

· 论 著 ·

## 失血性休克大鼠心肌收缩功能障碍中整合素联接激酶的作用\*

方玉强<sup>1</sup>, 李涛<sup>2</sup>, 朱娱<sup>2</sup>, 刘良明<sup>2△</sup>

(第三军医大学大坪医院野战外科研究所:1. 心血管内科;2. 第二研究室/

创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室, 重庆 400042)

**摘要:**目的 探讨整合素联接激酶(ILK)在失血性休克大鼠心肌收缩功能中的调节作用。方法 采用离体乳头肌灌流和心脏灌流技术,用不同方法预处理 ILK,测定失血性休克大鼠离体左心室乳头肌等长收缩张力的变化,以及大鼠离体心脏血流动力学指标的变化。结果 休克大鼠心脏血流动力学指标随着休克时间延长而逐渐下降,休克 1、2 h 的血流动力学指标显著低于对照组( $P < 0.05$ );离体左心室乳头肌收缩力呈现相同的变化趋势( $P < 0.05$ );休克 0.5、1.0、2.0 h ILK 活性显著低于对照组( $P < 0.05$ )。以休克 1.0 h 的离体乳头肌和心脏为研究对象,ILK 激动剂预处理可显著改善乳头肌的收缩力和心脏血流动力学指标( $P < 0.05$ ),而 ILK 特异性抑制剂则明显拮抗这种改善作用( $P < 0.05$ )。结论 ILK 在休克心肌收缩功能调节中发挥了重要作用,增强 ILK 的活性可增强心肌收缩功能。

**关键词:**休克,失血性;乳头肌;整合素联接激酶;心肌收缩功能

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.33.002

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)33-3980-03

## Role of ILK in the dysfunction of myocardium contraction following hemorrhagic shock\*

Fang Yuqiang<sup>1</sup>, Li Tao<sup>2</sup>, Zhu Yu<sup>2</sup>, Liu Liangming<sup>2△</sup>

(1. Department of Cardiology; 2. State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury/Department Two, Research Institute of Surgery, Daping Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

**Abstract:** Objective To explore the effect of ILK on myocardium contraction following hemorrhagic shock. Methods With isolated cardiac papillary muscle and isolated heart, the contraction of papillary muscle and hemodynamic parameters (left intraventricular systolic pressure (LVSP), the maximal change rate of left intraventricular pressure) were measured. Results Compared with normal control hearts, ILK activity, contractile response of cardiac papillary muscle and hemodynamic parameter were decreased significantly gradually in shock heart at the 1, 2 h ( $P < 0.05$ ), and the change of ILK activity was positive correlative with contractile response and hemodynamic parameter. With ILK agonist [phosphatidylinositol(3,4,5)trisphosphate, PLTP] the dysfunction of contractile response and hemodynamic parameter could be improved significantly ( $P < 0.05$ ), while these improvement could be abolished by ILK specific inhibitor ( $P < 0.05$ ). Conclusion ILK play important role in the regulation of cardiac contractility following hemorrhagic shock.

**Key words:** shock, hemorrhagic; papillary muscle; integrin-linked kinase; myocardial systolic function

制约休克治疗的环节是休克后心脏收缩功能的障碍,虽然对休克后心脏功能障碍机制已有深入了解,但仍未阐明。整合素联接激酶(integrin-linked kinase, ILK)是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,可将胞外刺激传递到胞内<sup>[1]</sup>,它广泛参与细胞增殖、分化、迁移以及血管再生,在肿瘤发生中有重要作用<sup>[1]</sup>。Bendig 等<sup>[2]</sup>发现 ILK 基因突变可引起斑马鱼心力衰竭的发生,敲除 ILK 基因可引起大鼠原发性心肌病并导致心力衰竭,提示 ILK 参与了心脏收缩功能的调节。但失血性休克后心脏收缩功能的变化是否有 ILK 的参与目前尚未见报道,为此本实验以失血性休克大鼠为模型,从离体心脏和离体乳头肌探讨 ILK 对休克心肌收缩功能的调节作用,以期对休克防治寻找新的治疗靶点。

## 1 材料与方

**1.1 动物与分组** 64 只 SD 大鼠由第三军医大学大坪医院野战外科研究所动物所提供,雌雄各半,体质量(243.5±12.5)g。实验分组:对照组,休克 10 min 组、0.5 h 组、1 h 组、2 h 组,休克 1 h 再分为 ILK 激动剂(PLTP)组、ILK 特异性抑制剂(KP-392)组、KP-392+PLTP 组,每组 8 只。实验前禁食、自由饮

