

· 论 著 ·

超声微泡联合 EPO 对于急性心肌梗死后大鼠心肌保护作用的研究

郭 庆,任 豪

(重庆市第九人民医院老年科 400700)

摘要:目的 观察超声微泡联合促红细胞生成素(EPO)对大鼠急性心肌梗死后的心肌保护作用。方法 采用结扎冠状动脉前降支的方法建立大鼠心肌梗死模型。将 40 只成功制作模型的大鼠随机分为超声+微泡造影剂+EPO 组(A 组)、超声+微泡造影剂组(B 组)、单纯 EPO 组(C 组)、单纯手术组(D 组)。术后 7 d 各组随机选取 5 只大鼠,尾静脉抽血,采用 ELISA 法检测 TNF- α 、IL-6 的含量。术后 28 d 心肌组织 VIII 因子免疫组织化学染色并在显微镜下计数心肌内新生血管和凋亡蛋白 Bcl-2、Bax 免疫组化染色。采用 ELISA 检测心肌组织内 VEGF 蛋白表达情况。**结果** 与其他各组比较,A 组 TNF- α 、IL-6 表达降低,新生毛细血管数量最多,为 43 ± 4.7 条/每高倍视野,Bcl-2 表达上调,Bax 表达显著下调,VEGF 含量为 (6.34 ± 2.14) ng/g,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 超声微泡联合 EPO 能增强 EPO 促进毛细血管形成、抑制梗死周围区炎症反应及减少心肌细胞凋亡,从而达到改善急性心肌梗死后心脏功能的作用。

关键词:超声微泡;促红细胞生成素;心肌梗死

中图分类号:R365.542

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)10-1198-03

Protective effect of ultrasound targeted microbubbles destruction combined with EPO on rat myocardium after acute myocardial infarction

GUO Qing, REN Hao

(Department of Geriatric, Ninth People's Hospital of Chongqing City, Chongqing 400700, China)

Abstract: Objective To investigate the protective effects of ultrasound targeted microbubbles destruction (UTMD) combined erythropoietin (EPO) on rat myocardium after acute myocardial infarction (AMI). **Methods** Rat model of AMI were built by ligating the left anterior descending coronary artery. 40 rats were randomly divided into four groups: UTMD+EPO treatment group (A), UTMD only treatment group (B), EPO only treatment group (C) and surgery only group (D). On 7 d, serum TNF- α and IL-6 were detected by ELISA. On 28 d, microvessel density (MVD) was counted in high-power field (HPF) under microscope, Bcl-2, Bax were stained by immunohistochemistry. The VEGF expression in myocardium was detected by ELISA. **Results** As compared with control group, the levels of TNF- α , IL-6 in treatment group were obviously decreased ($P < 0.05$), the expression of Bcl-2 was increased, while Bax was decreased ($P < 0.05$). The capillary density in the peripheral zone of myocardial infarction was obviously increased (43 ± 4.7 /hp) ($P < 0.05$). The content of VEGF in myocardium was (6.34 ± 2.14) ng/g ($P < 0.05$). **Conclusion** UTMD + EPO can improve the cardiac function after AMI in rats through the pro-angiogenic, anti-inflammatory, and anti-apoptotic effects.

Key words: ultrasound microbubble; EPO; myocardial infarction

急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 在冠脉血运重建后心肌微血管无再流现象, 严重影响了 AMI 近、远期预后, 目前尚无十分理想的防治办法。AMI 治疗的主要目的是缩小梗死面积, 积极促进缺血区域血液再灌注, 抑制梗死区以及周围区域的炎症反应和心肌细胞凋亡等, 进一步改善梗死患者心脏功能^[1]。研究已经证明, 促红细胞生成素 (EPO) 及其受体在心血管系统有广泛表达, 通过对缺氧的调节、抗氧化、增强细胞抗凋亡能力、促进血管生成、抗炎等多种作用机制参与心肌保护。同时研究发现, 超声破坏微泡造影剂可刺激心肌内源性血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 增加, 促进梗死心肌血管新生。研究发现, 超声破坏微泡造影剂产生的生物学效应能够引发微血管破裂, 释放血管生长因子 (主要是 VEGF), 促进血管新生, 并且能够靶向作用于器官或细胞, 定位释放药物或基因, 从而实现靶向治疗。本研究拟观察超声微泡联合 EPO 对大鼠 AMI 后的心肌保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 选取健康雌性清洁级 SD 大鼠, 购自重庆医科大学实验动物中心, 体质量 (300 ± 25) g。超声微泡采用 Sonovue 溶液 (意大利博莱科公司产, 25 mg 粉剂加 5 mL 生理盐水混合摇匀)。微泡破裂触发由 HP Sonos 7500 型超声诊断仪, S4 探头, 频率 1.8/3.6 MHz 完成。

