

曲美他嗪对心力衰竭犬氧化应激状态的影响

霍红, 王凤荣

摘要 目的 研究曲美他嗪对心衰犬心肌细胞氧化应激状态及形态结构的影响。方法 采用快速起搏心室构建心衰犬模型,将模型制造成功的15只犬随机分为3组:假手术组、模型组、曲美他嗪组[灌服曲美他嗪5 mg/(kg·d)],连续6周。实验结束后留取犬左心室心肌组织,应用硫代巴比妥法测定丙二醛(MDA),黄嘌呤氧化酶法测定超氧化物歧化酶(SOD),RT-PCR技术测定丙酮酸脱氢酶(PDH)mRNA表达,行病理形态学及心肌超微结构观察。结果 曲美他嗪组犬心肌组织中SOD活性升高,MDA表达下降。曲美他嗪治疗后PDH mRNA表达上调,高于模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。光镜和电镜下观察曲美他嗪组心肌损伤程度低于模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 曲美他嗪能够改善心衰犬心肌细胞氧化应激状态,其机制可能与曲美他嗪减少烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)生成,间接提高PDH mRNA的表达,提高葡萄糖氧化,抑制脂质过氧化反应,改善心肌能量代谢有关。

关键词 曲美他嗪;心力衰竭;丙二醛;超氧化物歧化酶;丙酮酸脱氢酶

中图分类号 R 541.62

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)06-0908-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.06.017

心力衰竭是心脏疾病的终末期表现,最终导致心肌结构和功能的改变,其发病机制复杂。众多研究^[1]表明,氧化应激与心力衰竭的整个过程密切相关。在正常的生理情况下,机体对活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生和清除处于动态调节状态,这种平衡一旦被打破,就会造成心肌能量代谢的紊乱及心肌细胞的损伤^[2]。曲美他嗪是优化心肌能量代谢的药物,能够在心肌缺血状态下,改善心肌能量代谢,保护心肌细胞。该研究通过观察曲美他嗪对心衰犬超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、丙酮酸脱

氢酶(pyruvate dehydrogenase, PDH)mRNA表达以及心肌细胞结构的影响,探讨其改善心衰犬氧化应激状态的可能机制。

1 材料与方法

1.1 试剂及仪器 曲美他嗪(法国施维雅公司,批号:J20030554);丙二醛测定试剂盒(南京建成生物工程研究所);RT-PCR试剂盒(上海宝生物公司,货号:DRR019A);超氧化物歧化酶测试盒(南京建成生物工程研究所);实验用起搏器(400次/min,电压阈值<1 V,阻抗500~1 000 Ω,上海复旦大学电子工程室);光学显微镜(日本Olympus公司);透射电镜(JEM-1200EX,日本JEOL公司);紫外分光光度计(Ultrospec3000,英国Pharmacia Biotech公司)。

1.2 动物模型及分组 15只杂种犬,体质量18~20 kg,由哈尔滨医科大学实验动物中心提供。犬心衰模型的制备:15只犬随机分为假手术组、模型组、曲美他嗪组,每组5只。假手术组只开胸,不安装起搏器;余两组均以快速起搏右心室6周构建心衰模型,曲美他嗪组于起搏后2 d每日灌胃给予曲美他嗪5 mg/(kg·d)。6周后关闭起搏器,观察犬生活状态,并检测三组犬心功能。与假手术组犬比较,模型组犬活动耐力下降,平静时呼吸急促,活动后气促加重,食欲减退,腹胀,尿量减少,肺部可闻及湿啰音。曲美他嗪组犬活动耐力稍减退,活动后气促,肺部偶可闻少许湿啰音。与假手术组犬相比,余两组犬心脏均有不同程度扩大,射血分数下降,提示造模成功。

标本采集:6周后,3组犬均以左侧胸廓切开术切除心脏。快速切取左室心肌组织,取约100 mg大小组织块,置于液氮速冻后,-80℃存放。

1.3 心肌组织MDA和SOD活性的测定 心肌组织称重、剪碎,按1:9浓度加入4℃匀浆介质,充分研磨,制成10%匀浆低温高速离心后,弃上清液,沉淀物加入少许匀浆介质制成悬浊液。MDA采用硫代巴比妥法检测,SOD采用黄嘌呤氧化酶法检测。

1.4 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR) RNA提取及逆转录:心肌组织100 mg用TRIzol法提取组织总

2018-01-25 接收

基金项目:黑龙江省卫生计生委科研课题(编号:2017-469)