水,以戊巴比妥钠麻醉,右侧股动脉插管并经三通管连接水银血压计和玻璃注射器,供观察血压和放血;股静脉插管给药。并经股动脉插管以肝素钠等渗盐水(500 U/kg)抗凝。所有实验大鼠均经股动脉插管 10 min 内放血至血压 40 mm Hg,根据实验设计维持不同时间。对照组仅插管,不放血,不输液。

**1.2 大鼠离体乳头肌收缩力的测定** 参照文献<sup>[3]</sup>的方法,所有大鼠断头活杀并取出心脏,置于氧合的 Krebs-Henseleit(H-K)溶液中,游离左心室乳头肌,肌腱端(附有约 2 mm 心室肌)固定于等长张力传感器上,肌端固定于拉钩上,30 ℃ 恒温的 H-K 液进行非循环灌流,其中 H-K 液以 95% O<sub>2</sub> 和 5% CO<sub>2</sub> 的混合气体充分氧合。各组分别用 10<sup>-8</sup> mol/L PLTP 或 10<sup>-5</sup> mol/L KP-392 预孵育离体乳头肌,测定其收缩反应性。乳头肌力学参数的测定:在静息张力为 1.0 g 条件下,平衡 60 min,通过千分卡尺移动灌流装置底座,拉伸乳头肌至最适初长(L<sub>max</sub>),平衡 30 min。然后依次用含不同浓度异丙肾上腺素的 H-K 液灌流乳头肌,每一灌流浓度下须有 10 次收缩的张力保

\* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81070259);重庆市自然科学基金资助项目(CTST2009BB5332)。 作者简介:方玉强(1971~),副主任医师,副教授,博士,主要从事心功能异常及心律失常机制研究。 △ 通讯作者, E-mail:liuliangming2002@yahoo.com。

持不变,才开始灌流下一浓度的液体。等长张力(T)信号经载波放大器输入四道记录仪进行记录,并通过微分器对 T 信号进行微分处理。

**1.3 离体心脏血流动力学指标测定** 参照文献[4]方法,麻醉大鼠后经股动脉插管并肝素化,按实验设计制备休克模型,后打开胸腔并经主动脉插管,成功后迅速剪下整个心脏,修去多余组织后连接于心脏灌流系统,调节灌注压力,37 °C,持续充氧。同进经左心耳将导管插入左心室,监测血流动力学参数:左心室收缩压(LVSP)、左心室压力上升或下降的最大速率(±dp/dt<sub>max</sub>)。PLTP、KP-392、KP-392+PLTP 组离体心脏在平衡后,用含 10<sup>-8</sup> mol/L PLTP 或 10<sup>-5</sup> mol/L KP-392 的 K-H 液继续灌流 30 min 后,测定血流动力学参数。

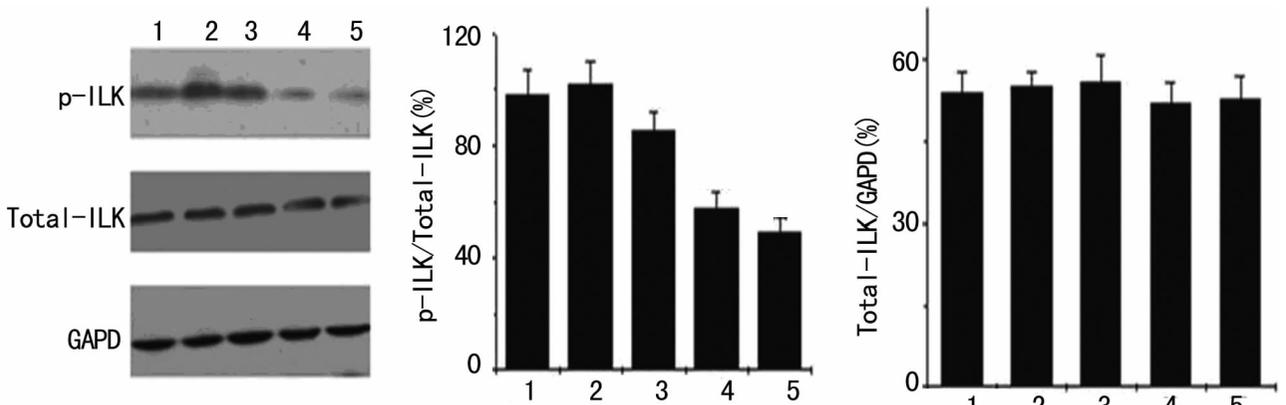
**1.4 ILK 活性测定** 常规方法裂解组织,提取总蛋白,制备 ILK 抗原-抗体免疫沉淀复合物,将免疫沉淀复合物加入 15 μL 肌球蛋白(0.1 mg/mL)、25 μL 酶反应液和终浓度为 100

