

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.27.006

脂联素后处理对大鼠心肌缺血-再灌注损伤的保护作用*

赵林静^{1,2}, 邓保国¹, 杨保胜¹, 张金盈²

(1. 新乡医学院基础医学院, 河南新乡 453003; 2. 郑州大学第一附属医院心血管内科, 郑州 450000)

[摘要] **目的** 探讨脂联素(ADP)后处理对大鼠心肌缺血-再灌注损伤(MIRI)是否有保护作用。**方法** SD大鼠随机分为:(1)假手术组(Sham组),冠状动脉左前降支(LAD)仅穿线不断流;(2)心肌缺血-再灌注损伤组(MIRI组),LAD结扎30 min后再灌注120 min;(3)脂联素后处理组(ADP组),LAD再灌注前20 min注射ADP,其余同MIRI组。检测各组血浆乳酸脱氢酶(LDH)、心肌肌钙蛋白I(cTnI)和丙二醛(MDA)的水平,检测心肌超氧化物歧化酶(SOD)和MDA的水平,各组心肌HE染色并描记心电图。**结果** MIRI组血浆LDH(735.21±110.92)U/L、cTnI(37.96±5.97) μ g/mL和MDA(4.55±0.18)nmol/L较Sham组升高($P<0.05$),ADP组血浆LDH(579.25±69.01)U/L、cTnI(21.07±5.77) μ g/mL和MDA(2.99±0.22)U/L水平较MIRI组降低($P<0.05$);与Sham组相比,MIRI组心肌SOD水平(11.47±1.67)U/mg降低而MDA水平(7.99±0.59)nmol/mg升高($P<0.05$);与MIRI组相比,ADP组心肌SOD水平(13.93±0.97)U/mg升高而MDA水平(5.74±0.64)nmol/mg降低($P<0.05$)。**结论** ADP后处理可以减轻大鼠MIRI,可能与减少脂质过氧化和增强自由基清除有关。

[关键词] 脂联素;再灌注损伤;心肌;缺血后处理**[中图分类号]** R363.2**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)27-3763-03

The role of adiponectin postconditioning on myocardial ischemia reperfusion injury in rats*

Zhao Linjing^{1,2}, Deng Baoguo¹, Yang Baosheng¹, Zhang Jinying²

(1. School of Basic Medical, Xinxiang Medical University, Xinxiang, Henan 453003, China; 2. Department of Vasculocardiology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450000, China)

[Abstract] **Objective** To study the role of adiponectin (ADP) postconditioning on myocardial ischemia reperfusion injury (MIRI) in rats. **Methods** SD rats were divided randomly into 3 groups: (1) Group Sham were processed identically except the left anterior descending coronary artery (LAD) and was not ligated; (2) Group MIRI were subjected to LAD occlusion for 30 min and reperfusion for 120 min; (3) Group ADP were subjected to ADP injection before reperfusion. The titer of lactate dehydrogenase (LDH), cardiac troponin I (cTnI) and malondialdehyde (MDA) in plasma were observed. The levels of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) in myocardial tissue were observed. The results of HE staining and electrocardiograms (ECG) was observed. **Results** Compared with Group Sham, LDH, cTnI and MDA in plasma in Group MIRI increased ($P<0.05$); Compared with Group MIRI, LDH, cTnI and MDA in plasma in Group ADP declined ($P<0.05$); Compared with Group Sham, SOD decreased and MDA increased in myocardial tissue in Group MIRI ($P<0.05$); Compared with Group MIRI, SOD increased and MDA decreased in myocardial tissue in Group ADP ($P<0.05$). The myocardial injury was serious in Group MIRI while it was lightened in Group ADP. There were acute ischemia ECG change in Group MIRI while it was slight in Group ADP. **Conclusion** ADP postconditioning is a protective factor against MIRI in rats, it is related to eliminating free radicals and alleviating the damage of lipid peroxidation.

