基础研究 文章编号:0253-3626(2010)10-1486-04

蛋白酶体抑制剂对急性心肌缺血再灌注大鼠心脏结构及功能的影响

戴翠莲[1],罗开良[2],姜黔峰[1],张新民[1]

(1. 遵义医学院附属医院心内科,遵义 563003;2. 重庆医科大学附属第二医院心内科,重庆 400010)

【摘 要】目的:观察蛋白酶体抑制剂 MG-132 对急性缺血/再灌注大鼠心肌结构及功能的影响。方法:44 只 SD 大鼠随机分为假手术(Sham)组 12 只、缺血再灌注(I/R)组 16 只及缺血再灌注治疗(I/R+T)组 16 只;根据再灌注时间不同,各组大鼠又被分为 24 h 及 7 d 亚组。结扎左冠状动脉前降支 30 min 制作心肌缺血再灌注模型,I/R+T 组于再灌注前 5 min 静脉注射 MG-132(0.75 mg/kg),I/R 组及 Sham 组注射生理盐水,观察各组恶性心律失常的发生率、血流动力学参数、心肌组织结构改变及脑钠肽水平。结果:与 I/R 组相比,I/R+T 组室性心动过速发生率明显降低(34% vs 67%,$P<0.05$),心律失常起始时间比 IR 组显著延迟[(102.0 ± 11.0) s vs (406.0 ± 36.7) s,$P<0.01$];心功能检测显示,7 d 后左心室收缩压(Left ventricular systolic pressure,LVSP)及左心室等容收缩期内压最大上升速率(The maximum rate of left ventricular pressure rise,+dp/dtmax)增加显著,[分别为(126.45 ± 13.41) mmHg vs (108.64 ± 15.61) mmHg,$P<0.05$;5 355 ± 754 mmHg/s vs 4 860 ± 680 mmHg/s,$P<0.05$],左心室舒张末压(Left ventricular end-diastolic pressure,LVEDP)明显降低[(15.50 ± 6.94) mmHg/s vs (20.66 ± 8.80) mmHg/s,$P<0.05$],脑钠肽水平由 I/R 组的(1 486 ± 142) pg/ml 降低至(231 ± 134) pg/ml($P<0.01$)。病理形态学发现,MG-132 能显著减少心肌缺血再灌注后心肌细胞坏死、炎症细胞浸润和纤维结缔组织增生,改善心肌组织重塑。结论:蛋白酶体抑制剂能够改善缺血再灌注后的心肌结构和功能,具有心脏保护作用。

【关键词】蛋白酶体抑制剂;心功能;脑钠肽;心脏结构

【中国图书分类法分类号】R541.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-03-01

The influence of myocardial structure and function by MG-132 on acute myocardial ischemia reperfusion rats

DAI Cui-lian, et al

(*Department of Cardiology, the Affiliated Hospital, Zunyi Medical College*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the influence of proteasome inhibitor MG-132 prior to reperfusion in rat acute myocardial ischemia-reperfusion model whether MG-132 could improve myocardial structure and its function. *Methods*: 44 Adult Sprague-Dawley rats were randomly divided into 3 groups: left anterior descending (LAD) coronary artery ligation for 30 minutes with subsequent 24 hours and 7 days reperfusion (I/R groups), LAD ligation for 30 minutes with subsequent 24 hours and 7 days reperfusion with treatment by MG-132 (I/R+T groups), and Sham group. After LAD was ligated for 25 min, 5 min before reperfusion, MG-132(0.75 mg/kg)was given by vein injection in I/R+T groups, and other groups were given by the same capacity of sterile saline. The incidence of malignant arrhythmia, hemodynamic parameters, the structure of myocardial tissue and the level of B-type natriuretic peptide were measured. *Results*: Compared with I/R group, the incidence of malignant arrhythmia was decreased (34% vs 67%, $P<0.05$), the initiate of ventricular arrhythmia was delayed (102.0 ± 11.0) s vs (406.0 ± 36.7) s, $P<0.01$, the left ventricular systolic pressure (LVSP) and +dp/dtmax were significantly raised in I/R+T group (126.45 ± 13.41) mmHg vs (108.64 ± 15.61) mmHg, $P<0.05$; (5 355 ± 754) mmHg/s vs(4 860 ± 680) mmHg/s, $P<0.05$, respectively). In the same time, we also found that B-type natriuretic peptide were decreased in I/R+T group than in I/R group (231 ± 134) pg/ml vs (1 486 ± 142) pg/ml, $P<0.01$ and MG-132 can improve the myocardial structure injury and inhibit the ventricular remodeling as well. *Conclusion*: Our results demonstrate that MG-132 could improve the myocardial structure and function, and play a very important role in myocardial protection.

