论著

文章编号:1000-5404(2009)02-0128-04

罗格列酮抑制粘附分子表达减轻大鼠急性心肌梗死再灌注后无再流

何 泉,雷 寒,覃 数,马康华 (重庆医科大学附属第一医院心血管内科,重庆 400016)

摘 要:目的 观察罗格列酮对大鼠急性心肌梗死(acute myocardial infarction,AMI)再灌注后无再流的影响及其机制。**方法** 45只SD大鼠分为假手术组、生理盐水组、罗格列酮组(3 mg·kg^{-1}·d^{-1},共14 d),每组15只,后2组大鼠行冠状动脉结扎3 h,松解2 h建立AMI再灌注后无再流模型。以病理染色法检测无再流面积;化学比色法检测再灌注区心肌髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)活性;以免疫组化及RT-PCR方法检测再灌注区细胞间粘附分子-1(intercellular adhesion molecule-1,ICAM-1)和P-选择素蛋白及mRNA的表达。**结果** ①罗格列酮组心肌无再流范围较生理盐水组显著减小($P<0.01$);②生理盐水组心肌MPO酶活性、ICAM-1及P-选择素蛋白及mRNA表达水平较假手术组均显著升高($P<0.01$),罗格列酮组上述指标较生理盐水组显著降低($P<0.05$)。**结论** 罗格列酮能有效减小大鼠急性心肌梗死再灌注后无再流范围,其机制可能与抑制再灌注后内皮ICAM-1及P-选择素的表达,进而减少中性粒细胞的粘附及聚积有关。

关键词: 无再流现象;心肌梗死;罗格列酮;细胞间粘附分子-1;P-选择素
中图法分类号: R392.32;R542.22;R977 **文献标识码:** A

Rosiglitazone reduces no-reflow area following reperfusion after AMI by inhibiting adhesion molecules in rats

HE Quan, LEI Han, QIN Shu, MA Kang-hua (Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the mechanism by which rosiglitazone affects no-reflow following reperfusion after acute myocardial infarction (AMI). **Methods** Forty-five SD rats were randomly divided into sham-operated group, normal saline treated group and rosiglitazone treated group (at dose of 3 mg·kg^{-1}·d^{-1}, for 14 d), 15 rats in each group. To establish no-reflow model, the rats of the latter two groups received coronary artery ligation for 3 h and reopening for 2 h. Then pathological staining for no-reflow area, chemical assay for MPO activity, immunohistochemistry and RT-PCR for protein and mRNA expressions of ICAM-1 and P-selectin in myocardium were performed. **Results** No-reflow area in rosiglitazone treated group was significantly reduced, compared with that in normal saline treated group ($P<0.01$). The MPO activity, protein and mRNA expressions of ICAM-1 and P-selectin in normal saline treated group were significantly increased ($P<0.01$), compared with that in sham-operated group, whereas those were significantly inhibited ($P<0.05$) in rosiglitazone treated group. **Conclusion** Rosiglitazone can effectively reduce no-reflow area following reperfusion after AMI in rats, probably through downregulating ICAM-1 and P-selectin expressions in the myocardium after reperfusion and thereby further inhibiting adhesion and accumulation of neutrophil.

Key words: no-reflow phenomenon; myocardial infarction; rosiglitazone; intercellular adhesion molecule-1; P-selectin

急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)急诊冠脉血运重建后心肌微血管无再流现象(no-reflow phenomenon, NR)严重影响了AMI近、远期预后[1],目前尚无十分理想的防治办法。相关的研究提示,心肌微血管的再灌注损伤是无再流的重要机制之一,在这一过程中,细胞间粘附分子-1(intercellular adhesion molecule-1,ICAM-1)及P-选择素等粘附分子表达被激活,从而介导了中性粒细胞在微血管的粘附、聚集,进而引起心肌微血管的结构及功能障碍。罗格列酮是人工合成的过氧化物酶体增殖物激活受体-γ(peroxisome proliferators -activated receptors-γ, PPAR-γ)特异性激动剂,作为胰岛素增敏剂用于2型糖尿病的治疗。近年研究显示,罗格列酮激动PPAR-γ后,通过

