

缝隙连接参与缺血后处理和庚醇的心肌保护作用

毛红娇^{1,2}, 陈宝平¹, 俞图南², 叶治国², 夏强^{2*} (1. 绍兴文理学院医学院生理教研室, 浙江 绍兴 312000; 2. 浙江大学医学院生理系, 杭州 310058)

摘要:目的 探讨缝隙连接是否参与缺血后处理和庚醇的抗心肌缺血/复灌(I/R)损伤作用。方法 采用离体大鼠心脏Langendorff灌流方法,冠脉结扎30 min,复灌120 min复制局部I/R模型,测定心室力学指标和复灌各时间点冠脉流出液中乳酸脱氢酶(LDH)含量。实验结束测定心肌梗死面积。全心停灌30 min,复灌120 min复制全心I/R模型,测定心律失常和心

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(Y205278);浙江省绍兴市科技计划项目(2005143);浙江省绍兴文理学院科研项目(07LG1028)

作者简介:毛红娇,女,讲师 Tel:(0575)88337954 *通信作者:夏强,男,教授,博士生导师 Tel:(0571)88208252
E-mail:xiaqiang@zju.edu.cn

肌传导速度。分别在复灌初期给予缝隙连接脱耦联剂庚醇和缝隙连接开放剂 AAP10 各 15 min。结果 在局部缺血/复灌模型上,与 I/R 组相比,缺血后处理组和庚醇组心肌梗死面积明显减少,复灌期间冠脉流出液中 LDH 含量降低。同时缺血后处理组明显改善心室力学指标,缓解冠脉流量的减少;在全心缺血/复灌模型上,缺血后处理组和庚醇组在复灌期间的心律失常评分明显下降,心肌传导速度降低。AAP10 在局部和全心缺血/复灌模型上明显减弱缺血后处理和庚醇的心肌保护作用。结论 缺血后处理和庚醇具有抗心肌缺血/复灌损伤作用,这种保护作用可能与缝隙连接细胞间通讯的减弱有关。

关键词:缺血后处理;缝隙连接;庚醇;缺血/复灌损伤;心脏

中图分类号:Q463;R965.1

文献标识码:A

文章编号:1007-7693(2009)03-0187-07

Gap Junction Mediates the Cardioprotective Effect of Ischemic Postconditioning and Heptanol

MAO Hongjiao^{1,2}, CHEN Baoping¹, YU Tunan², YE Zhiguo², XIA Qiang^{2*} (1. Department of Physiology, School of Medicine, Shaoxing University, Shaoxing 312000, China; 2. Department of Physiology, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To determine whether the cardioprotection of ischemic postconditioning and heptanol against ischemia/reperfusion (I/R) is mediated by gap junction. **METHODS** The isolated perfused hearts of male rats were subjected to 30 min of regional ischemia followed by 120 min of reperfusion. The infarct size and the level of lactate dehydrogenase (LDH) in the coronary effluent were measured. The arrhythmia scores and conduction velocity of ventricular myocardium were measured in global ischemia model of rat heart subjected to 30 min of ischemia followed by 120 min of reperfusion. Gap junction uncoupler heptanol and opener antiarrhythmic peptide 10 (AAP10) were administrated at the beginning of reperfusion for 15 min, respectively. **RESULTS** In the Langendorff perfused rat heart model, ischemic postconditioning (3 cycles of 10 s reperfusion/10 s regional ischemia starting at the beginning of the reperfusion) and heptanol reduced infarct size and LDH release, ischemic postconditioning also improved the recovery of the left ventricular developed pressure, maximal rise/fall rate of left ventricular pressure and rate-pressure product (left ventricular developed pressure multiplied by heart rate). Ischemic postconditioning (6 cycles of 10 s reperfusion/10 s global ischemia starting at the beginning of the reperfusion) and heptanol reduced arrhythmia scores and conduction velocity of ventricular myocardium. Administration of AAP10 attenuated the cardioprotection of ischemic postconditioning and heptanol. **CONCLUSION** The cardioprotection of ischemic postconditioning and heptanol may be related to the attenuation of gap junction communication on myocardial ischemia/reperfusion injury.