作者单位:辽宁中医药大学,沈阳 110032

作者简介:霍红,女,主治医师,博士研究生;

王凤荣,女,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: h_honger@163.com

RNA。将 RNA 溶于 20 μ l DEPC 水中, -80°C 冻存备用。取 5 μ l 总 RNA 稀释, 1% 的琼脂糖电泳证实 RNA 的完整性后, 用紫外线分光光度仪测定总 RNA 的纯度 [$1.8 < A_{260}/A_{280}$ (样品的纯度比值) < 2.2 为合格] 及浓度, 计算出进行 RT-PCR 所需样品量。β-肌动蛋白 (β-actin) 作为 PDH mRNA 表达的半定量内参对照。

PCR 聚合酶链反应: 按照二步法 RT-PCR 试剂盒提供的说明书加入逆转录反应所需试剂合成 cDNA, PCR 引物设计: PDH (205 bp) 上游引物序列为 5'-GTGTTGTCGGGCGTCTC-3'; 下游引物序列为 5'-CTGCCTTTAACTCCATTTCG-3'; β-actin (379 bp) 上游引物序列为 5'-CAGAGCAAGAGGGGCATC-3'; 下游引物序列为 5'-AGGTAGTCGGTCAGGTCC-3'。PCR 循环体系, 94°C 预变性 2 min; 94°C 变性 30 s; (PDH: 58°C , β-actin: 57°C) 退火 30 s, 72°C 延伸 2 min; 30 个循环。PCR 循环后 72°C 再延伸 10 min。

电泳及图像扫描: PDH 和 β-actin 扩增的产物电泳 (电泳条件: 1.5% 琼脂糖, 电压 150 V/cm, 电流 350 mA, 时间 30 min) 后, 经凝胶成像系统分析处理, 分别计算 PDH 和 β-actin 条带的灰度比值作为其 mRNA 的相对表达量。电泳条带回收纯化后送 DNA 序列分析。

1.5 光镜下观察心室肌病理组织学变化 各组犬心室肌组织块置入 4% 多聚甲醛固定, 4°C 保存; 标本脱水、透明后, 石蜡包埋, 制备切片, 常规 HE 染色。光镜下每例犬选取 8 张切片, 每张切片至少分析 200 个细胞 (可见细胞核), 计算肌溶解细胞占细胞总数的百分比, 记做肌溶解比率。采用计算机病理图像分析系统, 计算肌溶解面积占整个细胞面积百分比, 按照肌溶解面积分为: 轻度肌溶解 (10% ~ 25%), 重度肌溶解 ($> 25\%$)。

1.6 电镜下观察心室肌超微结构 组织块置入 3% 戊二醛中固定, 4°C 保存; 标本经乙醇逐级脱水后, 用 1:1 比例混合的丙酮和包埋剂室温下浸透 1 h, 再用纯包埋剂进行包埋、固化, 先制备半薄切片 (0.5 ~ 1.0 μm), 定位后制成超薄切片 (50 ~ 100 nm); 最后用醋酸铀和柠檬酸铅双重染色, 经漂洗、分化, 待干观察。

1.7 统计学处理 所有数据采用 SPSS 19.0 统计软件分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计数资料采用 χ^2 检验, 计量资料多组间比较采用方差分析, 两组间比较采用 q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 犬心室肌 MDA 和 SOD 含量的比较 与假手术组比较, 模型组与曲美他嗪组心室肌细胞中 MDA 增高, SOD 减低 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 曲美他嗪组 MDA 降低, SOD 增高 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 犬心室肌 MDA 和 SOD 含量的比较与心室肌 PDH 与 β-actin 灰度的比值 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	MDA (nmol/mg 蛋白)	SOD (U/mg 蛋白)	PDH 与 β-actin 灰度比值
假手术	146.51 ± 38.20	428.60 ± 34.51	0.93 ± 0.15
模型	367.33 ± 42.50*	136.61 ± 26.90*	0.68 ± 0.14**
曲美他嗪	245.41 ± 30.42#	352.43 ± 45.82#	0.73 ± 0.14*#
F 值	4.91	5.16	-

与假手术组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

2.2 各组犬心室肌 PDH mRNA 相对表达量 以 2 000 bp DNA Ladder 的 Marker 为标志, 在 205 bp 和 392 bp 处可见扩增产物, 经测序证实为 PDH mRNA 和 β-actin 的编码基因片段。与假手术组犬相比, 模型组犬心室肌 PDH mRNA 表达显著降低 ($P < 0.01$); 曲美他嗪组犬心室肌 PDH mRNA 表达较模型组明显增加 ($P < 0.05$), 但仍低于假手术组 ($P < 0.05$)。见表 1、图 1。

