

· 论 著 ·

HGF 抑制急性心肌梗死后心肌氧化损伤的实验研究

袁侨英, 司良毅, 李学军

(第三军医大学西南医院老年科, 重庆 400038)

摘要:目的 观察肝细胞生长因子(HGF)抑制急性心肌梗死后心肌氧化损伤的作用,并探讨其可能的机制。**方法** 结扎犬冠状动脉前降支制造心肌梗死模型,给予心肌内注射 HGF 裸质粒干预。4 周后,测定 HGF 在心肌的表达,测量心脏质量指数、心肌及血液中总超氧化物歧化酶(SOD)、铜锌-超氧化物歧化酶(CuZn-SOD)活性,血液过氧化氢(H_2O_2)含量,并与假手术组比较。**结果** 心肌梗死组(M组)大鼠右室心脏质量指数(RVWI)、左室心脏质量指数(LVWI)升高($P<0.01$),心肌、血液中 SOD 及 CuZn-SOD 活性下降, H_2O_2 含量升高($P<0.01$)。HGF 组较 M 组 RVWI、LVWI 下降($P<0.01$),血清和心肌 SOD 及 CuZn-SOD 活性升高, H_2O_2 含量下降。**结论** HGF 改善急性心肌梗死后心室重塑和心功能,可能与其提高 SOD 活性抗氧化损伤有关。

关键词: HGF; 心肌梗死; SOD 活性; 抗氧化损伤; 心室重塑**中图分类号:** R542.22**文献标识码:** A**文章编号:** 1671-8348(2010)11-1370-02

Experimental study of abating oxidative damage after acute myocardium infarction by HGF

YUAN Qiao-ying, SI Liang-yi, LI Xue-jun

(Department of Geriatrics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of HGF abating oxidative damage after myocardium infarction and the possible mechanisms. **Methods** HGF was given to the dogs with myocardial infarction by left anterior descending coronary artery ligation. After 4 weeks, expression of HGF was observed. The activity of superoxide dismutase (SOD) and copper-zinc SOD (CuZn-SOD) in left ventricular and hydrogen peroxide (H_2O_2) in serum were measured. Cardiac remodeling was observed through right ventricular weight index (RVWI), left ventricular weight index (LVWI). **Results** In the dog model of myocardial infarction, The activity of SOD, CuZn-SOD in left ventricular decrease and H_2O_2 in serum increased. HGF gene therapy can simultaneously attenuate RVWI, LVWI ($P<0.01$), enhance SOD, CuZn-SOD activity and decrease content of H_2O_2 in serum ($P<0.01$). **Conclusion** The HGF gene can enhance activity of SOD, CuZn-SOD and improve cardiac remodeling after acute myocardial infarction.

Key words: HGF; myocardium infarction; SOD; oxidative damage; cardiac remodeling

心肌梗死(MI)后 Ang II 过度激活,作用于心肌细胞及间质,自由基如超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)、过氧化氢(H_2O_2)产生增加,对心脏功能产生有害作用,也参与增生肥大形成重塑,影响心肌的收缩、舒张功能;增加氧化应激使 H_2O_2 产生增加,促进肾上腺素、醛固酮释放,引起心功能异常^[1]。增强超氧化物歧化酶(SOD)活性,减少 MI 后自由基生成、抑制心肌氧化损伤有助于改善 MI 后心室重塑和心功能。研究表明,肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)具有多种心脏保护作用^[2-3],抑制氧化损伤可能系其机制之一。本实验用 HGF 干预犬急性心肌梗死(AMI)模型,观察其抑制 MI 后心室重塑及心肌氧化损伤的作用,为利用 HGF 治疗 AMI 后心功能不全提供实验依据。

1 材料与方

1.1 实验仪器与材料 犬由重庆医科大学动物中心提供。大量质粒抽提试剂盒购于 TaKaRa 公司(Japan)。HGF ELISA 检测试剂盒购于中杉金桥公司。SOD 及铜锌-超氧化物歧化酶(CuZn-SOD)活性测定试剂盒、 H_2O_2 测定试剂盒购于南京建成生物工程研究所。FA1104 电子天平(精确到 0.000 1 g)购于上海精密科学仪器公司。