KEY WORDS: ischemic postconditioning; gap junction; heptanol; ischemia/reperfusion injury; heart

缺血后处理^[1] (ischemic postconditioning) 是指在心肌长时间缺血后,于复灌初期立即给予心肌反复多次短暂的复灌/停灌,具有明显的对抗心脏缺血/复灌损伤的保护作用。但缺血后处理的心肌保护作用机制尚未完全清楚。近年来的研究表明,缝隙连接(gap junction)通讯参与缺血/复灌心肌的保护作用。缝隙连接是存在于相邻细胞间的膜通道结构,由相邻的两个细胞质膜上的连接子相互衔接而成,缝隙连接对心肌细胞电同步兴奋和代谢耦联起着重要作用^[2],同时缝隙连接通讯也受到一些药物的影响,如庚醇(heptanol)。庚醇是一种脂溶性的缝隙连接脱耦联剂^[3],能可逆地抑制缝隙连接。研究发现,庚醇可以发挥类似心肌缺血预处理的效应。据报道,缺血后处理与缺血预处理存在一些共同的保护机制。笔者假设,在缺血后处理的心肌保护作用中,可能与预处理共享缝隙连接机制。本实验旨在探

讨缝隙连接是否参与缺血后处理的心肌保护作用。

1 材料和方法

1.1 试剂

庚醇(heptanol),氯化三苯基四氮唑(triphenyl tetrazolium chloride, TTC)为 Sigma 公司产品;H₂N-Gly-Ala-Gly-4Hyp-Pro-Tyr-CONH₂(AAP10)委托成都川抗派德生物医药科技有限公司合成。

1.2 离体心脏 Langendorff 灌流和左室功能评价

SD 大鼠,♂,体重 220 ~ 280 g [由浙江省医学科学院提供,动物编号:SCXK(浙 2003 - 0001)],断头后迅速取出心脏,置于 4 ℃ 改良 Krebs-Henseleit (K-H)液中洗净血液,迅速转移、固定于 Langendorff 灌流装置,以改良 K-H 液行常规恒压(76 mmHg)灌流。改良 K-H 液成分(mmol · L⁻¹):NaCl 118.0, KCl 4.7, K₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1.2, NaHCO₃ 25.0, CaCl₂ 1.25, 葡萄糖 10.0 g, pH 7.3 ~ 7.4, 以 95% O₂ + 5%

CO₂饱和,维持灌流液温度 37 ℃。切开左心耳,将充水乳胶囊插入左心室,囊内压力经特氟纶管传递至压力传感器,由 MedLab 生物信号采集处理系统记录和分析。向插入左心室内的乳胶囊注水使左心室舒张末压(left ventricular end-diastolic pressure, LVEDP)维持于 4~8 mmHg,连续记录左心室发展压(left ventricular developed pressure, LVDP)、心率(heart rate, HR)、心率与发展压的乘积(rate-pressure product, RPP)、左心室内压最大上升和下降速率(maximal rise/fall rate of left ventricular pressure, (dP/dt_{max})等指标。测定复灌各时间点单位时间的冠脉流量。在复灌各时间点收集冠脉流出液,采用分光光度法测定乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)的含量。

1.3 局部缺血/复灌模型和缺血后处理的方法

本模型采用冠脉结扎法。暴露左心耳和动脉圆锥之间表浅冠状静脉下方的左冠脉,用针、线绕过冠脉下方后,两个线头穿过一段细硅胶管,然后在另一小段细硅胶管上打结结扎,松开结扣作为复灌处理,以结扎 30 min,复灌 120 min 作为缺血/复灌过程,在停灌后复灌即刻立即给予 3 次复灌/停灌循环,每次 10 s 共计 1 min,实现缺血后处理。

1.4 心肌梗死面积测定

采用 TTC 染色法测定梗死面积,扫描仪扫描后使用 Image J 软件(美国 NIH)计算以梗死区面积占危险区面积的比例^[4]。

1.5 全心停灌/复灌模型和缺血后处理的方法

本模型采用全心停灌 30 min 复灌 120 min 的处理方法,在停灌后复灌即刻立即给予 6 次全心复灌/停灌循环,每次 10 s 共计 2 min,实现缺血后处理。

1.6 心律失常评分法

采用心律失常评分法对心律失常严重程度进行定量分析^[4],具体评分办法见表 1。

表 1 心律失常评分标准

Tab 1 Arrhythmia scoring system

心律失常评分	心律失常的类型
0	无心律失常
1	房性心律失常或偶发室性早搏
2	频发室性早搏
3	室性心动过速(1~2 阵)
4	室性心动过速(>3 阵)或室室纤颤

