

· 基础研究 ·

## 缺氧预处理对猪缺氧复氧冠状动脉内皮舒张功能的影响\*

周琦云, 胡应学, 何立术, 冯志强, 龚 坚, 李世康<sup>△</sup>  
(广西医科大学第一附属医院心胸外科, 南宁 530021)

**摘要:**目的 探讨缺氧预处理对猪缺氧复氧冠状动脉 EDHF 介导的内皮舒张功能的影响及其机制。方法 随机选取新鲜猪心 9 个, 每只取其心外膜下冠状动脉前降支中下 1/3 切成 4 段, 长 2 mm, 随机置入如下 4 组的环境中。对照组: 冠脉血管环未经缺氧/复氧处理, 直接在 37 °C 有氧条件下用 KH 液浸泡 90 min; 实验组 A: 在 4 °C 条件下用 KH 液缺氧浸泡 60 min 后复氧 30 min; 实验组 B: 先缺氧 5 min 后复氧 10 min, 再按实验组 A 的方法进行处理; 实验组 C: 先用含 5-羟基癸酸甘油酯(10 μmol/L) 的溶液浸泡 25 min, 再按实验组 B 的方法进行处理。然后采用器官槽法检测血管环在消炎痛(7 μmol/L)、N-硝基-L-精氨酸(300 μmol/L) 及氧合血红蛋白(20 μmol/L) 作用下, 前列腺素 F<sub>2α</sub> 引发的血管收缩反应, 及缓激肽引发的血管舒张反应。结果 与对照组比较, 缓激肽引发的血管环最大舒张反应, 实验组 A、C 均明显降低(P<0.001), 而实验组 B 变化不明显(P>0.05)。结论 缺氧复氧会损害冠状动脉内皮源性超极化因子所介导的内皮依赖性舒张功能, 缺氧预处理对其功能有保护作用。缺氧预处理能选择性开放线粒体 ATP 敏感的钾离子通道, 可能是产生这一效果的主要原因。

关键词: 冠状血管; 内皮功能; 预处理

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.18.020

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)18-2115-02

## The effect of hypoxic preconditioning on the function of coronary artery endothelium after hypoxia-reoxygenation\*

Zhou Qiyun, Hu Yingxue, He Lishu, Feng Zhiqiang, Gong Jian, Li Shikang<sup>△</sup>  
(Department of Cardiothoracic, Cardiovascular Institute, the First Hospital of  
Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China)

**Abstract:** Objective To study the effect of hypoxic preconditioning on the function of coronary artery endothelium after hypoxia-reoxygenation. **Methods** Thirty-six porcine coronary rings in 2 mm long were randomly divided into four groups. Control group (n=9): incubation in Krebs-Henseleit(KH) at 37 °C for 90 minutes with a constant supply of oxygen; Group A(n=9): 60-minute hypoxia(PO<sub>2</sub><15 mm Hg) followed by 30 minute reoxygenation in KH at 4 °C; Group B(n=9): hypoxia for 5 minutes followed by reoxygenation for 10 minutes before hypoxia-reoxygenation, Group C(n=9): 5-hydroxydecanoate(10 μmol/L) was given 20 minutes prior to hypoxia preconditioning. The endothelium-derived hyperpolarizing factor(EDHF)-mediated relaxation(percentage of 30 nmol/L U46619 precontraction) induced by bradykinin in the presence of indomethacin(7 μmol/L), LNNA(300 μmol/L) and oxy-hemoglobin(20 μmol/L) were measured in the organ chambers. **Results** Compared with control group, the relaxation induced by bradykinin was significantly decreased in group A, C, while there was no significant difference in group B. **Conclusion** Hypoxia-reoxygenation impairs EDHF mediated relaxation in coronary artery. This function can be restored by hypoxia preconditioning its effect might be related to mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels.

Key words: coronary vessels; endothelium function; preconditioning

新近的研究表明, 缺血预处理能减轻缺血再灌注对心脏功能的损伤<sup>[1-3]</sup>。但其对冠状动脉内皮功能影响的研究报道不多。本研究用离体猪心冠状动脉采用器官槽法<sup>[4-5]</sup>, 探讨在冠状动脉血管缺氧和复氧期间, 缺氧预处理对冠状动脉内皮超极化因子功能的影响及其作用机制, 为完善围手术期心脏功能的保护方法提供实验依据。

## 1 材料与方法

**1.1 主要试剂和设备** 前列腺素 F<sub>2α</sub>(U46619), 缓激肽, 一氧化氮合成酶阻断剂 N-硝基-L-精氨酸(N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine LNNA), 环加氧酶抑制剂消炎痛(indomethacin), 氧合血红蛋白(均来自美国 Sigma 公司), 5-羟基癸酸甘油酯(美国 Amfine-

com 公司)。配置重碳酸盐缓冲液(Rrebs-henseleit, KH), 其成分均为国产分析纯试剂。超级恒温器(WC109-5, 重庆试验设备厂), 血管张力计算机软件(Powerlab Chart v3.4.3 大澳大利亚 ADInstruments Pty Ltd)。

