

## 论著

文章编号:1000-5404(2014)18-1872-04

### 整合素连接激酶对大鼠离体心脏缺血再灌注室性心律失常的影响

周平, 蒋鑫, 杨小利, 方玉强, 曾春雨 (400042 重庆, 第三军医大学大坪医院野战外科研究所心血管内科)

**[摘要]** **目的** 探讨整合素连接激酶(integrin-linked kinase, ILK)在大鼠离体心脏缺血再灌注室性心律失常中的作用。**方法** 将8~10周龄、体质量200~230 g的SPF级健康雄性SD大鼠采用Langendorff系统结扎冠脉左前降支建立缺血再灌注心律失常模型,予ILK活性调节剂预处理,监测大鼠缺血再灌注室性心律失常的变化。**结果** ①与缺血再灌注(I/R)组相比,I/R+ILK激动剂中、高浓度组( $10^{-7}$ 、 $2 \times 10^{-7}$  mol/L)室速(50.0% vs 87.5%、50.0% vs 87.5%,  $P < 0.05$ )、室颤发生率(12.5% vs 50.0%、12.5% vs 50.0%,  $P < 0.05$ )及心律失常评分[( $1.6 \pm 1.4$ ) vs ( $3.3 \pm 1.3$ )、( $1.5 \pm 1.5$ ) vs ( $3.3 \pm 1.3$ )、 $P < 0.05$ ]明显降低。②与I/R组相比,I/R+ILK抑制剂中、高浓度组( $6 \times 10^{-7}$ 、 $1.2 \times 10^{-6}$  mol/L)室颤发生率(87.5% vs 50.0%、87.5% vs 50.0%,  $P < 0.05$ )及心律失常评分[( $5.3 \pm 1.5$ ) vs ( $3.3 \pm 1.3$ )、( $5.5 \pm 1.4$ ) vs ( $3.3 \pm 1.3$ )、 $P < 0.05$ ]明显增加。**结论** ILK参与大鼠缺血再灌注室性心律失常的发生,调节其活性可能成为再灌注室性心律失常的治疗手段。

**[关键词]** 整合素连接激酶;缺血再灌注;室性心律失常

**[中图分类号]** R-332;R345;R541.7

**[文献标志码]** A

### Effect of integrin-linked kinase on ventricular arrhythmia of *in vitro* rat ischemia reperfusion hearts

Zhou Ping, Jiang Xin, Yang Xiaoli, Fang Yuqiang, Zeng Chunyu (Department of Cardiology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the role of integrin-linked kinase (ILK) in ventricular arrhythmia after ischemia-reperfusion (I/R) in isolated rat hearts. **Methods** Male SD rats (SPF grade, 8–10 weeks old, weighing 200–230 g) were subjected to 30 min of regional ischemia which induced by ligation of the left anterior descending coronary artery and then 30 min of reperfusion in the Langendorff apparatus. Surface electrocardiography (ECG) was used to observe arrhythmia continuously after pretreatment with ILK agonists and inhibitors. **Results** As compared to the I/R group, the I/R + ILK agonist groups (ILK agonist middle concentration group  $10^{-7}$  mol/L and ILK agonist high concentration group  $2 \times 10^{-7}$  mol/L) showed reduced incidence of ventricular tachycardia (VT) (50.0% vs 87.5%, 50.0% vs 87.5%, respectively; both  $P < 0.05$ ) and ventricular fibrillation (VF) (12.5% vs 50.0%, 12.5% vs 50.0%, respectively; both  $P < 0.05$ ) as well as ventricular arrhythmia score ( $1.6 \pm 1.4$  vs  $3.3 \pm 1.3$ ,  $1.5 \pm 1.5$  vs  $3.3 \pm 1.3$ , respectively; both  $P < 0.05$ ) after reperfusion. In contrast, the IR + ILK inhibitor groups (ILK inhibitor middle concentration group  $6 \times 10^{-7}$  mol/L and ILK inhibitor high concentration group  $1.2 \times 10^{-6}$  mol/L) showed increased incidence of VF (87.5% vs 50.0%, 87.5% vs 50.0%, respectively; both  $P < 0.05$ ) and ventricular arrhythmia score ( $5.3 \pm 1.5$  vs  $3.3 \pm 1.3$ ,  $5.5 \pm 1.4$  vs  $3.3 \pm 1.3$  respectively; both  $P < 0.05$ ) after reperfusion. **Conclusion** ILK plays an important role in I/R ventricular arrhythmia of isolated rat hearts. Regulating ILK activity may be a potential therapeutic measure for reperfusion ventricular arrhythmia.