【Key words】Proteasome inhibitor; Heart function; B-type natriuretic peptide; Cardiac structure

作者介绍:戴翠莲(1966-),女,教授,博士,
研究方向:泛素-蛋白酶体系统与冠心病。

基金项目:贵州省教育厅青年基金(编号:C-358);贵州省优秀科技教育人才省长专项资金(编号:黔省专合字[2007]81 号);贵州省科技厅基金(编号:黔科合字[2007]2222 号。

心肌梗死后再血管化所致的心肌缺血再灌注损伤越来越引起重视,如何抑制再灌注损伤已经成为一个急需解决的问题。近期研究表明,蛋白酶体抑制剂能够抑制炎症损伤[1,2],减少心肌细胞凋亡[3],具有心肌保护作用[4,5],但其对缺血再灌注大鼠心肌的结构和功能有何影响目前还不清楚,本实验将进一步对其进行深入研究。

1 材料和方法

1.1 动物模型的建立和分组

成熟 SD 大鼠 44 只,体重(220 ± 50) g,雌雄各半(第三军医大学动物中心提供)。模型建立方法参照文献[6]。以3.5%水合氯醛(10 ml/kg)腹腔注射麻醉后将大鼠接心电图机,气管插管后接小动物呼吸机。于胸骨左缘 0.5 cm 逐层打开胸腔,剪开心包,于左冠状动脉前降支(Left anterior descending,LAD)发出约 2 mm 处穿线,打活结以阻断其血流 30 min,造成急性心肌梗死后,松开结扎线则形成再灌注。以心电图改变及心肌颜色变化作为心肌缺血/再灌注模型成功的标志。

根据缺血再灌注时间和是否给予 MG-132 干预,将大鼠分为:①缺血/再灌注 +MG-132(I/R+T)组:结扎大鼠 LAD,30 min 后再灌注,于再灌注前 5 min 将溶于 5 ml 生理盐水中的蛋白酶体抑制剂 MG-132 以 0.75 mg/kg(购于 Calbiochem公司)静脉注入,并根据取材时间点的不同,将该组分为 I/R 24 h 及 I/R 7 d 2 个亚组,每个亚组 8 只大鼠;②I/R 组,缺血和再灌注时间以及分组的情况完全同 I/R+T 组,于再灌注前 5 min 静脉注入 5 ml 生理盐水;③假手术(Sham)组,手术过程、分组及给药情况同 I/R 组,但只穿线不打结,每亚组 6 只大鼠。术后均予长效青霉素 40 万 U 腹腔内注射。

1.2 采集标本及检测指标

1.2.1 心律失常发生情况数据采集 监测所有大鼠手术前、结扎 LAD 及再灌注 2 h 的心电图,计算并分析心律失常发生情况。

1.2.2 血流动力学检测 在完成前述实验步骤后在各个时间点再次予大鼠 3.5%水合氯醛腹腔内注射麻醉,接呼吸机后原切口进胸,显露心尖,将含肝素液导管自心尖向心底方向插入左心室腔内,导管另一头连接于压力换能器,导入医学图象分析系统(BL-410 生物机能实验系统,成都泰盟科技有限公司)测得左心室收缩压(Left ventricular systolic pressure,LVSP)、左心室舒张末压(Left ventricular end-diastolic pressure,LVEDP)、心率(Heart rate,HR),同时同步输入微分器描记曲线,测得左心室等容收缩期室内压最大上升速率(The maximum rate of left ventricular pressure rise,+dp/dtmax)、左心室等容舒张期室内压最大下降速率(The maximum rate of left ventricular pressure decrease,-dp/dtmax)。

1.2.3 脑钠肽水平 完成心功能检测后右心室取血,分离血清,ELISA 法检测脑钠肽水平,严格按照说明书操作(试剂盒购于美国 PhoenixPeptide 公司)。

