

左旋精氨酸对急性心肌缺血/再灌注损伤大鼠内皮素-1 的影响

董化江 单娜娜 罗悦晨 高富合 李雪 徐健 徐鹏霄 杨德慧 李伯森 单云官

【摘要】 目的 探讨内皮素-1(ET-1)在大鼠心肌缺血/再灌注(I/R)损伤过程中的变化规律及左旋精氨酸(L-Arg)的影响。方法 采用结扎冠状动脉前降支 0.5 h 复制 Wistar 大鼠心肌 I/R 损伤模型。110 只大鼠按随机数字表法分为假手术组(C)、缺血 0.5 h 组(I)、缺血 0.5 h + 再灌注 0.5 h 组(R0.5)、缺血 0.5 h + 再灌注 1 h 组(R1)、缺血 0.5 h + 再灌注 2 h 组(R2)、L-Arg + 假手术组(L+C)、L-Arg + 缺血 0.5 h 组(L+I)、L-Arg + 缺血 0.5 h + 再灌注 0.5 h 组(L+R0.5)、L-Arg + 缺血 0.5 h + 再灌注 1 h 组(L+R1)、L-Arg + 缺血 0.5 h + 再灌注 2 h 组(L+R2)。用酶联免疫吸附法测定各组大鼠血清肌酸激酶(CK)、乳酸脱氢酶(LDH)活性;用放射免疫法测量血清 ET-1 水平;用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)、蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测各组心肌组织中 ET-1 mRNA 和蛋白表达。结果 I 组和 R 组血清 CK、LDH、ET-1 均较 C 组明显升高,且 R 组较 I 组升高明显。R 组 ET-1 mRNA 和蛋白表达均较 C 组明显升高,以 R2 组最为显著(ET-1 mRNA: 0.775 ± 0.029 比 0.310 ± 0.076 ; ET-1 蛋白: 0.773 ± 0.055 比 0.340 ± 0.099 , 均 $P < 0.05$);而静脉给予 L-Arg 预处理可明显降低 ET-1 mRNA 和蛋白表达(ET-1 mRNA: 0.340 ± 0.049 比 0.775 ± 0.029 ; ET-1 蛋白: 0.390 ± 0.094 比 0.773 ± 0.055 , 均 $P < 0.05$)。结论 在心肌 I/R 损伤的某些阶段可试用 L-Arg 进行干预,降低 ET-1 的表达。

【关键词】 大鼠; 缺血/再灌注损伤; 心肌; 内皮素-1; 左旋精氨酸

L-arginine suppresses ischemia/reperfusion induced up-regulation of endothelin-1 production in a rat model of acute myocardial injury DONG Hua-jiang*, SHAN Na-na, LUO Yue-chen, GAO Fu-he, LI Xue, XU Jian, XU Peng-xiao, YANG De-hui, LI Bo-sen, SHAN Yun-guan. * Logistics College of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China
Corresponding author: XU Peng-xiao, Email: xupengxiao1225@163.com

【Abstract】 **Objective** To examine the level of endothelin-1 (ET-1) in serum and its expression in myocardium tissue during the development of acute myocardial ischemia/reperfusion (I/R) injury in rat and the effects of L-arginine (L-Arg) administration on these indexes. **Methods** One hundred and ten Wistar rats were randomly divided into nine groups to receive: ① sham surgery, ② ischemia (I, by ligation of anterior descending coronary artery for 30 minutes), ③ I+reperfusion (R, by the removal of the ligature) for 0.5 hour, ④ I+R for 1 hour, ⑤ I+R for 2 hours; group ⑥~⑨ also received I/R treatment as in group 2~5 respectively but with L-Arg pretreatment. Blood and myocardium tissue samples were collected by the end of the experiment for the analysis of: serum level of creatine kinase (CK), lactate dehydrogenase (LDH, by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)), ET-1 (radioimmunoassay), and the tissue content of ET-1 mRNA/peptide [by reverse-transcription polymerase chain-reaction (RT-PCR) and Western blotting]. **Results** In comparison with the sham treated control animals, the serum levels of CK, LDH, and ET-1 were all significantly higher in the groups treated with I/R (particularly those exposed to reperfusion). The myocardial tissue content of ET-1 mRNA/peptide were also significantly increased in I/R treated groups (particularly the I+R 2 hours group) as compared to control (ET-1 mRNA: 0.775 ± 0.029 vs. 0.310 ± 0.076 ; ET-1 peptide: 0.773 ± 0.055 vs. 0.340 ± 0.099 , both $P < 0.05$). The i. v. administration of L-Arg significantly suppressed the up-regulation of tissue content of ET-1 mRNA /peptide in I/R treated animals (ET-1 mRNA: 0.340 ± 0.049 vs. 0.775 ± 0.029 ; ET-1 peptide: 0.390 ± 0.094 vs. 0.773 ± 0.055 , both $P < 0.05$). **Conclusion** L-Arg may be tested during certain stage of I/R injury as a therapeutic intervention for the suppression of ET-1 up-regulation.

