的信号传递。

3.4 效应子

被蛋白激酶磷酸化或由其诱导基因转录表达的新蛋白质就是效应子。目前对于 PKC 被激活后其下游的各个环节仍然不清楚。

已有多项研究证明 ATP 敏感的钾通道(K_{ATP})的开放是预缺血保护作用所必须的。Pang 等^[22]对猪背阔肌的研究显示:K_{ATP}通道的开放剂 Lemakalim 能使梗塞面积由对照组的 42% ± 2% 缩小为 21% ± 2% (p0.05),其作用与预缺血组(24% ± 2% p0.05)相似。而 K_{ATP}通道的阻断剂 5-hydroxydecanoate 及优降糖则能消除预缺血的保护效果。K_{ATP}通道受细胞内 ATP 浓度的调节,当 ATP 浓度下降时通道开放。然而,目前有两个问题仍未解决,其一是:PKC 与 K_{ATP}之间的关系为何?其二是:细胞内 ATP 在 μmol/L 水平即可抑制 K_{ATP}通道的开放,而缺血早期细胞内的 ATP 水平仍然在 mmol/L 的水平这似乎不可能激活 K_{ATP}通道。可能的解释为:缺血时细胞内 ATP 分布不均调节 K_{ATP}通道活性的 ATP 池,即细胞膜下的 ATP 选择性下降;预缺血保护了心肌细胞膜上的酶,特别是 Na⁺/K⁺ATP 酶使其保持较高活力并消耗肌膜下的 ATP,使局部 ATP 浓度下降 K_{ATP}通道开放;K_{ATP}通道开放敏感性呈多相性,在低氧时 K_{ATP}通道对 ATP 敏感性降低,从而提高了通道的开放活性。Liu 等^[23]用膜片钳技术研究显示:使用 PKC 激活剂 PMA 缩短了细胞膜 K_{ATP}通道开放所需的时间(缺血对照组:27.1min ± 2.2min;PMA 组为 12.6min ± 2.0min/0.01)而 PKC 抑制剂则部分消

除这一作用。由此可见 PKC 对 $K_{[ATP]}$ 通道的磷酸化易化了 $K_{[ATP]}$ 通道的开放过程。 $K_{[ATP]}$ 通道开放促进细胞内 K^+ 外流,使动作电位时程缩短减少了电压依赖的 Ca^{2+} 通道的开放和内流,减少能量消耗,防止 Ca^{2+} 超载引发的细胞凋亡。

