文章编号:1000-5404(2009)20-2009-04

论著

雌激素对大鼠心肌缺血再灌注损伤过程中心肌 HGF 表达的影响

王 彦[1],王冬梅[2],宫德正[2],许莹平[3],谢 玲[4],赵赫男[5] (大连医科大学:[1]附属第二医院实验中心,辽宁 大连 116023,[2]机能学教研室,[3]临床医学2005级七年制,[4]临床医学2003级七年制,[5]病理生理学教研室,辽宁 大连 116044)

摘 要:目的 观察17β-雌二醇(E_2)在大鼠心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia-reperfusion injury, MIRI)过程中对肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)mRNA的表达影响并探讨其与细胞凋亡的关系。**方法** 雄性SD大鼠40只,利用随机数字表将其分为缺血再灌注组(即对照组)、17β-雌二醇作用后的缺血再灌注组(即E_2作用组),每组20只。结扎大鼠冠状动脉左前降支20 min,再灌注30 min,造成心肌缺血再灌注损伤模型,观察17β-雌二醇对心肌HGF表达的影响,同时测定心肌细胞的凋亡。**结果** 心肌缺血20 min及再灌注30 min时,E_2作用组HGF mRNA表达均较对照组相应时点显著增高($P<0.05$)。TUNEL法检测E_2作用组再灌注30 min单位面积内心肌细胞凋亡较对照组明显减低($P<0.05$);同时流式细胞仪检测结果显示,E_2作用组亦显著低于对照组($P<0.05$)。对照组再灌注30 min及E_2作用组再灌注30 min的HGF mRNA表达变化与相应时间点的心肌细胞凋亡变化成负相关。**结论** 17β-雌二醇在大鼠心肌缺血再灌注损伤(MIRI)过程中可提高HGF的表达,来发挥抗凋亡作用。

关键词: HGF;17β-雌二醇;心肌缺血再灌注损伤;凋亡
中图法分类号: R322.11;R363;R977.12 **文献标识码:** A

E_2 upregulates HGF mRNA expression in rat heart during myocardial ischemia-reperfusion process

WANG Yan[1], WANG Dong-mei[2], GONG De-zheng[2], XU Ying-ping[3], XIE Ling[4], ZHAO He-nan[5] ([1]Laboratory Center, Second Affiliated Hospital, Dalian 116023, [2]Department of Functional Sciences, [3]7-year Program Student of Grade 2005, [4]7-year Program Student of Grade 2003, [5]Department of Pathophysiology, Dalian Medical University, Dalian 116044, Liaoning Province, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of 17β-estradiol (E_2) on the expression of hepatocyte growth factor (HGF) mRNA in the myocardial tissues in rats during myocardial ischemia-reperfusion (I/R) process, and explore the relationship between HGF mRNA expression and myocardial apoptosis. **Methods** Using the random number table, 40 male SD rats were divided into 2 groups (20 rats in each group) randomly, ischemia-reperfusion (control) group and E_2 treatment group. Myocardial I/R models of rats were duplicated by ligating the left anterior descending coronary artery for 20 min then reperfusion for 30 min. The expression of HGF and the apoptosis of myocardiocytes were observed with RT-PCR, TUNEL and flow cytometry. **Results** At the points of cardiac ischemia for 20 min and reperfusion for 30 min, in the E_2 treatment group, the expressions of HGF mRNA were significantly higher than corresponding points of the control group ($P<0.05$). After reperfusion for 30 min, the number of apoptosis cells per unit area in the E_2 treatment group was significantly lower than the control group. And the apoptosis rate of the E_2 treatment group was also lower than the control group ($P<0.05$). At the point of reperfusion of 30 min, the changing of cardiac HGF mRNA between with E_2 treatment and without had the negative relationship with the changing of apoptosis with the corresponding conditions. **Conclusion** E_2 can elevate the expression of HGF mRNA during myocardial ischemia-reperfusion process and then exert its protective effects during myocardial ischemia-reperfusion injury.

