

心脉隆对窒息新生鼠心肌缺氧诱导因子-1α的影响

黄锂新¹, 吴星恒²

(南昌大学 1. 研究生院医学部 2006 级; 2. 第一附属医院儿科, 江西 南昌 330006)

[摘要] 目的 心脉隆是从昆虫类美洲大蠊中提取和制备的化合物,主要用于心血管疾病的治疗。该文研究心脉隆对窒息新生鼠心肌缺氧诱导因子-1α(HIF-1α)与血浆内皮素 1(ET-1)的影响,探讨心脉隆对心肌缺氧缺血性损伤的保护机制。方法 新生 7 日龄 Sprague-Dawley 大鼠随机分为假手术组($n=30$)、窒息组($n=30$)、心脉隆组($n=30$)。每组再分 6 h, 24 h, 72 h 3 个时间点,每个时间点各 10 只,心脉隆组在进行窒息前 5 min 给予心脉隆注射液 5 mg/kg 腹腔注射。检测新生鼠心肌的 HIF-1α, ET-1, 心肌酶 CK 及心肌组织病理学。结果 窒息组 4 只鼠死亡,心脉隆组 1 只鼠死亡。窒息组心肌 HIF-1α 的表达与血浆 ET-1 水平于 6 h 升高, 24 h 达到高峰, 72 h 下降,均高于假手术组($P<0.01$); 3 个时间点均可见心肌缺血, 24 h 还可见细胞坏死; HIF-1α 的表达与血浆 ET-1 水平呈正相关($r=0.876, P<0.01$)。与窒息组同时时间点比较,心脉隆组心肌酶 CK、血浆 ET-1 的水平和心肌 HIF-1α 的表达均显著减低($P<0.01$),且可见心肌缺血改善,未见细胞坏死。结论 窒息时心肌 HIF-1α 表达和血浆 ET-1、CK 水平升高;心脉隆可降低 HIF-1α 表达,降低血浆 ET-1 的水平,减轻心肌缺氧缺血性损伤。

[中国当代儿科杂志, 2009, 11(8): 683-686]

[关键词] 心脉隆; 缺氧缺血性心肌损伤; 缺氧诱导因子-1α; 内皮素 1; 新生大鼠
[中图分类号] R-33 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2009)08-0683-04

Effect of Xinmailong on hypoxia-inducible factor-1α expression in neonatal rats with asphyxia

HUANG Li-Xin, WU Xing-Heng. 2006 Grade of Medical Department, Graduate School, Nanchang University, Nanchang 330006, China (Wu X-H, Email: wxh0709@163.com)

Abstract: Objective Xinmailong, a compound extracted from periplaneta americana, is used for the treatment of cardiovascular diseases. This study investigated the effects of Xinmailong on myocardial hypoxia-inducible factor-1α (HIF-1α) and plasma endothelin-1 (ET-1) levels in neonatal rats with asphyxia and explored the protection mechanism of Xinmailong in hypoxia-ischemic myocardial injury. **Methods** Seven-day-old Sprague-Dawley rats were randomly divided into three groups ($n=30$ each): sham-operated, asphyxia, Xinmailong-treated asphyxia. Each group was randomly subdivided into three groups according to the observed time points: 6 hrs, 24 hrs and 72 hrs. Xinmailong (5 mg/kg) was intraperitoneally injected to the rats in the Xinmailong-treated group five minutes before asphyxia. Myocardial HIF-1α expression, and plasma ET-1 and creatine kinase (CK) levels were measured. The histopathologic changes of the myocardium were observed by hematoxylin-eosin staining. **Results** Four rats died in the asphyxia group while only one died in the Xinmailong-treated group during the experiment. The plasma ET-1 and CK levels as well as myocardial HIF-1α expression increased at 6 hrs, reached a peak at 24 hrs, and declined at 72 hrs after asphyxia in the asphyxia group, being higher than that in the sham-operated group ($P<0.01$). Myocardial ischemia was observed in the three time points, and cell necrosis occurred at 24 hrs after asphyxia in the asphyxia group. Myocardial HIF-1α expression was positively correlated with plasma ET-1 levels ($r=0.876, P<0.01$). In the Xinmailong-treated group, plasma levels of CK and ET-1 as well as myocardial HIF-1α expression were significantly lower than those in the asphyxia group ($P<0.01$). Myocardial ischemia was alleviated and no cell necrosis was found in the Xinmailong-treated group. **Conclusions** Asphyxia leads to increase in myocardial HIF-1α expression and plasma levels of ET-1 and CK. Xinmailong can reduce the myocardial expression of HIF-1α and decrease plasma ET-1 levels, thus alleviating hypoxia-ischemic myocardial injury.

[Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11(8): 683-686]

Key words: Xinmailong; Hypoxic-ischemic myocardial injury; HIF-1α; ET-1; Neonatal rats

[收稿日期] 2009-01-07; [修回日期] 2009-02-13
[作者简介] 黄锂新, 男, 硕士, 医师。主攻方向: 小儿心血管系统疾病。
[通讯作者] 吴星恒, 女, 教授, 南昌大学第一附属医院儿科, 邮编: 330006。

心脉隆是从昆虫类美洲大蠊中提取和制备的化合物,其有效成分为核苷类;主要用于心血管病的治疗^[1],其毒副作用轻,具有强心、升压、改善微循环,兴奋呼吸、增加冠脉流量、肾血流量和利尿作用。缺氧缺血性心肌损伤是儿科疾病的常见并发症,为探索防治缺氧缺血性心肌损害的新药物和途径,本研究利用窒息新生鼠模型,观察心脉隆对新生鼠窒息后心肌 HIF-1 α 的表达、血浆 ET-1 的水平及心肌酶肌酸激酶(CK)的影响,从而探讨心脉隆对心肌缺氧缺血性损害是否具有保护作用及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

健康清洁级 7 日龄新生 Sprague-Dawley 大鼠,雌雄各半,体重 10 ~ 15 g,由南昌大学医学院动物部提供。随机分为假手术组($n = 30$)、窒息组($n = 30$)、心脉隆治疗组(心脉隆组, $n = 30$)。各组再分 6,24,72 h 3 个时间点,每个时间点各 10 只。

1.2 新生鼠常压窒息模型

将动物分别置于容积为 55 mL 的磨口瓶中(内装 5 g 钠石灰),待动物安静后,窒息组塞紧瓶塞密闭 30 min,之后立即复氧 120 min^[2]。对照组模拟该过程不塞瓶塞、不复氧。

1.3 心脉隆组治疗方法

窒息前 5 min 给予心脉隆 5 mg/kg 腹腔注射。药物购于云南腾冲药业,产品批号 070925。

1.4 心肌酶 CK 测定

各组新生鼠分批腹腔麻醉后开胸,取心脏血 0.3 mL,高速离心,取血浆 0.1 mL 于全自动生化分析仪(Olympus)上测定 CK。

1.5 内皮素 ET-1 测定

试剂盒购于北京福瑞生物工程公司,各组新生鼠分批腹腔麻醉后开胸,取心脏血 0.6 mL,高速离心,取血浆 0.2 mL 于自动放免仪(中国科大中佳公司)上测定 ET-1。

1.6 心肌组织病理学检查

将甲醛充分固定好的心肌组织冠状切片,取心尖部组织,常规脱水及石蜡包埋、切片、脱蜡、透明、

苏木精-伊红染色、光镜下观察。

1.7 HIF-1 α 免疫组织化学操作方法

按照 HIF-1 α 免疫组织化学试剂盒(北京博奥森生物技术有限公司)进行 HIF-1 α 免疫组织化学操作。采用显微照相系统(Olympus),通过光镜放大 10 $\times$ 40 倍,在曝光、放大倍数、亮度等条件均一致的情况下对每张免疫组化片随机选取 5 个视野采集图像,输入图像分析系统内(Imagepro-Plus),测定其阳性染色积分光密度(IOD)。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学处理。数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析,组内比较采用 q 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有显著性。在进行 HIF-1 α 与 ET-1 相关分析时,采用 Pearson 相关分析。

