文章编号:1000-5404(2008)12-1163-04

论著

促红细胞生成素预处理对心肌缺氧复氧损伤心脏血流动力学的影响

秦 川,肖颖彬,陈 林,钟前进,王学锋 (第三军医大学新桥医院全军心血管外科中心,重庆 400037)

摘 要:目的 观察促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)预处理在大鼠心肌缺氧复氧损伤中对其心脏血流动力学的影响,并研究其可能机制。**方法** 将Wistar成年雄性大鼠60只用随机数字表法分为对照组及EPO预处理组(EPO组),每组30只,EPO组大鼠经腹腔注射5 000 U/kg重组人促红细胞生成素(recombinant human erythropoietin, RHuEPO),对照组注射同体积生理盐水。两组中的各15只大鼠于给药24 h后检测各指标,其余各15只大鼠置于常压缺氧环境中(O_2的体积分数为7%)12 h后,移至常压常氧环境中2 h。采集血及心肌标本,通过全自动生化分析仪检测血清心肌酶活性,采用TUNEL法检测心肌细胞凋亡,免疫组化法检测凋亡效应酶caspase-3蛋白表达水平,并分别于复氧30、60、120 min后观察心脏血流动力学指标,包括$+dp/dt_{max}$、$-dp/dt_{max}$、LVSP、LVEDP、HR。**结果** 损伤前两组大鼠血清心肌酶活性、心肌细胞凋亡率以及心脏血流动力学各指标无显著差异($P>0.05$),损伤后EPO组大鼠血清心肌酶活性、心肌细胞凋亡率及caspase-3蛋白表达水平显著低于对照组($P<0.05$,$P<0.01$),复氧后30、60、120 min EPO组的$\pm dp/dt_{max}$显著高于对照组($P<0.05$),复氧30、60 min EPO组的LVSP显著高于对照组($P<0.05$)。**结论** EPO预处理能促进心肌缺氧复氧损伤后心脏舒缩功能的维持及恢复,这一作用可能与其抗凋亡心肌保护效应有关。

关键词: 促红细胞生成素;心肌;缺氧复氧损伤;血流动力学
中图法分类号: R331.31;R364.4;R654.2 **文献标识码:** A

Effects of erythropoietin pretreatment on cardiac hemodynamics of rats insulted with hypoxia/reoxygenation injury

QIN Chuan, XIAO Ying-bin, CHEN Lin, ZHONG Qian-jin, WANG Xue-feng (Cardiovascular Surgery Center, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To observe the effect of erythropoietin(EPO) pretreatment on the cardiac hemodynamic indexes and to explore the possible mechanism. **Methods** Sixty male adult Wistar rats were randomly divided into 2 groups: control group and EPO pretreatment group (EPO group), each with 30 rats. recombinant human erythropoietin (RHuEPO) of 5 000 U/kg was injected peritoneally to the rats in EPO group while the same volume of saline to the control group. In 24 h after the pretreatment, all the designed indexes in this study were examined 15 rats of each group. The other 15 rats in each group were insulted with hypoxia ($O_2$7%) for 12 h and then treated with normoxia for 2 h. Blood and myocardium were collected from all the rats. Serum myocardial enzyme activity, apoptosis and cardiac hemodynamics were detected. **Results** No difference was found in myocardial enzyme activity, apoptosis and cardiac hemodynamics between the 2 groups before hypoxia/reoxygenation injury (H/R) ($P>0.05$). After H/R, myocardial enzyme activity, apoptotic rate and the expression of caspase-3 protein were much lower in EPO group than in the control group ($P<0.05$, $P<0.01$), At 30, 60 and 120 min of reoxygenation, $+dp/dt_{max}$ was higher in EPO group than in control group ($P<0.05$), and at 30 min and 60 min LVSP in EPO group was higher than that in the control group ($P<0.05$). **Conclusion** EPO pretreatment can improve the maintenance and recovery of cardiac function in rats with H/R, which may be related to the anti-apoptotic effect of EPO in myocardium.

