

促红细胞生成素对兔心肌缺血/再灌注损伤保护作用的研究

庞英 马建群 梁明亭

【摘要】 目的 建立兔心肌缺血/再灌注损伤(I/R)模型,观察促红细胞生成素(EPO)对兔血清CK-MB浓度及心肌细胞凋亡的影响,探讨EPO对兔心肌I/R的保护作用及机制。方法 新西兰大白兔16只,随机分为I/R组和EPO组。结扎兔左冠状动脉前降支制备兔I/R模型。EPO组于结扎左冠状动脉前降支的同时经耳缘静脉注入重组EPO,I/R组注入等量的生理盐水。检测指标:(1)分别于缺血前5 min、缺血60 min、再灌注60 min和再灌注180 min检测血清CK-MB浓度。(2)再灌注180 min时取缺血区心肌组织,检测凋亡指数。(3)制作心肌组织标本,观察心肌组织的病理变化。结果 血清CK-MB浓度随缺血及再灌注时间的延长而增加(与前一时间点比较, $P < 0.01$);缺血前EPO组与I/R组血清CK-MB浓度无统计学差异($P > 0.05$);缺血60 min、再灌注60 min、再灌注180 min时,EPO组血清CK-MB浓度均显著低于I/R组(均 $P < 0.01$)。与I/R组相比,EPO组的缺血区心肌细胞的凋亡指数显著下降($P < 0.01$)。结论 EPO对兔心肌I/R具有明显的保护作用,其机制可能与稳定心肌细胞膜结构,减少心肌酶的释放和抑制心肌细胞凋亡有关。

【关键词】 红细胞生成素; 再灌注损伤; 细胞凋亡; 肌酸激酶,MB型

Protective effect of erythropoietin on myocardial ischemia/reperfusion injury in rabbits PANG Ying, MA Jian-qun, LIANG Ming-ting. Department of Cardiology, People's Hospital of Liaocheng, Liaocheng 252000, China
Corresponding author: PANG Ying, Email: piaoyang523@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the influence of Erythropoietin on cardiac myocyte apoptosis and CK-MB level in myocardial ischemia/reperfusion (I/R) injury of rabbit, and to explore the protective effects of Erythropoietin and its mechanisms. **Methods** Sixteen New Zealand rabbits were randomly divided into two groups: I/R injury group (C) and Erythropoietin group (EPO group). Rabbits were subjected to descending coronary artery (LAD) occlusion to establish rabbit myocardial I/R injury models. When the LAD was ligated, recombinant human Erythropoietin (rhEPO) was injected in EPO group by ear vein, I/R group were injected saline equivalently. Observing indexes: (1) testing the serum concentration of CK-MB at 5 min before occlusion, 60 min after occlusion, 60 min and 180 min after reperfusion. (2) testing the apoptotic index of the corresponding ischemic myocardium myocardial cell at 180 min after reperfusion, observing the general myocardial tissue morphosis organizational structure by light microscope. **Results** The serum CK-MB concentration increased gradually with the ischemia and reperfusion time ($P < 0.01$). Before ischemia, the serum CK-MB concentrations had no significant difference between EPO group and the I/R group ($P > 0.05$). The CK-MB concentrations in EPO group were markedly lower comparing with the I/R group at 60 min after ischemia, 60 min and 180 min after reperfusion (all $P < 0.01$). Compared with the I/R group, the apoptotic index of ischemic zone in EPO group decreased significantly ($P < 0.01$). **Conclusions** EPO has clear protective effects on the myocardial I/R injury in rabbits. The mechanisms of its cardioprotection may be associated with stabilizing the myocardium cell membrane structure to decrease the release of myocardial enzyme and to inhibit cardiac myocyte apoptosis.