基金项目:国家自然科学基金(30670869)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30670869)
作者简介:何 泉,男,四川省巴中市人,博士研究生,主治医师,讲师,主要从事冠心病的基础及临床方面的研究。E-mail: hequan822@yahoo.cn
通信作者:雷 寒,电话:(023)89012898
收稿日期:2008-04-02;修回日期:2008-06-26

转录转抑作用(transcriptional transrepression)而抑制 ICAM-1 及 P-选择素等粘附分子的表达,从而减轻心肌缺血再灌注损伤[2]。本实验以罗格列酮胃饲大鼠后,建立大鼠 AMI 再灌注后无再流模型,观察其对大鼠 AMI 再灌注后 ICAM-1、P-选择素等粘附分子表达及无再流范围的影响。

1　材料与方法

1.1　主要试剂

硫磺素(thioflavin-S)、伊文思蓝(Evan's blue)购自美国 Sigma 公司;兔抗鼠 ICAM-1 及 P-选择素(P-selectin)购自美国 Scat 公司;PCR 引物采用 Primer Premier 5.0 软件设计,由上海生物工程有限公司合成;免疫组化和 RT-PCR 试剂盒购自武汉博士德生物制剂有限公司;髓过氧化物酶(MPO)检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.2　实验动物及分组

健康清洁级 SD 大鼠 45 只,购自重庆医科大学实验动物中心,6～10 周龄,体质量 250～350 g,雌雄不拘,分为假手术组、生理盐水组、罗格列酮组,每组 15 只。罗格列酮组手术前 2 周每日 1 次胃饲罗格列酮 3 mg/kg。生理盐水组及假手术组以相同方法给予等量生理盐水。

1.3　模型建立

生理盐水组及罗格列酮组大鼠于给药后第 15 天,以 3.5% 水合氯醛 300 mg/kg 腹腔内注射麻醉,气管切开并插管,呼吸机机械通气,切开胸腔并暴露心脏,于冠状动脉前降支中段以 6-0 无损伤缝合线穿入冠脉下,带硅胶管结扎 3 h,再松解 2 h,建立急性心肌梗死再灌注模型。假手术组冠状动脉下穿线而不结扎。

1.4　无再流面积的测定

再灌注后 2 h,从右心室注入 4% 的硫磺素 1 ml/kg,使再灌注区着色,无再流区不着色;再于原位重新结扎前降支,从右心室再注入伊文思蓝,使结扎区外着蓝色,结扎区不着蓝色。立即取出心脏,并沿心脏长轴分为 4～5 个心肌短轴切片,即刻分别在日光及荧光下对切片拍照,利用图像分析软件计算出无再流心肌(荧光下不显色区)面积(area of no-reflow, ANR)、结扎区心肌(无蓝色)面积(ligation area, LA)、左室壁心肌面积(left ventricle wall area, LVWA);以 LA/LVWA 计算出 LA(%)表示结扎区心肌范围,以 ANR/LA 计算出 ANR(%)表示无再流范围。

1.5　MPO 活性检测

取再灌注区心肌组织约 100 mg,加入 5 g/L HTAB 2 ml 制备匀浆,冻融 3 次并超声粉碎(10 s×3 次),4 ℃ 3 000 r/min 离心 30 min,上清液 0.1 ml 加反应液 2.9 ml,温度保持在 25 ℃,在分光光度计 460 nm 波长下进行 2 min 的扫描,记录第 30 秒和第 90 秒的吸光度差值,以 1 min 内吸光度的变化代表酶活力的改变,MPO 活力单位为(U/g)。

