

· 器官保护治疗 ·

左卡尼汀联合比索洛尔对内质网应激介导的心肺复苏后大鼠心肌损伤的影响

张美齐 吴爱萍 沈晔 陈环 涂建锋 翟昌林

【摘要】 目的 探讨左卡尼汀联合比索洛尔治疗对内质网应激介导的心肺复苏后大鼠心肌损伤的影响。**方法** 空白对照组为假手术组(SHAM组),电生理刺激建立心肺复苏模型(CR组),心肺复苏模型建立后给予注射左卡尼汀组(L组),比索洛尔治疗(B组),以及联合用药组(LB组)。复苏成功后 24 h 后 HE 染色检测心肌损伤指标,缺口末端标记法(TUNEL)法检测心肌细胞凋亡情况、免疫印迹检测内质网应激关键因子 GRP78 等蛋白的表达。**结果** 与 SHAM 组相比,其余 4 组均发生心肌病理损伤,心肌细胞凋亡率明显升高[(32.5% ± 3.8%)、(52.1% ± 4.2%)、(47.1% ± 5.8%)、(42.1% ± 4.6%)比(0.4% ± 0.0%)]($P < 0.05$),内质网关键因子蛋白表达升高($P < 0.05$);LB 以及 B 组内质网因子蛋白表达下降,心肌损伤程度较 CR 组减轻,其中 LB 组最明显,LB 组凋亡指数(32.5% ± 3.8%),($P < 0.05$);**结论** 左卡尼汀联合比索洛尔可以通过抑制心肌内质网应激反应,减轻心肺复苏后的心肌损伤。

【关键词】 心肺复苏术; 内质网; 应激; 凋亡

Effects of L-carnitine and bisoprolol on endoplasmic reticulum stress-mediated myocardial injury after cardiopulmonary resuscitation in rats Zhang Meiqi, Wu Aiping, Shen Ye, Chen Huan, Tu Jianfeng, Zhai Changlin. EICU, Zhejiang Provincial People's Hospital, Hangzhou 310014, China
Corresponding author: Zhai Changlin, Email: yesterdaygun@126.com

【Abstract】 Objective To explore the effects of L-carnitine and bisoprolol on endoplasmic reticulum stress-mediated myocardial injury after cardiopulmonary resuscitation in rats. **Methods** A total of 75 Sprague-Dawley rats were randomly divided into 5 groups of sham operation (sham); cardiopulmonary resuscitation (CR), L-carnitine (L), bisoprolol treatment (B) and L-carnitine and bisoprolol treatment (LB). Myocardial pathological changes were detected by hematoxylin and eosin, myocardial apoptosis by terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick and the expressions of key factors in endoplasmic reticulum (ER) by Western blot. **Results** Compared with sham group, apoptosis and pathological lesions significantly increased in other groups ($P < 0.05$). And the levels of GRP78, CHOP and Caspase-12 were significantly higher ($P < 0.05$). The expression of ER factor protein and the degrees of myocardial injury in LB and B groups decreased compared with CR group. And LB group was the most obvious. **Conclusions** Combined use of levocarnitine and bisoprolol exerts protective effects on cardiopulmonary resuscitation in rats. And the mechanism may be related to an inhibition of ER stress.

【Key words】 Cardiopulmonary resuscitation; Endoplasmic reticulum; Stress; Apoptosis

心肺复苏(CPR)目前成功率仍然很低^[1]。超过 60% 的患者复苏后 1 周内死亡,其中 50% 死于复苏后心肌功能不全^[2]。目前认为严重的心肌缺血/再灌注损伤是导致心功能不全的主要因素。心肺复苏后心肌损伤甚至会导致复苏患者短期内死亡^[3]。内质网稳态的破坏可导致大量错误或未折

叠蛋白质在内质网中聚集,通过相应的信号通路,引起一系列的细胞反应,即内质网应激(ERS)^[4]。ERS 在多种疾病的发生、发展中起到重要作用^[5]。左卡尼汀(L-carnitine)可以协助脂肪代谢,改善心肺功能,减轻心肌缺氧。而比索洛尔则可以减慢心率,减轻心肌氧耗,抑制肾素-血管紧张素系统。本研究运用左卡尼汀联合比索洛尔治疗对心肺复苏后大鼠进行治疗,比较治疗组与未治疗组大鼠心肌损伤情况以及内质网应激指标变化,进而评估左卡尼汀联合比索洛尔治疗对心肺复苏后大鼠心肌功能的影响。

