基础研究 文章编号:0253-3626(2010)09-1348-03

低压冷停搏液灌注对大鼠心肌 NF-κB p65 表达水平的影响

严 宇[1],杨双强[1],杨庆军[2]

(1.重庆医科大学附属第一医院胸心外科,重庆 400016;2.重庆市中山医院心脏外科 重庆市心血管疾病治疗研究中心,重庆 400013)

【摘 要】目的:研究观察不同压力心脏停搏液灌注对离体大鼠心脏核因子 κB 亚基 p65 亲和肽(NF-κB p65)表达的影响,为体外循环术中心肌保护提供新的方法和思路。方法:选择健康 SD 大鼠 30 只,随机分为对照组、低压灌注组和高压灌注组,每组 10 只。对照组于麻醉后切开胸腔取正常心肌备检;低压灌注组麻醉后切开胸腔取出心脏,建立离体 Langendorff 灌注模型,以 50 mmHg 的压力灌注 4℃的 St.Thomas 心脏停搏液 5 min,然后取出心肌标本备检;高压灌注组麻醉后切开胸腔取出心脏,建立离体 Langendorff 灌注模型,以 100 mmHg 的压力灌注 4℃的 St.Thomas 心脏停搏液 5 min,然后取出心肌标本备检。运用 Western blot 免疫组化的方法从蛋白水平观察大鼠心肌 NF-κB p65 在不同实验组中的表达规律。结果:免疫组化提示,与正常对照组(80.1 ± 9.10)相比,不同压力停搏液灌注后大鼠心肌 NF-κB p65 表达均升高,但低压灌注组心肌的 NF-κB p65 表达水平(117.5 ± 15.5)明显低于高压灌注组(226.7 ± 12.5)($P<0.05$);同样,Western blot 方法检测出的 NF-κB p65 蛋白相对光密度值也有相同的结果,高压灌注组 NF-κB p65 相对光密度值(1.58 ± 0.13)明显高于对照组(0.44 ± 0.05)和低压灌注组(0.95 ± 0.05)($P<0.05$)。结论:不同压力心脏停搏液灌注下,大鼠心肌的 NF-κB p65 均有不同程度的表达,但低压灌注组的 NF-κB p65 的表达水平明显低于高压灌注组,可能对心肌会有更好的保护作用。

【关键词】停搏液;低压灌注;心肌保护;核因子 κB 亚基 p65 亲和肽

【中国图书分类法分类号】R654.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-03-10

Expression of NF-κB p65 on the myocardium of low pressure cardioplegia perfusion in rat hearts

YAN Yu, et al

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

【Abstract】*Objective*: To study the NF-κB p65 expression of the myocardium with different pressure cardioplegia perfusion in rat hearts in order to find the new way for myocardial protection on cardiopulmonary bypass. *Methods*: Thirty of Sprague Dawley rats were divided into three groups randomly: the control group, low pressure group and high pressure group. Control group: the normal myocardial samples were collected for study. Low pressure group : the hearts were perfused with a 4℃ St.Thomas' cardioplegia solution at the pressure of 50 mmHg for 5 minutes, then the myocardial samples were collected for study. High pressure group: the hearts were perfused with a 4℃ St. Thomas' cardioplegia solution at the pressure of 100 mmHg for 5 minutes, then the myocardial samples were collected for study. The NF-κB p65 expression of the myocardium were measured respectively by immunohistochemical staining and Western blotting. ***Results***: Integrated optical density (IOD) was measured by immunohistochemical. Control group: there was some expression of NF-κB p65 (80.1 ± 9.10). High pressure group: the expression of NF-κB p65 was observed in the myocardium(226.7 ± 12.5). Low pressure group: the expression of NF-κB p65 was observed in the myocardium too (117.5 ± 15.5), but the density level was obviously lower than high pressure group ($P<0.05$). The relative optical density was detected by Western blot analysis. Control group: there was some expression of NF-κB p65 (0.44 ± 0.05). High pressure group: the expression of NF-κB p65 was observed in the myocardium (1.58 ± 0.13). Low pressure group: the expression of NF-κB p65 was observed in the myocardium too (0.95 ± 0.05), it was significantly lower than high pressure group ($P<0.05$). *Conclusion*: The results suggest that there were different degree expression of NF-κB p65 with different pressure cardioplegia perfusion, but the low pressure cardioplegia perfusion was better than high pressure in myocardial protection.

