基础研究 文章编号：0253-3626（2011）06-0689-04

# 外源性 D- 核糖对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用

马林峰，杨双强，杨庆军
（重庆医科大学附属第一医院胸心外科，重庆 400016）

【摘 要】目的：探讨外源性 D-核糖对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及其机制。方法：24 只 SD 大鼠随机分成假手术组、缺血再灌注（Ischemia/reperfusion，I/R）组、D-核糖组。假手术组：只予以左冠状动脉前降支穿线不结扎；I/R 组：左冠状动脉前降支结扎 30 min，再灌注 120 min；D-核糖组：左冠状动脉前降支穿线前 30 min，给予尾静脉缓慢推注 D-核糖，余操作同 I/R 组。各组术毕取结扎处远端左心室游离壁心肌组织备用。RT-PCR 检测心肌中细胞因子诱导的中性粒细胞趋化物-1（Cytokine-induced neutrophil chemoattractant properties 1，CINC-1）mRNA，ELISA 检测髓过氧化物酶（Myeloperoxidase，MPO），Western blot 检测核因子-κB（Nuclear factor-κB，NF-κB），HE 染色观察心肌病理改变。结果：与假手术组相比，D-核糖组、I/R 组 CINC-1mRNA 的表达量，NF-κB 和 MPO 的量均明显增高（$P<0.05$），心肌组织病理学变化明显加重，中性粒细胞浸润明显增多。与 I/R 组相比，D-核糖组 CINC-1mRNA 的表达量，NF-κB 和 MPO 的量又明显减少（$P<0.05$），心肌组织病理学变化明显减轻，中性粒细胞浸润明显减少。结论：外源性 D-核糖对 SD 大鼠心肌缺血再灌注损伤有保护作用，其作用机制可能与减少心肌组织中 NF-κB 的含量，降低心肌组织 CINC-1mRNA 的表达，减少心肌中 MPO 含量，减少心肌组织中性粒细胞浸润有关。

作者介绍：马林峰（1986- ），男，硕士，
研究方向：心肌保护。
通信作者：杨双强，男，教授，Email：yysqiang@163.com。

反应细胞在体内所受到的其他来自神经体液等各方面的影响，其结果还有待于进一步研究观察。

## 参 考 文 献

[1] Askie L M，Henderson-Smart D J，ko H.Restricted versus liberal oxygen exposure for preventing morbidity and mortality in preterm or low birth weight infants[J].Cochrane Database Syst Rev，2009，(1)：CD001077.

[2] Wu C Y，Yue F，Li M，*et al*.*Effects of hyperoxia on inflammatory response in lung of infantile rats*[J].Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue，2010，22(7)：389-392.

[3] Hengartner M O.The biochemistry of apoptosis[J].Nature，2000，407(6805)：770-776.

[4] Shi X，Zhang H，Xiong S.*Primary culture of alveolar epithelial type Ⅱ cells and its bionomic study*[J].Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci，2007，27(6)：653-656.

[5] Masood A，Belcastro R，Li J，et al.A peroxynitrite decomposition catalyst prevents 60% $O_2$-mediated rat chronic neonatal lung injury[J].Free Radic Biol Med，2010，49(7)：1182-1191.

[6] Fu H M，Xu F，Liv C J，et al.Influence of 60% oxygen inhalation on type Ⅱ alveolar epithelial cells and protective role of calcitonin gene-related peptide from their damage induced in premature rat[J].Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue，2008，20(10)：578-581.

[7] 付红敏，许 峰，黄 波，等.胎鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞的分离和原代培养[J].重庆医科大学学报，2009，34(5)：586-589.

[8] Feng G，Wang Z G.Screening and cloning of susceptible genes related to acute lung injury[J].Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue，2003，15(6)：372-375.

[9] Liu H C，Chang L W，Rong Z H，et al.Relation of insulin-like growth factor binding protein-2 with hyperoxia-induced lung injury in term and premature neonatal rats[J].Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue，2008，20(6)：331-334.

[10] Saugstad O D.Why are we still using oxygen to resuscitate term infants[J]?Perinatol，2010，30(Suppl)：46-50.

