

网络出版时间: 2019-3-26 13:45 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20190322.1759.014.html>

缺血预处理诱导的血清外泌体 对大鼠心肌缺血再灌注损伤的影响

产进中,刘 中,黄 俊,张 丽,张 野,何淑芳

摘要 目的 探讨缺血预处理(IPC)诱导的血清外泌体(Exo)对大鼠心肌缺血再灌注(I/R)损伤的影响。方法 成年雄性SD大鼠,体质量250~300 g。按照随机数字表法分为2组($n=4$):IPC组,大鼠开胸结扎冠状动脉左前降支5 min,放松5 min;3个循环;对照组(CON),大鼠开胸后仅穿线不结扎。预处理结束后利用ExoQuick™试剂盒提取血清Exo,分别标记为Exo-IPC、Exo-CON。采用透射电镜观察Exo形态、Western blot法检测标志性蛋白,BCA法测定Exo浓度。另将30只成年雄性SD大鼠按照随机数字表法分为5组($n=6$):假手术组(Sham组)、缺血再灌注组(I/R组)、I/R+Exo-IPC组、I/R+Exo-CON组、溶剂对照组(I/R+PBS组)。除Sham组外,其余各组均给予冠状动脉左前降支结扎缺血30 min,再灌注120 min。I/R+Exo-IPC组、I/R+Exo-CON组、I/R+PBS组分别于缺血前15 min经静脉给予Exo-IPC、Exo-CON和PBS。再灌注120 min后取血,测定血清肌钙蛋白I(cTnI)水平,心脏标本进行氯化三苯基四氮唑(TTC)染色,测量左心室(LV)、右心室(RV)、梗死区(IS)、缺血危险区(AAR)体积以及IS/AAR比值。结果 透射电镜下可见外泌体呈圆形囊泡,平均直径约30~100 nm;与Exo-CON比较,Exo-IPC中外泌体标志性的蛋白抗白细胞分化抗原63(CD63)及热休克蛋白60(HSP60)的相对表达量增高($P<0.05$);Exo-IPC中Exo浓度较Exo-CON也显著增高($P<0.05$)。与Sham组比较,其余各组IS体积、IS/AAR和cTnI水平均显著升高($P<0.05$);与I/R组比较,I/R+Exo-IPC组IS体积、IS/AAR和cTnI水平均降低($P<0.05$);相反,I/R+Exo-CON组、I/R+PBS组的IS体积、IS/AAR和cTnI水平,与I/R组比较差异无统计学意义。结论 IPC可引起大鼠血清Exo释放增加,这种IPC诱导的Exo可减轻受体大鼠心肌I/R损伤,从而发挥心肌保护作用。

关键词 缺血预处理;外泌体;心肌保护;缺血再灌注损伤;大鼠

中图分类号 R 541.4

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)04-0570-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.04.014

缺血性心脏病是目前全球致死率最高的心血管疾病^[1-2]。其中心肌缺血再灌注(ischemia reperfusion, I/R)损伤是导致患者死亡的主要原因之一^[3]。外泌体(exosome, Exo)是细胞主动向胞外分泌的一种囊泡样小体,直径约为30~100 nm,其可通过运输蛋白质、RNA或微小RNA(microRNA, miRNA)等物质,靶向作用于细胞,是细胞间信号通讯的重要方式之一^[4]。研究^[5]表明Exo在心血管疾病中可以发挥重要的心肌保护效应。然而,关于Exo是否参与缺血预处理(ischemic preconditioning, IPC)^[6]介导的心肌保护效应,目前尚未报道。因此,该研究拟通过探讨IPC处理后从血清提取的Exo对心肌I/R损伤的影响,以研究IPC发挥心肌保护作用的新机制和靶点。

