

论著·基础研究

缩宫素对大鼠心肌缺血再灌注后一氧化氮及内皮素-1 的影响

牛少辉,张丽华[△],刘旭邦,陈 杰

(郑州大学第二附属医院心血管内科,郑州 450014)

摘 要:目的 探讨缩宫素(OT)对大鼠急性心肌缺血再灌注后一氧化氮(NO)与内皮素-1(ET-1)的影响及可能的机制。方法 将大鼠随机分为心肌缺血再灌注组(I/R 组)、I/R+OT 预处理组(I/R+OT 组)、假手术组(SH 组)和健康对照组(N 组)。采用在体大鼠结扎冠状动脉前降支 25 min 后,松扎再灌注 120 min 形成 I/R 模型,SH 组只穿线不结扎。I/R+OT 组在缺血前 25 min 腹腔注射 OT 0.03 μg/kg,其余 3 组给予等量生理盐水。再灌注结束后测定血清肌酸激酶同工酶(CK-MB)、乳酸脱氢酶(LDH)、NO 及 ET-1;再灌注结束时,采用 HE 染色进行心肌组织形态学分析。结果 光镜下观察,N 组与 SH 组心肌细胞排列整齐,无肌纤维破坏,I/R 组心肌纤维排列不规则、断裂,心肌间质水肿,较多粒细胞灶状浸润,I/R+OT 组可见心肌细胞排列、间质水肿及粒细胞浸润程度介于 N 组与 SH 组。与 SH 组相比,I/R 组和 I/R+OT 组血清 CK-MB、LDH、ET-1 升高,NO 水平降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$),而 N 组的表达差异无统计学意义($P > 0.05$);与 I/R 组相比,I/R+OT 组血清 CK-MB、LDH、ET-1 降低,NO 水平升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。I/R 组和 I/R+OT 组血清 NO 与 ET-1 水平呈负相关($P < 0.05$)。结论 OT 预处理对大鼠 I/R 有保护作用,其作用机制可能与 OT 增加血清 NO 水平、降低 ET-1 水平有关。

关键词:催产素;再灌注损伤;一氧化氮;内皮素-1

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.04.035

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)04-0471-03

The effect of oxytocin on the expression of NO and ET-1 in preconditioning myocardium of rats with ischemia

Niu Shaohui, Zhang Lihua[△], Liu Xubang, Chen Jie

(Department of Vasculocardiology, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450014, China)

Abstract: Objective To investigate the effect and possible mechanism of oxytocin on the expression of NO and ET-1 in preconditioning myocardium of rats with ischemia. **Methods** The rats were randomly divided into ischemic reperfusion group(I/R), ischemic reperfusion + oxytocin pretreatment group(I/R+OT), sham operation group(SH) and normal control group(N). The myocardial ischemia-reperfusion model was induced by 25 min coronary occlusion and 120 min reperfusion in opened-chest anesthetized rats, rats of SH group were not conducted with ligation but threading only. Group I/R+OT were administered oxytocin(0.03 g/kg, i. p) 25 min prior to ischemia, the other three groups were given the same amount normal saline. After reperfusion, nitric oxide(NO), endothelin-1(ET-1), creatin kinase isoenzyme(CK-MB) and lactate dehydrogenase(LDH) in blood serum were measured. At the end of reperfusion, HE stain was used to observe the morphology of the cardiac muscular tissue. **Results** Pathological observation showed that the myocardial cell in group SH and in X ranged in order, with no fibers fractured, myocardial fibers in I/R group were fractured and disorganized, interstitial edema, neutrophil infiltration were also observed. It was more serious in group I/R than in group I/R+OT. Compared with SH group, the CK-MB, LDH, ET-1 of the I/R group and I/R+OT group increased, the NO decreased($P < 0.05$), and it had no difference in group N and group SH($P > 0.05$). Compared with the I/R group, in I/R+OT group the expression of CK-MB, LDH, ET-1 were decreased, the level of NO increased($P < 0.05$). There was a negative correlation between NO and ET-1 in group I/R and I/R+OT($P < 0.05$). **Conclusion** Oxytocin pretreatment on rat myocardial ischemia and reperfusion has protective effect, and its action mechanisms maybe associated with the increase of the content of NO and the decrease of the content of ET-1 in blood serum.

