

人生长素对雌性大鼠心力衰竭心脏重塑及心肌细胞凋亡的影响

孙宇泽 李艳丽 赵 勇 袁 寰 田国忠 李梅秀

摘 要 目的 研究人 ghrelin 对急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 致心力衰竭 (heart failure, HF) 大鼠心肌形态结构变化和心肌细胞凋亡的影响, 探索生长素释放肽 (growth hormone releasing - peptides, GHRPs) 心脏保护活性机制。方法 经心电图监测成功永久结扎成年雌性 Wistar 大鼠左冠状动脉前降支诱导 AMI, 经 B 型超声鉴定诱导 HF 模型成立或穿线不接扎成 HF 模型对照; 以人 ghrelin 经尾静脉注射进行干预 3 周; 苏木精 - 伊红 (HE) 染色观察心肌组织形态结构变化; 末端脱氧核苷酰基转移酶介导的 dUTP 切口末端标记技术分别研究心力衰竭大鼠心肌组织形态、细胞凋亡变化。结果 TUNEL 染色结果: 永久结扎后心肌细胞排列紊乱, 呈颗粒变性, 肿胀、核固缩。较多间质纤维化、炎细胞浸润; 经人 ghrelin 干预的虽有排列紊乱、肿胀和少量颗粒变性外未见典型固缩或严重间质少量纤维化, HF 组心肌细胞凋亡指数明显高于 ghrelin 干预组 ($P < 0.05$)。结论 外源性 ghrelin 减少 HF 大鼠心肌细胞凋亡, 抑制心脏重塑而发挥心脏保护活性。

关键词 大鼠 急性心肌梗死 心力衰竭 心肌细胞凋亡 人生长素

中图分类号 R5 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.07.012

Effect of Human Ghrelin on the Cardiac Remodeling and Cardiomyocytes Apoptosis in Heart Failure Female Rats. Sun Yuze, Li Yanli, Zhao Yong, et al. Clinical Medical College and Basic Science College of Jiamusi University, Centre Hospital of Jiamusi City, Heilongjiang 154000, China

Abstract Objective To study the effect of human ghrelin on morphosis and cardiomyocytes apoptosis in heart failure (HF) rats derived from acute myocardial infarction (AMI), so as to explore the cardioprotective activity mechanism of growth hormone releasing - peptides (GHRPs). **Methods** Under the monitoring of the electrocardiogram (ECG) by the multichannel physiological signal collection management system to confirm successfully permanent ligation the left anterior descending coronary artery (LAD) to set up AMI model and then by ultrasound B system to rule out the rats without HF or to make the sham group rats which merely pass through the stylolite beneath LAD; HF model group rats accept three weeks human ghrelin through tail vein injection, using HE stain technique to analyze the changes of morphosis, the cardiomyocytes apoptosis in HF rats were assessed by terminal deoxynucleotidyl transferase - mediated dUTP nick end labeling (TUNEL). **Results** TUNEL staining results showed that the cardiomyocytes in rats after permanent LAD ligation aligned extremely irregularly, granular degeneration, swelling, much karyopyknosis and severe interstitial fibrosis, inflammatory cell infiltrate, while in human ghrelin intervention rats, cardiaomyocytes aligned irregularly, swelling and granular degeneration also could be found but without typical karyopyknosis or severe interstitial fibrosis. The cardiomyocytes apoptotic index in HF group rats is significantly higher than that in ghrelin intervention group rats ($P < 0.05$). **Conclusion** Extrinsic human ghrelin exerted the cardioprotective activities by reducing the cardiomyocytes apoptosis and inhabiting the cardiac remodeling.

Key words Rat; Acute myocardial infarction; Cardiomyocyte apoptosis; Human ghrelin

各种病因所致心力衰竭 (HF) 严重威胁人类的健康。AMI 发生率不断升高与患者逐渐年轻化的趋势使之成为制约现代人生活质量的主要元凶^[1,2]。GH-

RP 是 20 世纪 70 年代合成的可以强烈促进生长激素 (growth hormone, GH) 释放的一族寡肽, 与同样作用的非肽类化合物被合称为生长激素促分泌素 (growth hormone secretagogues, GHSs)^[3]。GHRPs 受体即 GHS - R 的成功克隆, 不仅使其代谢生长调节等内分泌功能广为关注外, 也因其不依赖于 GH 轴的广泛生物学活性特别是 GHRPs 的心血管保护效应越来越受到医学工作者的重视^[4]。GHS - R 发现后随之

