

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2018.10.004

环孢素 A 预处理对离体大鼠心肌细胞凋亡及心脏 乳酸脱氢酶和 $\text{Na}^+, \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性的影响

陈璐¹, 赵鑫^{2△}

(1. 苏州大学附属第二医院麻醉科, 江苏 苏州 215004; 2. 内蒙古自治区肿瘤医院麻醉科, 内蒙古 呼和浩特 010020)

摘要:目的 探讨环孢素 A 预处理对离体大鼠心脏乳酸脱氢酶活性、心肌细胞的凋亡及 $\text{Na}^+, \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性的影响。方法 选择健康雄性 Wistar 大鼠 48 只, 按随机数字表法分为对照组(A 组), 缺血再灌注组(B 组)和环孢素 A 组(C 组), 各 16 只。所有大鼠均制备 Langendorff 离体心脏灌注模型, A 组大鼠利用 Krebs 液进行全心灌注 90 min; B 组大鼠先用 Krebs 液进行灌注, 使心脏保持在正常工作状态 30 min, 然后切换成缺血状态 30 min, 再进行灌注 30 min; C 组大鼠先用 Krebs 液进行灌注 10 min, 然后换成浓度为 0.1 mmol/L 环孢素 A 的 K-B 液进行灌注, 心脏在持续给药状态下保持正常工作 20 min, 然后切换成缺血状态 30 min, 再灌注 30 min。结果 3 组大鼠的乳酸脱氢酶活性、心肌梗死面积百分比、 $\text{Na}^+, \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性相比, 差异均有统计学意义 ($F = 42.533, 366.713, 46.279, P < 0.05$), q 检验结果显示, 任意两组之间的差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 测定数值均为 B 组 > C 组 > A 组。结论 环孢素 A 预处理可降低缺血-再灌注损伤后心肌细胞乳酸脱氢酶的活性, 减少心肌细胞的凋亡, 降低 $\text{Na}^+, \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性, 对心肌缺血-再灌注损伤有一定防护作用。

关键词:环孢素 A; 乳酸脱氢酶; 心肌细胞; 缺血-再灌注损伤; $\text{Na}^+, \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶; 心脏灌注; 离体大鼠心脏模型

中图分类号: R965.2; R979.5

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2018)10-0012-04

Effect of Cyclosporine A Pretreatment on Cardiomyocyte Apoptosis Rate, Cardiac Lactate Dehydrogenase and Activity of $\text{Na}^+, \text{K}^+ - \text{ATP}$ Enzyme in Isolated Rat Hearts

Chen Lu¹, Zhao Xin²

(1. Department of Anesthesiology, The Second Hospital Affiliated to Suzhou University, Jiangsu, Suzhou, China 215004; 2. Department of Anesthesiology, Inner Mongolia Autonomous Region Tumor Hospital, Hohhot, Inner Mongolia, China 010020)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of cyclosporine A pretreatment on cardiomyocyte apoptosis rate (CMAR), cardiac lactate dehydrogenase (LDH) and activity of $\text{Na}^+, \text{K}^+ - \text{ATP}$ enzyme in isolated rat hearts. **Methods** Totally 48 healthy male Wistar rats were selected and divided into the control group (group A), ischemia reperfusion group (group B) and cyclosporin A group (group C) according to the random number table method, 16 rats in each group. All rats were prepared Langendorff isolated cardiac perfusion models. The rats in group A were fully perfused with Krebs solution for 90 min. The rats in group B were perfused with Krebs fluid firstly to keep the heart in normal working condition for 30 min and then switched to ischemic state for 30 min, followed by perfusion for 30 min. The rats in group C were perfused with Krebs solution for 10 min and then perfused with K-B solution at a concentration of 0.1 mmol/L cyclosporine A. The heart remained in normal state for 20 min after continuous administration, and then switched to ischemic state for 30 min, followed by perfusion for 30 min. **Results** The activities of LDH, percentages of myocardial infarct area, activity of $\text{Na}^+, \text{K}^+ - \text{ATP}$ enzyme in the three groups were statistically significant ($F = 42.533, 366.713, 46.279, P < 0.05$). q test results showed that the difference between any two groups was statistically significant ($P < 0.05$), and the measured values were as follows: group B > group C > group A. **Conclusion** Cyclosporine A pretreatment can reduce the activity of LDH in myocardial cells after ischemia-reperfusion injury, reduce the CMAR and the activity of $\text{Na}^+, \text{K}^+ - \text{ATP}$ enzyme, and has a certain protective effect on myocardial ischemia-reperfusion injury.