【Key words】 Rat; Myocardial ischemia/reperfusion injury; Endothelin-1; L-arginine

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2011.12.007

基金项目,国家“十一五”科技支撑计划项目(2007BAK38B05)

作者单位,300162 天津,武警后勤学院解剖学教研室(董化江、高富合、李雪、徐健、徐鹏霄、单云官),教育技术中心(单娜娜);天津医科大学(罗悦晨);民政部 101 研究所遗体防腐整容重点实验室(董化江、高富合、李雪、徐健、徐鹏霄、杨德慧、李伯森、单云官)

通信作者,徐鹏霄,Email,xupengxiao1225@163.com

目前再灌注治疗已成为急性心肌梗死(AMI)的主要治疗措施^[1-2],冠状动脉(冠脉)介入、溶栓、中药等作为经典的治疗方法挽救了无数 AMI 患者的生命^[3]。然而,再灌注带来的缺血/再灌注(I/R)心肌损伤却大大削弱了再通的意义^[4-7]。因此,研究心肌

I/R 损伤的机制、寻找新的治疗靶点尤为迫切。内皮素-1(ET-1)强大的缩血管效应所导致的无复流现象为心肌 I/R 损伤的重要机制之一^[5-6,8-11],而左旋精氨酸(L-Arg)可通过影响 ET-1 有效防治心肌 I/R 损伤^[6,12]。本研究旨在观察 ET-1 在心肌 I/R 损伤不同阶段的表达及 L-Arg 对其的影响,为心肌 I/R 损伤的防治提供新的治疗途径和思路。

1 材料与方

1.1 主要实验材料:BL-410 生物心电记录系统(成都医疗器械公司);乌拉坦、青霉素钠、L-Arg(美国 Sigma 公司);ET-1 多克隆抗体和三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)抗体、L-Arg 溶液、乳酸脱氢酶(LDH)检测试剂盒(北京经纬生物技术有限公司),ET-1 酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒(上海西唐生物科技有限公司)。

1.2 实验动物分组与模型复制:SPF 级成年健康 Wistar 大鼠 110 只,雌雄不计,体重 250~300 g,由军事医学科学院实验动物中心提供,动物合格证号:0040188。按随机数字表法分为假手术组(C)、缺血 0.5 h 组(I)、缺血 0.5 h+再灌注 0.5 h 组(R0.5)、缺血 0.5 h+再灌注 1 h 组(R1)、缺血 0.5 h+再灌注 2 h 组(R2)、L-Arg+假手术组(L+C)、L-Arg+缺血 0.5 h 组(L+I)、L-Arg+缺血 0.5 h+再灌注 0.5 h 组(L+R0.5)、L-Arg+缺血 0.5 h+再灌注 1 h 组(L+R1)、L-Arg+缺血 0.5 h+再灌注 2 h 组(L+R2)。C 组开胸后挤压出心脏暴露表面血管,在冠脉前降支下穿线但不结扎;I 组同上操作但结扎冠脉前降支 0.5 h;R 组在结扎冠脉前降支 0.5 h 后剪断结扎线恢复血流灌注至相应时间点;L-Arg 组在手术前 0.5 h 舌下静脉给予 L-Arg 20 mg/kg,其余操作同 R 组。本研究中动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 血中肌酸激酶(CK)、LDH、ET-1 水平检测:各组大鼠达预计时间点后即刻开胸右心房取血,并立即低温离心分离血清,按照试剂盒说明书用酶联免疫吸附法检测 CK、LDH 活性;用放射免疫法测定 ET-1。

1.3.2 心肌组织 ET-1 的 mRNA 和蛋白表达测定:取各组大鼠结扎线下左室游离壁、前下壁心肌组织,应用 TRIzol 匀浆,提取组织总 RNA,紫外光检测样品吸光度(A)值, A₂₆₀/A₂₈₀ 为 1.95~2.10,应用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 ET-1 的 mRNA 表达;另取结扎线下的心肌组织剪碎加入裂

解液,研磨至组织无肉眼可见碎片,用 200 μl 裂解液冲洗研磨器,4 ℃离心 15 min,取上清即为总蛋白,用蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测 ET-1 蛋白表达。

1.4 统计学处理:应用 SPSS 13.0 统计软件,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析, P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组心电图及 CK、LDH 比较(表 1):I 组心电图 ST 段抬高幅度及血 CK、LDH 均较 C 组明显提高(均 P < 0.05)。R 组 ST 段抬高幅度较 I 组明显降低(P < 0.05),但仍明显高于 C 组(P < 0.05);而血 CK、LDH 则进一步升高(均 P < 0.05)。

表 1 各组心电图 ST 段抬高程度及血中 CK、LDH 比较($\bar{x} \pm s$)

Table with 4 columns: 组别, 例数, ST 段抬高(mV), CK(μmol/L), LDH(μmol/L). Rows include C 组, I 组, R 组.