[11] Lanka K，Cummings J J.Initiating preterm resuscitation with less than 100% oxygen[J].Perinatol，2010，30(5)：366.

[12] Saugstad O D，Ramji S，Vento M，et al.Oxygen for newborn resuscitation：how much is enough[J]?Pediatrics，2006，118(2)：789-792.

[13] Kbar F A，Campbell I A.Oxygen therapy in hospitalized patients：*the impact of local guidelines*[J].Eval Clin Pract，2006，12(1)：31-36.

[14] Wang C L，Anderson C，Leone T A，et al.Resuscitation of preterm neonates by using room air or 100% oxygen[J].Pediatrics，2008，121(6)：1083-1089.

[15] Roberts D，Wacogne I.Question 3 In patients with spontaneous pneumothorax，does treatment with oxygen increase resolution rate [J]?Arch Dis Child，2010，95(5)：397-398.

[16] Oh S，Lee E，Lim Y，et al.Comparison of the effects of 40% oxygen and two atmospheric absolute air pressure conditions on stress-induced premature senescence of normal human diploid fibroblasts[J].Cell Stress Chaperones，2008，13(4)：447-458.

（责任编辑：关蕴良）

【关键词】D-核糖；心肌缺血再灌注损伤；中性粒细胞；中性粒细胞趋化物-1；核因子-κB；髓过氧化物酶
【中国图书分类法分类号】R54 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-11-09

# Protective effect of exogenous D-ribose on myocardial ischemia/reperfusion injury of rat hearts

*MA Lin-feng, YANG Shuang-qiang, YANG Qing-jun*

(*Department of Cardiaothoracic Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect and the mechanism of D-ribose on myocardial ischemia/reperfusion injury of rat hearts. *Methods*: 24 SD rats were randomly divided into sham group, ischemia/reperfusion group (I/R group) and D-ribose group ($n$=8). The rats in sham group did not undergo the left anterior descending coronary artery (LAD) ligation; The rats in I/R group underwent the LAD ligation for 30 min, then were reperfused for 120 min; The rats in D-ribose group (D-ribose group) were administered D-ribose (800 mg/kg) through tail vein 30 min prior to the LAD ligation. The left ventricular samples of the three groups were prepared for investigation. The expression of CINC-1mRNA was detected by RT-PCR; myeloperoxidase (MPO) was detected by ELISA; nuclear factor-κB (NF-κB) was detected by Western blot, and cardiac HE sections were observed under light microscope. *Results*: Compared with sham group, higher expression of CINC-1 mRNA, NF-κB and MPO were detected in I/R group and D-ribose group ($P$<0.05) with more remarkable histopathologic changes and neutrophil infiltration. Compared with I/R group, less expressions of CINC-1 mRNA, NF-κB and MPO were detected in D-ribose group ($P$<0.05) with less remarkable histopathologic changes and neutrophil infiltration. *Conclusion*: Exogenous D-ribose might play protective effect on myocardial ischemia/reperfusion injury of rat hearts. The mechanism could be related to its decreasing the expression of NF-κB, CINC-1 mRNA and MPO as well as reducing neutrophil infiltration.

【Key words】D-ribose; myocardial ischemia/reperfusion injury; neutrophil; cytokine-induced neutrophil chemoattractant properties 1 (CINC-1); nuclear factor-κB (NF-κB); myeloperoxidase (MPO)

已有研究证实，中性粒细胞的活化、浸润及其脱颗粒是造成心肌缺血再灌注损伤（Myocardial ischemia/reperfusion injury，MIRI）的重要细胞机制之一，抑制中性粒细胞的活化、浸润可以明显减轻 MIRI。D-核糖是一种存在于所有活细胞中的单糖，是三磷酸腺苷（Adenosine-triphosphate，ATP）和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（Nicotinamide adenine dinucleotide，NAD）的重要组成部分，D-核糖作为 ATP 的糖基团，已经被证实是一种心脏新陈代谢的潜在的补充物质[1]。D-核糖作为一种还原型糖可以提高机体氧化系统的防御能力，加快缺血再灌注组织中氧自由基的清除，氧自由基的清除可以进一步减少趋化因子的活化，进而减少各种炎性介质对缺血再灌注组织的损伤。Hitoaki Sato 等实验发现外源性 D-核糖可能是通过抑制中性粒细胞的活化来减少缺血再灌注引起的肾损伤[2]。本实验拟采用结扎大鼠左冠状动脉前降支建立在体 MIRI 模型，探讨外源性 D-核糖对 MIRI 保护作用及其心肌组织中中性粒细胞浸润的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