1.2 HGF 裸质粒扩增及抽提 pcDNA3.0-HGF 质粒含人全长肝细胞生长因子蛋白表达基因序列,将 HGF 质粒用氯化钙进行化学转化,细菌转化后挑单一菌落接种于含氨苄青霉素的 5 mL LB 液体培养基中,温和振荡摇菌(37 °C、150 r/min)12 h。收集菌液按照试剂盒说明书抽提质粒,酶切电泳鉴定证实

为所需质粒无误后行菌种的大量培养扩增。大量抽提质粒,纯化去除污染和毒素;酶切鉴定证实为 HGF 质粒后溶解在生理盐水中备用,浓度为 1.0 mg/mL。

1.3 动物模型的建立 实验动物经 3% 的戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔麻醉后,取右侧卧位于手术台上,常规消毒铺单,行气管插管术,连接小动物呼吸机正压通气辅助呼吸,潮气量 25~30 mL/100 g 体重,呼吸频率 16~20 次/min,吸呼比 1:1。取胸骨正中切口开胸暴露心脏,剪开心包悬吊做心包吊床,在左室前下壁分离左冠状动脉前降支第一对角支,用 4-0 无创缝合丝线结扎冠脉第一对角支以下 0.5 cm 处,造成左室前壁和心尖部缺血,结扎后观察室壁颜色和 ECG,若结扎区室壁变白,心电图 ST 段弓背抬高即判定为结扎成功。假手术组动物只穿线不结扎。

1.4 HGF 基因注射过程 在建立犬 AMI 动物模型后,随机分为 3 组($n=5$),分别为假手术组(S组)、MI 组(M组)、MI+HGF 治疗组(HGF 组)。HGF 组在 MI 区域(左室前下壁及心尖)分 5 点进行心肌内注射 HGF 基因,每点注射 200 μ L(共 1 000 μ g 基因);待心跳稳定后,逐层缝合心包、胸壁,排气关胸。4 周后摘取心脏,送液氮保存。

1.5 心肌形态观察 解剖心脏,肉眼大体观察有无心肌撕裂、穿孔、血肿等,HE 染色光镜下观察心肌病理形态及微细结构的改变。

1.6 心脏质量指数测定 洗净心脏,沿室间沟切开左室(包括室间隔),右室,吸干水分,用 FA1104 电子天平测量各部分质

量。公式:左室心脏质量指数(LVWI)=左室心脏质量/体质量,右室心脏质量指数(RVWI)=右室心脏质量/体质量。计算左、右室心脏质量指数。

1.7 心肌 SOD、CuZn-SOD 活性及血清 H₂O₂ 含量测定 用黄嘌呤氧化酶法测定血清、心肌 SOD 及 CuZn-SOD 活性; H₂O₂ 与钼酸作用生成络合物,以比色法测定血清 H₂O₂ 含量。

1.8 统计学方法 数值采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SAS6.12 统计软件分析,两组间行 *t* 检验,多组间用方差分析作 *q* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 质粒抽提结果 经细菌培养扩增,抽提的 HGF 质粒 DNA 经 Apa I 酶切、电泳,得其酶切鉴定图谱。经 Apa I 酶切后质粒 DNA 线性化,显示一条带,其大小为 7.6 kb(对照为 Marker),均符合 pcDNA3.0-HGF 的长度,纯化去除污染和毒素。

2.2 大体病理观察 术后 4 周 LAD 结扎部位以下,MI 模型犬均见沿左室前降支走行的左室心肌呈灰白色,形状不规则;除 S 组外,其他各组动物均可见手术部位心包粘连。MI 模型犬均形成透壁性心肌梗死,累及左室游离壁大部分,梗死区心肌为灰白色菲薄瘢痕组织代替,质硬。S 组心脏形态正常。