**[基金项目]** 国家重点基础研究发展计划(973计划,2013CB531104);国家自然科学基金(81070259)

**[通信作者]** 方玉强, E-mail: yuqiang@163.com

曾春雨, E-mail: chunyu@163.com

**[优先出版]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140821.1457.024.html>(2014-08-21)

[Key words] integrin-linked kinase; ischemia-reperfusion; ventricular arrhythmia

Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China (973 Program, 2013CB531104) and the National Natural Science Foundation of China (81070259). Corresponding author: Fang Yuqiang, E-mail: yuqiang@163.com; Zeng Chunyu, E-mail: chungyuzeng01@163.com

整合素连接激酶(integrin-linked kinase, ILK)是一类在多种细胞、组织中广泛表达,结合在 $\beta$ 整合素胞质尾区的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,其传递细胞-基质间相互作用的信号,调节细胞骨架重构,且在细胞增殖、存活、侵袭、分化中具有重要作用<sup>[1]</sup>。ILK在心脏中表达丰富,对心脏的生长发育起重要作用,ILK基因缺失的小鼠脉管系统明显异常,细胞结构完整性受到损坏,导致扩张型心肌病,于6~12周后因自发性心衰猝死<sup>[2-3]</sup>。近年来的研究亦证实,ILK在心肌细胞凋亡、心梗后心室重塑、心衰、心肌肥厚、病毒性心肌炎的发生、发展中具有重要作用<sup>[1-2, 4-5]</sup>。然而ILK是否与心脏缺血再灌注心律失常有关?为解决这一问题,本研究拟采用Langendorff离体灌注系统,探讨ILK在大鼠心脏缺血再灌注室性心律失常中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

SPF级健康雄性SD大鼠64只,8~10周龄,体质量200~230g,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。

### 1.2 实验方法

1.2.1 动物模型制备 大鼠腹腔注射肝素钠(500 U/kg),使其全身肝素化,再予2.5%戊巴比妥钠常规麻醉大鼠,迅速开胸取下心脏浸入4℃无钙Krebs-Henseleit(K-H)液中使其短暂停跳,尽快连接于Langendorff装置上,再予以95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>混合气体饱和的K-H液经主动脉逆行灌注,温度控制在(37.0±0.5)℃,冠脉流量8 mL/min恒流灌注。K-H液成分(mmol/L):118.5 NaCl, 4.7 KCl, 1.2 MgSO<sub>4</sub>, 1.8 CaCl<sub>2</sub>, 24.8 NaHCO<sub>3</sub>, 1.2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 Glucose, pH=7.2~7.4<sup>[6]</sup>。离体心脏固定好后,按照文献<sup>[7]</sup>的方法,在距冠状动脉左前降支起始部2~3 mm处垫一带凹槽硅胶管,并在此处用6/0缝线贯穿该血管的两侧和基底部,将缝线两端旷置在心脏表面,连接心外膜心电图。心脏平衡20 min后结扎左前降支,使心脏局部缺血30 min后,在凹槽处剪断缝线,再灌注30 min,全程监测心电图。

1.2.2 实验分组 离体灌注SD大鼠心脏64只,随机分成以下8组:①假手术组(Sham组):平衡20 min后,心脏继续予常规K-H液灌注60 min。②缺血再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)组:心脏平衡20 min后,结扎冠脉左前降支30 min后,在凹槽处剪断缝线,再灌注30 min,全程予以常规K-H液灌注。③I/R + ILK激动剂低浓度组:心脏平衡10 min后,予以含有ILK激动剂浓度为10<sup>-8</sup> mol/L的K-H液继续平衡10 min,结扎冠脉左前降支,并改用常规K-H液灌注,30 min后剪断缝线,再灌注30 min。④I/R + ILK激动剂中浓度组:心脏平衡10 min后,予以含有ILK激动剂浓度为10<sup>-7</sup> mol/L的K-H液继续平衡

