

结扎大鼠冠状动脉诱发心肌及背根神经节内降钙素基因相关肽变化的研究

张建文 郭政

【关键词】 心肌缺血； 心肌； 背根神经节； 降钙素基因相关肽； 神经源性机制

传统观点认为,心肌缺血、心肌梗死的预后主要取决于缺血、损伤、坏死以及修复的程度和持续时间、基础心功能状态、冠状动脉(冠脉)病变程度以及心肌缺血原因^[1],但神经源性机制在心肌缺血损伤中的作用国内外鲜有报道。本研究中采用免疫组化和逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR),分别从蛋白和基因水平观察结扎冠脉诱发降钙素基因相关肽(CGRP)在心肌(包括缺血区和非缺血区)及背根神经节(DRG)内的变化,探讨神经源性机制在局部心肌急性缺血诱发整体心肌损伤中的作用及机制。

1 材料与与方法

1.1 实验动物与试剂:270~300 g 健康成年雄性 SD 大鼠 24 只,由山西医科大学动物中心提供。过氧化物酶标记的链霉卵白素(SP)免疫组化试剂盒和 3-氨基-9-乙基吡啶(AEC)显色试剂盒均购自北京中山生物技术公司;CGRP 抗体购自武汉博士德公司;RNA 抽提试剂盒购自德国 Qiagen 公司;Taq-DNA 聚合酶、鸟成髓细胞性白血病病毒(AMV)反转录酶及 PCR 标准分子量等均购自美国 Promega 公司。

1.2 实验分组及心肌缺血大鼠模型制备:参照文献[2]以冠脉闭塞(CAO)方法制备大鼠心肌缺血模型。按随机数字表法分为假手术组(Sham 组)及 CAO 1、3 和 6 h 组,每组 6 只。

1.3 标本制备及检测指标:按文献[2]介绍的操作步骤取心脏及 DRG 标本。免疫组化染色切片,观察 CAO 各组缺血区和非缺血区心肌及 Sham 组心肌组

织 CGRP 的变化及其分布规律;采用 RT-PCR 法检测 CAO 各组缺血区、非缺血区心肌(缺血区的对侧半球心肌组织)、Sham 组心肌组织以及各组胸段(T1~5)DRG CGRP mRNA 表达。

1.3.1 CGRP 蛋白水平检测:①切片置 4℃、体积分数为 0.1%的 Triton-X100 中 10 min,磷酸盐缓冲液(PBS)洗 3×5 min;②切片置于新鲜配制的体积分数为 0.3% H₂O₂-甲醇溶液中室温孵育 20 min, PBS 洗 3×5 min;③滴加 3% H₂O₂ 室温孵育 20 min, PBS 洗 3×5 min;④滴加质量分数为 0.1%的胰蛋白酶 37℃下孵育 10 min, PBS 洗 3×5 min;⑤滴加正常山羊血清,37℃封闭 40 min,甩干不洗;⑥滴加 CGRP 抗体,4℃过夜, PBS 洗 3×5 min;⑦滴加生物素标记二抗,37℃下孵育 30 min, PBS 洗 3×5 min;⑧滴加辣根酶标记的 SP 37℃下孵育 30 min, PBS 洗 3×5 min;⑨AEC 显色,苏木素复染,水性封片剂封片。每组设立阴性(试剂)对照,以 PBS 代替一抗,其余步骤同上。用图像分析系统对免疫组化染色切片进行图像分析, CGRP 蛋白水平用平均吸光度(A)值的半定量方法检测。每组大鼠随机观察缺血区和非缺血区各 60 个高倍视野,以平均 A 值为指标进行半定量分析。

1.3.2 CGRP 基因水平检测:半定量 RT-PCR 采用 β-肌动蛋白(β-actin)为内参照,按德国 Qiagen 公司总 RNA 抽提试剂盒说明书提取总 RNA,用紫外分光光度仪测定 RNA 浓度,琼脂糖电泳证实 RNA 完整性。逆转录反应在 0.2 ml 小离心管(EP 管)中进行,体系为:5×逆转录缓冲液 6 μl, RNA 酶抑制剂 0.5 μl, 三磷酸脱氧核糖核苷(dNTP) 2.5 μl, AMV 反转录酶 0.8 μl, 随机引物 5 μl, 二硫苏糖醇(DTT) 1.5 μl, RNA 模板 6 μl, 补充无 RNA 酶水至 30 μl。逆转录反应条件:42℃ 50 min, 98℃ 5 min。逆转录反应结束后取 5 μl 产物进行 PCR,

