

- 2005, 112(22):3437-3444
- 9 Das M, Braunschweig T, Mühlenbruch G, *et al.* Carotid plaque analysis: comparison of dual - source computed tomography (CT) findings and histopathological correlation [J]. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2009, 38(1):14-19
 - 10 Wintermark M, Jawadi SS, Rapp JH, *et al.* High - resolution CT imaging of carotid artery atherosclerotic plaques[J]. *AJNR Am J Neuroradiol*, 2008, 29(5):875-882
 - 11 周建军, 周康荣, 陈祖望, 等. 大范围颈动脉 MSCTA 与 DSA 的对照研究[J]. *临床放射学杂志*, 2006, 25(1):75-78
 - 12 戴伟英, 靳松, 田超, 等. 64 层螺旋 CT 血管成像对颈动脉分叉处病变的临床应用[J]. *国际医学放射学杂志*, 2008, 31(6):425-427
 - 13 Executive Committee for the Asymptomatic Carotid Atherosclerosis Study. Endarterectomy for asymptomatic carotid artery stenosis [J]. *JAMA*, 1995, 273(18):1421-1428
 - 14 Saba L, Mallarini G. Carotid plaque enhancement and symptom correlations: an evaluation by using multidetector row CT angiography[J]. *AJNR Am J Neuroradiol*, 2011, 32(10):1919-1925
 - 15 Wintermark M, Arora S, Tong E, *et al.* Carotid plaque computed tomography imaging in stroke and nonstroke patients[J]. *Ann Neurol*, 2008, 64(2):149-157
 - 16 Fisher M, Paganini - Hill A, Martin A, *et al.* Carotid plaque pathology: thrombosis, ulceration, and stroke pathogenesis [J]. *Stroke*, 2005, 36(2):253-257
 - 17 Wolf RL, Wehrli SL, Popescu AM, *et al.* Mineral volume and morphology in carotid plaque specimens using high - resolution MRI and CT[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25(8):1729-1735
- (收稿日期:2013-07-26)
(修回日期:2013-08-22)

胡黄连苷Ⅱ预处理对大鼠离体心脏缺血再灌注的影响

吴楠 李雯娜 吕岩 舒雯琪 贾大林

摘要 **目的** 探讨胡黄连苷Ⅱ预处理对大鼠离体心脏缺血再灌注的影响。**方法** 健康 Wistar 大鼠 32 只,随机分为对照组(control 组)、1 μ mol/L 胡黄连苷Ⅱ预处理组(1-P)、10 μ mol/L 胡黄连苷Ⅱ预处理组和大剂量胡黄连苷Ⅱ预处理组(HP)。采用 Langendorff 离体心脏灌注装置,行缺血 30min,再灌注 120min,制备心肌缺血再灌注模型。胡黄连苷Ⅱ预处理于缺血前 15min 分别以含有 1 μ mol/L 和 10 μ mol/L 的胡黄连苷ⅡKH 液灌注。记录各组心功能指标,测定心肌梗死面积,测定冠脉灌流液中超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)含量。**结果** LP 组和 HP 组明显加快心率(HR)、提高左心室发展压(LVDP)和左心室内压最大上升及下降速率($\pm dp/dt_{\max}$),缩小心肌梗死范围,提高 SOD 的活性,降低 MDA 含量,与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),但 HP 组较 LP 组无统计学差异($P > 0.05$)。**结论** 胡黄连苷Ⅱ预处理能减轻心肌缺血再灌注损伤,其心肌保护作用机制可能与胡黄连苷Ⅱ提高机体抗氧化应激损伤的能力有关。

关键词 胡黄连苷Ⅱ 缺血预处理 心肌缺血再灌注损伤 氧化应激

Effects of Picroside Ⅱ Preconditioning on Myocardial Ischemia Reperfusion Injury in Isolated Rats Heart. Wu Nan, Li Wenna, Lv Yan, Shu Wenqi, Jia Dalin. *Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital of China Medical University, Liaoning 110000, China*