**1.2 实验动物** 取 9 个新鲜猪心, 每个猪心在心外膜下冠状动脉前降支中、下 1/3 处, 将其切成 4 段, 长 2 mm, 共用 36 条血管环。

**1.3 模型的建立** 猪心置入 4 °C KH 液中, 10 min 内游离出 4 条 2 mm 长的血管环, 按实验要求进行相应的处理后, 将其悬挂于不锈钢丝上并与肌张力换能器相连接。同时启动的实验器官槽充以 KH 液 9 mL, 持续给 95%O<sub>2</sub>+5%CO<sub>2</sub> 混合气体,

\* 基金项目: 广西回国基金资助项目(桂科回 0991007)。 作者简介: 周琦云(1987~), 主治医师, 主要从事围术期冠状动脉功能保护的研究。 <sup>△</sup> 通讯作者, Tel: 13397705186; E-mail: gxtinghaodi@163.com。

以维持氧分压( $PO_2$ ) $>401.25$  mm Hg,二氧化碳分压( $PCO_2$ ) $>40$  mm Hg,温度维持在 $37^\circ C$ 。随机选取4段2 mm的血管环,将一直径与血管口径相近的木棍插入血管腔,紧贴内皮轻柔摩擦1 min,去除内皮,观察其对缓激肽的舒张反应。

**1.4 实验步骤及分组** 随机将36条血管环分为4组,每组9条。对照组:冠脉血管环在 $37^\circ C$ 有氧条件下用KH液保存1 h,将血管环悬挂固定后,予 $2.5\sim 3.0$  g的前负荷至血管环,注入KH液9 mL浸泡血管环1 h,再平衡30 min使血管张力恢复至原水平,加入消炎痛( $7\ \mu\text{mol/L}$ )、N-硝基-L-精氨酸( $300\ \mu\text{mol/L}$ )和氧合血红蛋白( $20\ \mu\text{mol/L}$ )水浴30 min,再加入前列腺素 $F_{2\alpha}$ ( $30\ \text{nmol/L}$ )使血管环预收缩达一稳定的平台,依次加入不同浓度的缓激肽( $-10\sim -6.5\ \text{logM}$ )舒张血管环;实验组A:用KH液在 $4^\circ C$ 条件下浸泡30 min后复氧30 min,然后按对照组的方法检测EDHF介导的血管内皮依赖性舒张;实验组B:先缺氧5 min后复氧10 min,再按实验组A的方法进行处理;实验组C:先在 $37^\circ C$ 有氧条件下用含5-羟基癸酸甘油酯( $10\ \mu\text{mol/L}$ )的溶液浸泡25 min,再按实验组B的方法进行处理。

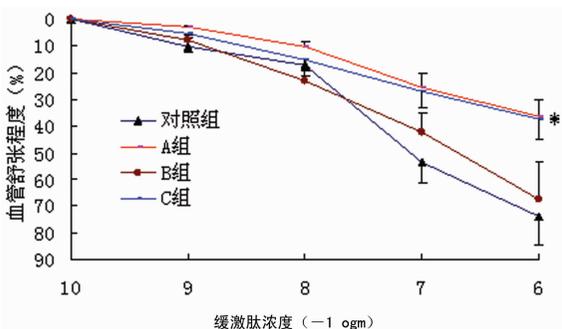
**1.5 观察指标** 血管环平衡后,前列腺素 $F_{2\alpha}$ 引发的冠状动脉最大预收缩强度;缓激肽引发的内皮源性舒张(占预收缩高度的百分比)。

**1.6 统计学处理** 应用SPSS16.0软件微机处理,数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示。组间比较用ANOVA方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 冠状动脉的血管收缩反应** 前列腺素 $F_{2\alpha}$ 引发的冠状动脉血管收缩强度变化,与对照组( $2.49\pm 0.57$ )g比较,A组( $2.38\pm 0.65$ )g、B组( $2.53\pm 0.41$ )g、C组( $2.41\pm 0.62$ )g比较,差异无统计学意义( $P=0.71,0.87,0.78$ )。

**2.2 EDHF介导的血管内皮源性舒张变化** 随着缓激肽的增加,血管内皮源性舒张反应逐渐增强(图1)。当缓激肽浓度为 $-6\ \text{logM}$ 时,EDHF介导的血管内皮源性舒张达最大值,与对照组( $72.1\pm 5.4$ )%比较,组A、C组[( $35.4\pm 2.9$ )%,( $P<0.001$ )],[( $37.9\pm 3.1$ )%,( $P<0.001$ )]明显降低,B组变化不明显[( $67.7\pm 3.8$ )%,( $P=0.06$ )]。