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81370342, 81270311)

作者单位: 154000 佳木斯大学 (孙宇泽、赵勇、袁寰、田国忠、李梅秀); 佳木斯市中心医院心内科 (李艳丽)

通讯作者: 李梅秀, 电子信箱: oldster@163.com; 田国忠, 电子信箱: tgz1966@163.com

发现了内源性的配基天然 ghrelin, 又称生长素^[5,6]。至此, 这族 GHS 被冀望于新世纪 HF 生物学治疗的最有前途的遴选药物。ghrelin 由 28 个氨基酸组成, 是一种新的 GHRPs, 最初是从大鼠的胃壁组织中作为 GHS-R 的配体被确认并提取, 其功能不仅是 GH 轴的调节, 还因通过其广泛分布中枢和外周而发挥独立于 GH 轴的生物活性, 进来, 生长素的心脏保护效应正在受到日益瞩目, 而其细胞及分子机制的研究及可能的临床试用成为目前研究的重点^[6]。为此, 在本课题组及其他课题组初步探究了人 ghrelin 对 AMI 雄性大鼠影响基础上, 设计以 AMI 诱导成年雌性 Wistar 大鼠 HF 模型, 探索人 ghrelin 对雌性 HF 大鼠心肌重塑、细胞凋亡的影响, 为 GHRPs 应用于 HF 生物学治疗、为人内源性 ghrelin 作为 HF 生物学治疗的新靶点进入临床应用提供必要的实验资料。

材料与amp;方法

1. 实验动物: 成年健康雌性 Wistar 大鼠, 平均体质量 280 ± 30g, 共 50 只, 由哈尔滨医科大学实验动物中心提供, 适应性饲养后按体重随机分为正常组(A 组)、假手术组(B 组), 其余用于 AMI 模型制作, 符合标准的再分为单纯 AMI 致 HF 模型组(C 组)和 HF + 人 ghrelin 组(D 组)。
2. 主要仪器和试剂: RM6240 多道生理信号采集处理系统(成都仪器厂); 小动物呼吸机 3 台: HX-300、HX-300S(成都泰盟科技有限公司); DHX-150(成都仪器厂); YC-6C 生物组织摊烤片机(湖北省孝感市亚光医用电子技术研究所); LEICA CM 1100 冷冻切片机(德国); LEICA SM 2000R 滑动式切片机(德国), Nikon YS100 生物显微摄像和分析系统(日本)。人 ghrelin(以色列), TUNEL 凋亡检测试剂盒(Roche 公司), 其他试剂为国产试剂纯。
3. 建立 AMI 大鼠模型及分组处置: 于平左心耳下缘水平

结扎 LAD, 在 RM6240 多道生理信号采集处理系统大鼠胸前第 II 导联检测心肌供血变化, 以 ST-T 段显著、持续抬高为结扎成功、以 B 型超声检测左心室射血分数(ejection fraction, EF) < 45% 为达到 HF。不符合条件的非标准模型淘汰后: D 组给人 ghrelin 40μg/(kg · d) 经尾静脉注射进行干预 3 周。麻醉下取材心肌梗死部位左心室心肌组织经 4% 多聚甲醛固定后分别严格按照 TUNEL 试剂盒说明和 HE 染色步骤进行操作, 封片干燥后 Nikon YS100 生物显微镜下观片并拍摄。心肌细胞凋亡指数(apoptotic index, AI)以不重叠的 7 个视野计数, AI(%) = 凋亡细胞数 ÷ 细胞总数 × 100%。

4. 统计学方法: 实验数据采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 应用 SPSS 19.0 统计软件对数据进行统计分析, 组间比较用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. AMI 致 HF 模型制作 ECG 结果: RM6240 多道生理信号采集处理系统 AMI 模型制作结扎 LAD 术中大鼠胸前 II 导联即时监测心肌供血变化, 结扎后 ST-T 段弓背向上持续抬高即为 AMI 制作成功, 经 B 型超声 5 个心动周期检测 EF < 45% 为可用 HF 大鼠模型, 用于后续实验, 假手术 ST-T 段不明显抬高或一过性升高并迅速回落为成功。
2. ghrelin 对 AMI 致 HF 心肌结构的影响 HE 检测结果: HE 染色可见 HF 即 C 组与 B 组比较, 心肌细胞大部分肿胀、着色极为不均、颗粒变性、细胞核固缩多、心肌排列紊乱, 可见大量炎性细胞浸润、间质纤维化; 而 ghrelin 干预的 D 组则心肌细胞也有肿胀但范围明显减小、粒细胞浸润及间质纤维化均较轻、着色较均匀; 与 A 组比较, B 组心肌组织着色、心肌纤维排列、炎性细胞浸润等均未见明显差异(图 1)。