2.3 心肌 HE 染色光镜下观察 (1)M 组:梗死区心肌细胞和间质组织均发生凝固性坏死,伴有较广泛肌溶解及心肌细胞空泡变性,坏死心肌细胞被嗜伊红浓染的纤维组织替代,交界区心肌呈现液化性肌溶解表现,心肌细胞坏死、消失;另有部分心肌细胞增生肥大,伴有大量炎症性细胞浸润。(2)S 组:心肌纤维结构清楚,排列整齐,无心肌细胞和间质组织坏死,无炎症细胞浸润和大小血管增生。(3)HGF 组:所有标本均可见明显梗死区,交界区见心肌细胞肥大增生,纤维增生较明显、排列紊乱,心肌间质内有较多淋巴细胞浸润,非梗死区心肌细胞代偿性肥大。

2.4 HGF 对心室重塑的影响 M 组与 S 组相比,LVWI、RVWI 升高(*P* < 0.01),与 M 组相比,HGF 组 LVWI、RVWI 降低(*P* < 0.01)。见表 1。

表 1 HGF 对左室重塑的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

指标	S 组	M 组	HGF 组
LVW(g)	70.20±6.7	84.80±8.6*	77.50±11.2▲
RVW(g)	12.20±1.9	15.20±1.8*	14.20±1.7▲
LVWI(g/kg)	4.92±0.62	7.72±1.18*	6.51±1.08▲
RVWI(g/kg)	0.82±0.04	1.35±0.15*	1.28±0.18▲
BW(kg)	14.70±3.2	11.50±2.9	11.90±3.3

与 S 组比较,* :*P* < 0.01;与 M 组比较,▲ :*P* < 0.05。

表 2 HGF 对血清和心肌 SOD、CuZn-SOD 活性及血清 H₂O₂ 含量的影响($\bar{x} \pm s$)

指标	S 组	M 组	HGF 组
血清 SOD(U/mL)	545±135	374±79 [#]	415±97*
血清 CuZn-SOD(u/mL)	288±54	165±43 [#]	205±56*
心肌 SOD(U/mL)	369±74	232±45 [#]	293±70*
心肌 CuZn-SOD(u/mL)	256±478	127±38 [#]	184±41*
血清 H ₂ O ₂ (mmol/L)	28.5±6.2	46.9±9.1 [#]	32.7±7.2*

与 S 组比较,[#] :*P* < 0.01;与 M 组比较,* :*P* < 0.01。

2.5 HGF 对血清和心肌 SOD、CuZn-SOD 活性及血清 H₂O₂ 含量的影响 M 组心肌、血清 SOD 及 CuZn-SOD 活性降低(*P* < 0.01),血清 H₂O₂ 含量升高(*P* < 0.01);HGF 组较 M 组心肌、血清 SOD 及 CuZn-SOD 活性升高(*P* < 0.01),H₂O₂ 含量下降(*P* < 0.01)。见表 2。

3 讨 论

氧自由基可以攻击生物膜,引发脂质过氧化,损伤内皮细胞,参与动脉粥样硬化、缺血性心肌疾病的整个病理生理病程。O₂⁻ 自由基的金属酶有保护细胞膜及脏器不受自由基损伤的生理功能,保护细胞,对抗氧自由基的毒性、调节 H₂O₂ 浓度。研究表明,SOD 也具有抗炎活性,能够改善心肌能量代谢,保护左室功能,可改善缺血时左室收缩及舒张功能。SOD 活性降低是自由基损伤血管内皮细胞、心肌细胞的重要因素。

心肌缺血时自由基生成增加,动物实验表明急性心肌梗死后 15 min 氧自由基即明显增加,引发心肌产生补体与炎性反应损伤心肌^[4-5],使心肌舒缩功能下降,参与心力衰竭的形成、发展。近年研究发现,HGF 是一种多功能因子,对多种组织器官的生长发育有重要的生理调节功能,可以通过抗细胞凋亡,促进组织细胞的发生、生存和再生,刺激新生血管生成,抗纤维化,减轻心肌缺血再灌注损伤等多种功能,发挥多种有益的心血管保护作用,对心肌缺血有治疗作用^[6-7]。