10 min,余同③组。⑤I/R + ILK激动剂高浓度组:心脏平衡10 min后,予以含有ILK激动剂浓度为2×10<sup>-7</sup> mol/L的K-H液继续平衡10 min,余同③组。⑥I/R + ILK抑制剂低浓度组:心脏平衡10 min后,予以含有ILK抑制剂浓度为6×10<sup>-8</sup> mol/L的K-H液继续平衡10 min,余同③组。⑦I/R + ILK抑制剂中浓度组:心脏平衡10 min后,予以含有ILK抑制剂浓度为6×10<sup>-7</sup> mol/L的K-H液继续平衡10 min,余同③组。⑧I/R + ILK抑制剂高浓度组:心脏平衡10 min后,予以含有ILK激动剂浓度为1.2×10<sup>-6</sup> mol/L的K-H液继续平衡10 min,余同③组。

1.2.3 心律失常的监测 心外膜心电图连接为负极接右房,正极接左室,使用Labchart 7软件记录心电图参数。心律失常的判定规则遵循Lambeth会议制定的标准<sup>[8]</sup>:室性早搏(VBP)定义为单个的可辨认的期前QRS波;室性心动过速(VT)指连续出现4个及以上的室性早搏;室颤(VF)是指QRS波形无法辨认的紊乱波形;室颤持续2 min内能自发转为窦性的室颤称可逆性室颤(SVF),不能自发转为窦性心律者称非可逆性室颤(NVF),即持续性室颤。心律失常的评分参照Curtis等<sup>[9]</sup>的方法:①0分:0 < VBP ≤ 20次;②1分:20 < VBP ≤ 100次;③2分:VBP > 100次或1 ≤ VT ≤ 3次或二者均具备;④3分:VT > 3次;⑤4分:SVF;⑥5分:1 ≤ NVF ≤ 2次;⑦6分:3 ≤ NVF ≤ 5次;⑧7分:NVF > 5次。

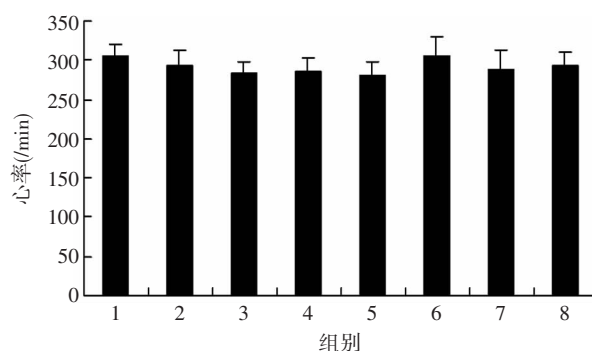
### 1.3 统计学处理

心律失常评分以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 18.0统计软件,行单因素方差分析和Fisher确切概率法。

## 2 结果

### 2.1 一般监测

所有心脏平衡期无室速、室颤发生,各组平衡期基础心率无统计学差异( $P > 0.05$ ,图1)。心脏多在再灌注开始3~5 min内出现室早、室速、室颤等室性心律失常,再灌注期典型心律失常心电图见图2。



1: Sham组;2:I/R组;3:I/R + ILK抑制剂低浓度组;4:I/R + ILK抑制剂中浓度组;5:I/R + ILK抑制剂高浓度组;6:I/R + ILK激动剂低浓度组;7:I/R + ILK激动剂中浓度组;8:I/R + ILK激动剂高浓度组  
图1 ILK活性调节剂处理后各组平衡期心率情况 ( $n=8, \bar{x} \pm s$ )