1.6　免疫组织化学检测

再灌注后 2 h,取再灌注区心肌组织,冰冻切片(片厚 14 μm),10% 甲醛固定,2% 血清封闭 2 h,一抗(兔抗鼠 ICAM-1 或 P-选择素抗体,1∶200)4 ℃孵育过夜;二抗(生物素标记的羊抗兔 IgG,1∶100)37 ℃,2 h;SABC 复合物(链霉素-生物素-抗生物素-辣根过氧化酶复合物),37 ℃,2 h;DAB 显色,中性树脂封片。阴性对照以相同量的正常羊血清代替一抗。

1.7　RT-PCR 检测

再灌注后 2 h,再灌注区心肌组织 100 mg 提取总 mRNA,将提取的 mRNA 逆转录成 cDNA,将 cDNA 产物分管分别加入 ICAM-1、P-选择素及 β-actin 引物(表 1)进行 PCR 反应,取 PCR 产物各 5 μl,经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,拍照。

表 1　RT-PCR 所用引物片段长度及核苷酸序列

引物	片段长度(bp)	上游(5′→3′)	下游(5′→3′)
ICAM-1	209	AGGTATCCATCCATCCCACA	GCCACAGTTCTCAAAGCACA
P-选择素	175	TTCTCCTGCAACGAGGAGTT	GGTGTCGACAGGACATTGTG
β-actin	542	GACCTGACTGACTACCTCAT	AGCAAGCAGGAGTAGACGA

1.8　计算机图像分析

采用北航 CM-2000B 型生物医学图像分析系统对 ICAM-1、P-选择素免疫组化切片进行平均灰度测量,去除背景,记录平均灰度值作为统计值;RT-PCR 电泳图像输入计算机,以图像分析系统检测条带的积分灰度值,用 β-actin 条带为内参照进行校正,各条带的光密度值与 β-actin 条带的光密度值之比半定量表示其表达水平。

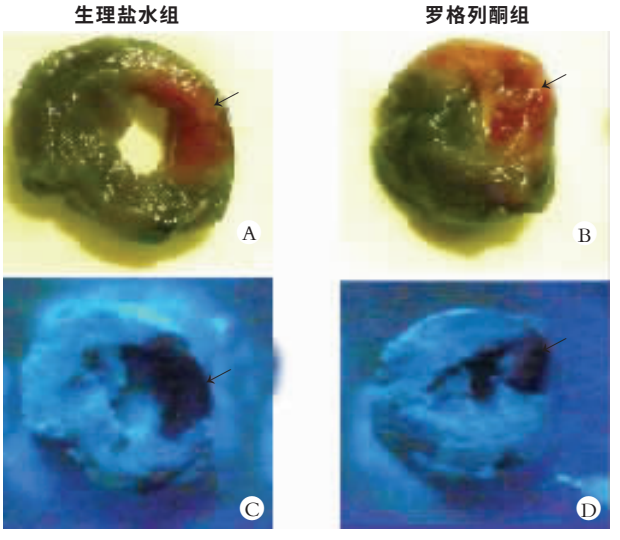
1.9　统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用统计软件 SPSS 10.0,多组间比较用方差分析,组间两两比较行 q 检验。

2　结果

2.1　罗格列酮对大鼠 AMI 再灌注后无再流范围的影响

伊文思蓝使结扎区外在日光下着蓝绿色,而结扎区(LA)则呈红色(图 1A、B);硫磺素于荧光下使再灌注区着白色荧光,无再流区(ANR)因不着荧光而呈黑色(图 1C、D)。图像分析结果表明:与生理盐水组比较,罗格列酮组结扎区心肌范围差异无统计学意义($P>0.05$);而罗格列酮组无再流范围显著小于生理盐水组($P<0.01$,表 2)。



A、B:伊文思蓝染色,↑:结扎区;C、D:硫磺素染色,↑:无再流区

图 1　罗格列酮对 AMI 再灌注后无再流范围的影响

表2 罗格列酮对大鼠AMI再灌注后无再流范围及MPO活性的影响($n=5$, $\bar{x}\pm s$)