D-核糖（美国 Sigma 公司）；髓过氧化物酶（Myeloperoxidase，MPO）ELISA 试剂盒（美国 R&D system 公司）；兔抗大鼠核因子-κB（Nuclear factor-κB，NF-κB）p65 抗体（美国 Santa Cruz 生化试剂公司）；辣根酶标记山羊抗兔 IgG（中杉金桥公司）；肌动蛋白 β（β-actin）兔多克隆抗体（北京四正柏生物科技有限公司）；蛋白预染 marker（美国 Fermenta 公司）；聚偏乙烯二氟（FVDF）膜（美国 Biosharp 公司）；BCA 蛋白浓度测定试剂盒（碧云天生物技术研究所）；Western 及 IP 细胞裂解液（碧云天生物技术研究所）；超敏 ECL 化学发光试剂盒（碧云天生物技术研究所）；SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液（碧云天生物技术研究所）；SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒（碧云天生物技术研究所）；动物 RNAout（北京天恩泽基因科技有限公司）；高效率逆转录试剂盒（东洋纺（上海）生物科技有限公司）；苏木素伊红（HE）染色试剂盒（碧云天生物技术研究所）；垂直电泳仪（北京六一仪器厂）。

### 1.2 实验方法

动物模型和分组。（1）模型建立：10~12 周龄的清洁级健康 SD 雄性大鼠 24 只，质量 230~260 g，由第三军医大学大坪医院动物实验中心提供。以 2%戊巴比妥钠（40 mg/kg）经腹腔注射麻醉成功后，行气管切开术，接小动物呼吸机（频率 80 次/min，呼吸比 1:1，潮气量 18 ml）。于大鼠胸骨左缘 2~5 肋处，逐层打开皮肤、肌肉、肋骨，暴露心脏，分离心包，于左心耳与肺动脉圆锥之间找出左冠状动脉前降支，用 5.0 带线缝合针在前降支起始后 0.2 cm 处穿一结扎线。（2）动物分组：24 只 SD 雄性大鼠随机分为假手术组、缺血再灌注（Ischemia/reperfusion，I/R）组、D-核糖组，每组 8 只。假手术组：穿线后不结扎缝合线，30 min 后取下缝合线，关闭胸腔，120 min 后处死大鼠。I/R 组：结扎缝合线，以心尖部变苍白为心肌缺

血形成，30 min 后剪断缝合线，使缺血冠脉恢复灌注，关闭胸腔，再灌注 120 min 处死大鼠。D-核糖组：于结扎前 30 min 尾静脉缓慢注射 D-核糖（800 mg/kg，150 mg/ml），余操作同 I/R 组。本实验根据 Hitoaki Sato 等[2]在实验中选用的缺血前 30 min 尾静脉注射 400 mg/kg（浓度为 150 mg/ml）的标准，分别以 200、400、800 mg/kg 剂量进行预实验，发现在 400、800 mg/kg 剂量均有保护作用，而 800 mg/kg 组的保护作用更为明显，故选择 800 mg/kg 的剂量。

1.3 标本采集及检测

于模型建立结束后取结扎处远端左心室游离壁心肌组织约 250 mg，置于-80℃液氮保存。

1.3.1 RT-PCR 检测心肌组织中细胞因子诱导的中性粒细胞趋化物-1（Cytokine-induced neutrophil chemoattractant properties 1，CINC-1）mRNA 表达 取心肌组织 50 mg，按照动物 RNAout 使用手册提取心肌细胞总 RNA，以 Beckman Coulter Du800 仪测定总 RNA 的 D(260)/D(280)值和 RNA 浓度，按高效率逆转录试剂盒说明书进行反转录获得 cDNA，并以之为模板进行 PCR 扩增。PCR 引物序列及扩增条件分别为：内参照 β-actin 上游引物：5'-GAGAGGGAAATCGTGCGTGAC-3'，下游引物：5'-CATCTGCTGGAAGGTGGACA-3'，退火温度 58℃，循环 30 次，产物长度 452 bp；CINC-1 上游引物：5'-GGCAGGGATTCACTTCAAGAACA-3'，下游引物：5'-TTACTTGGGGCACCCTTTAGCA-3'，退火温度 58℃，循环 30 次，产物长度 175 bp。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳，结果采用凝胶成像系统进行分析。

