论 著 文章编号:0253-3626(2008)11-1345-04

缺血再灌注对大鼠心脏 MCP-1和 HO-1表达的影响及促红细胞生成素的心肌保护作用

程希富,肖祥彬,马康华
(重庆医科大学附属第一医院心血管内科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨缺血再灌注(Ischemic reperfusion,I-R)对单核细胞趋化蛋白-1(Monocyte chemoattractant protein-1,MCP-1)和血红素氧和酶-1(Heme oxygenase-1 protein,HO-1)基因和蛋白表达的影响及促红细胞生成素(Erythropoietin,EPO)对I-R损伤的保护作用。方法:建立24只在体大鼠I-R模型,随机分成3组:假手术组(F组)、缺血再灌注组(O组)、促红细胞生成素组(E组),缺血45 min,再灌注180 min,E组在手术前24 h腹腔注射EPO(4 000 U/kg)。用免疫组织化学及逆转录聚合酶联反应(RT-PCR)分别测定3组大鼠心肌组织MCP-1和HO-1蛋白和mRNA的表达。结果:与F组比较,O及E组大鼠心肌组织内MCP-1和HO-1蛋白和mRNA表达显著增高($P<0.01$),E组心肌组织内MCP-1蛋白和mRNA表达水平介于其它2组之间($P<0.05$),而HO-1蛋白和mRNA表达水平又显著高于O组($P<0.01$,$P<0.05$)。结论:EPO预处理可能通过增加HO-1蛋白和mRNA表达及抑制MCP-1蛋白和mRNA的表达,从而起到抗心脏I-R损伤的作用。

【关键词】缺血再灌注;心肌缺血再灌注损伤;促红细胞生成素;单核细胞趋化蛋白-1;血红素氧和酶-1
【中国图书分类法分类号】R541 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-12-07

Effects of ischemic reperfusion on the expression of MCP-1 and HO-1 and the cardio-protective role of erythropoietin

CHENG Xi-fu, et al
(*Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*:To investigate the effect of ischemic reperfusion(I-R) on the expression of Monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1)and heme oxygenase-1 protein(HO-1) and mRNA of myocardial tissue and the protective role of erythropoietin (EPO). *Methods*:Ischemic reperfusion rat model was established in the experiments.24 animals were randomly divided into sham operation(F),I-R group(O)and EPO group(E)and subjected to 45 min of myocardial ischemia by ligation of left anterior descending coronary artery followed by 180 min of reperfusion.The animals in EPO group were intraperitoneal by injectioned with EPO(4 000 U/Kg)24 hours before the operation. The expression of MCP-1 and HO-1 protein and mRNA was determined by immunohistochemistry and RT-PCR. *Results*:Campared with F group, the expression of myocardial MCP-1 and HO-1 protein and mRNA increased significantly in O group and E group($P<0.01$);The expression of MCP-1 protein and mRNA was significantly higher in E group than that in O group($P<0.05$);The expression of HO-1 protein and mRNA was significantly higher in O group than that in E group($P<0.01$ and $P<0.05$). *Conclusion*:The pretreatment of EPO could protect cardiomyocyte against IRI through upregulating HO-1 expression and downregulating MCP-1.

【Key words】 Ischemia-reperfusion;Myocardial ischemia-reperfusion injury;Erythropoietin;Monocyte chemoattractant protein-1;Heme oxygenase-1

随着静脉溶栓、经皮冠状动脉腔内成形术等技术治疗急性心肌梗死的广泛开展,心肌缺血再灌注损伤(Ischemic reperfusion,I-R)日益成为人们关注的热点。促红细胞生成素(Erythropoietin,EPO)预处理的保护作用在大脑及肾脏缺血再灌注损伤中已有较多报道,但有关EPO预处理对心肌保护作用的研究较

作者介绍:程希富(1972-),男,主治医师,硕士,研究方向:冠脉介入治疗。
通讯作者:马康华,男,主任医师,E-amil:markcq111@yahoo.com.cn。