1 材料与方法

1.1 实验材料 ExoQuick™外泌体提取试剂盒购自美国SBI公司;2,2-联喹啉-4,4-二甲酸二钠(BCA)蛋白定量试剂盒购自上海碧云天科技研究所;抗白细胞分化抗原(cluster of differentiation, CD63)、抗热休克蛋白(heat shock protein, HSP60)抗体均购自美国Santa Cruz公司;ECL发光试剂盒购自美国Pierce公司;氯化三苯基四氮唑(TTC, 129K1867V)购自美国Sigma公司;肌钙蛋白I(cardiac troponin I, cTnI)测定试剂盒(化学发光法)购自美国Beckman Coulter公司;HX-300S型动物呼吸机购自成都泰盟科技有限公司;PowerLab系统购自澳大利亚AD公司;冷冻透射电镜购自中国科技大学生命科学院;Tanon全自动凝胶成像系统购自上海天能科技有限公司。

1.2 I/R模型建立 清洁级健康雄性SD大鼠38只,体质量250~300 g,由安徽医科大学动物实验中心提供。大鼠经腹腔注射5%戊巴比妥50 mg/kg麻醉下,行气管切开插管,连接动物呼吸机,以室内

2018-11-27 接收

基金项目:安徽省高校自然科学基金项目重点项目(编号: KJ2017A172)

作者单位:安徽医科大学第二附属医院麻醉科,合肥 230601

作者简介:产进中,男,硕士研究生;

何淑芳,女,博士,副研究员,硕士生导师,责任作者, E-mail: hsf77@163.com

空气通气,潮气量为 20 ~ 30 ml/kg,呼吸频率为 70 ~ 80 次/min。行左颈动脉切开置管,通过压力换能器,连接 PowerLab 系统,记录心电图、平均动脉血压(mean artery pressure, MAP)、心率(heart rate, HR)。行右颈内静脉切开置管用于输液和给药。沿左锁骨中线切开皮肤 2 cm,在第 4、5 肋间打开胸腔,剪开心包,轻压右侧胸廓,挤出心脏。在肺动脉圆锥与左心耳之间冠状动脉处用 6-0 Prolene 线作一线结,把心脏放回胸腔,稳定 15 min 后开始缺血再灌注损伤实验,即收紧线结即完成左冠状动脉闭塞致心肌缺血,表现为其支配的局部心肌发绀、血压下降、ST 段抬高或降低;松开线结即行再灌注处理。

1.3 Exo 的分离提取 取 8 只大鼠随机分为 2 组($n = 4$): IPC 组,先进行 IPC,即对心肌行缺血 5 min,再灌注 5 min,重复 3 次。处理结束即刻经颈动脉快速取血置于含促凝剂的采血试管内,获取血清,利用 ExoQuick™ 试剂盒提取 Exo,加入 100 μ l PBS 重悬,经 0.22 μ m 的无菌滤膜除菌,于 -80 $^{\circ}$ C 保存,标记为缺血预处理外泌体(Exo-IPC)。对照组(CON),仅穿线不进行任何处理,30 min 后获取血清,然后以相同方法提取外泌体,标记为对照外泌体(Exo-CON)。

1.4 Exo 鉴定分析 将 10 μ l 混悬均匀的 Exo 溶液滴在载样铜网上,室温静置 1 min 后,液体用滤纸从铜网边缘吸去。用 10 g/L 磷钨酸(pH 6.8)滴于铜网上,室温负染 5 min,滤纸从铜网边缘吸去多余液体,待常温下干燥后,80 ~ 120 kv 上机成像。用冷冻透射电镜观察外泌体的形态,并随机选取视野,拍摄照片,用标尺计算直径。冰上解冻外泌体,加入 5 $\times$ 上样缓冲液,95 $^{\circ}$ C 加热 5 min 使蛋白变性,常规制胶、上样,蛋白电泳,然后转膜、封闭,分别加入 5% BSA 稀释的一抗 HSP60(1 : 500)或 CD63(1 : 500),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,次日 TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,在山羊抗鼠 IgG(1 : 10 000)或山羊抗兔 IgG(1 : 20 000)中室温孵育 1 h, TBST 液漂洗 3 次,每次 5 min,采用 ECL 发光试剂盒,在 Tanon 全自动凝胶成像系统中自动曝光采集图像。