cDNA 的 PCR 引物序列(上海博亚生物技术公司设计合成):α-CGRP(201 bp)上游引物 5'-CCCCTTTCCTGGTTGTC A-3', 下游引物 5'-CCTCAGCCTCTG TTCTC-3';β-CGRP(111 bp)上游引物 5'-TCCTGCAACACCGCCACCTG-3', 下游引物 5'-GGTGGGCACAAAAGTTG TCCT-3';β-actin(422 bp)上游引物 5'-GAGACCTTCAACACCCAGCC-3', 下游引物:5'-TCGGGGCATCGGAACC GCTCA-3'。在 25 μl 的 PCR 反应体系中包含 MgCl₂ 1.5 μl, dNTP 1.5 μl, Taq-DNA 聚合酶 1.0 μl, 上下游引物各 1.5 μl, 缓冲液 2.5 μl, 无 RNA 酶水 10.5 μl。PCR 反应条件:95℃ 2 min, 94℃ 50 s, 55℃ 50 s, 72℃ 1 min, 共 35 个循环后于 72℃ 终延伸 10 min。扩增完毕后取 5 μl PCR 产物,在溴化乙锭(EB)染色的质量分数为 1%的琼脂糖凝胶上电泳,紫外凝胶成像系统扫描并得出条带灰度值。以目的基因与 β-actin 条带灰度值的比值表示 CGRP mRNA 表达量的相对值。

1.4 统计学处理:实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组化结果:CGRP 的阳性免疫反应主要位于心内膜和心肌层以及心外膜血管内皮。不仅在心肌层细胞质,部分细胞核也呈阳性;心外膜血管内皮呈强阳性反应。缺血区心肌纤维排列紊乱,且可见大量中性粒细胞浸润(图 1)。免疫组化统计结果显示:时间点和区域因素均对大鼠心肌 CGRP 的变化产生影响,且两者之间存在交互效应。单独效应研究结果表明(图 2):CAO 各组缺血区心肌 CGRP 水平均较 Sham 组升高,在 CAO 3 h 达高峰(P 均 < 0.05);非缺血区各组的变化趋势大致同缺血区,且各组 CGRP 水平均低于相应缺血区心肌(P 均 < 0.05)。

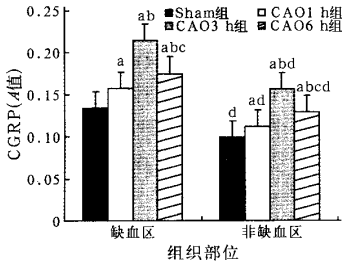
基金项目:国家自然科学基金资助项目(30471656)

作者单位:030001 太原,山西医科大学第二医院麻醉科

作者简介:张建文(1977-),男(汉族),山西省人,医学硕士,医师,主要从事伤害性刺激与器官损伤的研究,Email:zjw030001@126.com。



图 1 高倍显微镜下观察 CAO 3 h 组大鼠心肌组织内 CGRP 的表达(AEC, ×400)

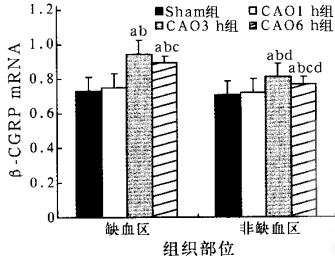


注:与 Sham 组比较, ^a*P*<0.05;与 CAO 1 h 组比较, ^b*P*<0.05;与 CAO 3 h 组比较, ^c*P*<0.05;与本组缺血区比较, ^d*P*<0.05

图 2 各组大鼠心肌组织内 CGRP 表达比较

2.2 心肌组织内 CGRP mRNA 表达: 心肌组织内仅检测到 β-CGRP mRNA, Sham 组心肌组织内有一定水平 β-CGRP mRNA 表达(图 3)。统计结果显示:时间点和区域因素均对大鼠心肌 β-CGRP mRNA 表达产生影响,而且两者间存在交互效应。单独效应研究结果表明(图 4):CAO 3 h 组和 CAO 6 h 组 β-CGRP mRNA 在心肌缺血区和非缺血区的表达水平均较 Sham 组显著增加(*P* 均 < 0.05),但 CAO 1 h 组与 Sham 组比较则差异无统计学意义(*P* 均 > 0.05),CAO 3 h 时达高峰,6 h 时则显著下降,但仍高于 CAO 1 h 组(*P* 均 < 0.05);而在非缺血区,CAO 3 h 组和 CAO 6 h 组