1.3.2 Western blot 检测心肌组织中 NF-κB p65 蛋白的表达

取心肌组织 100 mg，按 Western 及 IP 细胞裂解液说明书提取总蛋白，BCA 法测定蛋白质浓度，SDS-PAGE 凝胶电泳，湿转法转移至 PVDF 膜，常规洗膜后 37℃ 5%脱脂奶粉封闭 1 h，洗膜后加入兔抗大鼠 NF-κB p65 一抗（1:500 稀释）和兔抗大鼠 β-actin 一抗（1:2 000 稀释）4℃孵育过夜，洗膜后加入辣根酶标记山羊抗兔二抗（1:2 000 稀释）37℃孵育 1 h，化学发光法显色，凝胶成像分析系统摄像分析。

1.3.3 ELISA 检测心肌组织中 MPO 蛋白量 严格按照 MPO ELISA 试剂盒说明书操作步骤测定心肌组织中 MPO 蛋白表达量。

1.3.4 HE 染色观察心肌组织病理变化 取缺血区心肌组织，快速冰冻切片，严格按照 HE 染色试剂盒说明书操作步骤进行染色，光学显微镜（×400）下观察心肌组织病理改变。

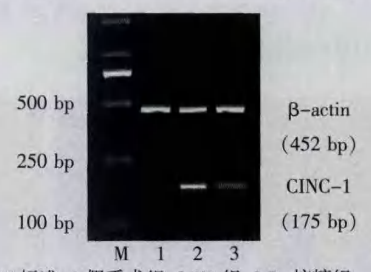
1.4 统计学分析

计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示。应用 SPSS13.0 统计软件，组间均数比较采用 *Student-Newman-Keuls* 检验，多组均数比较用方差检验。

## 2 结 果

2.1 RT-PCR 检测心肌组织中 CINC-1 mRNA 表达的变化

I/R 组、D-核糖组 CINC-1mRNA 的表达明显高于假手术组（$P<0.05$），而 D-核糖组 CINC-1mRNA 的表达又较 I/R 组明显下降（$P<0.05$）。电泳结果见图 1，半定量分析见表 1。




M.标准；1.假手术组；2.I/R 组；3.D-核糖组

**图 1 各组间心肌组织中 CINC-1 mRNA 表达**

**表 1 各组间心肌组织中 CINC-1 mRNA 表达（$\bar{x}\pm s$，$n$=8）**

| 组别 | CINC-1 |
|---|---|
| 假手术组 | 0.10 ± 0.02 |
| I/R组 | 0.98 ± 0.05# |
| D-核糖组 | 0.39 ± 0.03#* |

注：#，$P<0.05$，与假手术组比较；*，$P<0.05$，与 I/R 组比较

2.2 Western blot 检测心肌组织中 NF-κB p65 蛋白表达的变化

I/R 组、D-核糖组 NF-κB p65 的表达显著高于假手术组（$P<0.05$），而 D-核糖组 NF-κB p65 的表达又较 I/R 组显著下降（$P<0.05$）。电泳结果见图 2，定量分析见表 2。

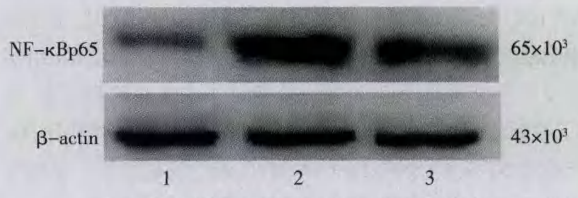



**图 2 各组间心肌组织中 NF-κB p65 的表达**

**表 2 各组间心肌组织中 NF-κB p65 的表达（$\bar{x}\pm s$，$n$=8）**

| 组别 | NF-κBp65 |
|---|---|
| 假手术组 | 0.29 ± 0.02 |
| I/R组 | 1.68 ± 0.04# |
| D-核糖组 | 0.97 ± 0.03#* |

