DOI:10.7499/j.issn.1008-8830.2013.05.017

论著·实验研究

脊髓内 MAPK-ERK 通路在心肌缺血再灌注损伤中的作用

蒋萌　王霖　蒋海河

(中南大学湘雅医院心胸外科,湖南 长沙　410008)

[摘　要] **目的**　探讨脊髓内 MAPK-ERK 通路在幼年大鼠心肌缺血再灌注损伤中的作用。**方法**　将鞘内置管成功的 60 只 Sprague-Dawley(SD)幼年雄性大鼠(80~100 g)随机分为 3 组:假手术组($n=10$)、缺血再灌注组($n=25$)和 PD98059 组($n=25$)。假手术组实验前 30 min 鞘内注射 5 μL DMSO,开胸后冠状动脉左前降支备线但不结扎;缺血再灌注组于实验前 30 min 鞘内注射 5 μL DMSO,开胸后结扎冠状动脉左前降支上 1/3 段 30 min,再灌注 120 min;PD98059 组于实验前 30 min 鞘内注射 5 μL PD98059(5 μg),余处理同缺血再灌注组。实验结束后取 3 组大鼠 T1~T4 段脊髓,免疫荧光法检测 p-ERK 表达情况。取 3 组大鼠心脏,分别检测其心肌梗死面积和缺血交界区心肌凋亡指数。**结果**　缺血再灌注组大鼠脊髓内 p-ERK 表达水平显著高于假手术组和 PD98059 组($P<0.05$);PD98059 组心肌凋亡指数和心肌梗死面积均明显低于缺血再灌注组($P<0.05$),但仍高于假手术组($P<0.05$)。**结论**　上胸段脊髓内 MAPK-ERK 通路在心肌缺血再灌注损伤中激活,阻断该通路可以产生明显的心肌保护作用。

[中国当代儿科杂志,2013,15(5):387-391]

[关　键　词]　脊髓;p-ERK;PD98059;心肌缺血再灌注损伤;大鼠

Role of spinal MAPK-ERK signal pathway in myocardial ischemia-reperfusion injury

JIANG Meng, *WANG Lin*, *JIANG Hai-He*. *Department of Cardioathoracic Surgery*, *Xiangya Hospital of Central South University*, *Changsha* 410008, *China* (*Jiang H-H*, *Email*: *thoraxjiang@*126.*com*)

Abstract: **Objective**　To explore the role of spinal MAPK-ERK signal pathway in myocardial ischemia-reperfusion (I/R) injury. **Methods**　Sixty male Sprague-Dawley(SD) rats (80-100 g) were randomly divided into 3 groups: sham ($n=10$), PD98059 ($n=25$) and I/R groups ($n=25$). Three days after successful intrathecal implantation, 5 μg DMSO was injected intrathecally into the sham group, and then the left coronary arteries were separated without being tied. Rats in the I/R and PD98059 groups were injected with 5 μL DMSO and PD98059 (5 μg) 30 minutes before thoractomy respectively. Then the left coronary artery was tied for 30 minutes followed by 120 minutes of reperfusion. After the experiments, the ERK phosphorylation condition of T1-T4 spinal cord segments was detected with immunofluorescence; the myocardiac apoptosic index and infarct size were measured. **Results**　Expression of p-ERK in the I/R group was significantly higher than in the sham and PD98059 groups ($P<0.05$). Myocardial apoptotic index and infarct size in the PD98059 group were significantly lower than in the I/R group ($P<0.05$), but higher in the PD98059 group than in the sham group ($P<0.05$). **Conclusions**　The MAPK-ERK pathway in the superior thorathic spinal cord can be activated by myocardial ischemia-reperfusion and inhibition of the pathway can play a protective role in myocardial ischemia-reperfusion injury.