Key words: HGF; 17β-estradiol; myocardial ischemia-reperfusion injury; myocardial ischemia-reperfusion injury; apoptosis

自20世纪70年代以来,不断有关于心血管病的发病率具有性别差异的报道[1,2]。育龄期女性与男性比较,心血管系统疾病发病率低,而绝经后妇女的心血管疾病发病率显著增加[3]。绝经后给以雌激素替代疗法的妇女则冠心病、心肌梗死的发病率显著降

作者简介:王 彦,女,辽宁省大连市人,副主任技师,主要从事分子生物学相关技术方面的研究,发表论文27篇。电话:(0411)84671291-7708,E-mail: yanzi941026@126.com
通信作者:赵赫男, E-mail: johnala_cn@hotmail.com
收稿日期:2009-03-09;修回日期:2009-04-08

低[4,5]。因此,雌激素对心血管系统的保护效应日益受到人们的重视,但具体机制尚无定论。肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor,HGF)具有抗心肌细胞凋亡、保护和修复内皮细胞、促进血管再生、限制心室重塑和改善心功能等作用[6,7]。虽然雌激素与HGF的相关性研究受到越来越多的重视,但在心肌保护中的作用,目前还少见报道。本实验通过研究雌激素在心肌缺血再灌注过程中对HGF表达影响以及与心肌细胞凋亡的关系,进一步探讨雌激素对心血管系统的保护机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雄性SD大鼠40只,体质量250~280 g,由大连医科大学实验动物中心提供。

1.2 试剂及器材

17β-雌二醇(E_2)购自美国Sigma公司,HGF上、下游引物及RT-PCR试剂盒(One Step RT-PCR Kit Ver.2)均购自大连TaKaRa公司,Trizol试剂(美国Invitrogen公司),原位细胞凋亡(TUNEL)试剂盒(美国Roche公司)。PCR扩增仪(德国Eppendrof公司),GALIBOR流式细胞仪(美国BD公司),ECG-6511心电图机(上海光电医用电子仪器有限公司),W-2000动物人工呼吸机(上海嘉鹏科技有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组 SD大鼠40只,利用随机数字表将其分为单纯缺血再灌注组(对照组,$n=20$)、17β-雌二醇(E_2)干预后的缺血再灌注组(E_2作用组,$n=20$)。E_2作用组于实验前1周,每天按100 μg/kg皮下注射17β-雌二醇。

1.3.2 建立心肌缺血再灌注模型 SD大鼠腹腔注射3%戊巴比妥钠麻醉(30 mg/kg),行气管切开术,并给予人工机械通气,潮气量为50 ml/kg;呼吸频率60~80次/min;呼吸比为2∶1,予呼气末持续正压呼吸。于胸骨左缘2、3、4肋间打开胸腔及心包膜,暴露心脏;在肺动脉圆锥右缘、平左心耳下缘1~2 mm处,经左冠状动脉下浅层心肌穿一6-0号丝线,连同一直径2 mm聚氯乙烯管结扎冠状动脉左前降支(left anterior descending coronary artery, LAD),造成心肌缺血。结扎LAD 20 min后,以结扎后出现心电图标准Ⅱ联导ST段抬高为缺血成功的标志;之后松开结扎线恢复血流灌注(ST段抬高为标志),再灌注30 min后结束实验。ECG-6511心电图机连续记录标准Ⅱ导心电图。ST仅作为评定冠脉结扎及开放有效的指标,E_2组与对照组合并进行分析。

1.3.3 逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)检测心肌组织中的HGF mRNA的表达 分别取2组心肌组织,Trizol法提取总RNA。取1.0 μg RNA,按TaKaRa公司一步法RT-PCR试剂盒说明书操作。HGF引物序列:上游5′-GAGGAGAAACGCAAACAG-3′,下游5′-ACGACCAGGAACAATGAC-3′;β-actin作为内参,上游5′-TGACGAGGCCCAGAGCAAGA-3′,下游5′-ATGGGCACAGTGTGGGTGAC-3′。反应条件:50 ℃ 30 min,94 ℃预变性2 min,94 ℃ 1 min,56 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min,33个循环,72 ℃ 10 min。HGF片段为414 bp,β-actin为330 bp。PCR产物于2.0%琼脂糖凝胶电泳,Lab Works 3.0图像分析软件进行密度测定分析。

1.3.4 心肌细胞凋亡检测

1.3.4.1 TUNEL法测定 心肌组织冰冻切片,0.01 mol/L PBS清洗;3% H_2O_2室温作用20 min消除内源性过氧化物酶作用;按原位细胞凋亡(TUNEL)试剂盒说明书操作。结果分析:荧光显色后,细胞核染为绿色荧光的为阳性。400倍高倍视野下摄片,然后利用Image pro plus 6.0软件进行心肌细胞计数。每张片选10个不同区域进行分析,测量单位面积(567像素×567像素,72 dpi作为单位面积)内平均阳性细胞数。