注：#，$P<0.05$，与假手术组比较；*，$P<0.05$，与 I/R 组比较

2.3 ELISA 检测 MPO 蛋白量的变化

I/R 组、D-核糖组 MPO 显著高于假手术组（$P<0.05$），而 D-核糖组 MPO 又较 I/R 组显著下降（$P<0.05$）。结果见表 3。

**表 3 各组间心肌组织中 MPO 的表达（$\bar{x}\pm s$，$n$=8）**

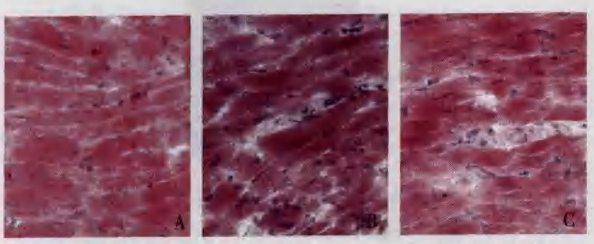
| 组别 | MPO |
|---|---|
| 假手术组 | 1.13 ± 0.03 |
| I/R组 | 5.68 ± 0.06# |
| D-核糖组 | 3.47 ± 0.04#* |

注：#，$P<0.05$，与假手术组比较；*，$P<0.05$，与 I/R 组比较

2.4 HE 染色观察病理改变

假手术组心肌组织心肌细胞排列整齐，细胞边界完整，横纹清晰，心肌组织中未见中性粒细胞浸润。I/R 组出现局灶

性心肌坏死，心肌细胞肿胀，细胞边界、横纹模糊，间质区及心肌细胞间可见中性粒细胞浸润。D-核糖组未见明显心肌细胞坏死，心肌细胞肿胀不明显，细胞边界、横纹清晰，间质区可见少量中性粒细胞浸润（见图 3）。



A. 假手术组　　B. I/R 组　　C. D- 核糖组

**图 3　各组间心肌组织病理变化(HE 染色 ×400)**

## 3　讨　论

I/R 特征表现为氧和血液作用于缺血细胞产生的爆发性炎性反应[3]。心肌缺血再灌注后中性粒细胞激活、浸润、脱颗粒可能是 MIRI 众多机制的共同效应途径和环节[4]。Hoffman JW 等[5]认为中性粒细胞浸润和活性氧自由基生成是造成 I/R 形成的重要原因。

本实验结果显示，与假手术组相比，D-核糖组、I/R 组 NF-κB、CINC-1mRNA、MPO 表达明显增高（$P<0.05$），中性粒细胞浸润明显增多，心肌损伤加重，说明 D-核糖组、I/R 组实验模型是成功的，同时也进一步验证了中性粒细胞激活、浸润、脱颗粒可能是 MIRI 的重要机制之一。而与 I/R 组相比，D-核糖组 NF-κB、CINC-1mRNA、MPO 表达明显降低，说明应用外源性 D-核糖可以明显减少缺血再灌注损伤。

外源性核糖可在磷酸戊糖途径较为活跃的组织器官，如肝脏、肾脏、红细胞等，作为磷酸戊糖途径的底物，加速磷酸戊糖循环，产生还原当量，以还原型辅酶Ⅱ的方式提高机体氧化系统的防御能力，提高氧化酶的活性，加速自由基的清除速度[6]。核糖可以明显的提高各组织器官内还原型谷胱甘肽的含量，加速过氧化氢的清除速度，这对于清除缺氧产生的过量自由基，抑制细胞膜脂质过氧化，保护细胞膜的完整性具有十分重要的意义[6]。缺血再灌注所参生的氧化物可以激活过氧化氢诱导的 P38 丝裂原活化蛋白激酶（p38 mitogen activated protein kinases，P38MAPK），进而使 TNF-α 等细胞因子产生增多[7]，TNF-α通过与靶细胞膜上 TNF 受体结合，活化的 TNF-α 受体通过一系列的反应，激活细胞内的信号蛋白，如 Caspases、p38MAPK 等，导致活化蛋白-1（Activating protein-1，AP-1）、NF-κB 活化[8]。本实验发现应用外源性 D-核糖可明显减少缺血再灌注心肌中 NF-κB 活化，其机制可能与减少缺血再灌注心肌中过氧化氢的清除有关。