1.7 心肌传导速度测定

SD 大鼠断头后开胸迅速取出心脏,置于 4 ℃改良 K-H 液中洗净血液,迅速转移、固定于

Langendorff 灌流装置,以改良 K-H 液行常规恒压灌流。心外膜下插置 3 对电极,由外涂绝缘层特氟龙的不锈钢丝制成,右心室垂直方向置起搏电极一对,左心室方向置记录电极两对,两对电极纵向排列固定在一个干胶片上,每个内电极相距 2.5 mm。电极插入时,其纵行方向平行于心肌纤维的纵轴,另有接地电极一支插入灌流管口附近溶液中。以起搏频率 5Hz 和两倍于舒张期阈值的电压起搏,测出两对记录电极所记录到心外膜心电图的起始点的时间差,取连续 5 个起搏周长的时间差作为计算值,将传导距离除以该值即为传导速度。

1.8 实验分组

1.8.1 局部缺血/复灌心肌部分实验 大鼠随机分为 10 组,每组 6 只。① I/R 组(ischemia/reperfusion, I/R):心脏平衡 20 min 后,结扎左冠状动脉前降支 30 min,然后复灌 120 min;②缺血后处理组(ischemic postconditioning, Postcond 组):同 I/R 组,但在复灌初期立即给予反复 3 次短暂的冠状动脉前降支复灌/缺血的循环,每次 10 s,共计 1 min;③庚醇后处理组:同 I/R 组,但在复灌初期分别以浓度为 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 mmol · L⁻¹ 的缝隙连接脱耦联剂庚醇灌流 15 min;④ I/R + AAP10 组:同 I/R 组,但在复灌初期同时给予缝隙连接开放剂 AAP10 (1 × 10⁻⁷ mol · L⁻¹) 灌流 15 min;⑤ Postcond + AAP10:同 Postcond 组,但在复灌初期同时给予 AAP10 (1 × 10⁻⁷ mol · L⁻¹) 灌流 15 min;⑥庚醇预处理组:同 I/R 组,但在结扎冠状前给予 0.5 mmol · L⁻¹ 庚醇的 K-H 溶液继续灌流 15 min;⑦庚醇 + AAP10 组:同庚醇预处理组,但在复灌初期立即给予浓度为 1 × 10⁻⁷ mol · L⁻¹ 的 AAP10 灌流 15 min。

1.8.2 全心停灌/复灌心肌部分实验 大鼠随机分为 9 组,每组 6 只。①对照组:心脏稳定 20 min 后,继续灌流 15 min;②AAP10 组:心脏稳定 20 min 后,继续分别以浓度为 1 × 10⁻⁶、1 × 10⁻⁷、1 × 10⁻⁸ mol · L⁻¹ 的 AAP10 灌流 15 min;③ I/R 组:心脏平衡 20 min 后,全心停灌 30 min,然后复灌 120 min;④Postcond 组:同 I/R 组,但在复灌初期立即给予反复 6 次短暂的全心复灌/停灌的循环,每次各 10 s,共计 2 min;⑤庚醇后处理组:同 I/R 组,但在复灌时分别以浓度为 0.05、0.1、0.5、1.0 mmol · L⁻¹ 的庚醇灌流 15 min;⑥ I/R + AAP10 组:同 I/R 组,但在复灌初期同时以浓度为 1 × 10⁻⁷ mol · L⁻¹ 的 AAP10 灌流 15 min;⑦Postcond + AAP10 组:同 Postcond

组,但在复灌初期同时以浓度为 $1 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AAP10 的 K-H 液灌流 15 min;⑧庚醇预处理组:同 I/R 组,但在停灌前给予 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的庚醇继续灌流 15 min;⑨庚醇预处理 + AAP10 组:同庚醇组,但在复灌时以浓度为 $1 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 AAP10 灌流 15 min。

1.9 统计分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 One-way ANOVA 和 Newman-Keuls 法进行统计学分析。