【Key words】 Erythropoietin; Reperfusion injury; Apoptosis; Creatine kinase, MB form

冠心病的发病率逐年上升,目前在各类心血管疾

病中居首位,在人口死亡原因中居第二位^[1]。根据世界卫生组织研究报告:冠心病将成为2020年世界上发病率和死亡率均居首位的疾病,将成为全球医疗健康事业的首要负担^[2]。溶栓、经皮冠状动脉介入治疗和冠状动脉旁路移植术等再灌注疗法通过恢复缺血区的

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2012.05.011

作者单位:252000 山东省,聊城市人民医院心内科(庞英、梁明亭);滨州医学院附属医院心内科(马建群)

通讯作者:庞英,Email:piaoyang523@163.com

供血能有效地挽救缺血心肌组织、减少梗死面积和住院病死率,是目前治疗心肌缺血和梗死的最有效措施。但大量的相关研究表明,经历一定时间缺血后心肌组织再恢复血流供应时可能出现缺血性损伤进一步加重的现象,此种现象被称为缺血再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)损伤。促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)是细胞生长因子超家族成员之一,广泛分布于人体内各个系统,具有多种与促造血作用无关的非造血生物学作用,具有潜在的组织细胞保护作用,本研究主要探讨EPO对I/R损伤心肌细胞的保护作用及其相关机制,从而为EPO在心血管疾病临床应用方面提供理论依据。

材料与方法

一、实验动物与分组

新西兰大白兔16只,雄性,体重 (2.0 ± 0.2) kg[山东省农科院提供,合格证号SCXK(鲁)20040013]。适应性喂养1周后,根据体重编号,按随机数字表法分为心肌I/R组和EPO组,每组8只。

二、模型制作

将兔用3%戊巴比妥钠(1 ml/kg)经耳缘静脉麻醉后,与心电图机连接,暴露颈静脉以备抽血用。保持兔自然呼吸状态,胸前区备皮并消毒。沿胸骨正中线切开皮肤,切断肌肉附着处并向左游离肌肉至暴露左侧肋骨。确认好2、3、4肋骨,于胸骨左缘约1 cm处每根肋骨下穿双线后,把两线分开向相反的方向牵拉,拉开肋骨上附着的薄层肌肉并结扎肋骨,从两线结扎中央剪断肋骨开胸。开胸后用小止血钳提起心包,将其缝置于两侧胸壁上,从中间剪开制作心包吊篮,将心脏提起。用棉棒将心脏逆时针转位以充分暴露左冠状动脉前降支,用3-0缝合线穿绕前降支中上1/3处放置硅胶管后一起结扎。心电图上显示ST段明显弓背向上抬高(≥ 0.2 mV),其供血区心肌颜色变暗。60 min后剪断结扎线取出硅胶管,恢复前降支血流,心电图显示ST段回落1/2以上,标志为再灌注成功,再灌注180 min。

三、标本留取

分别在缺血前、缺血60 min、再灌注60 min和再灌注180 min时抽取静脉血2 ml,静置后4℃离心(3000 r/min)15 min,取上清液测定血清肌酸激酶同工酶(CK-MB)的含量。实验结束后均取结扎线下1 mm相同部位缺血区心肌组织置于10%的中性甲醛中固定,石蜡包埋并切片,行TUNEL方法检测缺血区心肌细胞的凋亡指数。另取相同部位大小约1 mm × 1 mm × 1 mm的缺血区心肌组织块,放入预冷的2.5%

的戊二醛中4℃固定,待制作光镜标本。

四、统计学分析

结果以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,其中血清CK-MB值采用重复测量资料的方差分析,心肌细胞凋亡指数采用单因素方差分析,运用SPSS 13.0软件处理数据。以 $P < 0.05$ 为差异显著,以 $P < 0.01$ 为差异非常显著,均有统计学意义。

结 果

1. 兔心肌缺血再灌注过程中的心电图变化:持续心电监测并记录肢体II导联心电图,可见结扎兔冠状动脉左前降支后,与缺血前(图1)相比,肢体II导联ST段迅速弓背向上抬高(图2);于缺血60 min时可见抬高的ST段与QRS波群融合,呈垛型(图3);再灌注后ST段下降($\geq 1/2$),可见再灌注性心律失常(室性心动过速)(图4),标志再灌注成功;再灌注60 min时ST段下降明显,并出现病理性Q波;再灌注180 min时ST段已基本降至等电位线,T波倒置,病理性Q波持续存在。

