

EPO 对同种异体心脏移植中供心保护作用的实验研究

杨学慧 伊 雪 王 帅 张卫红 李占清 邬鹏宇

摘 要 **目的** 通过建立同种异体心脏移植模型来探讨促红细胞生成素(EPO)预处理供受体对供心的保护作用及其可能机制。**方法** 健康雄性 SD 大鼠 60 只随机分成 3 组,每组 20 只。对照组:摘取供心前 30min 经尾静脉注射生理盐水 0.5ml;EPO 供体预处理组:供体摘取供心前 30min 经尾静脉注射 EPO 5000U/kg,受体不处理;EPO 受体预处理组:受体于移植前 30min 经尾静脉注射 EPO 5000U/kg,供体不处理。利用 4℃ HTK 液保存供心 16h 后建立大鼠同种腹腔心脏移植模型。观察手术成功情况并评价供心功能;移植后 8h 和 24h 采血化验;CK-MB 和 TnT 变化;移植 24h 后处死大鼠取供心留取组织标本检测;SOD 和 LPO 的活性;SABC 法检测组织中 caspase-3 蛋白表达;Tunel 法评价心肌细胞凋亡。**结果** 供心全部成功复跳,并存活到实验结束;EPO 预处理组心功能较对照组明显改善($P < 0.05$);移植 8h,供、受体预处理组 CK-MB、TnT 均显著低于对照组($P < 0.05$),移植 24h 供体预处理组 CK-MB、TnT 及受体预处理组 CK-MB、TnT 低于对照组($P < 0.05$);供、受体预处理组间各指标比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。移植后 8、24h 组内比较,移植后 24h 两组各指标均显著低于 8h($P < 0.05$)。心肌组织中 SOD 和 LPO 活性;供受体预处理组 SOD 活性明显高于对照组,LPO 活性显著低于对照组($P < 0.05$);供、受体预处理组间比较无统计学差异($P > 0.05$)。EPO 预处理组心肌组织中细胞凋亡指数分别为: 3.36 ± 0.36 、 3.48 ± 0.22 明显低于对照组 3.21 ± 0.50 ,差异有统计学意义($P < 0.05$)。EPO 供体预处理组细胞凋亡指数与受体预处理组(3.36 ± 0.36 vs 3.48 ± 0.22)相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。供、受体预处理组 caspase-3 蛋白表达量均低于对照组($P < 0.05$),但受体预处理组 caspase-3 蛋白表达量高于供体预处理组($P < 0.05$)。**结论** EPO 预处理供受体可通过减少氧自由基产生,提高氧自由基清除能力,抑制心肌细胞凋亡来发挥保护供心作用,提高移植心脏功能。

关键词 同种异体心脏移植 促红细胞生成素 缺血再灌注损伤 细胞凋亡

中图分类号 R654

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.09.021

Experimental Study of Effect of EPO on Donor Heart Preservation in Allogeneic Heart Transplantation. Yang Xuehui, Yi Xue, Wang Shuai, et al. Department of Cardiothoracic Surgery, The Affiliated Hospital of Hebei United University, Hebei 063000, China

Abstract **Objective** To establish the model of cardiac allograft to explore erythropoietin (EPO) pretreatment of donor and receptor and study the protective effect on donor heart and its possible mechanism. **Methods** Sixty healthy male SD rats were randomly divided into 3 groups, with 20 rats in each group. In normal group, 0.5ml normal saline was infused via caudal vein at 30min before donor harvesting. In donor preconditioning group, EPO (5000U/kg) was infused via caudal vein at 30min before donor harvesting, but no treatment in recipients. And in recipient preconditioning group, EPO (5000U/kg) was infused via caudal vein at 30min before recipient transplantation, but no treatment in donors. The donor was preserved in HTK solution after 16h. The model of allogeneic heart transplantation was established in abdominal cavity in rat. Blood was drawn at 8 and 24h after reperfusion for analysis of CK-MB, TnT as markers of graft injury. The rats were killed after 24h transplantation. The heart specimens collected for detecting myocardial tissue was harvested to determine the superoxide dismutase (SOD) and lipid hydroperoxide (LPO) activity at 24 hours after reperfusion. Graft active caspase-3 protein expression was measured by immunohistochemistry staining, and apoptosis index (AI) was calculated by TUNEL. **Results** The hearts can successfully jump, and survive to the end of the experiment. heart function EPO pretreatment group of was better than that of control group ($P < 0.05$). The serum levels of CK-MB and TnT in donor and recipient preconditioning groups were significantly lower than those in control group at 8 hours after reperfusion ($P < 0.05$). The levels of CK-MB and TnT in donor preconditioning group and the levels of CK-MB and TnT in recipient preconditioning group were significantly lower than those in control group at 24 hours ($P < 0.05$), and no significant difference was found between donor and recipient preconditioning groups ($P > 0.05$). The levels of CK-MB and TnT at 24 hours were significantly lower than those at 8 hours in each group ($P < 0.05$). SOD activity in donor/receptor preconditioning group was