Key words: erythropoietin; myocardium; hemodynamics

促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)是一种造血细胞因子,主要用于治疗由多种原因所致的贫血,如肾衰、肿瘤化疗及外科手术等。研究表明,EPO具有直接组织保护作用,在神经组织、肾脏、小肠、血管内皮、血管平滑肌、皮肤等多种组织的多种损伤因素作用下均具有显著的保护效应,而近年已有报道EPO具有直接心肌保护作用。为此,本研究观察提前24 h EPO预处理对心肌缺氧复氧后心脏血流动力学的影响,并

作者简介:秦 川,男,四川省新津县人,博士,主治医师,讲师,主要从事心肌保护方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)68774607
通信作者:肖颖彬,电话:(023)68755607
收稿日期:2007-07-23;修回日期:2007-11-12

进而观察其对心肌凋亡的作用,以探讨 EPO 预处理的直接心肌保护效应。

1 材料与方法

1.1 材料

兔抗鼠 caspase-3 抗体(北京中山生物公司),SABC 免疫组化检测试剂盒、TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒均购于武汉博士德生物工程有限公司,八道生理记录仪,全自动生化分析仪。

1.2 实验动物及分组

雄性 Wistar 大鼠共 60 只,体质量 200 ~ 220 g,由本校大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。以随机数字表法将实验动物分为 2 组,每组 30 只:EPO 组,腹腔注射 5 000 U/kg RHuEPO;对照组,经腹腔注射同体积生理盐水。每组中各 15 只大鼠于预处理 24 h 后进行检测,其余各 15 只大鼠于预处理 24 h 后给予缺氧复氧损伤,然后进行检测。

1.3 心肌缺氧复氧损伤模型的建立

参照 Azhar 等[1]方法建立大鼠心肌缺氧复氧损伤模型,采用本院研制的医学实验自动测控舱,模拟常压缺氧环境(O_2 的体积分数为 7%),缺氧 12 h 后,于常压常氧下复氧 2 h。

1.4 心脏血流动力学检测

麻醉并仰卧固定动物,分离一侧颈总动脉,将末端带有微压力传感器的导管插入左心室,连接至八道生理记录仪以记录左室内压力的变化曲线,计算复氧 30、60、120 min 后大鼠的左心室内压上升及下降的最大速度($-dp/dt_{max}$, $+dp/dt_{max}$)、心率(HR)、左室舒张末压(LVEDP)、左室收缩压(LVSP)。

1.5 血及心肌标本的采集及指标检测

心脏血流动力学指标检测完毕后,剪开大鼠胸壁,暴露心脏,自主动脉采取动脉血 2 ml,静置 30 min 后,3 000 r/min 离心 10 min,留取上清液,以全自动生化分析仪检测 CK、CK-MB 及 LDH 活性。采血后,于动脉放血,结扎出入心脏大血管,在右心室剪一小口,将预冷的 D-Hanks 液注入左室腔,逆行灌注 4 ~ 5 min,于心尖部沿心脏横轴取心室肌,甲醛固定,作心肌 caspase-3 免疫组化染色,并用 TUNEL 法检测细胞凋亡。

1.6 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 统计软件进行 t 检验和单因素方差分析。

2 结果

2.1 心脏血流动力学指标检测结果

损伤前两组大鼠心脏血流动力学各指标无显著差异($P > 0.05$)。对照组大鼠复氧 30、60、120 min 后 $+dp/dt_{max}$ 及 $-dp/dt_{max}$ 显著低于损伤前对照组($P < 0.01$, $P < 0.05$),LVSP 于复氧后 30、60 min 显著低于损伤前对照组($P < 0.01$, $P < 0.05$);复氧后其 $+dp/dt_{max}$ 及 $-dp/dt_{max}$ 逐渐恢复,复氧 60 min 较复氧 30 min 显著升高($P < 0.05$),而复氧 120 min 则较复氧30 min 和 60 min 显著升高($P < 0.01$, $P < 0.05$),LVSP 也逐渐恢复,复氧 60 min LVSP 显著高于复氧 30 min($P < 0.01$)。EPO 组大鼠复氧 30、60 min $+dp/dt_{max}$ 显著低于损伤前对照组($P < 0.01$, $P < 0.05$),复氧 30、60、120 min $-dp/dt_{max}$ 显著低于损伤前对照组($P < 0.01$, $P < 0.05$),LVSP 于复氧后 30 min 显著低于损伤前对照组($P < 0.05$);复氧后其 $+dp/dt_{max}$、$-dp/dt_{max}$ 及 LVSP 恢复趋势同对照组。与对照组大鼠比较,复氧 30、60、120 min,EPO 组大鼠 $-dp/dt_{max}$、$+dp/dt_{max}$ 均较高($P < 0.05$),复氧 30、60 min 其 LVSP 显著高于相应时间点对照组($P < 0.05$)。两组各时间点 LVEDP 及 HR 无显著差异($P > 0.05$,表 1)。

