基础研究 文章编号:0253-3626(2010)11-1668-03

PAF 拮抗剂红花黄色素对急性心肌梗死大鼠心功能及心肌 IL-1β mRNA 表达的影响

李 波,邓昌明,吴 艳,周大燕,刘地川,黄 晶
(重庆医科大学附属第二医院心内科,重庆 400010)

【摘 要】目的:探讨血小板活化因子(Platelet activating factor,PAF)拮抗剂红花黄色素对急性心肌梗死大鼠心功能及心肌白介素细胞-1β(Interleukin-1β,IL-1β)表达的影响。方法:将 54 只 SD 大鼠随机分成假手术组、心梗组和红花黄色素治疗组,采用结扎左冠状动脉前降支方法建立急性心肌梗死动物模型,术后 24 h 治疗组给予腹腔内注射红花黄色素 40 mg/(kg·d),心梗组和假手术组给予相同体积的生理盐水腹腔内注射。28 d 后用 Vivid 7 型多普勒超声仪检测各组大鼠心功能,计算左室重量指数,用 RT-PCR 法检测 IL-1β mRNA 水平表达。结果:与假手术组相比,心梗组和治疗组心功能明显降低($P<0.05$);与心梗组比较,治疗组心功能明显好转($P<0.05$)。与假手术组相比,心梗组和治疗组左室重量指数、IL-1β mRNA 水平的表达明显增加($P<0.05$);和心梗组比较,治疗组左室重量指数及 IL-1β mRNA 表达减少($P<0.05$)。结论:PAF 拮抗剂红花黄色素可通过改善急性心肌梗死大鼠心室重构,调节炎性细胞因子 IL-1β 的表达,从而改善急性心肌梗死大鼠心功能。

【关键词】心肌梗死;血小板活化因子(PAF)拮抗剂;心功能;IL-1β;大鼠
【中国图书分类法分类号】R541.4 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-05-12

Effects of Safflor yellow on heart function and IL-1 β mRNA expression of cardiac muscle after acute myocardial infarction in rats

LI Bo, et al
(*Department of Cardiology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effects of platelet activating factor (PAF) antagonist Safflor yellow on the heart function and IL-1β mRNA expression of cardiac muscle in rats after acute myocardial infarction. *Methods*: 54 SD rats were randomly divided into sham group, MI group and treatment group; acute myocardial infarction animal models were established by ligation of LAD; rats of treatment group were intervened by injecting intraperitoneally with 40 mg/(kg·d) safflor yellow after 24h; the MI group and sham group were injected with equal volume of saline. The heart functions were detected by Vivid 7-type Doppler ultrasound after 28 days; the left ventricular weight index were calculated and the IL-1β mRNA expression of cardiac muscle was detected by RT-PCR. *Results*: Compared with sham group, the heart function of MI group and treatment group were significantly depressed ($P<0.05$); and that of treatment group was better than that of MI group ($P<0.05$). Compared with sham group, the left ventricular weight index and IL-1β mRNA expression of cardiac muscle in MI group and treatment group were increased significantly ($P<0.05$); and the left ventricular weight index in treatment group was less than that in MI group; the IL-1β mRNA in treatment group was expressed less than that in MI group($P<0.05$). *Conclusions*: Platelet activating factor(PAF) antagonist Safflor yellow can improve the heart function in rats after acute myocardial infarction by improving left ventricular remodeling and regulating IL-1β expression.

【Key words】Myocardial infarction; Platelet activating factor(PAF) antagonist; Heart function; IL-1β; Rats

研究表明,红花黄色素是一种血小板活化因子(Platelet activating factor,PAF)拮抗剂,具有防治冠心病、抗凝血、抑制血栓形成、抑制血管平滑肌增殖等多重心血管保护作用[1]。本实验将研究其对急性心肌梗死大鼠心功能及心肌白介素细胞-1β(Interleukin-1β,IL-1β)mRNA 表达的影响,进一步探讨红花黄色素对急性心肌梗死大鼠心功能的保护作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SD 雄性大鼠 54 只,体重 220 g ± 20 g,由重

作者介绍:李 波(1984-),男,硕士,
研究方向:冠心病诊断与治疗。
通讯作者:邓昌明,男,副教授,E-mail:dy070308@126.com。

庆医科大学实验动物中心提供。

1.1.2 主要药品与试剂 注射用红花黄色素由浙江永宁药业股份有限公司生产，50 mg 中含羟基红花黄色素 A 35 mg（国药准字 Z20050146）.Trizol、GoldView 核酸染料：重庆惠而利生物技术有限公司；PrimeScript RT reagent Kit、TaKaRa Taq：成都微克生物技术有限公司；其他试剂均为国产。