【Key words】Cardioplegia; Low pressure cardioplegia perfusion; Myocardial protection; NF-κB p65

作者介绍:严 宇(1972-),男,硕士,研究方向:冷停跳液灌注技术。

通讯作者:杨双强,男,教授,E-mail:yyshuangqiang@163.com。

体外循环手术中的冷停搏液灌注是保护心肌缺血再灌注损伤的有效手段，其主要目的是尽量减少心肌的损伤。在心脏停搏时，冠状血管阻力下降，如果冷停搏液的压力较高，会引起心肌水肿，加重组织炎性反应，甚至会导致心肌细胞早期的凋亡、坏死。核因子 -κB（NF-κB）为一个转录因子蛋白家族，其中核因子 κB 亚基 p65 亲和肽（NF-κB p65）的表达与心肌的缺血性损伤和炎性反应密切相关[1]，而且 NF-κB p65 还与心肌细胞凋亡和坏死相关[2,3]。本实验通过建立大鼠的冷停搏液灌注模型，应用 Western-blot 和免疫组化方法对心肌细胞 NF-κB p65 的表达进行研究，以 NF-κB p65 的表达水平来评价不同压力的冷停搏液灌注对心肌的损伤程度，为实际体外循环术中的心肌保护提供客观的科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物及分组 从重庆医科大学动物实验中心购得健康、成年 SD 大鼠 30 只，重 220～240 g，随机分成 3 组，每组 10 只。

1.1.2 仪器和试剂 Langendorff 离体心脏灌流系统、CCD、图像分析系统、垂直电泳仪、转膜仪、NF-κB p65 抗体、SABC 免疫组化试剂盒，ECL 显色试剂盒。

1.2 方法

1.2.1 心肌缺血再灌注模型的建立 实验动物：大鼠以戊巴比妥钠 45 mg/kg 腹腔麻醉，仰位固定，从一侧股静脉，注入肝素 125 U/ 只。用手术剪剪开大鼠胸骨，显示心脏位置，切开心包，分离至主动脉弓部。用手术剪于上下腔静脉开口处剪断上下腔静脉，于肺静脉开口处剪断肺静脉，于主肺动脉处剪断肺动脉，于主动脉弓分叉处之前剪断主动脉，取出心脏。对照组直接取出心脏固定，低灌注组和高灌注组采用 Langendorff 灌注模型作大鼠心脏灌流，取出心脏后，速将心脏投入 4℃ Krebs-Henseleit（K-H）液中，冲洗冠状动脉中的残留血液，将心脏移到灌流装置下端，于主动脉根部插入 20 号留置针测压，低灌注组以 50 mmHg 的压力灌注 4℃的 St.Thomas 心脏停搏液 5 min，剪开肺动脉根部，以利停搏液顺利流出，灌注结束后取出心脏固定。高灌注组以 100 mmHg 的压力灌注 4℃的 St.Thomas 心脏停搏液 5 min，剪开肺动脉根部，以利停搏液顺利流出，灌注结束后取出心脏固定。

1.2.2 心脏组织形态学观察、免疫组织化学法检测心肌 NF-κB p65 表达及分布 新鲜取材的大鼠心脏组织于 4%多聚甲醛中固定，取不同部位的心肌组织进行脱水、石蜡包埋切片，常规苏木精 - 伊红（H·E）染色。免疫组化：脱蜡至水，微波抗原修复，山羊血清封闭，一抗工作液中 4℃过夜，二抗工作液中室温 1 h，DAB 显色、苏木精复染、二甲苯透明、中性树胶封片。显微镜下观察结果，并在具可比性的视野采集图片，计算机图像分析系统对阳性信号进行计量分析。每张切片选取 10 个高倍视野，测量一定面积内阳性信号面积和选定面积及信号平均灰度值，计算积分光密度值（Integrated optical density，IOD）为阳性面积乘以阳性信号平均灰度。

1.2.3 免疫印迹（Werstern blot）检测心肌 NF-κB p65 蛋白表达 每组取 3 份心肌组织加入细胞裂解液中，置于冰上，用组织匀浆器打碎组织，冰上放置 20 min，4℃ 离心 20 min 收集上清。BCA 法测定蛋白浓度，取等量组织蛋白，进行 SDS-PAGE 电泳，电泳完毕后，利用电转仪将蛋白转到 PVDF 膜上。加 5%脱脂奶粉，37℃封闭 1～2 h。加入工作浓度的一抗，4℃过夜。TBST 溶液充分洗膜后加入二抗，室温 1 h，加入 ECL 系统显色 3 min，压片、洗膜，观察结果，并计算相对光密度值（Relative optical density，ROD）。