1.2.4 心肌超微结构变化 于大鼠心脏停跳前摘取心脏,迅速分离出左心室,取梗死周围心肌组织,1 mm^3 大小共 5 块用于电镜检查,尽量在同一部位取材。将用于电镜检查的组织在 1 min 内置于 2.5%戊二醛前固定,1%锇酸后固定,丙酮逐级脱水,环氧树脂 Epon812 包埋,LKBⅢ型超薄切片机切片,1%醋酸双氧铀及枸橼酸铅双重染色,JEM-1400 型透射电镜观察。

1.3 统计学处理

用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,所有计量资料数据以均数 ± 标准差表示。两组间比较计量资料采用 t 检验,计数资料采用卡方检验,以 $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组大鼠生存及死亡分析

大鼠总生存率为 88.6%,其中 I/R 组存活 13 只,存活率为 81%;I/R+T 组存活 14 只,存活率为 88%;Sham 组均存活。死亡原因分别为:恶性心律失常占 60%(I/R 组 2 只,I/R+T 组 1 只),大出血占 40%(I/R 组及 I/R+T 组各 1 只)。心律失常结果分析发现,I/R+T 组在缺血/再灌注过程中,发生心律失常起始时间(406.0 ± 36.7) s vs IR 组(102.0 ± 11.0) s 显著延迟($P<0.01$);室速持续时间比 IR 组短[分别为:I/R 组(19.6 ± 4.0) s,I/R+T 组 (6.1 ± 3.0) s,$P<0.01$];I/R 组的室性心动过速的发生率为 67%,I/R+T 组为 34%,两者差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.3 血流动力学检测

结果见表 1。与 I/R 组比较,I/R+T 组 LVEDP 减低,LVSP、+dp/dt 明显升高,差异均具有统计学意义($P<0.05$);-dp/dt 变化虽然没有统计学意义,但有升高。

2.4 脑钠肽水平

各组的脑钠肽水结果显示,缺血再灌注 24 h 后,I/R+T组的脑钠肽水平(1 080 ± 138) pg/ml 低于 I/R 组(1 208 ± 146) pg/ml,但差异无统计学意义($P>0.05$),而在缺血再灌注 1 周后,I/R+T 组的脑钠肽水平(231 ± 134) pg/ml 则明显低于 I/R 组(1 486 ± 142) pg/ml,差异有统计学意义($P<0.01$)。

表 1 各项血流动力学检测结果

指标	I/R 组		I/R+T 组		Sham 组	
	24 h(n=6)	7 d(n=7)	24 h(n=7)	7 d(n=7)	24 h(n=6)	7 d(n=6)
HR(beat/min)	423 ± 45	442 ± 34	432 ± 32	436 ± 40	396 ± 12	400 ± 29
LVSP(mmHg)	102 ± 23.76	108.64 ± 15.61	119 ± 5.67	126.45 ± 13.41*	142.65 ± 12.15	138.60 ± 15.02
LVDEP(mmHg)	18.32 ± 12.58	20.66 ± 8.80	16.72 ± 7.47	15.50 ± 6.94*	10.19 ± 10.80	9.56 ± 7.82
+dp/dt(mmHg/s)	5 029 ± 356	4 860 ± 680	5 539 ± 631	5 355 ± 754*	6 005 ± 1 073	6 108 ± 900
-dp/dt(mmHg/s)	3 145 ± 570	3 488 ± 758	3 550 ± 740	3 776 ± 329	4 810 ± 732	4 700 ± 885

* 与 I/R 组相应亚组比较 $P<0.05$

2.5 HE 染色

光镜下，假手术组动物心脏 3 层结构清晰，心肌纤维排列整齐，未见断裂，变性及坏死；间质内未见炎细胞浸润；心内膜、心外膜亦未见异常改变(图 1)。I/R 24 h 亚组，心肌肌浆红染，梗死区炎症反应明显(图 1A)。I/R+T 24 h 亚组，心肌肌浆红染、炎症反应较 I/R 组明显减轻(图 1C)。I/R 7 d 亚组，见大片心肌组织坏死溶解，被增生的肉芽组织所替代，其间可见散在分布呈岛状或细带状的存活心肌组织，横纹消失，肌丝断裂溶解，核固缩或溶解(图 1B)。I/R+T 7 d 亚组坏死心肌明显减少(图 1D)。