基金项目:唐山市科技局项目(12140209A-22)

作者单位:063000 唐山,河北联合大学附属医院心胸外科(杨学慧、王帅、张卫红、李占清、邬鹏宇);河北联合大学基础医学院病理系(伊雪)

通讯作者:邬鹏宇,副主任医师,电子信箱:wupengyu1977@163.com

significantly higher than that in the control group. The activity of LPO was significantly lower than the control group ($P < 0.05$). There is no significant difference between groups for pretreatment, receptor ($P > 0.05$). AI in EPO pretreatment groups were (3.36 ± 0.36) and (3.48 ± 0.22). They were significantly lower than those of the control group (3.21 ± 0.50) ($P < 0.05$). Pretreatment with EPO donor group, apoptosis index (3.36 ± 0.36) and receptor preconditioning group (3.48 ± 0.22) showed no significant difference ($P > 0.05$). Caspase-3 in recipient pretreatment group was significantly higher than that in donor preconditioning group and control group ($P < 0.05$). Caspase-3 protein expression in receptor preconditioning group was higher than that of donor pretreatment group ($P < 0.05$).

Conclusion EPO can protect the donor heart by reducing oxidative stress, and improving the ability of scavenging oxygen free radicals and inhibiting apoptosis and improving the function of donor heart.

Key words Allogeneic heart transplantation; Erythropoietin; Ischemia reperfusion injury; Apoptosis

对于各种原因导致的晚期心脏病,同种异体心脏移植是目前唯一确切有效的方法;供心数量、质量不足和保护效果不佳,是导致手术受限和影响术后早期心脏功能恢复及远期效果的主要因素。促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)是一种自体的内源性激素,经研究发现具有多种生物活性,对肝脏、肾脏、心脏、脑组织等多种组织器官具有保护作用^[1~3]。本实验旨在通过建立大鼠同种异体心脏模型给予 EPO 预处理供受体来观察其对供心的保护效果及可能机制,为临床心脏移植中供心保护提供新的思路。

材料与方法

1. 实验动物和主要试剂:同系健康雄性 SD 大鼠 8~10 周龄,清洁级,体质量 200~220g,作为供、受体,由河北联合大学实验动物中心提供。Leica Wild M650 显微镜(Leica 公司,德国);Anthos2010 分光光度计(Anthos 公司,奥地利);Genesys 10 μ V 分光光度计(Thermal Fisher Scientific INC Madison 公司,美国);脂质过氧化物(LPO)、超氧化物歧化酶(SOD)(南京建成生物工程研究所);PAS 染色试剂盒(DCS 公司,德国),caspase-3 抗体、免疫组化 ABC 试剂盒(广州达晖生物技术有限公司);TUNEL 试剂盒(广州达晖生物技术有限公司);重组促人红细胞生成素注射液(rhEPO)由山东阿华生物药业有限公司生产。

2. 实验分组:60 只健康的 Sprague-Dawley (SD)大鼠采用数字表法随机分成 3 组(每组供、受体各 10 只)。对照组:摘取供心前 30min 经尾静脉注射生理盐水 0.5ml;EPO 供体预处理组:摘取供心前 30min,供体经尾静脉注射 EPO5000U/kg,受体不处理;EPO 受体预处理组:受体于移植前 30min,经尾静脉注射 EPO5000U/kg,供体不处理。供心冷藏于 4℃ HTK 液 16h。

3. 建立动物模型:按照余思等^[4]方法建立大鼠同种异体异位心脏移植模型。供、受体均采用苯巴比妥钠(20mg/kg 体重)腹腔注射,氯胺酮(100mg/kg 体重)肌内注射。供心摘取后于 4℃ HTK 液保存 16h 后取出,将供心移植于受体腹腔内,分别行升主动脉与腹主动脉吻合,肺动脉与下腔静脉吻合,恢复供心血供,按摩至心脏复跳,关腹。供体手术时间 15~20min,受体移植时间控制在 30min。

