

血清脂联素在大鼠急性心肌梗死中的变化及意义

翟昌林 黎 莉 张 运

摘 要 **目的** 本研究在建立 AMI 模型的基础上讨论梗死后不同时间段血清脂联素 (APN) 的变化及意义。**方法** 试验用 SD 大鼠 90 只,随机分为假手术对照组以及心肌梗死 D_1 、 D_3 、 D_7 、 D_{10} 、 D_{14} 组。结扎冠状动脉造成梗死模型后第 1、3、7、10、14 天进行相关指标的采集。分别采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 和免疫组化法检测血清及心肌 APN 表达情况。**结果** 与假手术对照组相比,其余各组 APN 水平均降低,其中 D_1 组差异无统计学意义 ($P > 0.05$), D_3 组 APN 水平降低 ($P < 0.05$), D_7 组水平最低 ($P < 0.01$), D_{10} 、 D_{14} 组 APN 水平有所升高,但仍低于对照组 ($P < 0.05$)。免疫组化显示 D_{10} 亚组心肌细胞 APN 表达最高。**结论** 大鼠心肌梗死后血清 APN 水平降低,梗死心肌细胞 APN 表达增高,提示脂联素可能参加了心肌梗死的病理生理过程,对梗死心肌有保护作用。

关键词 脂联素 大鼠 心肌梗死

[中图分类号] R541.4 [文献标识码] A

Expression and Significance of Adiponectin in Acute Myocardial Infarction in Rats. Zhai Changlin, Li Li, Zhang Yun. The First Hospital of Jiaxing, Zhejiang 314000, China

Abstract **Objective** To discuss the changes and significance of APN in the serum on the basis of the model of myocardial infarction. **Methods** Ninety rats were randomly divided into sham-operated group and MI (D_1 , D_3 , D_7 , D_{10} , D_{14}) groups. Ligation of coronary artery caused by infarction model after first, 3, 7, 10, 14 days were related indicators collection. The level of APN were evaluated by ELISA and immunochemistry. **Results** For MI groups, the concentration of APN in D_1 group was not different with the control group ($P > 0.05$). The concentration of ANP in D_3 group was decreased obviously, and it was lowest in D_7 group, which was significantly different with control group. Then the concentration of ANP in D_{10} and D_{14} group were more increased than D_7 , but still lower than the control group ($P < 0.05$). Immunohistochemistry showed APN expression of myocardial cell in D_{10} subgroup was the highest. **Conclusion** The concentration of serum ANP was decreased after myocardial infarction, while APN expression in infarction myocardial cells increased. It suggests that the APN may participate in the pathophysiology of myocardial infarction and have protective effect on acute myocardial infarction.

Key words Adiponectin; Rats; Myocardial infarction

急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 是指因持久而严重的心肌缺血所致的部分心肌急性坏死,其因进展及其迅速,后果较为严重,病死率极高。近年来因其发病率正逐年上升,越来越受到临床工作者的关注,但具体分子生物学机制尚未明确。脂联素 (adiponectin, APN) 是一种新发现的蛋白因子,具有抗动脉硬化、抗炎及抗内皮损伤等生物活性,近年来其在心血管病中的作用越来越受到人们的重视。在此理论基础上,笔者讨论不同时间段血清 APN 在 AMI 中的变化及意义。

材料与方法

1. 试验动物:清洁 SD 大鼠,2~5 个月,雌雄不限,体重 160~240g。

2. 主要仪器和药物:小动物手术台,动物呼吸机:浙江大学动物仪器厂,千分之一天平:Mettler 公司;恒温水箱:上海医用恒温设备厂;低温高速离心机:Hitachi CF-5 型,日本;显微镜:OLYMPUS 公司;伊凡蓝试剂:瑞士 Restang 公司;APN-ELISA 检测试剂:南京建成生物有限公司;水合氯醛:浙江省华东医药股份公司;TTC 试剂:山东鲁南制药厂;

3. 实验分组:清洁级 Wistar 大鼠共 90 只,每组 15 只。①假手术组 (对照组):模型建立时只穿线,不结扎,随后进行有关指标的检测;②AMI 各组 (D_1 、 D_3 、 D_7 、 D_{10} 、 D_{14} 组):AMI 模型建立后,分别在第 1、3、7、10、14 天进行有关指标的检测。

4. 心肌梗死模型的建立:10% 的水合氯醛腹腔内注射 (5ml/kg),连接动物呼吸机保持呼吸道通畅,动脉插管监测生命体征。冠状动脉左心室支左心耳下缘约 0.5cm 处,用线穿过其下部,穿过硅胶管,收紧结扎线,造模成功以六导心电图