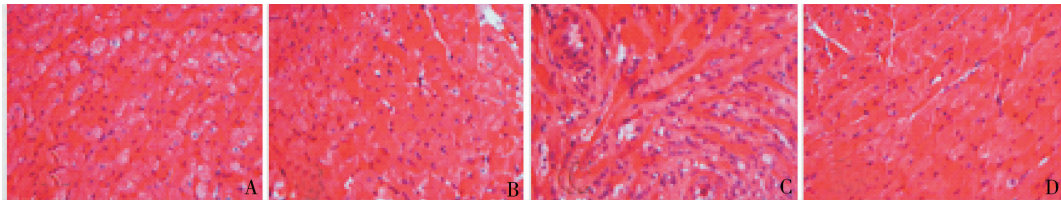


图 1 HE 染色检测心肌组织结构 (HE, × 400)

A. 正常组(A 组); B. 假手术组(B 组); C. HF 模型组(C 组); D. HF + 人 ghrelin 组(D 组)

3. ghrelin 对 AMI 致 HF 心肌细胞凋亡影响 TUNEL 检测结果: TUNEL 染色可见 HF 即 C 组与 B 组比较, 心肌细胞细胞核被染成棕褐色呈现大量特异性凋亡、可见大量炎性细胞浸润; 而 ghrelin 干预的 D

组则见较少特异性细胞凋亡; 与 A 组比较, B 组未见特异性细胞凋亡见图 2。D 组与 C 组凋亡指数比较明显降低, 差异具有统计学意义($P < 0.05$), 表 1 中列出 B、C、D 组心肌细胞凋亡指数(AI)。

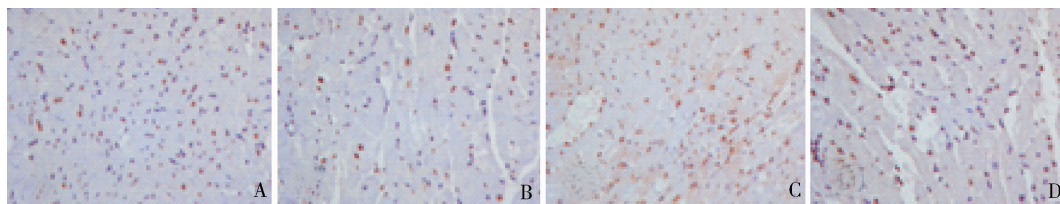


图2 TUNEL 染色检测心肌组织细胞凋亡检测 (TUNEL, $\times 400$)

A. A 组, 心肌细胞未见特异性凋亡; B. B 组, 心肌细胞未见特异性凋亡;
C. C 组, 可见许多特异性心肌细胞凋亡; D. D 组, 心肌细胞可见较少特异性凋亡

表1 AMI 致 HF 大鼠心肌细胞凋亡指数及 ghrelin 对其影响 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	假手术组 (B 组)	HF 模型组 (C 组)	HF + 人 ghrelin 组 (D 组)
AI	7.3 ± 1.5	$39.3 \pm 1.5^*$	31.3 ± 1.2

与 D 组比较, $^* P < 0.05$

讨 论

随着时代的进步和经济的快速发展,人们的生活发生着日新月异的变化,生活节奏的加快滋生了生活方式疾病,新的疾病谱也应运而生,人类的健康与保健意识、措施也在相应变化。一方面寿命延长,让中国逐步进入了老龄化社会,因 HF 是各种心脏疾病的终结归宿,其复杂性、严重性都注定了 HF 的治疗是一项耗费巨大的医疗支出;同时,出现了许多老年致命疾病发病年龄提前、发生率逐年升高的趋势。AMI 是最常见的危重心脏病,其发病年轻化且高发的趋势是现代直接危害中青年骨干人群健康的元凶^[1,7,8]。AMI 瞬间毙命的结局引起相当恶劣的社会效应,亟需医学工作者为中青年及老年人的 AMI 患病风险及早做出预警,并在发病后提供最有效的挽救生命的措施,因此,这是一个多元化需求的新医疗时代^[9]。所以,对 AMI 的预防、抢救的新攻略研究迫在眉睫。AMI 后心肌组织因缺血坏死不仅急剧加重原有心脏病病情导致心功能骤然下降至 HF,而且还因大面积心肌梗死直接诱发 HF,因此,AMI 可作为一种较理想的 HF 诱导方法^[10]。

