短篇论著

文章编号:1000-5404(2010)17-1898-03

急性心肌缺血大鼠心脏孤啡肽表达的变化

姚太平[1],郭 政[2] (032200 山西 汾阳,山西医科大学汾阳学院麻醉学教研室[1];030001 太原,山西医科大学第二医院麻醉科)

【摘要】 目的 观察急性心肌缺血大鼠心肌组织内孤啡肽(orphanin FQ,OFQ)的表达变化,探讨孤啡肽在急性心肌缺血中的作用。方法 54只260~280 g健康成年雄性SD大鼠,按随机数字表法分为3组:①动物对照组(C组);②手术对照组(Sham组);③结扎冠状动脉组(CAO组)。采用免疫组织化学染色(SABC法),观察冠脉结扎大鼠不同时点心肌组织内OFQ的表达变化,以平均光密度为指标进行半定量分析。同时记录相应时点心电图波形,并对不同时点P波、T波振幅和ST段偏移量进行统计学分析。结果 免疫组化切片CAO后各时点心肌缺血区OFQ的水平较对照组显著升高($P<0.05$),在CAO 3 h达高峰(0.663±0.021)($P<0.01$)。与对照组心电图相比,CAO组不同时点P波、T波振幅和ST段偏移量差别有统计学意义($P<0.05$)。结论 急性心肌缺血时OFQ表达显著增多,可能起到心肌保护作用。

【关键词】 心肌缺血;孤啡肽;心肌组织;内源性阿片肽
【中图法分类号】 R364.12;R542.202;R341 【文献标志码】 A

近年来研究发现,急性心肌缺血可引起体内大量内源性阿片肽释放[1],与心肌细胞膜上的阿片受体相结合,参与心肌缺血预适应[2],起到保护心肌作用。孤啡肽作为一种较新发现的内源性阿片肽,是否参与这一过程,目前尚不清楚。本研究采用急性心肌缺血大鼠模型,应用免疫组化观察孤啡肽在心肌组织中的表达变化,同时分析心电图变化趋势,探讨孤啡肽在急性心肌缺血中的可能作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

健康成年雄性SD大鼠54只,体质量260~280g(山西医科大学实验动物中心提供),按随机数字表法分为3组:(1)动物对照组(C组),麻醉后直接取材;(2)手术对照组(Sham组),只开胸暴露心脏,不结扎冠脉;(3)结扎冠状动脉组(coronary artery occlusion group, CAO组),单纯扎闭冠状动脉左前降支。其中,Sham组和CAO组又分为4个时点:30、60、180、360 min,每个时相点均为6只动物。本研究中所有的实验方案和操作程序经过山西医科大学实验动物伦理委员会的批准。

1.2 心肌缺血大鼠模型建立

大鼠用25%乌拉坦(1.2 g/kg)腹腔注射麻醉满意后,固定于实验台,连接电生理信号记录仪(成都仪器厂)作Ⅱ导联肢体心电图。手术切口均用1%利多卡因做局部皮下浸润。颈部行气管切开插管后,应用小动物呼吸机(AIC-V8,上海澳尔科特生物科技有限公司)进行人工机械通气(RR 70 bpm,V_T8 ml/kg),然后在左侧胸壁第4~5肋间旁开胸骨正中线1 cm处沿肋间开胸,逐层钝性分离,直至暴露心脏,以左冠状静脉主干为标志,在左心耳下方2 mm处进针,用0/6无损伤线穿过心肌表层的肌肉,在肺动脉圆锥旁出针,结扎冠状动脉左前降支,并计时。结扎后左下侧心肌由红色变为苍白,大鼠心电图ST段明显抬高,确认结扎成功,将心脏放回原位,逐层关胸,负压吸引将胸腔内空气抽出,大鼠脱离呼吸机后即刻恢复自主呼吸。每小时经尾静脉补生理盐水1 ml。

1.3 标本制备

各实验组在预定时间点开胸,经主动脉插管待灌注。插管后将心脏快速剪下,置于4 ℃生理盐水中;待心脏内血液泵出后用吸水纸擦净,置于4 ℃ 4% 多聚甲醛中固定3 h,然后移入4 ℃ 30% 蔗糖中脱水18~24 h。脱水后的标本用干净纱布擦净后修整并用OCT包埋固定,用Leica CM-1850恒冷箱切片机(德国Leica公司)将心脏连续冠状冰冻切片,厚5 μm,贴于处理过的载玻片上,吹干后放入切片盒内置-70 ℃低温冰箱保存。

