

综 述

热预处理对心肌保护作用的研究进展

李红昕 郭兰敏 苏应衡

热预处理(heat pretreatment, HPT)又称热休克预处理(heat shock preconditioning),是指事先对受试动物进行热刺激,包括全身升温至 42℃ 或用 42℃ 液体直接灌注心脏,使心脏产生能够耐受致死高温(热耐受性)或长时间缺血、缺氧等损害(交叉耐受性)的能力,减轻因此而造成的心功能异常、心律失常等不良反应。

HPT 的起源

热休克反应(heat shock response)最早是在对果蝇的研究中发现的^[1],即各种培养的细胞、整体器官或动物在遭受高温刺激后,能迅速合成多种高性能的蛋白质,并产生对抗其它外界刺激的能力^[2]。后将这类蛋白质称为热休克蛋白(heat shock proteins, HSP)^[3]。20 多年来,高温对细胞作用的研究主要集中于高热对癌细胞的杀伤作用以及 HSP 对非心脏细胞的作用^[2]。1986 年 Dillmann 等^[4]从缺血的狗心肌组织中证明了 HSP₇₀ mRNA 的存在,并且发现 HSP₇₀(分子量 70~80kD)能延长心肌缺血到坏死的时间。1988 年 Currie 等^[5]进一步证实, HPT 有利于缺血-再灌注后鼠心功能的恢复,其中起保护作用的成分就是 HSP 或过氧化氢酶等物质。HSP 依分子量大小分为多种类型^[2],现在研究较多,含量最丰富的是 HSP₇₀。

热处理的方法

诱导 HSP₇₀产生的因素很多,除了热刺激外,还有缺血、缺氧、乙醇、氨基酸类似物、重金属盐以及心脏压力或容量负荷增大等。两种能诱导 HSP₇₀产生的不同的损伤刺激,一种损伤会使受试动物产生对抗另一种更严重损伤的能力,这种现象称为交叉耐受性(cross-tolerance)。因此经热预处理(HPT)的动物除了可耐受致死的高温外,还可耐受缺血、缺氧等损伤。

目前常用的热处理方法有两种,一种是用物理的方法对受试动物全身加热(42℃)15 分钟^[5,6],另一种是用 42℃ 液体经升主动脉或股动脉直接灌注心脏 15 分

钟^[7,8]。两种方法都可使心脏产生交叉耐受性。HSP₇₀ mRNA 于全身加热后 0~90 分钟开始升高,2~3 小时达到高峰;而直接灌注心脏后, HSP₇₀ mRNA 可立即升高^[9]。HSP₇₀的合成一般迟于 HSP₇₀ mRNA 约 30 分钟,至加热后 24 小时合成最多^[10]。所以, HPT 后的动物,常恢复 24 小时,然后再进行损伤耐力试验。另外,某些药物,如拟交感神经药安非他明,可以使体温升高,也可诱导 HSP₇₀的产生,并能提高体外循环心肌缺血术后的心脏功能,减轻心肌损伤^[11]。

在活体上,用全身加热的方法很难将内脏器官,包括心脏的温度升至 42℃,这不仅是因为皮肤、肌肉等组织的隔离作用,更重要的是动物有对抗高热的自我保护机能,而且狗、猪等大型动物很难用物理法升高体温,因此用直接灌注或药物诱导的方法更具有临床应用价值。因为它们两者产生 HSP₇₀迅速、简便。

HPT 对心脏的作用

主要探讨 HPT 对于缺血心肌的保护作用。

一、完全性心肌缺血

受试动物于 HPT 后 24 小时,被迅速摘除心脏,用 Langendorff 法对离体心脏逆行灌注,通过阻断主动脉灌流实现心脏的完全性缺血,缺血一段时间后,恢复灌流,考察 HPT 对缺血心肌的保护作用。利用此模型发现: HPT 能提高缺血后 HSP₇₀的含量和过氧化氢酶的活性,减少肌酸激酶(CK)的释放,改善心脏功能^[5]。通过对鼠和兔的研究证实了上述结论,而且还发现 HPT 能减轻再灌时的氧化损伤^[6]。但对能量代谢的作用存在着种群差异,对于缺血一再灌注后的兔心, HPT 具有保存 ATP,保护线粒体功能的作用,ATP 含量明显高于对照;而对于鼠心,ATP 含量无明显升高。