直接注射 HGF 蛋白能减少梗死面积和改善心脏功能,而阻断内源性 HGF 表达,导致梗死面积扩大,表明 HGF 对缺血性 MI 的治疗效果是通过保护心肌细胞和促进血管的形成实现的。本实验发现,HGF 质粒能够在缺血心肌中很好的表达,HGF 改善心室重塑和心功能的同时,血清 H₂O₂ 含量降低,心肌及血清 SOD 活性升高,提示 HGF 改善心功能的机制还可能与其增强 SOD 活性、抑制氧化损伤相关。

总之,HGF 提高血液及心肌局部 SOD、CuZn-SOD 活性,使 O₂⁻ 和 H₂O₂ 生成减少,抑制 AMI 后心肌氧化损伤,改善心室重塑和心功能。

参考文献:

[1] Lucchesi BR. Myocardial reperfusion injury role of free radicals and mediators of inflammation. Heart physiology and pathophysiology [M]. 4th ed. San Diego: Academic Press,2001:1181.

[2] Huang N. ESR measurement of oxygen free radical generation in ischemic reperfused myocardium and scavenging effect of some drugs, and Japan-China Bilateral ESR symposium(abstracts) [M]. Japan, Kyoto, 1989:107.

[3] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis an update [J]. N Eng J Med,1986,314:488.

[4] Ahmet I, Sawa Y, Yamaguchi T, et al. Gene transfer of hepatocyte factor improves angiogenesis and function of chronic ischemic myocardium in canine heart [J]. Ann Thorac Surg,2003,5(4):283.

[5] Cartwright JE, Tse WK, Whitley GS, et al. Hepatocyte growth factor induced human trophoblast motility involves phosphatidylinositol-3-kinase, mitogen activated protein kinase, and inducible nitric oxide synthase [J]. Experimental Cell Res,2002,279:219.

[6] Nakamura T, Mizuno S, Matsumoto K, (下转第 1374 页)

条带,表明所建立的多重 RT-PCR 方法具有很好的特异性(图 2)。

2.3 多重 RT-PCR 的敏感性检测 INFA、INFB、HRV 和 H1N1 的多重 RT-PCR 最低检测浓度分别为 10^4 、 10^4 、 10^3 、 10^4 copies/mL。而单一 RT-PCR 则分别为 10^2 、 10^3 、 10^3 、 10^3 copies/mL。多重 RT-PCR 检测的敏感性略低于单一 RT-PCR(图 3~6)。

3 讨 论

2009 年初墨西哥甲型 H1N1 流感暴发,疫情迅速在全球范围内蔓延^[4]。2009 年 6 月 11 日,WHO 宣布将流感大流行警告级别提升为 6 级。进入冬季以来,已进入第 2 个疫情高峰,截至 2009 年 12 月 4 日,WHO 共接到报告因甲型 H1N1 流感死亡病例 8 768 例。截止 2009 年 11 月 30 日,中国内地累计报告 92 904 例甲型 H1N1 流感确诊病例,因甲型 H1N1 流感所致的死亡病例达 200 例。

有效防控疫情必须坚持早发现、早诊断、早隔离和早治疗的原则,因此,及时进行实验室诊断,对临床治疗和疫情防控工作至关重要。目前,呼吸道病毒的实验室诊断主要包括病毒分离培养、血清学诊断、病毒抗原荧光检测和核酸检测等方法。病毒分离培养设备和技术要求高,鉴定周期长,不利于疫情的应急处理。血清学诊断需采取急性和恢复期的血液标本,只能起到回顾性诊断作用。病毒抗原荧光检测其敏感性和特异性较低,且不能区分季节性流感和新型甲型 H1N1 流感,不能用于确诊。核酸检测与病毒分离、血清学诊断、病毒抗原快速检测等方法相比,具有检测灵敏度高、特异性强、检测时间短等优点,已被卫生部定为确诊的检测方法之一。

