

童晓红,查锦芬,丁家望,等. 探讨活化蛋白 C 对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及机制的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(2): 103-107.

Tong XH, Zha JF, Ding JW, et al. Investigation of the protective effect and mechanism of activated protein C on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(2): 103-107.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020.02.016

# 探讨活化蛋白 C 对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及机制的影响

童晓红<sup>1</sup>, 查锦芬<sup>2\*</sup>, 丁家望<sup>1</sup>, 李松<sup>1</sup>, 李稳慧<sup>1</sup>, 吴辉<sup>1</sup>, 陈勇<sup>1</sup>

(1.宜昌市中心人民医院心内科,湖北宜昌 443003; 2.宜昌市第一人民医院妇产科,湖北宜昌 443003)

**【摘要】** 目的 探讨活化蛋白 C (APC) 对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用与机制。方法 纳入 30 只雄性 SD 大鼠随机分为假手术组 (10 只)、I/R 组 (10 只) 和 APC 处理组 (10 只)。结扎左冠状动脉前降支 60 min, 再灌注 6 h 制作心肌缺血再灌注模型; 以 ELISA 和免疫组织化学法分别检测 TNF- $\alpha$ 、心肌组织 MPO 和 ICM-1 的表达水平; HE 染色检测各组心肌病理学改变情况。结果 与假手术组相比, I/R 组的 TNF- $\alpha$  和 MPO、ICM-1 的表达水平均明显增加 ( $P < 0.01$ ); 与 I/R 组比较, APC 组的 TNF- $\alpha$  和 MPO、ICM-1 的表达水平均明显降低 ( $P < 0.01$ ), 而在光镜下观察炎性细胞浸润的情况, I/R 组最为明显, APC 组较 IR 组明显减轻。结论 APC 对心肌缺血再灌注损伤有保护作用, 其机制可能与抑制炎性因子的表达, 减轻组织炎性细胞浸润有关。

**【关键词】** 活化蛋白 C; 心肌再灌注损伤; TNF- $\alpha$ ; 炎性因子

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 02-0103-05

## Investigation of the protective effect and mechanism of activated protein C on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats

TONG Xiaohong<sup>1</sup>, ZHA Jinfen<sup>2\*</sup>, DING Jiawang<sup>1</sup>, LI Song<sup>1</sup>, LI Wenhui<sup>1</sup>, WU Hui<sup>1</sup>, CHEN Yong<sup>1</sup>

(1. Department of Cardiology, Yichang Central People's Hospital, Yichang 443003, China. 2. Department of Obstetrics and Gynecology, Yichang First People's Hospital, Yichang 443003)

**【Abstract】 Objective** To investigate the protective effect and mechanism of activated protein C (APC) on myocardial ischemia reperfusion injury in rats. **Methods** Thirty male SD rats were randomly divided into sham operation group (10), I/R group (10) and apc-treated group (10). The anterior descending branch of the left coronary artery was ligated for 60 min, and the myocardial ischemia reperfusion model was established 6 h after reperfusion. The expression levels of TNF- $\alpha$ , MPO and ICM-1 were detected by ELISA and immunohistochemistry. HE staining was used to detect the changes of myocardial pathology in each group. **Results** Compared with the sham group, the expression of TNF- $\alpha$ , MPO and ICAM-1 were increased significantly in the I/R group ( $P < 0.01$ ); but compared with the I/R group, the expression of TNF- $\alpha$ , MPO and ICAM-1 were obviously decreased in the APC group ( $P < 0.01$ ). **Conclusions** APC has a protective effect on myocardial I/R injury, in a mechanism that may involve inhibiting the expression of inflammatory factors and reducing the infiltration of inflammatory cells.