Abstract **Objective** To investigate the effects of picroside Ⅱ preconditioning on myocardial ischemia reperfusion injury in isolated rats heart. **Methods** Twentyfour rats were randomly separated into control group, low - dose picroside Ⅱ preconditioning group(LP) and high - dose picroside Ⅱ preconditioning group(HP). Isolated hearts were linked to Langendorff device with 30 minutes ischemia and 120 minutes reperfusion to prepare myocardial ischemia reperfusion models. Picroside Ⅱ preconditioning was induced by perfusion with Krebs - Henseleit containing picroside Ⅱ at 1 μ mol/L and 10 μ mol/L respectively before 15 minutes ischemia. The changes of cardiac function of all groups, myocardial infarct size, SOD activity and MDA content in coronary perfusion fluid were determined. **Results** LP group and HP group significantly accelerated HR, improved LVDP and $\pm dp/dt_{\max}$, reduced myocardial infarct size, enhanced SOD activity and decreased MDA content compared with control group($P < 0.05$), but no significant difference was seen between LP group and HP group($P > 0.05$). **Conclusion** Picroside Ⅱ preconditioning attenuates myocardial ischemia reperfusion injury, which is involved in enhancing the body's resistance to the oxidative stress injury.

Key words Picroside Ⅱ; Ischemia preconditioning; Myocardial ischemia reperfusion injury; Oxidative stress

基金项目:辽宁省科技计划项目(2009225051-1)

作者单位:110000 沈阳,中国医科大学附属第一医院心内科

通讯作者:贾大林,教授,博士生导师,电子信箱:jdl2001@263.net

随着介入治疗和心脏搭桥手术在临床冠心病治疗中的广泛开展,如何有效预防心肌缺血/再灌注损伤成为目前研究的热点问题。已有研究证实,在长时间缺血开始前,对心脏进行反复多次的短暂缺血干预能提高心肌对缺血的耐受性,从而减轻心肌缺血/再灌注损伤,这一内源性的心肌保护作用被称为缺血预处理。此外还有研究发现,部分药物如吸入性麻醉药、腺苷等可以模拟缺血预处理的心肌保护效应,将这一方式称为药物预处理^[1]。

胡黄连是玄参科植物胡黄连或西藏胡黄连的根茎,是我国传统中药之一。胡黄连的主要化学成分包括 3 类:环烯醚萜类、葫芦素类和酚甙类,其中胡黄连苷 II (picroside II) 为环烯醚萜甙类的主要有效成分,它具有保护肝脏、抗氧化应激、调节免疫反应等多种生物学作用^[2~4]。最近有研究发现胡黄连苷 II 对脑缺血再灌注损伤具有保护作用,这可能与胡黄连苷 II 能减轻氧化应激和炎症反应有关^[5~7],然而胡黄连苷 II 对心肌缺血再灌注损伤是否具有保护作用目前尚未见报道。

本研究采用大鼠离体心脏缺血/再灌注模型,观察胡黄连苷 II 预处理对缺血/再灌注心肌损伤的影响,初步探讨其可能的心肌保护机制。

材料与方法

1. 动物:健康雄性 Wistar 大鼠 32 只,SPF 级,体重 300 ~ 350g,由中国医科大学实验动物部提供。

2. 药品与试剂:胡黄连苷 II (天津奎青医药科技有限公司,批号:39012-20-9,纯度 > 98%);氯化三苯基四氮唑 (TTC) (Sigma 公司,美国);超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 检测试剂盒 (南京建成生物工程公司)。

3. 离体心脏 Langendorff 灌流模型制备:Wistar 大鼠经 10% 水合氯醛 4ml/kg 进行腹腔注射麻醉,按 0.5mg/kg 经腹腔注射肝素钠,迅速开胸,取出心脏置于预先放置有 4℃ 的 KH 液 (NaCl 127mmol/L, NaHCO₃ 17.7mmol/L, KCl 5.1mmol/L, CaCl₂ 1.5mmol/L, MgCl₂ 1.26mmol/L, D-glucose 11mmol/L, pH 值 7.4) 的小培养皿中简单修剪,然后将心脏提起经主动脉逆行插管悬挂于 Langendorff 灌流系统上,整个过程在 2min 内完成。然后用 95% 的 O₂ 和 5% 的 CO₂ 充分氧合的 KH 液以 10kPa 恒压,37℃ 恒温灌流。用小手术剪刀于左心耳处剪一小口,经左心耳向左室内插入一个注水球囊 (约含 0.2ml 水),球囊和压力换能器相连,调整左心室舒张内压 (LVEDP) 在 4 ~ 10mmHg 之间,通过 MP150 多导电生理记录仪记录左心室各项心功能指标,包括心率 (HR)、左心室发展压 (LVDP)、左室内压最大上升速率 (+dp/dt_{max})、左室内压最大下降速率 (-dp/dt_{max})。灌流平衡 20min 后开始进一