基金项目:嘉兴市科技计划项目 (2010AY1167);桐乡市重点科技计划项目 (201003108)

作者单位:314000 浙江省嘉兴市第一医院心内科 (嘉兴市心内科重点学科)

通讯作者:黎莉,电子信箱:yesterdaygun@126.com

肢导联的变化来判断,以Ⅱ导联 ST 段弓背向上抬高 $>0.5\text{mv}$ 并持续 0.5h 以上作为结扎成功的标志。清除胸腔内积血,逐层缝合后关闭胸腔,等待动物苏醒后拔除气管插管,缝合气管。术后青霉素常规预防感染。各组到实验终点存活的大鼠分别为 9、8、9、8、7 只,在心肌梗死模型建立后第 1、3、7、10、14 天采血以及收集心脏标本。

5. 血清 APN 的 ELISA 测定:实验分为空白孔、待测大鼠血清样品孔、标准孔。大鼠血清样品 $100\mu\text{l}$ 加入待测大鼠血清样品孔、标准孔,混匀后上盖, 37°C 温育 2h 后弃液、甩干。 $100\mu\text{l}$ 检测溶液 A 工作液加入 3 孔, 37°C 温育 1h 后,洗涤、甩干。 $100\mu\text{l}$ 检测溶液 B 工作液加入 3 孔, 37°C 温育 1h 后洗涤、甩干。加底物溶液 $90\mu\text{l}$ 后避光 37°C 温育 0.5h,加终止溶液 $50\mu\text{l}$ 终止反应。酶联仪测量各孔的光密度(OD 值)。横坐标为标准物的浓度,纵坐标为 OD 值,绘出标准曲线,计算出样品的实际浓度,共计检测 51 份血清标本。

6. 心肌组织 APN 的 SABC 免疫组化法测定:石蜡切片脱蜡至水, $30\%\text{H}_2\text{O}_2$ 室温孵育 5min。蒸馏水冲洗 3 次, PBS 浸泡 5min。 $5\% \sim 10\%$ PBS 稀释封闭,室温孵育 10min,倾去血清。滴加一抗工作液, 37°C 孵育 1~2h 或 4°C 过夜。PBS 冲洗 5min,共 3 次。滴加适量生物素标记二抗工作液, 37°C 孵育 10~30min。PBS 冲洗, 5min 共 3 次。滴加试剂 SABC, 37°C 20min。PBS 洗 5 分钟,共 4 次。使用 DAB 显色试剂盒显色。取 1ml 蒸馏水,加试剂盒中 A、B、C 试剂各 1 滴,混匀后加至切片。室温显色,蒸馏水洗涤,苏木素轻度复染,脱水、透明、封片。显微镜下观察。计数 10 个高倍视野中阳性心肌细胞数,及阳性心肌细胞数(PMCN)占该视野中所有心肌细胞数目(MCTN)的百分比,求其均值。

7. 统计学方法:统计学处理采用 SPSS11.5 软件完成,计量资料采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,并进行正态性及方差齐性检验,多组均数比较采用 ANOVA 分析,两两比较采用 Dunnett-t 检验,计数资料采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 肉眼观察:实验结扎冠状动脉前降支 0.5h 后,可见心室壁心肌颜色逐渐变淡、变苍白,心肌收缩幅度逐渐下降,部分实验大鼠心脏伴有室壁瘤形成。

2. 实验大鼠血清 APN 的检测:由表 1 可以看出 D_1 组 APN 水平虽然较对照组有降低,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。 D_3 、 D_7 、 D_{10} 、 D_{14} 组与对照组相比 APN 水平都有不同程度的下降,均有统计学差异($P < 0.05$),其中 D_7 组 APN 水平最低($P < 0.05$)。

3. 心肌梗死后各时间点大鼠心肌组织中脂联素蛋白表达的变化:光镜下正常心肌细胞核呈蓝色,细胞质呈淡黄色,而细胞质染色棕黄色或是深棕黄色为阳性心肌细胞。结果显示脂联素在对照组以及梗死后非缺血组织中未染色,而在缺血心肌组织中可见棕

表 1 各组血清 APN 的测定结果

组别	动物数(n)	血清 APN 浓度(ng/ml)
对照	10	7.13 ± 1.05
D_1	9	6.95 ± 0.77
D_3	8	$5.94 \pm 0.53^*$
D_7	9	$4.81 \pm 0.68^{* \#}$
D_{10}	8	$5.27 \pm 0.49^*$
D_{14}	7	$5.90 \pm 0.82^*$