[**Chin J Contemp Pediatr**, **2013**, **15**(5):**387-391**]

Key words:　Spinal cord; p-ERK; PD98059; Myocardial ischemic-reperfusion injury; Rats

先天性心脏病是儿童常见疾病,严重影响患儿的生长发育,同时会造成极大的社会劳动力损失。手术是先天性心脏病的主要治疗手段,甚至是某些复杂先心病的唯一治疗方法。手术治疗不可避免地带来心肌缺血再灌注损伤,成为手术后严重并发症发生的重要诱因。研究表明,心肌缺血再灌注损伤的发生发展不仅与缺血心肌局部有关,同时也是一个全身性反应,尤其是神经体液因素在其中发挥着重要作用[1]。上胸段脊髓作为心脏交感神经传入传出的初级中枢,在心脏缺血再灌注损伤发生过程中的调节作用近些年来得到了一定重视。有研究显示,心肌缺血可以刺激上胸段脊髓活化,并释放具有

[收稿日期]2013-02-07;[修回日期]2013-03-18
[作者简介]蒋萌,女,硕士研究生。
[通信作者]蒋海河,主任医师。

多种生物学效应的肽类物质(如 P 物质),而抑制这些物质的表达可以对缺血再灌注产生保护作用[2-3]。提示上胸段脊髓可能通过改变其内某些物质的表达对心肌缺血再灌注损伤进行调节。大量研究表明,这种神经元活化导致的物质表达改变大多依赖 Ca^{2+} 内流[4-5]。内流的 Ca^{2+} 可以穿过核膜在核内发挥直接调节作用(这种作用极其有限);此外,Ca^{2+} 还可以通过活化胞浆内多种第二信使,发挥更为重要的间接调节作用[6]。在这些第二信使调控的下游通路中,MAPK-ERK 通路调节蛋白表达的作用最为广泛[7]。研究显示 Ca^{2+} 活化的多种信号分子(如 PKC、Ras、钙调素等)均最终通过激活 MAPK-ERK 通路改变基因表达,可以说该通路是间接作用的核心途径[6]。因此,本研究探讨脊髓内 MAPK-ERK 这一重要信号通路在幼年大鼠心肌缺血再灌注损伤中的作用。

1 材料与方法

1.1 动物模型及分组

1.1.1 上胸段脊髓鞘内置管模型 健康雄性 Sprague-Dawley(SD)大鼠(中南大学动物学部提供),体重 80 ~ 100 g,根据 Yaksh 等[8] 1976 年介绍的方法进行胸段鞘内置管。腹腔注射 10% 水合氯醛(300 mg/kg)麻醉,麻醉后在颈枕部备皮,70% 酒精消毒皮肤,在颈枕部做长约 0.3 cm 纵行切口,逐层分离颈部软组织,钝性分离枕骨大孔上的韧带及肌肉,小心挑破寰枕膜,暴露枕骨大孔,沿枕骨大孔向下轻柔置入 2 cm PE-10 导管。将导管固定在椎旁组织,逐层缝合伤口,伤口外留约 1 cm 导管用于鞘内注射。术后第 2 天及进一步实验前进行网屏实验[9],发现感觉运动明显受损则剔除实验。本研究中置管后出现明确神经功能损伤的大鼠共 8 只。所有实验结束后,鞘内注射 5 μL 美兰对导管进行定位,未进入预定位置及误入脊髓者,不进行统计学分析。

1.1.2 心肌缺血再灌注模型制作 选择鞘内置管成功的大鼠 60 只,置管 3 d 后行心肌缺血再灌注模型。腹腔注射 10% 水合氯醛(300 mg/kg)麻醉,麻醉后行气管插管,接小动物呼吸机,设置潮气量 2 mL/100 g,频率 60 ~ 80 次/min,吸呼比为 2∶1。用针形电极插入大鼠四肢皮下记录标准肢体 II 导联心电图。根据 Wong 等[10] 介绍的方法进行模型制作。备皮消毒后在胸骨左侧 0.3 cm 处第三、四肋间切开,分离肋间组织后剪断第三、四肋,打开心包,牵开切口,充分暴露心脏。5 - 0 无损伤缝合针穿过冠状动脉左前降支上 1/3 处,稳定 10 min 后进行实验。