**【Keywords】** APC; myocardial reperfusion injury; TNF- $\alpha$ ; inflammatory factor

[作者简介] 童晓红 (1983—), 女, 硕士, 主治医师, 研究方向: 心肌缺血再灌注。E-mail: hx604302@163.com

[通信作者] 查锦芬 (1983—), 女, 硕士, 主治医师, 研究方向: 妊娠心血管疾病。E-mail: lg224158@163.com

缺血再灌注损伤(ischemia reperfusion, I/R)一直是心肌缺血治疗难以解决的问题,迄今为止,临床用来治疗心肌缺血再灌注损伤的药物仍存在一定的局限性<sup>[1]</sup>。心肌缺血再灌注损伤(MIRI)指冠状动脉部分、完全急性阻塞后再通时,缺血心肌虽可恢复正常灌注,但其组织损伤反而加重<sup>[1-2]</sup>。缺血期患者心肌超微结构、心功能等出现损伤,可诱发心律失常、心肌细胞坏死、心肌组织损伤、心肌收缩功能的减退等,并且再灌注时产生的氧自由基会进一步加重心肌损伤,甚至可发生严重的心律失常而导致猝死。虽然缺血预处理被证实是减轻 I/R 损伤的有效方法之一,但多种原因导致其临床应用受限<sup>[2]</sup>。近年药物预处理成为 I/R 损伤研究的热点。蛋白 C 系统为机体重要的抗凝系统,由活化蛋白 C 抑制物(APCI)、血浆蛋白 C(PC)、蛋白 S(PS)和血栓调节素(TM)组成,其中 PC 是该系统发挥抗凝效应的重要部分。活化蛋白 C(APC)是一种天然的抗凝剂,APC 可选择性灭活 FV<sub>a</sub>、FVIII<sub>a</sub> 及纤溶酶原激活物抑制物(PAI),从而发挥强大的抗凝和促纤溶作用。APC 作为心肌细胞磷脂酰肌醇信号转导系统的重要组成部分,参与了心肌缺血再灌注损伤,心肌缺血再灌注时 PKC 活性显著增强除了抗凝作用外,它还能通过抑制炎症因子的转录与表达,达到抗炎作用,还能通过抑制细胞的凋亡过程有效的预防心肌缺血再灌注损伤<sup>[3-5]</sup>。本实验探讨 APC 对心肌缺血再灌注损伤的影响

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

纳入 30 只体重为 220~250 g 的 SPF 级雄性 SD 大鼠,8 周龄;购自三峡大学实验动物中心[SCXK(鄂)2011-0012],所有实验操作均在三峡大学第一临床医学院实验室[SYXK(鄂)2011-0061]进行,在温度(22±2)℃,湿度(60±10)%和光照(12 h 光照和 12 h 黑暗循环)条件下,将所有实验大鼠喂养在无特定病原体的动物房中。每个笼子最多容纳 5 只大鼠,每 4~6 天更换 1 次。同时经过我院委员会的批准,并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

### 1.2 主要试剂与仪器

MPO 试剂盒购买自上海远慕生物科技有限公司(货号:ym-sx1873);TNF-α 试剂盒购买自上海生物科技有限公司(货号:f00473);ICAM-1 试剂盒购买自上海雅吉生物科技有限公司(货号:iM-05687b);APC 购买自上海春麦生物科技有限公司(货号:enz-349)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 动物分组及模型的制作

30 只 SD 大鼠随机分为 APC 组、缺血再灌注(I/R)组和假手术(Sham)组,各 10 只。APC 组:将 APC 100 U<sub>g</sub>/kg 溶于 1 mL 生理盐水中,再灌注前 5 min 通过颈外静脉注射。I/R 组和假手术组注射等体积生理盐水。

按文献<sup>[6]</sup>复制模型,腹腔注射 3%戊巴比妥钠(剂量为 30 mg/kg)麻醉大鼠,切开气管,插管连接微型动物呼吸机。参数:潮气量 20 mL/kg,呼吸频率每分钟 50 次,呼吸时比为 1:1。用大头针将四肢皮下穿刺,然后连接心电图机记录一段,对照为正常心电图。开胸、暴露心脏。APC 组和 I/R 组用 5/0 缝线在左冠状动脉前降支根部穿线,在前降支上垫一塑料管一同结扎,缺血 60 min 后,剪断结扎线再灌注 6 h。假手术组仅在左前降支下穿线不结扎。手术完成,每组随机选取 5 只大鼠进行心肌梗死面积的检测,其余大鼠用于病理切片检测相关指标。

#### 1.3.2 标本的收集

再灌注 6 h 末,经下腔静脉采血 3 mL,常温下静置 20 min,以 3000 r/min 离心 10 min,提取血清,置于-20℃冰箱保存;将心脏迅速剪下,并且用生理盐水进行冲洗,将靠近心尖部分的心肌组织放在 10%福尔马林中进行固定 24 h,采用常规石蜡进行包埋。另一块快速放入液氮中进行速冻,-80℃保存<sup>[7]</sup>。