组别	LA(%)	ANR(%)	MPO(U/g)
假手术组	-	-	0.25±0.03[a]
生理盐水组	24.9±1.98	71.1±6.56	12.51±1.86
罗格列酮组	24.1±2.12	41.6±4.67[a]	8.67±0.67[a]

a: $P<0.01$,与生理盐水组比较

2.2 罗格列酮对大鼠AMI再灌注后MPO酶活性的影响

与假手术组比较,生理盐水组心肌组织MPO活性显著增高($P<0.01$)。与生理盐水组比较,罗格列酮组心肌组织MPO活性显著降低($P<0.01$)。见表2。

2.3 免疫组化结果

免疫阳性染色血管显微镜下表现为深黄色或褐色,高倍光学显微镜下对每张切片中的免疫阳性染色血管数量人工计数,并用计算机图像分析系统测量平均灰度值。图像分析和统计处理结果表明:假手术组血管内皮ICAM-1呈低水平表达,P-选择素几乎无表达;与假手术组比较,生理盐水组ICAM-1、P-选择素于血管内皮表达显著增强($P<0.01$);与生理盐水组比较,罗格列酮组ICAM-1、P-选择素表达显著减弱($P<0.05$,图2、3,表3)。

2.4 mRNA表达的变化

PCR可以在相应地带显示有产物(图4、5),图像分析结果表明:假手术组心肌组织ICAM-1 mRNA、P-选择素mRNA呈低水平表达;与假手术组比较,生理盐水组ICAM-1 mRNA、P-选择素mRNA表达显著增强($P<0.01$);与生理盐水组比较,罗格列酮组ICAM-1 mRNA、P-选择素mRNA表达显著减弱($P<0.05$,表4)。

表3 罗格列酮对大鼠AMI再灌注后ICAM-1、P-选择素蛋白表达的影响($n=5$, $\bar{x}\pm s$)

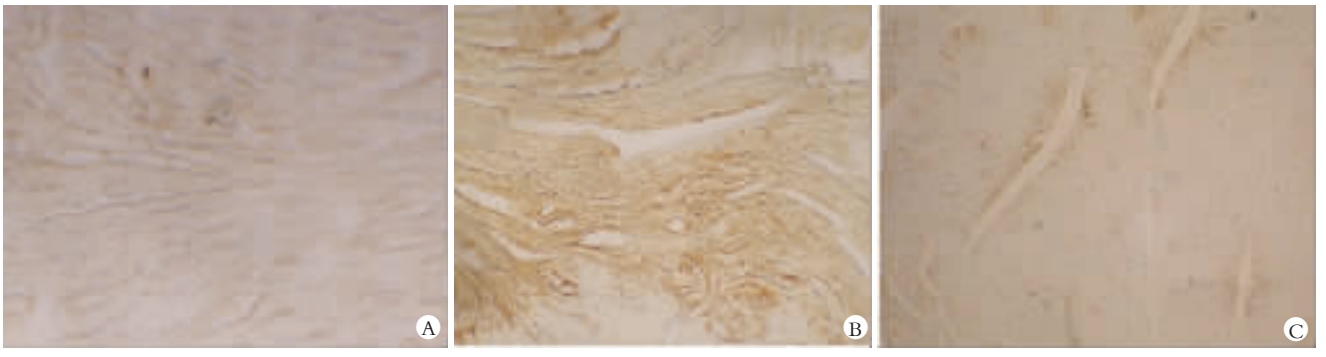
组别	ICAM-1	P-选择素
假手术组	0.07±0.03[a]	0.03±0.01[a]
生理盐水组	0.27±0.07	0.22±0.06
罗格列酮组	0.18±0.04[a]	0.12±0.04[a]

a: $P<0.05$,与生理盐水组比较

表4 罗格列酮对大鼠AMI再灌注后ICAM-1及P-选择素mRNA表达的影响($n=5$, $\bar{x}\pm s$)