β-CGRP mRNA 表达均低于相应缺血区(*P* 均 < 0.05)。



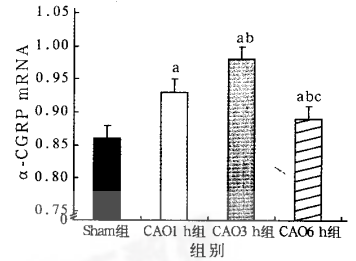
注:与 Sham 组比较, ^a*P*<0.05;与 CAO 1 h 组比较, ^b*P*<0.05;与 CAO 3 h 组比较, ^c*P*<0.05;与本组缺血区比较, ^d*P*<0.05

图 4 各组大鼠心肌组织内 β-CGRP mRNA 表达比较

2.3 DRG 内 CGRP mRNA 表达: DRG 内可检测到 α-CGRP mRNA 和 β-CGRP mRNA(图 5)。统计分析显示(图 6,图 7):CAO 各组 α-CGRP mRNA 和 β-CGRP mRNA 表达均较 Sham 组升高,CAO 3 h 组处于高峰(*P* 均 < 0.05);CAO 6 h 组较 3 h 组显著下降(*P* 均 < 0.05),但与 CAO 1 h 组比较差异有统计学意义(*P* 均 < 0.05)。

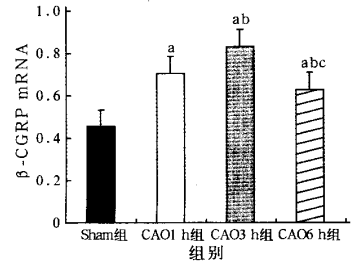
3 讨论

CGRP 是广泛分布于中枢和外周神经系统,含 37 个氨基酸的神经肽,主要在初级感觉神经元胞体内合成,然后沿着神经元的中枢突和周围突双向输送至末梢储存,当受到刺激时通过轴突反射向外周释放^[3],与 P 物质(SP)、神经激肽 A(NKA)共同介导神经源性炎症反应。结扎大鼠冠脉诱发急性心肌梗死,心脏感觉神经纤维末梢受刺激而产生伤害性神经信号,继而可能引起多种存在于传入神经末梢中的生物学活性物质及促炎介质的释放,使局部血管扩张、渗出,通透性增加,进一步促进局部炎症的



注:与 Sham 组比较, ^a*P*<0.05;与 CAO 1 h 组比较, ^b*P*<0.05;与 CAO 3 h 组比较, ^c*P*<0.05

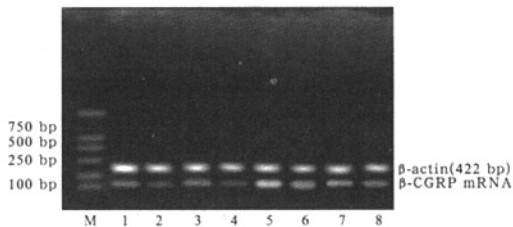
图 6 各组大鼠 DRG 内 α-CGRP mRNA 表达比较



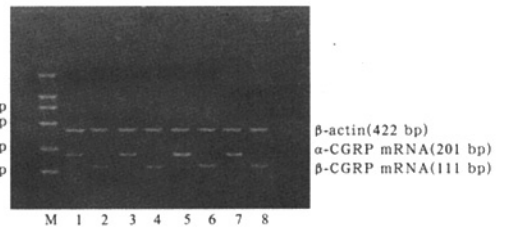
注:与 Sham 组比较, ^a*P*<0.05;与 CAO 1 h 组比较, ^b*P*<0.05;与 CAO 3 h 组比较, ^c*P*<0.05