表 1 目的基因引物序列及扩增片段长度

基因		序列	扩增长度
MCP-1	上游	5′-GAG-TCG-GCT-GGA-GAA-CTA-CAA-GA-3′	207 bp
	下游	5′-GGT-GCT-GAA-GTC-CTT-AGG-GTTG-3′	
HO-1	上游	5′-ACG-GCC-CTG-GAA-GAG-GAG-ATAG-3′	391 bp
	下游	5′-GAG-TGT-TCA-TGC-GAG-CAC-GATA-3′	
β-actin	上游	5′-GAC-CCA-GAT-CAT-GTT-TGA-GACC-3′	684 bp
	下游	5′-GCC-AGG-ATA-GAG-CCA-CCA-AT-3′	

少。因此本研究建立大鼠心肌缺血再灌注模型,观察EPO预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 健康雄性SD大鼠24只,体重在220~280 g,由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.1.2 药品及试剂 重组人促红素注射液。商品名:宁红欣,批号991283,山西威奇达药业有限公司生产。兔抗大鼠HO-1、MCP-1多克隆抗体、免疫组化检测试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司。总RNA提取试剂BIOZOL、二步法RT-PCR试剂盒均购自杭州博日科技有限公司。

1.1.3扩增引物 扩增引物分别为大鼠MCP-1、HO-1及内参照β-actin的部分cDNA序列,primer 5.0软件设计引物如表1所示,引物由北京赛百胜基因技术有限公司合成。

1.2 试验方法

1.2.1 动物分组及用药 动物适应性喂养1周后随机分为3组。假手术组(F,n=8,仅穿线不结扎);手术组(O,n=8);促红细胞生成素组(E,n=8,手术前24 h腹腔注射EPO4 000 U/kg,手术同模型组);

1.2.2 缺血-再灌注模型制备 大鼠称重后以3.5%水合氯醛作腹腔注射麻醉(10 ml/kg),背位固定于手术台上。颈胸部去毛并消毒,气管插管接人工呼吸机作机械通气,潮气量2~3 ml/100 g,频率80次/min。沿胸骨左缘1 cm处剪开皮肤,钝性分离皮下、肌层,剪断2~4肋骨,自制拉钩拉开肋骨,剪开心包膜,在左心耳及肺动脉圆锥间找到左前降支(LAD),在距其起始部3~5 mm处用6-0带线缝合针穿过,于心肌上放一4号丝线,用单活结结扎LAD,观察45 min后,松线再灌注,逐层关胸,再灌注180 min。成功标准:结扎LAD后心电图Ⅱ导联ST段出现弓背向上抬高,T 波高耸等为缺血成功,放松结扎线后,抬高的ST段下降1/2以上为再灌注成功。

1.2.3 标本的留取 实验结束后开胸摘取心脏,剪去心房及右心室,0.1%DEPC处理的无菌生理盐水冲洗左心室,用锐利刀片取左心室结扎线以下与心尖部中点附近心肌约3 mm,置于4%多聚甲醛中固定,余心肌切成约100 mg左右的小块包于锡纸立即放入液氮中保存。

1.2.4 心肌的免疫组织化学染色 心肌MCP-1和HO-1的检测用sABC法,按试剂盒说明书操作。抗体稀释浓度为1/100,空白对照实验用PBS代替一抗。阳性细胞胞浆被染成棕黄色。免疫组化图像分析应用北航CM2000B型生物医学图像分析系统,每张标本在高倍(×400)光镜下随机取5个视野,测定平均积分光密度值(IDP)。

1.2.5 RT-PCR法测定大鼠心肌mRNA表达 采用BIOZOL一步法提取总RNA,RT-PCR操作步骤依照试剂盒说明书进行,MCP反应条件:预变性94℃,3 min;变性94℃,30 s,退火53℃,30 s,延伸72℃,30 s,35个循环,最后延伸5 min;HO-1反应条件:预变性94℃,3 min;变性94℃,45 s,退火59℃,45 s,延伸72℃,1 min,35个循环,最后延伸5 min;β-actin反应条件:预变性94℃,3 min;变性94℃,45 s,退火55℃,45 s,延伸72℃,1.5 min,35个循环,最后延伸10 min。反应结束后取PCR产物5 μl,与1 μl上样缓冲液混匀,于2%琼脂糖凝胶电泳,Bio-Rad凝胶成像分析系统处理,各反应体系以β-actinmRNA的RT-PCR产物为内参照,计算待测mRNA的RT-PCR产物与它的灰度比值,作为待测mRNA的表达值。