\*:  $P<0.001$ ,与对照组比较。

图1 不同浓度缓激肽引起的内皮依赖性血管舒张反应

## 3 讨 论

血管内皮细胞能控制内膜下平滑肌细胞对药物性和生理性刺激的反应,期间包括众多的管腔内受体和复杂的细胞内机制,合成与释放多种血管活性物质<sup>[6-8]</sup>。其控制血管舒张功能

的重要作用已愈受重视。由血管内皮细胞分泌的具有舒张血管活性的物质包括一氧化氮(NO)、前列环素(PGI<sub>2</sub>)和EDHF共3种<sup>[9-10]</sup>,以调节局部组织的血流灌注。目前,有关EDHF的化学性质及作用机制尚不清楚。研究发现<sup>[11-12]</sup>,EDHF能使血管平滑肌超极化,促进细胞钾通道的开放,降低细胞内的钙从而舒张血管。

研究结果提示,在 $37^\circ C$ 有氧条件下用KH液浸泡60 min后,阻断了NO和PGI<sub>2</sub>舒张血管的途径,EDHF仍处于可激活状态,缓激肽能引发72.1%的血管舒张反应;而在 $4^\circ C$ 条件下用KH液缺氧浸泡60 min后复氧30 min,EDHF所介导的舒张反应则明显减低。这表明EDHF在冠状动脉内皮依赖性舒张的调节过程中起着重要的作用,但缺氧复氧会减低其功能。研究推测<sup>[13]</sup>,缺氧抑制ATP敏感性钾通道的开放,可能是产生这一效果的原因。但若能使细胞线粒体ATP敏感性钾离子通道开放,促使血管平滑肌超极化,则有利于缺氧复氧所抑制的EDHF功能的恢复。

多项研究结果表明,缺血预处理所表现出的一种强大的内源性保护现象<sup>[14]</sup>,诸如细胞凋亡减少,灌注后心律失常和心肌梗死的减轻以及许多其他心肌保护作用的产生都是通过开放线粒体ATP敏感钾通道得以实现的,线粒体ATP敏感钾通道可能是缺氧预处理的共同终末途径<sup>[15]</sup>。

研究结果提示,与对照组相比,经过缺氧预处理后,缺氧复氧后的冠状动脉EDHF所介导的舒张反应明显恢复,但在缺氧预处理之前,若先应用线粒体上的ATP敏感性钾通道的开放剂5-羟基癸酸甘油酯浸泡血管,则缺氧预处理对EDHF的作用消失。这说明缺氧预处理对EDHF所介导的舒张反应有保护作用,其作用机制可能与缺氧预处理能选择性开放线粒体ATP敏感性钾通道的功能密切相关。总之,本研究发现,缺氧复氧会损害冠状动脉EDHF所介导的内皮依赖性舒张功能,缺氧预处理对其功能有保护作用。缺氧预处理能选择性开放线粒体ATP敏感的钾离子通道,可能是产生这一效果的主要原因。

## 参考文献:

- [1] Vander Heide R. Clinically useful cardioprotection: ischemic preconditioning then and now[J]. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2011, 16(2): 251-254.
- [2] Huffmyer J, Raphael J. Physiology and pharmacology of myocardial preconditioning[J]. Semin Cardiothorac Vasc Anesth, 2010, 4(1): 54-59.
- [3] Bell RM, Yellon DM. Conditioning the whole heart—not just the cardiomyocyte[J]. J Mol Cell Cardiol, 2012, 53(1): 24-32.
- [4] 李世康,龙村,何巍. 高钾停搏液中镁离子对冠状动脉张力的影响[J]. 中华胸心血管外科杂志, 2006, 22(4): 259-261.
- [5] 李世康,龙村,程邦昌. 组氨酸-色氨酸-酮戊二酸与威斯康星大学溶液对冠状动脉内皮细胞的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2003, 20(1): 12-13.
- [6] 李世康,栗振坤,龙村,等. 四氢生物蝶(下转第2119页)

谱、高效移植多种蛋白酶、脂水解酶、糖水解酶和不良刺激引起的炎性因子的释放<sup>[9]</sup>,已广泛应用于急性胰腺炎、急性循环衰竭、改善器官缺血再灌注<sup>[10]</sup>。本研究发现,制作脓毒症模型后给予乌司他丁治疗能够明显减少 p38 MAPK 蛋白表达。并且在前期研究中作者发现乌司他丁能够明显减少脓毒症时膈肌内氧自由基释放,降低 SOD 消耗。而氧自由基能够作为第二信号增加 p38 MAPK 蛋白表达,促进 p38 MAPK 磷酸化<sup>[11]</sup>。因此,乌司他丁可能是通过减少氧自由基释放、减轻氧化应激反应来抑制 p38 MAPK 信号通路。

