

## 心肌远程调节及其临床相关性：现在一起来！

Kristin Luther<sup>1#</sup>, Yang Song<sup>2#</sup>, Yang Wang<sup>1</sup>, Xiaoping Ren<sup>1,2\*</sup>, W. Keith Jones<sup>1\*</sup>

**摘要：**急性心肌梗死 (AMI) 是世界上致死和致残的主要病因。及时再灌注法是 AMI 的标准疗法，能够缩小梗死面积，提高患者存活率和改善预后。然而，25 % 的患者在患心肌梗死 (MI) 后会进一步发展成为心力衰竭 (HF)，且其中 50 % 的患者会在 5 年内死亡。由于梗死面积是预后病人病情 (包括 HF 的形成) 的主要指标，因此，改善心肌的治疗方法具有极大的应用前景。在过去 30 年中，研究者已发现多种能够刺激内源性心肌保护通道的刺激物，这些刺激物能在缺血预适应 (IPC) 和缺血后适应以及心肌缺血情况下启动保护机制。当在心肌缺血发生前、发生期间或发生后即刻使用刺激物，在远离心脏的血管床中发生的短暂、可逆性局部缺血就会即刻引发心肌保护机制——这种现象被分别称为远程缺血预适应，远程缺血期适应和远程缺血后适应。尽管目前的研究尚未完全阐明远程缺血预适应 (RIPC) 的作用机制，但 RIPC 与 IPC 在机制上有很多共同之处。RIPC 的发现使研究转向了远程非缺血刺激的应用，包括神经刺激 (脊髓刺激和迷走神经刺激) 以及电针 (EA)。笔者与其他研究人员发现并阐述了非缺血现象的机制，并将其定义为远程创伤预适应 (RPCT)。通过刺激皮肤感觉神经来启动 RPCT，这与穴位处神经刺激和 EA 既有相似性又有一定差异性。笔者在此次研究中还发现，可通过采用腹中线电刺激 (与 EA 疗法相似) 来模拟 RPCT，而且作为预适应刺激和后适应刺激 (在应用再灌注法时)，这种激活心肌保护机制的模式是非常有效的。通过对这些心肌保护现象的研究，学术界对心肌保护机制形成了一种全面且综合的理解，而且在过去的 5~10 年期间，这种理解变得逐渐清晰，即无论是缺血性刺激诱导还是非缺血性刺激诱导，其机制均相似。通过对文献中多种数据的综合考虑，我们认为所有的这些心肌保护“适应”现象均表示心肌保护机制的启动是从心肌适

应网 (含有特定介质和心肌细胞生存感受器) 的不同切入点进行的，该切入点包括 NF- $\kappa$ B、Stat3/5、蛋白激酶 C、舒缓激肽和  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  通道。神经系统传导通路可能代表了一种激活心脏和其他器官适应的新机制。研究表明，由于 IPC 和 RIPC 存在一定风险并且无法应用于某些患者，所以它们很难被转化为临床应用。因此，近期又新兴了一种神经刺激和痛感刺激的应用，这是一种激活心肌适应的潜在的非缺血性无创方法。作为引起心脏保护作用众多方法之一的后适应重点强调了临床相关性，这种临床相关性有助于在现有成熟的药物与电子疗法中加速新的治疗方向的突破。

**关键词：**远程心肌保护，心肌适应，非缺血性适应，末端疼痛性刺激，神经和分子机制，临床可行性，电子疗法

### 1 引言

1986年，Murry等[1]首先提出了缺血预适应(IPC)。他们在犬类模型中发现，在有害的局部缺血/再灌注(I/R)发作之前出现的短暂性局部缺血/再灌注(I/R)症状，可减小心肌梗死面积。IPC现象已在多个动物种属中得到了证实，包括犬、大鼠、猪、家兔和小鼠，而且在临床患者中也得到了确认[2-7]，见参考文献[8]。Marber等[9]报道了第二窗口保护(延迟预适应)，该保护发生于初始预适应刺激后的12~24 h内。早期IPC虽然有效，但作用时间短。而延迟IPC的保护作用虽然会随时间推移而减弱，但其可持续24~72 h[3]。另有研究发现，使相同类型的预适应重复发作既不会出现效应的递增也不会出现效应的

<sup>1</sup> Department of Molecular Pharmacology and Therapeutics, Stritch School of Medicine, Loyola University, Chicago, IL 60153, USA; <sup>2</sup> Hand and Microsurgical Center, The Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China

<sup>#</sup> These authors contributed equally to this work

\* Correspondence authors. E-mails: chinarenxp@126.com, wjones7@luc.edu

Received 8 September 2015; received in revised form 7 December 2015; accepted 14 December 2015

© The Author(s) 2015. Published by Engineering Sciences Press. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

英文原文：Engineering 2015,1(4): 490-499

引用本文：Kristin Luther, Yang Song, Yang Wang, Xiaoping Ren, W. Keith Jones. Cardiac Remote Conditioning and Clinical Relevance: All Together Now! *Engineering*, DOI 10.15302/J-ENG-2015117

累积[10]。

1993年, Przyklenk等[11]研究证明, 在犬类心脏中, 应用于回旋支血管床的预适应刺激可缩小由左冠状动脉前降支供血的中层心肌的梗死面积。后来, McClanahan等[12]证实, 即使在远端器官(如肾脏)处的缺血性预适应刺激亦可激活心肌保护。后有研究表明, 在发生肾脏、肠、肢体、肝脏、骨骼肌和脑缺血后, 远程缺血预适应(RIPC)会激活心肌保护机制(见参考文献[13])。然而, 缺血性预适应组织(器官)中扩散性因子的释放是RIPC的关键[14-18], 而且连接预适应肢体或组织的神经是必不可少的。例如, 有研究表明, 在大部分[19]但非所有动物模型[20]中, 用六甲铵阻断交感神经的传输可消除RIPC的保护作用。在一个小鼠的后肢模型中, 研究人员发现, 无论是阻断股静脉还是切断股骨神经和坐骨神经, 均能消除RIPC后所观察到的心肌保护作用, 这就进一步证明了体液通道和神经通道在这一过程中的重要性[21]。另有研究表明, 在实施急性或慢性经皮冠状动脉介入治疗[22]、冠状动脉旁路移植术[23]和瓣膜置换术[24]之前应用RIPC时, 可改善短期和长期临床预后。RIPC的许多详细机制与IPC是一样的(见下文)。尽管IPC和RIPC均能有效改善心肌层的I/R损伤, 但由于其无法预测临床缺血的发作, 故其作为临床心肌保护策略用来改善I/R损伤(如梗死和心室功能不全)的病理生理学后果的效果是非常有限的。

考虑到此局限性导致的直接后果, Zhao等[25]的研究证明, 在缺血再灌注早期, 快速、连续间歇性的阻断冠状动脉血流可降低I/R损伤。这个发现(被称为后适应)非常有价值, 因为它支持了在临床相关时间点(如在再灌注时)反复缺血的有效应用[26]。通过研究证明, 远端(如肢体)缺血在再灌注时是能够引发心肌保护的, 因此, 近期在此领域开展的研究[27-30]均已将后适应和RIPC二者的概念包含其中。有研究表明, 在I/R损伤期间给予的心脏保护刺激可以引起相关现象与预适应[31, 32]。远程预适应是指在心肌梗死(MI)发作期间在远端施加适应性刺激, 研究结果已表明, 远程预适应具有保护作用 and 临床价值[24]。然而, 所有的心肌保护策略均有其局限性。原因是这些策略需要对某一器官实施缺血性刺激, 而在临床上通常无法满足此要求。此外, 这些方法的临床试验结果也非常令人失望[33], 它们具有极大的局限性和风险性, 且阻碍了这些方法在临床上的应用[34, 35]。远程缺血性适应的临床试验具有一定的局限性, 其原因主要在于研究对象过少和患者人群内固有的复杂变量等。参与试验的患者年龄和身体综合健康状况都不同; 许多患者患有已知的会降低心肌保护疗效的相关疾病, 并且