1.1.3 动物分组 将上述 60 只大鼠编号后查随机数字表分为 3 组:(1)假手术组(10 只):实验前 30 min鞘内注射总容量为 5 μL 的 DMSO,冠状动脉左前降支备线但不结扎。(2)缺血再灌注组(25 只):实验前 30 min 鞘内注射总容量为 5 μL 的 DMSO,结扎冠脉左前降支,30 min 后开放,再灌注 120 min。(3) PD98059(ERK 磷酸化抑制剂)组(25 只):实验前 30 min 鞘内注射总容量为 5 μL(5 μg)的 PD98059,结扎冠脉左前降支,30 min 后开放,再灌注 120 min。

1.2 方法

1.2.1 脊髓免疫组织化学 实验结束后,将大鼠用 10% 水合氯醛深麻醉处死,取出所有 60 只大鼠 T1 ~ T4 脊髓节段(长约 2 cm)置于 4% 多聚甲醛中固定 24 h,然后转入 30% 蔗糖溶液,4℃过夜。于冰冻切片机上切片(30 μm),每间隔 10 张取一张切片,每只大鼠约得 6 张切片。于 0.01 M PBS 中洗涤后,5% 羊血清加 0.3% TritonX-100 室温孵育 30 min。将切片转移至兔抗 p-ERK 一抗(1∶300,Abcam,美国)中,4℃孵育过夜。PBS 清洗未结合的一抗,加入四甲基异硫氰酸罗丹明(FITC)标记的山羊抗兔 IgG 二抗(1∶50,Santa Cruz,美国),室温孵育 2 h。PBS 清洗后暗室晾干,甘油封片。荧光显微镜下照片,每张切片取 3 个视野计数视野内所有阳性染色细胞数目,取平均值进行统计学分析。

1.2.2 心肌梗死面积测定 实验结束后,取假手术组 5 只,缺血再灌注组及 PD98059 组各 10 只大鼠,处死取出心脏,置于 - 20 ℃冷冻,然后沿与房室沟平行方向将左心切为 1 mm 厚组织片,用溶于 PBS 的 1% 氯化三苯基四氮唑(TTC,Sigma-aldrich,美国)对组织片染色,然后在 4% 多聚甲醛中固定,贴片后随机取 5 张照相。应用 Image Pro-Plus 6.0 软件测量梗死区面积,计算梗死面积在整个心脏中的比例。

1.2.3 心肌凋亡检测和凋亡指数计算 假手术组大鼠 5 只,缺血再灌注组及 PD98059 组各 15 只大鼠,实验结束后处死取出心脏置于 4% 多聚甲醛中固定,常规石蜡包埋,在左心室缺血区交界3 mm处进行切片(4 μm),每只大鼠心脏取 5 张。依据 TUNEL 试剂盒(Roche Biochemicals,德国)说明书进行染色。用显微测微尺进行测量,40 倍目镜方格测微尺面积为 0.09 mm^2,每张切片取 5 个视野,每个视野取 1 个方格,计数每个方格内凋亡细胞数目。最终以单位面积内凋亡细胞数目作为凋亡指数值。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析，所有数据均以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，组间比较采用单因素方差分析，两组间比较采用 SNK-q 检验，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 心肌缺血再灌注损伤时脊髓内 ERK 的活化

假手术组大鼠上胸段脊髓内 p-ERK 表达较弱，缺血再灌注组在接受心肌缺血再灌注后脊髓内 ERK 活化明显增强，p-ERK 阳性染色细胞明显增加（$P<0.05$）。鞘内给予了 PD98059 的 PD98059 组大鼠脊髓内 p-ERK 表达程度明显受到抑制，与缺血再灌注组相比阳性细胞数明显下降（$P<0.05$），仅在背角浅层偶有表达。见图 1。

2.2 鞘内注射 PD98059 对缺血再灌注后心肌梗死面积的影响

假手术组大鼠心肌梗死面积较小，而缺血再灌注损伤后，鞘内注射 DMSO 的缺血再灌注组或 PD98059 的 PD98059 组大鼠，心肌梗死面积均明显大于假手术组（$P<0.05$）。但 PD98059 组大鼠心肌梗死面积较单纯注射 DMSO 的缺血再灌注组梗死面积小，差异具有统计学意义（$P<0.01$）。见图 2。