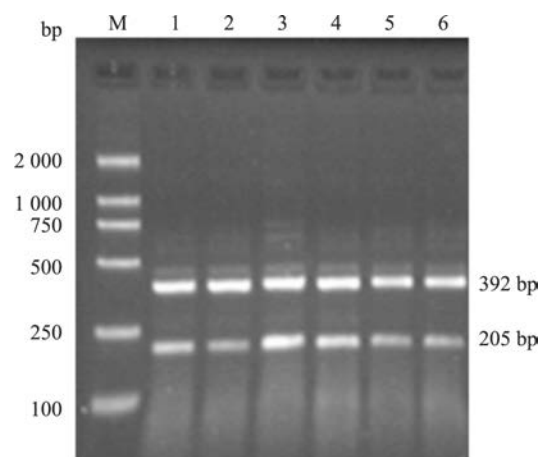


图 1 各组犬心室肌 PDH mRNA 表达

M: DL 2 000 标志物; 1、2: 模型组; 3、4: 假手术组; 5、6: 曲美他嗪组

2.3 各组犬心室肌病理组织学改变 假手术组心室肌细胞排列有序、结构正常。模型组心室肌细胞失去正常有序排列, 极向紊乱, 出现压迫性萎缩或代偿性肥大; 细胞核畸形大小不一; 心肌纤维溶解, 部分区

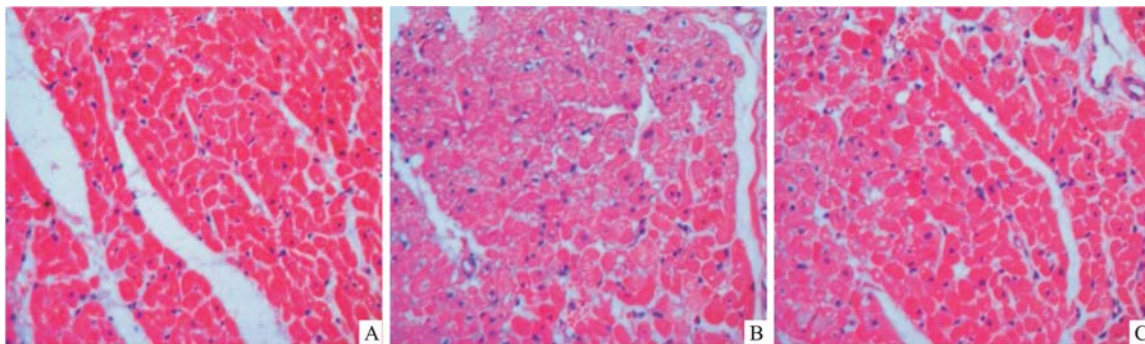


图2 各组犬心肌 HE 染色 $\times 400$
A: 假手术组; B: 模型组; C: 曲美他嗪组

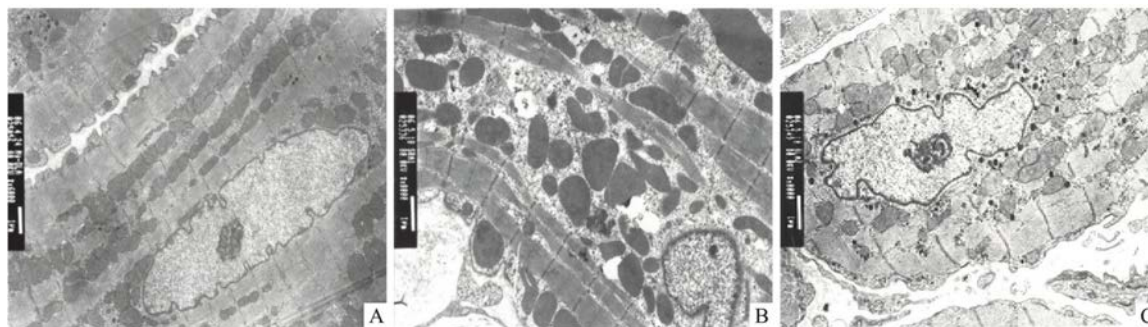


图3 各组犬心肌电镜下超微结构 $\times 5\,000$
A: 假手术组; B: 模型组; C: 曲美他嗪组

肥大; 细胞核畸形大小不一; 心肌纤维溶解, 部分区域肌溶解严重; 心肌间质可见纤维组织增生。与模型组比较, 曲美他嗪组犬心肌病理组织学改变显著减轻。见表2、图2。