注:CK,肌酸激酶;LDH,乳酸脱氢酶;C 组,假手术组;I 组,缺血 0.5 h 组;R 组,缺血 0.5 h+再灌注 0.5 h 组;与 C 组比较, *P < 0.05;与 I 组比较, bP < 0.05

2.2 各组血清 ET-1 比较(表 2):与 C 组比较,I 组和 R 组血清 ET-1 明显升高(均 P < 0.05);与 I 组比较,R 组血清 ET-1 随再灌注时间延长呈升高趋势(均 P < 0.05)。L 组血清 ET-1 均较相应 R 组明显下降(均 P < 0.05),而与 I 组比较差异无统计学意义(均 P > 0.05)。

表 2 各组大鼠血清 ET-1 及心肌组织 ET-1 mRNA 和蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)

Table with 5 columns: 组别, 动物数, 血清 ET-1(μg/L), 心 ET-1 mRNA, 心 ET-1 蛋白. Rows include C 组, I 组, R0.5 组, R1 组, R2 组, L+C 组, L+I 组, L+R0.5 组, L+R1 组, L+R2 组.

注:ET-1,内皮素-1;C 组,假手术组;I 组,缺血 0.5 h 组;R0.5、1、2 组,缺血 0.5 h+再灌注 0.5、1、2 h 组;L+C、L+I 及 L+R0.5、1、2 组分别为 C、I 及 R0.5、1、2 组对应的左旋精氨酸预处理组;与 C 组比较, *P < 0.05;与 I 组比较, bP < 0.05;与相应 R 组比较, cP < 0.05

2.3 各组心肌组织 ET-1 mRNA 和蛋白表达比较(表 2):与 C 组比较, I 组 ET-1 mRNA 表达无差异, ET-1 蛋白表达明显升高($P < 0.05$); R 组 ET-1 mRNA 和蛋白表达随时间延长逐渐升高, 且均明显高于 C 组(均 $P < 0.05$); 除 R0.5 组 ET-1 蛋白表达外, 余 R 组 ET-1 mRNA 和蛋白表达均明显高于 I 组(均 $P < 0.05$)。L+R1 组和 L+R2 组 ET-1 mRNA 和蛋白表达均较 R 组明显下降(均 $P < 0.05$), 且 L+R2 组 ET-1 mRNA 和蛋白表达与 C 组比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

3 讨论

AMI 是冠心病中最严重的类型, 具有发病急、病情重、变化快、病死率高的特点^[3-4, 13-14]。有 32.3% 的患者可再次发生 AMI^[15]。ET-1 为血管内皮细胞所释放, 是迄今所知最强的缩血管活性肽, 在调节血管张力与控制血流分布及 AMI 和再梗死方面起重要作用^[8, 11, 14-15]。AMI 患者 ET-1 水平显著升高, 提示 ET-1 参与了心肌 I/R 损伤的病理过程^[4-5, 7, 9, 13]。ET-1 与心肌 I/R 损伤的关系是近年来讨论的热点之一, 文献报道内皮素受体(ET_A、ET_B)阻滞剂能明显改善 I/R 损伤对心肌的损害, 减小 AMI 的面积^[8, 10-11]。Gourine 等^[8]在动物离体实验中证明, 于心肌缺血以前给予一定量的 ET-1, 可起到缺血预适应的保护作用, 减小 AMI 的面积。

内皮舒张因子是 ET-1 的生理拮抗剂, 它可抑制冠脉收缩。在心肌 I/R 损伤中血清 ET-1 水平明显上升, 打破了 ET-1 与内皮舒张因子之间的动态平衡, 其失衡可影响冠脉血流和心室功能恢复, 甚至可出现“无复流”现象^[6, 12]。L-Arg 是内皮舒张因子合成的前体, 文献报道, 给予 L-Arg 可调整 ET-1 与内皮舒张因子间的平衡, 能明显改善心肌低温 I/R 损伤后的心脏功能^[5-6, 12]。L-Arg 尚可通过提高机体内皮舒张因子水平, 间接抑制中性粒细胞和血小板的黏附、聚集以及黄嘌呤氧化酶, 减少超氧阴离子产生或与超氧阴离子形成无毒代谢产物一氧化氮(NO), 从而使心肌组织避免氧自由基的损害, 有效防治 I/R 损伤^[6, 12]。L-Arg 能促使心肌 I/R 损伤机体分泌降钙素基因相关肽(CGRP), 抑制 ET-1 生成, 说明 L-Arg 具有 ET-1 拮抗效应^[5, 12]。