1.4 OFQ表达的测定

集齐标本后采用SABC法测定OFQ的表达,一抗为Nociceptin(Phoenix Pharmaceuticals公司,美国),二抗为SABC-F(山羊抗兔IgG,武汉博士德),DAB显色。用BX51型Olympus显微镜及IDA-2000数码显微图像分析系统对免疫组化染色切片进行图像分析。每组大鼠随机观察各30个高倍视野(×400),以平均光密度作为指标进行半定量分析。

1.5 心电图测量

1.5.1 心电监测和记录方法 大鼠乌拉坦麻醉后仰卧固定于鼠台上,双下肢和右上肢掌心粘贴电极贴片,连接心电监护仪,连续心电监测,依次描记结扎前、CAO 10、30、60、180、360 min各时点Ⅱ导联心电图,速度80 ms/d,增益1 mm=500 μV。

1.5.2 心电图观察指标 以肢体Ⅱ导联为标准,选择心电以下参数作为观察指标:①T波波幅;②ST段偏移量(以QRS波群起点连线为基线);③心律失常发生情况。

1.6 统计学处理

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。免疫组化CAO组及Sham组同时点之间以两样本均数的t检验比较差异;CAO组不同心肌区域之间以两样本均数的t检验比较差异。CAO组不同时点之间及心电图分析比较采用SPSS 11.5统计软件进行单因素方差分析。检验水准取$\alpha=0.05$。

【基金项目】 国家自然科学基金(30471656)
【通信作者】 郭 政,E-mail:ykdgz2004@yahoo.com.cn

2 结果

2.1 免疫组织化学检测结果

OFQ 免疫阳性产物在心脏组织主要位于心肌细胞膜及细胞质，呈棕黄色团块状分布；血管内皮细胞也有强阳性反应。免疫组化切片以平均光密度为指标进行半定量分析。统计结果分析显示：CAO 后各时点心肌缺血区 OFQ 的水平较对照组显著升高（$P<0.05$），随着时间先有上升趋势，在 CAO 180 min 达高峰（$P<0.05$）；心肌非缺血区各组的变化趋势与心肌缺血区相似，且各组水平心肌缺血区组织有显著差异（$P<0.05$）（表 1）。

表 1 各组大鼠心肌组织免疫组化图像分析结果（$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

组别	心肌缺血区	心肌非缺血区
C 组	0.486 ± 0.015	0.474 ± 0.015
Sham 组		
30 min	0.513 ± 0.009	0.505 ± 0.009
60 min	0.521 ± 0.014	0.522 ± 0.014
180 min	0.504 ± 0.021	0.501 ± 0.021
360 min	0.518 ± 0.007	0.498 ± 0.007
CAO 组		
30 min	0.515 ± 0.010[a]	0.543 ± 0.010[b]
60 min	0.609 ± 0.006[b]	0.569 ± 0.006[c]
180 min	0.663 ± 0.021[c]	0.583 ± 0.021[c]
360 min	0.628 ± 0.008[b]	0.558 ± 0.008[b]

a：$P<0.05$ 与 C 组比较；b：$P<0.05$，c：$P<0.01$，与 Sham 组同时点比较

2.2 心电图测量结果

与正常心电图相比，冠脉结扎后心律失常主要发生在 CAO 15 min 之内，以室性早搏等心律失常多见（图 1）。随冠脉结扎时间延长大鼠 P 波、ST 段、T 波电压进行性增高，缺血 180 min 达最高峰，此后相对平稳下降。不同时点 P 波、T 波振幅和 ST 段偏移量差别有统计学意义（$P<0.05$，表 2）。



A：Sham 组；B：CAO 组

图 1 大鼠心肌缺血心电图变化

表 2 各组大鼠 CAO 不同时相点心电图比较分析结果（μV，$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

组别	P 波振幅	T 波振幅	ST 偏移量
Sham 组	34.81 ± 8.54	70.98 ± 6.717	87.14 ± 12.77
CAO 组			
10 min	66.87 ± 13.13[a]	99.84 ± 14.81[a]	153.51 ± 4.87[a]
30 min	72.36 ± 4.58[ab]	132.21 ± 15.57[ac]	171.48 ± 15.40[ac]
60 min	76.64 ± 5.19[a]	122.43 ± 7.02[ab]	132.08 ± 13.10[ab]
180 min	79.62 ± 6.41[a]	100.15 ± 3.05[a]	117.93 ± 4.89[ac]
360 min	74.19 ± 2.91[ab]	101.06 ± 10.08[a]	127.28 ± 14.14[ab]

a：$P<0.05$，与 Sham 组比较；b：$P<0.05$，c：$P<0.01$，与 CAO 组 10 min 点比较

3 讨论

目前研究[3]认为，急性心肌 E 缺血诱发的心肌损伤，不仅仅是局部心肌组织的缺血病理生理变化引起的，可能还存在神经源性反应机制。即感受痛觉的神经元并非只具有单纯感知疼痛刺激，向中枢传导痛觉的功能，它们同时具有神经内分泌功能，可以分泌多种生物学活性物质，如组织胺、IL-1、缓激肽、P 物质等。在心肌缺血期间，心交感传入纤维的刺激及其反射活动的结果，引起存在于传入神经末梢的心血管活性物质及促炎介质的释放，使局部血管扩张、渗出，进一步促进炎症发展，加重心肌组织损伤[4]。