组别	ICAM-1 mRNA	P-选择素 mRNA
假手术组	0.09±0.03[a]	0.02±0.01[a]
生理盐水组	0.23±0.06	0.19±0.05
罗格列酮组	0.19±0.04[a]	0.11±0.03[a]

a: $P<0.05$,与生理盐水组比较



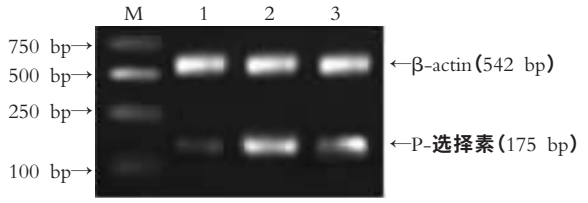
A:假手术组; B:生理盐水组; C:罗格列酮组

图2 罗格列酮抑制大鼠AMI再灌注后血管内皮ICAM-1蛋白的表达 (SABC ×200)



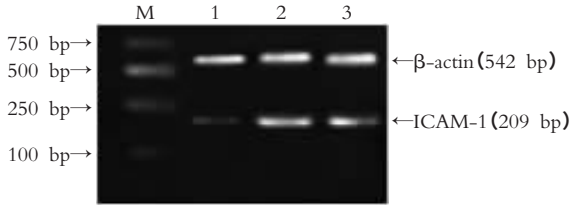
A:假手术组;B:生理盐水组;C:罗格列酮组

图3 罗格列酮抑制大鼠AMI再灌注后血管内皮P-选择素蛋白的表达 (SABC ×200)



M:DNA 标准(DL 2000); 1:假手术组; 2:生理盐水组; 3:罗格列酮组

图 4　罗格列酮抑制大鼠 AMI 再灌注后内皮 P-选择素 mRNA 的表达



M:DNA 标准(DL 2000); 1:假手术组; 2:生理盐水组; 3:罗格列酮组

图 5　罗格列酮抑制大鼠 AMI 再灌注后内皮 ICAM-1 mRNA 的表达

3　讨论

既往动物实验表明心肌缺血时间与再灌注时间是影响 AMI 再灌注后无再流的重要因素,缺血时间越长,无再流越重;再灌注后,随着再灌注时间的延长,无再流进行性扩展,多在最初 8 h 内达高峰[3,4]。本研究采用结扎大鼠冠状动脉左前降支 3 h 再通 2 h 的方法建立无再流模型,结果显示生理盐水组所有大鼠均存在大面积无再流区(平均达 71.1%),与 Zhao 等[5]构建的猪的无再流动物模型情况接近,表明本研究所采用的构建无再流模型的方法是可行的。

本研究结果表明,大鼠急性心肌梗死再灌注后 2 h 心肌组织 MPO 活性明显升高,无再流范围平均高达 71.1%,而罗格列酮预处理使再灌注后心肌 MPO 活性显著降低,同时无再流范围也显著减小。由于 MPO 活性是反映中性粒细胞浸润程度较可靠的指标,本实验结果提示中性粒细胞于再灌注区的粘附、聚集是无再流形成和发展的重要因素,而罗格列酮减小大鼠 AMI 再灌注后无再流范围与其抑制中性粒细胞于再灌注区的聚集有关。中性粒细胞参与无再流形成的机制较复杂,中性粒细胞的粘附与激活可以导致毛细血管机械性的阻塞,并释放活性氧、蛋白水解酶及脂质氧合酶等物质而产生细胞毒性作用,损伤微血管,造成结构性无再流;另一方面,激活的中性粒细胞及内皮细胞还可以释放大量的缩血管物质如内皮素-1、血管紧张素Ⅱ等,同时扩血管物质产生减少,使微血管持续而严重的痉挛,造成功能性无再流。

