文章编号:1000-5404(2003)12-1053-03

论著

肝细胞生长因子对兔心肌梗死后心肌细胞凋亡及心脏功能的影响

宋明宝,黄 岚,蒋世忠,张 坡,于世勇,武晓静,赵 刚,晋 军 (第三军医大学附属新桥医院全军心血管内科中心,重庆 400037)

提 要:目的 观察外源性肝细胞生长因子对心肌梗死后心肌细胞凋亡及心功能的影响。方法 36只新西兰兔随机分为3组:假手术组、对照组和干预组。结扎左冠状动脉前降支复制急性心肌梗死模型。干预组静脉注射给予肝细胞生长因子2 mg·kg^{-1}·(12 h)$^{-1}$,48 h后测心脏功能,取出心脏,梗死区/缺血区质量比为梗死范围。TUNEL法染色检测细胞凋亡,心肌凋亡阳性细胞数占总心肌细胞数的千分比为心肌细胞凋亡指数。免疫组化法检测抗凋亡蛋白bcl-2的表达。结果 ①干预组心肌梗死范围显著小于对照组($P<0.01$),左室功能得以改善;②干预组心肌细胞凋亡指数显著低于对照组($P<0.05$);③干预组梗死心肌周围bcl-2表达显著多于对照组($P<0.05$),且与细胞凋亡指数呈负相关($r=-0.691$;$P<0.05$)。结论 外源性肝细胞生长因子能显著减少急性心肌梗死后的梗死范围、抑制心肌细胞凋亡及改善左室功能,其作用途径可能与促进抗凋亡蛋白bcl-2表达有关。

关键词:肝细胞生长因子;心肌梗死;凋亡;兔
中图法分类号:R329.2^{+}8;R331.3^{+}1;R542.2^{+}2 文献标识码:A

Effect of hepatocyte growth factor on cardiomyocyte apoptosis and cardiac function in AMI rabbits

SONG Ming-bao, HUANG Lan, JIANG Shi-zhong, ZHANG Po, YU Shi-yong, WU Xiao-jing, ZHAO Gang, JIN Jun (Cardiovascular Center of PLA, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To observe the effect of hepatocyte growth factor (HGF) on cardiomyocyte apoptosis and cardiac function in acute myocardial infarction (AMI) rabbits. Methods Rabbit model with AMI was established by ligation of the proximal left anterior descending coronary artery (LAD). Thirty-six rabbits were randomly divided into 3 groups: sham-operation, control and interventional groups. Animals in sham-operation and control groups were intravenously injected with normal saline and those in interventional group were given HGF (2 mg/kg every 12 h). At 48 h after LAD ligation, hemodynamic studies were performed in each group, and ischemic area and infarct size were also measured. Cell apoptosis was detected by TUNEL straining, and the expression of bcl-2 proteins was analyzed by immunohistochemistry. Results ① The infarct size in interventional group was significantly smaller than that in control group [(31.72±6.62) *vs* (14.08±4.63), $P=0.002$], and left ventricular function was improved; ② The myocardial apoptotic index of interventional group was significantly lower than that of control group [(57.75±7.50) *vs* (33.25±5.32), $P=0.02$]; ③ The expression of bcl-2 protein in interventional group was significantly higher than that in control group, and was correlated negatively to the myocardial apoptotic index ($r=-0.691$, $P=0.013$). Conclusion Exogenous HGF can shrink infarct area, inhibit cardiomyocyte apoptosis and improve left ventricular function. The mechanism is probably associated with the promotion of the expression of anti-apoptotic bcl-2 protein.

Key words: hepatocyte growth factor; apoptosis; acute myocardial infarction; rabbits

传统观念认为急性心肌梗死时心肌细胞死亡形式是坏死。最近大量的研究证实,在经历长时间的缺血和缺血再灌注后,心肌细胞出现明显的凋亡特征[1~3],细胞凋亡作为缺血性心肌细胞死亡的一种重要的形式,越来越受到人们的关注。寻找一种有效的干预措施以减少心肌细胞凋亡、增加存活心肌具有重要的临床意义。肝细胞生长因子(Hepatocyte growth factor, HGF)是间质细胞衍生的一种能促进细胞有丝分裂的多功能因子,它具有抗凋亡特性,并能调节细胞生长和运动,促进多种细胞组织形态的发生,在胚胎生长、组

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30270568)
作者简介:宋明宝(1973-),男,山东省秦安市人,医师,主要从事冠心病防治方面的研究。电话:(023)68774601
收稿日期:2002-12-13;修回日期:2003-03-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