图 7 各组大鼠 DRG 内 β-CGRP mRNA 表达比较

发生,可产生类似“神经源性炎症”的反应,加重心肌组织的损伤^[4]。本研究中观察到,CAO 后 1、3 和 6 h CGRP 水平在缺血区和非缺血区心肌均显著增加,CAO 3 h 达峰值。CGRP 分为 α-CGRP 和 β-CGRP 两种亚型;α-CGRP 主要在初级感觉神经元胞体内合成;β-CGRP 则主要由免疫细胞合成和释放^[5]。我们在心肌组织仅检测到 β-CGRP mRNA,而在 DRG 内则能同时检测到 α-CGRP mRNA 和 β-CGRP mRNA;同时观察到



M:Marker;1,2:Sham 组;3,4:CAO 1 h 组;5,6:CAO 3 h 组;7,8:CAO 6 h 组;3,5,7:缺血区;4,6,8:非缺血区
图 3 各组大鼠心肌组织内 CGRP mRNA 表达



M:Marker;1,2:Sham 组;3,4:CAO 1 h 组;5,6:CAO 3 h 组;7,8:CAO 6 h 组
图 5 各组大鼠 DRG 内 CGRP mRNA 表达

CAO 各组大鼠 DRG 内 α -CGRP mRNA 和 β -CGRP mRNA 的表达均较 Sham 组显著升高,且在 CAO 3 h 达高峰,心肌内 β -CGRP mRNA 也在 CAO 3 h 和 CAO 6 h 显著增高。提示心肌缺血所致心肌组织(包括缺血区和非缺血区)CGRP 水平的增高不仅来源于 DRG,而且也来源于局部心肌组织,但两种来源的 CGRP 以何种占主导地位,两者是否具有相同的生物学作用以及心肌组织内心肌细胞和免疫细胞对 CGRP 来源的贡献度等问题尚有待后续研究论证。

目前对 CGRP 在心肌缺血中的作用尚存在不同的观点。多数学者认为 CGRP 对急性缺血、缺氧状态下的心肌细胞具有保护作用,还可显著减轻心肌缺血/再灌注损伤^[6-8],但 Shen 等^[9]发现在心脏疾病中内源性 CGRP 对心血管系统的调节作用不显著;而商立军等^[10]则认为实验条件下心肌缺血所致 CGRP 水平的升高更多表现在炎症反应方面。心肌缺血期间,心肌 C-传入神经纤维不仅向中枢传递痛觉信息,也通过轴突反射在心脏局部释放 CGRP 等神经肽^[3]。释放到局部心肌组织的 CGRP 可以促进单核细胞分泌白细胞介素-1(IL-1)、IL-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等炎症因子^[11],可促进 SP 从初级传入纤维末梢释放并抑制中性内肽酶对 SP 的降解^[12],而释放到局部组织的 SP 可通过以下几方面的作用激发“瀑布式”炎症反应,最终可能使心肌炎症从局部缺血区通过神经源性机制的介导影响到非缺血区,即整体心肌。①促进肥大细胞脱颗粒释放组胺、组胺、趋化因子、前列腺素等大量炎症介质,延缓中性粒细胞凋亡^[13],促进中性粒细胞黏附和移行^[14],促进内皮细胞产生黏附分子^[15]等;②触发细胞中核转录因子- κ B(NF- κ B)的激活,继发炎症介质 TNF- α 、IL-1 β 等转录表达增加^[16],TNF- α 、IL-1 β 反过来又可激活 NF- κ B^[17],形成正反馈环导致组织发生过度炎症反应和损伤;③促进肥大细胞中 TNF- α mRNA 表达和 TNF- α 分泌^[18],而 TNF- α 是多器官功能衰竭时激活细胞级联效应,引起过度炎症反应的主要介质^[19-20]。牛燕兰等^[21]研究表明,心肌内 TNF- α 表达上调,在急性心肌缺血诱发激活的神经源性反应机制中发挥了重要作用。

综上所述,急性心肌缺血可诱发大鼠整体心肌组织内 CGRP 水平的提高,同时 DRG 内 CGRP mRNA 的表达也显著增加,提示神经源性机制可能参与心肌缺血的病理学过程。