A: 窦性心律; B: 室性早搏; C: 室性心动过速; D: 可逆性室颤; E: 不可逆性室颤

图2 再灌注期出现的各种心律失常典型心电图

## 2.2 ILK 激动剂对缺血再灌注室性心律失常的影响

与 I/R 组比较, I/R + ILK 激动剂低浓度组心脏再灌注室性心律失常评分稍低, 但差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); I/R + ILK 激动剂中、高浓度组心脏再灌注室性心律失常评分较 I/R 组及 I/R + ILK 激动剂低浓度组明显降低 ( $P < 0.05$ ), 但 I/R + ILK 激动剂高浓度组较 I/R + ILK 激动剂中浓度组评分差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。与 I/R 组比较, I/R + ILK 激动剂低浓度组再灌注室速发生率无明显降低 ( $P > 0.05$ ); I/R + ILK 激动剂中、高浓度组心脏再灌注室速发生率较 I/R 组及 I/R + ILK 激动剂低浓度组明显降低 ( $P < 0.05$ )。I/R + ILK 激动剂低浓度组与 I/R 组比较, 再灌注室颤发生率降低, 但无统计学差异 ( $P > 0.05$ ), I/R + ILK 激动剂中、高浓度组与 I/R + ILK 激动剂低浓度组及 I/R 组相比, 室颤发生率明显降低 ( $P < 0.05$ , 表 1)。

表 1 予以 ILK 激动剂预处理后各组大鼠室性心律失常评分及室速、室颤发生率情况 ( $n = 8$ )

组别	心律失常评分 (分, $\bar{x} \pm s$ )	室速发生率 (%)	室颤发生率 (%)
Sham 组	0	0	0
I/R 组	3.3 ± 1.3	87.5(7/8)	50.0(4/8)
I/R + ILK 激动剂低浓度组	2.9 ± 1.1	87.5(7/8)	37.5(3/8)
I/R + ILK 激动剂中浓度组	1.6 ± 1.4 <sup>ab</sup>	50.0(4/8) <sup>ab</sup>	12.5(1/8) <sup>ab</sup>
I/R + ILK 激动剂高浓度组	1.5 ± 1.5 <sup>ab</sup>	50.0(4/8) <sup>ab</sup>	12.5(1/8) <sup>ab</sup>

a:  $P < 0.05$ , 与 I/R 组比较; b:  $P < 0.05$ , 与 I/R + ILK 激动剂低浓度组比较

## 2.3 ILK 抑制剂对缺血再灌注室性心律失常的影响

与 I/R 组比较, I/R + ILK 抑制剂低浓度组心脏再灌注室

性心律失常评分升高, 但无统计学差异 ( $P > 0.05$ ); I/R + ILK 抑制剂中、高浓度组心脏再灌注室性心律失常评分较 I/R 组及 I/R + ILK 抑制剂低浓度组明显增加 ( $P < 0.05$ ), 但 I/R + ILK 抑制剂高浓度组较 I/R + ILK 抑制剂中浓度组评分无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。与 I/R 组比较, I/R + ILK 抑制剂低、中、高浓度心脏再灌注室速发生率增高, 但无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。I/R + ILK 抑制剂低浓度组心脏再灌注室颤发生率较 I/R 组增加, 但无统计学差异 ( $P > 0.05$ ); ILK 抑制剂中、高浓度组与 I/R 组比较, 再灌注室颤发生率明显增加 ( $P < 0.05$ ), 但 I/R + ILK 抑制剂高浓度组室颤发生率较 I/R + ILK 抑制剂中浓度组无统计学差异 ( $P > 0.05$ , 表 2)。

表 2 予 ILK 抑制剂预处理后各组室性心律失常评分及室速、室颤发生率情况 ( $n = 8$ )