1.1.2 试剂与药品 肿瘤坏死因子- α (TNF- α , ELISA 试剂盒, 美国 Biosource 公司)、白介素-6 (IL-6, ELISA 试剂盒, 美国 Biosource 公司); Bcl-2 兔抗大鼠多克隆抗体 (美国 Santa Cruz 公司)、Bax 兔抗大鼠多克隆抗体 (美国 Santa Cruz 公司); 大鼠 VEGF 定量 ELISA 试剂盒 (北京尚柏生物公司), SABCD 通用型免疫组化检测试剂盒 (北京中杉金桥生物公司); EPO (3 000 u/支, 北京四环生物公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 大鼠 AMI 模型制作 采用结扎冠状动脉前降支的方

法建立大鼠心肌梗死模型。大鼠称重后,10%水合氯醛(0.3 mL/100 g)腹腔注射麻醉,仰卧位固定于动物实验手术台上。连接标准肢体导连心电图,采用无创法经口气管插管,动物呼吸机正压辅助呼吸,沿左侧胸骨旁线剪开,暴露 3~5 肋,进胸腔并剪开心包膜,暴露心脏,于左心耳下面结扎左冠状动脉前降支,并即刻观察心电图,出现 sT 段抬高和心肌结扎部位组织颜色变白作为确定心肌梗死模型复制成功的标志。

1.2.2 实验分组与处理 将成功制作模型的 40 只大鼠随机分为 4 组,A 组:超声+微泡造影剂+EPO;B 组:超声+微泡造影剂组;C 组:单纯 EPO 组;D 组:单纯手术组。每组 10 只,A 组和 C 组大鼠采用腹腔注射方法给予 EPO 3 000 u/kg,共 3 d(术前 1 d、当天、术后 1 d),A 组和 B 组大鼠经尾静脉注射微泡造影剂 0.5 mL,超声经胸壁辐照心肌,间歇作用 2 min,术前 1 d、当天、术后 1 d 共处理 3 次。

1.2.3 细胞炎症因子测定 术后 7 d 每组随机选取 5 只大鼠,用尾静脉抽血的方法抽取大鼠血液。采用酶联免疫方法(ELISA)检测血清 TNF- α 、IL-6 的含量,严格按照试剂盒说明书进行。

1.2.4 免疫组化染色 缺血区心肌组织毛细血管密度及 Bcl-2 和 Bax 表达水平均采用免疫组织化学染色法。术后 28 d 将两组大鼠处死,摘除心脏,10%甲醛固定。取左心室梗死及周围区组织常规石蜡包埋、切片、脱蜡,微波法抗原酶热修复、磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗后滴加正常兔血清封闭,20 min 后加一抗,4 $^{\circ}$ C 过夜;加羊抗兔抗体(二抗),室温孵育 20 min;DAB 显色后苏木素复染细胞核。阴性对照片染色不加一抗,其余步骤相同,毛细血管密度计算;在显微镜下计算梗死周边区毛细血管数量,每张切片随机取 5 个视野,并计算 5 个视野的毛细血管均数;凋亡蛋白表达水平测定,显微镜下每张切片随机观察 5 个视野($\times 400$),计数每个视野内 100 个细胞中 Bcl-2 和 Bax 染色阳性细胞,取其平均数作为其表达水平。心肌组织 VEGF 含量采用双夹心 ABC-ELISA 法测定,严格按照试剂盒说明书进行,在 492 nm 处测定 A 值,通过绘制标准曲线求出标本中心肌组织 VEGF 含量。

1.3 统计学方法 所有数据采用 SPSS13.0 统计软件处理,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示;两样本均数比较用配对检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 术后 7 d TNF- α 、IL-6 的血清浓度 见表 1。大鼠血清炎症因子检测结果显示,A 组 TNF- α 、IL-6 表达较其他组明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 术后 7 d TNF- α 、IL-6 的血清浓度比较($\bar{x} \pm s$,ng/g)

指标	A 组	B 组	C 组	D 组
TNF- α	55.5 \pm 58.0	86.1 \pm 67.3	62.3 \pm 65.5	99.7 \pm 18.0
IL-6	95.0 \pm 13.5	128.0 \pm 19.7	105.0 \pm 20.1	143.0 \pm 27.6

2.2 术后 28 d 免疫组化染色

2.2.1 毛细血管密度 在显微镜每高倍视野下计数新生血管数量,大鼠心肌梗死边缘区血管 VIII 因子免疫组化染色显示,A 组新生毛细血管数量最多,为 43 \pm 4.7 条/每高倍视野,B 组为 23 \pm 4.3 条/每高倍视野,C 组为 31 \pm 5.5 条/每高倍视野,D