参考文献

- [1] 陈在嘉,徐义枢,孔华宇. 临床冠心病学[M]. 北京:人民军医出版社,1994:269-271.
- [2] 张建文,郭政. 结扎大鼠冠状动脉诱发心肌及背根神经节内 P 物质变化的研究[J]. 中国危重病急救医学,2006,18(4):201-205.
- [3] Källner G. Release and effects of calcitonin gene-related peptide in myocardial ischemia[J]. Scand Cardiovasc J Suppl, 1998,49:1-35.
- [4] Longhurst J C, Tjen-A-Looi S C, Fu L W. Cardiac sympathetic afferent activation provoked by myocardial ischemia and reperfusion, mechanisms and reflexes[J]. Ann N Y Acad Sci, 2001,940:74-95.
- [5] Wang X, Xing L, Xing Y, et al. Identification and characterization of immunoreactive calcitonin gene-related peptide from lymphocytes of the rat[J]. J Neuroimmunol, 1999, 94(1-2): 95-102.
- [6] 商立军,臧益民,王春梅,等. 降钙素基因相关肽对心肌细胞缺血缺氧状态下胞内钙的影响[J]. 第四军医大学学报, 2000,21(4):903-905.
- [7] Wu D M, van Zwieten P A, Doods H N. Effects of calcitonin gene-related peptide and BIBN4096BS on myocardial ischemia in anesthetized rats[J]. Acta Pharmacol Sin, 2001,22(7):588-594.
- [8] Hoover D B, Chang Y, Hancock J C, et al. Actions of tachykinins within the heart and their relevance to cardiovascular disease[J]. Jpn J Pharmacol, 2000, 84(4):367-373.
- [9] Shen Y T, Mallee J J, Handt L K, et al. Effects of inhibition of α -CGRP receptors on cardiac and peripheral vascular dynamics in conscious dogs with chronic heart failure[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2003,42(5):656-661.
- [10] 商立军,臧益民,臧伟进. CGRP 对正常及模拟缺血缺氧状态下豚鼠心肌细胞 L 型钙通道电流的影响[J]. 中国药理学通报,2000,16(5):503-506.
- [11] Cuesta M C, Quintero L, Pons H, et al. Substance P and calcitonin gene-related peptide increase IL-1 beta, IL-6 and TNF alpha secretion from human

peripheral blood mononuclear cells[J]. Neurochem Int, 2002,40(4):301-306.

- [12] Ballet S, Aubel B, Mauborgne A, et al. The novel analgesic, cizolirtine, inhibits the spinal release of substance P and CGRP in rats[J]. Neuropharmacology, 2001,40(4):578-589.
- [13] Böckmann S, Seep J, Jonas L, et al. Delay of neutrophil apoptosis by the neuropeptide substance P; involvement of caspase cascade[J]. Peptides, 2001, 22(4):661-670.
- [14] Kähler C M, Pischel A, Kaufmann G, et al. Influence of neuropeptides on neutrophil adhesion and transmigration through a lung fibroblast barrier in vitro[J]. Exp Lung Res, 2001, 27(1): 25-46.
- [15] Lindsey K Q, Caughman S W, Olerud J E, et al. Neural regulation of endothelial cell-mediated inflammation[J]. J Invest Dermatol Symp Proc, 2000,5(1):74-78.
- [16] Hess D C, Howard E, Cheng C, et al. Hypertonic mannitol loading of NF-kappaB transcription factor decoys in human brain microvascular endothelial cells blocks upregulation of ICAM-1[J]. Stroke, 2000,31(5):1179-1186.
- [17] 陈燕启,刘德红,杨光田. 葛根素在大鼠全脑缺血/再灌注时对核因子- κ B 表达的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2004,11(1):21-24.
- [18] Cocchiara R, Lampiasi N, Albigiani G, et al. Mast cell production of TNF-alpha induced by substance P evidence for a modulatory role of substance P-antagonists[J]. J Neuroimmunol, 1999,101(2):128-136.
- [19] 乔万海,李小珍,裴红. 危重病患者细胞因子和氧化代谢指标的动态变化[J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16(8): 493.
- [20] Kollias G, Douni E, Kassiotis G, et al. On the role of tumor necrosis factor and receptors in models of multiorgan failure, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and inflammatory bowel disease[J]. Immunol Rev, 1999, 169: 175-194.
- [21] 牛燕兰,郭政. 结扎大鼠冠状动脉对心肌和背根神经节内肿瘤坏死因子- α 表达的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2007,19(11):657-661.

(收稿日期:2007-12-26)

修回日期:2008-01-14)

(本文编辑:李银平)