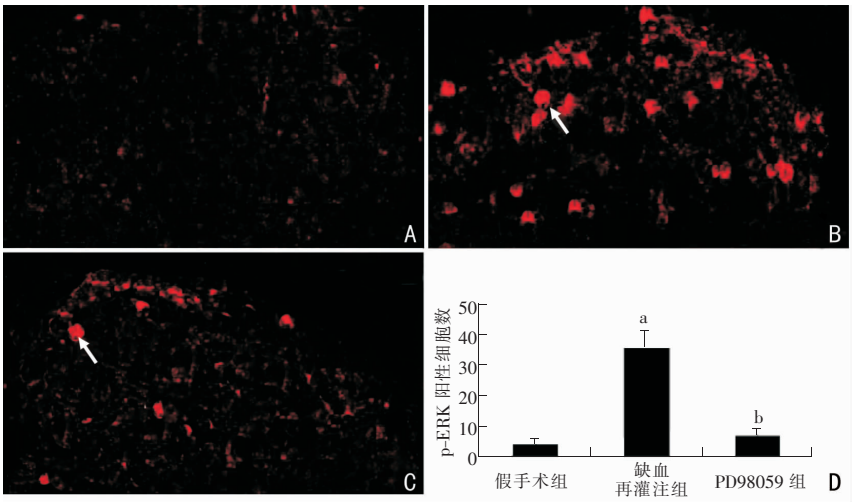

图 1 3 组大鼠上胸段脊髓内 p-ERK 的表达（FITC 染色，×100） A：假手术组（$n=10$）；B：缺血再灌注组（$n=25$）；C：PD98059 组（$n=25$）。B～C 图中白色箭头所示为 p-ERK 阳性染色细胞。D：3 组大鼠脊髓内 p-ERK 表达水平的柱状图。a：与假手术组相比，$P<0.05$；b：与缺血再灌注组相比，$P<0.05$。

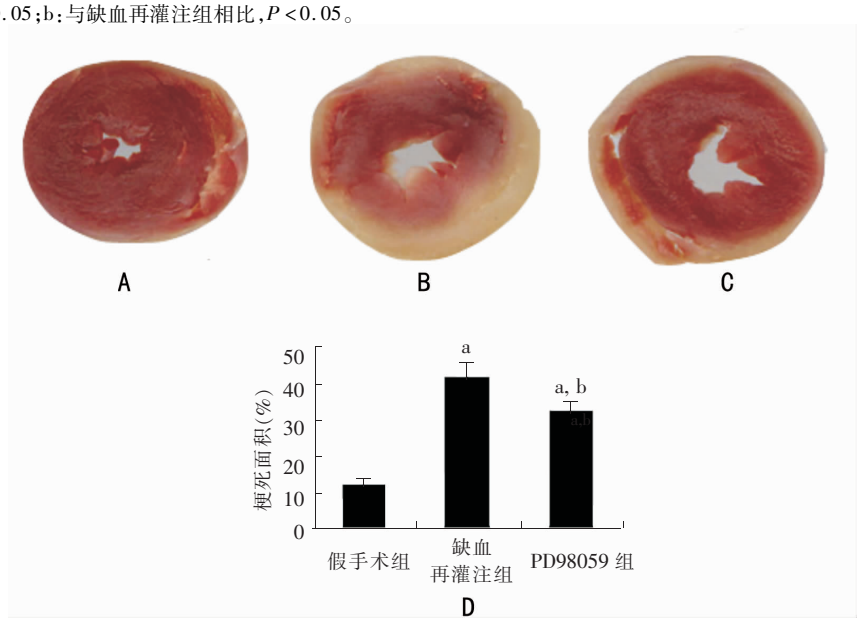

图 2 3 组大鼠心肌梗死面积比较 A：假手术组（$n=5$）；B：缺血再灌注组（$n=10$）；C：PD98059 组（$n=10$）。A～C 图为沿与房室沟平行方向的左心组织切片，梗死区域呈白色，非梗死区呈红色。与假手术组相比，经历了缺血再灌注的两组大鼠心脏梗死面积明显增加。D：3 组大鼠心肌梗死面积柱状图。a：与假手术组相比，$P<0.05$；b：与缺血再灌注组相比，$P<0.05$。