1.2.4 统计学处理 所有数据均经 SPSS for windows 软件进行 t 检验，多组间比较应用 ANOVA 法进行方差分析，两两间比较应用 Student-Newman-Keulsa 法进行 q 检验。数据应用均数 ± 标准差表示。

2 结 果

2.1 心肌组织 H.E 染色结果

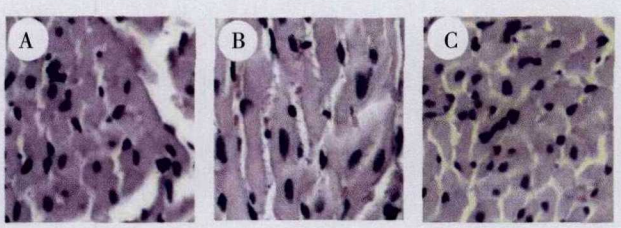
低压灌注组和对照组心肌细胞染色清晰，形态完整，细胞内结构正常。高压灌注组心肌细胞偶见肿胀，未见心肌凝固性坏死和炎性细胞浸润（图 1）。

2.2 免疫组化染色结果

与对照组相比，灌注后 NF-κB p65 在心肌组织中的表达均升高，但低压灌注组心肌组织中其表达水平明显低于高压灌注组（图 2，表 1）。

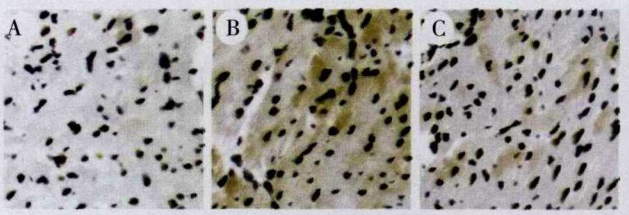
2.3 Western blot 结果

低压灌注组和高压灌注组与对照组相比 NF-κB p65 蛋白表达量明显升高，但低压灌注组的 NF-κB p65 蛋白表达量明显低于高压灌注组（图 3），2 组间差异有统计学意义（表 1，$P<0.05$）。



A. 对照组；B. 高压灌注组；C. 低压灌注组

图 1 各组心脏组织 H·E 染色结果



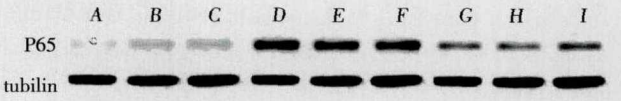
A. 对照组；B. 高压灌注组；C. 低压灌注组（×200）

图 2 免疫组化检测 NF-κB p65 分别在各组大鼠心肌中的表达

表 1 各组大鼠心脏心肌 NF-κB p65 蛋白的表达(IOD 值)(n=10)和相对光密度值($\bar{x} \pm s$, n=3)

分组	NF-κB p65 IOD 值	NF-κB p65ROD 值
对照组	80.1 ± 9.10	0.44 ± 0.05
高灌注组	226.7 ± 12.5*	1.58 ± 0.13*
低灌注组	117.5 ± 15.5*▲	0.95 ± 0.05*▲

注:*P<0.05 vs 对照组; ▲P<0.05 vs 高灌注组



ABC: 对照组;DEF:高灌注组; GHI:低灌注组

图 3 Western blot 检测各组大鼠心肌 NF-κB p65 蛋白表达量

3 讨 论

NF-κB 是一种具有基因转录多项调控作用的转录因子,是参与炎症反应的一个重要转录因子,广泛存在于真核细胞中,参与许多基因表达的调控[4]。由 p50 和 p65 亚基形成的二聚体是 NF-κB 最常见的活化形式,也是最丰富的二聚体,p50/p65 二聚体几乎存在于所有的细胞中。NF-κB p65 是 NF-κB 发挥生物学作用的所必须的亚单位[5]。大鼠心肌缺血 5 min 后,NF-κB p65 即见提高[6]。Lindner 和 Collins[7]的研究发现血管内皮细胞因缺氧刺激而损伤,先有 NF-κB 被激活,造成血管和心肌的损伤,而损伤程度的大小和 NF-κB p65 的表达强度成正比[2]。