2 结果

2.1 缺血后处理对缺血/复灌心肌的影响

与 I/R 组相比,缺血后处理组 LVDP、RPP 明显增高、 $\pm \text{dP}/\text{dt}_{\text{max}}$ 增大、冠脉流量增多,复灌期间冠脉流出液中 LDH 含量降低,结果见图 1,表 2。复灌期间心律失常评分下降,结果见表 3,心肌传导速度降低,结果见图 2,心肌梗死面积明显减小(I/R 组 $49.11\% \pm 18.29\%$, 缺血后处理组 $25.51\% \pm 8.94\%$, $P < 0.05$)。

表 2 缺血后处理和 AAP10 对离体心脏缺血/复灌过程中心室动力学指标的影响($n = 6, \bar{x} \pm s$)

Tab 2 Hemodynamic parameters in the isolated reperfused rat hearts($n = 6, \bar{x} \pm s$)

参数	缺血前	复灌/min			
		30	60	90	120
LVDP(缺血前的%)					
I/R	100(91.12 ± 22.83 mmHg)	63.37 ± 11.00	58.62 ± 5.39	50.53 ± 0.24	45.78 ± 4.43
Postcond	100(75.50 ± 11.58 mmHg)	90.44 ± 4.56 ¹⁾	79.51 ± 15.81 ²⁾	77.62 ± 8.27 ²⁾	76.59 ± 6.50 ²⁾
I/R + AAP10	100(88.54 ± 3.05 mmHg)	72.75 ± 9.77	67.84 ± 5.73	64.95 ± 4.73	55.30 ± 5.38
Postcond + AAP10	100(92.42 ± 7.05 mmHg)	60.68 ± 31.17 ³⁾	58.19 ± 11.05 ³⁾	55.55 ± 20.44 ⁴⁾	51.00 ± 26.48 ³⁾
RPP(缺血前的%)					
I/R	100(18548.18 ± 4656.92 mmHg · beat ⁻¹ · min ⁻¹)	67.44 ± 2.11	57.64 ± 7.99	54.87 ± 8.46	46.08 ± 23.78
Postcond	100(20132.10 ± 6511.83 mmHg · beat ⁻¹ · min ⁻¹)	98.22 ± 13.34 ²⁾	85.80 ± 14.68 ¹⁾	84.21 ± 12.34 ¹⁾	82.10 ± 12.22 ¹⁾
I/R + AAP10	100(20878.09 ± 3601.33 mmHg · beat ⁻¹ · min ⁻¹)	74.39 ± 8.18 ⁴⁾	68.99 ± 24.45	59.19 ± 23.61 ³⁾	57.14 ± 18.06 ³⁾
Postcond + AAP10	100(22598.43 ± 3919.64 mmHg · beat ⁻¹ · min ⁻¹)	66.95 ± 1.72 ⁴⁾	62.61 ± 10.30 ³⁾	59.31 ± 14.20 ³⁾	50.12 ± 18.22 ³⁾
+ dP/dtmax(缺血前的%)					
I/R	100(1960.05 ± 778.22 mmHg · s ⁻¹)	63.25 ± 3.26	56.86 ± 4.44	58.30 ± 5.45	51.10 ± 4.11
Postcond	100(1587.12 ± 526.38 mmHg · s ⁻¹)	96.46 ± 3.41 ²⁾	83.37 ± 12.93 ²⁾	82.01 ± 18.38 ²⁾	82.88 ± 20.67 ²⁾
I/R + AAP10	100(2798.66 ± 395.39 mmHg · s ⁻¹)	63.63 ± 4.51	58.86 ± 6.28 ⁴⁾	55.36 ± 2.72 ⁴⁾	50.98 ± 5.80 ⁴⁾
Postcond + AAP10	100(2797.29 ± 279.59 mmHg · s ⁻¹)	76.30 ± 19.72 ⁴⁾	70.52 ± 9.56 ³⁾	67.65 ± 9.34 ³⁾	60.75 ± 10.73 ⁴⁾
- dP/dtmax(缺血前的%)					
I/R	100(-1351.58 ± 486.55 mmHg · s ⁻¹)	69.10 ± 19.56	61.49 ± 14.73	59.8 ± 11.82	52.67 ± 12.31
Postcond	100(-1197.16 ± 307.57 mmHg · s ⁻¹)	93.73 ± 3.02 ²⁾	78.49 ± 13.75 ¹⁾	73.73 ± 22.26	3.13 ± 24.03 ¹⁾
I/R + AAP10	100(-1463.11 ± 388.33 mmHg · s ⁻¹)	54.86 ± 0.16 ⁴⁾	45.02 ± 3.46 ⁴⁾	44.94 ± 3.41 ⁴⁾	37.40 ± 3.42 ⁴⁾
Postcond + AAP10	100(-1460.02 ± 274.64 mmHg · s ⁻¹)	56.18 ± 2.29 ⁴⁾	47.69 ± 5.24	48.61 ± 6.81 ⁴⁾	38.70 ± 3.30 ⁴⁾
CF(缺血前的%)					
I/R	100(8.28 ± 0.28 mL · min ⁻¹)	65.68 ± 8.09	57.25 ± 3.46	47.68 ± 6.62	41.43 ± 3.54
Postcond	100(7.17 ± 1.04 mL · min ⁻¹)	79.94 ± 15.45 ¹⁾	73.19 ± 11.64 ¹⁾	69.44 ± 20.16 ¹⁾	64.06 ± 8.11 ²⁾
I/R + AAP10	100(7.57 ± 0.88 mL · min ⁻¹)	63.19 ± 9.21 ³⁾	51.46 ± 7.60 ⁴⁾	46.58 ± 9.16 ³⁾	42.47 ± 10.46 ⁴⁾
Postcond + AAP10	100(7.77 ± 0.15 mL · min ⁻¹)	62.15 ± 9.00 ³⁾	59.52 ± 10.63 ³⁾	56.94 ± 11.44	50.55 ± 10.55 ³⁾