1.5 Exo 浓度测定 参照文献^[4]方法,将提取的 Exo 样品利用 2,2-联喹啉-4,4-二甲酸二钠(BCA)蛋白定量法测定提取 Exo 浓度。分别取待测 Exo-IPC、Exo-CON 样品各 5 μ l 稀释 10 倍后,严格按照 BCA 试剂盒的说明书测量各样品的浓度,每个样品设 3 个复孔。

1.6 实验动物分组及给药方法 大鼠采用随机数

字表法分为 5 组($n = 6$):假手术组(Sham 组)、缺血再灌注组(I/R 组)、I/R + Exo-IPC 组、I/R + Exo-CON 组、溶剂对照组(I/R + PBS 组)。I/R + Exo-IPC 组、I/R + Exo-CON 组、I/R + PBS 组分别于缺血前 15 min 经颈静脉一次性给予 Exo-IPC(0.4 μ g/ μ l)、Exo-CON(0.4 μ g/ μ l)以及 PBS 各 100 μ l。除 Sham 组外,其余各组均给予缺血 30 min,再灌注 120 min 处理。

1.7 血清肌钙蛋白 I(cardiac troponin I, cTnI)测定 于再灌注 120 min 结束后,经颈动脉取血,离心分离血清,放入 -80 $^{\circ}$ C 保存。严格按照 cTnI 测定试剂盒(化学发光法)要求测定各组血清 cTnI 水平。

1.8 心肌梗死体积测定 实验结束后取出心脏,去除非心脏组织,生理盐水灌注,冲洗出血液,结扎左冠状动脉,从主动脉注入 0.25% Evan 蓝溶液。置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中,待充分冷冻后,行冰冻切片,沿心脏纵轴线切 5 ~ 6 片,每片厚约 2 mm。切片放于 1% 氯化三苯基四氮唑溶液中,37 $^{\circ}$ C 水浴锅中孵育 15 min;随后用 10% 中性福尔马林固定过夜,缺血危险区中呈白色为梗死区,呈红色为非梗死区。采用 Imaging J 1.38e 图像分析软件分析左心室(left ventricular area, LV)、右心室(right ventricular area, RV)、缺血危险区(area at risk, AAR)和梗死区(infarct size, IS)的面积,乘以 0.2 cm 即为各区的体积,并计算 LV 体积与 RV 体积之和(LV + RV)、IS 体积与 AAR 体积以及 IS/AAR 比值。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 Tukey 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Exo 的鉴定分析 通过透射电镜观察纳米级别的 Exo 形态,可见大小均一的微型囊体结构,直径约 30 ~ 100 nm 左右,形态为圆形或椭圆形,在边缘可观察到类似细胞膜的双层膜结构,见图 1。Western blot 结果显示: Exo-IPC 的 Exo 特异性蛋白标志物 HSP60($t = 4.009, P < 0.05$)和 CD63($t = 3.905, P < 0.05$)的相对表达量增高,差异有统计学意义,见图 2A、2B。BCA 法测定血清 Exo 浓度,结果显示: Exo-IPC 中 Exo 浓度显著增多,差异有统计学意义($t = 3.066, P < 0.05$),见图 2C。

2.2 心肌梗死体积 各组 LV + RV 体积及 AAR 体积差异均无统计学意义($P > 0.05$);与 Sham 组比

较,其余各组的 IS 体积和 IS/AAR 比值均升高,差异有统计学意义($F = 53.28, P < 0.01$);与 I/R 组比较, I/R + Exo-IPC 组的 IS 体积和 IS/AAR 比值显著降低,差异有统计学意义($t = 3.209, P < 0.05$);与 I/R 组比较, I/R + Exo-CON 组、I/R + PBS 组的 IS 体积和 IS/AAR 比值差异均无统计学意义($P > 0.05$),见图 3。