组别	心律失常评分 (分, $\bar{x} \pm s$ )	室速发生率 (%)	室颤发生率 (%)
Sham 组	0	0	0
I/R 组	3.3 ± 1.3	87.5(7/8)	50.0(4/8)
I/R + ILK 抑制剂低浓度组	3.6 ± 1.2	100.0(8/8)	62.5(5/8)
I/R + ILK 抑制剂中浓度组	5.3 ± 1.5 <sup>ab</sup>	100.0(8/8)	87.5(7/8) <sup>a</sup>
I/R + ILK 抑制剂高浓度组	5.5 ± 1.4 <sup>ab</sup>	100.0(8/8)	87.5(7/8) <sup>a</sup>

a:  $P < 0.05$ , 与 I/R 组比较; b:  $P < 0.05$ , 与 I/R + 抑制低浓度组比较

## 3 讨论

缺血再灌注心律失常指冠脉在某些因素作用下血流短暂中断后因自然开放、药物作用或机械再通, 血流再灌注心肌, 使心肌的生理、生物化学及电活动发生改变而出现的心律失常, 可作为临床判断冠脉再通的 1 项指标<sup>[10]</sup>。而再灌注心律失常中以室性早搏、室速、室颤等室性心律失常为主。心肌缺血再灌注心律失常发生率极高, 在心梗溶栓治疗后高达 80%。在心血管外科体外循环之后, 停搏的心脏恢复了血运, 也极易发生再灌注心律失常。而再灌注心律失常可能造成心脏停搏、心源性休克等严重后果。因此如何改善缺血再灌注心律失常已成为目前防治缺血性心脏病及临床心脏病介入治疗的研究重点。

ILK 是一种相对分子质量为  $59 \times 10^3$  的丝氨酸/苏氨酸 (Ser/Tre) 蛋白激酶, 它可同整合素  $\beta 1$  和  $\beta 3$  亚单位细胞质区结合, 是胞外信号分子调节胞内结构与功能的关键激酶, 可磷酸化下游多种细胞内信号系统, 包括 AKT、GSK3- $\beta$ 、ERK、Rac1 等, 从而调节细胞生长、侵袭、增殖、存活等多种细胞生物学功能<sup>[11]</sup>。心脏中广泛表达的 ILK 在出生后扮演着双重角色——机械感受器和各种信号途径的调节因子<sup>[12-14]</sup>。ILK 主要分布于心肌肋状带 (costamere), 是连接肌动蛋白和细胞

膜的重要桥梁<sup>[15]</sup>,也是心肌机械牵张感应器的重要组成部分,与 ParvB 蛋白形成的复合物在调节心脏收缩性中具有重要作用,并参与了肥厚型心肌病、病毒性心肌炎、心梗后心室重塑的发生、发展<sup>[1-2,4-5]</sup>。但 ILK 在心脏缺血再灌注心律失常中是否具有调节作用还不明确。

研究表明,ILK 激动剂能减轻缺血再灌注室性心律失常,主要表现为再灌注室性心律失常评分降低,室速、室颤等恶性心律失常的发生率降低;然而 ILK 抑制剂却明显加重再灌注室性心律失常程度,其评分明显增加,室速、室颤恶性心律失常的发生率明显增加,二者均呈浓度依赖地调节缺血再灌注室性心律失常的发生。本研究发现 ILK 参与了心肌缺血再灌注室性心律失常的发生、发展,调节其活性可能成为缺血再灌注心律失常的一个新的治疗靶点,但其机制如何,有待进一步研究。

目前缺血再灌注心律失常机制尚不完全清楚,可能与氧自由基、炎症反应、钙超载、细胞凋亡、缝隙连接蛋白、蛋白激酶途径等相关<sup>[16-17]</sup>。近年来报道缺血再灌注时可激活再灌注损伤挽救激酶信号通路(RISK 通路),发挥保护缺血再灌注损伤的作用<sup>[18]</sup>。然而 AKT 作为 RISK 通路中的 1 个重要中间激酶,对 RISK 通路中各种蛋白激酶作用的发挥具有重要的调节作用。文献[19]报道,ILK 可直接磷酸化 AKT473 位点,且 ILK 主要通过激活下游蛋白激酶 AKT 发挥各种生物生化作用,故其抗缺血再灌注心律失常的作用可能与之有关,还需进一步实验验证。

#### 参考文献:

[1] Ding L, Dong L, Chen X, *et al.* Increased expression of integrin-linked kinase attenuates left ventricular remodeling and improves cardiac function after myocardial infarction [J]. *Circulation*, 2009, 120(9): 764-773.