2 结果

2.1 窒息后新生鼠的一般情况

磨口瓶密闭后,新生鼠逐渐出现烦躁、躁动,呼吸心跳加快,继而抽搐、皮毛变灰、唇及甲床逐渐紫绀,实验近结束时动作减少,几乎不动,呼吸减慢。复氧后新生鼠逐渐恢复,但懒动、少吃。假手术组、心脉隆组 6 h 组和 72 h 组无死亡鼠,窒息组 6 h,24 h,72 h 和心脉隆组 24 h 死亡鼠数分别为 1,2,1 和 1 只。

2.2 各组新生鼠血浆 CK 值变化

假手术组各时间点 CK 值无明显变化($P > 0.05$),窒息组与心脉隆组 CK 值均于 6 h 升高,24 h 达到高峰,72 h 下降(仍高于 6 h),各时间点显著高于假手术组($P < 0.01$)。心脉隆组 CK 值在 6 h,24 h,72 h 虽高于假手术组($P < 0.01$),但显著低于同时间段窒息组($P < 0.01$),见表 1。

2.3 新生鼠血浆 ET-1 浓度

假手术组各时间点 ET-1 浓度无明显变化($P > 0.05$),窒息组与心脉隆组 ET-1 值均于 6 h 升高,24 h 达到高峰,72 h 下降(仍高于 6 h),各时间点显著高于假手术组($P < 0.01$)。心脉隆组 ET-1 值在 6 h,24 h,72 h 虽高于假手术组($P < 0.01$),但显著低于同时间段窒息组($P < 0.01$),见表 2。

表 1 各组新生鼠血浆 CK 值比较 ($\bar{x} \pm s, U/L$)

分组	鼠数	6 h	鼠数	24 h	鼠数	72 h
假手术组	10	59.90 $\pm$ 6.15	10	57.90 $\pm$ 6.21	10	58.60 $\pm$ 7.28
窒息组	9	292.56 $\pm$ 8.05 ^a	8	1125.63 $\pm$ 10.60 ^{a,c}	9	405.56 $\pm$ 6.31 ^{a,c,d}
心脉隆组	10	162.10 $\pm$ 7.29 ^{a,b}	9	867.56 $\pm$ 10.17 ^{a,b,c}	10	318.90 $\pm$ 7.81 ^{a,b,c,d}

a:与假手术组比较, $P < 0.01$; b:与窒息组比较, $P < 0.01$; c:与同组 6 h 比较, $P < 0.01$; d:与同组 24 h 比较, $P < 0.01$

表 2 各组新生鼠血浆 ET-1 浓度比较 (x̄ ± s, pg/mL)

分组	鼠数	6 h	鼠数	24 h	鼠数	72 h
假手术组	10	5.37 ± 2.74	10	7.30 ± 3.72	10	6.11 ± 3.42
窒息组	9	18.46 ± 5.69 ^a	8	36.67 ± 4.88 ^{a,c}	9	23.53 ± 5.52 ^{a,c,d}
心脉隆组	10	13.35 ± 4.16 ^{a,b}	9	29.60 ± 3.32 ^{a,b,c}	10	19.08 ± 3.28 ^{a,b,c,d}

a:与假手术组比较, $P < 0.01$; b:与窒息组比较, $P < 0.01$; c:与同组 6 h 比较, $P < 0.01$; d:与同组 24 h 比较, $P < 0.01$