Key words: cyclosporin A; lactate dehydrogenase; cardiomyocytes; ischemia-reperfusion injury; $\text{Na}^+, \text{K}^+ - \text{ATP}$ enzyme; myocardial perfusion; model of isolated rat heart

冠状动脉粥样硬化性心脏病(简称冠心病)的发病率和死亡率均呈逐渐升高趋势,未来有可能超过癌症等成为对我国人群危害最大的疾病^[1-2]。1960年,詹宁斯首次提出了心肌缺血-再灌注损伤的概念,心肌的持续

第一作者:陈璐(1987-),女,汉族,硕士研究生,医师,研究方向为伤害信号转导与器官损伤保护,(电子信箱)13824568686@163.com。

△通信作者:赵鑫(1988-),女,汉族,硕士研究生,医师,研究方向为伤害信号转导与器官损伤保护,(电话)0471-3280801。

性缺血会导致心肌组织出现不可逆损伤与细胞死亡,早期再灌注治疗虽可减轻心肌缺血的损伤程度,但治疗后会引起更严重的损伤,表现为心律失常、心肌梗死面积增大、持续性心室收缩功能降低等,病理变化表现为心肌细胞水肿,心肌细胞膜与细胞器被破坏,心肌纤维出现破坏性断裂及微血管损伤等^[3-4]。目前,对于心肌再灌注损伤的处理方法包括缺血后处理、缺血预处理等,但均为各类保护机制共同作用的结果,至今仍未找到有较强针对性的处理药物,也未找到相应的药物靶点^[5]。研究显示,环孢素 A 除有免疫抑制作用外,还有其他的生物学效应,可用于预防心肌缺血-再灌注损伤^[6]。为了探讨环孢素 A 对心肌缺血-再灌注的影响,本研究中选择离体大鼠心脏模型,并就环孢素 A 对乳酸脱氢酶活性,心肌细胞凋亡与 Na^+ , K^+ -ATP 酶活性的影响进行探讨。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物

选择健康雄性 Wistar 大鼠 48 只,月龄 5~12 个月,体质量 300~350 g,购自苏州大学医学部试验动物科学部,动物等级为普通级,许可证号为 SCXK2002-0001。

1.1.2 试剂与仪器

主要试剂的生产厂家和批号见表 1。Krebs 灌注液由 NaCl, KCl, KH_2PO_4 , CaCl_2 , NaHCO_3 与葡萄糖配制而成,配制完成后用 0.45 μm 滤膜滤过,灌注前向其中持续注入 95% 氧气(O_2)与 5% 二氧化碳(CO_2)。Langendorff 离体心脏灌注装置,由心脏保温室、恒温加热管、恒温水浴箱与恒流泵组成,利用恒温水流保证灌注液与心脏保温室温度保持在 $(37 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 。

表 1 主要试剂生产厂家与批号

主要试剂	生产厂家	批号
NaCl	廊坊鹏彩精细化工有限公司	20150807
KCl	廊坊鹏彩精细化工有限公司	20161217
KH_2PO_4	廊坊鹏彩精细化工有限公司	20160407
CaCl_2	廊坊鹏彩精细化工有限公司	20170102
NaHCO_3	南京甲乙信维化工有限公司	90805441
葡萄糖	南京甲乙信维化工有限公司	54122281
环孢素 A	南京甲乙信维化工有限公司	78446951
TTC	郑州派尼化学试剂厂	160807
甲醛	郑州派尼化学试剂厂	170204
高氯酸	郑州派尼化学试剂厂	161119