1.1.3 主要仪器 ALC-V8 动物呼吸机：上海奥尔科特生物科技有限公司；RM6240 系列多道生理信号采集处理系统：成都仪器厂；Vivid 7 型多普勒超声仪（探头频率 10 MHz）：GE 公司；5810R 高速低温离心机：德国 Eppendorf 公司；DNA Engine PTC-200 型 PCR 仪、ChmiD oc XRS 凝胶成像分析仪：美国 BIO-RAD 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 大鼠心梗模型的制备、实验分组及给药方法 将实验动物随机分成 MI 组（心肌梗死模型）、SY 组（红花黄色素治疗）、SH 组（假手术），每组 18 只。心梗模型制备：将 MI 组与 SY 组实验动物用 3.5%的水合氯醛 10 ml/kg 腹腔注射麻醉后将大鼠仰位固定于操作台上，大鼠的四肢与 RM6240 系列多道生理信号采集处理系统相连接，气管插管后接入 ALC-V8 动物呼吸机，呼吸频率 70 次/min，潮气量 4 ml/100 g。沿胸骨左缘纵行切开，剪断第 3、4 肋骨后小心剪开心包膜，充分暴露心脏，以左冠状动脉前降支为标志，于左心耳根部下方约 2~3 mm 处穿线结扎造成急性心肌梗死，以心电图 ST 段弓背向上抬高为心梗模型建立成功的标志；SH 组，手术过程同 MI 组和 SY 组，只是在相同部位只穿线不结扎。术后给于 40 万 IU/ d 的青霉素腹腔注射，连续注射 3 d。

各组大鼠处理 SY 组：术后 24 h 给予腹腔注射红花黄色素 40 mg/(kg·d)，至术后 28 d；SH 组和 MI 组给予相同体积的生理盐水腹腔内注射。各组大鼠分笼饲养。

1.2.2 大鼠心脏超声检查 术后 28 d，采用 Vivid 7 型多普勒超声仪（探头频率 10 MHz）对各组大鼠进行心脏超声检查。用 3.5%的水合氯醛腹腔内注射（10 ml/kg），待大鼠麻醉后仰卧位固定于操作台，胸部备皮后将超声探头置于左胸，测量参数包括：左室后壁厚度、左室舒张末期内径、左室收缩末期内径、左室射血分数。

1.2.3 左室重量指数 大鼠称重后断颈处死，在心脏停止跳动前迅速取出心脏，轻轻挤压出心腔内的血液，去除血管组织、心房及右心室后留取左心室，用生理盐水冲洗后用电子天平称取左室湿重除以体重获得左室重量指数（mg/g）。

1.2.4 RT-PCR 法检测心肌 IL-1β mRNA 水平表达 在 pubmed 基因数据库中查询到大鼠 IL-1β 的 mRNA 基因编号为 NM_031512，委托上海生工生物工程技术服务有限公司合成引物如下：IL-1β：上游引物 5'-GTCACTCATTGTGGCTGTGGA-3'，下游引物 5'-GTCGTTGCTTGTCTCTCCTTGT-3'，扩增片段长度 319 bp；β-actin：上游引物 5'-GTGCTGAGTATGTCGTGGAGTCT-3'，下游引物 5'-GTGGAAGAATGGGAGTTGCTGT-3'，扩增片段长度 610 bp。

提取各组心肌细胞总 RNA，用紫外分光光度计测定各组总 RNA 浓度及纯度。在 0.2 ml PCR 管中依次加入下列物质配制 RT 反应体系：4 μl 5×PrimerScript Buffer，1 μl PrimerScript RT Enzyme Mix 1，1 μl Oligo dT Primer，4 μl Random 6 mers，3 μl Total RNA，7 μl RNase Free dH_2O，总反应体系 20 μl，混匀各管，37 ℃ 15 min；85 ℃ 5 s，反应结束后，各反应管置冰上冷却，取 4 μl cDNA 用做 PCR 反应，剩余 -20℃保存。在冰盒中配制 PCR 反应体系：0.125 μl TaKaRa Taq，2.5 μl 10×PCR Buffer（Mg^{2+} Free），1.5 μl $MgCl_2$，2 μl dNTP Mixture，4 μl cDNA，0.5 μl 上游引物，0.5 μl 下游引物，加入灭菌蒸馏水至总反应体系 25 μl，12 000 r/min 离心 10 s 后轻微振荡混匀，立即放于 PCR 仪上进行 PCR 反应，反应条件为：（1）94℃ 5 min；（2）94℃ 30 s；55℃ 30 s；72℃ 1 min；30 个循环。（3）72℃ 10 min。反应完后各组分别取 5 μl PCR 扩增产物在同一2%琼脂糖凝胶上以 100 V 电压电泳 30 min，用凝胶成像分析系统进行照相和扫描，记录结果图像，测定 IL-1β 与 β-Actin 的相对 A 值并进行半定量分析。