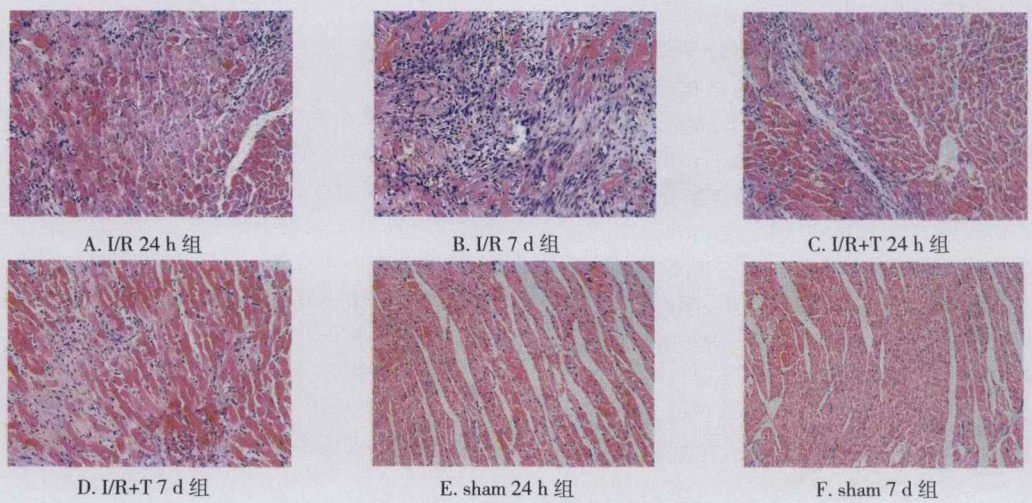
2.6 电镜

透射电镜检查结果显示：I/R 组电镜下可见肌丝排列紊乱、分离及崩解，肌丝分离、溶解或消失，局部肌丝与闰盘分离，肌纤维明暗带模糊；心肌细胞线粒体普遍损伤严重，嵴不清楚，水肿明显；细胞核多切迹凹陷，染色质分布以及排列异常，部分心肌纤维细胞核浓缩，电子密度均匀增高。I/R+T 组较 IR 组肌丝、线粒体、细胞核破坏均有明显改善(图 2)。

3 讨 论

缺血再灌注后心肌细胞的结构及功能状态严重影响了患者的预后，缺血再灌注损伤所致的电不稳定性是导致恶性心律失常的主要原因，由此增加了死亡。本实验结果显示，蛋白酶体抑制剂能够显著减少心肌缺血再灌注后恶性心律失常的发生率、缩短其持续时间，并能降低急性心肌缺血再灌注后大鼠的死亡率，这与 Huang 的研究结果相似[7]。Huang 在狗的心梗模型上发现，缺血后 1 h 内抑制泛素蛋白酶体系统能减少恶性心律失常和心源性猝死发作，并减少心肌梗死面积，进一步研究发现，蛋白酶体抑制剂通过在心外膜心律失常易发区(Arrhythmia-prone epicardial borderzone，EBZ)稳定 G 蛋白偶联受体激酶 2(G protein-coupled receptorkinase-2，GRK2)，降低心肌组织对 β－受体激动剂的敏感性，从而减少室性心律失常以及心源性猝死的发生；而蛋白酶体抑制剂稳定 GRK2 可能是通过热休克蛋白途径实现的[7]。