机体具有完善的调制伤害性感受信号传递的系统，从外周感觉神经末梢到中枢神经系统的各个水平对伤害性刺激的传递产生调制作用[5,6]。内源性阿片肽（endogenous opioids peptides，EOPs）及其受体存在于中枢神经内，而且广泛分布于心肌及血管壁，从中枢和外周水平参与了心血管功能的调节[7]。近年研究[8]发现，急性心肌缺血时，机体处于应激状态，可启动心脏的自我保护机制，此时内源性阿片肽被激活并大量释放。它们可能通过以下几种途径起作用：①通过血脑屏障入脑，对下丘脑和极后区等部位的心血管中枢进行调节；②作用于心脏或肺内的化学感受器，反射性调节心血管系统的功能；③通过外周作用对心血管系统的植物神经支配及体液支配因素进行调节；④与心肌细胞膜上的阿片受体相结合，通过 G 蛋白耦联作用抑制腺苷酸环化酶，并激活一系列蛋白激酶，作用于效应蛋白即心肌细胞膜和线粒体 K^+-ATP 通道[9]，参与心肌缺血的预适应，从而起到保护心肌作用，减少心肌梗死面积。

孤啡肽是一种新发现的内源性阿片肽，它既具有神经递质、神经调质的功能，又具有内分泌激素的功能，是一个潜在的心血管调节系统。本研究结果显示：孤啡肽在心肌缺血条件下，其表达逐渐增多，CAO 180 min 达到峰值，CAO 360 min 下降，该变化与背根神经节孤啡肽表达变化趋势基本相一致[10]，急性心肌缺血时孤啡肽的表达变化很可能是通过上述机制对伤害性刺激进行调制。其表达高峰延迟，说明心肌组织的孤啡肽其合成部位和来源可能部分来自于感觉神经纤维末梢。外周白细胞、血管平滑肌细胞、心房内皮细胞等也可能是心肌组织 OFQ 的另外来源[11]。CAO 180 min 以后心电图趋于平稳，ST 段偏移量逐渐减小，其可能是由于机体内源性调控机制发挥保护作用。

综上所述，急性心肌缺血时孤啡肽在心脏内表达显著增高，其具体机制有待深入研究。

参考文献：

[1] Schultz J E, Gross G J. Opioids and cardioprotection [J]. Pharmacol Ther, 2001, 89 (2): 123 - 137.

[2] 肖继明，陈锐华. 阿片肽参与心肌缺血预适应的分子机制[J]. 医学研究生学报，2004，17(12)：1135－1137，1150.
[3] Campbell J N, Meyer R A. Mechanisms of neuropathic pain[J]. Neuron, 2006, 52(1): 77－92.
[4] Cuesta M C, Quintero L, Pons H, *et al*. Substance P and calcitonin gene-related peptide increase IL-1 beta, IL-6 and TNF alpha secretion from human peripheral blood mononuclear cells[J]. Neurochem Int, 2002, 40(4): 301－306.
[5] Valtchanova-Matchouganska A, Ojewole J A. Mechanisms of opioid delta (delta) and kappa (kappa) receptors' cardioprotection in ischaemic preconditioning in a rat model of myocardial infarction[J]. Cardiovasc J S Afr, 2003, 14(2): 73－80.
[6] McPherson B C, Yao Z. Signal transduction of opioid-induced cardioprotection in ischemia-reperfusion[J]. Anesthesiology, 2001, 94(6): 1082－1088.
[7] Pugsley M K. The diverse molecular mechanisms responsible for the actions of opioids on the cardiovascular system[J]. Pharmacol Ther, 2002, 93(1): 51－75.
[8] Gross E R, Hsu A K, Gross G J. Opioid-induced cardioprotection occurs via glycogen synthase kinase beta inhibition during reperfusion in intact rat hearts[J]. Cite Res, 2004, 94(7): 960－966.
[9] Patel H H, Hsu A K, Peart J N, *et al*. Sarcolemmal K(ATP) channel triggers opioid-induced delayed cardioprotection in the rat[J]. Circ Res, 2002, 91(3): 186－188.
[10] Guo Z, Yao T P, Wang J P, *et al*. Acute myocardial ischemia upregulates nociceptin/orphanin FQ in dorsal root ganglion and spinal cord of rats[J]. Neurosci Lett, 2008, 433(3): 274－278.
[11] Mika J, Li Y, Weihe E, *et al*. Relationship of pronociceptin/orphanin FQ and the nociceptin receptor ORL1 with substance P and calcitonin gene-related peptide expression in dorsal root ganglion of the rat[J]. Neurosci Lett, 2003, 348(3): 190－194.