服用了能够阻碍或阻断心肌保护的药物[8]。此外, 侧支循环和自发或极早期临床再灌注等因素可能会导致小面积心肌梗死, 而辅助疗法对这种小面积心肌梗死却无效[13]。

虽然有关肢体缺血的近期研究结果能够证明人体心肌保护[36], 但此方法需要具有较强的忍受能力, 因此无法在某些患者中使用, 如病态肥胖者或接受轴向淋巴切除术的患者。然而可以采用无创或微创技术(如远程非缺血刺激)作为一种替代疗法来实现心肌保护。经研究证实, 非缺血性刺激可激发心肌保护, 包括神经刺激(脊髓神经、迷走神经和股神经)、针刺和电针刺、皮肤切口、皮肤的化学或电处理[37-43]。在一定程度上, 这些方法中的某些是属于微创但有效的方法, 因此它们将会被当成潜在疗法进行研究。

## 2 IPC、RIPC 和心肌适应

在过去的25年间, 笔者学习了大量关于心肌保护机制的相关理论知识, 为心肌保护的相关研究积累了一定的理论基础, 尤其是在IPC、RIPC及相关现象的研究方面。尽管随着时间的推移, 我们可能对其中一些保护现象互相区别的相关见解变得模糊, 但我们对机制的研究通常专注于心肌保护的启动器、适应器和感受器三个方面。

显然, 对IPC、RIPC和后适应之后的心肌保护机制的理解有助于阐明可用于启动或强化心肌保护的药物作用靶点。这些靶点可用于特定情况下的预适应, 包括防止或降低手术时发生MI和治疗存在MI风险的患者[5, 44, 45]。另外, 对作用机制的理解也可能是发现更适用于临床方法的关键, 以便在临床环境下启动预适应和(或)后适应。一般而言, 相似但不相同的作用机制是各种保护性刺激(包括IPC、RIPC、预适应、后适应和缺血期适应)感受器和传感器方面的基础[46]。各种心肌保护现象的最大区别在于启动阶段, 但这可能简单地说明刺激点存在于更普遍的相似机制中。有研究表明, 各种机制间存在一些明显差异, 并且一些特定通路对某些特定类型的心肌保护刺激而言是没有必要的。一些组合研究(应用多种刺激)有时会显示出支持机制差异的附加效应[47, 48]。然而, 其他组合研究却未显示出类似效应, 而是显示出机制的相似性或至少存在交叠性。在本文中, 笔者对这些研究结果中的一部分进行了对比, 提炼了一些观点并将其加入到大家所熟知的、在一定意义上可能指向更有效、更实用的心肌保护类型的观点中, 以便在临床环境中引起关注。

下面将介绍一些有关组合刺激的研究。近年来, 研

究者们已经在组合适应刺激方面进行过多项研究，目的是测定它们之间是否存在重合、叠加或协同保护的现象。其中有几个小组研究了后适应和缺血期适应的组合疗效。这类研究的依据是两种刺激导致的梗死面积的减少程度均小于预适应。考虑到这些刺激具有较强的临床相关性，因此其产生的任何累加作用都是非常有用的。Xin等[47]在2010年首次研究了组合疗效。他们发现尽管后适应和缺血期适应的保护作用均小于预适应，但二者结合产生的保护作用的程度可以模拟预适应的保护作用程度。另外，他们还发现将预适应疗效与后适应/缺血期适应组合疗效相结合，无法进一步加强保护作用，这表明预适应和后适应/缺血期适应组合具有相似的重叠机制。激酶活性研究表明，所有刺激均能激活Akt和ERK1/2的磷酸化作用，但其在IPC中的激活程度最高，而且在后适应/缺血期适应组合中也可以模拟这种激活程度。以小鼠为试验对象，在每次试验中，小鼠中的预适应保护作用均被PI3K或ERK1/2抑制剂阻断。Xin等得出结论，启动时间不同的各种刺激均通过相同的通用机制发挥作用，而且激酶激活的程度表示了对小鼠的保护程度。此结论与这些现象的机制研究结果一致，并且与同一小组中的一项研究结论也一致，此项研究表明重复远程后适应刺激可以增加心肌保护程度[49]。非常有趣的是，Tamareille等[30]发现，IPC和RIPC可发挥累加性作用来减少梗死面积，但是除能激活再灌注损伤抢救激酶(RISK)通道外，RIPC的使用还可以使磷酸-Stat3水平升高。因此，他们得出结论，IPC和RIPC的作用机制存在部分重合，但也存在一定差异。但是必须要注意的是，仅IPC存在Stat3的需求[50, 51]。Kloner课题组的研究表明，缺血期适应和远程后适应在所用大鼠模型中无效，因此排除了适应组合的问题[52]。一项最新的有关远程缺血后适应(RIPOST)的临床试验又表明，远程缺血期适应和后适应均有效，但其组合并无明显的累加效应(肌酐激酶-MB (CK-MB) AUC从31%降至29%， $P > 0.05$ ) [48]。因此，通过动物模型和人体中的组合研究可以得出以下观点：一般情况下如果作用机制不相似，则保护通道会通过相互重叠来发挥作用。由于在此领域中对这个观点的认知程度在逐渐提高，所以“适应”一词逐渐流行并形成了一种通用术语，用来指代这类型的效应。

### 3 启动心肌适应的新方法

除了对心肌缺血启动IPC和心脏其他任意部位缺血(包括肢体缺血)启动RIPC进行研究，本文还对作为心肌

适应启动器的若干非缺血性刺激进行了研究，尤其是对电针刺激(EA)、皮肤切口和皮肤伤害性感受器的药理激活进行了研究。同时，基于这些刺激的潜在的临床相关性及其心肌适应机制的相关内容，笔者对这些刺激进行了论述。笔者主要讨论了EA、脊髓刺激、迷走神经刺激和皮肤伤害感受器刺激的疗效，这些刺激均能激活心肌适应。20世纪80年代晚期和90年代早期的三篇文章为这项研究工作奠定了一定的基础。这三篇文章揭示了EA、迷走神经刺激对心脏的适应性作用[53–55]。尤其是1991年Meerson等发表的文章，该文章表明离体心脏的EA可减少心肌坏死面积。后来，一些研究人员观察到了神经和神经肽在适应现象中的作用。众所周知，缩氨酸舒缓激肽是缺血性预适应和后适应过程中必需的物质[56, 57]。而且Erşahin等和Shoemaker等也首次证实了其在RIPC过程中的参与性[58, 59]。缓激肽参与发出感觉神经信号，而心肌细胞含有缓激肽的BKR2接收器。在大鼠模型中，冠脉循环中的缓激肽被血管紧张素转化酶(ACE)和氨基肽酶P迅速降解。Erşahin等[58]表明，在分离的大鼠心脏模型中，抑肽素(一种氨基肽酶P抑制剂)针对I/R损伤具有心肌保护作用。该结论支持了缓激肽具有局部保护作用的观点，但不排除缓激肽的全身效应。

Vatners研究组后来在猪模型中证实，IPC后期需要神经支配，尤其是需要 $\alpha_1$ -AR的支配，但IPC早期不依赖此通道[60]。众所周知，RIPC需要来自缺血血管床完整的神经支配；但研究还发现了一些激素介质，这似乎表明神经信号也是至关重要的[61]。除了缺血性刺激需要神经系统参与，所有已知无创/非缺血性远程调节形式均在一定程度上需要神经系统的参与。目前研究认为EA是通过皮肤感觉刺激或其他神经支配发挥作用的，而迷走神经和脊髓刺激是可直接引发神经刺激的。笔者的研究表明，无论是由皮肤切口(远程创伤预适应或RPCT)或化学伤害感受器刺激引起的皮肤伤害感受诱导适应(NIC)均涉及皮肤的感觉神经刺激[42, 62]。此现象可能还包括体液和神经因素，但它们对大多观察到的保护作用的相对贡献目前尚不清晰。大部分非缺血性心肌适应刺激均能引发一种即时保护(如早期阶段)和一种较长期的持续性保护(如后期阶段)。因此不难发现，所有非缺血性远程调节启动器似乎均涉及神经和体液机制这两方面。这一点与RIPC相似。然而，远程缺血期适应和后适应与它们在起效时间的早期阶段更加相似(即时保护开始时)。