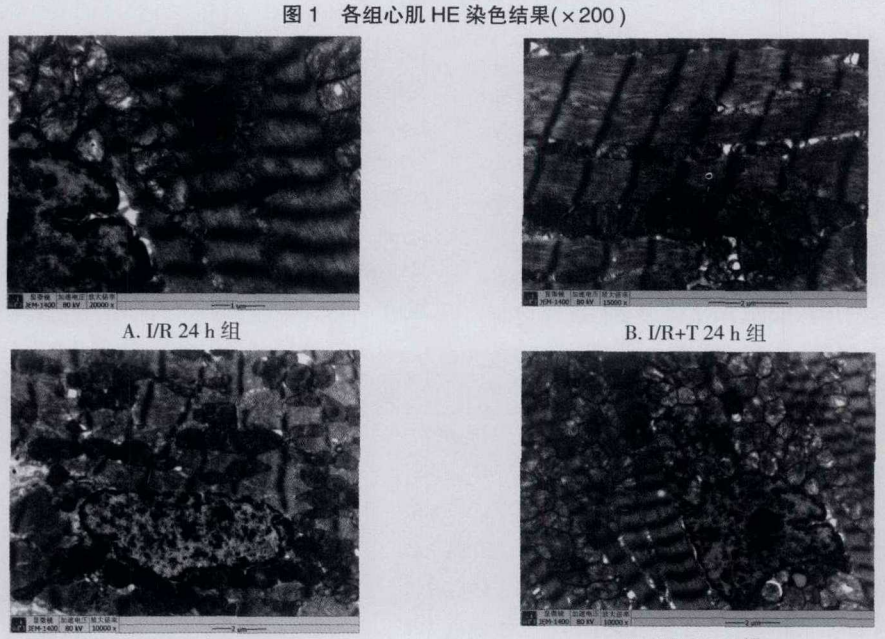
病理形态学检测显示，*MG-132* 处理组与对照组相比，显



A. I/R 24 h 组　B. I/R 7 d 组　C. I/R+T 24 h 组

D. I/R+T 7 d 组　E. sham 24 h 组　F. sham 7 d 组

图 1　各组心肌 HE 染色结果(×200)



A. I/R 24 h 组　B. I/R+T 24 h 组

C. I/R 7 d 组　D. I/R+T 7 d 组

图 2　电镜图

著改善了心肌缺血再灌注后心肌细胞坏死、炎症细胞浸润和纤维结缔组织增生，减少肌丝断裂溶解及线粒体损伤，故改善了心肌的组织重塑。Stangl 等[8]研究同样发现，在培养的心肌细胞中，低剂量蛋白酶体抑制剂 MG-132 能减少心肌细胞坏死和凋亡、增加心肌细胞存活，具有心肌保护作用。其可能机制与诱导热休克蛋白表达相关，Hsp70 可通过结合因缺血而受损的蛋白质，修复并维持其结构的稳定性，从而减轻受损蛋白质的破坏，达到心肌保护作用。

本研究还对血流动力学进行了监测，结果发现，心肌缺血再灌注后 24 h 即出现 LVSP、+dp/dt 降低、LVDP 增高，与其相比，7 d 后上述指标仍降低，但是较 24 h 略有所改善，可能与部分心肌细胞功能代偿有关。当用 MG-132 治疗后明显提高心肌缺血再灌注后左室收缩压和左室最大收缩速率，减低了左室舒张末压，改善了血流动力学异常。但 van Hees 与本研究结果不一致[9]，该作者认为蛋白酶体抑制剂的心脏保护作用在于改善了膈肌功能，而非血流动力学指标。其在结扎 LAD 导致的心衰大鼠中，静脉注射了另一种蛋白酶体抑制剂bortezomib 后，显著抑制了与心肌肥大相关的 MuRF-1 和 MAFbx 的表达，增加了膈肌肌球蛋白的含量。分析结果不同的可能的原因是，不同的蛋白酶体抑制剂针对不同的心脏蛋白酶体亚型具有不同的抑制作用，不同的蛋白酶体亚型用同种相同剂量的蛋白酶体抑制剂达到的作用不同[10]。

近年研究发现，N 端脑钠肽前体与心力衰竭的严重程度相关，可反映左心室功能。动物实验表明，脑钠肽水平在健康大鼠、无症状的心脏病大鼠以及心衰大鼠中显著不同[11]，心肌病大鼠[12]及心肌梗死后心衰大鼠[11]，其脑钠肽水平均显著增加。新近的人群实验也发现，脑钠肽在左心室质量增加、心脏功能异常者显著增加[13]。B 型脑钠肽对于住院的急性冠脉综合征患者的心血管事件具有预测价值[14]，而且脑钠肽能够准确区分大鼠的呼吸困难是心衰所致还是非心脏病所致[15]。因此，各项实验均表明，脑钠肽对心力衰竭具有很好的预测价值，故本实验将脑钠肽作为检测心衰的指标。结果显示，脑钠肽水平在心肌缺血再灌注 24 h 即开始升高，至第 7 d 呈持续升高趋势，但是蛋白酶体抑制剂治疗组则明显下降，且在 7 d 后达到假手术组水平。本实验从血流动力学数据及脑钠肽水平均证明了蛋白酶体抑制剂能够改善心功能。

注素蛋白酶体系统(Ubiquitin-proteasome system，UPS)心肌细胞最重要的蛋白质质量控制系统，不适当的蛋白质质量控制在 I/R 损伤及慢性心力衰竭发展中起着重要作用[16]，由于冠心病的严重程度与泛素的表达水平呈正相关[17]，故冠心病患者存在 UPS 的功能失调。如何适时适度地调节 UPS 是近年心脏保护的研究热点，本研究表明于心脏缺血再灌注前静脉注射 MG-132(0.75 mg/kg)能减少恶性心律失常，降低死亡率，改善心肌结构及心功能，具心脏保护作用，此为抑制心肌损伤提供了新的治疗方法。

参 考 文 献

[1] Gao G, Zhang J, Si X, et al. Proteasome inhibition attenuates coxsackievirus-induced myocardial damage in mice[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008, 295(1): 401-408.