2.4 HIF-1α 免疫组化染色与光密度值 (IOD) 结果

假手术组 HIF-1α 表达低,胞核和胞浆呈蓝色,窒息 24 h 组可见胞浆和胞核染成棕褐色,其他组可见胞浆和胞核染成淡黄色和浅棕色(图 1A ~ C)。假手术组各时间点 IOD 值无明显变化($P > 0.05$),

窒息组与心脉隆组 IOD 值均于 6 h 升高,24 h 达到高峰,72 h 下降(仍高于 6 h),各时间点显著高于假手术组($P < 0.01$)。心脉隆组 IOD 值在 6 h,24 h,72 h 虽高于假手术组($P < 0.01$),但显著低于同时时间段窒息组($P < 0.01$),表 3。

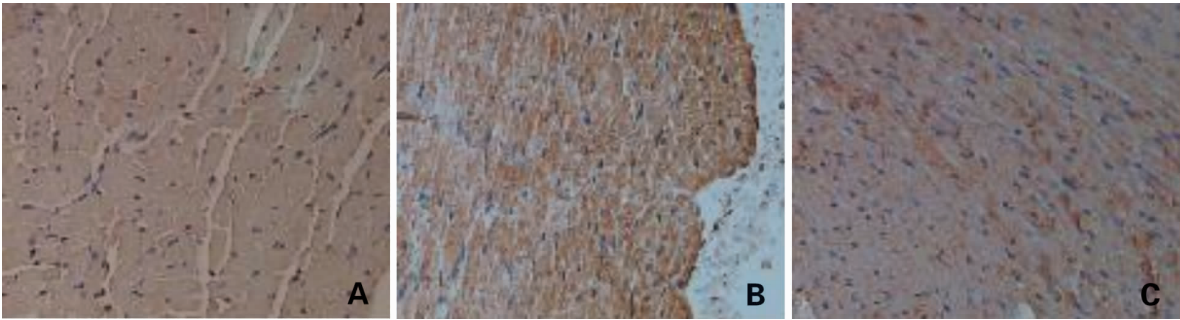


图 1 心肌 HIF-1α 免疫组化染色 A:假手术组 24 h 胞浆和胞核均呈蓝色,无阳性染色; B:窒息组 24 h 胞浆和胞核呈棕褐色阳性染色; C:心脉隆组 24 h 部分胞浆和胞核呈浅棕色或淡黄色。

表 3 各组新生鼠新心肌组织 HIF-1α 表达 IOD 值比较 (x̄ ± s, IOD 值 × 10³)

分组	鼠数	6 h	鼠数	24 h	鼠数	72 h
假手术组	10	32.26 ± 10.39	10	32.64 ± 10.86	10	32.24 ± 10.69
窒息组	9	135.23 ± 10.03 ^a	8	195.96 ± 10.12 ^a	9	159.63 ± 11.70 ^a
心脉隆组	10	116.46 ± 9.58 ^{a,b}	9	178.68 ± 13.83 ^{a,b}	10	144.38 ± 11.49 ^{a,b}

a:与假手术组比较, $P < 0.01$; b:与窒息组比较, $P < 0.01$

2.5 心肌组织病理学检查

假手术组新生鼠心肌细胞排列整齐而紧密,组织间无水肿,染色清晰,结构完整,胞浆中横纹清楚,细胞质均匀呈粉红色,细胞核致密清晰可见,圆形或卵圆形,呈蓝色。窒息 24 h 组,见缺血区心肌细胞水肿明显,部分细胞出现坏死,核消失,心肌纤维成

波浪状改变。心肌间质水肿出血,有较多中性粒细胞浸润。窒息 6 h、72 h 组及心脉隆组,见缺血区心肌细胞轻度水肿,无坏死,有散在的炎性细胞浸润(图 2A ~ C)。