[2] Gu R, Bai J, Ling L, *et al.* Increased expression of integrin-linked kinase improves cardiac function and decreases mortality in dilated cardiomyopathy model of rats [J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e31279.

[3] Dai J, Matsui T, Abel E D, *et al.* Deep sequence analysis of gene expression identifies osteopontin as a downstream effector of integrin-linked kinase (ILK) in cardiac-specific ILK knockout mice [J]. *Circ Heart Fail*, 2014, 7(1): 184-193.

[4] Cammas L, Wolfe J, Choi S Y, *et al.* Integrin-linked kinase deletion in the developing lens leads to capsule rupture, impaired fiber migration and non-apoptotic epithelial cell death [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53(6): 3067-3081.

[5] Ling L, Bai J, Gu R, *et al.* Sca-1<sup>+</sup> cardiac progenitor cell therapy

with cells overexpressing integrin-linked kinase improves cardiac function after myocardial infarction [J]. *Transplantation*, 2013, 95(10): 1187-1196.

[6] Xi J, McIntosh R, Shen X, *et al.* Adenosine A2A and A2B receptors work in concert to induce a strong protection against reperfusion injury in rat hearts [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2009, 47(5): 684-690.

[7] Johansen D, Cruciani V, Sundset R, *et al.* Ischemia induces closure of gap junctional channels and opening of hemichannels in heart-derived cells and tissue [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2011, 28(1): 103-114.

[8] Hu X, Wu B, Wang X, *et al.* Minocycline attenuates ischemia-induced ventricular arrhythmias in rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 654(3): 274-279.

[9] Curtis M J, Walker M J. Quantification of arrhythmias using scoring systems: an examination of seven scores in an *in vivo* model of regional myocardial ischaemia [J]. *Cardiovasc Res*, 1988, 22(9): 656-665.

[10] Clements-Jewery H. Mitochondria, the calcium uniporter, and reperfusion-induced ventricular fibrillation [J]. *Br J Pharmacol*, 2006, 149(7): 811-813.

[11] Teo Z L, McQueen-Miscamble L, Turner K, *et al.* Integrin linked kinase (ILK) is required for lens epithelial cell survival, proliferation and differentiation [J]. *Exp Eye Res*, 2014, 121: 130-142.

[12] Xie J, Lu W, Gu R, *et al.* The impairment of ILK related angiogenesis involved in cardiac maladaptation after infarction [J]. *PLoS One*, 2011, 6(9): e24115.

[13] Nishimura M, Kumsta C, Kaushik G, *et al.* A dual role for integrin-linked kinase and beta1-integrin in modulating cardiac aging [J]. *Aging Cell*, 2014, 13(3): 431-440.

[14] Traister A, Walsh M, Aafaqi S, *et al.* Mutation in integrin-linked kinase (ILK(R211A)) and heat-shock protein 70 comprise a broadly cardioprotective complex [J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e77331.

[15] Zervas C G, Psarra E, Williams V, *et al.* A central multifunctional role of integrin-linked kinase at muscle attachment sites [J]. *J Cell Sci*, 2011, 124(Pt 8): 1316-1327.

[16] Zhu J, Rebecchi M J, Tan M, *et al.* Age-associated differences in activation of Akt/GSK-3beta signaling pathways and inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening in the rat heart [J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2010, 65(6): 611-619.

[17] Gharekhani A, Najafi M, Ghavimi H. Acute administration of natural honey protects isolated heart in normothermic ischemia [J]. *Iran J Pharm Res*, 2012, 11(4): 1275-1284.

[18] Hausenloy D J, Yellon D M. New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway [J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 61(3): 448-460.

[19] Lee S L, Chou C C, Chuang H C, *et al.* Functional role of mTORC2 versus integrin-linked kinase in mediating Ser473-Akt phosphorylation in PTEN-negative prostate and breast cancer cell lines [J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e67149.

(收稿:2014-01-27;修回:2014-05-27)

(编辑 栾嘉)