#### 3.1 脊髓刺激

通过脊髓刺激(SCS)激活脊髓背角神经元可有效治疗慢性顽固性心绞痛。除能镇痛外，采用SCS治疗慢性

心绞痛临床研究还表明,此疗法可增强人体的运动耐受性,改善由缺血引起的相关EKG变化并提高患者的生活质量[37, 63, 64]。动物研究也表明,SCS可改善心脏功能。在一个有一过性冠状动脉闭塞症状的家兔模型中,SCS可减少心肌梗死面积,但该效应会被肾上腺素阻断剂阻断[65]。然而,将其作为后适应刺激执行时并未观察到此效应。尽管研究人员一直在对SCS进行研究,而且其可能在其他方面还具潜在作用,如用于心力衰竭(HF)和心律不齐,但此结果及其创伤性操作过程限制了其在临床上的应用。

### 3.2 迷走神经刺激

长期以来,研究者就意识到自主神经系统平衡对体内平衡的很多方面及心脏功能调节方面至关重要。在发生心肌缺血后,交感神经和副交感神经系统间会失去平衡,而且研究人员认为增强的慢性交感神经活动会导致患者在MI后或在HF时死亡[66-68]。有研究者对迷走神经刺激在减缓左心室(LV)重塑、改善心脏功能及在MI和HF后的存活率方面的潜在作用进行了研究。基于此潜在作用,Kong等研究表明,在大鼠MI模型中,迷走神经刺激可减少心肌梗死面积并改善心脏功能。上述机制包括激活蛋白激酶C(PKC)、一氧化氮(NO)保护作用以及在IPC和RIPC后显示出的相同的抗炎作用[38]。另有研究表明,切断股神经同样可以消除RIPC的心肌保护作用[61],且股神经刺激还可以模拟肢体缺血时的RIPC[39]。该结果支持了如下观点,即神经通路对多种心肌调节形式是相同的,并且对某些神经的直接刺激可以引发心肌保护。

### 3.3 电针(EA)

2003年,Tsou等[69]通过在大鼠模型中测定心肌酶含量发现大鼠穴位处(对应于人体腕部,由胸椎区激活)EA可降低I/R损伤。他们还发现,通过切断双侧正中神经、双侧迷走神经或静脉注射纳洛酮均可阻断此效应。纳洛酮可影响包括迷走神经在内的神经通道,而迷走神经的刺激性已经被证实具有调节作用。Wang等[70]研究表明,EA可引发针对MI的心肌适应,并且此效应可加强低体温症的保护效应,说明二者机制间存在互补性。2006年,Gao等[40]在大鼠模型中发现,双侧内关穴的EA具有心肌保护作用,同时可使大鼠的梗死面积降低50%左右。此效应可被心得安阻断,表明此效应对肾上腺素能信号的依赖性。2012年,Zhou等[41]在家兔模型中发现,EA预适应(冠状动脉闭塞期间的EA)可减少心肌梗死面积,并同时释放心肌去甲肾上腺素(NE)。而且

PKC和阿片受体的药理学阻断可减少此保护作用。这种阻断作用扰乱了IPC/RIPC中许多相同的信号通道和EA诱导调节中的神经信号。

Redington研究组在先前的研究中表明,在RIPC中有透析性循环因子的参与[61]。后来该研究组又进一步证实,在家兔的内关穴执行双侧EA后也会出现这样的情况[71]。尽管研究时间已超过15年,但是否存在体液因素依然尚未得到鉴定。有研究证实,其他阻断作用对Hsp70(对于IPC和RIPC也至关重要[72, 73])和miR-214(也参与缺血后适应[74, 75])也具有牵连性影响。该结论证实了如下观点,即除了共享信号和神经通路外,基因调控通路还可能与这些不同形式的心肌适应进行共享。到目前为止,EA作为后适应刺激的有效性还没有得到证实,但其作为缺血期的适应保护可能具有临床相关性[41]。

### 3.4 通过激活感觉神经启动心肌保护: RPCT和NIC

2004年,在我们发表的一篇文章中,描述了皮肤手术切口的心肌保护效应,同时为这个效应命名了新的术语,即远程创伤预适应(RPCT)。简言之,我们认为腹腔周围区域的手术切口可引发心肌保护,从而减弱继发性缺血损伤,同时将心肌梗死面积减少80%~85%。与IPC和RIPC所不同,RPCT无缺血依赖性但却具有非常高的保护效应。与RIPC相似,RPCT要求完整的神经连接[42],而且RPCT在早期和晚期也和IPC一样都具有保护效应。然而,与IPC不同的是,RPCT的早期和晚期保护效应都不依赖TNF- $\alpha$ 和iNOS[42, 62, 76]。这就说明RPCT与IPC的机制不完全相同但存在一定重合。

RPCT的特殊之处在于其保护效应的启动与特定部位——脐周两侧皮肤的外周神经的刺激相关[42, 62]。我们的研究表明,这种刺激是通过皮肤传感神经发挥作用的。因为局部利多卡因可阻断该效应,局部辣椒素软膏可模拟该效应,所以在TRPV1基因被敲除的小鼠中局部辣椒素效应可被完全阻断[42]。此结果显示了神经通路的存在。事实上,我们的研究表明对T7椎体水平的脊椎进行横切可阻断保护作用,但对C7横切却无此效应,这说明其缺乏中枢神经系统(CNS)调节,但是位于肚脐和心脏间的脊柱一定是完整的。皮肤的伤害感受及化学和其他疼痛可引发相应的保护作用,基于这个事实,我们提出了新的术语,即伤害感受诱导适应(NIC),用来指代更广泛的效应(通过切口、化学或我们将要看到的电学方法被激活)。

有研究进一步表明,通过在皮肤切口部位注射荧光染料1,1'-对苯二甲酸-3,3,3',3'-四甲基吡啶碳菁(Dil),

可追踪神经通道。DiI信号可对位于T1-T5(腹部)和T9-T10(心脏)椎体水平的背角进行染色。其研究结果表明,在皮肤切口水平至心脏神经支配水平上存在从皮肤感觉神经至脊髓背根神经节(DRG)的神经通路[42]。有文献报道,由外周疼痛刺激诱导的背根反射可能形成了不同脊柱水平上躯体感觉和心脏交感神经系统间相互作用的基础[77, 78]。背根反射是指在对相邻背根或感觉神经执行电刺激后,从脊髓背根记录到的一连串的动作电位。研究认为对感觉神经和背根实施电刺激后,背根反射可引发初级传入去极化(PAD)的上升相,该上升相是到达脊髓的同步传入抽射在脊髓中的传入神经末端内产生的[79, 80]。这会导致脊髓内传入神经末端的去极化超出了其阈值,从而引发沿背根脊髓外侧反向运行的动作电位的形成。目前已有多个研究组记录了沿着脊髓和横穿脊髓的背根反射传播[81, 82]。研究人员发现,在一个离体仓鼠脊髓中,背根反射沿着喙-尾和尾-喙两个方向,从下腰椎至上胸根的至少15个片段内进行传播[82]。这就说明,在哺乳动物脊髓内的片段间存在PAD传输通道。而且我们的脊髓切断结果也验证了此通道的参与[42]。正如BKR2基因的敲除能阻断心肌保护效应,Hoe140和心得安同样能阻断心肌保护的效应。该事实说明在此过程中有缓激肽和肾上腺素能信号的参与,而它们同样存在于IPC和RIPC中[59, 60]。也表明了激活PKC和活化mitoK<sub>ATP</sub>渠道所必须的条件,同时证明了在NIC[42]和IPC[83]中均涉及通用传递器和末端效应器的假说。降钙素基因相关肽(CGRP)和P物质信号的阻断说明存在一种通路,心脏感觉神经的异向激活可通过此通路激活交感神经。NE和缓激肽可能对心肌细胞起作用,而且它们是PKC的活化信号。Gross的实验室和其他研究机构[84, 85]已经证实,RPCT(目前我们将其视为一种NIC刺激)可以在犬、大鼠中运行,且必须要有缓激肽信号的参与。但是与IPC不同,腺苷和阿片信号的药理学阻断对心肌保护不起作用。Gross等表明,二十碳三烯酸(EETs)诱导的信号是NIC(由RPCT或局部辣椒素诱导)中缓激肽信号的重要下游信号,而且先前的研究已经表明了IPC中EET的参与和缺血后适应[85-87]。尽管研究者认为EETs是以自分泌或旁分泌的方式发挥局部作用,但NIC中的远距离作用依然不能被排除。最后,通过采用一种PKC $\gamma$ 的局部抑制剂(神经元特异性PKC亚型)[88],研究者阻断了NIC,该研究证实了皮肤神经纤维的重要性,同时为NIC的诱导提供了一种新的药理学靶点[86]。