Key words: oxytocin; reperfusion injury; nitric oxide; endothelin1

对缺血心肌施行再灌注治疗是缺血性心脏病的主要治疗方法之一,缺血再灌注在拯救缺血心肌的同时还会造成心肌的缺血再灌注损伤(ischemic/reperfusion, I/R),加重单纯心肌缺血所造成的损伤,成为影响疗效的一个重要因素。目前研究发现,与女性生殖相关的催产素(oxytocin, OT)在心血管系统中也起着新的作用,同时在大鼠、人类的血管床中已经发现了有功能的 OT 受体^[1]。多项研究也表明,I/R 与一氧化氮(NO)、内皮素-1(ET-1)有密切关系。但是,OT 保护心肌防治 I/R 机制还未明确。本实验通过建立大鼠心脏 I/R 模型,观察 OT 对 I/R 心肌组织中 NO、ET-1 表达的影响,探讨其对心肌 I/R 的保护作用机制,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 健康成年雄性 SD 大鼠,体质量 250~300 g(郑州大学实验动物中心提供,批号:410118)。OT 注射液每支 1 mL(上海典微生物技术有限公司,批号:H34022979)。实验仪器:Hx-100E 小动物呼吸机(自成都蒙肇科技公司)。

1.2 大鼠心肌 I/R 模型制作及分组 取雄性 SD 大鼠 80 只,分为 I/R 组、I/R+OT 组、假手术组(SH 组)和健康对照组(N 组),每组 20 只。4 组大鼠适应性喂养 1 周,术前 12 h 禁食。SH 组、I/R 组和 I/R+OT 组用质量分数为 10%的水合氯醛(0.3 mL/100 g)腹腔麻醉后固定于操作台,胸部去毛,消毒,气管切开,机械辅助通气,沿胸骨左缘开胸,暴露心脏,环绕左冠

状动脉前降支根部穿线,结扎,以盐水纱布覆盖,25 min 后剪开结扎线,使心肌再灌注,120 min 后结束实验。线结扎左冠状动脉前降支致心肌缺血,去除结扎线致心肌再灌注,仅穿线而未结扎者为 SH 模型。以心电图和心肌颜色改变作为缺血再灌注造模成功的标志:结扎左冠状动脉前降支后见心电图 ST 段立即抬高,局部心肌颜色由红变灰;再灌注时抬高的 ST 段回落 50% 以上,心肌颜色变红。I/R+OT 组大鼠于术前 25 min 腹腔注射缩宫素 0.03 μg/kg,其余 3 组分别给予相同剂量生理盐水腹腔注射^[2]。

1.3 指标测定 再灌注结束后,取大鼠腹主动脉血 4 mL,静置 60 min 后,3 000 r/min,离心 5 min,吸取上层血清,保存在-70℃的冰箱中。分别以化学法和放射免疫法测定血清 NO、血浆 ET-1 值,并计算 NO/ET-1 比值;全自动生化分析仪检测血清肌酸激酶同工酶(CK-MB)、乳酸脱氢酶(LDH)。所有操作均按照试剂盒说明进行操作。