2.2 血清心肌酶活性

损伤前两组血清心肌酶活性无显著差异($P > 0.05$),损伤后两组血清 CK、LDH、CK-MB 均显著高于损伤前($P < 0.01$),EPO 组的血清 LDH、CK、CK-MB 显著低于对照组($P < 0.05$, $P < 0.01$),见表 2。

表 2 血清心肌酶活性 (U/L, $n = 15$, $\bar{x} \pm s$)

组别	LDH	CK	CK-MB
损伤前对照组	552.32 ± 94.02	635.26 ± 110.67	593.97 ± 121.3
损伤后对照组	1335.14 ± 223.75[a]	2561.09 ± 439.98[a]	1982.11 ± 356.31[a]
损伤后 EPO 组	1023.22 ± 198.83[ab]	1872.77 ± 302.64[ac]	1088.44 ± 223.89[ac]

a: $P < 0.01$,与损伤前对照组比较; b: $P < 0.05$, c: $P < 0.01$,与损伤后对照组比较

2.3 心肌 caspase-3 表达变化

心肌 caspase-3 免疫组化染色,阳性信号呈棕黄色,位于细胞质。损伤前两组心肌 caspase-3 表达较呈弱阳性,组间无显著差异($P > 0.05$)。损伤后,两组 caspase-3 表达较损伤前显著增强($P < 0.01$),但 EPO 组心肌低于对照组 ($P < 0.05$,图 1)。

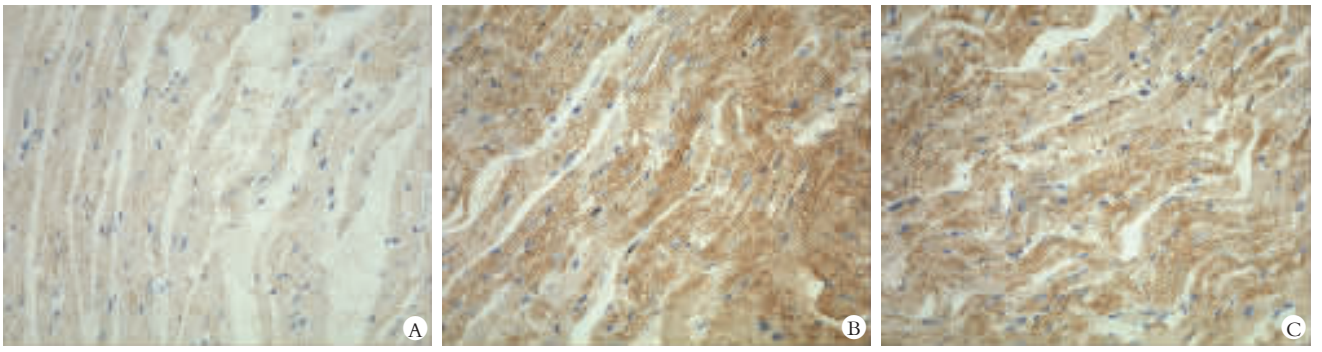
2.4 心肌细胞凋亡

TUNEL 染色,阳性的细胞核呈深棕黄色,损伤前两组大鼠心肌仅见极少染色阳性细胞核,组间差异不显著($P > 0.05$),对照组心肌细胞凋亡指数为(0.74 ± 0.12)%。缺氧复氧后两组阳性染色心肌细胞核较损伤前显著增多($P < 0.01$),对照组心肌细胞凋亡指数为(6.61 ± 0.55)%,EPO 组为(2.85 ± 0.43)%,而 EPO 组显著低于对照组($P < 0.01$,图 2)。

表 1 心脏血流动力学指标检测结果 ($n = 15$, $\bar{x} \pm s$)