组为 18 \pm 2.9 条/每高倍视野,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2.2 术后 28 d Bcl-2、Bax 表达水平 Bcl-2 和 Bax 阳性染色信号分别定位于细胞质和细胞核,阳性细胞主要为胞质或细胞核棕黄色颗粒着色。结果见表 2。

表 2 术后 28 d Bcl-2、Bax 阳性细胞数比较($\bar{x} \pm s$)

指标	A 组	B 组	C 组	D 组
Bcl-2	53.7 \pm 8.2	44.1 \pm 7.3	48.3 \pm 10.5	42.7 \pm 5.6
Bax	49.3 \pm 6.5	41.3 \pm 19.7	46.3 \pm 20.1	39.3 \pm 7.6

A 组 Bcl-2 表达上调、Bax 表达显著下调,与其他组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2.3 术后 28 d 心肌组织 VEGF 含量比较 A 组 VEGF 含量为(6.34 \pm 2.14)ng/g,B 组 VEGF 含量为(2.11 \pm 1.12)ng/g,C 组 VEGF 含量为(4.32 \pm 2.06)ng/g,D 组 VEGF 含量为(1.84 \pm 1.19)ng/g,A 组 VEGF 含量明显高于其他组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨 论

EPO 及 EPO 受体(erythropoietin receptor,EPOR)广泛分布于人类多种组织和器官,除造血功能外,还具有多种非造血作用,如抗凋亡、促血管生成、调节炎症以及促干细胞迁移等作用^[2]。尽管作用机制尚待明确,但陆续有关于 EPO 保护缺血性心血管疾病实验研究的报道,并认为调节炎症、抗凋亡以及促血管生成作用可能是 EPO 能够用于心脑血管疾病治疗的基础。在动物模型的研究已经发现,EPO 通过活化多种细胞内信号转导途径,增加心肌细胞及内皮细胞抗凋亡、抗炎症损害的能力,延缓细胞的衰老死亡进程。在减少缺血-再灌注及心肌梗死后面积,加快左室功能的恢复及防止心室重构等方面发挥重要的保护作用^[3]。虽然 EPO 具有一些显著的心肌保护作用,但它对心血管系统也有一些不利作用,如导致高血压和血栓形成等,有研究发现在 EPO 过表达的实验动物中出现心室壁增厚,心肌细胞水肿,心脏质量明显增加,还可出现心肌缺血,舒张功能不全,最终导致心功能衰竭^[4]。因此,为了减少其不良反应,提高药物在靶器官的浓度很有必要,新近研究提示,超声破坏微泡造影剂产生的生物学效应能够引发微血管破裂,诱导血管生长因子(主要是 VEGF)释放,促进血管新生,并且能够靶向作用于器官或细胞,定位释放药物或基因,从而实现靶向治疗。鉴于此,本研究采用 EPO 和超声微泡联合的方法,可减少用药量,以减少不良反应,同时增加其治疗效果。

已有研究报道,EPO 可产生抗凋亡心肌保护作用,EPO 组织保护作用可能与 PI3K/AKT、MAPK、JAK2 等信号通路有关,而这些信号分子均可激活 NF- κ B,NF- κ B 提前活化后可上调多种抗凋亡基因如 bcl-2、bcl-xl、XIAP、CIAP 等的表达,产生抗凋亡效应。Parsa 等^[5]在家兔心肌梗死前 24 h 用 EPO 预处理。心肌梗死 6 h 的心肌组织 TUNEL 凋亡分析发现,与对照组比较,EPO 预处理组 TUNEL 阳性细胞明显减少(13.8 \pm 2.0)%vs(29.3 \pm 3.3)%,该研究结果表明,EPO 可以抑制损伤后的心肌细胞凋亡,对心肌具有保护作用。本研究结果显示,A 组对 bcl-2 表达上调、Bax 表达下调最明显,说明 EPO 和超声微泡联合应用能增强 EPO 抗凋亡效应。

EPO 能减少许多致炎因子的释放,减轻炎症细胞的浸润,

从而发挥重要的抗炎作用。Villa 等^[6]报道 EPO 能显著减少脑梗死区内的致炎因子如 TNF- α 、IL-6 等的释放, Qin 等^[7]报道 EPO 预处理可抑制缺氧复氧损伤后心肌细胞 TNF- α mRNA 及基因表达。而超声破坏微泡造影剂产生的生物学效应能够引发微血管破裂, 诱导血管生长因子(主要是 VEGF) 释放, 促进血管新生。本研究结果显示, A 组术后炎症因子表达水平下降, 毛细血管密度明显增加, 这与 VEGF 的表达量是一致的, 提示 VEGF 可促进内皮细胞增殖, 有利于血管的生成。虽然单纯超声辐照微泡亦可促进 VEGF 分泌及血管新生, 但新生血管数量有限, 且对组织会产生机械损伤等不良反应。