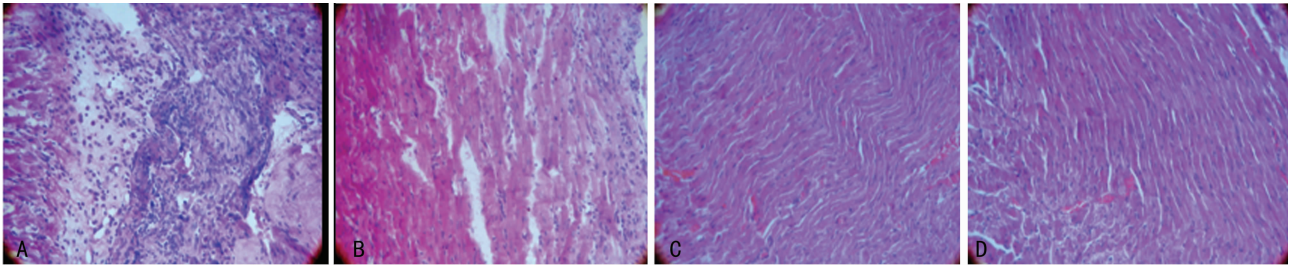
1.4 组织形态分析 再灌注结束后,将大鼠颈椎脱臼处死,48

h 内取左心室前壁心肌梗死区为标本。在 10% 甲醛溶液中固定,常规脱水,石蜡包埋,6 μm 连续切片,分别做 HE 染色、显微镜检查。

1.5 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间 NO、ET-1、CK-MB 和 LDH 水平采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-t 法;相关分析采用 Pearson 分析,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HE 染色结果 SH 组和 N 组心肌切片中,可见心肌纤维排列整齐,有分支,细胞核染色清晰,核位于肌纤维中轴部分,未见细胞变性和坏死。I/R 组心肌纤维排列不规则,心肌纤维水肿、断裂,肌浆内空泡形成,肌浆溶解,心肌间质水肿,较多粒细胞灶状浸润,及见小灶性出血,I/R+OT 组可见心肌细胞排列、间质水肿及粒细胞浸润程度介于 N 组与 SH 组,见图 1。



A:I/R 组;B:I/R+OT 组;C:N 组;D:SH 组。

图 1 各组大鼠心肌组织结构变化(HE×400)

2.2 血清 CK-MB、LDH 的变化 与 SH 组相比,I/R 组和 I/R+OT 组血清中心肌酶 CK-MB、LDH 均明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$),而 N 组比较差异无统计学意义($P>0.05$);I/R+OT 组血清中心肌酶 CK-MB、LDH 水平较 I/R 组低,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

表 1 OT 对大鼠心肌 I/R 后 CK-MB、LDH 的影响($\bar{x} \pm s$,U/L)

组别	n	CK-MB	LDH
SH 组	20	174.6±65.3*	935.5±245.7*
N 组	20	141.2±73.4*	824.9±197.5*
I/R 组	20	2 368.4±605.1#	2 047.2±421.4#
I/R+OT 组	20	1 523.7±387.9#*	1 499.7±405.8#*

: $P<0.05$,与 SH 组比较;*: $P<0.05$,与 I/R 组比较。

2.3 血清 NO 和 ET-1 的变化 与 SH 组相比,I/R 组和 I/R+OT 组血清中 NO 水平均降低、ET-1 水平均升高,差异有统计学意义($P<0.05$),而在 N 组的表达差异无统计学意义($P>0.05$);给予 OT 干预后均可明显增加 NO 水平,降低 ET-1 水平与 I/R 组相比,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

表 2 OT 对大鼠心肌 I/R 后 NO 和 ET-1 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	NO(μmol/L)	ET-1(pg/mL)
SH 组	20	40.7±6.1*	83.32±12.47*
N 组	20	56.8±3.4*	68.54±17.2*
I/R 组	20	19.9±3.8#	187.29±41.51#
I/R+OT 组	20	36.7±3.4#*	141.71±25.84#*

: $P<0.05$,与 SH 组比较;*: $P<0.05$,与 I/R 组比较。

2.4 相关性分析 对各组 NO、ET-1 水平分别用 SPSS 绘图功能做散点图,并进行 Pearson 相关性分析:I/R 组 NO、ET-1 水平呈负相关($r=-0.762$, $P<0.05$);I/R+OT 组 NO、ET-1 水平呈负相关($r=-0.607$, $P<0.05$)。N 组和 SH 组无明显相关性。

3 讨 论

有研究发现,除了下丘脑和大脑的其他部位,心脏也可以合成和释放 OT,应用放射免疫分析法可以在心脏的 4 个腔室中检测到 OT 的存在。同时,在心房、心室和血管内皮细胞中都发现了 OT 受体^[1]。Gutkowska 等^[2] 研究表示,OT 是一种心血管激素,通过诱导 ANP 的释放对心血管有重要作用。Dusunceli 等^[3] 研究发现,在大鼠肝脏的缺血再灌注中,OT 可以刺激 NO 的释放,保护缺血组织。Tugtepe 等^[4] 研究证实,在大鼠肾脏 I/R 模型中 OT 也可以刺激 NO 的释放,保护肾功能^[5]。在 OT 对心肌 I/R 损伤的研究中,Alizadeh 等^[5] 发现,在心肌细胞中 OT 通过激活的线粒体 KATP 通路对心肌起保护作用,但是 OT 与心肌缺血再灌注密切相关的 NO、ET-1 的关系还未报道。