二、局部心肌缺血

用结扎冠状动脉前降支的方法实现。根据 HPT 作用后心肌收缩功能和代谢状态的改变,以及心肌梗死范围(infarct size, IS)的多少,来阐明 HPT 对缺血心肌的保护作用。一定时间内缺血心肌组织的 IS,用梗死心肌组织总重量与左心室总重量的比值乘以 100 表

作者单位: 250021 济南,山东省立医院心外科

示^[12]。在关于 HPT 或 HSP₇₀ 能否减少 IS 问题上还存在争议。多数研究发现, HPT 能明显减小冠状动脉阻断 30~45 分钟后的 IS; 而 Yellon^[13] 则发现: HPT 对于冠状动脉阻断 45 分钟的心肌无保护作用。Currie^[14] 则观察到, HPT 对于缺血 30 分钟的兔心有保护作用, 但 40 小时后这种保护作用消失, 而这时 HSP₇₀ 的含量仍在增加。这就使人们对于 HSP₇₀ 的保护作用产生疑问。

在缺血时间长短问题上, HPT 对于局部心肌组织的不同保护作用尚无满意解释。HPT 对于心肌的保护作用可能是有一定限度的, 当缺血损害过于严重时, 这种保护作用就变得不明白了。

三、对于肥厚心肌的作用

HPT 对于易发生缺血性损伤的肥厚心肌同样具有保护作用, 它可使肥厚心肌的灌流更加均匀, 改善缺血后的心脏功能, 减少心律失常的发生。用环扎主动脉的办法制作大鼠肥厚心肌模型, 发现环扎后心肌细胞内 HSP₇₀ mRNA 和原癌基因 *c-fos*, *c-myc* 迅速升高, 2~4 天后新合成的 HSP₇₀ 也增加, 这种现象被认为是 HSP₇₀ 作用于肥厚心肌的证据。而持不同观点者认为, 主动脉环扎所造成的急性压力负荷可引起心内膜下心肌坏死, 早期的 HSP₇₀ 增加可能与心肌坏死有关, 而不是心肌肥厚。因此, 有关 HPT 或 HSP₇₀ 对肥厚心肌的作用有待于进一步的研究。

四、对心律失常的作用

HPT 能减少缺血-再灌注损伤所引起的心律失常。缺血-再灌注损伤引起的心律失常可被自由基清除剂消除。因此, HPT 降低心律失常的机制可能与减少心肌梗死不同, HPT 相当于一种外源性的自由基清除剂, 从而减少自由基释放引起的心律失常。

HPT 对心脏作用的机制

对于整体动物或器官, 所有用热来诱导产生 HSP₇₀ 的试验都可引起许多生理紊乱。比如, HPT 可诱导包括过氧化氢酶在内的多种蛋白质, 可以激活中性粒细胞, 所以很难判定是否为 HSP₇₀ 本身起保护作用。目前对 HPT 的作用机制还未完全阐明, 存在多种学说, 比较有说服力的是 HSP₇₀ 学说。

一、HSP₇₀ 学说

HSP₇₀ 广泛存在于各种组织细胞中, 在不受刺激的情况下, HSP₇₀ 主要存在于细胞质中; 而发生热休克反应后, 诱导产生的 HSP₇₀ 存在于细胞核中。HSP₇₀ 常与变性或新生的多肽类结合在一起, 参与细胞的防御体系, 对于代谢或氧化反应造成的损伤起防护作用^[5]。

Skowya^[15] 等人发现: 埃希氏大肠杆菌 (*E. coli*)

HSP₇₀ 的类似物 *dnaK* 可以使灭活的 *E. coli* RNA 聚合酶重新活化。用超微注射 HSP₇₀ 抗体的方法消耗 HSP₇₀ 或用基因调控的方法减少 HSP₇₀ 的表达可使细胞死亡。有人将提纯的 HSP₇₀ 加入到兔网状细胞的转录系统内, 发现这种细胞在能抑制蛋白质合成的 42℃ 高温下, 仍保持部分转录活性。