2. 病理改变:光镜下可见I/R组大量心肌细胞空泡变性,心肌组织水肿,较多的心肌凋亡细胞表现为细胞核浓缩、变小,胞浆嗜酸性变、红染,细胞膜结构相对完整,大量炎性细胞浸润等特征,正常心肌细胞存活明显比EPO组少(图5)。EPO组少量心肌细胞空泡变性,心肌组织水肿轻,偶见心肌凋亡细胞,少见炎性细胞浸润,大量正常心肌细胞尚存,病变程度较I/R组明显减轻(图6)。

3. 各组血清CK-MB浓度的变化:I/R组与EPO组血清CK-MB浓度随缺血及再灌注时间的延长而增加,差异有统计学意义(与前一时间点比较, $P < 0.01$);缺血前EPO组与I/R组血清CK-MB浓度比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);缺血60 min、再灌注60 min、再灌注180 min时,EPO组血清CK-MB浓度均显著低于I/R组,差异有统计学意义(均 $P < 0.01$)(图7,表1)。

4. TUNEL法检测心肌细胞凋亡结果:TUNEL结果显示,凋亡心肌细胞的胞核呈深棕(褐)色,多位于梗死区中心及周边,正常心肌细胞胞核为蓝色。I/R组心肌中可见大量凋亡的心肌细胞,心肌细胞凋亡指数为 $52.91\% \pm 6.83\%$ (图8),EPO组心肌凋亡细胞较I/R组明显减少,其心肌细胞凋亡指数为 $34.76\% \pm 8.35\%$ (图9),较I/R组显著降低,差异有统计学意义($P < 0.01$)(表2)。说明EPO可以抑制心肌I/R损伤所致的心肌细胞凋亡。

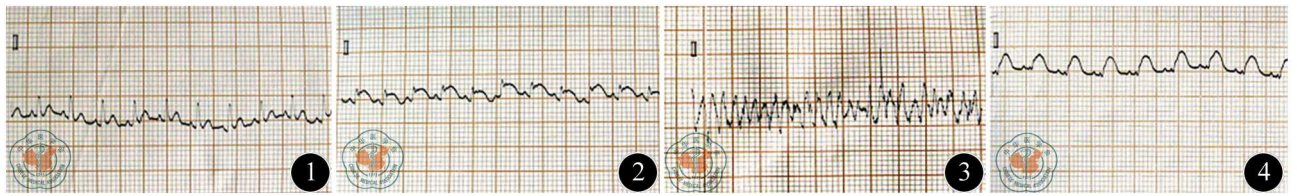


图1 正常心电图 图2 缺血5 min心电图 图3 缺血60 min心电图 图4 再灌注性心律失常(室性心动过速)

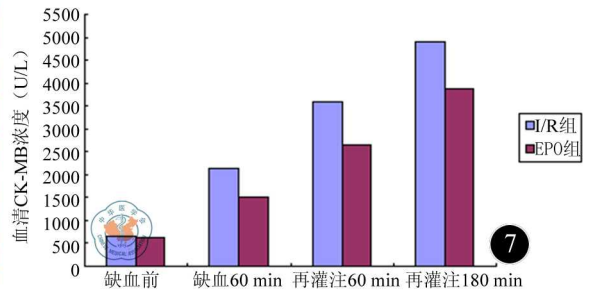
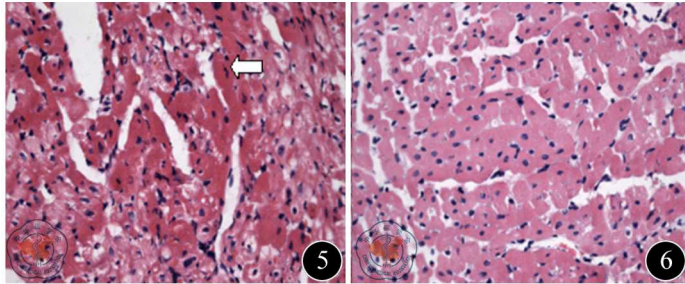


图5 I/R组心肌HE染色(×400)示心肌组织细胞水肿、空泡样变性,中性粒细胞浸润,大量胞质嗜酸性均质红染细胞均为凋亡的心肌细胞,“⇨”所示核碎裂 图6 EPO组心肌HE染色(×400) 图7 血清CK-MB浓度变化