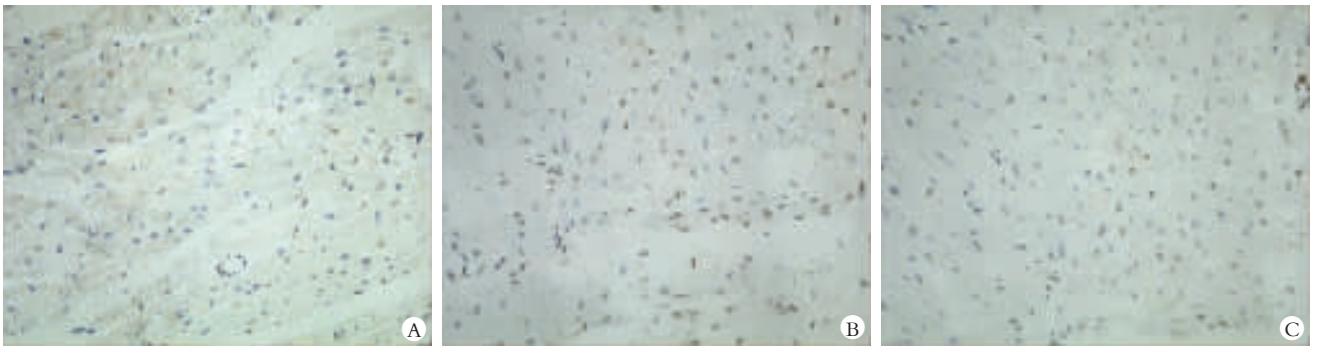
组别	HR(次/min)	LVSP(mmHg)	$+dp/dt_{max}$(mmHg/s)	$-dp/dt_{max}$(mmHg/s)	LVEDP(mmHg)
损伤前对照组	389.0 ± 34.0	123.78 ± 12.13	4635.0 ± 429.7	4442.0 ± 387.2	3.38 ± 1.23
复氧 30 min 对照组	407.0 ± 24.0	89.32 ± 11.33[b]	2968.0 ± 407.4[b]	2995.0 ± 525.5[b]	3.89 ± 1.12
复氧 30 min EPO 组	393.0 ± 31.1	105.38 ± 15.67[ac]	3591.0 ± 411.6[bc]	3482.0 ± 413.4[bc]	3.78 ± 1.69
复氧 60 min 对照组	388.0 ± 43.0	111.86 ± 9.47[a]	3579.0 ± 436.5[b]	3386.0 ± 434.5[b]	3.79 ± 1.38
复氧 60 min EPO 组	403.0 ± 37.9	121.96 ± 14.55[c]	4026.0 ± 343.7[ac]	3831.0 ± 357.8[ac]	3.81 ± 1.25
复氧 120 min 对照组	395.0 ± 13.0	118.88 ± 4.36	3965.0 ± 377.5[a]	3846.0 ± 385. 9[a]	4.03 ± 10.19
复氧 120 min EPO 组	410.0 ± 41.0	120.44 ± 10.22	4597.0 ± 416. 9[c]	4221.0 ± 396.1[ac]	3.75 ± 1.17

a: $P < 0.05$; b: $P < 0.01$,与损伤前对照组比较; c: $P < 0.05$,与复氧后各时间点对照组比较



A：损伤前对照组；B：损伤后对照组；C：损伤后 EPO 组

图 1　损伤前后 2 组心肌 caspase-3 蛋白的表达变化　（SABC ×400）



A:损伤前对照组;B:损伤后对照组;C:损伤后 EPO 组

图 2　损伤前后 2 组心肌细胞的凋亡变化　（TUNEL ×400）

3　讨论

EPO 为一经典造血因子,其主要作用为促进红系组细胞的分裂及分化,提高循环血成熟红细胞数量,因此主要用于治疗肾衰、化疗及手术等多种原因造成的贫血。已发现 EPO 除了造血作用外,还具有多种非造血生物作用,主要有抑制炎症反应,参与哺乳动物胚胎的正常发育,促进血管生长等,而最受关注的是其直接的组织保护效应。研究已证明 EPO 在神经组织包括大脑、脊髓、视网膜等、肾脏、血管内皮细胞、血管平滑肌细胞、小肠、皮肤等的缺血缺氧及其他损伤中具有直接组织保护效应[2-6]。