大量证据说明: HSP₇₀ 可以稳定大分子物质的结构, 使变性的蛋白质重新活化, 维持各种胞浆蛋白在原有状态; 参与细胞生长的调节, 使作跨膜运动的蛋白质展开并重新折叠, 促进蛋白质在各种细胞器内外的转运。

HSP₇₀ 对于心肌细胞同样具有上述作用。为了避免在体器官受其他因素的影响, Marber^[16] 将离体乳头肌置于不含营养基质的低氧浸液中, 模拟心肌缺血, 发现经过 HPT 的乳头肌, 损伤程度明显低于对照组, 而且乳头肌抗缺血的能力与所含 HSP₇₀ 的量成正相关。

用离体培养的心肌细胞能更直接地反映 HSP₇₀ 的防护作用。最近, Mestri^[17] 等用 HSP₇₀ 基因转染鼠胚胎心源性细胞 (H9c2), 并获得 HSP₇₀ 的超量表达, 发现转染 HSP₇₀ 的细胞能明显对抗缺血及高温损伤。同样, HSP₇₀ 转基因动物的心脏也具有明显的抗缺血损伤的能力, 与对照相比, 其收缩功能恢复快, CK 释放少, 心肌梗死范围小。可见, 基因治疗有望成为心肌保护的一种新方法。

总之, 不论是正常还是受损伤的细胞, HSP₇₀ 都参与细胞功能的发挥, 它的存在对于蛋白质的合成以及热休克或缺血、缺氧期间细胞的存活具有重要作用。

二、过氧化氢酶学说

Currie 小组发现: HPT 能提高内源性过氧化氢酶的含量^[5], 用其抑制剂 3-氨基三氮唑 (3-AT) 灭活过氧化氢酶可使心肌保护作用消失, 因此认为过氧化氢酶具有心肌保护作用。这是因为过氧化氢酶可以催化再灌时产生的氧自由基转化成水, 从而减轻对心肌细胞的损伤。尤其对于长时间的心肌缺血, HPT 可明显降低超氧化物歧化酶 (SOD) 和还原型/氧化型谷胱甘肽的比值, 使再灌时氧化型谷胱甘肽的产生减少^[6]。

对于上述发现, 有两种可能性的解释: 一是 HPT 后抗氧化能力提高, 对自由基的清除加强; 二是 HPT 使缺血期的损害性因素减弱, 线粒体的解聚和儿茶酚胺的浓集减少, 所以自由基的产生减少。

但问题在于: 作为消极因素的过氧化氢酶抑制剂 3-AT, 对于 HPT 后的鼠心, 同样能减少再灌时的心律失常。HPT 后的离体鼠心再灌时, 3-AT 能减少而不是增加自由基的产生。更有一些研究者, 用 3-AT 并未消

除 HPT 的保护作用。因此,过氧化氢酶在 HPT 后所起的作用尚未完全阐明。

3. 抗“钙反常”学说

用无钙溶液短时间灌注离体动物心脏后,再用含钙溶液灌注,可使心肌细胞发生不可逆损伤,造成心肌挛缩,释放大量 CK,这种现象称为钙反常 (calcium paradox)。心肌缺血一再灌注时,钙离子和儿茶酚胺的浓度升高,同样可发生钙反常,而 HPT 可减轻钙反常对心肌的损伤^[18]。目前,钙反常损伤心肌的确切机制还有争论,但它与氧自由基的产生无关,说明 HPT 对心肌的保护作用不依赖于抗氧化作用。可以认为:在低钙期心肌细胞结构蛋白发生了变化,脆性增加,当高钙液体再灌时,心脏收缩活性的迅速恢复,使心肌细胞发生机械性断裂。而 HPT 可以改变肌动蛋白和肌间蛋白的物理性质,防止细胞骨架的断裂,从而减轻“钙反常”的损伤。

总之,心肌缺血、再灌注时,由于细胞内 pH 和多种离子浓度的变化以及自由基的作用,必然要发生蛋白质结构上的变化,造成细胞损伤,而 HPT 的作用就是能减轻或纠正这些变化。