nmol/L 的[γ-<sup>32</sup>P]-ATP,30 °C 反应 5 h,取反应液 25 μL 滴在硝酸纤维素纸上,稍干燥,再用 PBS 加入 6 mL 闪烁液测定<sup>32</sup>P 水平。无肌球蛋白底物组为对照,底物组减去对照组为实验结果,以对照组为 100%,计算各组的变化情况。

**1.5 统计学处理** 研究结果以 SPSS17.0 和 Orange5.0 处理。所有数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间采用 *t* 检验进行统计学处理。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

**2 结 果**

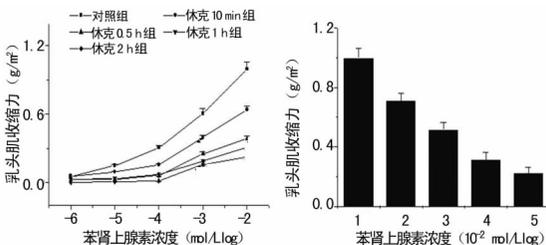
**2.1 失血性休克后不同时相点 ILK 活性变化** 如图 1 所示,心肌组织 ILK 总量(Total-ILK)在各组无明显变化,但磷酸化程度(p-ILK,代表 ILK 活性)发生显著变化。休克后 10 min 时 ILK 活性部分增强,但与对照组比较差异无统计学意义(*P* > 0.05),休克 0.5、1、2 h 的 p-ILK 显著低于对照组(*P* < 0.05),休克 1、2 h 的 p-ILK 仅为正常的 59% 和 46%。



1:对照组;2:休克 10 min 组;3:休克 0.5 h 组;4:休克 1 h 组;5:休克 2 h 组。

图 1 休克不同时相点心肌组织 ILK 活性变化

**2.2 失血性休克后离体左心室乳头肌收缩力的变化** 休克后 10 min、0.5 h、1 h 和 2 h,离体左心室乳头肌对 10<sup>-3</sup> mol/L 和 10<sup>-2</sup> mol/L 苯肾上腺素的反应均显著低于对照组(*P* < 0.05)。当苯肾上腺素为 10<sup>-2</sup> mol/L 时,休克 10 min、0.5 h、1 h 和 2 h 离体左心室乳头肌收缩力分别为对照组的 72%、51%、32% 和 24% (*P* < 0.05)。见图 2。



1:对照组;2:休克 10 min 组;3:休克 0.5 h 组;4:休克 1 h 组;5:休克 2 h 组。

图 2 休克不同时相点离体乳头肌收缩功能的变化

**2.3 失血性休克后离体心脏血流动力学参数的变化** 休克 10 min、0.5 h,离体心脏 dp/dt<sub>max</sub>、LVSP 有轻度变化,但与对照组比较差异无统计学意义;而在休克 1、2 h 时,dp/dt<sub>max</sub>、LVSP 值明显低于对照组,+dp/dt<sub>max</sub>、-dp/dt<sub>max</sub>、LVSP 分别从对照组的 136 mm Hg/s、-1 858 mm Hg/s、737 mm Hg 降至休克 1 h 的 85 mm Hg/s、-958 mm Hg/s、475 mm Hg 和休克 2 h 的 50 mm Hg/s、-503 mm Hg/s、226 mm Hg。

**2.4 失血性休克后 ILK 活性与心肌收缩力、血流动力学参数间的相关性** 根据失血性休克不同时相点 ILK 活性变化,分析其与心肌收缩力、血流动力学参数变化间的关系,结果发现它们呈显著的正相关,其中 ILK 活性与心肌收缩力的相关系数为 0.889 (*P* < 0.05),ILK 活性与 +dp/dt<sub>max</sub>、-dp/dt<sub>max</sub>、LVSP 变化的相关系数分别为 0.997、0.941、0.988 (*P* < 0.05)。