我们认为,已有的研究结果证明了NIC的相关机制,即激活前腹部(靠近T9~T10)的皮肤伤害感受器可将信号从T9~T10的DRG传递至T1~T5的DRG,从而产生通过

心脏感觉神经至心脏的逆向性信号。在心脏中,感觉神经会释放CGRP和P物质,从而引发来自交感神经的NE释放,及来自感觉神经或交感神经的缓激肽的释放[89]。NE和/或缓激肽在一定程度上会对心肌细胞产生作用,同时会触发PKC的活性,进而调节信号和末端效应器的活性,包括线粒体K<sub>ATP</sub>通道[42, 85]。通过触发交感神经系统介导的心肌适应,可以响应脊髓传导的远端皮肤神经的“警示信号”。

尽管在IPC、RPCT和NIC的机制间存在着大量重叠,但值得注意的是,根据目前仅有的资料可知,NIC不需要TNF- $\alpha$ 、腺苷或阿片信号[62, 85],而这些却是IPC的必需品。有趣的是,在NIC和IPC中都有交感神经激活、缓激肽和 $\beta$ -肾上腺素能信号的参与,PKC似乎是所有这些调节模式所必需的物质。而且,研究表明CGRP具有心肌保护作用,且其会参与到RIPC、后适应和热应激后的心肌保护中[90-93]。总之,现有证据表明,虽然不要求IPC、RPCT和NIC在分子的构成方面完全相同,但至少在心肌适应现象的相关机制方面要有相同点。我们认为情况确实是这样的,不同的心肌保护现象基本上代表了进入一个大信号网络的不同切入点,该信号网络由受体、激酶、代谢信号级联放大、基因网络和效应器通路(图1)构成。各种调节信号均可在网络的明确“临界点”激活此网络,从而使网络的特定定位点在通用的保护效应器通路集中检测信号通路的焦点。通用的调节子和效应器通路似乎包括了缓激肽(上文已讨论)、PKC和mitoK<sub>ATP</sub>。

### 3.5 蛋白激酶 C(PKC)

PKC在许多支配细胞行为的信号链中发挥着非常重要的作用[94]。目前,心肌保护中PKC信号模式的建立主要是以各种信号元素的病理学抑制获取到的信息为基础。为了验证PKC信号的线性模式,研究已证实IPC[95]和RIPC[96]中可以用PKC依赖性模式激活多种蛋白。这表明这些蛋白可能是PKC通路中的信号元素。PKC- $\alpha$ 是最能表达心肌衰弱PKC亚型的物质之一[95],目前对PKC- $\alpha$ 的研究是最少的,因为与新的PKC- $\delta$ 和PKC- $\epsilon$ 亚型不同,在出现急性心肌缺血时PKC- $\alpha$ 不会受到调节。尽管有一项研究[99]对PKC- $\delta$ 在猪模型中的活性存在争议,但易位修饰却表明其在大鼠、小鼠和猪[97, 98]中是缺血后心肌细胞坏死和收缩功能障碍的关键调节子。在正常心肌中,PKC- $\epsilon$ 可利用至少36种蛋白形成信号复合体,这些蛋白可被归类为结构要素、信号分子和胁迫应答蛋白[100]。PKC- $\epsilon$ 依赖性心肌保护可诱导这些复合体的动态调制,此结果表明PKC- $\epsilon$ 在启动对抗

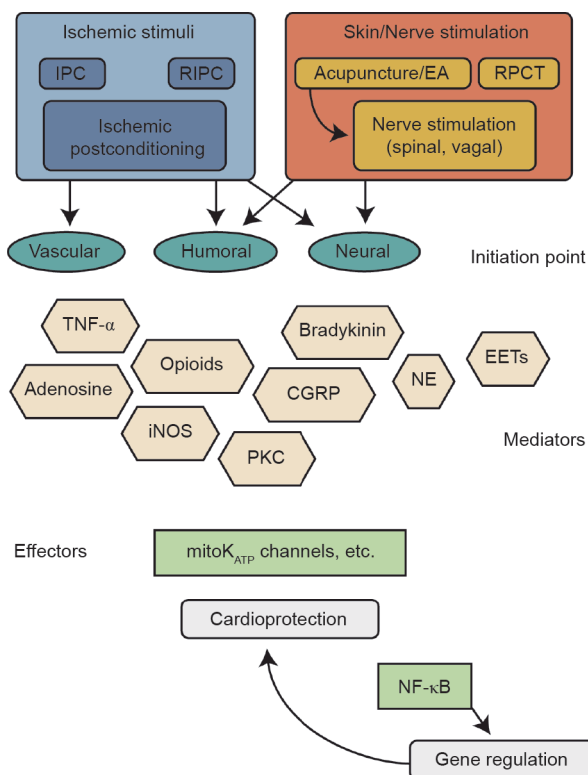


图1. 此“心肌适应网”假设不同刺激可在不同临界点激活一部分细胞信息网，以收集心肌挽救信号。本示意图并不是全面的，仅用来指出概念中的相似之处。缩略词：IPC，缺血预适应；RIPC，远程缺血预适应；EA，电针刺；RPCT，远程创伤预适应；TNF- $\alpha$ ，肿瘤坏死因子 $\alpha$ ；iNOS，诱导型一氧化氮合酶；CGRP，降钙素基因相关肽；PKC，蛋白激酶C；NE，去甲肾上腺素；EETs，二十碳烯酸； $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ ，ATPase钾线粒体；NF- $\kappa$ B，核转录因子B。

缺血性损伤的保护机制中对这些复合体具有功能性作用[94,101]。

### 3.6 线粒体 / 细胞膜 $\text{K}_{\text{ATP}}$ 通道

线粒体在经过氧化磷酸化的肌细胞能量生成方面发挥着重要作用。它们也是参与心肌细胞存活的关键因素，主要是通过调节细胞内活性氧(ROS)的生成、钙的稳定和细胞凋亡诱导因子的释放来参与心肌细胞的存活[102–104]。在哺乳类动物的心脏中存在着 $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ 和 $\text{sarcK}_{\text{ATP}}$ 两种通道[105]，而且它们似乎都参与IPC和心肌保护[102]。Gaudette等[106]在绵羊模型中研究证实，由 $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ 启动子直接提供的保护可被PKC拮抗剂(白屈菜赤碱)阻断；而通过激活PKC调节的保护可通过加入 $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ 通道拮抗剂5-羟基萘酸盐(5-HD，一种 $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ 通道选择性阻断剂)来消除。上述结果表明PKC的激活和 $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ 通道的激活具有相互依赖性，且两种通道对于心脏保护来说都是必要的。Nozawa等[107]表明，在大鼠中，IPC可导致PKC- $\delta$ 和PKC- $\epsilon$ 的易位；然而，5-HD可在不阻断两种PKC亚型易位的情况下阻断IPC效应。上述结果表明 $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ 通道或5-HD的作用位点距PKC较

远。 $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ 是在I/R损伤后提高细胞存活率的主要的、常见的效应器通道之一。然而，其他心肌适应药理学诱导剂在药物靶向此通道的临床应用方面还存在严重的局限性。