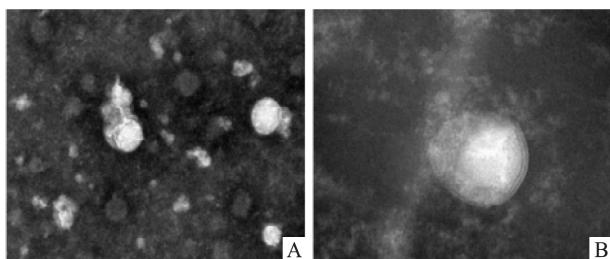


图 1 外泌体透射电镜观察形态学结果

A: bar = 200 nm; B: bar = 100 nm

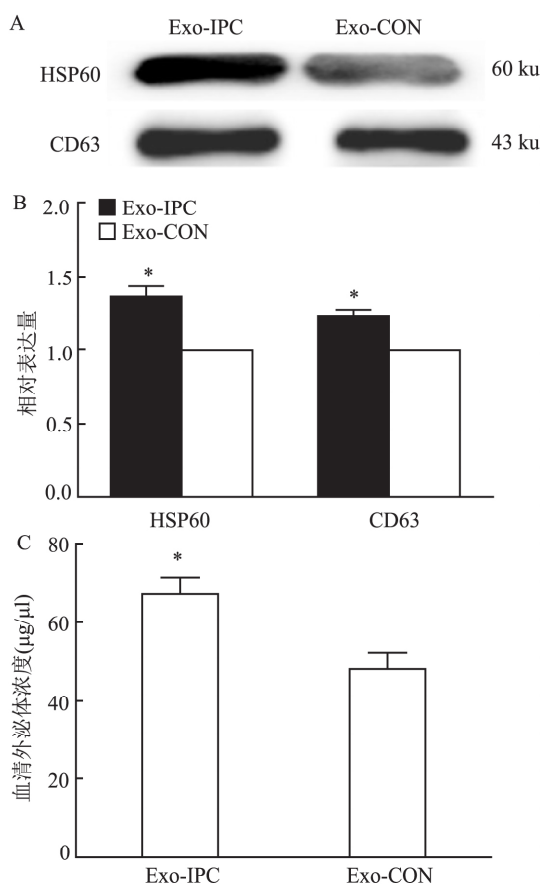


图 2 Western blot 检测外泌体表面蛋白标志物以及 BCA 法测定外泌体浓度

A、B: HSP60、CD63 表达; C: 外泌体浓度; 与 Exo-CON 比较: * $P < 0.05$

2.3 cTnI 水平 与 Sham 组比较,其余各组再灌注

120 min 时血清 cTnI 浓度均升高,差异有统计学意义($F = 27.14, P < 0.01$);与 I/R 组比较, I/R + Exo-IPC 组血清 cTnI 浓度降低,差异有统计学意义($t = 7.013, P < 0.05$);与 I/R 组比较, I/R + Exo-CON 组、I/R + PBS 组血清 cTnI 浓度差异均无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

表 1 各组大鼠血清 cTnI 水平的比较($\bar{x} \pm s$)