IL-8 在转录阶段受 NF-κB 和 AP-1 的调节[9]，作为 CXC 亚家族的代表，具有特异性的中性粒细胞趋化和激活作用。大鼠的 CINC-1 是 CXC 亚家族成员，它相当于人的 IL-8，拥有强大的中性粒细胞趋化活性。中性粒细胞在粘附、趋化后释放活性氧自由基、蛋白酶、弹性蛋白酶、MPO 以及其他损伤组织的酶，对心肌造成损伤[10]。由于 MPO 是一种主要由中性粒细胞释放的酶，所以把它当做一个炎症指标，被广泛用于组织中中性粒细胞浸润程度的分析，并且髓过氧化物酶的活性与缺血再灌注引起的组织损伤是直接相关的。故我们在实验中应用 NF-κB、CINC-1mRNA、MPO 作为检测心肌损伤及心肌中中性粒细胞浸润指标。

综上所述，外源性 D-核糖可以通过减少中性粒细胞的浸润来减轻 I/R，其机制可能为：应用外源性 D-核糖可通过提高缺血再灌注区心肌能量的恢复，减少过氧化氢等氧自由基对核因子-κB 的激活，活化中性粒细胞的趋化因子（如 CINC-1）表达减少，使中性粒细胞的活化、浸润、脱颗粒明显减少，释放心肌组织中的 MPO 等其他损伤心肌的酶类明显降低，从而明显减轻 I/R。

## 参　考　文　献


[1] Pauly D F，Pepine C J.D-ribose as a supplement for cardiac energy metabolism[J].Cardiovasc Pharmacol ther，2000，5：249-258.

[2] Hitoaki S，Masaaki U，Takehiko A，et al.D-ribose attenuates ischemia/reperfusion-induced renal injure by reducing neutrophil activation in rats[J].Tohoku J.Exp.med，2009，218(1)：35-40.

[3] 王桂花，孟凡学，张树平，等.大鼠缺血再灌注心肌 TLR4、TNF-α、NF-κB 表达及其关系[J].第四军医大学学报，2009，30(20)：2133-2135.

[4] 陈　芳，魏继承.中性粒细胞的激活在心肌缺血再灌注损伤中的作用[J].西南医学，2009，11(1)：117-119.

[5] Hoffman J W，Gilbert T B，Poston R S，et al.Myocardial reperfusion injure.Etiology，mechanisms，and therapies[J].J Extra Corpor Technol，2004，36(4)：391-411.

[6] 熊正英，曲洪刚，刘海斌，等.核糖对大强度耐力训练大鼠血清酶活性和血清尿素、血糖、肌肝糖原含量的影响[J].天津体育学院学报，2006，21(5)：420-422.

[7] Wang M，Tsai B M，Turrentine M W，et al.P38 mitogen activated protein kinases mediates both death signaling and funcional depression in the heart[J].Ann Thorac Surg，2005，80(6)：2235.

[8] Dhingra S，Sharma A K，Singla D K，et al.P38 and ERK1/2 MAPKs mediate the interplay of TNF-alpha and IL-10 in regulating oxidative stress and cardiac myocyte apoptosis[J].Am J Physiol Heart Circ Physiol，2007，293(6)：3524.

[9] Yasumoto K，Okamoto S，Mukaida N，et al.Tumor necrosis factor alpha and interferson gamma synergistically induce interleukin-8 production in a human gastric cancer cell line through acting concurently on AP-1 and NF-κB like binding sites of the interleukin-8 gene[J].J Biol Chem，1992，267(31)：22506-22511.

[10] Okusa M D.The inflammatory cascade in acute ischemic real failure[J].Nephron，2002，90：133-138.


（责任编辑：张学颖）