4. 移植后观察指标:(1)一般状况:观察大鼠移植后成活情况。手术成功标准:移植后 8、24h 触摸腹部,大鼠心脏跳动正常。移植心脏功能:采用半定量方法评价移植心脏的功能^[5]。(2)心肌酶学:心脏移植后 8h 和 24h 分别经内眦静脉、腹腔静脉采血,离心,上清液采用全自动生化仪分析心肌酶学 CK-MB 和 TnT 的变化。(3)心肌组织 LPO、SOD 活性:移植后 24h 取各组小块左心室壁心肌组织置于 -80℃ 冰箱保存检测 LPO、SOD 活性,操作方法按照试剂盒说明进行。(4)心肌组织 caspase-3 表达:取各组相同部位左心室壁小块心肌组织块固定、脱水、包埋,用 SABC 法检测 caspase-3 表达,严格按说明书用操作;对动物实验分组不知情的实验者在光学显微镜下($\times 400$)对每组实验标本的免疫组化结果进行观察、图像分析。(5)TUNEL 法检测心肌细胞凋亡同时留取左心室壁心肌组织,石蜡包埋固定切片,操作按凋亡试剂盒说明书进行。光镜下随机选取 5 个高倍镜视野,计算 1000 个细胞中凋亡细胞所占百分比为凋亡指数(apoptotic index, AI)来表示细胞凋亡情况。

5. 统计学方法:采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析。数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK 检验;组内各时点间比较采用配对 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 移植心脏功能:EPO 预处理供体组、受体组移植心脏功能较对照组明显提高($P < 0.05$),EPO 预处理供体组及受体组移植心脏的功能比较差异无统计学意义,详见表 1。

2. 心肌酶学结果:移植后 8h,供、受体预处理组 CK-MB、TnT 均显著低于对照组($P < 0.05$),24h 时供体预处理组 CK-MB、TnT 及受体预处理组 CK-MB、TnT 低于对照组($P < 0.05$);供、受体预处理组间各指标比较差异均无统计学意义($P > 0.05$),详见表 1。

3. 心肌组织中 SOD 和 LPO 活性结果:供、受体预处理组心肌组织中 SOD 活性高于对照组,而 LPO 活性低于对照组($P < 0.05$),供、受体预处理组之间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),详见表 2。

表 1 移植后心脏功能评分及 8、24h 各组血清酶学检测 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	n	心脏功能评分	TnT(ng/ml)		CK-MB(U/L)	
			8h	24h	8h	24h
对照组	10	2.55 ± 0.35	50.51 ± 12.48	20.30 ± 4.10	2066.10 ± 415.08	1899.40 ± 331.20
EPO 供体组	10	3.89 ± 0.56 *	18.90 ± 5.24 *	8.06 ± 1.89 *	670.6 ± 98.62 *	200.20 ± 50.12 *
EPO 受体组	10	4.01 ± 0.39 *	20.92 ± 7.07 *	7.80 ± 0.77 *	710.20 ± 150.76 *	241.10 ± 34.40 *

与对照组比较, * $P < 0.05$

表 2 移植后 24h 各组 SOD、LPO 含量及 caspase-3 蛋白表达、心肌细胞 AI 检测 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	n	SOD(U/100mg)	LPO(nmol/mg)	TI(%)	caspase-3(OD)
对照组	10	2.38 ± 0.39	10.90 ± 2.28	3.21 ± 0.50	0.049 ± 0.003
EPO 供体组	10	4.57 ± 1.09 *	7.82 ± 1.56 *	3.36 ± 0.36 *	0.031 ± 0.016 *
EPO 受体组	10	2.00 ± 0.39 *	7.00 ± 2.26 *	3.48 ± 0.22 *	0.040 ± 0.012 *

与对照组比较, * $P < 0.05$

4. 心肌组织中凋亡指数和 caspase-3 的变化结果: EPO 预处理供受体组中 AI 与对照组相比均明显降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 供受体预处理组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。EPO 预处理供受体组中 caspase-3 表达与对照组相比均明显降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 受体预处理组 caspase-3 蛋白表达量高于供体预处理组 ($P < 0.05$), 详见表 2。