DOI:10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2015.19.009

基金项目:2012 年浙江省药卫生一般研究计划(2012KYB008;B 类)

作者单位:310014 杭州,浙江省人民医院急诊重症医学科

通信作者:翟昌林,Email: yesterdaygun@126.com

材料与方法

一、材料

80 只 SD 大鼠由山东大学医学院动物实验室提供,雌性清洁级,200~300 g,4~6 月龄,饲养于恒温恒湿笼中,常规饮食。动物实验经浙江省人民医院动物护理及使用委员会批准。缺口末端标记法(TUNEL)试剂盒购自武汉博士德生物技术有限公司。C/EBP 同源蛋白(CHOP)、内质网应激(ERS)相关因子葡萄糖调节蛋白 78(GRP78)、胱冬肽酶(caspase)-12 兔多克隆抗体购于北京天根生化科技有限公司。比索洛尔纯粉购买于北京四环医药科技股份有限公司,左卡尼汀纯品购买于上海酶联实业有限公司,纯度 98%。

二、方法

1. 动物模型建立和分组:大鼠心肺复苏模型:经食管起搏心室,将起搏电极连接生物机能实验系统,远端插入食管约 4 cm。连续快速起搏诱发室颤发生,若室颤转窦率,则需继续心室起搏。心脏骤停的标准:(1)心电图提示室颤;(2)皮肤黏膜明显发绀;(3)心脏搏动消失。心脏骤停后心肺复苏成功的标准:(1)心电图提示室颤转为窦性心率或室上性节律,平均动脉压持续升高并 > 60 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa);(2)皮肤黏膜发绀明显减轻;(3)可触到明显的心尖区搏动。造模过程中共死亡 5 只,剩余 75 只。

实验分组:75 只大鼠数字表法随机分为 5 组:假手术组(SHAM 组)、心肺复苏模型组(CR 组)、左卡尼汀组(L 组)、比索洛尔组(B 组)、左卡尼汀及比索洛尔联合治疗组(LB 组)。心肺复苏模型建立后注射左卡尼汀 200 mg/kg 及比索洛尔 1 mg/kg,复苏成功后 24 h 留取血浆以及心肌标本。

2. HE 染色法观察心肌病理变化:10% 福尔马林溶液内固定过夜的组织标本,4 mm 连续切片,常规乙醇脱水,石蜡包埋,经烤片,二甲苯脱蜡,乙醇脱水,流水冲洗,二甲苯透明,树脂胶封片后,显微镜下观察。

3. 酶联免疫法(ELISA)检测各组血浆肌酸激酶同工酶(CK-MB)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)的表达:实验终点时间,暴露下腔静脉,抽静脉血进行离心,根据实验说明进行操作。根据标准曲线,检测各组实验大鼠成分血浆浓度。

4. TUNEL 测心肌细胞凋亡:4% 多聚甲醛中固定心肌组织、脱水、浸蜡包埋,按照说明书操作。荧

光显微镜下阳性凋亡细胞核呈棕色,Image Pro Plus 4.5 图像分析软件计数凋亡细胞。凋亡指数 = 阳性细胞/(阳性细胞 + 阴性细胞) $\times 100\%$ 。

5. 免疫印迹法检测各组心肌 GRP78、CHOP、caspase-12 蛋白表达:取大鼠心肌组织, RIPA 缓冲液裂解液置冰上裂解 15 min,裂解液置于低温离心机中在 4 °C 下以 14 000 r/min 离心 10 min, α -氨基丙烯酸正丁酯(BCA)法测定上清液中总蛋白浓度。每孔加入 50 μ g 蛋白样品,采用 10% 蛋白质聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)-垂直电泳分离蛋白, BIO-RAD 半干转印系统,20 V 转膜 1 h,5% 牛血清白蛋白(BSA)溶液室温封闭 1.5 h;加入兔抗人 GRP78 抗体(1:1 000),兔抗人 CHOP 抗体(1:1 000)及兔抗人 caspase-12 抗体(1:1 000),兔抗人磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)抗体(1:1 000)作为内参,4 °C 孵育过夜,TBST 工作液洗去残余一抗,分别加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗(1:5 000),室温孵育 1 h,TBST 工作液洗去未结合二抗。于暗室内,在膜上滴加增强化学发光(ECL)溶液,并使胶片曝光,全自动洗片机洗片。