[Key words] adiponectin; reperfusion injury; myocardium; ischemic postconditioning

随着近年静脉溶栓、经皮冠脉腔内成形术和冠脉旁路移植术等方法被广泛应用于心血管临床,急性心肌梗死的病死率有所下降,但是同时心肌缺血-再灌注损伤(myocardial ischemia reperfusion injury, MIRI)包括心肌抑顿和再灌注心律失常等现象愈发引起关注,成为临床亟待解决的问题。针对MIRI,缺血预处理(ischemic preconditioning, IPC)被公认为是最强的心肌保护措施,但患者心肌缺血事件的发生难以预测,各种临床治疗均是在心肌缺血后实施的,所以在2003年提出的缺血后处理(ischemic postconditioning, IPO)的概念更贴近临床,成为抗MIRI的研究热点。但由于单纯IPO对机体是有损操作,临床并不可行,于是各种药物IPO得到了更多关注,其中脂联素

(adiponectin, ADP)因其广泛的药理作用而备受关注。吴芹等^[1]发现提高ADP水平可增强心脏IPC对大鼠MIRI的保护作用,本组前期实验也证实ADP可以增强大鼠肢体IPC对MIRI的保护效应^[2],但ADP后处理对大鼠MIRI是否具有保护作用还研究甚少。本实验在大鼠心肌缺血再灌注前给予ADP后处理,观察ADP后处理是否对MIRI有保护作用,以期作为临床MIRI的早期干预提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及试剂仪器 清洁级SD大鼠30只,体质量220~280 g,由河南省实验动物中心提供。所有动物适应性饲养1周,实验前禁食12 h,不禁水。主要试剂:脂联素购自美国

* 基金项目:河南省科技厅科技发展计划基金资助(411045800)。损伤防治的研究。

作者简介:赵林静(1970—),讲师,在读博士,主要从事心脏缺血再灌注

Phoenix 公司,批号 426002;大鼠超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒,乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒,丙二醛(MDA)试剂盒和心肌肌钙蛋白 I(cTnI)试剂盒均购自美国 R&D 公司。主要仪器:光学显微镜(上海豫光仪器公司),Lei Ca RM 2235 切片机, DHX-150B 型动物呼吸机(特力麻醉呼吸设备公司),ECG-100 型心电图机(深圳邦健电子公司),DNM-9602A 型酶标分析仪(成都广普仪器公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 大鼠在体 MIRI 模型建立 大鼠 10%水合氯醛腹腔麻醉(每 100 克 0.3 mL)后仰卧位固定,1%聚维酮碘颈部消毒后分离气管并穿线后剪开气管,插入气管插管连接呼吸机进行机械通气支持(潮气量 15~20 mL,呼吸频率每分钟 70~80 次,呼吸比 1.0:1.5),分别经四肢插入针型电极描记标 II 导联心电图,按照本组前期操作^[3],建立大鼠 MIRI 模型。

1.2.2 动物分组 造模成功的大鼠随机分为以下 3 组,每组 10 只:(1)假手术(Sham)组,开胸后分离冠状动脉左前降支(left anterior descending coronary artery, LAD)后并不结扎断流;(2)MIRI 组,LAD 穿线后结扎断流血流 30 min 后松开线结再灌注 120 min;(3)脂联素后处理组(ADP 组),药物后处理的时间点采用本组前期常规操作即在 LAD 再灌注前 20 min 经股静脉注射 ADP(1.8 μ g/g),其余操作同 MIRI 组。

1.2.3 标本留取和指标检测 各组动物 LAD 缺血再灌注 120 min 后(Sham 组 LAD 仅穿线后 150 min),自颈总动脉取血 2~3 mL,3 500 r/min 离心 10 min 后取上清液,分装入 Eppendorf 管待检。用 ELISA 法检测血浆 LDH、SOD、MDA 和 cTnI 含量。同时摘取大鼠心脏用生理盐水反复洗涤,剪下左心室心肌放入冻存管入液氮冻存。测定时称取心肌 200 mg,剪碎后移入装有 2 mL 冷生理盐水的匀浆管中冰浴匀浆,3 500 r/min 离心 15 min 后收集上清液,用 ELISA 法检测心肌 SOD 和 MDA 水平。最后每组取 2 只大鼠迅速摘取心脏,在左心室最大横径处横切并去除左心耳,经 4%多聚甲醛固定后 HE 染色。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件,用 $\bar{x} \pm s$ 表示计量资料。计量资料数据结果呈正态分布,多组间比较采用单因素方差分析,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠血浆 LDH、cTnI 和 MDA 的水平 MIRI 组大鼠血浆 LDH、cTnI 和 MDA 水平与 Sham 组相比升高($P < 0.05$),ADP 组血浆 LDH、cTnI 和 MDA 水平较 MIRI 组降低($P < 0.05$),见表 1。

表 1 各组大鼠血浆 LDH、cTnI 和 MDA 水平($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	LDH(U/L)	cTnI(μ g/mL)	MDA(nmol/L)
Sham 组	314.33 \pm 56.05	4.96 \pm 0.99	2.41 \pm 0.16
MIRI 组	735.21 \pm 110.92 ^a	37.96 \pm 5.97 ^a	4.55 \pm 0.18 ^a
ADP 组	579.25 \pm 69.01 ^{ab}	21.07 \pm 5.77 ^{ab}	2.99 \pm 0.22 ^{ab}