## 4 NIC 和 EA 的潜在临床应用

正如本文前面所提到的，EA对心脏后适应的有效性还没有得到证实；然而，一项积极的研究验证了其作为缺血期适应刺激的有效作用[41]。由于作用机制相似且RPCT临床应用又具有局限性(例如，涉及皮肤手术切口)，所以在这种情况下，我们利用了电刺激激活腹部感觉神经——皮肤EA，来探索一种启动NIC的简便、无创的方法。在我们先前的研究中，我们通过采用RPCT和NIC(采用辣椒素[42])刺激相同皮肤区域的远程电刺激可以激活心肌保护，该结果已经得到了证实，并且我们在本文中首次报告了该研究结果。

在I/R前15 min或再灌注开始时(此后持续15 min)，我们采用电针和电流(技术详情如图2所示)进行皮肤电刺激(ES)。对于ES来说，由于其属于针刺疗法，EA针无需深入插入组织，而是仅需钩穿皮肤即可(故被命名为ES)。对于使用或不使用上述ES的治疗情况，一般是根据梗死面积来评价I/R损伤结果。本研究结果表明，当将ES用作预适应或后适应刺激时，沿肚脐侧面沿线等间距特定位点(即RPCT中所用的相同区域)执行ES，可使梗死面积有效地减少80%~85%( $P \leq 0.05$ ) (如图2所示)。由此可知，在前腹位点通过ES执行NIC可有效缓解小鼠中的I/R损

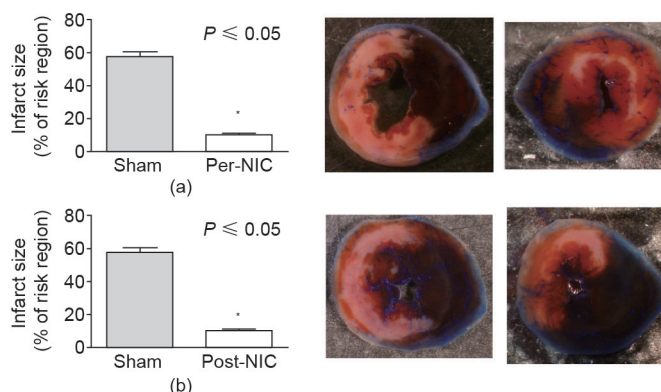


图2. 通过皮肤电刺激(ES)激活伤害感受器的心肌适应。将无菌手指和面部针灸(0.18 × 7 mm; Millenia Acupuncture, Alhambra, CA, USA)等距定位在穿过预先画好的RPCT区域[62]的一条线上，将该线连接至KWD-808-I多功能健康设备(Yingdi Inc., 中国)上，并接通电流(10 V 100 Hz 脉冲宽度400 ms)刺激20 min以启动预适应，然后诱发缺血症状((a)预NIC)。对于(b)中的后NIC，在再灌注前执行刺激并持续20 min。在小鼠恢复意识前将针移除，持续再灌注24 h。再灌注结束时，麻醉小鼠、对心脏进行插管、染色、固定、拍照，然后依上文所述对梗死面积进行分析[42, 62]。右：典型TTC染色mid-LV模拟图像(左上和左下)，预-NIC(右上)，后-NIC(右下)。预NIC和后NIC均使梗死面积减少80%以上。

伤，其机制与RPCT相似。由于这种作为后适应刺激的干预作用具有无创性和非缺血性，且无需手术干预，所以我们认为该方法具有较强的临床相关性。

## 5 结论

将近30年的研究成果使我们更多地了解了IPC内源性心肌保护作用机制。RPCT的发现为保护心脏免受心肌I/R损伤提供了重要的治疗对策，开启了探索启动心肌保护新模式的大门。研究证实，一些引起心脏保护的模型在许多动物模型及人体中有效[108]。这就表明这些模型是非常有价值的实验资料，它帮助我们进一步理解引起心脏保护的临床前发展。机制性研究及多种刺激因素组合应用研究表明，预适应、缺血期适应、后适应、IPC、RIPC、神经刺激、EA和NIC在机制上具有许多的相同部分，但它们仍然存在差异。例如，IPC和RIPC均涉及TNF- $\alpha$ 、腺苷和阿片物质的作用，但RPCT[62]和NIC[85]的发生则均不涉及这些物质。据报道，EA作为预适应刺激时有效，但作为后适应刺激时无效[41]。但所有这些模式均需要激活并利用NF- $\kappa$ B、PKC、缓激肽和mitoK<sub>ATP</sub>通道[42, 62]。我们认为所有这些心肌保护现象实际上都是一种广泛的心脏调节网的反射，而且各种刺激通过此网中略微不同的切入点发挥作用(如图1所示)。IPC似乎能够利用多个切入点来发挥作用，包括血管、体液和神经，而NIC和EA则主要通过网络中的神经切入点发挥作用。切入点的差异可能与网络中不同的成分活化有关；因此它们在所研究的特定现象中的可检测活性、必要性或可分配性也不同。我们对这些现象所提炼出的观点主要来源于过去对不同模式和机制片段的实验室发现。我们认为心脏调节网主要包括：体液因素、神经和血管信号，激酶、氧化、心肌细胞中的代谢级联反应(可能存在于不同类型的细胞之间)，基因表达和相关的miRNA网。据我们所知，这些网络组件聚集在若干位点，包括PKC、缓激肽和线粒体。随着研究工作的进行，我们将会发现一些其他的机制组成部分，这些机制在NIC、ES、RIPC中发挥更重要的作用，但是它们可能在IPC引起的心脏保护中并不发挥作用。我们认为这种调节网的存在实际上是人类的一种构想，即可指定总体细胞和细胞间信息网络的一部分具有与心肌挽救相关的特定功能。但是出于研究和翻译的目的，此构想有助于对那些可能最终被视为药物作用靶点的分子功能的描述。

目前，临床上仍然急需能启动心肌适应的非缺血性和非创伤性的方法。如今，作为远程非缺血启动器的

NIC和EA/ES诱导的神经通道的发现，对在不引发缺血状况或不需要手术干预的情况下引发心肌保护的这种药理学和电化学方法的发展[109, 110]具有更广阔的前景。我们在本文中首次证明了NIC作为一种后适应刺激所具有的保护作用，同时确立了研究潜在机制和进一步的临床前发展的临床相关性。

## 致谢

本研究获得了美国国立卫生研究院(NIHR01 HL091478)对W. Keith Jones的支持和中国国家自然科学基金(81470425)对Xiaoping Ren的支持。

## Compliance with ethics guidelines

CardioCeption, LLC holds licenses relevant to this field of study. W. Keith Jones owns equity in CardioCeption, but has received no income or financial benefit from any entity related to this work. The University of Cincinnati, W. Keith Jones, and Xiaoping Ren filed the initial patents but have received no royalties.