1.3.4.2 流式细胞仪检测 采用AnnexinV/PI双染色法,按试剂盒操作步骤收集细胞、处理标本,加入10 μl AnnexinV和5 μl PI,轻轻混匀,避光室温反应15 min加入300 μl Binding-Buffer,立即上机检测。结果判断:凋亡细胞对所有用于细胞活性鉴定的染料如PI有抗染性,坏死细胞则不能。细胞膜有损伤的细胞的DNA可被PI着染产生红色荧光[8]。

1.3.4.3 雌激素引起的心肌HGF mRNA表达变化与TUNEL法检测心肌细胞凋亡的相关性分析 对照组再灌注30 min与E_2作用组再灌注30 min的HGF mRNA表达及相应的心肌细胞凋亡进行相关性分析,计算相关系数及相关性。

1.4 统计学处理

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 16.0统计软件,组内数据比较用t检验,组间数据比较用方差分析;相关性分析采用协方差分析。

2 结果

2.1 缺血再灌注过程中心电ST段变化

正常情况下,ST段水平维持在基线附近[(0.010±0.001)mV],冠脉结扎后显著增高至(0.156±0.020)mV,较正常时有极显著性差异($P<0.01$)。再灌注后回落至(0.064±0.013)mV,较正常状态及缺血期均有显著性差异($P<0.05$)。见图1。



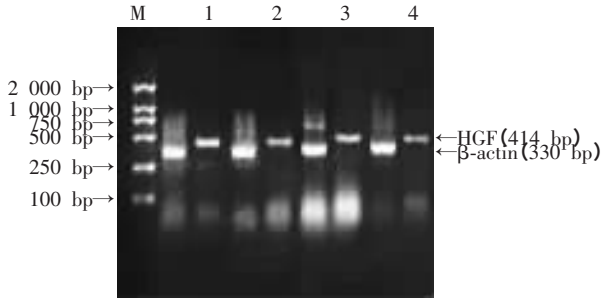
A:正常大鼠心电图; B:缺血期心电图; C:再灌注期心电图

图1 不同时期大鼠心电图ST变化

2.2 心肌HGF mRNA表达水平的变化

心肌缺血20 min及再灌注30 min时,雌激素作用组HGF

mRNA 的表达分别为(0.742 ±0.001)、(0.86 ±0.001),均较对照组[分别为(0.537 ±0.001)和(0.721 ±0.001)]有显著性增加(P <0.05),见图 2。

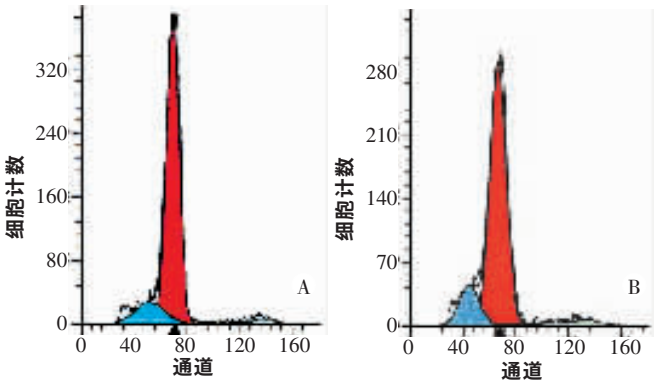


M:DL2000 标准; 1:雌激素组再灌注 30 min;2:对照组再灌注 30 min; 3:雌激素组缺血 20 min; 4:对照组缺血 20 min

图 2　心肌 HGF mRNA 在缺血再灌注过程中的表达

2.3　心肌细胞凋亡水平的变化

TUNEL 法(荧光染色)检测结果显示,对照组心肌细胞凋亡明显多于 E_2 作用组。单位面积内,对照组再灌注 30 min 心肌细胞凋亡数为(82.29 ±5.53)个,而 E_2 作用组再灌注 30 min 时为(66.57 ±7.63)个,二者差异显著(P <0.05)。但两组心肌细胞凋亡均高于正常心肌的表达[(21.48 ±9.77)个,P <0.01)],见图 3。流式细胞仪检测结果显示,再灌注 30 min 后对照组为(15.9 ±0.1)%,E_2 作用组为(12.2 ±1.4)%,二者差异显著(P <0.05),结果见图 4。