注:TTC 为 2,3,5-氯化三苯基四氮唑磷酸盐缓冲液。

1.2 方法

所有大鼠均先用乙醚吸入麻醉,麻醉完成后将大鼠取仰卧位,四肢伸展后固定。沿着右侧腹股沟将大鼠的皮肤剪开,于股静脉注射肝素钠,剂量为 3 U/g。沿着大鼠的肋缘下方将腹壁横向剪开,再沿胸骨的左缘将肋骨剪断,打开大鼠胸腔,充分暴露心脏。在主动脉根部上方 1 cm 处剪断血管,快速取出心脏,放置在配置好的 Krebs 液中。然后将主动脉接到 Langendorff 离体灌注装置的主动脉插管上,并进行结扎固定。打开主动脉夹,对心脏进行逆行恒压灌注,保持灌注压在 10 kPa,观察心脏自主搏动情况。Krebs 液氧分压保持在 70~73 kPa,二氧化碳分压保持在 4.8~5.8 kPa, pH 保持在 7.35~7.45。用恒温水浴维持整个灌注系统与心脏温度在 36.8~37.5 $^\circ\text{C}$ 。

按随机数字表法将大鼠分为对照组(A组),缺血再灌注组(B组)和环孢素 A 组(C组),各 16 只。A 组大鼠利用 Krebs 液进行全心灌注 90 min; B 组大鼠先用 Krebs 液进行灌注,使心脏保持在正常工作状态 30 min,然后切换成缺血状态 30 min,之后再灌注 30 min。C 组大鼠首先利用 Krebs 液进行灌注 10 min,然后换成浓度为 0.1 mmol/L 环孢素 A 的 K-B 液进行灌注,心脏在持续给药状态下保持正常工作 20 min,然后切换成缺血状态 30 min,之后再灌注 30 min。

1.3 观察指标

乳酸脱氢酶活性:收集 3 组大鼠心脏再灌注冠状动脉流出液体,利用紫外分光光度法测定其乳酸脱氢酶活性。乳酸脱氢酶活性(U/g) = $[\Delta A_{340} \times \text{反应体系体积}(\mu\text{L})] / [\text{吸光系数} \times \text{心肌质量}(\text{g}) \times 10^{-3}]$ 。采用岛津 UV-2450 型紫外/可见分光光度计进行检测,试剂盒购自南京建成生物有限公司。

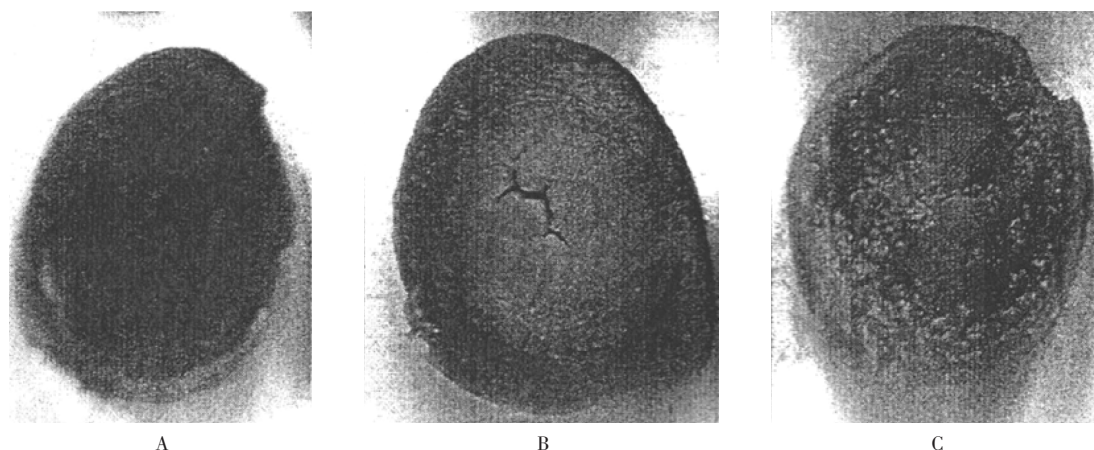
心肌梗死面积百分比:从每组随机选择 8 只大鼠的心脏,从灌注液中取出,用生理盐水进行冲洗后,将心房、血管与脂肪组织等剪除,在 -20°C 下保存 10 min,然后将心室肌制成厚度为 1 mm 的薄片,立刻放入 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)磷酸盐缓冲液中,在 37 $^\circ\text{C}$ 下避光染色 30 min,用超纯水对心肌切片清洗 3 次,放入 10% 的甲醛溶液中固定 12 h。根据颜色的界限,将心肌切片划分为 2 个区域,未出现梗死的区域为砖红色,出现梗死的区域为灰白色。利用数码相机采集心肌图片,利用制图软件进行分析,计算心肌梗死面积的百分比。心肌梗死面积百分比 = (灰白色面积/心肌片总面积) $\times 100\%$ 。