步实验。

4. 实验动物分组:将 24 只 Wistar 大鼠随机平均分为 3 组,每组 8 只:①对照组 (Control):缺血 30min,再灌注 120min,不使用药物干预;②小剂量胡黄连苷 II 预处理组 (LA):缺血前 15min 开始时以含有 1μmol/L 胡黄连苷 II KH 液灌注,随后缺血 30min,再灌注 120min;③大剂量胡黄连苷 II 预处理组 (HA):缺血前 15min 开始时以含有 10μmol/L 胡黄连苷 II KH 液灌注,随后缺血 30min,再灌注 120min。用药剂量参考 Meng 等^[8]的报道。

5. 心功能指标测定:通过 MP150 多导电生理记录仪记录左心室各项心功能指标,包括心率 (HR)、左心室发展压 (LVDP)、左室内压最大上升及下降速率 ($\pm dp/dt_{max}$)。

6. 心肌梗死面积测定:心脏灌流结束后,从灌流装置上取下离体心脏,放入 -20℃ 冰箱内冷冻 1h 后取出,自心尖向心底平行于房室沟方向将左心室切成相等厚度的 6 片,将切片放在 1% 氯化三苯基四氮唑 (TTC) 溶液 (TTC 粉末溶于 pH 值 7.4 的 PBS 缓冲液) 中孵育 15min,随后用 10% 的甲醛固定 24h,于切面可见红色的非梗死区和灰白色的梗死区。用数码相机采集图像,用 image J 图像分析软件计算梗死面积,心肌梗死百分率 = 梗死区面积/全心面积。

7. 氧化应激水平测定:选择各组再灌注 120min 作为观察点,分别收集 1ml 冠脉流出液,按照试剂盒说明书步骤用紫外分光光度计测定超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA) 的含量。

8. 统计学方法:计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,应用 SPSS 17.0 统计软件分析处理,并采用单因素方差检验 (one-way ANOVA) 分析组间差异的显著性。若差异有统计学意义时,进一步进行两两比较 (SNK 法), $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

1. 对大鼠离体心脏左心室心功能指标的影响:缺血前各实验组左心室心功能指标比较,HR、LVDP、 $\pm dp/dt_{max}$ 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。1 和 10μmol/L 胡黄连苷 II 预处理组较对照组的 HR、LVDP、 $\pm dp/dt_{max}$ 均明显升高 ($P < 0.05$)。1 和 10μmol/L 胡黄连苷 II 预处理组之间比较无统计学意义 ($P > 0.05$),详见表 1。

2. 对大鼠离体心脏心肌梗死面积的影响:1 和 10μmol/L 胡黄连苷 II 预处理组较对照组显著减少心肌梗死面积 ($P < 0.05$),1 和 10μmol/L 胡黄连苷 II 预处理组之间比较无统计学意义 ($P > 0.05$),详见图 1。

3. 对大鼠离体心脏冠脉流出液 SOD、MDA 的影响:1 和 10μmol/L 胡黄连苷 II 预处理组较对照组显著增加冠脉流出液 SOD 的活性,减少冠脉流出液 MDA 的含量 ($P < 0.05$),1 和 10μmol/L 胡黄连苷 II 预处理组之间比较无统计学意义 ($P > 0.05$),详见表 2。

表 1 胡黄连苷 II 预处理对心功能的影响

时间	基线	R - 10min	R - 30min	R - 120min
心率(次/分)				
对照组	226 ± 23	150 ± 15	164 ± 11	153 ± 8
1 μmol/L 胡黄连苷 II 组	217 ± 20	165 ± 11 *	185 ± 13 *	178 ± 15 *
10 μmol/L 胡黄连苷 II 组	225 ± 17	168 ± 12 *	188 ± 10 *	176 ± 9 *
LVDP (mmHg)				
对照组	86 ± 6.4	34 ± 5.4	38 ± 5.1	35 ± 3.2
1 μmol/L 胡黄连苷 II 组	84 ± 6.5	44 ± 4.3 *	48 ± 4.5 *	46 ± 4.3 *
10 μmol/L 胡黄连苷 II 组	83 ± 6.6	46 ± 4.9 *	51 ± 6.0 *	49 ± 3.4 *
+ dp/dt _{max} (mmHg/s)				
对照组	2322 ± 233	1289 ± 103	1422 ± 178	1162 ± 168
1 μmol/L 胡黄连苷 II 组	2318 ± 187	1466 ± 159 *	1589 ± 167 *	1484 ± 134 *
10 μmol/L 胡黄连苷 II 组	2472 ± 274	1445 ± 202 *	1666 ± 164 *	1454 ± 143 *
- dp/dt _{max} (mmHg/s)				
对照组	1476 ± 222	878 ± 128	1002 ± 117	938 ± 156
1 μmol/L 胡黄连苷 II 组	1378 ± 207	1109 ± 137 *	1211 ± 149 *	1129 ± 134 *
10 μmol/L 胡黄连苷 II 组	1408 ± 190	1089 ± 112 *	1308 ± 102 *	1136 ± 129 *