Kristin Luther, Yang Song, Yang Wang, Xiaoping Ren, and W. Keith Jones declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

## References

1. C. E. Murry, R. B. Jennings, K. A. Reimer. Preconditioning with ischemia: A delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 1986, 74(5): 1124–1136
2. J. A. Auchampach, G. J. Gross. Adenosine A1 receptors, K<sub>ATP</sub> channels, and ischemic preconditioning in dogs. *Am. J. Physiol.*, 1993, 264(5 Pt 2): H1327–H1336
3. Y. Guo, W. J. Wu, Y. Qiu, X. L. Tang, Z. Yang, R. Bolli. Demonstration of an early and a late phase of ischemic preconditioning in mice. *Am. J. Physiol.*, 1998, 275(4 Pt 2): H1375–H1387
4. D. M. Yellon, A. Dana. The preconditioning phenomenon: A tool for the scientist or a clinical reality? *Circ. Res.*, 2000, 87(7): 543–550
5. M. A. Leeser, M. F. Stoddard, S. Manchikalapudi, R. Bolli. Bradykinin-induced preconditioning in patients undergoing coronary angioplasty. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 1999, 34(3): 639–650
6. B. Ji, et al. Evaluation by cardiac troponin I: The effect of ischemic preconditioning as an adjunct to intermittent blood cardioplegia on coronary artery bypass grafting. *J. Card. Surg.*, 2007, 22(5): 394–400
7. L. K. Teoh, R. Grant, J. A. Hulf, W. B. Pugsley, D. M. Yellon. A comparison between ischemic preconditioning, intermittent cross-clamp fibrillation and cold crystalloid cardioplegia for myocardial protection during coronary artery bypass graft surgery. *Cardiovasc. Surg.*, 2002, 10(3): 251–255
8. G. Heusch. Cardioprotection: Chances and challenges of its translation to the clinic. *Lancet*, 2013, 381(9861): 166–175
9. M. S. Marber, D. S. Latchman, J. M. Walker, D. M. Yellon. Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation*, 1993, 88(3): 1264–1272
10. S. Hoshida, N. Yamashita, K. Otsu, M. Hori. Repeated physiologic stresses provide

- persistent cardioprotection against ischemia-reperfusion injury in rats. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2002, 40(4): 826–831
11. K. Przyklenk, B. Bauer, M. Ovize, R. A. Kloner, P. Whittaker. Regional ischemic ‘preconditioning’ protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation*, 1993, 87(3): 893–899
  12. T. B. McClanahan, B. S. Nao, L. J. Wolke, B. J. Martin, T. E. Metz, K. P. Gallagher. Brief renal occlusion and reperfusion reduces myocardial infarct size in rabbits. *FASEB J.*, 1993, 7: A118 (abstract)
  13. G. Heusch, H. E. Bøtker, K. Przyklenk, A. Redington, D. Yellon. Remote ischemic conditioning. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2015, 65(2): 177–195
  14. S. M. Davidson, et al. Remote ischaemic preconditioning involves signalling through the SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 signalling axis. *Basic Res. Cardiol.*, 2013, 108(5): 377
  15. K. Przyklenk. ‘Going out on a limb’: SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 signaling as a mechanism of remote ischemic preconditioning? *Basic Res. Cardiol.*, 2013, 108(5): 382
  16. T. Rassaf, M. Totzeck, U. B. Hendgen-Cotta, S. Shiva, G. Heusch, M. Kelm. Circulating nitrite contributes to cardioprotection by remote ischemic preconditioning. *Circ. Res.*, 2014, 114(10): 1601–1610
  17. J. Li, et al. MicroRNA-144 is a circulating effector of remote ischemic preconditioning. *Basic Res. Cardiol.*, 2014, 109(5): 423
  18. K. Przyklenk. microRNA-144: The ‘what’ and ‘how’ of remote ischemic conditioning? *Basic Res. Cardiol.*, 2014, 109(5): 429
  19. B. C. Gho, R. G. Schoemaker, M. A. van den Doel, D. J. Duncker, P. D. Verdouw. Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue. *Circulation*, 1996, 94(9): 2193–2200
  20. C. Weinbrenner, M. Nelles, N. Herzog, L. Sárváry, R. H. Strasser. Remote preconditioning by infrarenal occlusion of the aorta protects the heart from infarction: A newly identified non-neuronal but PKC-dependent pathway. *Cardiovasc. Res.*, 2002, 55(3): 590–601
  21. S. Y. Lim, D. M. Yellon, D. J. Hausenloy. The neural and humoral pathways in remote limb ischemic preconditioning. *Basic Res. Cardiol.*, 2010, 105(5): 651–655
  22. W. R. Davies, et al. Remote ischemic preconditioning improves outcome at 6 years after elective percutaneous coronary intervention: The CRISP stent trial long-term follow-up. *Circ. Cardiovasc. Interv.*, 2013, 6(3): 246–251
  23. L. Candilio, et al. Effect of remote ischaemic preconditioning on clinical outcomes in patients undergoing cardiac bypass surgery: A randomised controlled clinical trial. *Heart*, 2015, 101(3): 185–192
  24. L. Li, et al. Remote preconditioning reduces myocardial injury in adult valve replacement: A randomized controlled trial. *J. Surg. Res.*, 2010, 164(1): e21–e26
  25. Z. Q. Zhao, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: Comparison with ischemic preconditioning. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2003, 285(2): H579–H588
  26. G. Heusch. Treatment of myocardial ischemia/reperfusion injury by ischemic and pharmacological postconditioning. *Compr. Physiol.*, 2015, 5(3): 1123–1145
  27. C. M. Li, X. H. Zhang, X. J. Ma, M. Luo. Limb ischemic postconditioning protects myocardium from ischemia-reperfusion injury. *Scand. Cardiovasc. J.*, 2006, 40(5): 312–317
  28. F. Kerendi, et al. Remote postconditioning: Brief renal ischemia and reperfusion applied before coronary artery reperfusion reduces myocardial infarct size via endogenous activation of adenosine receptors. *Basic Res. Cardiol.*, 2005, 100(5): 404–412
  29. L. Breivik, E. Helgeland, E. K. Aarnes, J. Mrdalj, A. K. Jonassen. Remote postconditioning by humoral factors in effluent from ischemic preconditioned rat hearts is mediated via PI3K/Akt-dependent cell-survival signaling at reperfusion. *Basic Res. Cardiol.*, 2011, 106(1): 135–145
  30. S. Tamarelle, et al. RISK and SAFE signaling pathway interactions in remote limb ischemic preconditioning in combination with local ischemic postconditioning. *Basic Res. Cardiol.*, 2011, 106(6): 1329–1339
  31. M. R. Schmidt, et al. Intermittent peripheral tissue ischemia during coronary ischemia reduces myocardial infarction through a K<sub>ATP</sub>-dependent mechanism: First demonstration of remote ischemic preconditioning. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2007, 292(4): H1883–H1890
  32. H. E. Bøtker, et al. Remote ischaemic conditioning before hospital admission, as a complement to angioplasty, and effect on myocardial salvage in patients with acute myocardial infarction: A randomised trial. *Lancet*, 2010, 375(9716): 727–734
  33. P. Meybohm, et al.; RIPHeart Study Collaborators. A multicenter trial of remote ischemic preconditioning for heart surgery. *N. Engl. J. Med.*, 2015, 373(15): 1397–1407
  34. S. Pasupathy, S. Homer-Vanniasinkam. Surgical implications of ischemic preconditioning. *Arch. Surg.*, 2005, 140(4): 405–409, discussion 410
  35. A. J. Ludman, D. M. Yellon, D. J. Hausenloy. Cardiac preconditioning for ischaemia: Lost in translation. *Dis. Model. Mech.*, 2010, 3(1–2): 35–38
  36. M. Thielmann, et al. Cardioprotective and prognostic effects of remote ischaemic preconditioning in patients undergoing coronary artery bypass surgery: A single-centre randomised, double-blind, controlled trial. *Lancet*, 2013, 382(9892): 597–604
  37. J. De Vries, M. J. De Jongste, G. Spincemaille, M. J. Staal. Spinal cord stimulation for ischemic heart disease and peripheral vascular disease. *Adv. Tech. Stand. Neurosurg.*, 2007, 32: 63–89
  38. S. S. Kong, J. J. Liu, X. J. Yu, Y. Lu, W. J. Zang. Protection against ischemia-induced oxidative stress conferred by vagal stimulation in the rat heart: Involvement of the AMPK-PKC pathway. *Int. J. Mol. Sci.*, 2012, 13(11): 14311–14325
  39. J. H. Dong, Y. X. Liu, J. Zhao, H. J. Ma, S. M. Guo, R. R. He. High-frequency electrical stimulation of femoral nerve reduces infarct size following myocardial ischemia-reperfusion in rats. *Acta Physiol. Sin.*, 2004, 56(5): 620–624
  40. J. Gao, W. Fu, Z. Jin, X. Yu. A preliminary study on the cardioprotection of acupuncture pretreatment in rats with ischemia and reperfusion: Involvement of cardiac  $\beta$ -adrenoceptors. *J. Physiol. Sci.*, 2006, 56(4): 275–279
  41. W. Zhou, et al. Cardioprotection of electroacupuncture against myocardial ischemia-reperfusion injury by modulation of cardiac norepinephrine release. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2012, 302(9): H1818–H1825
  42. W. K. Jones, et al. Peripheral nociception associated with surgical incision elicits remote nonischemic cardioprotection via neurogenic activation of protein kinase C signaling. *Circulation*, 2009, 120(11 Suppl 1): S1–S9
  43. A. C. Merlocco, et al. Transcutaneous electrical nerve stimulation as a novel method of remote preconditioning: *In vitro* validation in an animal model and first human observations. *Basic Res. Cardiol.*, 2014, 109(3): 406
  44. H. Jneid, M. Leessar, R. Bolli. Cardiac preconditioning during percutaneous coronary interventions. *Cardiovasc. Drugs. Ther.*, 2005, 19(3): 211–217
  45. S. R. Walsh, T. Tang, U. Sadat, D. P. Dutka, M. E. Gaunt. Cardioprotection by remote ischaemic preconditioning. *Br. J. Anaesth.*, 2007, 99(5): 611–616
  46. G. Heusch. Molecular basis of cardioprotection: Signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning. *Circ. Res.*, 2015, 116(4): 674–699
  47. P. Xin, et al. Combined local ischemic postconditioning and remote preconditioning recapitulate cardioprotective effects of local ischemic preconditioning. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2010, 298(6): H1819–H1831
  48. F. Prunier, et al. The RIPOST-MI study, assessing remote ischemic preconditioning alone or in combination with local ischemic postconditioning in ST-segment elevation myocardial infarction. *Basic Res. Cardiol.*, 2014, 109(2): 400
  49. M. Wei, et al. Repeated remote ischemic postconditioning protects against adverse left ventricular remodeling and improves survival in a rat model of myocardial infarction. *Circ. Res.*, 2011, 108(10): 1220–1225
  50. R. Hattori, et al. Role of STAT3 in ischemic preconditioning. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2001, 33(11): 1929–1936
  51. N. Suleman, S. Somers, R. Smith, L. H. Opie, S. C. Lecour. Dual activation of STAT-3 and Akt is required during the trigger phase of ischaemic preconditioning.