表2 各组犬心室肌肌溶解情况 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

分组	肌溶解总比率 (%)	轻度肌溶解 (10% ~ 25%)	重度肌溶解 (>25%)
假手术	4.31 ± 0.60	3.90 ± 0.63	0.41 ± 0.30
模型	$47.42 \pm 5.53^{**}$	$31.61 \pm 4.40^{**}$	$16.72 \pm 4.81^{**}$
曲美他嗪	$15.34 \pm 3.71^{* \# \#}$	$10.52 \pm 2.51^{* \# \#}$	$5.90 \pm 0.50^{* \# \#}$
F 值	7.13	6.16	7.61

与假手术组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较: $^{* \# \#} P < 0.01$

2.4 各组犬心室肌超微结构改变 假手术组: 心肌超微结构基本完好; 肌节结构完整, 各带清晰; 细胞核发育正常, 核仁明显, 有丰富的线粒体, 嵴清晰; 闰盘发育良好。模型组: 心肌纤维溶解、缺失, 排列稀疏; 细胞核固缩非常明显; 核周细胞器消失; 细胞间连接形成高电子密度的斑块; 线粒体肿胀, 大小不一, 嵴减少、变短、甚至溶解, 可见巨线粒体; 细胞间质水肿, 可见吞噬细胞和淋巴细胞, 吞噬细胞内可见

大量溶酶体; 个别肌细胞完全溶解; 间质结缔组织细胞增多。曲美他嗪组: 与模型组比较, 犬心肌超微结构改变程度明显减轻。见图3。

3 讨论

氧化应激是指机体内 ROS 产生过多或(和)清除能力降低, 导致机体氧化/抗氧化系统的代谢失衡。ROS 由氧化还原反应产生, 生物功能是参与信号转导和免疫防御等生理过程, 但病理状态下过多的 ROS 介导氧化应激, 损伤心肌。氧化应激作为心力衰竭的发病机制之一, 影响疾病进展的多个环节^[8]。

烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(磷酸) (NADH/NADPH) 是细胞内参与糖、脂肪、蛋白质新陈代谢的辅酶对, 是重要的电子供体, 参与机体大部分的氧化还原反应^[9]。能量充足情况下, 腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)作为磷酸供体, NADH 发生磷酸化生成 NADPH。NADPH 的合成是 NADH 的主要消耗反应之一。机体受病理条件及外源性因素影响, 细胞内 NADH/NADPH 的水平改变, 诱导 ROS 生成。NADH 水平与 ROS 相关^[8]。心力衰竭时 ROS 主要

来源: ① 心肌缺血低氧, ATP 生成减少, 膜脂质中 NADH 得不到氧化而堆积, ROS 生成增多^[8]。② 神经-内分泌系统激活, 儿茶酚胺大量释放和自由化; 细胞促炎症因子合成分泌增加; 补体系统被激活等因素的刺激下, NADH/NADPH 氧化系统被激活, 心肌细胞产生 ROS。③ 心肌能量缺乏, 线粒体呼吸链酶活性降低, 氧化磷酸化效率降低, 电子传递发生障碍, 产生 ROS。总之, 心衰时氧化物过度表达, 抗氧化物清除能力下降, 氧化及抗氧化系统的失衡造成 ROS 增多, 细胞损伤。ROS 作用于细胞膜、线粒体脂质双分子层结构, 使其发生脂质过氧化反应, 膜通透性改变, 溶酶体水解酶释放; 线粒体肿胀, 蛋白质生成受抑制; 最终导致心肌超微结构改变, 心肌能量代谢障碍, ATP 合成进一步减少。另外, ROS 可使心肌肌浆网储存、释放钙的能力下降, 影响心肌收缩舒张功能, 心肌功能降低, 造成不可逆的损害。SOD 是抗氧化酶, 其活性反应氧自由基的清除能力; MDA 是脂质过氧化代谢产物, 含量反映脂质过氧化程度, 也间接体现细胞损伤的程度。本研究中经曲美他嗪治疗的心衰犬, SOD 活性升高, MDA 水平下降, 表明曲美他嗪通过调节心肌细胞能量代谢, 减轻脂质过氧化反应造成的心肌损伤, 降低 ROS 对心肌细胞的损伤, 从病理形态及超微结构的改变, 可以观察到, 曲美他嗪可维护心肌细胞膜和线粒体的结构, 减轻 ROS 造成的心肌损伤, 维持心肌细胞的基本功能。