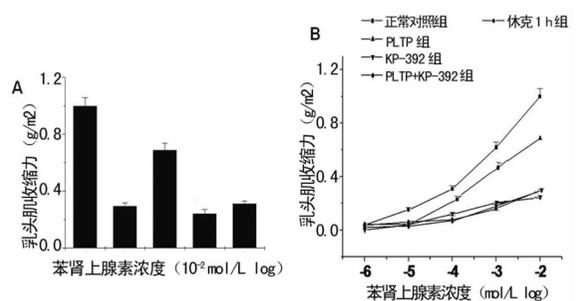


图 3 ILK 活性调节剂对失血性休克离体乳头肌收缩功能的影响

**2.5 活性调节剂对 ILK 调节失血性休克大鼠离体乳头肌收缩功能的影响** 以失血性休克 1 h 离体乳头肌对苯肾上腺素的反应为研究对象,结果如图 3 所示:失血性休克后离体心脏乳头肌对苯肾上腺素的收缩力较对照组显著下降,仅为 32% (*P* < 0.01)。给予 PLTP 预处理,乳头肌的收缩力从 32% 上升

至 76% ( $P < 0.01$ ), 这种作用在不同苯肾上腺素浓度 ( $10^{-4}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-2}$  mol/L) 结果相似; 而 KP-392 预处理, 离体乳头肌收缩力与对照组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 但 PLTP 与 KP-392 联合预处理, PLTP 引起收缩力的增加被显著抑制 ( $P < 0.01$ )。

**2.6 活性调节剂对 ILK 调节失血性休克大鼠心脏收缩功能的影响** 同样以失血性休克 1 h 离体心脏为研究对象, 发现失血性休克后离体心脏 + dp/dt<sub>max</sub>、- dp/dt<sub>max</sub>、LVSP 明显降低 ( $P < 0.01$ )。PLTP 预处理可显著升高离体心脏血流动力学参数, + dp/dt<sub>max</sub>、- dp/dt<sub>max</sub>、LVSP 分别从休克 1 h 的 958 mm Hg/s、- 475 mm Hg/s、85 mm Hg 升高至 1 621 mm Hg/s、- 829 mm Hg/s、122 mm Hg, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 而 KP-392 对失血性休克离体心脏血流动力学参数无明显影响 ( $P > 0.05$ ), 但 KP-392 与 PLTP 合用, 可明显降低由 PLTP 引起的心脏血流动力学参数的改善 ( $P < 0.01$ )。

### 3 讨 论

心脏功能障碍是休克后致死率和致残率过高的主要原因, 但其发生机制似未阐明<sup>[5]</sup>, 药物治疗效果有待商榷<sup>[6-7]</sup>。ILK 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 参与多种细胞生物学功能的调节, 在细胞增殖、分化、迁移以及血管再生的调节中起着重要的作用, 与肿瘤发病有显著关系<sup>[1]</sup>。研究也证实 ILK 在心脏疾病和功能调节中起着重要作用, 如参与心肌细胞收缩功能的调节、心肌肥大的发生、心力衰竭的病理生理<sup>[2,8-10]</sup>。ILK 是否参与休克后心肌功能调节未见相关报道。

本研究发现心肌细胞 ILK 活性随着休克时间延长而降低, 同时伴随有休克心肌收缩力下降和心脏血流动力学参数下降。统计分析发现休克后心肌 ILK 活性变化与心肌收缩力变化呈明显正相关, 相关系数为 0.889 ( $P < 0.05$ ), ILK 活性与 + dp/dt<sub>max</sub>、- dp/dt<sub>max</sub>、LVSP 变化的相关系数分别为 0.997、0.941、0.988。结果提示休克后 ILK 在休克心肌收缩功能变化调节中发挥重要作用。

为进一步证实 ILK 在休克心肌收缩功能调节中的作用, 本研究采用 ILK 活性调节剂干预, 发现 PLTP 可明显升高休克后心肌的收缩力和离体心脏血流动力学参数, KP-392 无明显影响, 但 KP-392 与 PLTP 合用, 可明显降低由 PLTP 的乳头肌收缩力的增加和血流动力学参数改善。结果进一步证实 ILK 在休克心肌收缩功能调节中具有重要的调节作用。