^a: $P < 0.05$,与 Sham 组比较;^b: $P < 0.05$,与 MIRI 组比较

2.2 各组大鼠心肌 SOD 和 MDA 水平 与 Sham 组相比,MIRI 组心肌 SOD 水平降低而 MDA 水平升高($P < 0.05$);与 MIRI 组相比,ADP 组心肌 SOD 水平升高而 MDA 水平降低($P < 0.05$),见表 2。

表 2 各组大鼠心肌中 SOD 和 MDA 水平($\bar{x} \pm s$)

组别	SOD(U/mg)	MDA(nmol/mg)
Sham 组	21.01 \pm 0.80	4.26 \pm 0.41
MIRI 组	11.47 \pm 1.67 ^a	7.99 \pm 0.59 ^a
ADP 组	13.93 \pm 0.97 ^{ab}	5.74 \pm 0.64 ^{ab}

^a: $P < 0.05$,与 Sham 组比较;^b: $P < 0.05$,与 MIRI 组比较

2.3 各组大鼠心肌形态学结果 各组大鼠心脏标本 HE 染色后,光镜下可见:Sham 组大鼠心肌纤维排列整齐,心肌横纹清晰,心内膜内皮完整;MIRI 组大鼠部分心肌纤维出现溶解和断裂,肌间质间隙扩大,横纹不清晰,心内膜内皮不完整;ADP 组和 MIRI 组相比大鼠心肌的病理损伤有所减轻。见图 1~3。

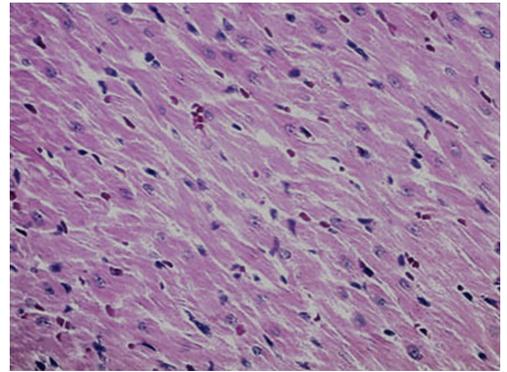


图 1 Sham 组心肌 HE 染色($\times 400$)

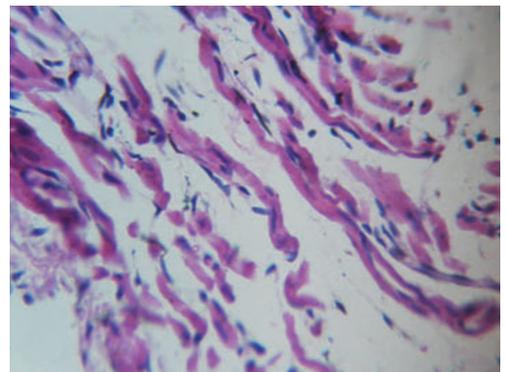


图 2 MIRI 组心肌 HE 染色($\times 400$)

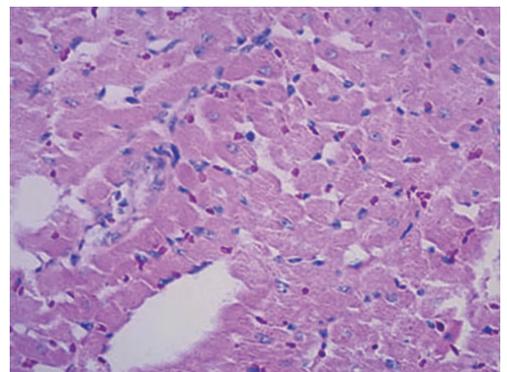


图 3 ADP 组心肌 HE 染色($\times 400$)

2.4 各组大鼠标 II 导联心电图结果 Sham 组大鼠心电图结果正常,MIRI 组大鼠心电图呈明显急性缺血性改变,ADP 组和 MIRI 组相比心电图急性缺血性改变明显减轻。结果见图 4~6。