2.3 鞘内注射 PD98059 对缺血再灌注后心肌细胞凋亡和凋亡指数的影响

与心肌梗死面积类似，缺血再灌注组心肌细胞凋亡数量（30.4 ± 5.2）明显高于假手术组（3.2 ± 0.6，$q = 3.53$，$P < 0.05$），而 PD98059 组（24.3 ± 4.1）与缺血再灌注组相比，凋亡细胞明显减少（$q = 4.12$，$P < 0.05$），但仍高于假手术组（$q = 3.36$，$P < 0.05$）。经统计心肌凋亡指数与凋亡细胞变化趋势一致。见图 3。

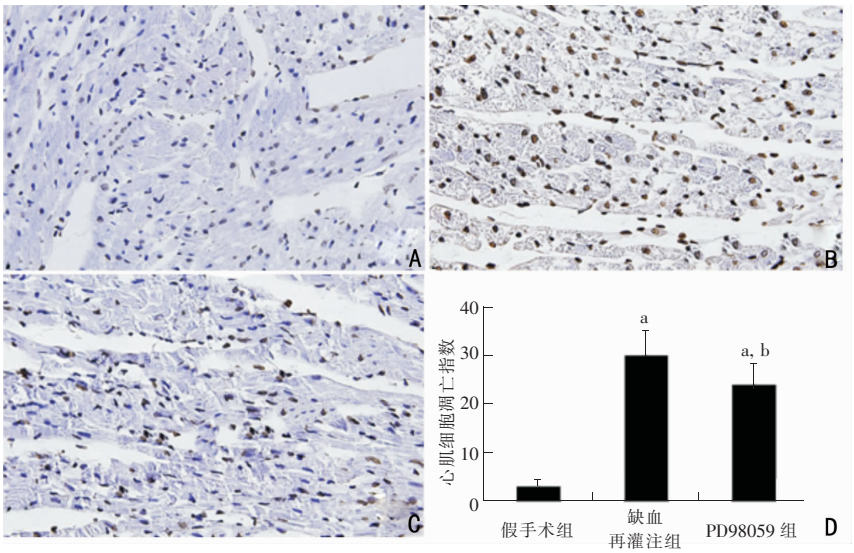

图 3　3 组大鼠心肌细胞凋亡情况（TUNEL 染色，×100）　A：假手术组（$n = 5$）；B：缺血再灌注组（$n = 15$）；C：PD98059 组（$n = 15$）。A ~ C 图中 TUNEL 染色标示的凋亡细胞核呈棕色，而未凋亡的正常细胞染色为蓝色。D：3 组大鼠心肌细胞凋亡指数柱状图。a：与假手术组相比，$P < 0.05$；b：与缺血再灌注组相比，$P < 0.05$。

3　讨论

先天性心脏病的发病率较高，约为 1%[11]，其中手术是先心病的主要治疗措施。大多数先心病患儿需要在体外循环下开展手术治疗，且复杂先心病的手术需要较长时间的体外循环，不可避免地造成心肌缺血再灌注损伤，大大增加了先心病手术后并发症的发生率和死亡率。心肌缺血再灌注损伤的定义为心脏缺血后，在再灌注开始时尚存活的心肌细胞由血流再通时的一个或多个事件直接造成的细胞死亡[12]。目前，关于缺血再灌注损伤的认识集中于能量耗竭、离子蓄积、氧自由基损伤、凋亡与自噬、血管内皮功能障碍和免疫活化等多种机制[13]，但这些机制均只关注了缺血心脏局部变化。事实上，缺血再灌注损伤也是一个全身参与的过程，尤其是神经体液因素在其中发挥了重要作用。