现阶段上呼吸道感染的流行病学呈甲型 H1N1 流感暴发为主、季节性流感和常见呼吸道病毒流行并存的特点,急需可以有效分辨患者致病病原体的检测方法。目前,多种病原体核酸筛查技术有多重 RT-PCR、多重 real-time PCR 和基因微阵列检测技术^[5-6]。多重 real-time PCR 技术核酸扩增和检测在同一反应密封管中同时进行,具有灵敏度高、特异性强、准确快速的特点,但是其引物和探针设计较为困难,并且需要具备多通道检测能力的 real-time PCR 仪^[7]。基因微阵列检测技术作为一种检测新技术,最大的特色在于其高通量检测,可以分析海量信息,而其研制、运行成本高昂,也限制了其大规模应用^[8-9]。虽然多重 RT-PCR 检测方法仅为定性检测,但其发展较为成熟,在保持了较高特异性和敏感性的同时,研制周期和成本明显低于 real-time PCR 和基因芯片,有利于在临床的广泛应用^[3]。

本研究利用多重 RT-PCR 技术,建立了 INFA、INFB、HRV 和 H1N1 4 种呼吸道病毒的检测方法。在设计中根据减小各引物间 Tm 值差、目的片段在 500 bp 以下、引物长度保持在 20~25 mer、GC 含量在 50%~60%的原则^[10],设计了 4 对

引物。在实验中针对引物与模板的浓度比例,酶量及缓冲液离子浓度,变性、退火、延伸时间等影响因素进行优化,检测结果特异性高,仅敏感性稍低于单一 RT-PCR 检测技术,完全满足临床诊断的需要。因此,本研究的多重 RT-PCR 技术,为甲型 H1N1 流感病毒暴发流行时期,呼吸道感染的病原学诊断提供了有效的实验室检测手段。

参考文献:

- [1] Smith GD. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic [J]. *Nature*, 2009, 459(7250):1122.
- [2] 曾凡胜,陆学东,王琼. 多重 RT-PCR 技术检测儿童呼吸道标本中的常见病毒[J]. *现代检验医学杂志*, 2009, 24(3):121.
- [3] Lam WY. Rapid multiplex nested PCR for detection of respiratory viruses [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007, 45(11):3631.
- [4] 代涛,池慧,许培扬. 甲型 H1N1 流感疫情进展与应对策略综述[J]. *中国健康教育*, 2009, 25(8):602.
- [5] Ieven M. Currently used nucleic acid amplification tests for the detection of viruses and atypicals in acute respiratory infections [J]. *Journal of Clinical Virology*, 2007, 40(4):259.
- [6] Fox JD. Nucleic acid amplification tests for the detection and analysis of respiratory viruses; the future for diagnostics [J]. *Future Microbiology*, 2007, 2(2):199.
- [7] Brittain LR. Multiplex real-time PCR for detection of respiratory tract infections [J]. *Journal of Clinical Virology*, 2008, 41(1):53.
- [8] Kumar S. Detection of 11 common viral and bacterial pathogens causing community-acquired pneumonia or sepsis in asymptomatic patients by using a multiplex reverse transcription-PCR assay with manual (enzyme hybridization) or automated (electronic microarray) detection [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2008, 46(9):3063.
- [9] Quan PL. Detection of respiratory viruses and subtype identification of influenza A viruses by GreeneChipResp oligonucleotide microarray [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007, 45(8):2359.
- [10] 赵海龙,姜涛,陈水平. 重要呼吸道病毒病原的多重 RT-PCR 检测 [J]. *解放军医学杂志*, 2006, 31(9):890.

(收稿日期:2010-01-25 修回日期:2010-04-26)

(上接第 1371 页)

et al. Myocardial protection from ischemia reperfusion injury by endogenous and exogenous HGF [J]. *J Clin Invest*, 2000, 106:1511.

- [7] Azuma J, Taniyama Y, Takeya Y, et al. Angiogenic and

antifibrotic actions of hepatocyte growth factor improve cardiac dysfunction in porcine ischemic cardiomyopathy [J]. *Gene Ther*, 2006, 13:1206.

(收稿日期:2010-01-25)