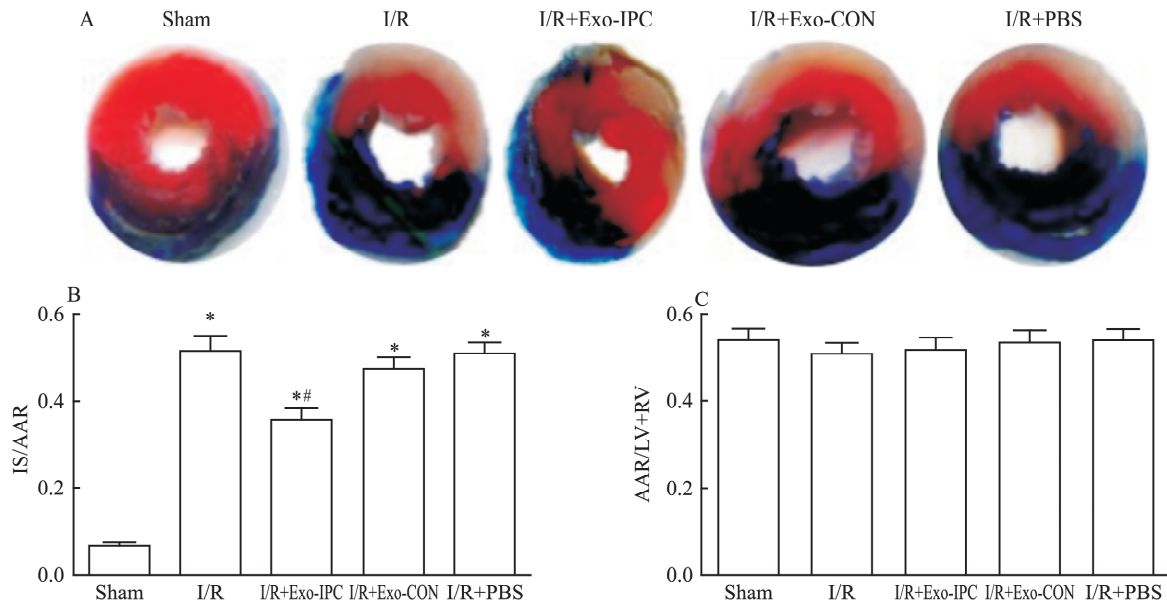
组别	n	cTnI (ng/ml)
Sham	6	1.77 ± 0.55
IR	6	448.50 ± 79.40*
IR + Exo-IPC	6	174.15 ± 39.41* #
IR + Exo-CON	6	404.50 ± 100.86*
IR + PBS	6	419.25 ± 99.35*

与 Sham 组比较: * $P < 0.01$; 与 IR 组比较: # $P < 0.05$

3 讨论

临床上心肌梗死溶栓、冠脉搭桥术和心脏瓣膜置换术等治疗方法都会涉及心肌 I/R 损伤这一重要的病理生理过程,预防和减轻心肌 I/R 损伤是目前临床上急需解决的问题。Exo 作为细胞主动向胞外释放的具有一定生物活性功能的小囊泡,在心肌缺血后信号转导和组织修复过程中可能发挥着重要作用^[8]。本研究通过提取 IPC 处理后大鼠血清中的 Exo,将其注入受体大鼠体内,证明这些 Exo 可减轻受体大鼠心肌 I/R 损伤,降低心肌梗死面积和 cTnI 水平,提示预处理诱导释放的内源性 Exo 可能成为促进心肌缺血后组织损伤修复的潜在治疗措施。

本研究参考文献^[8]利用 ExoQuick™ 试剂盒提取大鼠血清中的 Exo。根据文献^[9]报道,电镜下 Exo 为直径介于 30 ~ 100 nm 之间的类似椭圆形结构的纳米级双层膜囊泡,本研究在透射电镜下观察到的结果与其相符合。CD63、HSP60 是目前鉴定 Exo 主要的表面标志蛋白^[11-12],本研究采用 Western blot 检测显示提取的外泌体 CD63、HSP60 均为阳性表达,且 Exo-IPC 中外泌体特异性的蛋白标志物相对表达量增高。同时,本研究还显示经过 IPC 后,大鼠血清 Exo 的浓度明显增加,表明 IPC 可刺激机体大量释放内源性 Exo,从而增加其在血清内的含量。有报道^[13]显示,当机体处于应激状态下时,细胞会迅速增加 Exo 的分泌量并改变其内容物的成分,并对机体产生不同程度的影响。Vicencio et al^[14]研究显示,对自愿者和大鼠分别进行远端缺血预处理同样显著地增加了两者血浆中 Exo 的水平。