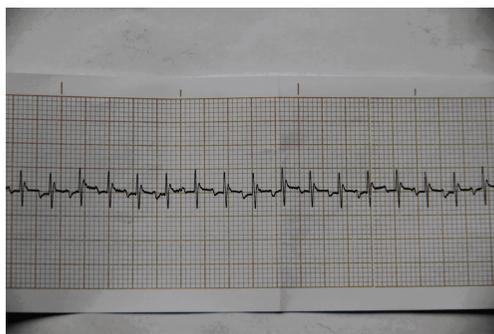


图 4 Sham 组标 II 导联心电图

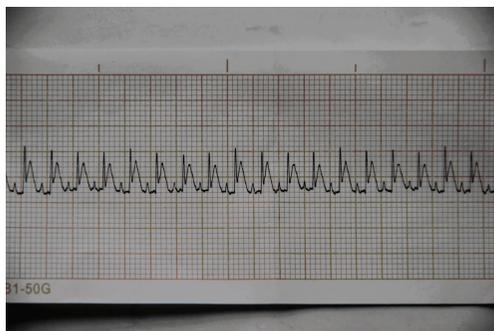


图 5 MIRI 组标 II 导联心电图

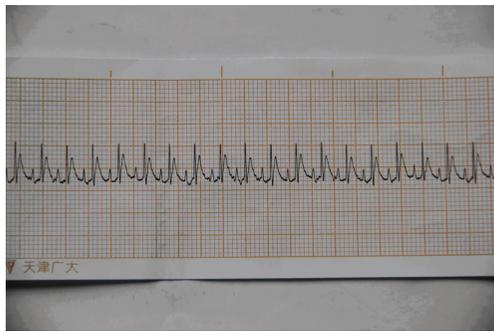


图 6 ADP 组标 II 导联心电图

3 讨 论

大鼠心血管解剖结构包括冠状动脉支配区,与人体非常相似,MIRI 的发生率较高,因此大鼠是 MIRI 理想的研究对象^[4]。本实验选用 8 周龄以上大鼠,体质量超过 220 g,处于性成熟期的成年阶段,对各种损伤抵抗力相对较强。

ADP 是由脂肪细胞分泌的一种血浆细胞因子性蛋白质。研究发现,高血压和冠心病等患者 ADP 水平明显降低,提示 ADP 具有心脏保护作用^[5]。在动物实验中有更多关于 ADP 心脏保护的报道,有学者报道大鼠 MIRI 越严重,ADP 水平下降越明显,当使用 ADP 基因敲除大鼠制作 MIRI 模型,可见心肌梗死范围明显扩大,当采用腺病毒介导 ADP 转染则可减少梗死面积^[6]。

LDH 及 cTnI 正常主要存在于心肌和骨骼肌中,血中含量很低。当心肌损伤和大量细胞死亡时逸入出血,且二者升高水平与心肌损伤程度大致平行^[7]。cTnI 是心肌众多调节蛋白中的重要成分,作为新的心肌损伤评价指标近年广受重视。因为 cTnI 相对分子质量较小仅为 22 500,心肌受损初期即可入血并在血中持续时间长,所以敏感性高,被称为检测心肌受损程度的“金标准”^[8]。本实验中 MIRI 组血清 LDH 和 cTnI 含量比 Sham 组明显升高,提示存在 MIRI;ADP 组血清 LDH 和 cTnI 含量较

MIRI 组降低,提示 ADP 后处理对 MIRI 有保护作用。

氧自由基化学性质活泼,能对生物大分子如 DNA 碱基、蛋白质和脂质等造成过氧化损伤形成氧化应激状态,通过损伤 DNA 碱基,产生蛋白氧化产物及脂质过氧化等导致组织损伤,参与了多种疾病的发生发展^[9]。心肌缺血再灌注产生的氧自由基能攻击生物膜,引发脂质过氧化,最终导致细胞损伤。心肌缺血再灌注过程中,通过白细胞“呼吸暴发”等途径自由基的产生急剧增多^[10]。

MDA 化学性质十分稳定,是自由基攻击膜性成分多不饱和脂肪酸的终产物,组织 MDA 水平是反映自由基损伤程度的重要指标^[11]。SOD 是体内主要的酶性自由基清除剂,清除过程中 SOD 被大量消耗,所以 MDA 和 SOD 水平可反映机体脂质过氧化损伤程度。本试验中 MIRI 组血清心肌酶含量增高,同时血浆和心肌中 MDA 水平升高而心肌 SOD 水平下降,提示心肌的脂质过氧化可能参与了 MIRI,推测 SOD 水平降低与在清除自由基过程中被大量消耗有关。