EPO 的直接心肌保护效应是近年的新发现,无疑为临床缺血性心脏疾病的防治以及体外循环下心脏手术中的心肌保护提供了新的研究方向。Juul 等[7]对 EPO 及其受体在人胚胎发育过程中组织分布的研究中发现,人胚胎发育早期心肌能够表达 EPOR mRNA,此后,Tramontano 等[8]以免疫组化及 Western blot 进一步证实新生大鼠心室肌细胞能够表达 EPOR 蛋白,Cai 等[9]采用 RT-PCR 证实了成年大鼠心脏能够表达 EPOR 的 mRNA,这些发现表明心肌细胞能够表达 EPO 受体,因此 EPO 可以直接作用于心肌细胞。Tramontano 等[8]在对体外培养的乳鼠心肌细胞缺氧复氧和大鼠心肌缺血再灌注损伤的研究中发现,TUNEL、流式细胞技术及 caspase-3/7 活性检测等表明外源性给予 RHuEPO 明显抑制心肌细胞凋亡。Cai 等[9]的研究也发现以 RHuEPO 预处理大鼠,能够明显抑制 24 h 后离体灌注心脏缺血再灌注损伤所致的心肌细胞凋亡,并促进心功能恢复。最近也有研究进一步证明了 EPO 的直接心肌保护效应[10-12]。然而关于 EPO 的处理时机还存在争议,是缺血/缺氧前预处理,缺血/缺氧后处理,还是再灌注/复氧后处理,尚无定论,为此本研究观察了提前 24 h 以 EPO 5 000 U/kg 腹腔注射预处理大鼠对复氧后不同时间点心脏血流动力学的影响,发现 EPO 预处理显著改善复氧后不同时间点反映心脏舒缩功能的心脏血流动力学指标的恢复,包括 $+dp/dt_{max}$、$-dp/dt_{max}$ 以及 LVSP 等,同时抑制损伤后血清心肌酶活性升高,包括 CK,CK-MB 以及 LDH 等,证明 EPO 预处理在心肌缺氧复氧损伤中具有显著的心肌保护效应。进一步研究表明 EPO 预处理显著抑制损伤后心肌凋亡效应酶 caspase-3 表达增加,同时 TUNEL 法检测表明其显著抑制损伤后心肌细胞凋亡,证明 EPO 预处理在心肌缺氧复氧损伤中可产生抗凋亡心肌保护效应。众所周知,心肌细胞凋亡是心肌缺血/再

灌注或缺氧/复氧中的重要损伤途径,可直接导致心肌细胞数量减少,即心脏有效收缩单元减少,从而使心脏舒缩功能下降,还可参与心肌损伤后心肌梗死面积的增加及梗死后心肌重构等过程。因此,如何抑制心肌细胞凋亡已成为心肌保护研究的重要方向,本研究表明 EPO 预处理显著抑制缺氧复氧损伤后心肌细胞凋亡,从而抑制心肌细胞数量减少以及心脏有效收缩单元的减少,进而促进损伤后心脏舒缩功能的维持及恢复。

总之,提前 24 h 以 EPO 预处理,显著改善缺氧复氧损伤后心脏舒缩功能的恢复,这一作用可能与 EPO 预处理的抗凋亡心肌保护效应有关。

参考文献:

[1] Azhar G, Liu L, Zhang X, *et al*. Influence of age on hypoxia/reoxygenation-induced DNA fragmentation and bcl-2, bcl-xl, bax and fas in the rat heart and brain[J]. Mech Aging Dev, 1999, 112(1): 5 - 25.

[2] Juul S. Erythropoietin in the central nervous system, and its use to prevent hypoxic-ischemic brain damage[J]. Acta Paediatr Suppl, 2002, 91(438): 36 - 42.

[3] Yang C W, Li C, Jung J Y, *et al*. Preconditioning with erythropoietin protects against subsequent ischemia-reperfusion injury in rat kidney [J]. FASEB J, 2003, 17(12): 1754 - 1755.

[4] Chatterjee P K. Pleiotropic renal actions of erythropoietin[J]. Lancet, 2005, 365(9474): 1890 - 1892.

[5] Buemi M, Vaccaro M, Sturiale A, *et al*. Recombinant human erythro poietin influences revascularization and healing in a rat model of random ischaemic flaps[J]. Acta Derm Venereol, 2002, 82 (6): 411 - 417.

[6] Bahlmann F H, Song R, Boehm S M, *et al*. Low-dose therapy with the long-acting erythropoietin analogue darbepoetin alpha persistently activates endothelial Akt and attenuates progressive organ failure[J]. Circulation, 2004, 110(8): 1006 - 1012.

[7] Juul S E, Yachnis A T, Chistensen R D. Tissue distribution of erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human fetus[J]. Early Hum Dev, 1998, 52 (3): 235 - 249.