多数研究避开雌雄性别差异而选择雄性为研究对象,但雄性对象研究结果并不能完全替代雌雄研究资料。有研究结果证明男性、女性在 AMI 乃至其后的 HF 发生率方面存在显著差异^[11]。GHRPs 及人和哺乳动物体内共有的天然生长素即 ghrelin,通过其广泛分布的心血管系统特异受体,发挥着生长激素-胰岛素轴以外的心血管保护效应,被视为新世纪最有前途的 HF 生物学治疗遴选药物^[12-15]。因此,亟需大

量实验研究全面阐述其心脏保护活性机制,然而,即使使用雌性大鼠研究 AMI 后 HF 观察的亦是大鼠天然生长素的作用,而缺少对人类天然生长素生物学效应及机制的实验资料,制约了人 ghrelin 作为 HF 生物学治疗新靶点应用于临床的步伐^[12]。

本实验即是通过较高位置结扎 LAD 使得成年雌性大鼠心功能急剧下降至 $<45\%$ 直接诱导 HF, HF 后大鼠心脏结构发生代偿性重构变化即心肌纤维化。本实验心肌组织 HE 染色结果证实了 AMI 后诱导的 HF 心脏发生结构重塑,显示了增加外源性的 GHRPs 即给人天然 ghrelin 能够减轻 HF 心脏的结构重塑;TUNEL 染色结果又复证明了 AMI 致 HF 后的心脏大量心肌细胞凋亡及人 ghrelin 抑制 HF 心脏心肌细胞凋亡的发生,与课题组前期完成的研究补充了 ghrelin 对 AMI、HF 大鼠的作用部分实验资料,为进入临床发挥 HF 生物学治疗作用提供有力佐证^[16];性别差异在 AMI 乃至 HF 病理进程中的差异及内源性 ghrelin 的变化有待于今后进一步研究,雄性大鼠 AMI 致 HF 模型及相关项目研究业已完成,二者之间的比较及其他实验数据发表待后续完成。

参考文献

- Altowajri A, Phillips CJ, Fitzsimmons D. A systematic review of the clinical and economic effectiveness of clinical pharmacist intervention in secondary prevention of cardiovascular disease [J]. *Manag Care Pharm*, 2013, 19(5):408-416
- Yunyun W, Tong L, Yingwu L, et al. Analysis of risk factors of ST-segment elevation myocardial infarction in young patients [J]. *BMC Cardiovasc Disorders*, 2014, 14:179-188
- Bowers CY, Momany F, Reynolds GA, et al. Structure activity relationships of a synthetic pentapeptide that specifically releases growth hormone in vitro [J]. *Endocrinology*, 1980, 106:663-667
- Howard AD, Feighner SD, Gully DF, et al. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release [J]. *Science*, 1996, 273:974-977
- Kojima M, Hosoda H, Date Y, et al. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach [J]. *Nature*, 1999, 402:656-660