上胸段脊髓是心脏交感神经传入纤维和传出纤维的初级中枢，研究发现脊髓在心肌缺血再灌注损伤过程中可能发挥着重要的调控作用。心肌缺血会活化迷走神经和心肌缺血敏感的交感传入神经元（cardiac ischemia-sensitive afferent neuron，CISAN），CISAN 神经元胞体存在于 C8 ~ T9 脊髓节段的背根神经节内，主要集中在 T2 ~ T6 脊髓节段内[14]。激活的 CISAN 神经元将神经冲动通过突触传递给脊髓内的次级神经元，导致次级神经元内 Ca^{2+} 通道的开放，Ca^{2+} 大量内流。内流的 Ca^{2+} 通过直接和间接两种途径使神经元内基因表达发生改变。其中 Ca^{2+} 通过活化下游蛋白激酶级联反应改变基因表达的机制更为重要。在磷酸化的级联反应中，MAPK 通路处于中心位置，是近些年来研究得较多和较为透彻的信号通路。MAPK 的活化可以使其下游底物发生磷酸化，这些底物包括 ERK1/2、JNK、p38 和 ERK5。其中 ERK1/2 在突触可塑性、学习记忆和疼痛等多种病理生理过程中发挥广泛作用，是 MAPK 最为重要的底物。研究表明神经元活化标记物 c-fos 蛋白在大鼠心肌缺血后上胸段脊髓内表达上升[15]，而 c-fos 的表达很大程度上是 MAPK-ERK 信号途径激活的结果[16]，因此这直接提示心肌缺血可能使得 MAPK-ERK 信号途径活化。

p-ERK 是 ERK 的活化状态，可以进入细胞核内，使得细胞核内的转录调节因子 CREB 发生磷酸化，p-CREB 与基因的调控区域结合，促进基因转录。研究显示，短暂的冠状动脉结扎会导致大鼠 T4 脊髓内板层 I ~ VII 的 P 物质表达明显增加[17]，而抑

制脊髓内 P 物质表达或增加强啡肽 A 表达可以使心肌缺血再灌注损伤减小[18-19]。脊髓内这两种物质的表达均与 MAPK-ERK 通路相关,这些均说明心肌缺血发生后可能通过 MAPK-ERK 通路使脊髓神经细胞内相关物质表达增加,这些增加了的物质通过神经调节,或者运输到心肌细胞内对缺血心肌进行调控,促进其凋亡或死亡。而恰当地对该机制进行调节则可能起到心肌保护的作用。

尽管这些结果均在成年大鼠研究中得出,但神经反射及脊髓发育在幼年期即已建立,并不断完善,因此我们推测这些机制可能也在幼年大鼠中不同程度地存在。本实验希望阐明上胸段脊髓内 MAPK-ERK 信号途径在幼年大鼠心肌缺血再灌注中的作用。结果发现,缺血再灌注损伤发生后,幼鼠上胸段脊髓内 p-ERK 表达明显高于假手术组,即缺血再灌注使上胸段脊髓 ERK 通路发生了活化。ERK 磷酸化抑制剂有两种,U0126 和 PD98059,前者通过抑制 MAPK 的作用,从而抑制其下游多个信号分子的活化,而后者则较有选择性地抑制 ERK 的磷酸化,更具特异性。本研究鞘内注射 PD98059 专一地抑制 MAPK-ERK 通路,发现应用该抑制剂后明显抑制了上胸段脊髓 ERK 的活化程度,同时心肌缺血再灌注损伤造成的心肌梗死面积及心肌细胞凋亡指数均明显下降,即抑制了缺血再灌注对心肌的损伤作用。

综上所述,脊髓 MAPK-ERK 通路参与了幼鼠心肌缺血再灌注损伤的发生发展,而研究脊髓在心肌缺血后发生的变化,能够为我们在临床上进行有效的心肌保护提供另一个新途径。

[参 考 文 献]

[1] Remme WJ, Kruyssen DA, Look MP, Bootsma M, de Leeuw PW. Systemic and cardiac neuroendocrine activation and severity of myocardial ischemia in humans[J]. J Am Coll Cardiol, 1994, 23(1): 82-91.