A:单纯缺血再灌注组; B:雌激素作用组

图 4　流式细胞仪检测对照组与 E_2 作用组在灌注 30 min 时心肌细胞凋亡

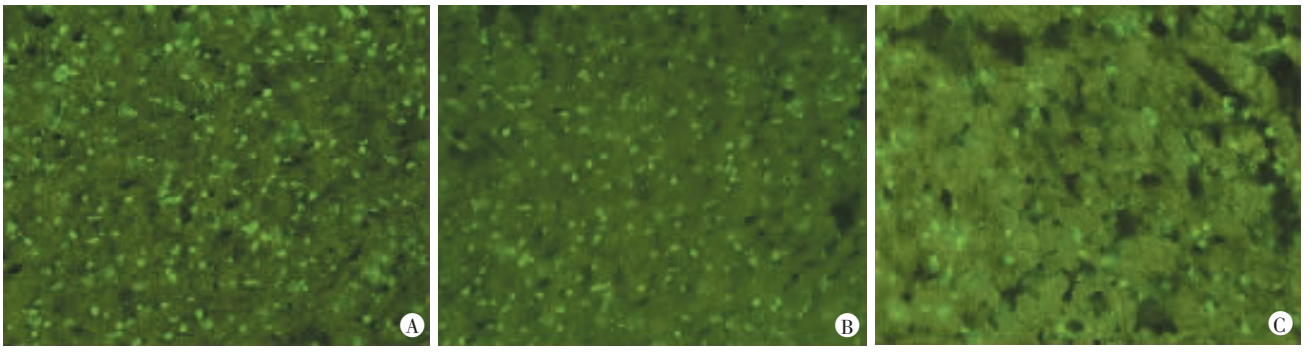
2.4　雌激素引起的心肌 HGF mRNA 表达与 TUNEL 法检测心肌细胞凋亡的相关性分析

对照组再灌注 30 min 及 E_2 作用组再灌注 30 min 的 HGF mRNA 表达变化与相应时间点的心肌细胞凋亡变化呈负相关(r = −0.465 9)。

3　讨论

近年来的研究表明雌激素具有明显的心肌保护作用[9]。目前认为雌激素可通过增加血管内皮细胞一氧化氮合酶的表达,促进内源性 NO 的释放,从而达到舒张血管,抑制血小板的黏附和聚集,抑制血管平滑肌的增殖等作用;同时它还可改善体内脂质代谢,升高高密度脂蛋白(HDL)及载脂蛋白 A-I,降低低密度脂蛋白(LDL),减少冠心病发病的危险性。但 E_2 对心肌的保护作用的机制目前尚无定论。实验结果显示,雌激素组与对照组在再灌注后心肌 HGF mRNA 表达均较缺血期显著增强。此外,雌激素作用后,缺血期与再灌注期的心肌 HGF mRNA 的表达均高于对应的对照组水平。同时凋亡检测结果显示,无论对照组还是雌激素组再灌注后心肌细胞凋亡均显著加重;但雌激素组明显低于对照组。由此可见,雌激素可以提高再灌注心肌的 HGF mRNA 表达,而对应的心肌细胞凋亡数及比例却明显低于对照组。

肝细胞生长因子在这一过程中的表达增强具有非常重要的意义,它具有加速血管内皮细胞形成、抗凋亡、促进心肌干细胞迁移、促进梗死心机重构、修复病变组织、维持心脏的自稳态、改善心脏功能等多种重要的生物学作用[10,11]。实验结果表明再灌注后心肌 HGF mRNA 表达较缺血期增强,说明再灌注损伤本身即可激活 HGF 的表达[12],但具体机制还需做进一步研究。另一方面,雌激素作用后大鼠在单纯缺血期及再灌注期,心肌 HGF mRNA 的表达均高于对照组。同时,相关性分析的结果表明,再灌注期由于雌激素的作



绿色荧光染色的为凋亡心肌细胞的细胞核 A:单纯缺血再灌注组; B:雌激素作用组;C:正常心肌表达情况

图 3　TUNEL 法检测对照组与 E_2 作用组在再灌注 30 min 时心肌细胞凋亡　(×400)

用引起的心肌 HGF mRNA 表达增高与对应的心肌细胞凋亡存在负相关。综合以上事实可以认为,雌激素在心肌缺血再灌注过程中可以增强 HGF 表达,从而发挥抗凋亡和保护心肌的作用。

据 WHO 统计,到2020年急性冠状动脉梗阻性疾病将是世界上的主要致死原因[13],绝大部分治疗手段存在心肌缺血再灌注损伤,所以防治 MIRI 是至今仍需解决的一个重大课题。本实验从 E_2 对心肌 HGF mRNA 表达影响及抗凋亡的角度对雌激素在 MIRI 中的保护作用及相关性进行了研究,揭示了 E_2 对心肌的保护可能是通过上调 HGF 表达来发挥作用这一新的研究方向和思路,对进一步弄清雌激素作用机制及临床替代药物的研制均具有一定的理论意义和参考价值。

参考文献:

[1] Eskes T, Haanen C. Why do women live longer than men? [J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2007, 133(2): 126 – 133.