注:与缺血/复灌组比较:¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与缺血后处理组比较:³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$

Note: ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ vs I/R; ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ vs Postcond

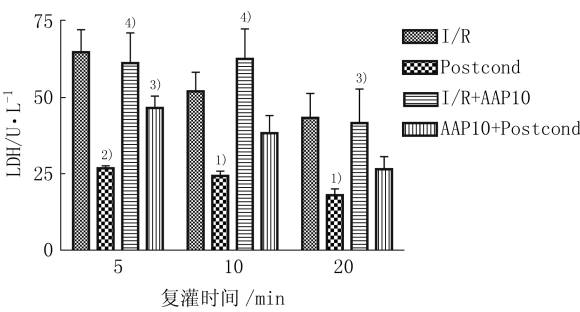


图 1 缺血后处理和 AAP10 ($1 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 对离体心脏缺血 30 min、复灌 120 min 时冠脉流出液中 LDH 的影响($n = 6, \bar{x} \pm s$)

注:与缺血/复灌组比较,¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与缺血后处理组比较,³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$

Fig 1 Effect of postconditioning (Postcond) and AAP10 ($1 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) on LDH activity in the coronary effluent of the isolated rat hearts subjected to 30 min of regional ischemia and 120 min of reperfusion (I/R) ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

Note: ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ vs I/R; ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ vs Postcond

表3 缺血后处理、AAP10($1 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)和不同浓度庚醇(0.05,0.5,0.1,1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)对离体心脏缺血30 min、复灌120 min时心律失常评分的影响($n=6, \bar{x} \pm s$)

Tab 3 Effect of postconditioning (Postcond), AAP10 ($1 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) and different doses (0.05, 0.5, 0.1, 1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively) heptanol on arrhythmia scores in the isolated rat hearts subjected to 30 min of regional ischemia and 120 min of reperfusion (I/R) ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组 别	复灌时间/min		
	0~30	31~60	61~120
I/R	3.16±0.75	2.50±0.84	1.60±0.38
Postcond	0.50±0.54 ²⁾	0.33±0.51 ²⁾	0.33±0.51 ²⁾
I/R + AAP10	1.00±0.89 ²⁾	0.66±0.52 ¹⁾	0.66±0.52 ²⁾
Postcond + AAP10	2.50±1.34 ⁴⁾	2.00±1.67 ³⁾	0.66±0.52 ⁴⁾
庚醇/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$			
0.05	3.57±0.86	2.33±0.61	0.30±0.31 ¹⁾
0.1	0.83±0.75 ²⁾	0.66±0.52 ²⁾	0±0 ²⁾
0.5	0.83±0.75 ²⁾	0±0 ²⁾	0±0 ²⁾
1.0	1.16±0.75 ²⁾	0.33±0.51 ²⁾	0±0 ²⁾

注:与缺血/复灌组比较:¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与缺血后处理组比较:³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$