[2] Hua F, Ricketts BA, Reifsteck A, Ardell JL, Williams CA. Myocardial ischemia induces the release of substance P from cardiac afferent neurons in rat thoracic spinal cord[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004, 286(5): H1654-H1664.

[3] Odenstedt J, Linderoth B, Bergfeldt L, Ekre O, Grip L, Mannheimer C, et al. Spinal cord stimulation effects on myocardial ischemia, infarct size, ventricular arrhythmia, and noninvasive electrophysiology in a porcine ischemia-reperfusion model[J]. Heart Rhythm, 2011, 8(6): 892-898.

[4] Bading H. Transcription-dependent neuronal plasticity the nuclear calcium Hypothesis[J]. Eur J Biochem, 2000, 267(17): 5280-5283.

[5] Hardingham GE, Chawla S, Johnson CM, Bading H. Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression[J]. Nature, 1997, 385(6613): 260-265.

[6] Wiegert JS, Bading H. Activity-dependent calcium signaling and ERK-MAP kinases in neurons: a link to structural plasticity of the nucleus and gene transcription regulation[J]. Cell Calcium, 2011, 49(5): 296-305.

[7] Ji RR, Gereau RW, Malcangio M, Strichartz GR. MAP kinase and pain[J]. Brain Res Rev, 2009, 60(1): 135-148.

[8] Yaksh TL, Rudy TA. Chronic catheterization of the spinal subarachnoid Space[J]. Physiol Behav, 1976, 17(6): 1031-1036.

[9] 师存伟. 椎管内置入不同型号的导管对大鼠运动感觉功能及脊髓超微结构的影响[J]. 青海医学院学报, 2007, 28(3): 187-191.

[10] Wong GT, Yao L, Xia Z, Irwin MG. Intrathecal morphine remotely preconditions the heart via a neural pathway[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2012, 60(2): 172-178.

[11] 杨江帆, 许月珍, 李萍, 杨戎威. 新生儿先天性心脏病患病率的调查和孕妇增补叶酸的预防效果[J]. 中国当代儿科杂志, 2000, 2(5): 320-322,325.

[12] Kaplan JA, Reich DL, Savino JS. Kaplan's Cardiac Anesthesia: The Echo Era[M]. 6th ed. Missouri: Elsevier Saunders, 2011: 3.

[13] Turer AT, Hill JA. Pathogenesis of myocardial ischemia-reperfusion injury and rationale for therapy[J]. Am J Cardiol, 2010, 106(3): 360-368.

[14] Kuo DC, Oravitz JJ, DeGroat WC. Tracing of afferent and efferent pathways in the left inferior cardiac nerve of the cat using retrograde and transganglionic transport of horseradish peroxidase[J]. Brain Res, 1984, 321(1): 111-118.

[15] Hua F, Harrison T, Qin C, Reifsteck A, Ricketts B, Carnel C, et al. cFos expression in rat brainstem and spinal cord in response to activation of cardiac ischemia-sensitive afferent neurons and electrostimulatory modulation[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004, 287(6): H2728-H2738.

[16] O'Donnell A, Odrowaz Z, Sharrocks AD. Immediate-early gene activation by the MAPK pathways: what do and don't we know[J]. Biochem Soc Trans, 2012, 40(1): 58-66.

[17] Ding X, Ardell JL, Hua F, McAuley RJ, Sutherly K, Daniel JJ, et al. Modulation of cardiac ischemia-sensitive afferent neuron signaling by preemptive C2 spinal cord stimulation: effect on substance P release from rat spinal cord[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2008, 294(1): R93-R101.

[18] Hua F, Ricketts BA, Reifsteck A, Ardell JL, Williams CA. Myocardial ischemia induces the release of substance P from cardiac afferent neurons in rat thoracic spinal cord[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004, 286(5): H1654-H1664.

[19] Ding X, Hua F, Sutherly K, Ardell JL, Williams CA. C2 spinal cord stimulation induces dynorphin release from rat T4 spinal cord: potential modulation of myocardial ischemia-sensitive neurons[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2008, 295(5): R1519-R1528.

(本文编辑:周勇)