2.6 心肌 HIF-1α 与血浆 ET-1 的相关性分析

HIF-1α 与 ET-1 呈正相关($r = 0.876, P < 0.01$)。

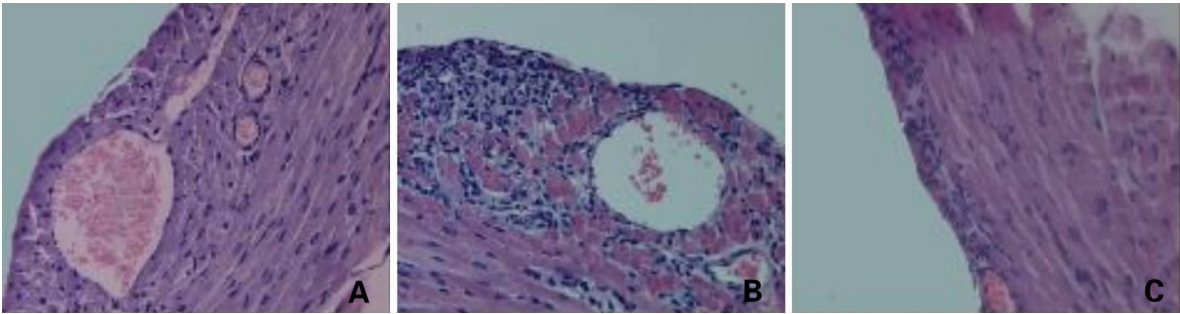


图 2 心肌细胞病理学检查苏木精-伊红染色(×400) A:假手术组 24 h 无炎性细胞浸润,胞核清晰; B:窒息 24 h 组大量炎性细胞浸润,部分细胞核坏死; C:心脉隆 24 h 组有较多炎性细胞浸润,无细胞核坏死。

3 讨论

本研究模拟新生鼠常压窒息过程,通过观察鼠窒息后的一般表现和存活鼠的只数证实缺氧存在;通过检测血浆 CK 及观察心肌病理形态学证实该动物已出现心肌缺氧缺血性损害。本研究发现,窒息组和心脉隆组与假手术组比较,鼠懒动、少吃;假手术组鼠 30 只全部存活,而窒息组鼠存活 26 只,心脉隆组鼠存活 29 只,且后两组鼠血浆 CK 均高于假手术组,其程度与心肌细胞炎性浸润及坏死程度相符。

生理情况下血浆 ET 浓度很低,有研究表明,窒息新生儿缺氧可使血浆 ET 水平升高,加重小冠脉、脑动脉强烈收缩,心输出量下降,体循环和冠脉血管阻力增加,加重脑缺血缺氧及加重心肌缺血缺氧^[3]。陈美芳等^[4]报道,在大鼠离体灌注心脏缺血再灌注急性心肌缺血损伤模型中注入内皮素 A 受体拮抗剂 BMS-182874 抗前 ET-1 寡核苷酸可明显减轻心肌缺血再灌注损伤。李兴文等^[5]研究表明,心脉隆注射液能增加血浆 CGRP 含量,抑制心衰患者 ET 的分泌和作用,纠正神经内分泌异常。本实验结果显示:窒息组的 ET-1 水平明显高于假手术组,应用心脉隆可降低窒息新生鼠血浆 ET-1 的水平。

缺氧诱导因子-1(HIF-1) 的表达与活性的调节主要是通过细胞氧浓度的改变来实现的。缺氧使 HIF-1 α 的稳定性和转录活性增加,HIF-1 α 进入核中和 HIF-1 β 形成有活性的二聚体 HIF-1。Catron 等^[6]证实,慢性缺氧条件下可导致心肌细胞 HIF-1 α 呈指数性升高。Lee 等^[7]发现,在接受冠脉搭桥手术的冠心病患者的心肌标本中,HIF-1 α 的表达增加。目前暂无心脉隆对心肌 HIF-1 α 表达的报道。本实验探讨了新生鼠常压窒息模型中心肌 HIF-1 α 的表达,结果显示:窒息组和心脉隆组鼠的心肌 HIF-1 α 的表达明显高于假手术组,而心脉隆可减弱窒息新生鼠 HIF-1 α 表达。