Na^+ , K^+ -ATP 酶活性:将每组剩余 8 只大鼠的心

表2 3组大鼠乳酸脱氢酶与 $\text{Na}^+, \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性比较 ($\bar{X} \pm s$)

项目	A组	B组	C组	F值	P
乳酸脱氢酶活性(U/g, $n=16$)	2.68 ± 0.81^{bc}	10.66 ± 3.70^{ac}	7.50 ± 1.97^{ab}	42.533	<0.01
$\text{Na}^+, \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性(U/mgprot, $n=8$)	122.80 ± 6.85^{bc}	165.97 ± 12.66^{ac}	138.22 ± 6.40^{ab}	46.279	<0.01

注:与A组比较,^a $P < 0.05$;与B组比较,^b $P < 0.05$;与C组比较,^c $P < 0.05$ 。



A. 对照组 B. 缺血再灌注组 C. 环孢素A组

图1 3组大鼠心肌梗死情况

脏于灌注完成后从灌流装置中取出,利用液氮中预先冷却好的 Wollenberger 夹板将心肌组织夹成冰冻薄片,在 -80°C 下冷冻干燥,利用高氯酸萃取,取匀浆液 3 000 g,离心后(试剂盒购自南京建成生物有限公司)测定 $\text{Na}^+, \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 20.0 统计学软件处理。计量资料以 $\bar{X} \pm s$ 表示,3组及以上计量数据比较采用方差分析,若结果为阳性,则利用 q 检验进行两两比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

结果见表2和图1。3组大鼠心肌梗死面积百分比分别为 $0, (33.11 \pm 4.01)\%, (24.22 \pm 1.77)\%$, 差异有统计学意义 ($F = 366.713, P < 0.05$); q 检验结果显示,任意两组大鼠间的数据差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3 讨论

环孢素A是钙调神经磷酸酶的特异性拮抗剂。目前对于该酶信号传导通路与心肌肥大、血管平滑肌细胞增殖,内皮细胞功能的作用机制的关系已基本研究清楚,但环孢素A钙调神经磷酸酶在心肌细胞凋亡过程中的具体作用机制尚有争论,尚不明确到底是促进细胞凋亡还是抑制细胞凋亡^[7-8]。心肌缺血一段时间后,在冠状动脉出现再通的情况下会加重心肌损伤,即出现心肌缺血-再灌注损伤,继而导致心肌细胞凋亡,对于患者的心功能恢复非常不利。在心肌出现再灌注时,心肌