与对照组比较, * $P < 0.05$

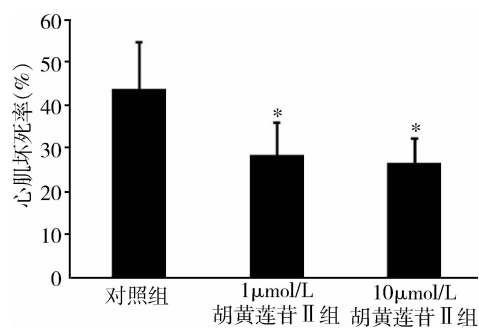


图 1 心肌梗死面积统计图

与对照组比较, * $P < 0.05$

表 2 各组心冠脉灌流液中 SOD、MDA 值

组别	SOD (U/ml)	MDA (nmol/ml)
对照组	3.01 ± 0.855	2.56 ± 0.50
1 μmol/L 胡黄连苷 II 组	5.29 ± 0.586 *	1.84 ± 0.10 *
10 μmol/L 胡黄连苷 II 组	5.50 ± 0.525 *	1.77 ± 0.18 *

与对照组比较, * $P < 0.05$

讨 论

本研究发现,不同剂量的胡黄连苷 II 预处理均能显著减少再灌注心肌的梗死面积,明显改善再灌注后 HR、LVDP、± dp/dt_{max} 等多项心功能指标。这提示胡黄连苷 II 预处理能减少再灌注区域心肌的坏死,促进缺血后心脏功能的恢复,对缺血再灌注心肌具有保护作用。参考 Meng 等^[8] 的报道,笔者选择了 1 和 10 μmol/L 两种不同浓度的胡黄连苷 II 进行观察,结果发现不同浓度的胡黄连苷 II 预处理在减少心肌梗死范围和改善心功能方面并没有统计学差异,这提示

胡黄连苷 II 预处理的心肌保护作用可能不存在剂量依赖性,但这一结论还有待更多浓度梯度药物的检测。尽管之前 Meng 等^[8] 报道了胡黄连苷 II 能减少缺氧复氧状态下心肌的凋亡水平,在细胞水平上证实了胡黄连苷 II 的心肌保护作用,但我们的研究却首次在大体水平上报道了胡黄连苷 II 预处理对于缺血再灌注心肌的保护作用。

心肌缺血再灌注损伤发生的机制目前尚未完全明确,目前认为再灌注损伤发生与自由基所致的氧化应激、细胞内钙超载、白细胞聚集和激活等多种因素有关。而在众多的影响因素中,氧自由基与细胞膜的脂质发生脂质过氧化反应,从而导致细胞膜破坏是导致心肌缺血再灌注损伤的中心环节^[9,10]。MDA 是脂质过氧化反应的产物,它能反映机体受自由基攻击的严重程度。SOD 是酶性自由基清除剂,它能反映机体抗氧化应激损伤的能力。本研究发现,两种不同剂量的胡黄连苷 II 预处理均能显著降低离体心脏冠脉流出液中的 MDA 水平,提高 SOD 的活性,这提示胡黄连苷 II 预处理可能是通过提高机体抗氧化应激损伤的能力来发挥心肌保护作用。

综上所述,胡黄连苷 II 预处理明显缩小缺血再灌注心肌的梗死范围,改善心功能,说明胡黄连苷 II 预处理对缺血再灌注心肌起保护作用。而这一心肌保护作用可能是通过提高机体抗氧化应激损伤的能力来介导的。但是胡黄连苷 II 在临床应用中的效果如何以及其心肌保护作用的机制还有待进一步的探究。