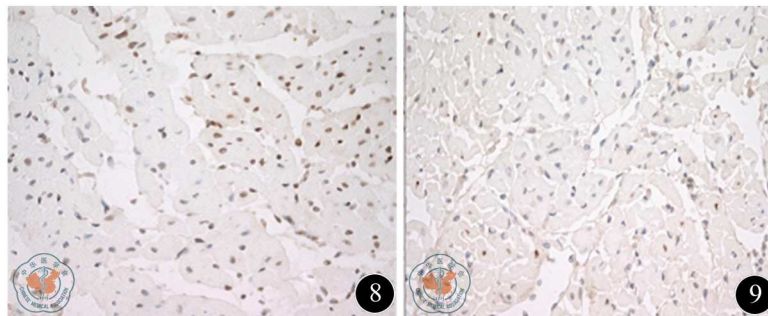


图8 I/R组TUNEL阳性细胞较多(×400) 图9 EPO组TUNEL阳性细胞明显减少(×400)

表1 两组血清CK-MB浓度变化(U/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	缺血前	缺血60 min	再灌注60 min	再灌注180 min
I/R组	660.08 ± 148.86	2142.68 ± 197.84 ^a	3585.03 ± 371.40 ^a	4910.63 ± 298.83 ^a
EPO组	628.16 ± 159.90	1519.94 ± 220.95 ^{ab}	2654.94 ± 92.59 ^{ab}	3887.11 ± 155.79 ^{ab}

注:与前一时间点相比,^a $P < 0.01$;与同时段对照组相比,^b $P < 0.01$

表2 两组之间心肌凋亡指数的比较(% $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	心肌细胞凋亡指数
I/R组	8	52.91 ± 6.83
EPO组	8	34.76 ± 8.35 ^a

注:与I/R组相比,^a $P < 0.01$

讨论

1. EPO与心肌I/R损伤:减少组织器官缺血性损伤的最有效方法是尽快恢复其再灌注,但较长时间缺血后的再灌注却可导致更为严重的损伤,即I/R损伤。心肌I/R损伤会引起再灌注性心律失常主要为室性心动过速及心室颤动,心肌收缩、舒张功能障碍,心肌细胞坏死、凋亡等;其机制复杂,涉及多个环节,随着对心肌I/R损伤研究的深入,越来越多的证据显示了细胞凋亡是造成损伤的重要机制之一^[3],抑制细胞凋亡可

预防I/R损伤,现已引起广大基础和临床研究者的关注。

EPO是一种刺激骨髓造血的糖蛋白类激素,天然存在的EPO主要来源于肾脏及胎肝,有 α 和 β 两种类型,由193个氨基酸组成,分子量为34 kDa。成人EPO主要由肾脏皮质髓质交界处的肾小管旁细胞分泌。EPO在体内不能储存,主要由血氧含量的变化来调节其生成。EPO作为一种新的细胞保护剂,正在引起广泛兴趣,有关EPO治疗心肌梗死效果的动物实验结果表明,EPO治疗可以改善心脏功能,减小梗死面积和增加毛细血管密度^[4]。由此可见,EPO具有很高的研究价值,本实验则主要探讨了EPO对I/R损伤的保护作用。

2. EPO稳定I/R损伤心肌细胞膜结构,减轻病理形态学的损伤:心肌病理形态学变化是反映缺血性损伤最直观指标,而心肌病理程度的改善则是反映药

物治疗缺血性损伤有效性的直接证据。本实验显示:光镜下可见:I/R组大量心肌细胞空泡变性,心肌组织水肿,较多的心肌凋亡细胞表现为细胞核浓缩、变小、胞质嗜酸性变、红染、细胞膜结构相对完整,大量炎性细胞浸润等特征,正常心肌细胞存活明显比EPO组少。EPO组少量心肌细胞空泡变性、心肌组织水肿轻,偶见心肌凋亡细胞,少见炎性细胞浸润,大量正常心肌细胞尚存,病变程度明显小于I/R组。以上所述均表明EPO能维护心肌组织细胞大体形态结构的完整性,对I/R损伤心肌细胞有保护作用。