1.3 统计学处理

采用 SAS8.0 统计软件对数据进行分析，数据用均数±标准差（$\bar{x} \pm s$）表示。对多组计量资料的比较采用方差分析、Kruskal Wallis 检验，两两比较采用 SNK 检验、Wilcoxon 秩和检验。检验水准 $\alpha = 0.05$。

2 结 果

2.1 大鼠存活情况及心脏病理学观察

手术过程中因出血过多 SH 组与 MI 组分别死亡 2 只、SY 组死亡 1 只；因气胸及呼吸衰竭 SH 组死亡 4 只、MI 组死亡 3 只、SY 组死亡 2 只；因恶性心律失常 MI 组死亡 1 只、SY 组死亡 2 只；术后 36 h 因心力衰竭 SY 组死亡 2 只。28 d 后可见结扎部位以下心梗区颜色呈苍白色，左室腔明显增大，后壁增厚，前壁明显变薄。

2.2 各组大鼠心脏超声检查

超声检测结果显示：与假手术组相比，心梗组和治疗组的左室后壁厚度、左室舒张末期内径和左室收缩末期内径明显增大、左室射血分数明显降低（$P<0.05$），而治疗组较心梗组上述指标有所改善，差异具有统计学意义（$P<0.05$，表 1）。

2.3 左室重量指数

各组大鼠体重、左室重量及左室重量指数如表 2 所示：3 组大鼠体重无差异（$P>0.05$），与假手术组相比，心梗模型组和治疗组的左心室重量、左室重量指数明显增加，治疗组较心梗组有所改善，差异具有统计学意义（$P<0.05$）。

2.4 RT-PCR 法检测 IL-1βmRNA 水平表达

凝胶成像分析系统下发现：与假手术组相比，心梗组和治疗组 IL-1β 表达增加，治疗组较心梗组表达减少（图 1）。用 quantity one 软件分别测得假手术组、心梗模型组、红花黄色素治疗组 IL-1β 与 β-Actin 的相对 A 值分别为 0.53±0.07、

表 1 各组大鼠心脏超声检查结果($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	左室后壁厚度 LVPWT(mm)	左室舒张末期内径 LVDd(mm)	左室收缩末期内径 LVDs(mm)	射血分数 EF(%)
SH 组	12	1.24 ± 0.18	5.26 ± 0.42	2.14 ± 0.54	82.85 ± 4.52
MI 组	12	1.78 ± 0.17[a]	6.94 ± 0.82[a]	5.81 ± 0.83[a]	38.86 ± 9.31[a]
SY 组	11	1.54 ± 0.17[ab]	6.20 ± 0.88[ab]	5.02 ± 0.95[ab]	49.85 ± 8.96[ab]
F		22.35*	15.98	72.28	101.13
P		<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1

注:"*"表示 Kruskal Wallis 检验的 H 值。[a]. $P<0.05$ 与 SH 组相比;[b]. $P<0.05$ 与 MI 组相比

表 2 各组大鼠体重、左室重量、左室重量指数($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	体重(g)	左室重量(mg)	左室重量指数(mg/g)
SH 组	12	320.33 ± 12.15	571.67 ± 15.05	1.79 ± 0.03
MI 组	12	311.92 ± 8.88	850.67 ± 28.24[a]	2.73 ± 0.04[a]
SY 组	11	313.27 ± 10.47	686.09 ± 15.59[ab]	2.19 ± 0.03[ab]
F		3.12*	551.31	2 358.93
P		0.21	<0.000 1	<0.000 1

注:"*"表示 Kruskal Wallis 检验的 H 值。[a]. $P<0.05$ 与 SH 组相比;[b]. $P<0.05$ 与 MI 组相比

表 3 各组大鼠 IL-1β mRNA 的表达($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	IL-1β	*F*	*P*
SH 组	12	0.53 ± 0.07		
MI 组	12	0.97 ± 0.09[a]	84.05	<0.000 1
SY 组	11	0.68 ± 0.09[ab]		