织形成、肝肾脏再生、肿瘤转移及损伤修复中起着重要作用[4,5]。本实验通过结扎兔左冠状动脉前降支建立心梗死模型，并在此模型上给予肝细胞生长因子治疗，以观察其对心肌细胞凋亡及心脏功能的影响。

1 材料与方法

1.1 动物模型

新西兰兔（第三军医大学实验动物中心提供）36只，雌雄不拘，体质量（2.02±0.62）kg。经速眠新0.2 ml/kg肌肉注射麻醉后，左冠状动脉前降支结扎术，于前降支中点处用3-0丝线结扎，记录心电图，若有ST段显著弓背向上示手术成功。假手术组只在同样部位穿一3-0丝线，但不结扎。

1.2 分组及给药方法

将36只兔随机分成3组，每组12只：对照组（CG）、假手术组（SO）、干预组（IG）。各组中用以心肌梗死范围和细胞凋亡检测的心脏各半。干预组在手术后即刻给予肝细胞生长因子（购于北京邦定公司）2 mg/kg静脉注射[6]，其余2组给于生理盐水2 ml/kg，以后每12小时一次。

1.3 组织学检测

1.3.1 心肌细胞凋亡测定 术后48 h处死兔后，取出心脏，剪去心房及右心室，用4%多聚甲醛磷酸盐缓冲液固定2 h，20%多聚甲醛蔗糖液4 ℃过夜，在冠脉结扎点下5 mm处横切左室，常规脱水、蜡块包埋。取连续切片依次作HE染色及TUNEL染色，按说明书操作。细胞核中有紫蓝色颗粒者为阳性细胞即凋亡细胞。在高倍镜（×400）以心肌凋亡阳性细胞数占总心肌细胞数的千分比作为心肌细胞凋亡指数。

1.3.2 bcl-2检测 bcl-2检测试剂盒购于美国Santa Cruz公司，切片脱蜡至水，3%H_2O_2浸泡15 min，滴加5%的正常山羊血清封闭10 min，吸干血清，滴加一抗，4 ℃过夜，辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素孵育60 min，DAB显色，苏木精复染。以Tris-HCl缓冲液替代一抗的切片同时染色作为阴性对照。所有标本同时切片行常规HE染色。

1.4 心肌梗死范围测定[7]

48 h后静脉注射1%伊文思蓝3 ml，区分心脏的缺血和非缺血区。立即取出心脏，剪下左室称质量。每隔2 mm将心肌切成横片，剪下缺血区，放入0.1%N-BT磷酸盐缓冲液（pH 7.4）37 ℃水浴20 min，梗死心肌细胞中脱氢酶因细胞膜损伤而完全释放丢失，不能使N-BT还原染色，梗死心肌不被染色，损伤残存心肌尚存在部分脱氢酶可象正常心肌被染色为蓝色。剪下梗死心肌，余下部分为存活心肌，称质量。以缺血心肌/左室质量比代替缺血范围，以梗死心肌/缺血心肌质量比为梗死范围。

1.5 心脏功能测定

术后48 h再次开胸，分离出降主动脉，4 mm电磁流量计探头测每分钟心输出量，于左心室未梗死部位插入9F针头，后接5F心导管，八导生理仪（RM-6000型，日本光电公司产）同步测定左室收缩压（LVSP）、左室舒张末期压（LVEDP）、等容收缩期最大瞬间压力升高速率（+dp/dt_{max}），同时行右颈动脉插管测动脉收缩压（ASP）和动脉舒张压（ADP），记录心率（HR），计算心脏指数（CI）。

1.6 统计学处理

数据以$\bar{x}\pm s$表示，用SPSS10.0统计软件处理，组间比较用方差分析，两组比较用t检验和相关分析。

2 结果

2.1 HGF对梗死范围和心肌细胞凋亡数的影响

假手术组未见心肌梗死及细胞凋亡，干预组梗死范围显著小于对照组，正常及梗死心肌中心均无凋亡心肌细胞发现，而梗死周围缺血带心肌中有散在的凋亡心肌细胞，干预组心肌细胞凋亡指数显著低于对照组，见表1。

表1 HGF对缺血范围、梗死范围、凋亡指数及bcl-2表达的影响（$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

Tab 1 Effect of HGF on ischemic area, infarct area, apoptotic index and bcl-2-positive cardiomyocytes（$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