Note:¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ vs I/R;³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ vs Postcond

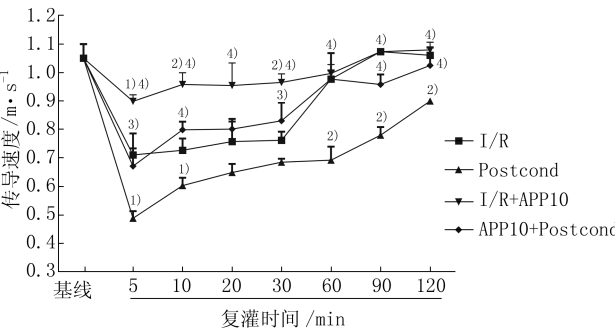


图2 缺血后处理和 AAP10($1 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)对离体心脏停灌30 min、复灌120 min时心肌传导速度的影响($n=6, \bar{x} \pm s$)

注:与缺血/复灌组比较,¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与缺血后处理组比较,³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$

Fig 2 Effect of postconditioning (Postcond) and AAP10 ($1 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) on conduction velocity of ventricular myocardium from the isolated rat hearts subjected to 30 min of global ischemia and 120 min of reperfusion (I/R) ($n=6, \bar{x} \pm s$)
Note:¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ vs I/R;³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ vs Postcond

2.2 庚醇对缺血/复灌心肌的影响

复灌初期分别给予 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的庚醇,与 I/R 组相比,各庚醇组使心肌复灌过程中心律失常评分下降,结果见表3,高浓度庚醇(0.1~1.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)使心肌梗死范围缩小(I/R 组 $49.11\% \pm 18.29\%$, 0.1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 庚醇组 $27.93\% \pm 1.38\%$, 0.05 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 庚醇组 $21.26\% \pm 5.00\%$, 1.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 庚醇组 $16.24\% \pm 3.44\%$,

三组 $P < 0.01$),复灌期间冠脉流出液中 LDH 含量降低,传导速度降低,结果见图3、4。

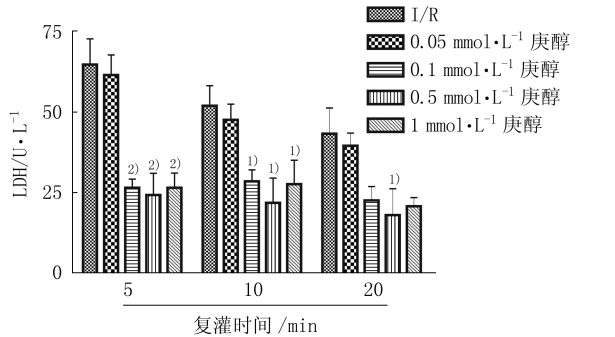


图3 不同浓度庚醇(0.05,0.5,0.1,1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)对离体心脏缺血30 min、复灌120 min时冠脉流出液中 LDH 的影响($n=6, \bar{x} \pm s$)

注:与缺血/复灌组比较,¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$

Fig 3 Effects of heptanol of different doses (0.05, 0.5, 0.1, 1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively) on LDH activity in the coronary effluent of the isolated rat hearts subjected to 30 min of regional ischemia and 120 min of reperfusion (I/R) ($n=6, \bar{x} \pm s$)
Note:¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ vs I/R

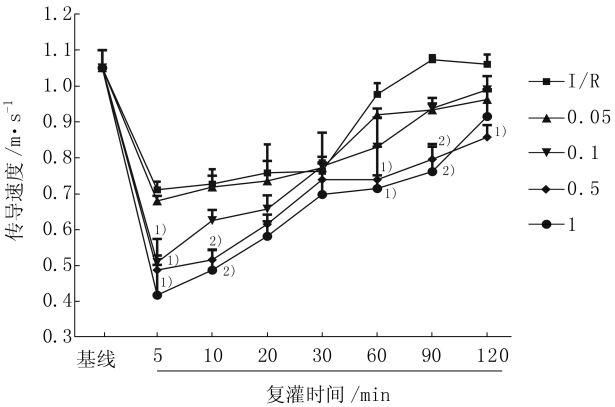


图4 不同浓度庚醇(0.05,0.5,0.1,1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)对离体心脏停灌30 min、复灌120 min时心肌传导速度的影响($n=6, \bar{x} \pm s$)