- Cardiovasc. Res.*, 2008, 79(1): 127–133
52. J. Sachdeva, W. Dai, P. Z. Gerczuk, R. A. Kloner. Combined remote preconditioning and postconditioning failed to attenuate infarct size and contractile dysfunction in a rat model of coronary artery occlusion. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.*, 2014, 19(6): 567–573
  53. F. Z. Meerson, et al. Adaptive stabilization of myocardium under the influence of electroacupuncture and cardiac protection. *Kardiologiya*, 1991, 31(10): 72–77 (in Russian)
  54. E. Vanoli, G. M. De Ferrari, M. Stramba-Badiale, S. S. Hull Jr., R. D. Foreman, P. J. Schwartz. Vagal stimulation and prevention of sudden death in conscious dogs with a healed myocardial infarction. *Circ. Res.*, 1991, 68(5): 1471–1481
  55. G. Zuanetti, G. M. De Ferrari, S. G. Priori, P. J. Schwartz. Protective effect of vagal stimulation on reperfusion arrhythmias in cats. *Circ. Res.*, 1987, 61(3): 429–435
  56. M. Goto, Y. Liu, X. M. Yang, J. L. Ardell, M. V. Cohen, J. M. Downey. Role of bradykinin in protection of ischemic preconditioning in rabbit hearts. *Circ. Res.*, 1995, 77(3): 611–621
  57. R. Schulz, H. Post, C. Vahlhaus, G. Heusch. Ischemic preconditioning in pigs: A graded phenomenon: Its relation to adenosine and bradykinin. *Circulation*, 1998, 98(10): 1022–1029
  58. C. Erşahin, D. E. Euler, W. H. Simmons. Cardioprotective effects of the aminopeptidase P inhibitor apstatin: Studies on ischemia/reperfusion injury in the isolated rat heart. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 1999, 34(4): 604–611
  59. R. G. Schoemaker, C. L. van Heijningen. Bradykinin mediates cardiac preconditioning at a distance. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2000, 278(5): H1571–H1576
  60. R. K. Kudej, et al. Obligatory role of cardiac nerves and  $\alpha_1$ -adrenergic receptors for the second window of ischemic preconditioning in conscious pigs. *Circ. Res.*, 2006, 99(11): 1270–1276
  61. K. L. Redington, et al. Remote cardioprotection by direct peripheral nerve stimulation and topical capsaicin is mediated by circulating humoral factors. *Basic Res. Cardiol.*, 2012, 107(2): 241
  62. X. Ren, Y. Wang, W. K. Jones. TNF- $\alpha$  is required for late ischemic preconditioning but not for remote preconditioning of trauma. *J. Surg. Res.*, 2004, 121(1): 120–129
  63. S. Eddicks, K. Maier-Hauff, M. Schenk, A. Müller, G. Baumann, H. Theres. Thoracic spinal cord stimulation improves functional status and relieves symptoms in patients with refractory angina pectoris: The first placebo-controlled randomised study. *Heart*, 2007, 93(5): 585–590
  64. G. A. Sgueglia, A. Sestito. Spinal cord stimulation: A new form of pain modulatory treatment in cardiac syndrome X. *Am. J. Med.*, 2007, 120(9): e17
  65. E. M. Southerland, et al. Preemptive, but not reactive, spinal cord stimulation mitigates transient ischemia-induced myocardial infarction via cardiac adrenergic neurons. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2007, 292(1): H311–H317
  66. K. Sroka. On the genesis of myocardial ischemia. *Z. Kardiol.*, 2004, 93(10): 768–783
  67. D. L. Jardine, et al. Increased cardiac sympathetic nerve activity following acute myocardial infarction in a sheep model. *J. Physiol.*, 2005, 565(1): 325–333
  68. E. A. Jankowska, P. Ponikowski, M. F. Piepoli, W. Banasiak, S. D. Anker, P. A. Poole-Wilson. Autonomic imbalance and immune activation in chronic heart failure—Pathophysiological links. *Cardiovasc. Res.*, 2006, 70(3): 434–445
  69. M. T. Tsou, C. H. Huang, J. H. Chiu. Electroacupuncture on PC6 (Neiguan) attenuates ischemia/reperfusion injury in rat hearts. *Am. J. Chin. Med.*, 2004, 32(6): 951–965
  70. X. R. Wang, J. Xiao, D. J. Sun. Myocardial protective effects of electroacupuncture and hypothermia on porcine heart after ischemia/reperfusion. *Acupunct. Electrother. Res.*, 2003, 28(3–4): 193–200
  71. K. L. Redington, et al. Electroacupuncture reduces myocardial infarct size and improves post-ischemic recovery by invoking release of humoral, dialyzable, cardioprotective factors. *J. Physiol. Sci.*, 2013, 63(3): 219–223
  72. C. R. Hampton, et al. HSP70.1 and -70.3 are required for late-phase protection induced by ischemic preconditioning of mouse hearts. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2003, 285(2): H866–H874
  73. M. Tranter, et al. NF- $\kappa$ B driven cardioprotective gene programs; Hsp70.3 and cardioprotection after late ischemic preconditioning. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2010, 49(4): 664–672
  74. P. Y. Liu, Y. Tian, S. Y. Xu. Mediated protective effect of electroacupuncture pretreatment by miR-214 on myocardial ischemia/reperfusion injury. *J. Geriatr. Cardiol.*, 2014, 11(4): 303–310
  75. D. Y. Wan, Z. Zhang, H. H. Yang. Cardioprotective effect of miR-214 in myocardial ischemic preconditioning by down-regulation of hypoxia inducible factor 1,  $\alpha$  subunit inhibitor. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*, 2015, 61(2): 1–6
  76. W. K. Jones, et al. Ischemic preconditioning increases iNOS transcript levels in conscious rabbits via a nitric oxide-dependent mechanism. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 1999, 31(8): 1469–1481
  77. J. Bagust, Y. Chen, G. A. Kerkut. Spread of the dorsal root reflex in an isolated preparation of hamster spinal cord. *Exp. Physiol.*, 1993, 78(6): 799–809
  78. C. M. Brooks, K. Koizumi. Origin of the dorsal root reflex. *J. Neurophysiol.*, 1956, 19(1): 60–74
  79. K. Koketsu. Intracellular potential changes of primary afferent nerve fibers in spinal cords of cats. *J. Neurophysiol.*, 1956, 19(5): 375–392
  80. J. Bagust, I. D. Forsythe, G. A. Kerkut. An investigation of the dorsal root reflex using an *in vitro* preparation of the hamster spinal cord. *Brain Res.*, 1985, 331(2): 315–325
  81. G. P. McCouch, G. M. Austin. Postsynaptic source of dorsal root reflex. *J. Neurophysiol.*, 1958, 21(3): 217–223
  82. J. Bagust, G. A. Kerkut, N. I. Rakkah. Differential sensitivity of dorsal and ventral root activity to magnesium and 2-amino-5-phosphonovalerate (APV) in an isolated mammalian spinal cord preparation. *Brain Res.*, 1989, 479(1): 138–144
  83. A. Hassouna, B. M. Matata, M. Galiñanes. PKC- $\epsilon$  is upstream and PKC- $\alpha$  is downstream of mitoK<sub>ATP</sub> channels in the signal transduction pathway of ischemic preconditioning of human myocardium. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2004, 287(5): C1418–C1425
  84. S. Y. Lim, D. J. Hausenloy. Remote ischemic conditioning: From bench to bedside. *Front. Physiol.*, 2012, 3: 27
  85. G. J. Gross, J. E. Baker, J. Moore, J. R. Falck, K. Nithipatikom. Abdominal surgical incision induces remote preconditioning of trauma (RPCT) via activation of bradykinin receptors (BK2R) and the cytochrome P450 epoxygenase pathway in canine hearts. *Cardiovasc. Drugs Ther.*, 2011, 25(6): 517–522
  86. E. R. Gross, A. K. Hsu, T. J. Urban, D. Mochly-Rosen, G. J. Gross. Nociceptive-induced myocardial remote conditioning is mediated by neuronal gamma protein kinase C. *Basic Res. Cardiol.*, 2013, 108(5): 381
  87. G. J. Gross, K. M. Gauthier, J. Moore, W. B. Campbell, J. R. Falck, K. Nithipatikom. Evidence for role of epoxyeicosatrienoic acids in mediating ischemic preconditioning and postconditioning in dog. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2009, 297(1): H47–H52
  88. Q. Chai, J. Liu, Y. Hu. Cardioprotective effect of remote preconditioning of trauma and remote ischemia preconditioning in a rat model of myocardial ischemia/reperfusion injury. *Exp. Ther. Med.*, 2015, 9(5): 1745–1750
  89. N. Seyed, T. Win, H. M. Lander, R. Levi. Bradykinin B<sub>2</sub>-receptor activation augments norepinephrine exocytosis from cardiac sympathetic nerve endings. Mediation by autocrine/paracrine mechanisms. *Circ. Res.*, 1997, 81(5): 774–784
  90. Y. J. Li, J. Peng. The cardioprotection of calcitonin gene-related peptide-mediated preconditioning. *Eur. J. Pharmacol.*, 2002, 442(3): 173–177
  91. S. Wolfrum, J. Nienstedt, M. Heidbreder, K. Schneider, P. Dominiak, A. Dendorfer. Calcitonin gene related peptide mediates cardioprotection by remote preconditioning. *Regul. Pept.*, 2005, 127(1–3): 217–224
  92. Q. J. Song, Y. J. Li, H. W. Deng. Early and delayed cardioprotection by heat stress