作为转录因子,HIF-1 α 调控众多基因的表达,Tipoe 等^[8]研究提示在慢性缺氧中,机体往往通过上调 HIF-1 α 的表达,使体内一些血管活性物质如 VEGF、ET-1 和 eNOS 的表达增加,来适应机体的缺氧环境。本实验研究表明:窒息组心肌 HIF-1 α 的表达与血浆 ET-1 的水平变化存在正相关性,说明窒息时 HIF-1 α 可调控其目的基因 ET-1 的表达。

Chen 等^[9]研究发现,通过缺氧预处理可以使心肌产生适应性反应从而对缺血心肌产生保护作用,HIF-1/vEGF/CEACAM-1 途径可能发挥了重要作用。李星海等^[10]研究发现,应用 HIF-1 活性诱导剂氯化钴预处理大鼠,可减少急性心肌缺血面积,促进 VEGF、蛋白表达。本实验通过采用心脉隆预处理的方法探讨其对缺氧缺血性心肌的保护作用,结果表明:与同时间段窒息组比较,心脉隆组的心肌酶 CK、血浆 ET-1 水平及心肌 HIF-1 α 的表达均减低,进一步支持了心脉隆的心肌保护作用,其作用机制可能是心脉隆减少了心肌 HIF-1 α 的表达,降低了血浆 ET-1 水平的水平,从而减轻心肌缺氧缺血性损害。至于心脉隆预处理和后处理对缺氧缺血性心肌损害保护作用的差异,尚需做进一步的研究证实。

[参 考 文 献]

[1] 唐晓鸿. 心脉隆注射液药理作用和治疗心力衰竭临床研究进展[J]. 中国新药杂志, 2008, 17(6):461-464.

[2] 王彩霞,徐淑珍,姜长青,初建芳,赵炜. 基质金属蛋白酶活性与新生鼠窒息后心肌损害的相关性研究[J]. 中国新生儿杂志, 2006, 21(3):152-154.

[3] 黄丽娟,赵善民,何显教,晋玲,黄俊杰,梁祚仁. 多种环境因素改变对心肌缺血家兔血浆内皮素的影响[J]. 右江民族医学院学报, 2008, 30(4): 536-537.

[4] 陈美芳,江俊麟,李元建,杨天伦. 内皮素受体拮抗剂 BMS-182874 对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2004, 12(1):31-34.

[5] 李兴文,张基建,戴路明,黄维丽,张效予,王伯龄. 心脉龙治疗肺心病心衰的机制探讨[J]. 昆明医学院学报, 1998, 19(2): 42-44.

[6] Catron T, Mendiola MA, Smith SM, Born J, Walker MK. Hypoxia regulates avian cardiac Arnt and HIF-1alpha mRNA expression [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 282(2):602-607.

[7] Lee SH, Wolf PL, Escudero R, Deutsch R, Jamieson SW, Thistlethwaite PA. Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction[J]. N Engl J Med, 2000, 342(9):626-633.

[8] Tipoe GL, Lau TY, Nanji AA, Fung ML. Expression and functions of vasoactive substances regulated by hypoxia-inducible factor-1 in chronic hypoxemia[J]. Cardiovasc Hematol Agents Med Chem, 2006, 4(3):199-218.

[9] Chen WJ, Chen HW, Yu SL, Huang CH, Wang TD, Chen JJ, et al. Gene expression profiles in hypoxic preconditioning using cDNA microarray analysis: altered expression of an angiogenic factor, carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 [J]. Shock, 2005, 24(2):124-131.

[10] 李星海,朱兵,王宁夫. HIF-1 对大鼠急性缺血心肌的保护作用[J]. 心脑血管防治, 2007, 7(4):236-238.

(本文编辑: 吉耕中)