注:与缺血/复灌组比较,¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$

Fig 4 Effects of heptanol of different doses (0.05, 0.5, 0.1, 1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively) on conduction velocity of ventricle muscle from the isolated rat hearts subjected to 30 min of global ischemia and 120 min of reperfusion (I/R) ($n=6, \bar{x} \pm s$)
Note:¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ vs I/R

2.3 AAP10 对正常心肌传导速度的影响

1×10^{-6} , 1×10^{-7} , $1 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 AAP10 分别使心肌的传导速度($\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$)由正常时的 1.05 ± 0.05 增加到 1.13 ± 0.04 ($P < 0.05$), 1.30 ± 0.05 ($P < 0.01$), 1.43 ± 0.11 ($P < 0.01$),并呈剂量依从性关系。

2.4 AAP10 对缺血/复灌心肌的作用

与 I/R 组相比,AAP10 + I/R 组的 RPP, LVDP,

$\pm dP/dt_{\max}$ 和冠脉流量、LDH 含量、心肌梗死面积无明显变化,结果见图 1,表 2,但明显降低了复灌期各时间点的心律失常评分,结果见表 3,增加复灌 30 min 前的心肌传导速度,结果见图 2。

2.5 AAP10 减弱缺血后处理的心肌保护作用

复灌初期同时给予 $1 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 AAP10 取消了缺血后处理增高复灌期 RPP, LVDP, $\pm dP/dt_{\max}$ 的作用,结果见表 2,取消了缺血后处理增加冠脉流量和降低冠脉流出液中 LDH 释放的作用,结果见图 1,表 2,取消了缺血后处理降低心律失常评分的作用,结果见表 3,也取消了缺血后处理缩小心肌梗死面积的作用(缺血后处理组 $25.51\% \pm 8.94\%$, AAP10 + 缺血后处理组 $44.79\% \pm 14.77\%$, $P < 0.05$)。复灌时心肌传导速度比缺血后处理组加快,结果见图 2。

2.6 AAP10 减弱庚醇的心肌保护作用

复灌初期同时给予 $1 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 AAP10,减弱了庚醇缩小心肌梗死面积的作用(庚醇组 $6.96\% \pm 3.69\%$, 庚醇 + AAP10 组 $43.97\% \pm 8.67\%$, $P < 0.01$),减弱了庚醇降低心律失常评分的作用(庚醇组 $0.88\% \pm 0.64\%$, 庚醇 + AAP10 组 $2.0\% \pm 0.89\%$, $P < 0.05$),也减弱了庚醇降低复灌初期的心肌传导速度的作用,结果见图 5。

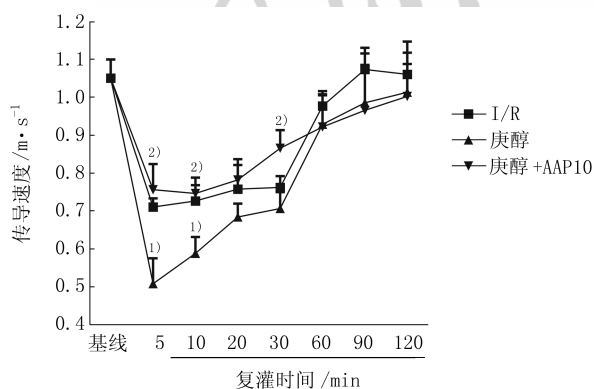


图 5 庚醇 ($0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 AAP10 ($1 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 对离体心脏停灌 30 min、复灌 120 min 时心肌传导速度的影响 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

注:与缺血/复灌组比较,¹⁾ $P < 0.05$;与庚醇组比较,²⁾ $P < 0.05$

Fig 5 Effects of heptanol ($0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) and AAP10 ($1 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) on conduction velocity of ventricle muscle from the isolated rat hearts subjected to 30 min of global ischemia and 120 min of reperfusion (I/R) ($n=6, \bar{x} \pm s$)

Note: ¹⁾ $P < 0.05$ vs I/R; ²⁾ $P < 0.05$ vs heptanol

3 讨论

本实验在离体心脏灌流模型上发现,缺血后处理可明显改善灌注后左心室收缩功能,增加缺血/复

灌后冠脉流量,减少心肌损伤标志酶 LDH 的漏出,减少心肌梗死面积,减少复灌期间心律失常的发生,缝隙连接脱耦联剂庚醇也有类似作用,这种心肌保护作用可被缝隙连接开放剂 AAP10 所阻断,提示缝隙连接可能参与了缺血后处理的心肌保护作用。