[8] Tramontano A F, Muniyappa R, Black A D, *et al*. Erythropoietin protects cardiac myocytes from hypoxia-induced apoptosis through an Akt-dependent pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 308 (4): 990 - 994.

[9] Cai Z, Manalo D J, Wei G, *et al*. Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury[J]. Circulation, 2003, 108(1): 79 - 85.

[10] Hirata A, Minamino T, Asanuma H, *et al*. Erythropoietin enhances neovascularization of ischemic myocardium and improves left ventricular dysfunction after myocardial infarction in dogs[J]. J Am Coll Cardiol, 2006, 48(1): 176 - 184.

[11] Nishiya D, Omura T, Shimada K, *et al*. Effects of erythropoietin on cardiac remodeling after myocardial infarction[J]. J Pharmacol Sci, 2006, 101(1): 31 - 39.

[12] 秦 川, 肖颖彬, 钟前进, 等. NF-κB 在 EPO 预处理对培养心肌细胞缺氧/复氧损伤保护效应中作用的研究[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(22): 2223 - 2225.

(编辑 薛国文)

(上接 1158 页)

分均为 10 分,身长约 47 cm,外观未见明显畸形,胎盘、胎膜剥离完整,连续缝合子宫切口后行子宫肌瘤剥除术。术中剥除子宫肌瘤 3 枚,总质量约 2 kg。手术顺利,术中出血约 200 ml,术后给予抗感染、对症等治疗,术后病检结果提示肌瘤坏死伴纤维化。术后第 8 天患者痊愈出院。

2 讨论

子宫肌瘤是女性生殖器官最常见的良性肿瘤,常见于 30 ~ 50 岁妇女,是导致女性患者不孕的常见原因之一。肌瘤合并妊娠占肌瘤患者的 0.5% ~ 1%,占妊娠 0.3% ~ 0.5%。肌瘤对妊娠及分娩的影响与肌瘤大小及生长部位有关[1]。本例患者第 1 次妊娠后发生自然流产,后 2 年内未避孕一直未孕,显然受子宫肌瘤的影响。本例患者子宫肌瘤巨大,有妊娠失败及不孕的病史,可见有临床处理的指征。目前传统的治疗方法为肌瘤剥除术,但行肌瘤剥除术以后给子宫留下手术疤痕,给将来妊娠带来一定的风险。近年来子宫动脉栓塞术(UAE)为子宫肌瘤的治疗带来了新的理念。UAE 手术操作简单,而且在子宫上没有留下任何疤痕。在采取 UAE 治疗后,患者肌瘤缩小并成功妊娠。由此可见,子宫肌瘤患者采取 UAE 治疗不失为一种理想选择。但 UAE 治疗有其自身特点,即通过阻断肌瘤血供而使肌瘤缺血、坏死、吸收,因此需要一定的时间才能使肌瘤缩小。再者,手术在 X 线环境下进行,放射线对卵巢造成一定的辐射损伤。鉴于对介入治疗是否对患者的生育功能和性功能有明显影响,刘萍等[2]对 694 例子宫肌瘤患者行 UAE 治疗后观察发现,UAE 治疗后自然受孕的平均时间最早为 3 个月,平均为 15 个月,提示卵巢在术后 3 个月内可恢复排卵,但考虑到射线的影响和治疗后 1 ~ 6 个月子宫处于肿瘤坏死吸收的高峰阶段,子宫水肿和容易收缩以利于肿瘤的吸收,对妊娠是不利的,故建议治疗后 6 个月后受孕相对安全,1 ~ 2 年可能是较佳的妊娠时间。本例患者 UAE 术后半年妊娠,至妊娠足月选择剖宫产分娩,术中剥除肌瘤后无大出血发生,其新生儿未见明显畸形,均很好地回答了上述的疑问。

总之,UAE 是一门新兴的治疗方法,其安全性及有效性还有待时间的检验和临床大样本的观察总结。

关键词: 子宫肌瘤;妊娠;介入治疗

中图法分类号: R737.33 **文献标识码:** B

参考文献:

[1] 乐 杰. 妇产科学[M]. 第 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 269 - 272.

[2] 刘 萍, 陈春林, 高绿芬, 等. 子宫肌瘤行子宫动脉栓塞治疗后妊娠及结局分析[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2006, 22(6): 446 - 448.

(编辑 吴培红)