6. 统计学处理:采用 SPSS 18.0 软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,两两比较采用 Dunnett- t 检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 心肌病理变化:SHAM 组大鼠心肌组织染色均匀,排列整齐,结构清晰,纤维完整,细胞膜以及细胞核完整。CR 组大鼠心肌组织可见严重损伤:大量炎症细胞浸润,间质水肿,部分心肌纤维可见断裂,边界欠清;L 组大鼠心肌可见损伤较 CR 组有减轻,但病理积分无明显差异($P > 0.05$);B 组大鼠心肌可见损伤较 CR 组以及 L 组均有所减轻,病理积分下降($P < 0.05$),比索洛尔治疗对心肺复苏大鼠也有一定的治疗作用;而 LB 组心肌轻度损伤:纤维染色不均,间质水肿,排列紊乱,病理积分显示其较其余各组病理损伤均减轻($P < 0.05$)(图 1)。

2. 心肺复苏大鼠心肌细胞凋亡:TUNEL 法检测发现,与 SHAM 组凋亡指数($0.4\% \pm 0.1\%$)相比,CR 组凋亡指数($52.1\% \pm 4.2\%$)有明显升高($P < 0.05$),L 组大鼠凋亡指数($47.1\% \pm 5.8\%$)较 CR 组有减少,但差异无统计学意义($P > 0.05$),B 组大鼠凋亡指数($42.1\% \pm 4.6\%$)较 CR 组减少($P < 0.05$),而 LB 组凋亡指数($32.5\% \pm 3.8\%$)要低于 CR 组,($P < 0.05$)(图 2)。

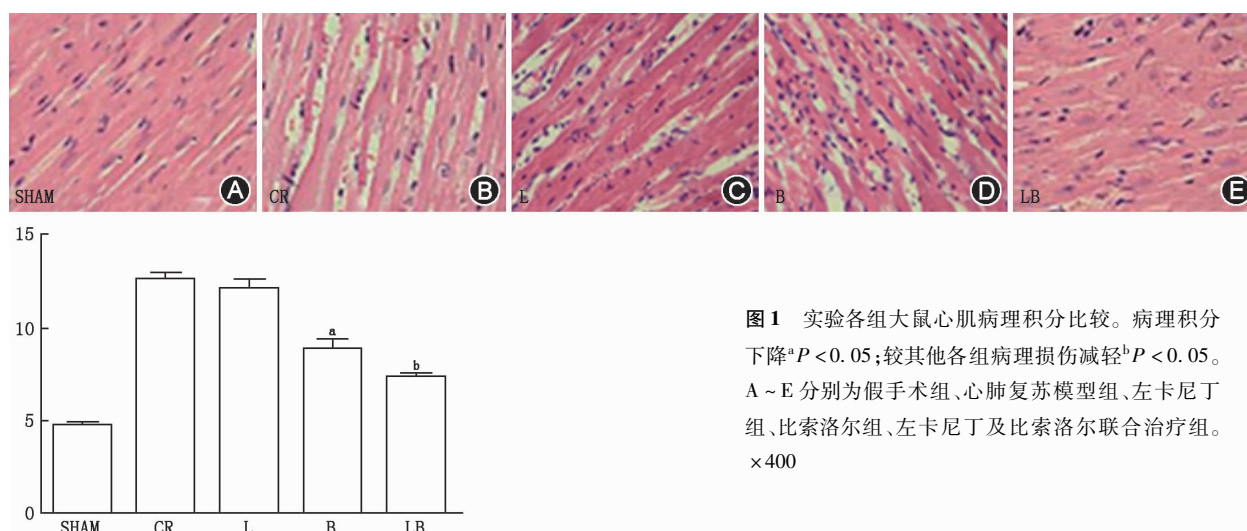
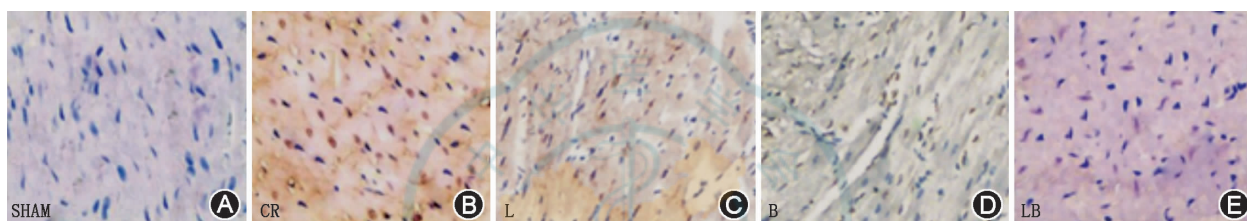