缝隙连接是相邻细胞之间的连接通道,低分子量物质可以自由通透,电位变化也可以进行传递^[5-6],不论是化学耦联或电耦联均可使信息通过缝隙连接传到另一细胞,起到细胞间通讯的作用^[7]。近年的研究表明,心肌细胞间的电耦联对心脏兴奋冲动的传导速度起着关键的决定性作用,因此,在决定传导速度方面,缝隙连接通道起到了重要的作用。在本实验中,笔者采用的测定电兴奋在心室肌细胞的传导速度可以间接反映心肌细胞间缝隙连接电耦联的情况。

在实验中,笔者发现经缺血后处理的心肌,在复灌期间心肌传导速度明显减慢。不同剂量的庚醇在复灌期间心肌传导速度也呈现不同程度的减慢,同时,这些作用都可以被缝隙连接开放剂 AAP10 取消或减弱。AAP10 的作用机制是增加细胞缝隙连接的传导性,而对心肌细胞的其他电生理参数没有明显影响^[8-9]。在实验中笔者观察到 AAP10 增加心肌的传导速度,并呈剂量依从性,表明 AAP10 可增加缝隙连接细胞间电通讯;另外, AAP10 可抵消缺血后处理和庚醇引起的心肌保护作用,进一步证实了缝隙连接可能参与了缺血后处理的心肌保护作用。

缺血后处理缩小心肌梗死面积的机制也可能与缝隙连接通讯的减弱有关:心肌细胞的高度挛缩,被认为是引起不可逆性再灌注损伤的重要原因^[10],经缺血后处理的心肌,在缺血后复灌时降低缝隙连接的电耦联和代谢耦联,即降低细胞间的通讯,减少了高度挛缩心肌细胞数目,防止细胞损伤面积的扩大,同时,心肌细胞之间代谢耦联下调,限制缺血区与其邻近区域产生的有害物质的扩散,保护了缺血区周围的正常心肌细胞,从而起到缩小梗死面积的作用。

REFERENCES

- [1] ZHAO Z Q, CORVERA J S, HALKOS M E, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003, 285(2): H579-H588.
- [2] OYAMADA M, KIMURA H, OYAMADA Y, et al. The expression, phosphorylation, and localization of connexin 43 and gap-junctional intercellular communication during the establishment of a synchronized contraction of cultured neonatal

- rat cardiac myocytes[J]. *Exp Cell Res*, 1994, 212(2):351-358.
- [3] KEEVIL V L, HUANG C L, CHAU P L, et al. The effect of heptanol on the electrical and contractile function of the isolated, perfused rabbit heart [J]. *Pflugers Arch*, 2000, 440(2):275-282.
- [4] CHEN B P, MAO H J, FAN F Y, et al. Heptanol, a gap junction uncoupler, protects heart against ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2005, 21(6):1071-1075.
- [5] HARRIS A L. Emerging issues of connexin channels: biophysics fills the gap[J]. *Q Rev Biophys*, 2001, 34(3):325-472.
- [6] BEVANS C G, KORDEL M, RHEE S K, et al. Isoform composition of connexin channels determines selectivity among second messengers and uncharged molecules [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(5):2808-2816.
- [7] OYAMADA M, KIMURA H, OYAMADA Y, et al. The expression, phosphorylation, and localization of connexin 43 and gap-junctional intercellular communication during the establishment of a synchronized contraction of cultured neonatal rat cardiac myocytes[J]. *Exp Cell Res*, 1994, 212(2):351-358.
- [8] MULLER A, GOTTWALD M, TUDYKA T, et al. Increase in gap junction conductance by an antiarrhythmic peptide[J]. *Eur J Pharmacol*, 1997, 327(1):65-72.
- [9] MULLER A, SCHAEFER T, LINKE W, et al. Actions of the antiarrhythmic peptide AAP10 on intercellular coupling [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 1997, 356(1):76-82.
- [10] PIPER H M, GARCIA-DORADO D, OVIZE M. A fresh look at reperfusion injury[J]. *Cardiovasc Res*, 1998, 38(2):291-300.

收稿日期:2008-02-24