与对照组相比, $^*P < 0.05$;与其他各组相比, $^{\#}P < 0.05$

黄色的脂联素蛋白表达。 D_1 、 D_3 、 D_7 、 D_{10} 组心肌组织 APN 表达逐渐升高,其中 D_{10} 脂联素表达最高($P < 0.05$), D_{14} 较前有所下降(表 2、图 1、图 2)。

表 2 各组心肌组织 APN 蛋白表达结果

组别	动物数(n)	PMCN/HPF	PMCN/MCTN(%)
D_1	9	15.24 ± 1.10	3.04 ± 0.29
D_3	8	$45.25 \pm 1.26^*$	$8.45 \pm 1.92^*$
D_7	9	$99.47 \pm 8.38^*$	$19.99 \pm 2.26^*$
D_{10}	8	$112.16 \pm 15.03^{* \Delta}$	$22.40 \pm 3.53^{* \Delta}$
D_{14}	7	$65.12 \pm 9.06^*$	$13.02 \pm 3.44^*$

与 D_1 组相比, $^*P < 0.05$;与其他各组相比, $^{\Delta}P < 0.05$

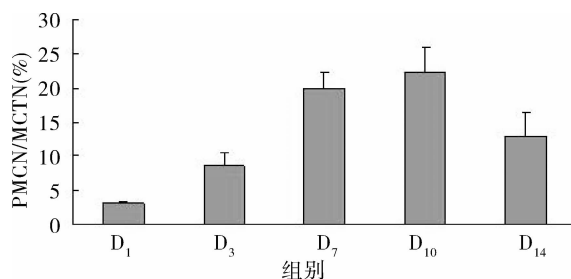


图 1 各组心肌组织 APN 蛋白表达

讨 论

本试验通过结扎冠状动脉造成大鼠心肌梗死模型,分别测定梗死模型大鼠第 1、3、7、10、14 天的血清 APN 浓度动态变化。研究结果发现梗死后第 1 天血清 APN 水平较对照组轻度下降,但没有统计学差异,梗死 3 天后血清 APN 水平明显下降($P < 0.05$),第 7 天血清 APN 水平最低,随后第 10 及 14 天稍有升高,但仍明显低于假手术对照组($P < 0.05$)。笔者的前期研究已表明 APN 可能与心肌梗死密切相关^[1]。结合最新文献以及笔者的实验结果表明 APN 可能参与了心肌梗死的发生以及之后的心肌重塑,APN 水平的下降可能是心肌梗死发生发展的重要因素之一^[2,3]。

APN 又称为脂肪细胞补体相关蛋白(Acrp30),

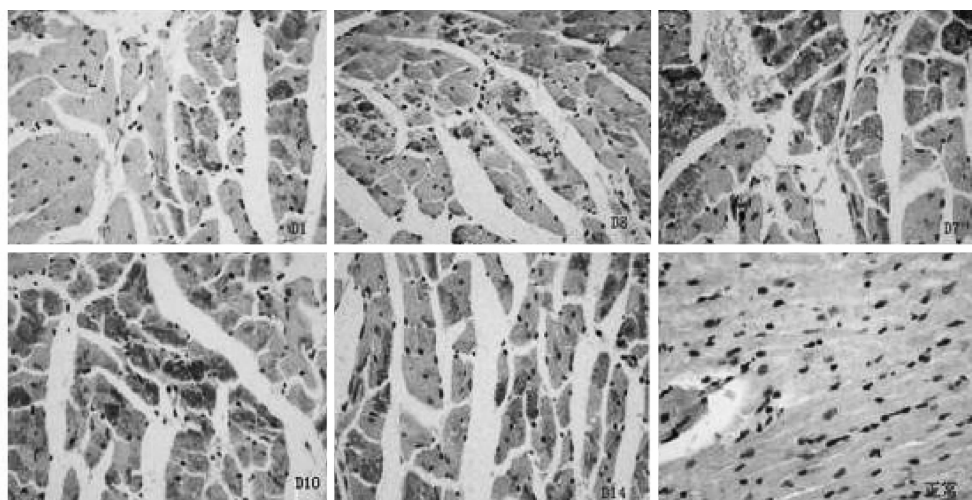


图 2 各组心肌组织脂联素免疫组化表达 ($\times 200$)

由 244 个氨基酸组成,包括 4 个功能区:氨基末端的分泌信号序列、胶原样结构域、非同源序列和羧基末端的球形结构域,它是至今发现的唯一的与肥胖呈负相关的脂肪细胞因子,已证实其在心血管领域广泛的生物学效应,具有抗动脉粥样硬化形成、抗炎、防止心肌重构、防止糖尿病代谢紊乱、改善内皮功能等作用^[4-8]。Guo 等^[9]研究发现,脂联素可以改善糖尿病心肌病变,Eric 等^[10]研究显示脂联素可以作用于 ROS 系统,防止心肌纤维化及心肌重构。Kazuhisa 等^[11]给予结扎冠脉的猪模型注射外源性脂联素,发现可以减少心肌梗死面积,并且可以减少心肌凋亡。