图3 TTC染色法检测各组大鼠心肌梗死($n=6, \bar{x} \pm s$)A: TTC染色; B: IS/AAR; C: AAR/(LV+RV); 与 Sham 比较: * $P < 0.01$; 与 I/R 组比较: # $P < 0.05$

在心肌 I/R 损伤前,本研究将 IPC 诱导释放的血清 Exo 注入大鼠静脉内,可明显减小心肌梗死面积,同时血清 cTnI 水平也相应地降低,然而对照组 Exo 对 I/R 损伤不产生保护效应,这一结果提示 IPC 可通过刺激机体释放具有保护性作用的内源性 Exo 途径,来减轻缺血和再灌注引起的心肌损伤。Exo 在预处理介导的心肌保护效应中发挥何种作用及其相关机制,目前国内外研究还很少。Giricz et al.^[12]报道,离体灌流的供体心脏经过 3 次(每次 5 min)的 IPC 处理后,其冠脉流出液中的细胞外囊泡(其中包含有 Exo),有助于减轻受体心脏的 I/R 损伤。远端缺血预处理诱导的内源性外泌体可能通过转运 HSP70 蛋白,激活心肌细胞内细胞外调节蛋白激酶和 p38 通路发挥心肌保护作用^[11]。最新研究^[14-15]还证实,经过缺氧预处理的间充质干细胞所分泌的 Exo 中含有大量的 miRNA-22 和 miRNA-221,可通过作用于心肌细胞凋亡调控因子而发挥抗细胞凋亡作用。本研究通过 IPC 诱导机体释放 Exo,研究内源性 Exo 心肌保护中的作用,但其具体作用机制尚需进一步研究。

综上所述,IPC 可诱导大鼠血清 Exo 释放增加,这种内源性的 Exo 可减轻受体大鼠心肌 I/R 损伤,为研究 IPC 的心肌保护机制提供了新的方向以及的理论依据。

参考文献

- Plakht Y, Shiyovich A, Gilutz H. Predictors of long-term (10-year) mortality postmyocardial infarction: age-related differences. Soroka Acute Myocardial Infarction (SAMI) Project [J]. J Cardiol, 2015, 65(3): 216-23.
- Khan J N, McCann G P. Cardiovascular magnetic resonance imaging assessment of outcomes in acute myocardial infarction [J]. World J Cardiol, 2017, 9(2): 109-33.
- 张引, 金世云, 何淑芳, 等. JNK 信号通路和 p38MAPK 信号通路在吗啡预处理减轻心力衰竭大鼠心肌缺血再灌注损伤中的作用 [J]. 中华麻醉学杂志, 2016, 36(2): 219-2.
- Ailawadi S, Wang X, Gu H, et al. Pathologic function and therapeutic potential of exosomes in cardiovascular disease [J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1852(1): 1-11.
- Ong S G, Wu J C. Exosomes as potential alternatives to stem cell therapy in mediating cardiac regeneration [J]. Circ Res, 2015, 117(1): 7-9.
- 程洁, 何淑芳, 韩正怡, 等. miRNA 在缺血预处理保护心肌缺血/再灌注损伤中的研究进展 [J]. 国际麻醉学与复苏杂志, 2017, 38(5): 470-3.
- 王仁峰, 耿振, 李朝阳, 等. ExoQuick 提取人血清外泌体方法改良及比较 [J]. 实用医学杂志, 2015, 31(15): 2458-62.
- Bei Y, Das S, Rodosthenous R S, et al. Extracellular vesicles in cardiovascular theranostics [J]. Theranostics, 2017, 7(17): 4168-82.
- Théry C, Amigorena S, Raposo G, et al. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids [J]. Curr Protoc Cell Biol, 2006, Chapter 3: Unit 3.22.
- Bian S, Zhang L, Duan L, et al. Extracellular vesicles derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote angiogenesis in a rat myocardial infarction model [J]. J Mol Med, 2014, 92(4): 387-97.
- Vicencio J M, Yellon D M, Sivaraman V, et al. Plasma exosomes