IPC 的保护作用中还涉及减少中性白细胞的渗出、聚集;减少炎症因子(肿瘤坏死因子 TNF、巨噬细胞炎性蛋白 MIP)的释放。

IPC 作为一种有效的内源性保护机制能对抗缺血再灌注的损伤。但目前对其作用、机理等方面的了解还不完全,尚需进一步深入的研究。

参考文献

- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 1986, 74:1124-1136.
- Vanden Hoek TLV, Becker BL, Shao ZH, et al. Preconditioning in cardiomyocytes protects by attenuation oxidant stress at reperfusion. *Circ Res*, 2000, 86:541-548.
- Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, et al. Regional ischemic "preconditioning" protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation*, 1993, 87:893-899.
- Birnbaum Y, Hale SL, Kloner RA. Ischemic preconditioning at a distance: reduction of myocardial infarct size by partial reduction of blood supply combined with rapid stimulation of the gastrocnemius muscle in the rabbit. *Circulation*, 1997, 96:1641-1646.
- Qiu Y, Tang XL, Park SW, et al. The early and late phases of ischemic preconditioning: a comparative analysis of their effects on infarct size, myocardial stunning, and arrhythmias in conscious pigs undergoing a 40-minute coronary occlusion. *Circ Res*, 1997, 80:730-742.
- Gurke L, Mattei A, Chaloupka K, et al. Mechanisms of ischemic preconditioning in skeletal muscle. *J Surg Res*, 2000, 94:18-27.
- Wang WZ, Tsai TM, Anderson GL. Late-preconditioning protection is evident in the microcirculation of denervated skeletal muscle. *J Orthop Res*, 1999, 17:571-577.
- Cave AC, collis CS, Downey JM, et al. improved functional recovery by ischemic preconditioning is not mediated by adenosine in the globally ischemic isolated rat heart. *Cardiovasc Res*, 1993, 27:663-668.
- Shattock MJ, Lawson CS, Hearse DJ, et al. Electrophysiological characteristics of repetitive ischemic preconditioning in the pig heart. *J Mol Cell Cardiol*, 1996, 28:1339-1347.
- Lawson CS, Coltart DJ, Hearse DJ. "Dose" dependency and temporal characteristics of protection by ischemic preconditioning against ischemia-induced arrhythmias in rat hearts. *J Mol Cell Cardiol*, 1993, 25:1391-1402.
- Zahir KS, Syed SA, Zink JR, et al. Ischemic preconditioning improves the survival of skin and myocutaneous flaps in a rat model. *Plast Reconstr Surg*, 1998, 102:140-150.
- Ashraf M, Suleiman J, Ahmad M. Ca^{2+} preconditioning elicits a unique protection against the Ca^{2+} paradox injury in rat heart. *Circ Res*, 1994, 74:360-367.
- Whetzel TP, Stevenson TR, Sharman RB, et al. The effect of ischemic preconditioning on the recovery of skeletal muscle following tourniquet ischemia. *Plast Reconstr Surg*, 1997, 100:1767-1775.
- Libonati JR, Cox M, Incanno N, et al. Brief periods of occlusion and reperfusion increase skeletal muscle force output in humans. *Cardiology*, 1998, 43:1355-1360.
- Wang WZ, Anderson G, Firrell JC, et al. Ischemic preconditioning versus intermittent reperfusion to improve blood flow to a vascular isolated skeletal muscle flap of rats. *J Trauma*, 1998, 45:953-959.
- Wagh M, Pantazi G, Romeo R, et al. Cold storage of rat skeletal muscle free flaps and pre-ischemic perfusion with modified UW solution. *Microsurgery*, 2000, 20:343-349.
- McLaughlin R, Kelly CJ, Kay E, et al. Diaphragmatic dysfunction secondary to experimental lower torso ischemia: reperfusion injury is attenuated by thermal preconditioning. *British J Surgery*, 2000, 87:201-205.
- Papanastasiou S, Estdale SE, Homer-Vanniasinkam S, et al. Protective effect of preconditioning and adenosine pretreatment in experimental skeletal muscle reperfusion injury. *British J Surgery*, 1999, 86:916-922.
- Pudupakkam S, Harris KA, Jamieson WG, et al. Ischemic tolerance in skeletal muscle: role of nitric oxide. *Am J Physiol*, 1998, 275:94-99.
- Costa F, Cristensen NJ, Farley G, et al. NO modulates norepinephrine release in human skeletal muscle: implications for neural preconditioning. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2001, 280:1494-1498.
- Hopper RA, Forrest CR, Xu H, et al. Role and mechanism of PKC in ischemic preconditioning of pig skeletal muscle against infarction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2000, 279:666-676.
- Pang CY, Neligan P, Neligan P, et al. Role of APT-sensitive K channels in ischemic preconditioning of skeletal muscle against infarction. *Am J Physiol*, 1997, 273:44-51.
- Liu Y, Gao WD, O'Rourke B, et al. Priming effect of adenosine on K (ATP) currents in intact ventricular myocytes implications for preconditioning. *Am J Physiol*, 1997, 273:1637-1643.

(收稿:2002-02-20 编辑:李为农)

北京天东电子医用设备公司供货信息

北京天东医疗设备有限公司生产部是多年生产口腔正畸材料、骨科器械及小针刀系列产品的专业厂家。审批文件:京药器监(准)字 2001 年第 2550313 号,京医械广审(文)200203021 号。

现办理小针刀邮购业务,售价:型(20 支装)每套 120 元;~型(10 支装)每套 90 元。每套加收 10 元包装邮资,款到发货。地址:北京天东医疗设备有限公司,北京崇文区东花市斜街 50 号(北京第 59 中学东侧)。邮编 100062 电话:010-67126137 67159054