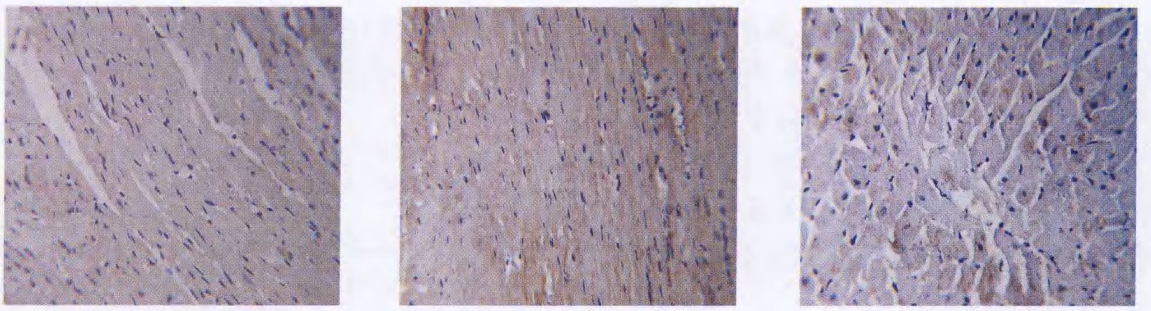
1.3 统计学处理

采用SPSS统计软件包,实验数据以$\bar{x}\pm s$表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用q检验,P<0.05表示统计学上有差异,P<0.01表示统计学上有显著性差异。

2 结 果

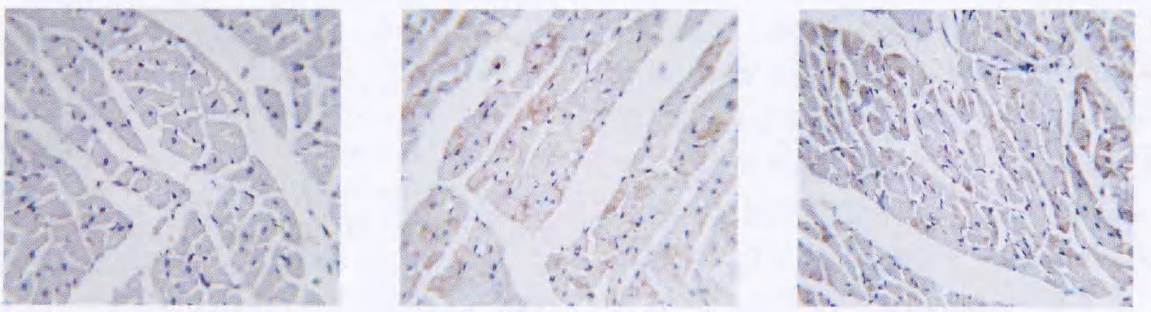
2.1 缺血再灌注及EPO预处理对心肌MCP-1和HO-1蛋白表达的影响

免疫组化检测结果(图1、2)显示,假手术组心肌细胞胞浆呈均匀浅褐色,几乎没有MCP-1或HO-1蛋白表达;缺血再灌注后心肌细胞胞浆内可见片状深褐色,MCP-1及HO-1表达均显著增多(P<0.01);经EPO预处理24 h后,大鼠心肌MCP-1的表达较单纯缺血再灌注组有所减少(P<0.05),而HO-1的表达较单纯缺血再灌注组则有所增多(P<0.01),数据见



F 组　　O 组　　E 组

图 1　3 组心肌细胞内 MCP-1 蛋白的表达(×400)



F 组　　O 组　　E 组

图 2　3 组心肌细胞内 HO-1 蛋白的表达(×400)

表2。

2.2　缺血再灌注及EPO预处理对心肌MCP-1和HO-1mRNA表达的影响

RT-PCR产物电泳结果(图3)显示,假手术组MCP-1mRNA和HO-1mRNA表达极少;缺血再灌注后大鼠心肌组织中MCP-1和HO-1mRNA水平均明显增高($P<0.01$);经EPO预处理24 h后,大鼠心肌组织中MCP-1mRNA水平较单纯缺血再灌注组有所降低($P<0.05$),但HO-1mRNA水平则较单纯缺血再灌注组有所增高($P<0.05$),数据见表3。