现在有研究表明[8]心脏冷停搏液灌注时,灌注压对冠状动脉内皮功能的影响很大,过高或过低的灌注压将损伤冠状动脉内皮或影响心肌保护的效果。以前认为主动脉根部顺行灌注冷停搏液压力不高于 100 mmHg 是安全的[9],所以此次实验的高压灌注组的压力即为 100 mmHg。但现在更多的学者认为比较低的停搏液灌注压可能更有利于心肌的保护,刘东璐等[10]研究表明,45 mmHg 的冷停搏液灌注压是安全有效的,Kronon 等[11]研究也表明 30 ~ 50 mmHg 的冷停搏液灌注压力可以提供很好的心肌保护和避免心肌的损伤,因此本次实验的低压灌注组压力为 50 mmHg。用免疫组化的方法,发现冷停搏液灌注后,NF-κB p65 的表达水平升高,对照组的 NF-κB p65 表达水平(80.1 ± 9.10)低于高压灌注组(226.7 ± 12.5)和低压灌注组(117.5 ± 15.5)(P<0.05),这说明停搏液的灌注会导致心肌的损伤,可能与心肌缺血引起的炎症介质有关。现在有研究表明[12]心脏冷停搏液灌注时,灌注压对冠状动脉内皮功能的影响很大,也会影响心肌保护的效果。高压下灌注冷停搏液,停搏液高流量的冲刷及剪切力也是导致血管内皮细胞损伤的主要原因[13],张新等[14]研究也认为停搏液灌注压力自身可以造成冠状动脉内皮细胞功能的损害,压力越高,损伤越重。血管内皮细胞损伤后,会导致了 NF-κB 的激活,而 NF-κB 可诱导前炎症细胞因子、趋化因子、细胞间粘附分子、细胞表面受体等物质的表达增加,而这些物质又能进一步释放炎性递质、氧自由基等物质,通过氧化刺激通路,反过来激活 NF-κB 形成恶性循环,加重细胞的炎症反应和免疫反应,从而导致血管及心肌损伤。这和本次实验结果高压灌注组心肌的 NF-κB p65 表达水平(226.7 ± 12.5)明显高于低压灌注组(117.5 ± 15.5)(P<0.05)相符。而本次实验使用 Western blot 方法检测出的 NF-κB p65 蛋白 ROD 也有相同的结果,高压灌注组 NF-κB p65 ROD(1.58 ± 0.13),明显高于对照组(0.44 ± 0.05)和低压灌注组(0.95 ± 0.05)(P<0.05)。结果显示,冷停搏液的灌注可以激活 NF-κB 信号通路,而采用低压灌注能降低 NF-κB 的活化程度,减低心肌损害。

参 考 文 献

[1] 高淑红,刘 聪,谭秋丰,等. 早期心肌却学猝死心肌 NF-κB p65 的表达研究[J].中国法医学杂志,2008,23(3):145-147.

[2] 胡宏远,李连宏.大鼠心肌急性缺血再灌注 NF-κB p65 和 caspase-3 的表达[J].中国法医学杂志,2006,21(6):334-337.

[3] Brar B K, Stephanoua A, Okosib A, et al.GRH-like peptides protect cardiac myocytes from lethal ischaemic injury[J].Mol Cell Endocrinol, *1999,158(1-2):55-63.*

[4] 王晓杨.核因子 -κB 及其与心脏缺血再灌注[J].心血管病杂志,2009,28 (4):295-296.

[5] Samaj J, Baluska F.From signal to cell polarity: mitogen-activated protein kinases as sensors and effectors of cytoskeleton dynamicity[J].Journal of Experimental Botany, 2004, 55(395): 189-198.

[6] Valen G, Yan Z Q, Hansson G K.Nuclear factor kappa-B and the Heart[J].J Am Coll Cardiol, 2001, 38(2): 307-314.

[7] Lindner V, Collins T. Expression of NF-kappa B and I kappa B-alpha by aortic endothelium in an arterial injury model[J].Am J Pathol, 1996, 148(2): 427-438.

[8] Mohara J, Tsutsumi H, Takeyoshi I, et al.The optimal pressure for initial flush with UW solution in heart procurement[J]. Heart Lung Transplant, 2002, 21(3): 383-390.

[9] 李家春,李功宋.体外循环灌注学[M].第 1 版,北京:人民军医出版社,1999.489-494.

[10] 刘东璐,吴伯娟,陶仁海.未成熟心肌保护与停搏液灌注压的试验研究[J].河北医学,2008,30(8):1124-1125.