参考文献

- 1 Gerczuk PZ, Kloner RA. Protecting the heart from ischemia: an update on ischemic and pharmacologic conditioning[J]. Hosp Pract; Minneap, 2011,39(3):35-43
- 2 顾伟,范昕建,吴疆,等. 胡黄连苷 II 对 H₂O₂ 损伤 L-02 细胞的保护作用[J]. 世界华人消化杂志,2008,16: 3274-3278
- 3 Gao H, Zhou YW. Anti-lipid peroxidation and protection of liver mitochondria against injuries by picroside II[J]. World J Gastroenterol, 2005,11(24): 3671-3674
- 4 郭云良,沈卫,杜芳,等. 胡黄连苷 II 对大鼠脑缺血再灌注损伤后 TLR4 及 NFκB 表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2011,31(1):58-61
- 5 Guo Y, Xu X, Li Q, et al. Anti-inflammation effects of picroside 2 in cerebral ischemic injury rats[J]. Behav Brain Funct, 2010,6:43
- 6 Li T, Liu JW, Zhang XD, et al. The neuroprotective effect of picroside II from hu-huang-lian against oxidative stress[J]. Am J Chin Med, 2007,35(4):681-691
- 7 Li Q, Li Z, Xu XY, et al. Neuroprotective properties of picroside II in a rat model of focal cerebral ischemia[J]. Int J Mol Sci, 2010,11(11):4580-4590
- 8 Meng FJ, Hou ZW, Li Y, et al. The protective effect of picroside II against hypoxia/reoxygenation injury in neonatal rat cardiomyocytes[J]. Pharm Biol, 2012,50(10):1226-1232
- 9 de Vries D, Kortekaas K, Tsikas D, et al. Oxidative damage in clinical ischemia/reperfusion injury: a reappraisal[J]. Antioxid Redox Signal, 2013, Jan in press
- 10 Su H, Ji L, Xing W, et al. Acute hyperglycaemia enhances oxidative stress and aggravates myocardial ischaemia/reperfusion injury: role of thioredoxin-interacting protein[J]. J Cell Mol Med, 2013,17(1): 181-191

(收稿日期:2013-06-21)

(修回日期:2013-07-28)

HBV S-eclCD40L 融合基因修饰对树突状细胞功能的影响

林贤凡 吴金明 林春景 金思思

摘 要 目的 探讨 HBV S-eclCD40L 融合基因修饰对树突状细胞(DC)功能的影响。**方法** 分离健康成人外周血单个核细胞,GM-CSF、IL-4 诱导培养树突状细胞,培养第 5 天,以脂质体介导转染,分为 pcDNA3.1-S-eclCD40L 转染组、pcDNA3.1-S 转染组、pcDNA3.1 转染组及 PBS 对照组。转染 48h 收集 DC 及上清,流式细胞仪检测 DC 表面 CD80、CD86、HLA-DR 表达水平;CCK-8 法检测混合淋巴细胞反应(MLR)中 DC 刺激同种异体淋巴细胞增殖的能力;酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 IL-12 的分泌水平。**结果** 与对照组比较,pcDNA3.1-S-eclCD40L 转染组 DC 表达 CD80、CD86、HLA-DR 水平增加,刺激同种异体淋巴细胞增殖的能力增强,分泌 IL-12 水平增高。**结论** HBV S-eclCD40L 融合基因修饰能促进 DC 活化,增强 DC 功能,将 CD40L 胞外段基因与 HBV 抗原基因融合可能是增强乙肝疫苗免疫效果的有效方法。

关键词 乙型肝炎病毒 CD40 配体 树突状细胞

Effects of HBV S-eclCD40L Fusion Gene Modification on Function of Dendritic Cells. Lin Xianfan, Wu Jinming, Lin Chunjing, et al. Department of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang 325003, China

Abstract Objective To investigate the effects of HBV S-eclCD40L fusion gene modification on function of dendritic cells(DC). **Methods** The peripheral blood mononuclear cells(PBMCs) from healthy adults were incubated and induced into DC in presence of granulocyte-macrophage colony stimulating factor(GM-CSF) and interleukin-4(IL-4). On the fifth day of incubation, DC were transfected with pcDNA3.1-S-eclCD40L, pcDNA3.1-S, pcDNA3.1, PBS respectively. DC and the culture supernatants were harvested for detection after 48 hours. The expression level of CD80, CD86 and HLA-DR on DC were detected by flow cytometry. The level of IL-12 released by DC was analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) and the stimulatory capacity of DC in allogenic mixed leukocyte reaction(MLR) was tested by CCK-8. **Results** Modification of DC with HBV S-eclCD40L fusion gene resulted in activation of DC with up-regulated expression of immuneologically important cell surface molecules(CD80, CD86 and HLA-DR) and pro-in-

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(LY12H03003)

作者单位:325003 温州医科大学附属第一医院消化内科

通讯作者:林贤凡,电子信箱:lynnxianfan@126.com