#### 1.3.3 指标检测

心肌组织石蜡切片,常规二甲苯脱蜡。切片经脱蜡后,参照 ICAM-1 试剂盒说明书用 SP 法进行免疫组化染色,光镜下每张切片随机选择 5 个高倍视野进行半定量分析<sup>[8]</sup>。用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定血清 TNF-α 的浓度,采用硫代巴比妥酸比色法测定心肌组织 MPO 的水平;HE 染色观察各组心肌组织病理学改变。

## 1.4 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件处理, 计量资料均以平均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示, 采用 $\chi^2$ 及  $t$  检验,  $P<0.05$ , 差异有统计学意义

## 2 结果

### 2.1 心肌梗死面积比较

与假手术组比较, I/R 组和 APC 组大鼠心肌梗死面积明显增加( $P<0.01$ ), 而 APC 组大鼠心肌梗死面积较 I/R 组明显减少( $P<0.05$ ) (见表 1)。

### 2.2 血清 TNF- $\alpha$ 水平和心肌组织 MPO 水平的测定

与假手术组比较, I/R 组和 APC 组血清 TNF- $\alpha$  的水平明显升高( $P<0.01$ ), 而 APC 组 TNF- $\alpha$  的水平较 I/R 组明显降低( $P<0.01$ )。在 I/R 组和 APC 组心肌组织 MPO 的水平与假手术组比较明显升高( $P<0.01$ ); 与 I/R 组比较, APC 组心肌组织 MPO 水平明显降低( $P<0.05$ ) (见表 2)。

### 2.3 心肌组织 ICAM-1 免疫组化染色

与假手术组比较, I/R 组和 APC 组 ICAM-1 的表达水平明显升高( $P<0.05$ ) 与 I/R 组比较, APC 组心肌组织 ICAM-1 的表达明显减少( $P<0.05$ ), (见图 1A、1B)。

### 2.5 HE 染色观察各组心肌组织病理学变化

再灌注 6 h 后, 假手术组未见炎性细胞浸润, 心肌细胞包膜完整; 与 I/R 组比较, APC 组心肌组织炎性细胞浸润明显减少 (见图 2)。

## 3 讨论

心肌缺血再灌注能够触发急性炎症反应所具备条件, 包括补体激活, 心肌内化学因子和细胞因子产生, 细胞外基质降解和细胞死亡, 活性氧生成和微血管通透性增强<sup>[9]</sup>。近年来有关心肌缺血再灌注损伤等血栓性疾病与活化蛋白 C 密切相关。活化蛋白 C 是人体重要抗凝因子, 其缺乏可导致血栓性疾病; 凝血酶和血栓调节蛋白相互结合时可以激活 APC, 从而达到抗凝效果。血浆 PC 系统主要包括血浆蛋白 C、PS、APCI 和 TM 等, 当凝血酶与 TM 结合形成复合物时可激活 PC, 灭活 F V a/FVIIIa, 达到抗凝及促纤溶目的。PS 为辅因子可加强 PC 活性, APCI 可降低 PC 活性。研究表明, 心肌缺血再通后血小板聚集率明显增高。患者若出现心肌缺血, 血浆中 TM 含量大幅度上升, 与凝血酶形成复合物, 消耗血浆 APC, 同时活化的血小板释放大量 APC 抑制血浆 APC 活性。冠状动脉再灌注后血流急剧增加, 血液呈高凝状态, 抗凝系统活化, 进而激活 APC, 血浆 FPS 代偿增多以抵抗高凝状态。

APC 是存在于血浆中的维生素 K 依赖性的胰凝乳蛋白酶原, 生理情况下是血液中的主要抗凝成分, 同时近年来的研究显示其具有抗炎、抗凋亡及保护内皮屏障的功能。它的细胞保护效应可以中和细胞损伤, 使细胞得以存活并且其效应的发挥依细胞和损伤类型的不同而不同, 主要表现为抗炎、抗凋亡、改变基因表达谱和稳定内皮细胞屏

表 1 各组大鼠心肌梗死面积的比较( $\bar{x}\pm s$ )

Table 1 Comparison of myocardial infarct size in each group of rats

组别 Groups	梗死心肌/危险区心肌 IR/AAR Infarction area/area at risk	梗死心肌/左心室面积 IR/LV Infarction area/left ventricular
假手术组 Sham group	0	0
I/R 组 Ischemia-reperfusion group	61.70 $\pm$ 9.97*	45.59 $\pm$ 5.69*
APC 组 Activated protein C group	43.76 $\pm$ 5.50 $\Delta$	29.19 $\pm$ 2.41 $\Delta$

注: 与假手术组比较, \* $P<0.05$ ; 与 I/R 组比较,  $\Delta P<0.01$ 。

Note. Compared with the sham operation group, \* $P<0.05$ . Compared with the I/R group,  $\Delta P<0.01$ .