综上所述,乌司他丁能够有效抑制 p38 MAPK 信号通路,减少膈肌细胞凋亡率,减轻脓毒症膈肌损伤程度。因此,乌司他丁对于防治脓毒症并发症,降低死亡率,改善患者生活质量有重要意义。

#### 参考文献:

- [1] Bhatia M, He M, Zhang H, et al. Sepsis as a model of SIRS[J]. *Front Biosci*, 2009, 14: 4703-4711.
- [2] Hubbard WJ, Choudhry M, Schwacha MG, et al. Cecal ligation and puncture[J]. *Shock*, 2005, 23(1): 52-57.
- [3] 齐宇洁,樊寻梅,周涛,等.不同剂量氢化可的松对早期脓毒性休克大鼠炎症介质分泌的影响[J]. *中国小儿急救医学*, 2007, 14(3): 235-238.
- [4] Powers SK. Calpain and caspase-3 are required for sepsis-induced diaphragmatic weakness [J]. *J Appl Physiol*, 2009, 107(5): 1369-1371.
- [5] Montgomery AB, Stager MA, Carrico CJ, et al. Causes of mortality in patients with the adult respiratory distress

- syndrome[J]. *Am Rev Respir Dis*, 1985, 132(2): 485-489.
- [6] Sasaki K, Chiba K. Induction of apoptosis in starfish eggs requires spontaneous inactivation of MAPK (extracellular signal-regulated kinase) followed by activation of p38 MAPK [J]. *Mol Biol Cell*, 2004, 15(3): 1387-1396.
- [7] Sharma, Avadhesh C. Spesis- induced myocardial dysfunction[J]. *Shock*, 2007, 28(3): 265-269.
- [8] Guo W, Liu W, Chen G, et al. Water-soluble andrographolide sulfonate exerts anti-sepsis action in mice through down-regulating p38 MAPK, STAT3 and NF-kappaB pathways[J]. *Int Immunopharmacol*, 2012, 14(4): 613-619.
- [9] Kim MS, Park JW, Lim YH, et al. Effect of ulinastatin on the rocuronium-induced neuromuscular blockade[J]. *Korean J Anesthesiol*, 2012, 62(3): 240-244.
- [10] Shin IW, Jang IS, Lee SM, et al. Myocardial protective effect by ulinastatin via an anti-inflammatory response after regional ischemia/reperfusion injury in an in vivo rat heart model[J]. *Korean J Anesthesiol*, 2011, 61(6): 499-505.
- [11] Hsieh CC, Papaconstantinou J. Thioredoxin-ASK1 complex levels regulate ROS-mediated p38 MAPK pathway activity in livers of aged and long-lived snell dwarf mice [J]. *FASEB J*, 2006, 20(2): 259-268.

(收稿日期:2012-11-08 修回日期:2013-02-22)

(上接第 2116 页)

- 吟对吸烟者大隐静脉桥内皮功能的影响[J]. *中华实验外科杂志*, 2011, 28(5): 520-522.
- [7] 李世康,栗振坤,龙村,等.四氢生物蝶呤保存液对 2 型糖尿病患者大隐静脉氧化应激的影响[J]. *中华实验外科杂志*, 2011, 28(11): 1289-1291.
- [8] 李世康,栗振坤,龙村. 2 型糖尿病对冠心病患者大隐静脉桥内皮细胞的影响[J]. *中华胸心血管外科杂志*, 2011, 27(8): 480-482.
- [9] Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors[J]. *FASEBJ*, 1989, 30(16): 2007-2015.
- [10] Chiu JJ, Chien S. Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives[J]. *Physiol Rev*, 2011, 91(3): 327-387.
- [11] Jin X, Satoh-Otonashi Y, Zamami Y, et al. New molecular mechanisms for cardiovascular disease: contribution of endothelium-derived hyperpolarizing factor in the regulation of vasoconstriction in peripheral resistance arteries[J]. *J*

- Pharmacol Sci*, 2011, 116(4): 332-336.
- [12] Garland CJ, Hiley CR, Dora KA. EDHF: spreading the influence of the endothelium[J]. *Br J Pharmacol*, 2011, 164(3): 839-852.
- [13] Ren Z, Yang Q, Floten HS, et al. ATP-sensitive potassium channel openers may mimic the effects of hypoxic preconditioning on the coronary artery [J]. *Ann Thorac Surg*, 2001, 71(6): 642-647.
- [14] Sanada S, Komuro I, Kitakaze M. Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011, 301(6): 733-741.
- [15] Andersen A, Povlsen JA, Bötter HE, et al. Ischemic preconditioning reduces right ventricular infarct size through opening of mitochondrial potassium channels[J]. *Cardiology*, 2012, 123(3): 177-180.

(收稿日期:2012-10-28 修回日期:2013-03-10)