- is mediated by calcitonin gene-related peptide. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 1999, 359(6): 477–483
93. D. Li, et al. Calcitonin gene-related peptide-mediated cardioprotection of postconditioning in isolated rat hearts. *Regul. Pept.*, 2008, 147(1–3): 4–8
  94. G. W. Dorn II, T. Force. Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy. *J. Clin. Invest.*, 2005, 115(3): 527–537
  95. P. Ping, et al. Demonstration of selective protein kinase C-dependent activation of Src and Lck tyrosine kinases during ischemic preconditioning in conscious rabbits. *Circ. Res.*, 1999, 85(6): 542–550
  96. S. Wolfrum, K. Schneider, M. Heidbreder, J. Nienstedt, P. Dominiak, A. Dendorfer. Remote preconditioning protects the heart by activating myocardial PKC $\epsilon$ -isoform. *Cardiovasc. Res.*, 2002, 55(3): 583–589
  97. E. N. Churchill, D. Mochly-Rosen. The roles of PKC $\delta$  and  $\epsilon$  isoenzymes in the regulation of myocardial ischaemia/reperfusion injury. *Biochem. Soc. Trans.*, 2007, 35(5): 1040–1042
  98. K. Inagaki, et al. Inhibition of  $\delta$ -protein kinase C protects against reperfusion injury of the ischemic heart *in vivo*. *Circulation*, 2003, 108(19): 2304–2307
  99. C. Vahlhaus, R. Schulz, H. Post, R. Onallah, G. Heusch. No prevention of ischemic preconditioning by the protein kinase C inhibitor staurosporine in swine. *Circ. Res.*, 1996, 79(3): 407–414
  100. R. Brandman, M. H. Disatnik, E. Churchill, D. Mochly-Rosen. Peptides derived from the C2 domain of protein kinase C $\epsilon$  ( $\epsilon$ PKC) modulate  $\epsilon$ PKC activity and identify potential protein-protein interaction surfaces. *J. Biol. Chem.*, 2007, 282(6): 4113–4123
  101. G. W. Dorn II, D. Mochly-Rosen. Intracellular transport mechanisms of signal transducers. *Annu. Rev. Physiol.*, 2002, 64: 407–429
  102. G. J. Gross. The role of mitochondrial K<sub>ATP</sub> channels in cardioprotection. *Basic Res. Cardiol.*, 2000, 95(4): 280–284
  103. O. Oldenburg, et al. Bradykinin induces mitochondrial ROS generation via NO, cGMP, PKG, and mitoK<sub>ATP</sub> channel opening and leads to cardioprotection. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2004, 286(1): H468–H476
  104. S. Pasupathy, S. Homer-Vanniasinkam. Ischaemic preconditioning protects against ischaemia/reperfusion injury: Emerging concepts. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*, 2005, 29(2): 106–115
  105. Z. Lacza, J. A. Snipes, A. W. Miller, C. Szabó, G. Grover, D. W. Busija. Heart mitochondria contain functional ATP-dependent K<sup>+</sup> channels. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2003, 35(11): 1339–1347
  106. G. R. Gaudette, I. B. Krukenkamp, A. E. Saltman, H. Horimoto, S. Levitsky. Preconditioning with PKC and the ATP-sensitive potassium channels: A codependent relationship. *Ann. Thorac. Surg.*, 2000, 70(2): 602–608
  107. Y. Nozawa, T. Miura, T. Miki, Y. Ohnuma, T. Yano, K. Shimamoto. Mitochondrial K<sub>ATP</sub> channel-dependent and -independent phases of ischemic preconditioning against myocardial infarction in the rat. *Basic Res. Cardiol.*, 2003, 98(1): 50–58
  108. R. K. Kharbanda, T. T. Nielsen, A. N. Redington. Translation of remote ischaemic preconditioning into clinical practice. *Lancet*, 2009, 374(9700): 1557–1565
  109. S. Reardon. Electroceuticals spark interest. *Nature*, 2014, 511(7507): 18
  110. M. Tirrell. GlaxoSmithKline's big bet on electroceuticals. CNBC News, 2015-03-11. <http://www.cnbc.com/2015/03/11/glaxosmithklines-big-bet-on-electroceuticals.html>