- protect the myocardium from ischemia-reperfusion injury [1]. *J Am Coll Cardiol*, 2015, 65(15):1525–36.
- [2] Giricz Z, Varga Z V, Baranyai T, et al. Cardioprotection by remote ischemic preconditioning of the rat heart is mediated by extracellular vesicles [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2014, 68(2):75–8.
- [3] Tian J, Guo X, Liu X M, et al. Extracellular HSP60 induces inflammation through activating and up-regulating TLRs in cardiomyocytes [J]. *Cardiovasc Res*, 2013, 98(3):391–401.
- [4] Feng Y, Huang W, Wani M, et al. Ischemic preconditioning potentiates the protective effect of stem cells through secretion of exosomes by targeting Mecp2 via miR-22 [J]. *PLoS One*, 2014, 9(2):e88685.
- [5] Yu B, Gong M, Wang Y, et al. Cardiomyocyte protection by GA-TA-4 gene engineered mesenchymal stem cells is partially mediated by translocation of miR-221 in microvesicles [J]. *PLoS One*, 2013, 8(8):e73304.

Effect of ischemic preconditioning-induced serum exosome on myocardial ischemia reperfusion injury in rats

Chan Jinzhong, Liu Zhong, Huang Jun, et al

(Dept of Anesthesiology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To investigate the effect of ischemic preconditioning-induced serum exosome on myocardial ischemia-reperfusion(I/R) injury in rats. **Methods** Male SD rats weighing 250 ~ 300 g were used in this study. Rats were randomly(random number) divided into 2 groups of 4 animals each. In ischemia preconditioning group (IPC), left anterior descending branch of coronary artery was ligated by 3 cycles of 5 min ischemia-5 min reperfusion after thoracotomy. In control group(CON), rats were only punctured and not ligated. After preconditioning, ExoQuick™ kit was used to extract serum exosome and marked as Exo-IPC or Exo-CON. The morphological characteristics of exosome were observed by transmission electron microscope, the marker proteins were detected by Western blot and the concentration of exosome was measured by BCA. Another thirty male SD rats were randomly(random number) divided into five groups($n=6$): sham group, ischemia reperfusion group(I/R), I/R + Exo-IPC, I/R + Exo-CON, solvent control group(I/R + PBS). Except the sham group, all other groups were treated by 30 min ischemia and 120 min reperfusion. Exo-IPC, Exo-CON and PBS were given intravenously in I/R + Exo-IPC group, I/R + Exo-CON group and I/R + PBS group respectively, 15 min before ischemia. At the end of reperfusion, venous blood samples were taken for determination of cardiac troponin I(cTnI) level. Hearts were stained by TTC for the measurement of left ventricular area(LV), right ventricular area(RV), infarct size(IS) and area at risk(AAR) as well as IS/AAR ratio. **Results** Under the transmission electron microscope, the exosome was round vesicle with an average diameter of 30 ~ 100 nm, and Western blot demonstrated that the relative quantitative expression of cluster of differentiation 63(CD63) and heat shock proteins 60(HSP60) was increased in Exo-IPC compared with Exo-CON($P<0.05$). The concentration of exosome in Exo-IPC was increased more than that in Exo-CON($P<0.05$). IS, IS/AAR ratio and cTnI level were significantly increased at the end of reperfusion in other groups as compared to Sham group($P<0.01$). Whereas these changes were decreased in I/R + Exo-IPC group as compared to I/R group($P<0.05$). On the contrary, there was no significant difference about these changes between I/R + Exo-CON group and I/R + PBS group compared with I/R group. **Conclusion** IPC can increase the release of serum exosome in rats. The IPC induced exosome can reduce the myocardial I/R damage in recipient rats, which plays a protective role in myocardium.

Key words ischemic preconditioning; exosome; cardioprotection; ischemia reperfusion injury; rats