图1 实验各组大鼠心肌病理积分比较。病理积分下降^a $P < 0.05$;较其他各组病理损伤减轻^b $P < 0.05$ 。A~E 分别为假手术组、心肺复苏模型组、左卡尼汀组、比索洛尔组、左卡尼汀及比索洛尔联合治疗组。 $\times 400$



2 实验各组大鼠心肌细胞凋亡。A~E 分别假手术组、心肺复苏模型组、左卡尼汀组、比索洛尔组、左卡尼汀及比索洛尔联合治疗组。 $\times 400$

3. 各组血浆 CK-MB、SOD、MDA 表达:心肺复苏后血浆肌酸激酶同工酶(CK-MB)、丙二醛(MDA)表达均明显升高,超氧化物歧化酶(SOD)表达下降,大鼠心肺复苏后炎症反应加剧,心肌损伤加重($P < 0.05$);CR、L、B 组大鼠 CK-MB、MDA、SOD 浓度差异统计学意义($P > 0.05$);而 LB 组大鼠血浆 CK-MB、MDA 明显低于 CR 组($P < 0.05$),SOD 表达高于 CR 组,这提示左卡尼汀联合比索洛尔后可以明显降低 MDA 和心肌损伤标志物 CK-MB 的表达,增加 SOD 表达,联合用药可以减轻心肌损伤(表 1)。

4. 各组心肌内质网关键因子 CHOP、GRP78、caspase-12 蛋白表达:CR 组心肌组织内质网关键因子 CHOP、GRP78、caspase-12 蛋白表达较 SHAM 组均升高($P < 0.05$);L 组 GRP78、CHOP、caspase-12

蛋白低于 CR 组,但差异无统计学意义($P > 0.05$);B 组 GRP78、CHOP、caspase-12 蛋白低于 CR 组($P < 0.05$);而 LB 组 GRP78、CHOP、Caspase-12 蛋白明显低于 CR 及 B 组($P < 0.05$)(图 3)。

讨 论

心肺复苏并发症多,死亡率高,其中复苏后心功能不全是心肺复苏后高死亡率的主要病因之一^[6-7]。因此,如何保护心肺复苏时心肌组织,减轻心肌损伤,成为了急重症研究领域的一个重要方向^[8]。

目前常用的心肺复苏模型是诱发大鼠心跳骤停为常用方法包括注射氯化钾停跳法和气管夹闭窒息法^[9-10]。前者氯化钾的剂量不易控制,体内易聚集,会严重影响实验结果;后者所需仪器及操作比较简单,但是其不能完全反映临床上的实际情况,因为临床上心脏骤停的主要病因为心源性骤停,而不是窒息。因此本研究采用了经食管电刺激心室快速起搏法诱导大鼠室颤后心肺复苏,建立大鼠心肺复苏模型^[11],较传统方法更加接近于临床病理生理。

左卡尼汀(左旋肉碱)是能量代谢中的一种必需物质,大量研究证实其对心肌具有显著保护作用。Lee 等^[12]研究证实左卡尼汀可以通过促进脂肪酸进入线粒体及糖代谢进而对缺血心肌起到保护作