Group	Ischemia area (%)	Infarct area (%)	Apoptotic index (‰)	Bcl-2-positive cardiomyocyte (‰)
SO	0	0	0	0
CG	29.4±2.16	31.72±6.62	267.67±49.23	188.17±33.80
IG	28.1±1.34	14.08±4.63**	115.00±34.89*	250.5±47.65

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* CG group

2.2 HGF对心肌细胞bcl-2蛋白表达的影响

bcl-2蛋白的表达主要积聚于胞浆，每张玻片，分别随机选择10个区域，每区统计100个细胞中bcl-2蛋白表达阳性的细胞数，然后加在一起，见表1。干预组梗死心肌周围bcl-2表达明显多于对照组（$P<0.05$），且与细胞凋亡指数呈负相关（$r=-0.691$；$P<0.05$）。

2.3 HGF对心梗后左室功能的影响

心肌梗死后给予肝细胞生长因子治疗，能够明显改善左室功能。干预组LVSP、+dp/dt_{max}明显高于对照组（$P<0.05$）；LVEDP显著低于对照组，但仍显著高于假手术组，见表2。

表2 HGF对心肌梗死后心功能的影响（$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

Tab 2 Effect of HGF on cardiac functions after AMI（$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

	SO	CG	IG
HR (min^{-1})	211.00±5.02	225.00±4.08	153.00±6.36
LVSP (mmHg)	104.84±11.97	68.52±10.50	84.69±10.55*
LVEDP (mmHg)	2.35±0.46	6.74±1.03	4.64±1.28*
+dp/dt_{max} (mmHg/s)	3525.00±327.00	1822.67±256.33	2538.00±700.60*
CI ($ml\cdot min^{-1}\cdot m^{-2}$)	78.82±6.74	64.78±3.29	65.41±4.91

*：$P<0.05$ *vs* CG group

3 讨论

最近研究表明心肌细胞凋亡是导致急性心肌梗死后心肌细胞大量丢失、心脏功能不全的重要因素之一，抑制心肌细胞凋亡可能减轻心肌梗死所致的心脏病理生理学改变及心功能不全，对心肌细胞凋亡进行干预以减少心肌细胞丢失将可能为缺血性心脏病治疗提供新的途径。心肌细胞凋亡分为线粒体前期、线粒体期和线粒体后期，只有作用于线粒体前期和线粒体期的干预措施才能减轻心肌梗死程度[8]。

本实验应用冠脉结扎动物模型，观察肝细胞生长因子对心肌梗死后细胞凋亡及心功能的影响，结果显示：心肌梗死后给予肝细胞生长因子能减少梗死范围

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

并降低心肌细胞凋亡率, 与对照组相比差异有非常显著性意义($P<0.01$), 同时左室功能指标显著改善, 提示HGF 具有抗凋亡特性并能减少心肌梗死范围、改善心功能。HGF 是间质细胞衍生的一种促进细胞有丝分裂多功能因子, 并能调节细胞生长和运动, 促进多种细胞组织形态的发生, 在胚胎生长、组织形成、肝肾脏再生、肿瘤转移及损伤修复中起着重要作用[4]。近来研究显示, 它还是一种心肌保护因子, 其心肌保护作用的机制目前还不十分清楚, 可能与其抗凋亡、促进内皮功能修复[9]及促血管新生有关[10]。Ueda 等[11]研究证明HGF 直接激活ERK1/2 发挥作, Kitta 等[12]用MEK 抑制剂PD98059 预先处理细胞后能部分阻断 HGF 信号传导并增加过氧化物脱氢酶诱导的细胞死亡, 提示HGF 也可能通过激活 MEK、P44/42MAPK 及 p90RSK. MEK-MAPK 通路发挥作用。本实验研究表明, HGF 能促进抗凋亡蛋白 bcl-2 表达并与心肌细胞凋亡指数呈负相关, 提示 HGF 可能通过激活凋亡抑制基因 bcl-2 表达来发挥作用, 与国外研究结果一致[6]。

心肌梗死经常引起心室扩张、顺应性下降、心功能恢复差和死亡率增加, 其内在机制是与存活心肌中心肌细胞死亡有关, 肝细胞生长因子作为一种心肌保护因子, 对心肌梗死后近期梗死范围缩小、心功能的改善有益处, 是否对远期心肌重塑、心功能及生存率有明显影响, 有待深入研究。

参考文献:

[1] Kerr J F, Wyllie A H, Currie A R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics[J]. Br J Cancer, 1972, 26(4): 239—257.

[2] Gottlieb R A, Burleson K O, Kloner R A, *et al*. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes[J]. J Clin Invest, 1994, 94(4): 1621—1628.