本研究证实了 APN 在心肌梗死病变中的保护作用,其机制可能包括:①血清 APN 可以在梗死后损伤动脉内皮内聚集,可制 TNF- α 诱导的核因子- κ B 的激活以及细胞间黏附分子的表达,从而减少单核细胞的黏附,抑制血管平滑肌细胞的增生,抑制巨噬细胞向泡沫细胞的转化,稳定斑块,抑制动脉粥样硬化的发展;②炎症反应是心肌梗死中主要病理、生理机制,APN 可以通过腺苷酸激酶 (AMPK) 所介导的信号靶体,作用于内皮及巨噬细胞,抑制炎症反应,减轻心肌梗死后的炎症损伤;③APN 还可影响还原型辅酶 II 氧化酶活性,减少有丝分裂原活化蛋白激酶 E 的活性,从而促使氧化型低密度脂蛋白诱发的内皮细胞增殖及超氧化物的产生,增强一氧化氮的合成,改善血管内皮功能,扩张血管,增加缺血心肌的氧供。此外研究表明高脂高糖喂养、球囊机械损伤主动脉内膜的 APN 基因剔除小鼠,较对照组发生更严重的主动脉内膜增厚和 VSMC 增生,而补充 APN 后明显减轻该反应,提示 APN 可能通过防止内皮损伤致血管重

建起到保护心肌的作用^[12]。本实验 D₃ 组心肌损害最为严重,随着 D₁、D₁₀、D₁₄ 组缺血心肌 APN 表达的升高,心肌受损减轻,这与 Zhang 等^[13]的研究一致。

有研究发现脂联素基因敲除鼠给予外源性脂联素后,脂联素聚集于缺血心肌^[14]。本实验心肌组织 APN 免疫组化结果表明 D₁、D₃、D₇、D₁₀ 组心肌组织 APN 表达逐渐升高,其中 D₁₀ 脂联素表达最高,D₁₄ 较前有所下降,与血清 APN 表达峰值时间不一致,这可能由于应激状况下脂肪、骨骼肌等组织细胞产生脂联素增多有关,也可能由于血清中脂联素渗透聚集于缺血梗死心肌,发挥心肌保护作用有关,其具体机制尚需进一步研究。而王慧等^[15]报道缺血预处理后心肌组织及血浆中 APN 水平均升高,其中血浆 APN 变化与本研究有不符,可能与实验模型不同有关,缺血预处理后的炎症反应要更强烈。

总之,本研究中大鼠心肌梗死后 APN 浓度下降,并且缺血心肌组织 APN 表达增加,这提示脂联素可能参加了心肌梗死的病理、生理过程,对梗死心肌有保护作用,本实验对 APN 的临床应用提供了一定的理论依据。

参考文献

- 1 张松,翟昌林,葛均波,等.大鼠急性心肌梗塞脂联素变化的研究[J].中华微生物与免疫学杂志,2009,29:404
- 2 Hatano YM, Masatoshi I, Shizukiyo, *et al.* Plasma adiponectin level and myocardial infarction: the JMS Cohort Study[J]. J Epidemiol, 2009,19(2): 49-55
- 3 Shojaie M, Sotoodah A, Shafaie G, *et al.* Is adiponectin associated with acute myocardial infarction in Iranian non obese patients? [J]. Lipids Health Dis, 2009,12(8): 17
- 4 Parul SS, Mazumder M, Debnath BC, *et al.* Serum adiponectin in pa-