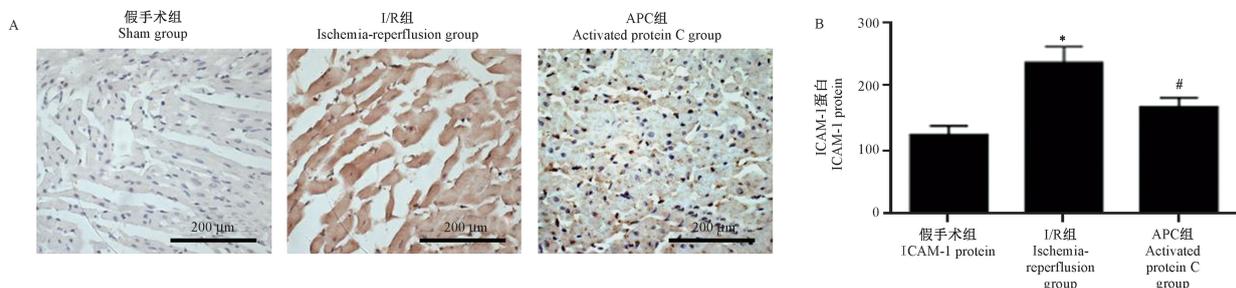
表 2 各组血清 TNF- $\alpha$  水平及心肌组织 MPO 含量的比较( $\bar{x}\pm s$ )

Table 2 Comparison of serum TNF- $\alpha$  levels and MPO protein expressions in myocardial tissue in each group of rats

组别 Groups	肿瘤坏死因子- $\alpha$ (pg/mL) TNF- $\alpha$	髓过氧化物酶(U/g) MPO
假手术组 Sham group	25.32 $\pm$ 3.69	2.01 $\pm$ 0.25
I/R 组 Ischemia-reperfusion group	69.49 $\pm$ 5.78*	13.75 $\pm$ 1.53*
APC 组 Activated protein C group	41.56 $\pm$ 4.77 $\Delta$	7.84 $\pm$ 1.36 $\Delta$

注: 与假手术组比较, \* $P<0.01$ ; 与 I/R 组比较,  $\Delta P<0.01$ 。

Note. Compared with the sham operation group, \* $P<0.05$ . Compared with the I/R group,  $\Delta P<0.01$ .



注:与假手术组比较,\* $P<0.05$ ;与I/R组比较,# $P<0.01$ 。

图1 心肌组织 ICAM-1 免疫组化染色

Note. Compared with the sham group, \* $P<0.05$ . Compared with the I/R group, # $P<0.01$ .