讨 论

在临床心脏移植中取决于手术成败的关键是供心的功能及免疫排斥反应的有效抑制。而供心的功能主要取决于如何有效减轻移植前热缺血、随后的冷缺血损伤及移植后再灌注损伤。而心肌的热冷缺血导致能量代谢障碍及再灌注损伤时导致大量氧自由基产生, 同时能量代谢异常导致氧自由基清除能力下降, 最终导致氧自由基大量的堆积。氧自由基导致细胞膜内不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应, 膜结构受到破坏, 通透性增加, 细胞内钙离子超载, 线粒体通透性增加, 进而加重缺血心肌损伤及功能障碍^[6-8]。TnT、CK-MB 是反映心肌损伤程度的指标^[9]。LPO 是组织内脂质过氧化反应的产物, 可以反映心肌细胞受自由基损伤的严重程度; SOD 是体内清除氧自由基的首要物质, 测定其活力可以反应组织清除氧自由基的能力。因此, 笔者通过检测血清 TnT、CK-MB 来评价心肌损伤程度; 组织 SOD 活性能评价氧自由基的基含量清除能力, LPO 来评价脂质过氧化程度^[10]。

本实验研究结果显示, 缺血再灌注后对照组心肌 LPO 含量及血清 TnT、CK-MB 明显增高, 而 SOD 活性明显降低; EPO 预处理后与对照组相比 SOD 活性

明显升高, 血清学 TnT、CK-MB 降低。EPO 预处理通过降低氧化应激反应来减轻心肌缺血再灌注损伤^[11-13]。

细胞死亡有两种方式: 坏死和凋亡; 心肌缺血再灌注损伤可通过多种途径导致心肌细胞死亡, 其中坏死主要发生在缺血期, 再灌注损伤期以细胞凋亡为主, 主要影响早期心脏功能恢复。细胞凋亡是一种主动的程序性死亡过程, 目前认为细胞凋亡信号转导通路主要为线粒体/胱冬肽酶-9 (caspase-9) 和死亡受体/胱冬肽酶-8 (caspase-8) 两条途径, caspase-3 是他们共同的下游通路, 其中 caspase-3 的活化就意味着细胞死亡不可避免, 结果导致大量心肌细胞丢失和心脏功能受损^[14-16]。

本实验结果显示: 移植后 24h 供、受体预处理组 AI 显著低于对照组, 受体预处理组 caspase-3 蛋白表达显著低于对照组; 供体预处理组较受体预处理组 caspase-3 蛋白表达减少。表明 EPO 供、受体预处理对供体心脏保护均有效, 但 EPO 供体预处理效果优于受体预处理。其可能作用机制为 EPO 供体预处理主要是阻止移植前缺血引起的损伤及随后的再灌注损伤, 而受体预处理主要是减少再灌注后损伤。本实验结果也提示在缺血再灌注过程中, 凋亡和坏死细胞是可以被调控的。若早期积极干预减少细胞凋亡, 将对移植器官功能具有保护作用。

总之, EPO 预处理供受体可通过减少氧自由基产生, 提高氧自由基清除能力, 抑制心肌细胞凋亡来发挥保护供心作用, 提高移植心脏功能, 为临床心脏移植中供心保护提供一个新思路, 但其具体给药的最佳剂量及疗程来发挥最佳保护效果尚需进一步研究。