心力衰竭的发生发展过程中伴随着心肌能量代谢改变, 而心肌的能量代谢紊乱又直接或间接促进了心肌的重构^[9]。自“代谢重构”的概念提出以来, 优化心肌能量代谢治疗前景广阔, 在传统药物治疗的基础上, 仍可从提高能量代谢过程中获益。曲美他嗪是近年研究的热点, 它主要作用机制是通过抑制部分脂肪酸氧化, 减少 NADH 的生成, 从而降低 NADH 对 PDH 的抑制, 使心肌代谢向高效的葡萄糖氧化转变^[8]。另外, 曲美他嗪可以通过提高清除自由基的能力, 抑制脂质过氧化反应, 稳定细胞膜, 起

到保护心肌细胞、抑制心肌重构的作用^[9-10]。本研究显示曲美他嗪组 PDH mRNA 表达较模型组明显增加, 表明心肌细胞内葡萄糖氧化效率增加, 心肌能量代谢得到优化, 线粒体合成 ATP 相对增多, NADH/NADPH 系统功能改善, NADH 堆积减少, 减轻 ROS 损伤。

目前, 心力衰竭的氧化应激机制仍在研究中, 氧化应激产生 ROS 对心肌细胞的损伤毋庸置疑, 代谢治疗是有前景的治疗方法和途径, 但临床上缺乏具体的调控机制研究, 曲美他嗪改善 NADH 介导氧化应激损伤参与心力衰竭病理过程仍需进一步探讨。

参考文献

- [1] Maack C, Kartes T, Kilter H, et al. Oxygen free radical release in human failing myocardium is associated with increased activity of Rael-GTPase and represents a target for statin treatment [J]. *Circulation*, 2003, 108(1): 1567-74.
- [2] Reneev C, Bertrand M, Xavier B. Beneficial effects of endurance training on cardiac and skeletal muscle energy metabolism in heart failure [J]. *Cardiovas Res*, 2007, 73(1): 10-8.
- [3] 张莹, 史大卓. 曲美他嗪优化心肌代谢的研究进展 [J]. *医学综述*, 2015, 21(13): 2313-5.
- [4] 狄宁宁, 高海波, 孔一慧, 等. 尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶、氧化应激和心力衰竭 [J]. *心血管病学进展*, 2013, 34(3): 385-8.
- [5] 张姗姗, 王彦, 李德东, 等. NADH 和 NADPH 代谢和功能的研究进展 [J]. *第二军医大学学报*, 2011, 32(11): 1239-42.
- [6] 周丹丹, 于远望. 中医药干预氧自由基治疗心力衰竭的研究进展 [J]. *陕西中医*, 2016, 37(8): 1101-3.
- [7] 苏冠华, 孙雨霏, 卢永昕. 心力衰竭的能量代谢重构及其治疗 [J]. *国际心血管病杂志*, 2012, 39(2): 65-7.
- [8] 李大鹤, 于俊民, 张小波, 等. 优化心肌能量代谢治疗心力衰竭的研究进展 [J]. *实用临床医药杂志*, 2013, 17(23): 197-9.
- [9] Dehina L, Vaillant F, Tabib A, et al. Trimetazidine demonstrated cardioprotective effects through mitochondrial pathway in a model of acute coronary ischemia [J]. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 2013, 386(3): 205-15.
- [10] Loiacono F, Alberti L, Lauretta L, et al. Metabolic therapy for heart failure [J]. *Recenti Prog Med*, 2014, 105(7): 288-94.

Effects of trimetazidine on oxidative stress in dogs with heart failure

Huo Hong, Wang Fengrong

(*Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032*)

Abstract Objective To investigate the effect of trimetazidine on oxidative stress and morphological structure of cardiomyocytes in dogs with heart failure. **Methods** A model of heart failure was established by rapid pacing, and 15 dogs were randomly divided into 3 groups: sham operation group, model group, trimetazidine group [Intragastric

网络出版时间: 2018-5-23 14:13 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180522.1500.018.html>