HPT 与缺血预处理的关系

缺血预处理 (ischemic preconditioning, IPC) 是指一次或几次短暂的心肌缺血能够使心脏耐受更长时间的心肌缺血。自从 1986 年 Murry 等^[19]提出 IPC 以来,人们注意到 HPT 和 IPC 具有某些共同之处,即两者都能产生交叉耐受性,都能诱导 HSP₇₀ 的产生。有人推测,IPC 对缺血心肌的保护作用是由 HSP₇₀ 决定的,因为 HPT 和 IPC 作用后 24 小时能产生相同量的 HSP₇₀,都能明显减少 IS^[10]。如果 IPC 产生的 HSP₇₀ 量减少,对心肌的保护作用就不明显^[12]。但 Marber^[10]等注意到,IPC 后 HSP₇₀ 的升高可维持 2~24 小时,而其对心肌的保护作用仅存在 1 小时;而且抑制 HSP₇₀ 的合成并不能消除 IPC 对心肌的保护作用,因此还不能明确 IPC 和 HSP₇₀ 的关系。

目前认为,抗氧化酶系统以及一些内源性的保护性物质,如腺苷、缓激肽、HSP₇₀ 和 遍在蛋白质 (ubiquitin) 等,可能是 IPC 对抗缺血一再灌注损伤的分子机制^[20]。

HPT 与心脏停搏液

HPT 能够提高心脏停搏液对心肌的保护作用。用 42℃ 热血直接灌注猪心 15 分钟,然后实施低温、高钾心脏停搏 2 小时,再灌后发现心肌 HSP₇₀ 含量增加,CK

产生减少,血流动力学效果获得明显改善。Amrani^[21] 用离体鼠心试验同样证明 HPT 对于 St. Thomas 液灌注、低温停搏 4 小时的心脏有保护作用,能明显提高心脏复跳后的机械和内功功能。可见 HPT 在心脏外科领域有实际应用价值。

结束语

HPT 诱导 HSP₇₀ 和其他蛋白质产生的过程,可能是心肌细胞对抗缺血及其他损害的一条内源性的保护途径,这条途径的发现将给临床治疗措施带来一种新方法。人们希望能利用药物或基因治疗来诱导 HSP₇₀ 的产生,这对于心脏外科领域及冠心病患者预防心肌缺血性损伤将具有十分重要的意义。目前,HPT 对心脏作用的研究多集中于 HSP₇₀,其他 HSP 在正常、肥厚或缺血心脏上的功能尚未阐明。如果我们知道了这些 HSP 的功能并能操纵它们的表达,HPT 将具有十分广阔的临床应用前景。

参 考 文 献

- 1 Ritossa FM. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*, 1962, 18: 571.
- 2 Lindquist S, Craig EA. The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet*, 1988, 22: 631.
- 3 Hightower LE, White FP. Cellular responses to stress: comparison of a family of 71-73-kilodalton proteins rapidly synthesized in rat tissue slices and canavanine-treated cells in culture. *J Cell Physiol*, 1981, 108: 261.
- 4 Dillmann WH, Mehta HB, Barrieux A, et al. The dog heart induces the appearance of a cardiac mRNA coding for a protein with migration characteristics similar to heat-shock/stress protein 71. *Circulation Res*, 1986, 59: 110.
- 5 Currie WR, Karmazyn M, Kloc M, et al. Heat-shock response is associated with enhanced postischemic ventricular recovery. *Circ Res*, 1988, 63: 543.
- 6 Yellon DM, Pasini E, Cargnoni A, et al. The protective role of heat stress in the ischemic and reperfused rabbit myocardium. *J Mol Cell Cardiol*, 1992, 24: 895.
- 7 Donnelly TJ, Sievers RE, Vissers FLJ, et al. Heat shock protein induction in rat hearts - a role for improved myocardial salvage after ischemia and reperfusion? *Circulation*, 1992, 85: 769.
- 8 Liu X, Engelman RM, Moraru II, et al. Heat-shock - a new approach of myocardial preservation in cardiac surgery. *Circulation*, 1992, 86 (Suppl 1): 1358.
- 9 Robinson BL, Morita T, Toft DO, et al. Accelerated recovery of postischemic stunned myocardium after