3. EPO对I/R损伤细胞凋亡的影响:新近研究发现,EPO是细胞生长因子超家族成员之一,广泛分布于人体内各个系统,具有多种与促造血作用无关的非造血生物学作用,具有潜在的组织细胞保护作用,广泛地应用于神经系统和心血管系统疾病的细胞保护^[5-7]。但EPO对心肌细胞的抗凋亡作用研究尚少。本实验采用TUNEL检测法直接显示I/R损伤中凋亡心肌细胞,结果表明:I/R损伤的心肌确实存在心肌细胞凋亡,与前人研究相符;I/R组心肌中可见大量凋亡的心肌细胞,心肌细胞凋亡指数为 $52.91\% \pm 6.83\%$,EPO组心肌细胞凋亡较I/R组明显减少,其心肌细胞凋亡指数为 $34.76\% \pm 8.35\%$,较I/R组显著降低,差异有统计学意义($P < 0.01$),初步表明EPO具有抗心肌细胞凋亡作用。

4. EPO对I/R损伤保护的可能机制:本实验EPO组与I/R组相比,EPO能维护心肌组织细胞大体形态结构及超微结构的完整性,缺血及再灌注后EPO组血清CK-MB浓度升高均显著降低,与I/R比较差异有统计学意义($P < 0.01$),EPO组心肌细胞凋亡指数较I/R组显著降低,表明EPO组心肌坏死程度较轻,减轻了心肌细胞膜的损伤,降低了心肌酶的释放,从而改善能量代谢障碍。由此可见,EPO对I/R损伤保护的机制可能与稳定心肌细胞膜结构,减少心肌酶的释放和抑制心肌细胞凋亡有关。而细胞凋亡涉及多种基因及其表达的复杂变化,其中,凋亡发生机制中最关键的环节之

一是Caspase家族的激活^[8],相关研究认为,EPO可能通过PI3K-Akt途径、一氧化氮途径及丝裂素激活的蛋白激酶-胞外信号调节激酶途径降低Caspase-3表达的信号通路^[9-10],从而起到抗心肌细胞凋亡的作用,由于凋亡和抗凋亡的信号转导途径众多且复杂,EPO对I/R损伤保护的机制还需更多更全面的研究来揭示。

参 考 文 献

- [1] 朱妙章,袁文俊,吴博威,等. 心血管生理学及临床. 北京:高等教育出版社,2004:3.
- [2] 和亚萍,黄瑞雯,魏盟,等. 强化随访对冠心病患者二级预防水平的作用[J/CD]. 中华临床医师杂志:电子版,2011,5:1412-1414.
- [3] Formigli L, Ibba-Manneschi L, Perna AM, et al. Ischemia-reperfusion-induced apoptosis and p53 expression in the course of rat heterotopic heart transplantation. *Microvasc Res*, 1998, 56:277-281.
- [4] Feagan BG, Wong CJ, Kirkley A, et al. Erythropoietin with iron supplementation to prevent allogeneic blood transfusion in total hip joint arthroplasty. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med*, 2000, 133:845-854.
- [5] Li F, Chong ZZ, Maiese K. Erythropoietin on a tightrope: balancing neuronal and vascular protection between intrinsic and extrinsic pathways. *Neurosignals*, 2004, 13:265-289.
- [6] Maiese K, Li F, Chong ZZ. New avenues of exploration for erythropoietin. *JAMA*, 2005, 293:90-95.
- [7] Savino R, Ciliberto G. A paradigm shift for erythropoietin: no longer a specialized growth factor, but rather an all-purpose tissue-protective agent. *Cell Death Differ*, 2004, 11 Suppl 1:S2-S4.
- [8] Wyllie AH. Apoptosis: cell death in tissue regulation. *J Pathol*, 1987, 153:313-316.
- [9] Takahashi K, Ohyabu Y, Schaffer SW, et al. Cellular characterization of an in-vitro cell culture model of seal-induced cardiac ischaemia. *J Pharmacology and Pharmacology*, 2001, 53:379-386.
- [10] Li J, Bombeck CA, Yang S, et al. Nitric oxide suppresses apoptosis via interrupting caspase activation and mitochondrial dysfunction in cultured hepatocytes. *J Biol Chem*, 1999, 274:17325-17333.

(收稿日期:2011-11-11)

(本文编辑:张岚)