注:[a]. $P<0.05$ 与 SH 组相比;[b]. $P<0.05$ 与 MI 组相比



图 1 各组大鼠心肌组织 IL-1β mRNA 表达

0.97 ± 0.09、0.68 ± 0.09,各组之间的差异有统计学意义($P<0.05$,表 3)。

3 讨 论

急性心肌梗死后,长期的神经内分泌系统激活及细胞因子的作用下,心肌细胞肥大,细胞外基质增多,胶原纤维网断裂变形,心室肥厚扩张,各种炎症细胞因子表达增加,而心肌结构的变化和炎性细胞因子的表达将长期影响患者的心室功能和预后,是急性心肌梗死患者发生心衰、猝死的重要原因。因此,改善急性心肌梗死后心肌结构的变化、抑制炎性细胞因子的表达、保护心肌细胞是改善急性心梗后心功能及远期预后的关键。

研究发现红花黄色素是一种通过阻断 PAF 途径而发挥抗血小板聚集作用的药物,而 PAF 是由血小板、内皮细胞、单核细胞等多种细胞合成和分泌,能够放大炎症和血栓级联反应参与人体各种疾病的发生和发展过程,而红花黄色素具有抗炎、抑制血栓形成等心血管保护作用。已有动物及临床实验表明[2-4],红花黄色素具有有效改善不稳定型心绞痛症状,抗心肌缺血,降低血粘度。还具有抗氧化作用,能通过抑制心肌脂质过氧化、增强细胞抗氧化能力而保护心肌细胞。

IL-1β 是具有高活性的致炎性细胞因子,可能在动脉粥样硬化及血栓形成性疾病中起重要作用,它通过促进粥样硬化斑块的形成、增强血管炎症反应、以及激发斑块的不稳定性造成急性心肌梗死,IL-1 还通过调节炎性反应以及增加基质金属蛋白酶的表达参与心肌损伤的重塑过程。IL-1 本身是一种重要的调节因子,能抑制心肌细胞的收缩性、促进心肌肥大、导致心肌细胞凋亡而参与心衰的病理生理过程[5]。本研究发现急性心肌梗死后 IL-1β 表达明显增加,这与 Zhang J 等[6]研究结果相似。IL-1β 与心肌梗死后左室重塑密切相关,Mitchell MD 等[7]研究表明 IL-1β 能够通过细胞分裂素活化蛋白激酶刺激心肌纤维细胞迁移,从而影响急性心肌梗死后心肌修复进展速度和加速心肌重构的过程,导致心衰的发生。Xiao H 等[8]发现 IL-1β 能够在转录和转录后过程中通过降解胶原、调节基质金属蛋白酶的活性,从而减少胶原的合成,并且该过程与 IL-1β 的浓度有关,因此,IL-1β 分泌的增加可能包括在心肌梗死后心室重构的过程中,以及 IL-1β 的浓度可能是影响心室重构程度的主要影响因素。Mountain DJ 等[9]体外实验也同样证实了 IL-1β 能够调节与血管发生相关的多种基因的表达,从而调节 MMP-2 的表达和活性,参与心室重塑。腹腔注射红花黄色素能明显改善急

基础研究 文章编号:0253-3626(2010)11-1671-05

微淋巴管形成对胃癌淋巴结转移的影响

王肖泽,王继见,黄金向
(重庆医科大学附属第二医院普外科,重庆 400010)

【摘 要】目的:探讨微淋巴管形成在胃癌淋巴结转移中的作用及其二者间的病理相关性。方法:取 40 例胃癌组织(筛选出有无淋巴结转移病例各 20 例,分为有转移组和无转移组),另取 15 例胃溃疡良性病变组织作对照组,采用免疫组化 SP 法检测血管内皮生长因子 C(Vascular endothelial growth factor-C,VEGF-C)、血管内皮生长因子受体 3(Vascular endothelial growth factor receptor-3,VEGFR-3)表达水平,再以肾水平蛋白(Podoplanin)标记微淋巴管内皮细胞,计数微淋巴管密度(Lymphatic microvessel density,LMVD)及分布特点。结果:胃癌组与对照组之间 LMVD 存在显著差异($P<0.05$),LMVD 在有转移组与无转移组有显著差异($P<0.05$),胃癌组中 LMVD 与性别年龄无显著相关性,VEGF-C 表达胃癌组与对照组有显著差异($P<0.05$),在有转移组与无转移组间表达强度有显著差异($P<0.05$)。VEGF-C 表达与 VEGFR-3 表达有高度相关性,VEGFR-3 的表达在有转移组与无转移组间有显著差异($P<0.05$)。结论:VEGF-C 与 VEGFR-3 高表达能够促进微淋巴管的生成,微淋巴管的增多亦可增强 VEGF-C 与 VEGFR-3 的表达。微淋巴管的增多在促进胃癌淋巴结转移中有重要意义。