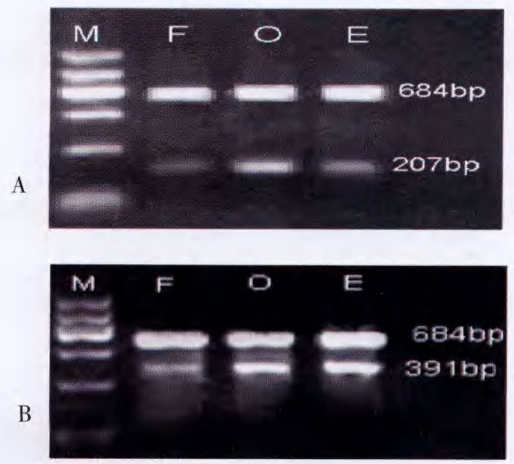


图 3　RT-PCR 显示 MCP-1 和 HO-1 mRNA 表达的变化

表 2　各组心肌细胞内 MCP-1、HO-1 蛋白的表达(IDP,$\bar{x}\pm s$)

	MCP-1	HO-1
F 组(n=8)	0.325 5±0.078 9☆	0.101 4±0.032 1☆
O 组(n=8)	0.636 7±0.081 5	0.370 8±0.084 2
E 组(n=8)	0.528 5±0.084 2★	0.542 7±0.097 9☆

注:同假手术组比较,其它 2 组 MCP-1、HO-1 的表达均增加,差别有显著统计学意义($P<0.01$);☆:与手术组比较,$P<0.01$;★:与手术组比较,$P<0.05$。

表 3　3 组心肌细胞内 MCP-1、HO-1mRNA 的灰度(目的片段/β-actin,$\bar{x}\pm s$)

	MCP-1	HO-1
F 组(n=8)	0.143 4±0.054 9☆	0.164 6±0.066 6☆
O 组(n=8)	0.348 5±0.111 0	0.399 3±0.109 5
E 组(n=8)	0.242 1±0.084 1★	0.543 4±0.117 2★

注:同假手术组比较,其它 2 组 MCP-1、HO-1 的表达均增加,差别有显著统计学意义($P<0.01$);☆:与手术组比较,$P<0.01$;★:与手术组比较,$P<0.05$。

3　讨　论

目前认为,IRI的发生与氧自由基、钙超载、白细胞侵润等有关。缺血再灌注时,循环中白细胞、单核细胞及血小板粘附于血管内皮细胞,释放多种炎症介质和细胞因子损伤心肌组织。在缺血后再灌注所

致的氧化应激刺激下，心脏、主动脉和肾脏均高度表达MCP-1和HO-1mRNA及其蛋白[1-3]。本研究发现，正常心肌组织内几乎无MCP-1和HO-1蛋白的表达，而在心肌缺血45 min再灌注3 h后MCP-1和HO-1表达显著增高。本研究与上述研究结果相一致，提示上述各因子相互作用，共同参与心肌缺血再灌注损伤。

心肌缺血再灌注损伤释放多种炎症介质和细胞因子，严重地影响了缺血心肌的结构和功能，因而寻求抑制炎症介质和细胞因子释放的方法和药物成为缺血再灌注研究的热点。近年来研究表明EPO在细胞及组织的多种原因所致损伤中具有抑制细胞凋亡，减小梗死面积，促进功能恢复等保护效应。该效应可能与上调抗凋亡基因，抑制炎症反应，减轻NO介导的损伤及直接的抗过氧化效应等有关[4-5]。Cai等[6]的研究发现以重组人促红细细胞生成素(RHuEPO)预处理大鼠，能够明显抑制24 h后离体灌注心脏缺血再灌注损伤所致的心肌细胞凋亡，并促进心功能恢复。另有研究[7]显示长期治疗能降低血液透析病人包括MCP-1在内的C-C家族趋化因子和血管内膜厚度(IMT)，而且用EPO的长期血透病人的HO-1 mRNA水平和抗氧化作用增高，其作用与促红细胞生成作用无关[8]。