[2] Marfella R, Filippo C D, Portoghese M, et al. The ubiquitin-proteasome system contributes to the inflammatory injury in ischemic diabetic myocardium: the role of glycemic control[J]. Cardiovasc Pathol, 2009, 18(6): 332-345.

[3] 戴翠莲，罗开良，陈章荣，等. MG-132 对大鼠急性缺血/再灌注心肌细胞凋亡的影响研究[J]. 中国动脉硬化杂志，2007，15(5)：369-373.

[4] 戴翠莲，罗开良，陈章荣，等. 抑制 UPS 对缺血再灌注大鼠心肌 Hsp27 和 TNF-α 的影响[J]. 第三军医大学学报，2008，30(22)：2115-2119.

[5] Dreger H, Westphal K, Weller A, et al. Nrf2-dependent upregulation of antioxidative enzymes: a novel pathway for proteasome inhibitor-mediated cardioprotection[J]. Cardiovasc Res, 2009, 83(2): 354-361.

[6] 戴翠莲，罗开良. 蛋白酶体抑制剂 MG-132 对大鼠急性心肌缺血再灌注损伤的保护作用研究[J]. 重庆医科大学学报，2006，31(4)：528-531.

[7] Huang S, Patterson E, Yu X, et al. Proteasome inhibition 1 h following ischemia protects GRK2 and prevents malignant ventricular tachyarrhythmias and SCD in a model of myocardial infarction[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008, 294(3): 1298-1303.

[8] Stangl K, Günther C, Frank T, et al. Inhibition of the ubiquitin-proteasome pathway induces differential heat-shock protein response in cardiomyocytes and renders early cardiac protection[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 291(3): 542-549.

[9] van Hees H W, Li Y P, Ottenheijm C A, et al. Proteasome inhibition improves diaphragm function in congestive heart failure rats[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2008, 294(6): 1260-1268.

[10] Kloss A, Meiners S, Ludwig A, et al. Multiple cardiac proteasome subtypes differ in their susceptibility to proteasome inhibitors[J]. Cardiovasc Res, 2010, 85(2): 367-375.

[11] Connolly D J, Magalhaes R J, Syme H M, et al. Circulating natriuretic peptides in cats with heart disease[J]. J Vet Intern Med, 2008, 22(1): 96-105.

[12] Zimmering T M, Meneses F, Nolte I J, et al. Measurement of N-terminal proatrial natriuretic peptide in plasma of cats with and without cardiomyopathy[J]. Am J Vet Res, 2009, 70(2): 216-222.

[13] Eggers K M, Lindahl B, Venge P, et al. B-type natriuretic peptides and their relation to cardiovascular structure and function in a population-based sample of subjects aged 70 years[J]. Am J Cardiol, 2009, 103(7): 1032-1038.

[14] Coppola G, Corrado E, Mulè M C, et al. Analysis of N-terminal pro-B-type natriuretic peptide in patients with acute coronary syndromes [J]. Coron Artery Dis, 2009, 20(3): 225-229.

[15] Fox P R, Oyama M A, Reynolds C, et al. Utility of plasma N-terminal pro-brain and non-cardiac causes of acute dyspnea in cats[J]. J Vet Cardiol, 2009, 11(1s): 51-61.

[16] Wang X, Su H, Ranek M J. Protein Quality Control and Degradation in Cardiomyocytes[J]. J Mol Cell Cardiol, 2008, 45(1): 11-27.

[17] Chen S M, Li Y G, Wang D M, et al. Expression of heme oxygenase-1, hypoxia inducible factor-1alpha, and ubiquitin in peripheral inflammatory cells from patients with coronary heart disease[J]. Clin Chem Lab Med, 2009, 47(3): 327-333.

(责任编辑：张学颖)