表 1 ELISA 法检测实验各组 SOD、MDA、CK-MB 的表达($\bar{x} \pm s$)

组别	SOD (U/ml)	MDA (nmol/ml)	CK-MB (U/L)
SHAM 组	249.23 \pm 28.28	4.12 \pm 0.87	32.24 \pm 2.32
CR 组	148.62 \pm 10.27 ^a	7.25 \pm 0.40 ^a	229.25 \pm 22.71 ^a
L 组	142.98 \pm 8.367 ^a	7.41 \pm 0.65 ^a	236.12 \pm 19.55 ^a
B 组	148.24 \pm 12.65 ^a	7.30 \pm 0.50 ^a	233.50 \pm 20.88 ^a
LB 组	172.22 \pm 17.38 ^{ab}	5.55 \pm 0.72 ^{ab}	118 \pm 9.12 ^{ab}

注:与 SHAM 比,^a $P < 0.05$;与 CR 比,^b $P < 0.05$)

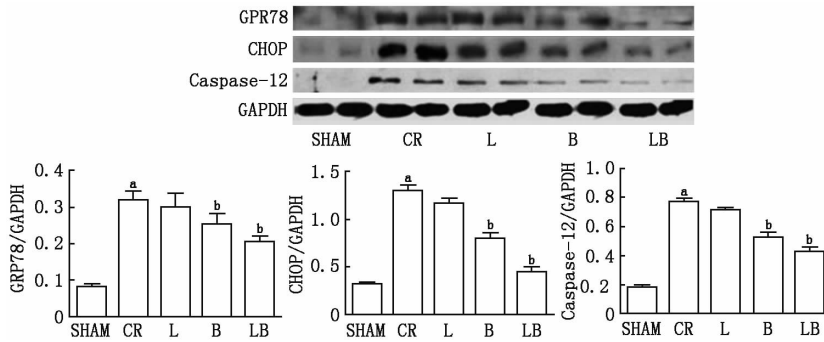


图3 实验各组大鼠内质网应激关键因子的表达。病理积分下降^a $P < 0.05$ 较其他各组病理损伤减轻^b $P < 0.05$ 。SHAM:假手术组;CR:心肺复苏模型组;L:左卡尼汀组;B:比索洛尔组;LB:左卡尼汀及比索洛尔联合治疗组

用。Omori 等^[13]研究发现左卡尼汀可以增加花生四烯酸途径,减轻心脏纤维化,改善高血压心脏病心衰。以往研究证实左卡尼汀具有多脏器保护作用^[14-15],但是在我们的研究中,单用左卡尼汀干预在大鼠心肺复苏模型中并未见明显的心肌保护作用,具体机制还需要进一步的深入研究。

比索洛尔是一种高选择性 β_1 受体阻滞剂, β_1 -受体阻滞剂通过改善心肺复苏后大鼠心肌线粒体 ATP 酶活性,减轻复苏后心肌损伤程度^[16]。研究表明心肺复苏后 RAS 系统和 SAS 系统都处于过度兴奋状态^[17-18],应用 β_1 -受体阻滞剂可以抑制 RAS 以及 SAS 系统活性,对心肺复苏后心肌起到一定的保护作用。本研究单用比索洛尔干预在大鼠心肺复苏模型中具有一定的心肌保护作用,但作用不及联合左卡尼汀干预。

本研究发现,心肺复苏后的大鼠心肌细胞凋亡率以及病理损伤均明显增加,而左卡尼汀和比索洛尔联合干预后大鼠心肌细胞凋亡以及病理损伤情况有了明显改善,MDA 及 CK-MB 表达降低,SOD 表达增加,这些提示左卡尼汀联合比索洛尔治疗具有心肌保护作用。western 检测内质网应激相关 GRP78、CHOP、Caspase-12 蛋白发现,左卡尼汀联合比索洛尔干预后 GRP78、CHOP、Caspase-12 蛋白表达较未干预组明显下降,提示左卡尼汀联合比索洛尔干预可以抑制心肺复苏后大鼠内质网应激。因此我们推测左卡尼汀联合比索洛尔干预对心肌的保护作用可能与其抑制内质网应激有关。