综上所述, 超声微泡联合 EPO 能够增强 EPO 抑制炎症反应, 调节 Bax/Bcl-2 比值抗心肌凋亡、增加毛细血管密度等作用可保护受损心肌, 达到改善 AMI 后心脏功能的作用。此方法安全、简单, 可减少用药量及超声辐照强度及时间, 有望实现心肌血管新生和组织修复, 改善缺血器官功能, 为缺血性疾病的治疗开辟新的路径。

参考文献:

- [1] 陈嘉瑜, 张祥忠. 骨髓间质干细胞促进急性心肌梗死大鼠的血管新生及其抗纤维化作用[J]. 广东医学, 2008, 29(4):688.
- [2] Wu H, Lee SH, Gao J, et al. Inactivation of erythropoietin

leads to defects in cardiac morphogenesis[J]. Development, 1999, 126:3597.

- [3] Mocini D, Leone T. Structure, production and function of erythropoietin: implications for therapeutical use in cardiovascular disease. [J]. Curr Med Chem. 2007, 14(21): 2278.
- [4] Deten A, Shibata J, Scholz D, et al. Norepinephrine-induced acute heart failure in transgenic mice overexpressing erythropoietin[J]. Cardiovasc Res, 2004, 61(1):105.
- [5] Parsa C, Matsumoto A, Kim J, et al. A novel protective effect of erythropoietin in the infarcted heart[J]. J Clin Invest, 2003, 112(7):999.
- [6] Villa P, Bigini P, Mennini T, et al. Erythropoietin selectively attenuates cytokine production and inflammation in cerebral ischemia by targeting neuronal apoptosis[J]. J Exp Med, 2003, 198(6):971.
- [7] Qin C, Xiao YB, Chen L, et al. Protective effects of erythropoietin pretreatment on myocardium with hypoxia/reoxygenation injury in rats[J]. J Med Coll PLA, 2004, 19(6):329.

(收稿日期:2009-09-16 修回日期:2009-11-18)

(上接第 1197 页)

访。如发现复发者, 须再次手术。迄今仅有 1 例 FNH 切除后复发的报道^[12]。本组 25 例术后随访至今均健在, 未发现肿瘤复发。

参考文献:

- [1] DiCarlo I, Urrico GS, Ursino V, et al. Simultaneous occurrence of adenoma, focal nodular hyperplasia, and hemangioma of the liver: are they derived from a common origin [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2003, 18: 227.
- [2] Porayko MK, Choudhary C. Benign neoplasms of the liver [J]. Curr Treat Options Gastroenterol, 2001, 4:479.
- [3] Becker YT, Raiford DS, Webb L, et al. Rupture and hemorrhage of hepatic focal nodular hyperplasia [J]. Am Surg, 1995, 61:210.
- [4] 吴孟超. 肝脏外科学[M]. 2 版. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2000. 386.
- [5] Fukukura Y, Nakashima O, Kusaba A, et al. Angioarchitecture and blood circulation in focal nodular hyperplasia of the liver[J]. J Hepatol, 1998, 29:470.
- [6] Mathieu D, Kobeiter H, Cherqui D, et al. Oral contraceptive in take in women with focal nodular hyperplasia of the liver[J]. Lancet, 1998, 352:1679.

- [7] 林川, 耿利, 陈汉, 等. 肝脏局灶性结节性增生 48 例临床分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2004, 26(9):567.
- [8] Nguyen BN, Flejou JF, Terris B, et al. Focal nodular hyperplasia of the liver: a comprehensive pathologic study of 305 lesions and recognition of new histologic forms[J]. Am J Surg Pathol, 1999, 23:1441.
- [9] 徐爱民, 程红岩, 陈栋, 等. 肝脏局灶性结节增生的螺旋 CT 平扫及 3 期增强扫描[J]. 中华肿瘤杂志, 2001, 23(5):409.
- [10] Fabre A, Auder P, Vilgrain V, et al. Histologic scoring of liver biopsy in focal nodular hyperplasia with a typical presentation [J]. Hepatology, 2002, 35:414.
- [11] Hardwigsen J, Pons J, Veit V, et al. A life threatening complication of focal nodular hyperplasia [J]. J Hepatol, 2001, 35:310.
- [12] Sadowski DC, Lee SS, Wanless IR, et al. Progressive type of focal nodular hyperplasia characterized by multiple tumor and recurrence [J]. Hepatology, 1995, 21:970.
- [13] 沈英皓, 樊嘉, 吴志全, 等. 肝脏局灶性结节性增生 60 例临床分析[J]. 中华普通外科杂志, 2005, 20(7):397.

(收稿日期:2009-09-18 修回日期:2009-10-09)