参考文献

- 1 Bogoyevitch MA. An update on the cardiac effects of erythropoietin cardioprotection by erythropoietin and the lessons learnt from studies in neutroprotection[J]. *Cardiovas Res*, 2004, 63 (2): 208 - 216
- 2 杨巍, 蔡彦, 梅育嘉, 等. 促红细胞生成素治疗急性心肌梗死的研究进展[J]. *中国全科医学*, 2010, 12(3): 1360 - 1363
- 3 Garg K, Yadav HN, Singh M, *et al.* Mechanism of cardioprotective effect of erythr - opoietin - induced preconditioning in rat heart[J]. *Indian J Pharmacol*, 2010, 42(4): 219 - 223
- 4 余思, 何晓顺, 马毅. 改良大鼠腹部心移植模型的制作[J]. *北京大学学报: 医学版*, 2008, 40(3): 327 - 329
- 5 Kuznetsov AV, Schneeberger S, Seiler R, *et al.* Mitochondrial defects and heterogeneous cytochrome C release after cardiac cold ischemia and reperfusion[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004, 286 (5): 1633 - 1641
- 6 张薇薇, 马康华. 心肌缺血再灌注损伤的研究进展[J]. *现代诊断与治疗*, 2012, 23(4): 250 - 252
- 7 陈旻, 明腾. 心肌缺血再灌注损伤机制的研究进展[J]. *山东医药*, 2014, 54(41): 98 - 100
- 8 赵冠聪. 氧自由基与心肌缺血再灌注损伤[J]. *医学信息*, 2013, 26 (2 上): 337 - 339
- 9 田毅, 柳培雨, 田国刚. 异氟醚和片托普利联合预处理对兔心肌缺血再灌注心肌酶学的影响[J]. *局解手术学杂志*, 2013, 5(22): 466 - 471
- 10 Bayram E, Atalay C. Identification of the culprit artery involved in inferior wall acute myocardial infarction using electrocardiographic criteria[J]. *Int Med Res*, 2004, 32(1): 392 - 411
- 11 Lu MJ, Chen YS, Huang HS, *et al.* Erythropoietin alleviates post - ischemic injury of rat hearts by attenuating nitrosative stress[J]. *Life Sci*, 2012, 90(19): 776 - 784
- 12 Talan MI, Latini R. Myocardial infarction: cardioprotection by erythropoietin[J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 9(82): 265 - 302
- 13 Shen Y, Wang Y, Li D, *et al.* Recombinant human erythropoietin pretreatment attenuates heart ischemia - reperfusion injury in rats by suppressing the systemic inflammatory response[J]. *Transplant Proc*, 2010, 42(5): 1595 - 1597
- 14 吴锦波, 吴平生. 心肌缺血/再灌注损伤与细胞凋亡[J]. *医学综述*, 2011, 17(19): 2961 - 2963
- 15 陈宇, 张露萍, 石艳葵, 等. 心肌缺血再灌注损伤时细胞凋亡的分子机制[J]. *西南军医*, 2012, 14(6): 888 - 891
- 16 孙宇, 陈建. 细胞凋亡与心肌缺血再灌注损伤研究[J]. *北华大学学报: 自然科学版*, 2009, 10(1): 34 - 45

(收稿日期: 2015 - 01 - 19)

(修回日期: 2015 - 02 - 03)

胃癌组织中 LKB1 和 VEGF - C 的表达及其意义

李利义 罗 越 周玲玲 林海鸿 卢明东 郑志强

摘 要 **目的** 探讨 LKB1 和 VEGF - C 在胃癌中的表达及临床意义。**方法** 应用免疫组化方法, 检测 LKB1 和 VEGF - C 在人胃癌组织中的表达, 同时对其与胃癌临床病理因素的关系进行统计学分析。**结果** LKB1 在胃癌组织中高表达率为 27.1%, 显著低于正常组织; VEGF - C 在胃癌组织中高表达率为 67.14%, 显著高于正常组织; 而且, LKB1 表达与 VEGF - C 表达呈显著负相关($r = 0.736, P = 0.000$)。胃癌组织中 LKB1 和 VEGF - C 的表达水平与肿瘤的组织分化程度、肿瘤浸润深度、淋巴结转移及 TNM 分期显著相关($P < 0.05$)。**结论** LKB1 和 VEGF - C 有望成为胃癌分子诊断和病期评估的标志之一。

关键词 LKB1 VEGF - C 胃癌 临床病理因素

中图分类号 R735

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.09.022

Expression of LKB1 VEGF - C in Gastric Cancer and Its Significance. Li Liyi, Luo Yue, Zhou Lingling, *et al.* Department of gastrointestinal surgery, The Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Zhejiang 325027, China

Abstract **Objective** To investigate the expression of LKB1 and VEGF - C in gastric cancer and its clinical significance. **Methods** The expression of LKB1 and VEGF - C in human gastric cancer were detected by immunohistochemistry. The relationship between expression of LKB1 and VEGF - C and the clinicopathological factors was statistically analyzed. **Results** The expression rate of LKB1 in gastric cancer was 27.1%, and it was significantly lower than that of normal tissue; The expression rate of VEGF - C in gastric cancer was 67.14%, and it was significantly higher than normal tissue. Meanwhile, the expression of LKB1 was negative consistent with the expression of VEGF - C ($r = 0.736, P = 0.000$). The expression levels of LKB1 and VEGF - C were closely correlated with histological cellular differentiation, invasion depth, lymph node metastasis and TNM stage ($P < 0.05$). **Conclusion** LKB1 and VEGF - C expressions may

基金项目:温州市科技计划基金资助项目(Y20130266)

作者单位:325027 温州医科大学附属第二医院育英儿童医院胃肠外科(李利义、罗越、林海鸿、卢明东、郑志强), 病理科(周玲玲)