综上所述,左卡尼汀联合比索洛尔干预可能抑制了内质网应激,减轻心肌细胞凋亡,对心肺复苏大鼠损伤心肌起到保护作用,但其具体分子调控机制,尚需进一步的深入研究。

参考文献

- [1] 何爱文,陈寿权. 心肺复苏研究的最新进展[J]. 中华危重症医学杂志,2012,5(4):218-223.
- [2] The Brain Resuscitation Clinical Trial II Study Group. A randomized clinical trial of calcium entry blocker administration to comatose survivors of cardiac arrest. Design, methods, and patient characteristics [J]. Control Clin Trials, 1991,12(4):525-545.
- [3] 葛晓平,汪云开. 虾青素对过氧化氢损伤心肌细胞的保护作用[J]. 中华危重症医学杂志电子版,2011,4(1):35-38.
- [4] 翟昌林,唐敏敏,胡惠林,等. 针灸预处理对大鼠心肌缺血再灌注后内质网应激的影响[J]. 中华危重症医学杂志,2014,7(3):16-19.
- [5] Kaufman RJ, Arboir A. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease[J]. J Clin Invest,2002,110(10):1389-1398.
- [6] Tian Y, Zhang W, Xia D, et al. Postconditioning inhibits myocardial apoptosis during prolonged reperfusion via a JAK2-STAT3-Bcl-2 pathway[J]. J Biomed Sci,2011,18(2):53.
- [7] Chung SY, Sheu JJ, Lin YJ, et al. Outcome of patients with profound cardiogenic shock after cardiopulmonary resuscitation and prompt extracorporeal membrane oxygenation support [J]. Neurol Res,2012,76(6):1385-1392.
- [8] Ji XF, Shuo W, Yang L, et al. Impaired β -adrenergic receptor signalling in post-resuscitation myocardial dysfunction [J]. Resuscitation,2012,83(5):640-644.
- [9] Kofler L, Otsuka T, Zhang Z, et al. Differential effect of PARP-2 deletion on brain injury after focal and global cerebral ischemia [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2006,26(1):135-141.
- [10] Hickey RW, Kochanek PM, Ferimer H, et al. Induced hyperthermia exacerbates neuronal histologic damage after asphyxial cardiac in rats[J]. Crit Care Med, 2003,31(2):521.
- [11] Chen MH, Liu TW, Xie L, et al. A simpler cardiac arrest model in rats [J]. Am J Edmery Med, 2007,25(6):623-630.
- [12] Lee JH, Jarreau T, Prasad A, et al. Nutritional assessment in heart failure patients[J]. Congest Heart Fail, 2011,17(4):199-203.
- [13] Omori Y, Ohtani T, Sakata Y, et al. L-Carnitine prevents the development of ventricular fibrosis and heart failure with preserved ejection fraction in hypertensive heart disease [J]. Hypertens, 2012,11(2):220-223.
- [14] Zaugg CE, Spaniol M, Kaumann P, et al. Myocardial function and energy metabolism in carnitine -deficient rats[J]. Cell Mol Life Sci, 2003,60(4):767-775.
- [15] Evangelou A, Vlassopoulos D. Carnitine metabolism and deficit-when supplementation is necessary [J]. Curr Pharm Biotechnol, 2003,4(3):211-219.
- [16] 孙宁玲,洪婷婷,张瑞军,等. 缓释维拉帕米与比索洛尔对高血压患者交感神经活性的影响[J]. 中华心血管病杂志,2000,28(3):181.
- [17] 陈延英,孟凌新,贾有海,等. 艾司洛尔对心肺复苏大鼠心肌线粒体 ATP 酶活性的影响[J]. 解放军医学杂志,2007,2(32):115-116.
- [18] Funck BC, van Veldhuisen DJ, van de Ven Louis LM, et al. Influence of order and type of drug (bisoprolol vs. enalapril) on outcome and adverse events in patients with chronic heart failure: a post hoc analysis of the CIBIS-III trial [J]. Eur J Heart Fail, 2011,13(7):765-772.

(收稿日期:2015-03-09)

(本文编辑:秦学军)