本研究表明, ET-1 在心肌 I/R 各阶段血清中有不同的浓度, 且遵循一定的变化规律。近年来文献报道, ET-1 受体抑制剂可以减轻缺血心肌的损伤程度, 因此本研究中通过对 ET-1 在 I/R 各阶段升高的规律, 把握尝试给予相应剂量的 ET-1 受体抑制

剂对抗 ET-1, 结果显示, 在心肌 I/R 损伤各阶段 ET-1 的血清、基因、蛋白表达水平均升高且存在一定的规律性, 即 R 组高于 I 组, I 组高于 C 组。在该模型中, L-Arg 在某些阶段可降低血清及心肌组织中的 ET-1, 间接对心肌起到保护作用。因此, 在某些阶段可以尝试通过 L-Arg 对 ET-1 进行干预以减轻心肌 I/R 损伤, 但具体在哪些时间点更具有意义仍需进一步研究。

参考文献

- [1] 王磊, 何健卓, 张军, 等. 218 例急性心肌梗死围再灌注期中医证候要素变化规律探讨. 中国中西医结合急救杂志, 2010, 17, 267-270.
- [2] 贾振华, 李叶双, 吴以岭, 等. 急性心肌梗死证候诊断标准规范化研究. 中国中西医结合急救杂志, 2007, 14, 195-199.
- [3] 沈敬鸿. 中西医结合治疗急性心肌梗死 45 例疗效观察. 中国中西医结合急救杂志, 2010, 17, 238.
- [4] 薛辉, 颜光涛, 林季, 等. 心肌缺血/再灌注损伤后瘦素的改变及机制初探. 中国危重病急救医学, 2010, 22, 680-683.
- [5] 王万铁, 徐正衿, 吴成云, 等. 左旋精氨酸对实验性肺缺血/再灌注损伤中内皮素和降钙素基因相关肽的影响. 中国危重病急救医学, 2005, 17, 373-374.
- [6] 王万铁, 徐正衿, 王卫, 等. 左旋精氨酸对实验性心肌缺血/再灌注损伤中一氧化氮和内皮素的影响. 中国急救医学, 2004, 24, 423-424.
- [7] 徐影彤, 刘世平, 王晓珊. 瘦素预处理和缺血预处理在小鼠心肌缺血/再灌注损伤中的心肌保护机制. 中国危重病急救医学, 2010, 22, 105-108.
- [8] Gourine AV, Molosh AI, Poputnikov D, et al. Endothelin-1 exerts a preconditioning-like cardioprotective effect against ischaemia/reperfusion injury via the ET_A receptor and the mitochondrial K_{ATP} channel in the rat in vivo. Br J Pharmacol, 2005, 144, 331-337.
- [9] Nelson JB, Nabulsi AA, Vogelzang NJ, et al. Suppression of prostate cancer induced bone remodeling by the endothelin receptor A antagonist atrasentan. J Urol, 2003, 169, 1143-1149.
- [10] Vetter D, Shaw SG, Brandes RP, et al. Beneficial cardiovascular effects of endothelin ET_A receptor blockade in established long-term heart failure after myocardial infarction. Exp Biol Med, 2006, 231, 857-860.
- [11] Nelson J, Bagnato A, Battistini B, et al. The endothelin axis, emerging role in cancer. Nat Rev Cancer, 2003, 3, 110-116.
- [12] 李醒三, 易忠, 曾志羽, 等. 左旋精氨酸冠状静脉逆行灌注对猪心肌缺血损伤保护作用. 心肺血管病杂志, 2001, 20, 109-112.
- [13] 迟东升, 吾柏铭, 洪小苏, 等. 急性心肌梗死患者血浆降钙素基因相关肽含量变化及尿激酶溶栓治疗对其影响的观察. 中国危重病急救医学, 2000, 12, 167-169.
- [14] Teerink JR. Endothelins: pathophysiology and treatment implications in chronic heart failure. Curr Heart Fail Rep, 2005, 2, 191-197.
- [15] 李志刚. 再次心肌梗死发生的高危因素分析. 中国中西医结合急救杂志, 2011, 18, 38-40.

(收稿日期, 2011-09-29)

(本文编辑, 李银平)