(收稿：2010-03-31 修回：2010-06-22)
(编辑 邓强庭)

短篇论著

文章编号：1000-5404(2010)17-1900-03

孕早期绒毛和蜕膜组织差异表达蛋白的初步研究

李红梅，龙 玲，邓 丽，姚春莉 (400038 重庆，第三军医大学西南医院妇产科)

【摘要】 目的 利用蛋白质组相关技术分析孕早期胚胎绒毛和蜕膜组织蛋白质组的差异表达，探讨胚胎植入的可能机制。方法 选择2007年1－5月期间，正常妊娠10周在本院行人工流产者的胚胎绒毛和子宫蜕膜组织各20例。用固相pH梯度双向凝胶电泳(2D-PAGE)分别分离正常早孕人工流产者的胚胎绒毛和蜕膜的蛋白质组。考马斯亮蓝显色，PDQuest 2DE软件分析。结果 图像分析测得绒毛与蜕膜凝胶的匹配率蜕膜达45%，在等电点pI4～7、相对分子质量(14.40～116.00)×10^3范围内，分离得到正常早孕绒毛蛋白点大约680个，蜕膜蛋白点大约621个，其中至少33个蛋白点在绒毛中的表达量高于蜕膜3倍以上，27个蛋白点在蜕膜中的表达量高于绒毛3倍以上，利用质谱相关技术鉴定出7个有意义的差异表达蛋白点。结论 早期胚胎绒毛和蜕膜蛋白质的差异表达，可能是胚胎植入的一个原因。

【关键词】 蛋白质组学；绒毛；蜕膜
【中图法分类号】 R321.3；R321.4；R394.3
【文献标志码】 A

胚胎植入涉及两个关键事件：一是胚胎对子宫内膜腔上皮的黏附，二是子宫内膜基质的蜕膜化。在植入窗口期，胚胎滋养层细胞达到侵入状态，宫内膜达到接受状态，两者同步发生才导致胚胎成功植入[1]。目前，胚胎植入的机制尚不清楚，本课题利用双向凝胶电泳、质谱分析等蛋白质组学相关技术，研究孕早期胚胎绒毛和蜕膜组织蛋白质组的差异表达，以期从差异蛋白质组角度探讨胚胎植入的机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

选择2007年1－5月期间，正常妊娠10周在本院行人工流产者的胚胎绒毛和子宫蜕膜组织各20例。

1.2 主要试剂与仪器

胰酶、DMEM、Dnase Ⅰ、Percoll、FBS、低分子量蛋白标记物、Pharmalyte(pH 3～10)购自Amersham Pharmacia Biotech，30%丙烯酰胺(29∶1，3.3% C)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、二硫苏糖醇(DTT)、硫脲(Thiourea)、十二烷基硫酸钠(SDS)、IPG干胶条(pH3～10，11cm)、甘氨酸(glycin)购自Bio-Rad，超纯脲、TEMED、丙基硫酸盐(CHAPS)、PMSF、碘乙酰胺、考马斯亮蓝R-250、G-250购自Sigma，Trypsin购自Promega，其余试剂均为国产分析纯。IPGphor、附件和循环水浴(Amersham Pharmacia)、Protein Ⅱ XL Cell电泳仪、PDQuest 8.0(Bio-Rad)、MALDI-TOF-MS(ABI)、Nikon D100＋AF-SNIKKOR 17～35 mm 1∶2.8D数码相机。

1.3 实验方法

1.3.1 蜕膜组织蛋白样品的制备 将人工流产获得的蜕膜组织标本置于装有生理盐水的消毒器皿中，用4 ℃生理盐水反复洗涤标本后，仔细分离蜕膜组织，再用4 ℃生理盐水冲洗标本组织15次，消毒吸水纸充分吸干水分后，按50 mg标本加1 ml裂解缓冲液(7 mol/L ultra urea、2 mol/L Thiourea、4% CHAPS、65 mmol/L DTT、40 mmol/L Tris、0.2% pH 3～10的Pharmalyte、0.1 g/L PMSF)，经液氮反复冻融、研磨3次后加入0.02 g/L DNase和5 mg/L RNase，4 ℃放置15 min，12 000 r/min，4 ℃离心30 min。取上清分装，－80 ℃保存，Bradford法

【通信作者】 李红梅，电话：(023)68765408，E-mail：hmys@sohu.com