- induced expression of myocardial heat shock protein (HSP₇₀). J Thorac Cardiovasc Surg, 1995, 109: 753.
- 10 Marber MS, Latchman DS, Walker JM, et al. Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. Circulation, 1993, 88: 1264.
 - 11 McCully JD, Myrmet T, Lotz MM, et al. The rapid expression of myocardial HSP₇₀ mRNA and the heat shock 70 kDa protein can be achieved after only a brief period of retrograde hyperthermic perfusion. J Mol Cell Cardiol. 1995, 27: 873.
 - 12 Amrani M, Allen NJ, O'Snea J, et al. Role of catalase and heat shock protein on recovery of endothelial and mechanical function after ischemia. Cardioscience, 1993, 4: 193.
 - 13 Yellon DM, Iliodromitis E, Latchman DS. Whole body heat stress fails to limit infarct size in the reperfused rabbit heart. Cardiovasc Res, 1992, 26: 342.
 - 14 Currie RW, Tanguay RM, Kingma JG. Heat shock response and limitation of tissue necrosis during occlusion/reperfusion in rabbit heart. Circulation, 1993, 87: 963.
 - 15 Skowrya D, Georgopoulos C, Zylicz M. The dnak gene product, the HSP₇₀ homolog, can reactivate heat-inactivated RNA polymerase in an ATP hydrolysis-dependent manner. Cell, 1990, 62: 939.
 - 16 Marber MS, Walker JM, Latchman DS, et al. Myocardial protection after whole body heat stress in the rabbit is dependent on metabolic substrate and is related to the amount of the inducible 70-kD heat stress protein. J Clin Invest, 1994, 93: 1087.
 - 17 Mestril R, Chi S-H, Sayen R, et al. Expression of inducible stress protein 70 in rat heart myogenic cells confers protection against simulated ischemia-induced injury. J Clin Invest, 1994, 93: 759.
 - 18 Marber MS, Walker JM, Latchman DS, et al. Attenuation by heat stress of a submaximal calcium paradox in the rabbit heart. J Mol Cell Cardiol, 1993, 25: 1119.
 - 19 Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. Circulation, 1986, 74: 1124.
 - 20 Andres J. Molecular mechanisms for protecting the heart. Folia Med Cracov, 1994, 35: 22.
 - 21 Amarni M, Corbett J, Allen NJ, et al. Induction of heat shock proteins enhances myocardial and endothelial functional recovery after prolonged cardioplegic arrest. Ann Thorac Surg, 1994, 57: 157.

中华医学会物理医学与康复学会 关于召开第五次全国学术会议的征文通知

各省市医学会、专科分会、各位委员、会员：

兹订于 1998 年 9 月召开全国物理医学与康复学术会议，同时进行我专科学会全国委员会换届改选。现将征文事项通知如下：

一、征文内容

1. 物理医学与康复评定新方法的研究与应用。
2. 物理医学与康复治疗新技术的作用机制研究和临床应用。
3. 各种伤病的康复评定与治疗的新方法、新经验。
4. 各种康复评定与治疗新仪器的研究与应用。
5. 物理医学与康复的新理论探讨。

二、征文要求

1. 应征论文应具有较高的科学性、先进性、实用性、文学性，未曾在全国性学术会议与全国性杂志发表。全文字数在 5 000 字以内，并应附有 500 字的摘要，经本单位及省市分会审批盖章后，于 1998 年 4 月底以前寄到北京市北京医院康复科 李晶 主任收，邮编 100730，并汇寄审稿费 20 元。

2. 应征论文凡来稿前未曾经本单位及省市分会审批，或未寄审稿费，或在截稿后来稿者均不予录用。应征论文来稿时未附摘要者如能录用，只能在学术会议论文汇编中列题，不能刊登论文或摘要。

三、会议具体时间、地点另行通知。

中华医学会物理医学与康复学会

1997 年 2 月