- tients with coronary heart disease[J]. Mymensingh Med J, 2011, 20(1): 78-82
- 5 Kajikawa Y, Ikeda M, Takemoto S, *et al.* Association of circulating levels of leptin and adiponectin with metabolic syndrome and coronary heart disease in patients with various coronary risk factors[J]. International Heart Journal, 2011, 52(1): 17-22
- 6 Yin WH, Chen YH, Wei J, *et al.* Associations between endothelin-1 and adiponectin in chronic heart failure[J]. Cardiology, 2011, 118(4): 207-216
- 7 Hecker PA, O'Shea KM, Galvao TF, *et al.* Role of adiponectin in the development of high fat diet-induced metabolic abnormalities in mice[J]. Horm Metab Res, 2011, 43(2): 100-105
- 8 Ohashi K, Ouchi N, Matsuzawa Y, *et al.* Adiponectin and hypertension[J]. Am J Hypertens, 2011, 24(3): 263-269
- 9 Guo ZX, Zheng CH, Qin ZH, *et al.* Effect of telmisartan on the expression of cardiac adiponectin and its receptor 1 in type 2 diabetic rats[J]. J Pharm Pharmacol, 2011, 63(1): 87-94
- 10 Eric E, Ouchi N, Wilson RM, *et al.* Adiponectin mediates cardioprotection in oxidative stress-induced cardiac myocyte remodeling[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011, 301(3): 984-993
- 11 Kazuhisa K, Rei S, Kazumasa U, *et al.* Impact of a single intracoronary administration of adiponectin on myocardial ischemia/reperfusion injury in a pig model[J]. Circ Cardiovasc Interv, 2010, 3(2): 166-173
- 12 Shibata R, Ouchi N, Ito M, *et al.* Adiponectin-mediated modulation of hypertrophic signals in the heart[J]. Nat Med, 2004, 10(12): 1384-1389
- 13 Zhang S, He B, Goldstein S, *et al.* Changes in adiponectin expression in acute myocardial infarction rats and the significance of bisoprolol intervention[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2011, 89(2): 109-115
- 14 Shibata R, Sato K, Kumada M, *et al.* Adiponectin accumulates in myocardial tissue that has been damaged by ischemia-reperfusion injury via leakage from the vascular compartment[J]. Cardivasc Res, 2007, 74(3): 471-179
- 15 王慧, 程劲松, 吴文静, 等. 成年大鼠心肌缺血预处理的心肌保护作用及其对脂联素表达的影响[J]. 中华心血管病杂志, 2010, 10: 929-933
- (收稿日期: 2012-12-28)
- (修回日期: 2013-01-07)

骨髓基质细胞经颈内动脉移植对短暂脑缺血大鼠 VEGF 表达和学习记忆的影响

吴 杰 潘晶晶

摘 要 目的 观察骨髓基质细胞(BMSCs)经颈内动脉移植对短暂脑缺血大鼠的脑组织血管内皮生长因子(VEGF)表达及学习记忆的影响。方法 5只短暂脑缺血模型大鼠移植标记有¹⁸F-FDG的BMSCs,仅用于正电子发射型计算机断层显像(positron emission computed tomography, PET)观察。16只模型大鼠采用数字表法随机分为移植组($n=8$)和对照组($n=8$),另设假手术组($n=8$)。移植组由颈内动脉种植BMSCs,对照组种植PBS,假手术组无特殊处理。14天后行脑组织HE染色,VEGF免疫组化染色。另设3个组,于移植后14和90天行Morris水迷宫实验。结果 BMSCs注射后3h,细胞主要分布于双侧颅内。移植后第14天,HE染色观察,与对照组比较,移植组神经元缺失较少,微血管增生明显。移植组在海马脑组织的VEGF阳性细胞数高于另两组,移植组为 12.14 ± 1.53 个,对照组为 9.53 ± 1.31 个,假手术组为 7.23 ± 0.77 个,差异有统计学意义($P < 0.05$)。移植后第14天,移植组的定位航行潜伏期和穿越平台的次数为 46.55 ± 6.92 s和 4.50 ± 1.05 次,对照组为 44.50 ± 5.09 s和 5.50 ± 1.05 次,假手术组为 27.83 ± 5.80 s和 7.17 ± 1.17 次。移植组和对照组的定位航行潜伏期延长,穿越平台的次数减少,与假手术组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。移植后第90天,移植组的定位航行潜伏期和穿越平台的次数为 25.85 ± 2.20 s和 7.50 ± 1.05 次,对照组为 39.25 ± 4.02 s和 5.83 ± 0.75 次,假手术组为 24.62 ± 2.63 s和 7.67 ± 0.82 次。对照组的定位航行潜伏期仍延长,穿越平台的次数仍减少,与另两组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 BMSCs移植可以减少短暂脑缺血大鼠神经细胞的丢失,促进脑组织VEGF的表达和血管增生,改善学习和记忆功能。

关键词 骨髓基质细胞 移植 血管内皮生长因子 正电子发射型计算机断层显像

[中图分类号] R3 [文献标识码] A

Effects of Bone Marrow Stromal Cells Transplantation Through Internal Carotid Artery Injection on Learning and Memory and the Express-

作者单位:317502 浙江省台州市肿瘤医院神经外科(吴杰);241000 安徽省芜湖市第二人民医院神经外科(潘晶晶)

通讯作者:吴杰,电子信箱:wujie8812@aliyun.com