内皮源性 NO 是内皮细胞产生的舒张血管的强大物质,多数研究表明,在急性心肌缺血再灌注时,心肌发生不同程度的心肌损伤,这与血浆 NO 含量下降有关^[6-7]。在缺血再灌注预处理过程中,NO 对缺血再灌注损伤具有调节和保护作用。Wink 等^[8] 实验表明,NO 具有抗氧化作用,它把培养的肺成纤维细胞及神经元暴露于过氧化生成体系中,发现细胞损伤存在剂量依赖性;而在其中加入 NO 供体后,细胞损伤显著减轻。心肌再灌注伴过氧化物的产生,因而提前加入 NO 供体有利于细胞的保护。ET 是一种强大的缩血管物质,具有收缩冠状血管、降低心率等作用。目前发现人的 ET 有 3 种,主要由

血管内皮细胞产生,其中 ET-1 的生物活性最强,收缩血管的作用最为强烈。心肌缺血再灌注可以导致 ET 数量增加,尤其在灌注期增加的更加迅猛,有可能是缺血再灌注导致内皮细胞稳态失衡的结果,研究发现,ET 转换酶抑制剂 PP36 可以保护急性心肌缺血大鼠的心功能^[9]。正常情况下,血管内皮释放一定量的 NO、ET-1,NO 舒张血管,ET-1 收缩血管,二者的动态平衡调节着血管的舒缩^[10-11]。心肌缺血缺氧,内皮功能障碍,对周围环境的反应性减弱,NO 的释放量减少和生物活性下降,NO 和 ET 对血管的效应相反,是相互拮抗的关系,NO 释放减少,收缩血管的 ET-1 释放水平就会急剧上升,NO/ET-1 失调,二者的平衡被破坏,这些原因导致冠状动脉收缩,血流减少,流速减慢,中性粒细胞在内皮细胞上聚集,释放各种介质和氧自由基,心肌缺血缺氧加剧^[12]。

本实验结果显示,I/R 组 CK-MB、LDH 及光镜下心肌组织的改变,均反映心肌缺血坏死较重,提示造模成功;I/R+OT 组 CK-MB、LDH 水平明显下降,光镜下心肌组织改变较 I/R 组轻,提示 OT 可能对心肌 I/R 损伤有保护作用。与 SH 组相比,I/R 组和 I/R+OT 组血清中 NO 水平均降低、ET-1 水平均升高($P<0.05$),而在 N 组的表达差异无统计学意义($P>0.05$);血清中 NO 降低的水平、ET-1 升高的水平在 I/R 组较 I/R+OT 组高($P<0.05$);NO、ET-1 的表达水平呈负相关。提示心肌 I/R 后 NO 水平降低、ET-1 水平升高,可能是导致心肌损伤的重要病理生理机制,机制可能是血管收缩,血流减少,流速减慢,中性粒细胞在内皮细胞上聚集,释放各种介质和氧自由基,进而损伤心肌。I/R+OT 组血清中 NO 水平较 I/R 组高、ET-1 水平较 I/R 组低,提示 OT 对心肌 I/R 损伤有保护作用,其机制可能是在缺血缺氧状态下,血管内皮损伤引起内皮功能障碍,影响了 NO 的分泌合成,ET-1 水平升高,OT 可以在一定程度上纠正内皮功能紊乱,使 NO 的分泌释放量有所升高,ET-1 水平有所下降,血管相对收缩减轻,缓解了心脏缺血缺氧状态。NO、ET-1 水平表达呈负相关,提示 NO 和 ET-1 在心肌 I/R 后损伤的发生中可能起协同作用。

综上所述,心肌 I/R 后 OT 可能通过改善受损内皮的功能,调节血管活性物质的分泌、释放及不同物质间的比例,使下调的 NO/ET-1 趋于正常、恒定,以调节血管紧张度和局部血流量,恢复血管的自稳态,可能为 I/R 后心肌损伤的治疗开辟了新的领域,值得进一步研究。

参考文献:

[1] Gutkowska J, Jankowski M. Oxytocin Revisited: Its Role in Cardiovascular Regulation [J]. J Neuroendocrinol, (上接第 470 页)
[J]. J Androl, 2012, 33(5): 763-776.
[7] 李卫平, 王养民, 马文强, 等. β -actin 在无菌性前列腺炎大鼠模型中免疫抑制治疗前后的表达及意义[J]. 第四军医大学学报, 2010, 16(4): 746-748.
[8] 孙继红, 胡梅, 巫凤娟, 等. 花川保列颗粒对大鼠非细菌性前列腺炎模型的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(4): 135-138.
[9] 高卫军, 王长海. 良性前列腺增生合并慢性前列腺炎的研究进展[J]. 西北国防医学杂志, 2012, 33(4): 453-455.
[10] 叶海云, 侯树坤, 白文俊, 等. 慢性前列腺炎患者前列腺液 IL-6 和 IL-8 表达变化及意义[J]. 中华泌尿外科杂志,

2012, 24(4): 599-608.
[2] Gutkowska J, Jankowski M, Mukaddam-Daher S, et al. Oxytocin is a cardiovascular Hormone [J]. Braz J Med Biol Res, 2000, 33(6): 625-633.
[3] Dusunceli F, Iseri SO, Ercan F, et al. Oxytocin alleviates hepatic ischemia-reperfusion injury in rats [J]. Peptides, 2008, 29(7): 1216-1222.
[4] Tugtepe H, Sener G, Biyikli NK, et al. The protective effect of oxytocin on renal ischemia/reperfusion injury in rats [J]. Regul Pept, 2007, 140(3): 101-108.
[5] Alizadeh AM, Faghihi M, Sadeghipour HR, et al. Oxytocin protects rat heart against ischemia-reperfusion injury via pathway involving mitochondrial ATP-dependent potassium channels [J]. Peptides, 2010, 31(7): 1341-1345.
[6] Cohen MV, Yang XM, Downey JM. Nitric oxide is a preconditioning mimetic and cardioprotectant and is the basis of many available infarct sparing strategies [J]. Cardiovasc Res, 2006, 70(2): 231-239.
[7] 贾俊海, 陈素仙, 陈永昌. 缺血预处理对心肌缺血再灌注大鼠一氧化氮系统和 ICAM-1 mRNA 表达的影响 [J]. 陕西医学杂志, 2006, 35(12): 1582-1585.
[8] Wink DA, Hanbauer I, Krishna MC. Nitric oxide protects against cellular damage and cytotoxicity from reactive oxygen species [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993, 90(21): 9813-9817.
[9] RUFANOVA VA, POZDNEV VF, KALENIKOVA E, et al. Endothelin-converting enzyme inhibition in the rat model of acute heart failure: function and neurohormonal action [J]. Exp Biol Med, 2009, 234(10): 1201-1211.
[10] 宋晓晶, 张栋, 马慧敏, 等. 电针对小鼠肝组织内 ET-1、NO 含量的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(9): 1978-1981.
[11] Liu X, Qiu J, Zhao S, et al. Grape seed proanthocyanidin extract alleviates ouabain-induced vascular remodeling through regulation of endothelial function [J]. Mol Med Report, 2012, 6(5): 948-954.
[12] 汤春光, 王利宏, 俞桂芬, 等. IL218、NO、ET 对评价冠脉粥样硬化狭窄程度的临床价值 [J]. 放射免疫学杂志, 2010, 23(4): 373-375.

(收稿日期: 2013-09-08 修回日期: 2013-10-22)

2003, 24(4): 279-281.
[11] 周青, 田雪飞, 袁轶峰, 等. 慢性非细菌性前列腺炎/慢性盆腔疼痛综合征患者前列腺液中炎症因子差异表达的临床意义 [J]. 中华泌尿外科杂志, 2009, 30(6): 386-389.
[12] 孙波, 李辉, 王宁. 肥胖与慢性炎症 [J]. 生物学杂志, 2012, 29(2): 88-90.
[13] Herrero L, Shapiro H, Nayer A, et al. Inflammation and adipose tissue macrophages in lipodystrophic mice [J]. Proc Natl Acad Sci, 2010, 107(1): 240-245.

(收稿日期: 2013-09-13 修回日期: 2013-10-29)