Jones 等[6-9]研究表明心肌缺血再灌注后数小时至数天内各种粘附分子表达显著增加,包括 P-选择素、E-选择素、CD18 及 ICAM-1,其中 P-选择素、E-选择素介导了白细胞于内皮的滚动(rolling),CD18 及 ICAM-1 则介导了白细胞与内皮细胞的牢固粘附。本研究表明,大鼠 AMI 再灌注后 2 h 血管内皮 ICAM-1、P-选择素蛋白质及 mRNA 水平表达均显著增强,罗格列酮预处理使再灌注后 ICAM-1、P-选择素蛋白及 mRNA 表达显著减弱,而且这种变化与再灌注后心肌 MPO 活性及无再流范围的变化明显同步,提示罗格列酮减小心肌无再流范围可能与其抑制再灌注后内皮 ICAM-1、P-选择素的表达,减少中性粒细胞于再灌注区聚集,进而减轻微血管再灌注损伤有关。近年还有研究表明罗格列酮还可能通过增加 NO 的产生而减轻再灌注损伤[10],本研究中罗格列酮减小无再流范围的作用是否与此有关,还值得进一步研究。

本实验结果显示,罗格列酮预处理可以显著减小大鼠 AMI 再灌注后无再流范围,其机制可能与其抑制再灌注后血管内皮 ICAM-1、P-选择素等粘附分子的表达,进而抑制中性粒细胞的粘附及聚积有关。鉴于临床无再流现象与无再流动物模型在发生机制上的差别,以及近年关于罗格列酮可能增加心血管风险的争议,所以,在罗格列酮用于临床无再流防治之前,还需要进行大量的临床研究来证实它对临床 AMI 再灌注后无再流的有效性及安全性,以及对 AMI 患者长期预后的影响。

参考文献:

[1] Wu K C, Zerhouni E A, Judd R M, *et al*. Prognostic significance of microvascular obstruction by magnetic resonance imaging in patients with acute myocardial infarction[J]. Circulation, 1998, 97(8): 765 – 772.

[2] Wayman N S, Hattori Y, McDonald M C, *et al*. Ligands of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR-gamma and PPAR-alpha) reduce myocardial infarct size[J]. FASEB J, 2002, 16(9): 1027 – 1040.

[3] Rochitte C E, Lima J A, Bluemke D A, *et al*. Magnitude and time course of microvascular obstruction and tissue injury after acute myocardial infarction[J]. Circulation, 1998, 98(10): 1006 – 1014.

[4] Reffelmann T, Kloner R A. Microvascular reperfusion injury: Rapid expansion of anatomic no reflow during reperfusion in the rabbit[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002, 283(3): H1099 – H1107.

[5] Zhao J L, Yang Y J, Cui C J, *et al*. Pretreatment with simvastatin reduces myocardial no-reflow by opening mitochondrial K(ATP) channel [J]. Br J Pharmacol, 2006, 149(3): 243 – 249.

[6] Jones S P, Trocha S D, Strange M B, *et al*. Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules in a chronic murine model of myocardial reperfusion injury[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000, 279(5): H2196 – H2201.

[7] Reffelmann T, Kloner R A. The no-reflow phenomenon: A basic mechanism of myocardial ischemia and reperfusion[J]. Basic Res Cardiol, 2006, 101(5): 359 – 372.

[8] Kloner R A, Giacomelli F, Alker K J, *et al*. Influx of neutrophils into the walls of large epicardial coronary arteries in response to ischemia/reperfusion[J]. Circulation, 1991, 84(4): 1758 – 1772.

[9] Nathan C F. Neutrophil activation on biological surfaces. Massive secretion of hydrogen peroxide in response to products of macrophages and lymphocytes[J]. J Clin Invest, 1987, 80(6): 1550 – 1560.

[10] 高凌云, 何作云, 牟　娇. 罗格列酮对 apoE 基因敲除小鼠血清 NOS/NO 的影响[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(11): 1204 – 1205.

(编辑　吴培红)