- 6 陈晨, 孙强. 生长素的发现及研究进展[J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2009, 30(2): 131 - 136
- 7 White HD, Chew DP. Acute myocardial infarction. Lancet, 2008, 16; 372: 570 - 584
- 8 Fan GQ1, Fu KL1, Jin CW1, *et al.* A medical costs study of older patients with acute myocardial infarction and metabolic syndrome in hospital. Clin Interv Aging, 2015, 23(10): 329 - 337
- 9 Gambetti S, Fuca G, Bressan S, *et al.* Focal acute myocarditis mimicking ST - elevation myocardial infarction: a case report and literature review. Ital Cardiol (Rome). 2014, 15(11): 634 - 637
- 10 Haidara MA, Assiri AS, Z Yassin H, *et al.* Heart Failure Models: Traditional and Novel Therapy. Curr Vasc Pharmacol, 2015 Feb 12
- 11 Konstantino Y, Chen E, Hasdai D, *et al.* Gender differences in mortality after acute myocardial infarction with mild to moderate heart failure. Acute Card Care, 2007, 9(1): 43 - 47
- 12 Chunyan Yang, Zhonghui Liu, Kai Liu, *et al.* Mechanisms of Ghrelin anti - heart failure: inhibition of Ang II - induced cardiomyocyte apoptosis by down - regulating AT1R expression. PLoS One, 2014, 9(1): e85785
- 13 Ong H, Bodart V, McNicoll N, Lamontagne D, Bouchard JF. Binding sites for growth hormone - releasing peptide. Growth Horm IGF Res, 1998, 8: 137 - 140
- 14 CHEN Chen, 孙强. 生长素的发现及研究进展. 西安交通大学学报, 2009, 30(2): 131 - 136
- 15 Leite Moreira AF, Soares JB. Physiological, pathological and potential therapeutic roles of ghrelin [J]. Drug Discov Today, 2007, 12: 276 - 288
- 16 韩峰, 田国忠, 李梅秀. AMI 大鼠 Ghrelin 的变化及人 Ghrelin 对其影响[J]. 黑龙江医药科学, 2014, 37(3): 1 - 3

(收稿日期: 2015 - 02 - 14)

(修回日期: 2015 - 03 - 30)

基于红细胞溶血贫血探讨地中海贫血患者证候季节变化的生物学机制

褚娜利 张新华 方素萍 程艳玲 王文娟 吴志奎

摘 要 **目的** 从地中海贫血患者红细胞溶血贫血探讨证候季节变化及证候季节变化的生物学机制。**方法** 在夏季(7 月份)和冬季(11 月份)分别对 11 例中间型地中海贫血患者(5 例 α - 地中海贫血、6 例 β - 地中海贫血)的中医证候进行量化评分, 并检测患者血液参数[血红蛋白(Hb)、红细胞(RBC)、网织红细胞(Ret)]水平的差异。检测冬夏两个月份患者血清造血相关细胞因子[干细胞因子(SCF)、白介素 - 3(IL - 3)、促红细胞生成素(EPO)]的活性水平的差异; 检测冬夏两个月份红细胞抗氧化损伤指标[超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH - Px)]的活性水平的差异; 检测冬夏两个月份红细胞膜骨架蛋白[α - 收缩蛋白(SPTA1)、 β - 收缩蛋白(SPTB)、带 4.1 蛋白(EPB4.1)]基因表达的差异($P > 0.05$)。**结果** 冬季(11 月份)地中海贫血患者主要血液参数 Hb 水平显著高于夏季(7 月份)($P < 0.05$)。冬季(11 月份)地贫患者爪甲色淡、食少纳呆、潮热盗汗的中医证候量化评分显著低于夏季($P < 0.05$)。冬季(11 月份)红细胞抗氧化损伤指标 SOD、GSH - Px 活性显著低于夏季(7 月份)($P < 0.01$), MDA 的活性显著高于夏季(7 月份)($P < 0.01$)。冬季(11 月份)血清造血细胞因子 SCF、EPO 水平显著高于夏季(7 月份)($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), IL - 3 活性水平冬季(11 月份)显著低于夏季(7 月份)($P < 0.05$)。冬季(11 月份)地贫患者红细胞膜骨架蛋白 SPTA1 mRNA 的表达水平显著高于夏季(7 月份)($P < 0.05$), SPTB、EPB4.1 冬夏两个月份的 mRNA 的表达水平差异无统计学意义。**结论** 临床研究结果进一步证实了地中海贫血患者在气温高的季节(夏季)比气温低的季节(冬季)溶血贫血严重的客观规律。实验研究显示, 地中海贫血患者证候季节变化可能与冬夏两季红细胞膜骨架蛋白表达差异以及造血相关细胞因子和抗氧化损伤水平活性差异有关。但其是否为客观规律, 仍需进一步的探索。

关键词 地中海贫血 红细胞溶血贫血 证候季节变化 生物学机制

中图分类号 R259

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.07.013

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81173167); 国家重点基础研究发展计划(“973”计划)项目(2010CB530406)

作者单位: 100053 北京, 中国中医科学院广安门医院(褚娜利、方素萍、程艳玲、吴志奎); 530021 南宁, 中国人民解放军第 303 医院(张新华); 100069 北京, 首都医科大学(王文娟)

通讯作者: 吴志奎, 博士生导师, 电子信箱: gamwuzhikui@sina.com