有关 ILK 调节休克心肌收缩功能的机制目前尚未见报道。研究发现 ILK 是调节心肌生长和修复的关键激酶<sup>[8]</sup>, 心肌细胞在胞外刺激作用下, 通过 integrin-ILK-β-parvin 信号传递, 形成 ILK/PINCH1/β-parvin 复合物, 参与心肌细胞肌丝结构和功能的调节, 敲除 ILK 基因的心肌细胞存在明显的肌丝结构紊乱, 细胞骨架完整性受到破坏; 机械牵拉或血管紧张素 II 长期刺激可引起心肌明显肥大, 而采用 ILK 质粒转染心肌细胞, 可明显抑制这种肥大的发生<sup>[9]</sup>; Bendig 等<sup>[2]</sup>在研究 ILK 在斑马鱼心肌细胞中的作用时发现, 乙基亚硝基脲可引起斑马鱼发生 msq 突变, 并引起心力衰竭的发生, 而 msq 突变主要是由于 ILK 基因突变引起的; White 等<sup>[10]</sup>发现敲除 ILK 基因可引起大鼠原发性心肌病和心力衰竭。进一步分析发现休克后心肌收缩功能降低的机制是由于休克后虽然心肌细胞内钙离子超载, 但心肌细胞肌肉收缩蛋白对钙的敏感性降低, 从而引起收缩功能下降。ILK 可能通过调节心肌细胞的钙敏感性而调节心肌收缩力, Bendig 等<sup>[2]</sup>研究 ILK 在心力衰竭心肌收缩功能中的作用时发现, ILK 活性降低可通过调节蛋白激酶 B

(protein kinase B, PKB) 磷酸化水平而使血管内皮生长因子 (VEGF) 表达降低, 致使 VEGF-PLCγ-IP3 受体通路受损<sup>[11]</sup>, 细胞钙释放降低, 从而引起心肌细胞收缩力降低。但进一步实验却发现, 增加 VEGF 的表达心脏功能仅能恢复 10%, 说明 ILK 通过 PKB-VEGF 的钙依赖调节通路并非 ILK 调节心肌细胞收缩功能的主要途径, 非钙依赖性机制在 ILK 调节心肌细胞收缩功能中发挥着更重要的作用。其次, ILK 在结构上与直接影响心肌细胞钙敏感性的心肌特异性激酶 (TNNI3K) 相似<sup>[12]</sup>, 可能参与对心肌细胞钙敏感性调节。这些结果提示 ILK 可能通过调节心肌的钙敏感性调节心肌收缩功能, 但具体机制有待进一步研究。

### 参考文献:

- [1] McDonald PC, Fielding AB, Dedhar S. Integrin-linked kinase essential roles in physiology and cancer biology[J]. J Cell Sci, 2008, 121(Pt 19): 3121-3132.
- [2] Bendig G, Grimm M, Huttner IG, et al. Integrin-linked kinase, a novel component of the cardiac mechanical stretch sensor, controls contractility in the zebrafish heart [J]. Genes Dev, 2006, 20(17): 2361-2372.
- [3] Mei JM, Hu DY, Chen HS, et al. Effect of MCI-154, a calcium sensitizer, on calcium sensitivity of myocardial fibers in endotoxic shock rats[J]. Shock, 2000, 14(6): 652-656.
- [4] Li T, Liu LM, Xu J, et al. Changes of Rho kinase activity after hemorrhagic shock and its role in shock-induced biphasic response of vascular reactivity and calcium sensitivity[J]. Shock, 2006, 26(5): 504-509.
- [5] 李涛, 朱娱, 刘良明. Rho 激酶在失血性休克大鼠心肌收缩功能障碍中的作用[J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26(6): 1059-1063.
- [6] 朱娱, 李涛, 刘良明. 不同药物对非控制性出血性休克治疗效果的影响[J]. 重庆医学, 2010, 39(18): 2417-2419.
- [7] 李涛, 方玉强, 刘良明, 等. 羟乙基淀粉 200 抗大鼠失血性休克作用与羟乙基淀粉氯化钠的等效性研究[J]. 重庆医学, 2009, 38(5): 544-546.
- [8] Hannigan GE, Coles JG, Dedhar S. Integrin-linked kinase at the heart of cardiac contractility, repair and disease[J]. Circ Res, 2007, 100(10): 1408-1414.
- [9] Brancaccio M, Hirsch E, Notte A, et al. Integrin signaling: the tug-of-war in heart hypertrophy[J]. Cardiovasc Res, 2006, 70(3): 422-433.
- [10] White DE, Coutu P, Shi YF, et al. Targeted ablation of ILK from the murine heart results in dilated cardiomyopathy and spontaneous heart failure[J]. Genes Dev, 2006, 20(17): 2355-2360.
- [11] Rottbauer W, Just S, Wessels G, et al. VEGF-PLC γ1 pathway controls cardiac contractility in the embryonic heart[J]. Gene Dev, 2005, 19(13): 1624-1634.
- [12] Zhao Y, Meng XM, Wei YJ, et al. Cloning and characterization of a novel cardiac-specific kinase that interacts specifically with cardiac troponin[J]. J Mol Med, 2003, 81(5): 279-290.