HO-1是一个应激蛋白，能被各种引起细胞内氧化还原失衡的理化因素显著诱导，HO-1及其产物有抗氧化应激、抗凋亡、抗炎症及改善微循环等作用[9]。研究表明HO-1高表达对IRI具有明显保护作用，表现为白细胞如多形核中性粒细胞、T淋巴细胞、巨噬细胞在心脏移植器官中的侵润明显减轻，促炎因子如IL-1、IL-6、MCP-1及MIP-2水平显著下降[10,11]。而在离体灌流的兔子心脏实验中，在灌流液中加用MCP-1的抑制剂可显著抑制单核巨噬细胞的激活，缓解心肌再灌注损伤并改善缺血后的心功能[12]。

基于上述研究，推测EPO的心脏保护作用可能与改变HO-1和MCP-1蛋白的表达也有关系。本实验结果显示与单纯缺血再灌注组相比较，经EPO预处理的大鼠心肌在缺血再灌注后HO-1 mRNA及其蛋白表达水平均增加，而MCP-1 mRNA及其蛋白表达水平则减少。提示EPO可能通过增加HO-1基因的表达，进而抑制MCP-1的表达，从而减轻心肌缺血再灌注损伤，起到心脏保护作用。但在心肌缺血再灌注中EPO通过何种机制改变HO-1和MCP-1基因及蛋白尚需进一步研究。

参 考 文 献

[1] Raju V S,Maines M D.Renal. ischemia/reperfusion in rats up-regulates HO-1 (HSP32)expression and increases cGMP in the rat heart[J]. J pharmacol Exp Ther,1996,277:1814-1822.

[2] Kumar A G,Ballantyne C M,Michael LH,et al. Induction of monocyte chemoattractant protein-1 in the small veins of the ischemic and reperfused canine myocardium[J]. Circulation,1997,95:693-700.

[3] Kakio T,Matsumori A,Ono K,et al. Roles and relationship of macrophages and monocyte chemotactic and activating factor/monocyte chemoattractant protein-1 in the ischemic and reperfused rat heart [J]. Lab Invest,2000,80:1127-1136.

[4] Calvillo L,Latini R,Kajstura J,et al. Recombinant human erythropeietin protects the myocardium from ischemia-repefusion injury and promotes beneficial remodeling[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2003,100(8):4802-4806.

[5] Tramontano AF,Muniyappa R,Black AD,et al. Erythropeietin protects cardiac myocytes from hypoxia-induced apoptosis through an Akt-dependent pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun,2003,308(4):990-994.

[6] Cai ZQ.Manalo DJ,Wei G,et al. Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoitin are protected against ischemia-reperfusion injury[J]. Circulation,2003,107:79

[7] Pawlak K,Pawlak D,Mysliwiec M. Long-term erythropoietin therapy decreases CC-chemokine levels and intima-media thickness in hemodialyzed patients[J]. Am J Nephrol,2006,26(5):497-502.

[8] Calò LA,Stanic L,Davis PA,et al. Effect of epoetin on HO-1 mRNA level and plasma antioxidants in hemodialysis patients[J]. Int J Clin Pharmacol Ther,2003,41:187-192.

[9] Kupiec eglinski JW,Busuttil RW. Ischemia and reperfusion injury in liver transplantation [J].Transplant Proc,2005,37(4):1653-1656.

[10] Sato K,Balla J,Otterbein L,et al. Carbon monoxide generated by heme oxygenase-1 supperasses the rejection of mouse-to-rat cardiac transplants[J]. J Immunol,2001,166(6):4185-4194.

[11] Coito A,Shaw G,Li J,et al. Selectin-mediated interactions regulate cytokine networks and macrophage heme oxygenase-1 induction in cardiac allograft recipients[J]. Lab Invest,2002,82(1):61-70.

[12] Kajihara N,Morita S,Nishida T,et al. Transfection with a dominant-negative inhibitor of monocyte chemoattractant protein-1 gene improves cardiac function after 6 hours of cold preservation[J]. Circulation,2003,108(Suppl1):Ⅱ213-Ⅱ218.

(责任编辑：关蕴良)