细胞内会产生过量活性氧,直接损伤细胞壁,增加细胞膜通透性,钙离子内流,引发钙离子超载。研究结果显示,心肌细胞内的钙离子超载在心肌缺血-再灌注损伤导致的心肌细胞凋亡发病机制中有着重要作用^[9-10]。钙调神经磷酸酶的活化依赖于细胞内钙离子浓度持续升高及钙调蛋白的调节作用,故钙离子超载可以作为钙调神经磷酸酶活化的重要因素^[11]。国外研究表明^[12],将小鼠的钙调神经磷酸酶抗体基因敲除后,更易出现急性缺血引发的心肌细胞凋亡,从而提出钙调神经磷酸酶信号途径可能介导心肌细胞的凋亡。环孢素A可通过抑制钙调神经磷酸酶的活性来抑制心肌细胞的凋亡,可减轻脑缺血-再灌注后的脑梗死面积,并可抑制缺血-再灌注后的细胞凋亡。环孢素A为线粒体膜的保护剂,可抑制线粒体膜的通透性改变,稳定线粒体的膜性结构,在脑缺血出现再灌注的早期使用环孢素A可以起到较明显的线粒体保护功能。线粒体通透性的改变为缺血-再灌注后各种损失机制的焦点,也是缺血-再灌注损伤的核心环节之一。有专家推测,线粒体及其通透性的改变有可能成为预防缺血-再灌注损伤的靶点。环孢素A可影响线粒体膜通透性,稳定线粒体膜,减轻线粒体内部钙离子超载与氧自由基的生成,抑制细胞的凋亡^[13-14]。

也有研究认为,能量代谢障碍是心肌缺血-再灌注损伤的起因^[15]。缺血发生后,组织中的高能磷酸化合物逐渐减少,在发生组织再灌时,能量底物又被冲刷出来,合成高能磷酸化合物数量不足,这就对以ATP为直接

能量的心肌细胞造成严重影响。心肌一旦缺血,心肌细胞会迅速从有氧代谢转化为无氧糖酵解状态,而在此状态下,ATP的生产能力仅为有氧代谢情况下的1/18左右,导致心肌细胞内的ATP快速消耗,直接影响依赖ATP工作的细胞膜上的泵。细胞膜泵功能显著降低,细胞内的钙离子超载与氧自由基产生,进一步扩大再灌注损伤。缺血-再灌注状态下, Na^+ , K^+ -ATP酶的活性受到冲击,其应激反应的结果就是从原始状态被激活,促使能量代谢加速,并调节细胞内各种离子浓度的平衡,分解ATP,降低细胞内的能量储备。环孢素A可抑制 Na^+ , K^+ -ATP酶活性,其作用机制:一是能激活体内与体外的蛋白激酶C(PKC),而PKC可抑制细胞膜上 Na^+ , K^+ -ATP酶的活性;二是可抑制体内血管紧张素Ⅱ与醛固酮,而这2个激素是可以激活泵活性的激素;三是环孢素A属亲脂性物质,易进入细胞膜,可通过该种方式影响膜外侧脂类构造,继而影响膜的流动性^[16]。另外,环孢素A可抑制钙调神经磷酸酶的活性,降低 Na^+ , K^+ -ATP酶活性,导致后者对于ATP的分解能力降低,其结果就是细胞内部保留的磷酸腺苷水平上升^[17]。

乳酸脱氢酶可以催化丙酮酸与NADH生成乳酸与 NAD^+ ,在反应过程中NADH脱氢转化为 NAD^+ ,而NADH在340 nm波长处有光吸收,在此波长处 NAD^+ 无光吸收。所以,通过在340 nm波长(A_{340})处光吸收的减少情况对乳酸脱氢酶活性进行测定。未出现梗死的心肌细胞,其脱氢酶可以将TTC还原呈现红色,心肌组织呈现出砖红色,但梗死的心肌细胞的细胞膜出现破坏,脱氢酶外漏,无法将TTC还原,所以心肌组织呈现灰白色。 Na^+ , K^+ -ATP酶为P型ATP酶,在生物膜上广泛分布,ATP酶可以分解ATP,产生ADP与无机磷,故对无机磷的测定可以判定ATP酶的活力。因此,本研究中通过乳酸脱氢酶活性与心肌梗死面积2个指标衡量缺血再灌注心肌损伤程度。结果显示,环孢素A的使用明显降低了缺血-再灌注心肌梗死的面积,乳酸脱氢酶活性,以及 Na^+ , K^+ -ATP酶活性($P < 0.05$),提示环孢素A可以延缓心肌缺血造成的损伤,对心肌细胞具有防护作用。