[11] Michael K, Kirk S, Bradley S.The importance of cardioplegic infusion pressure in neonatal myocardial protection[J].Ann Thorac Surg, 1998, 66(4): 1358-1364.

[12] Mohara J, Tsutsumi H, Takeyoshi I, et al.The optimal pressure for

基础研究 文章编号:0253-3626(2010)09-1351-04

大鼠皮肤创伤愈合过程中 SP 的表达及其死后稳定性的实验研究

黄 海,蒋 朴,李 虹,王全芳,邓世雄
(重庆医科大学基础医学院法医学教研室 法医学与生物医学信息研究室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨大鼠皮肤切创愈合过程中感觉神经肽 P 物质(Substance P,SP)表达变化规律及法医学意义。方法:建立大鼠皮肤切创模型后,应用免疫组化方法,观察大鼠皮肤创伤后不同时间点 SP 的表达变化及其死后稳定性,每个免疫组化染色切片样品在 400 倍率下分别随机观察 5 个不同的视野,测定 SP 阳性细胞率,取其平均值,试验数据采用 Excel 和 SPSS13.0 分析软件进行方差分析,各组间两两比较采用 LSD-t 检验。结果:生前造创组于皮肤切创后 1 h,SP 即在中性粒细胞有阳性表达,伤后 4 d 达峰值,以后开始下降,持续至伤后 8 d,SP 在损伤区及其周围皮肤组织中表达明显高于正常对照组($P<0.05$)。死后伤组与正常对照组 SP 仅在表皮,皮脂腺,汗腺上皮细胞呈弱阳性表达,相比较无明显差异。死后稳定性各组在不同温度环境下各时间点 SP 表达与死后即刻比较无显著性差异($P>0.05$)。结论:在皮肤创伤愈合过程中 SP 的表达变化具有时序性规律,且死后受环境温度影响较小,其稳定性较好,可望作为法医学损伤时间推断的一个参考指标。

【关键词】P 物质;法医病理学;皮肤切创;死后稳定性;免疫组织化学;损伤时间推断
【中国图书分类法分类号】D919.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-11-19

A study on the expression and the postmortem stability of SP in incised rat skin healing

HUANG Hai, et al
(*Department of Forensic Medicine, Lab of Forensic Medicine and Biomedical Information, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the expression regulation of Substance P (SP) during incised rat skin healing processs and its significance in forensic medicine. *Methods*: Using immunohistochemistry technique and image analysis system to study the dynamic expression and the postmortem stability of SP at different time during incised rat skin healing processs. Counting each slide for SP-positive cell rate from 5 different zones randomly choosed under 400 × microscope, then calculating a mean value. Performing LSD-t test. *Results*: Positive stain of SP was detected in the neutrophil cells 1h after injury and the SP-positive rate reached maximum on the 4th day, then it began to decrease. The expression of SP in the damage zone and the surrounding skin tissues was significantly higher than the normal control group for 8 days after injury ($P<0.05$); Weak SP-expressions, which have no obviously changes, in the epidermic cells, sweat gland cells and endothelial cells were detected in the postmortem injury groups and normal control groups. No significant differences of SP-expressions were found among each subgroups of postmortem stability group under the environment of −20℃, 4℃ and 30℃ degree, compare to the time immediately after death ($P>0.05$). *Conclusion*: The SP-expression during incised rat skin healing processs is time-dependent, and the SP is quite stable after death. So SP may be used as a useful reference marker to estimate the time since injury.

作者介绍:黄 海(1980-),男,硕士,
研究方向:法医病理学。
通讯作者:邓世雄,男,教授,E-mail:dengshixiong1963@163.com。

【Key words】Substance P; Forensic pathology; Incised skin injury; Postmortem stability; Immunohistochemistry; Wound age estimation

initial flush with UW solution in heart procurement[J]. Heart Lung Transplant, 2002,21(3):383-390.
[13] Sawatari K, Kadoba K, Bergner K A, et al. Influence of initial reperfusion pressure after hypothermic cardioplegic ischemia on endothelial modulation of coronary tone in neonatal lamb; impaired coronary vasodilator response to acetylcholine[J]. Thorac Cardiovasc Surg, 1991, 101(5):777-782.
[14] 张 新,乔晨晖,张伟华.低温停搏液灌注压力对猪冠状动脉内皮及平滑肌功能的影响[J].第三军医大学学报,2006,28(20):2077-2079.

(责任编辑:张学颖)