目前发现,ADP 也有抗氧化应激的作用,能减少活性氧产生并改善内皮功能^[12];通过细胞培养和临床实验都证实了 ADP 可以改善细胞氧化应激状况^[13-14]。有学者通过 ADP 对人心肌细胞氧化应激的干预指出,ADP 可以通过降低衔接蛋白 P66shc mRNA 表达,使磷酸化的 p66shc 表达减少,降低人心肌细胞的氧化应激水平^[15]。此外袁芳等^[16]也通过动物实验证实 ADP 能通过刺激腺苷活化蛋白激酶磷酸化而抑制活性氧产生和减少 MDA 的生成,从而减缓氧化应激反应。

在临床实验中也提示 ADP 和氧化应激也有关系^[13]。林书坡等^[3]通过临床病例分析指出,ADP 与冠状动脉粥样硬化过程中的脂质代谢异常及氧化应激密切相关,ADP 和机体氧化应激状态可能在冠心病包括急性心梗的发病中起重要作用。本实验中 ADP 组血浆和心肌 MDA 含量下降而心肌 SOD 含量升高,提示减少脂质过氧化和加强自由基清除可能参与了 ADP 后处理对 MIRI 的保护;MIRI 组血清心肌酶含量增高,同时血浆和心肌 MDA 含量升高而心肌 SOD 含量下降,提示心肌的脂质过氧化参与了 MIRI。

通过脂联素等药物 IPO 对大鼠 MIRI 的研究,提示是否临床可以对急性心梗患者采取类似的药物后处理来保护缺血心肌。综上所述,本实验从药物后处理的角度对 MIRI 的防治进行了探讨,提示 ADP 缺血后处理对大鼠 MIRI 具有保护作用,可能与增强自由基清除和减少脂质过氧化反应相关,但深入机制还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 吴芹,孙红,杨留才,等. 热量限制通过 AMPK 途径恢复老年大鼠心脏缺血预处理效应的实验观察[J]. 中国老年学杂志, 2011, 31(1): 77-80.
- [2] 高建芝,赵林静,张婧君,等. 脂联素及其受体在 LIPC 抗 MIRI 大鼠心肌细胞凋亡中的作用[J]. 重庆医学, 2013, 42(36): 4427-4429.
- [3] 林书坡,周更苏,孙孟军,等. 冠状动脉粥样硬化性心脏病患者血清脂联素水平与氧化型低密度脂蛋白及血脂的关系[J]. 山东医药, 2013, 53(17): 36-37.
- [4] 刘悦,彭云水,刘雅,等. P13K/Akt/eNOS 信号转导通路在七氟醚后处理减轻大鼠心肌缺血再(下转第 3769 页)

h 后对细胞的损伤与对照组相比差异具有统计学意义。而 24 h 组的细胞存活率较低,不利于之后实验的进行。6 h 组 200 U/mL 凝血酶与 12 h 组 150 U/mL 凝血酶相比,二者对细胞的损伤无明显差异,而 150 U/mL 的凝血酶与脑出血血肿内凝血酶浓度更为接近。凝血酶合并缺氧在不同时间均可以造成细胞损伤,随着时间的延长及凝血酶浓度的增加,对细胞的损伤逐渐加重,故选择 150 U/mL 凝血酶在缺氧作用 12 h 后为研究凝血酶合并缺氧对 PC12 细胞损伤的最佳模型条件。

凝血酶的分子信号作用是通过其受体的介导来实现的,但其作用的确切靶点及信号转导通路尚未明确,通过对凝血酶合并缺氧对 PC12 细胞损伤模型的探索,进一步研究凝血酶对神经细胞损伤的相关机制,为实现防治 AIS 后凝血酶毒性作用可能具有更大的理论和现实意义。

参考文献

- [1] 中华医学会神经病学分会;脑血管病学组急性缺血性脑卒中诊治指南撰写组. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2010[J]. 中国全科医生,2011,14(12B):4013-4017.
- [2] 吴江. 神经病学[M]. 北京:人民卫生出版社,2005:158.
- [3] Karaszewski B, Wardlaw JM, Marshall I, et al. Early brain temperature elevation and anaerobic metabolism in human acute ischaemic stroke[J]. Brain, 2009, 132(Pt 4):955-964.
- [4] Brouns R, De Deyn PP. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke[J]. Clin Neurol Neurosurg, 2009, 111(6):483-495.
- [5] Mccoll BW, Allan SM, Rothwell NJ. Systemic infection, inflammation and acute ischemic stroke[J]. Neuroscience,

2009,158(3):1049-1061.