【关键词】胃癌;免疫组化;淋巴转移;微淋巴管密度;血管内皮生长因子 C;微淋巴管生成
【中国图书分类法分类号】R656.6 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-04-19

作者介绍:王肖泽(1979-),男,硕士,住院医师,
研究方向:胃肠外科疾病。
通讯作者:王继见,男,教授,E-mail:wjj1963@163.com。

性心肌梗死大鼠的心功能。IL-1β 表达明显减少,左室重量指数降低,表明红花黄色素对心功能的改善可能与以下几个方面有关:①通过抑制炎性因子 IL-1β 的表达、降低脂质过氧化物、清除氧自由基、改善心肌能量代谢、降低心肌细胞损伤,从而保护心肌细胞[10];②红花黄色素能够抑制 H_2O_2 导致的乳酸脱氢酶 LDH 的释放、丙二醛 MDA 与超氧阴离子生成、Bax 基因的表达,抗氧化和抗细胞凋亡机制保护嗜铬细胞瘤细胞由 H_2O_2 导致的损伤和细胞凋亡[11],红花注射液也可通过上调 bcl-2 基因的蛋白表达与下调 Bax 基因的表达以保护缺血再灌注心肌损伤[12],因此红花黄色素通过抑制心肌细胞的凋亡改善左室功能。

综上所述,红花黄色素可能通过改善急性心肌梗死大鼠的心室重构,调节炎性细胞因子 IL-1β 的表达,从而改善急性心肌梗死大鼠的心功能。本实验进一步认识到 PAF 拮抗剂红花黄色素在心肌缺血中的心脏保护作用及其作用机制,对研究 PAF 受体拮抗剂在心肌缺血中的作用机制和临床应用具有一定的理论和实际指导意义。

参 考 文 献

[1] 杨 红,魏宗德.红花黄色素与心血管疾病的研究进展[J].西南军医,2009,11(1):83-85.

[2] Jin M,Li J R,Wu W. Study on the antioxidative effect of Safflor yellow[J]. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi,2004 ,29(5):447-449.

[3] 刘建宏,侯晓军.红花黄色素注射液治疗不稳定型心绞痛疗效观察[J].中西医结合心脑血管病杂志,2009,7(6):734-735.

[4] 徐持华,张善锋,马二民.大鼠心肌缺血再灌注损伤与红花黄素的保护作用[J].中国临床康复,2005,9(43):93-95.

[5] Bujak M,Frangogiannis N G. The role of IL-1 in the pathogenesis of heart disease[J].Arch Immunol Ther Exp (Warsz),2009,57(3):165-176.

[6] Zhang J,Cheng X,Liao Y H,et al. Simvastatin regulates myocardial cytokine expression and improves ventricular remodeling in rats after acute myocardial infarction[J]. Cardiovasc Drugs Ther,2005,19(1):13-21.

[7] Mitchell M D,Laird R E,Brown R D,et al. IL-1beta stimulates rat cardiac fibroblast migration via MAP kinase pathways[J].Am J Physiol Heart Circ Physiol,2007,292(2):1139-1147.

[8] Xiao H, Ji A M,Li Z L,et al. Interleukin-1beta inhibits collagen synthesis and promotes its decomposition in cultured cardiac fibroblasts[J]. Sheng Li Xue Bao,2008,60(3):355-361.

[9] Mountain D J,Singh M,Menon B,et al. Interleukin-1beta increases expression and activity of matrix metalloproteinase-2 in cardiac microvascular endothelial cells:role of PKCalpha/beta1 and MAPKs[J].Am J Physiol Cell Physiol,2007,292(2):867-875.

[10] Wang C,Zhang D,Li G,et al. Neuroprotective effects of safflor yellow B on brain ischemic injury[J].Exp Brain Res,2007,177(4):533-539.

[11] Wang C,Ma H,Zhang S,et al.Safflor yellow B suppresses pheochromocytoma cell (PC12) injury induced by oxidative stress via antioxidant system and Bcl-2 /Bax pathway[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol,2009,380(2):135-142.

[12] 明章银,蒋建刚,刘复兴,等.红花注射液对大鼠缺血再灌注心肌组织 Bcl-2 和 Bax 基因表达的影响[J].咸宁医学院学报,2002,16(2):81-83.

(责任编辑:冉明会)