综上所述,环孢素A预处理可减少缺血-再灌注损伤后心肌细胞乳酸脱氢酶的活性,减少心肌细胞凋亡,降低 Na^+ , K^+ -ATP酶的活性,对心肌缺血-再灌注损伤有一定预防和保护作用。

参考文献:

- [1] 关丽,张玉婷,李文军,等. 曲美他嗪治疗冠状动脉粥样硬化性心脏病合并心功能不全临床研究[J]. 中国药业,2017,26(3):39-41.
- [2] 戴路刚. 地尔硫卓和硝酸甘油用于经桡动脉介入治疗冠心病疗效评价[J]. 中国药业,2016,25(18):51-54.
- [3] 杨冬,梁贵友. 长链脂酰辅酶A与心肌缺血再灌注损伤胰岛素抵抗的研究进展[J]. 中华实验外科杂志,2017,34(1):177-180.
- [4] 梁启恒,夏中元,苏娃婷,等. N-乙酰半胱氨酸对糖尿病大鼠心肌缺血再灌注损伤时Cav-3表达的影响[J]. 中华麻醉学杂志,2017,37(2):224-226.
- [5] 宋瑾,王超,阳仁达,等. 电针内关穴预处理对心肌缺血再灌注损伤大鼠线粒体膜电位、腺苷A1受体的影响[J]. 湖南中医药大学学报,2017,37(4):402-405.
- [6] 欧阳资章,刘晓萍,陈方,等. 坏死性凋亡特异性抑制剂抗环孢素A致坏死性凋亡的机制研究[J]. 中国药业,2016,25(13):10-12.
- [7] 王永,施丹,蔡琦霞,等. 健心颗粒对慢性心力衰竭大鼠Ca_vmRNA、U₂RNA表达的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2017,15(2):158-161.
- [8] 谢锐,冯洋洋,温跃桃,等. RCAN1及CnA在下肢闭塞性动脉硬化支架术后再狭窄组织中的表达及意义[J]. 上海交通大学学报(医学版),2017,37(3):298-304.
- [9] 周叶萍. 阿托伐他汀对心肌缺血再灌注损伤病人内皮前体细胞及血管功能的保护作用[J]. 陕西医学杂志,2017,46(4):471-473.
- [10] 王日军,王敬萍,徐继尧,等. 姜黄素对缺血再灌注损伤大鼠心肌线粒体呼吸链的影响[J]. 中国心血管病研究,2017,15(4):377-380.
- [11] 邓娜,夏桂玲,杨龙,等. AT1R-Ca_v信号通路在乳鼠肥大心室肌细胞Nav1.5蛋白表达调控中的作用[J]. 中国病理生理杂志,2017,33(2):221-226.
- [12] Bueno OF, Lips DJ, Kaiser RA, et al. Calcineurin A β gene targeting predisposes the myocardium to acute ischemia-induced apoptosis and dysfunction[J]. Circ Res, 2004 Jan 9, 94(1):91-99.
- [13] 夏乐敏,郑秦,张爱萍,等. 线粒体途径在免疫性骨髓衰竭性血小板凋亡中的作用机制研究[J]. 中国实验血液学杂志,2017,25(1):176-180.
- [14] 黄军祥,胡咏梅,石海,等. 环孢素A对人胃癌MGC80-3细胞周期影响以及诱导其凋亡相关机制的研究[J]. 安徽医科大学学报,2017,52(2):169-173.
- [15] 乔钰惠,孟增慧,郭丽君,等. 心肌缺血再灌注损伤的机制和治疗[J]. 基础医学与临床,2015,35(12):1666-1671.
- [16] 李明琰,何文凯,崔永生,等. Ad-HIF-1 α 双突变体对大鼠缺血心肌及 Na^+ , K^+ -ATP酶的影响[J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版),2016,37(6):476-480.
- [17] 孙凡,鲍红光,斯妍娜,等. 海马亲环素D在大鼠脓毒症相关性脑病中的作用[J]. 中华麻醉学杂志,2016,36(3):380-383.

(收稿日期:2017-11-28;修回日期:2018-01-14)