- [6] 安泳潼,夏玉叶,闵旸. 缺血性脑卒中的发病机制及其治疗[J]. 世界临床药物,2010,31(1):35-39.
- [7] Chen B, Friedman B, Whitney MA, et al. Thrombin activity associated with neuronal damage during acute focal ischemia[J]. J Neurosci, 2012, 32(22):7622-7631.
- [8] Ma L, Dorling A. The roles of thrombin and protease-activated receptors in inflammation [J]. Semin Immunopathol, 2012, 34(1):63-72.
- [9] 何金婷,莽靖,郭洪亮,等. PC12 细胞转化为神经元样细胞的培养、鉴定及氧糖剥夺模型的制备[J]. 中国实验诊断学,2012,16(5):769-771
- [10] Alabanza LM, Bynoe MS. Thrombin induces an inflammatory phenotype in a human brain endothelial cell line[J]. J Neuroimmunol, 2012, 245(1/2):48-55.
- [11] Barreto AD, Alexandrov AV, Lyden P, et al. The argatroban and tissue-type plasminogen activator stroke study: final results of a pilot safety study[J]. Stroke, 2012, 43(3):770-775.
- [12] Gorbacheva L, Pinelis V, Ishiwata S, et al. Activated protein C prevents glutamate- and thrombin-induced activation of nuclear factor-kappaB in cultured hippocampal neurons[J]. Neuroscience, 2010, 165(4):1138-1146.
- [13] Hosomi N, Naya T, Kohno M, et al. Efficacy of anti-coagulant treatment with argatroban on cardioembolic stroke [J]. J Neurol, 2007, 254(5):605-612.

(收稿日期:2016-02-13 修回日期:2016-04-06)

(上接第 3765 页)

- 灌注损伤中的作用[J]. 中华麻醉学杂志,2012,32(3):371-375.
- [5] Göksen D, Levent E, Kar S, et al. Serum adiponectin and hsCRP levels and non-invasive radiological methods in the early diagnosis of cardiovascular system complications in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus[J]. J Clin Res Pediatr Endocrinol, 2013, 5(3):174-181.
- [6] Lin T, Qiu Y, Liu Y, et al. Expression of adiponectin and its receptors in type 1 diabetes mellitus in human and mouse retinas[J]. Mol Vis, 2013, 19(6):1769-1778.
- [7] Leonardi F, Passeri B, Fusari A, et al. Cardiac troponin I (cTnI) concentration in an ovine model of myocardial ischemia[J]. Res Vet Sci, 2008, 85(1):141-144.
- [8] 黄晓玲,陈柏梁,仇焯,等. 血清肌钙蛋白 I,血浆脑钠肽联合心脏 Tei 指数评估窒息新生儿心肌损伤及心功能[J]. 实用儿科临床杂志,2014,29(14):1112-1114.
- [9] Lappas M, Mitton A, Mittion A, et al. In response to oxidative stress, the expression of inflammatory cytokines and antioxidant enzymes are impaired in placenta, but not adipose tissue, of women with gestational diabetes[J]. J Endocrinol, 2010, 204(1):75-84.

- [10] Misra MK, Sarwat M, Bhakuni P, et al. Oxidative stress and ischemic myocardial syndromes[J]. Medical Science Monitor, 2009, 15(10):209-219.
- [11] 杨进城,王志伟,李朝龙,等. 大鼠肝肠缺血再灌注对远隔器官损伤作用的实验研究[J]. 第一军医大学学报,2004,24(2):198-200,203.
- [12] 王正,金振晓,易蔚,等. 脂联素受体 1 结合蛋白表达抑制对脂联素抗小鼠心肌缺血/再灌注损伤作用的影响[J]. 中国体外循环杂志,2014,12(2):117-120.
- [13] 张磊,孙娟,李伟. 脂联素对高糖环境下胰岛细胞增殖及氧化应激水平的影响[J]. 基础医学与临床,2013,33(10):1066-1069.
- [14] 何秋蓉,余霆,李萍. 代谢综合征氧化应激与血清脂联素水平的关系[J]. 四川大学学报:医学版,2009,40(4):623-627.
- [15] 李美蓉,李兴. 脂联素对高糖环境心肌细胞氧化应激及凋亡的影响[J]. 医学研究杂志,2012,41(6):67-70.
- [16] 袁芳,刘映红,田俊玮,等. 脂联素对糖尿病大鼠的肾脏保护作用及其抗氧化机制探讨[J]. 南方医科大学学报,2010,30(3):426-430.

(收稿日期:2016-02-11 修回日期:2016-04-06)