白细胞介素-1 β 在类青光眼引流阀植入术后瘢痕化中的作用

张康玉, 蒋正轩, 刘超, 夏洋, 鲍颖超, 陶黎明

摘要 目的 检测白细胞介素-1 β (IL-1 β) 在类青光眼引流阀植入术后瘢痕组织中的表达水平, 明确其在瘢痕形成中的作用。方法 将 30 只新西兰大白兔随机分为硅胶组和新材料组, 分别于球结膜下植入硅胶和聚-氯对二苯 (Parylene C) 涂层包裹的聚甲基丙烯酸甲酯 (PMMA); 于术后 1、4、8 周取球结膜至巩膜全层组织, 采用苏木精-伊红 (HE) 染色检测组织中炎细胞浸润和成纤维细胞增生情况, 于高倍镜下计数成纤维细胞; 免疫组化检测 IL-1 β 蛋白的表达及组织中的定位; Western blot 法检测 IL-1 β 蛋白表达水平; 并统计分析 IL-1 β 蛋白与成纤维细胞的相关系数。结果 HE 染色显示: 硅胶组炎细胞浸润、成纤维细胞增生数量明显高于新材料组; Western blot 及免疫组化检测术后 1、4 及 8 周硅胶组的 IL-1 β 蛋白的表达明显高于新材料组 ($P < 0.05$); 免疫组化显示: IL-1 β 主要位于近巩膜面增生的成纤维细胞周围。相关性分析结果表明: 4、8 周组织中 IL-1 β 的表达水平与成纤维细胞呈正相关性 ($P < 0.05$)。结论 IL-1 β 可能在青光眼引流阀植入术后的瘢痕化形成中起促进作用。

关键词 难治性青光眼; 青光眼引流阀; 白细胞介素-1 β ; 硅胶; PMMA; Parylene C

2018-02-07 接收

基金项目: 安徽高校自然科学研究重点项目 (编号: KJ2016A340); 2017 年度高校优秀青年人才支持计划项目 (编号: gxyqZD2017033); 安徽医科大学第二附属医院火花计划 (编号: 2015hh02)

作者单位: 安徽医科大学第二附属医院眼科, 合肥 230601

作者简介: 张康玉, 女, 硕士研究生;

陶黎明, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: Lmtao9@163.com

中图分类号 R 775.9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)06-0912-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.06.018

青光眼是以视神经损伤及视功能损害为特征的一组疾病, 是世界首位不可逆转的致盲性眼病。难治性青光眼是一组病情复杂、手术成功率相对较低、术后并发症较多的眼病。目前青光眼引流阀植入术是难治性青光眼主要手术方法, 术后早期成功率约 80%, 远期成功只有约 50%^[1]。而其手术失败的主要原因为术后引流阀周围较重炎症反应及成纤维细胞增生, 导致引流阀纤维包裹, 引流受阻, 造成眼压再次升高。目前在成纤维细胞增生和瘢痕化形成中发现很多相关性标志物, 主要集中在炎性细胞因子的研究, 其中白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 具有广泛的生物学性, 被认为是最重要的炎性因子。

IL-1 β 是一种分泌型调节蛋白, 由巨噬细胞、小胶质细胞及成纤维细胞等多种细胞分泌, 是白介素-1 的主要分泌形式, 是一种重要的促炎因子, 在炎症、自身免疫性疾病及体内组织损伤修复中发挥着重要的作用。该文通过将 Parylene C 涂层包裹的 PMMA 和硅胶两种不同引流阀材料植入新西兰大白兔球结膜下, 预形成不同的瘢痕组织, 比较在不同瘢痕化的组织中 IL-1 β 蛋白的表达及其对成纤维细胞增生的影响。

administration trimetazidine 5 mg/(kg · d)] for 6 weeks. At the end of the experiment, the left ventricular myocardium was removed and the malondialdehyde (MDA) was determined by thiobarbital method. The superoxide dismutase (SOD) was determined by xanthine oxidase method, and the pyruvate was determined by RT-PCR, then the pathomorphology and myocardial ultrastructure was observed. **Results** The activity of SOD was increased but the expression of MDA were decreased in the myocardium of tramadiazine group. The expression of pyruvate dehydrogenase (PDH) mRNA was up-regulated after treated weith trimetazidine, which was higher than that in model group ($P < 0.05$). The degree of myocardial injury in tramadamide group was lower than that in model group verified by light microscope and electron microscope detection ($P < 0.05$). **Conclusion** Tramadiazine can improve oxidative stress in cardiomyocytes of heart failure dogs. The mechanism may be related to the reduction of nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) production, indirectly improving the expression of PDH mRNA, improving glucose oxidation, inhibiting lipid peroxidation, improving myocardial energy metabolism.

Key words trimetazidine; heart failure; malondialdehyde; superoxide dismutase; pyruvate dehydrogenase