[2] Wang M, Crisostomo P R, Markel T, *et al*. Estrogen receptor beta mediates acute myocardial protection following ischemia [J]. Surgery, 2008, 144(2): 233 – 238.

[3] Mercuro G, Zoncu S, Dragoni F. Gender differences in cardiovascular risk factors [J]. Ital Heart J, 2003, 4(6): 363 – 366.

[4] Gerhard M, Ganz P. How do we explain the clinical benefits of estrogen? From bedside to bench [J]. Circulation, 1995, 92(1): 5 – 8.

[5] Ray R, Novotny N M, Crisostomo P R, *et al*. Sex steroids and stem cell function [J]. Mol Med, 2008, 14(7 – 8): 493 – 501.

[6] Yang Z J, Ma D C, Wang W, *et al*. Experimental study of bone marrow-derived mesenchymal stem cells combined with hepatocyte growth factor transplantation *via* noninfarct-relative artery in acute myocardial infarction [J]. Gene Ther, 2006, 13(22): 1564 – 1568.

[7] Wang W, Yang Z J, Ma D C, *et al*. Induction of collateral artery growth and improvement of post-infarct heart function by hepatocyte growth factor gene transfer [J]. Acta Pharmacol Sin, 2006, 27(5): 555 – 560.

[8] 刘伍梅, 汪铭书, 程安春. 细胞凋亡检测技术的研究进展 [J]. 中国兽医科技, 2004, 34(11): 45 – 49.

[9] Xing D, Nozell S, Chen Y F, *et al*. Estrogen and mechanisms of vascular protection [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009, 29(3): 289 – 295.

[10] Chen X H, Minatoguchi S, Kosai K, *et al*. In vivo hepatocyte growth factor gene transfer reduces myocardial ischemia-reperfusion injury through its multiple actions [J]. J Card Fail, 2007, 13(10): 874 – 883.

[11] Linke A, Muller P, Nurzynska D, *et al*. Stem cells in the dog heart are self-renewing, clonogenic, and multipotent and regenerate infarcted myocardium, improving cardiac function[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(25): 8966 – 8971.

[12] Anderson C D, Heydarkhan-Hagvall S, Schenke-Layland K, *et al*. The role of cytoprotective cytokines in cardiac ischemia/reperfusion injury [J]. J Surg Res, 2008, 148(2): 164 – 171.

[13] Lopez A D, Murray C C. The global burden of disease, 1990 – 2020 [J]. Nat Med, 1998, 4(11): 1241 – 1243.

(编辑 龙 亮)

关于计量单位的使用

在医学领域中几乎时时处处都离不开计量单位。国务院于1984-02-27公布了《关于在我国统一实行法定计量单位的命令》和《中华人民共和国法定计量单位》。1993-12-27国家技术监督局发布了《量和单位》国家强制标准,全国必须统一采用计量单位。

我国的法定计量单位包括:①国际单位制的基本单位,如长度(m)、质量(kg)、时间(s)等;②国际单位制的辅助单位;③国际单位制中具有专门名称的导出单位,如频率(Hz)、压力(Pa)、能量(J);④国家选定的非国际单位制单位,如时间(min、h、d)、转速(r/min);⑤由以上单位构成的组合形式单位,如速度(m/s)、浓度(mol/L);⑥由词头和以上单位所构成的倍数和分数单位,如 μm、kPa、ml 等。在医学写作时必须严格执行国务院的命令和有关的国家标准。

各种单位除在无数值的叙述性文字中和科普读物中可使用中文名称或中文符号外,均应使用符号。单位符号都是正体拉丁和希腊字母,无复数形式,符号后不附加圆点(正常语法名字尾标点符号除外)。来源于人名的单位,例如:Pa、Gy、W 等和 10^6 以上的词头,例如:M、G、T 等的首字母大写以外均为小写,容积"升"的符号可用大写(L)也可用小写(l),一般在单独使用不加词头时用大写。数值与单位符号之间、单位符号与相邻的其他符号(例如:化学元素符号)之间应留半个阿伯数字空隙,词头与其所组合的单位符号之间不需空隙。词头不能单独使用,也不能重叠使用(例如:"mμm"应为"nm")。

本刊编辑部