[3] Cheng W, Kajstura J, Nitahara J A, *et al*. Programmed myocyte cell death affects the viable myocardium after infarction in rats[J]. Exp Cell Res, 1996, 226(2): 316—327.

[4] Dxion I M. Help from within: cardioprotective properties of hepatocyte growth factor[J]. Cardiovasc Res, 2001, 51(1): 4—6.

[5] 徐明清, 韩本立, 薛　兰, 等. 非肝硬变性胆道梗阻大鼠肝脏部分切除术后肝内促肝细胞生长因子及其受体 mRNA 的表达变化[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(3): 334—337.

[6] Nakamura T, Mizuno S, Matsumoto K *et al*. Myocardial protection from ishemia/reperfusion injury by endogenous and exogenous HGF[J]. J Clin Invest, 2000, 106(12): 1511—1519.

[7] Wakiyama H, Cowan D B, Toyoda Y, *et al*. Selective opening of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels during surgically induced myocardial ischemia decreases necrosis and apoptosis[J]. European Journal of Cardio-thoracic Surgery, 2002, 21(3): 424—433.

[8] Yaoita H, Ogawa K, Maehara K, *et al*. Apoptosis in relevant clinical situations: contribution of apoptosis in myocardial infarction[J]. Cardiovasc Res, 2000, 45(3): 630—641.

[9] Bussolino F, Direnzo M F, Ziche M, *et al*. Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth [J]. J Cell Biol, 1992, 119(3): 629—641.

[10] Miyagawa S, Sawa Y, Taketani S, *et al*. Myocardial regeneration therapy for heart failure: hepatocyte growth factor enhances the effect of cellular cardiomyoplasty[J]. Circulation, 2002, 105(21): 2556—2561.

[11] Ueda H, Nakamura T, Matsumoto K, *et al*. A potential cardioprotective role of hepatocyte growth factor in myocardial infarction in rats[J]. Cardiovasc Res, 2001, 51(1): 41—50.

[12] Kitta K, Day R M, Ikeda T, *et al*. Hepatocyte growth factor protects cardiac myocytes against oxidative stress-induced apoptosis[J]. Free Radic Biol Med, 2001, 31(7): 902—910.

（编辑　张　宁）

（上接 1052 页）

肝穿刺后出血, 经保守治疗后完全均缓解。并发症发生率为 1.25%(2/160)。

3　讨论

腹腔镜检查可以使观察图像直接显示在监视器上, 手术人员和其他医师均可看到检查过程, 不仅可以直接对腹腔内脏器进行观察, 而且可在直视下活检, 为临床确诊提供重要条件。本研究对 160 例慢性肝病的腹腔镜检查结果进行回顾分析, 结果显示腹腔镜检查结合病理活检的总临床确诊率为 91.25%(155/160), 对慢性肝病有较高确诊率。

腹腔镜结合病理活检对慢性肝病的是诊断有较高的敏感性。本组 160 例临床考虑慢性肝病而未确诊的患者经腹腔镜检查, 155 例(91.25%, 155/160)得以确诊, 与文献报道一致。腹腔镜检查可以通过直接观察肝脏的大小、形状、颜色, 以及肝脏表面结节的大小、数目、形状和分布, 还可以观察肝脏与周围组织的关系及有无粘连等情况, 最后结合直视下的病理活检, 很容易对各种性质慢性肝病进行鉴别[2]。

现代腹腔镜虽在慢性肝病诊断与治疗的起到重要作用, 其对肝脏疾病的诊断价值也越来越受到国内外学者的充分肯定, 但它毕竟是一种有创的诊断方法, 在腹腔镜检查过程中, 操作者的临床经验、手术操作熟练程度及选择活检部位是否准确, 往往直接影响诊断结果, 所以一般应在综合性大医院中选择有经验的医师开展, 总之, 严格掌握适应症、操作细致、术后密切观察能有效降低腹腔镜的并发症, 以便更充分地发挥其在慢性肝病诊治中的作用。

关键词: 腹腔镜检查; 诊断; 慢性肝病
中图法分类号: R575.04　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 廖福权, 史常旭. 结核性腹膜炎的诊断经验及腹腔镜应用价值[J]. 第三军医大学学报, 1992, 14(3): 301—302.

[2] 张岫兰, 卢启明. 腹腔镜检查在慢性肝病诊断中的意义[J]. 中华消化内镜杂志, 1999, 16(5): 263—264.

（编辑　张　宁）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net