Figure 1 Myocardial tissue ICAM-1 immunohistochemical staining

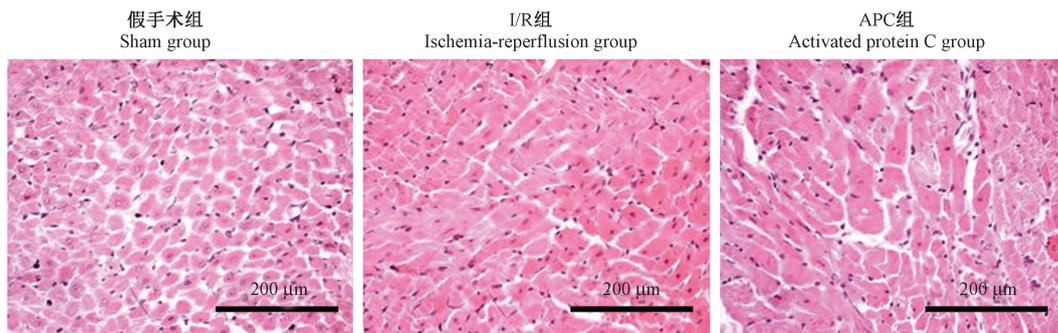


图2 心肌组织 HE 染色

Figure 2 HE staining of myocardial tissue

障的功能。炎症是机体的防御性反应,主要表现为血流速度加快、血管通透性增加。中性粒细胞在化学趋化因子的作用下渗出血管外在受损组织大量集聚浸润同时释放大量炎症因子如 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, NO, 诱导 TNF 的表达导致了大量的凝血酶的产生,这些反应修复现存的组织损伤同时造成进一步的损伤;使凝血和抗凝血平衡紊乱从而促进血栓形成和炎症反应。机体可释放 IL-4、IL-10 产生进一步代偿炎症反应。在人体内,活化蛋白 C 可以减少白细胞与选择素的连接从而抑制中性粒细胞在体内的活化和白细胞产物的定位;抑制核因子 NF- $\kappa$ B 的核转移从而减少单核细胞炎症因子如 TNF- $\alpha$  的释放;通过内皮蛋白 C 受体(EPCR)减少白细胞释放的促炎细胞因子;通过抑制凝血酶的生成和功能的发挥从而间接抑制其促炎效应;促进纤维蛋白溶解,防止血栓形成,减轻炎症反应。活化蛋白 C 与内皮蛋白 C 受体结合,激活蛋白激酶活化受体-1 (PAR-1),从而激活上皮-间质细胞转化因子(SIP-1)转录,活化内皮生长因子-1,减少 TNF- $\alpha$  诱导的细胞凋亡。活化蛋白 C 可抑制凋亡基因表达,促进细胞的增殖。研究表明其亦可以通过蛋白激酶活

化受体复合物阻碍细胞凋亡诱导因子-1 转录,增加抗凋亡基因 Bcl-2、凋亡蛋白抑制物的表达,抑制 Caspase-3、Caspase-9、P21 及 P53 等诱导的细胞凋亡。研究表明其亦可以通过蛋白激酶活化受体复合物阻碍细胞凋亡诱导因子-1 转录,从而诱导细胞凋亡。本研究发现再灌注 6 h 心肌组织中有明显的炎症反应,而与对照组比较,APC 组的心肌损伤、炎症细胞浸润有所减轻。相关表明 APC 能够改善大鼠肾脏缺血再灌注损伤肾血流量,减少白细胞在肾组织的浸润、迁移,降低维持肾小球通过性的稳定和再灌注组织内纤维素沉积<sup>[10-11]</sup>。相关研究表明 APC 能够通过下调血浆髓过氧化物酶、IL-8、TNF- $\alpha$  水平,来改善受损骨骼肌的电生理作用<sup>[12-13]</sup>。TNF- $\alpha$  是一种重要的炎症因子,它能刺激血管内皮细胞表达黏附分子,并促进产生中性粒细胞趋化因子<sup>[14-15]</sup>。本次研究我们发现 APC 能明显降低再灌注血清 TNF- $\alpha$  的水平,同时减少心肌组织中 MPO 的含量,降低了 ICAM-1 的表达水平,减少了炎症细胞与血管内皮的接触机会,在心肌缺血再灌注中具有抗炎作用。

在凝血酶-血栓调节蛋白复合物的作用下蛋白

C 所形成的 APC 具有抗凝、抗炎、粗纤溶以及抗凋亡和保护内皮的功能。它通过调节炎症因子的产生,降低血管内皮细胞 ICAM-1 的表达来减轻炎症损伤。目前 APC 已被广泛用于脓毒症的治疗,降低了全身炎症反应的病死率<sup>[16]</sup> 同样本次研究也证实了 APC 通过抑制缺血再灌注的炎症反应明显改善再灌注后的心肌损伤。同时为心肌缺血再灌注损伤临床干预提供新的途径。

#### 参考文献:

- [ 1 ] 徐盟. 心肌缺血再灌注损伤的主要机制与相关药物治疗的研究进展 [J]. 实用药物与临床, 2014, 17(8): 1052-1056.
- [ 2 ] Schlegel M, Granja T, Kaiser S, et al. Inhibition of neogenin dampens hepatic ischemia-reperfusion injury [J]. Crit Care Med, 2014, 42(9): 610-619.
- [ 3 ] Bouwens EAM, Stavenuiter F, Mosnier LO, et al. Mechanisms of anticoagulant and cytoprotective actions of the protein C pathway [J]. J Thromb Haemost, 2013, 11(1): 242-253.
- [ 4 ] Healy LD, Puy C, Fernández, et al. Activated protein C inhibits neutrophil extracellular trap formation in vitro and activation in vivo [J]. J Biol Chem, 2017, 292(21): 8616-8629.
- [ 5 ] Althawadi H, Alfarsi H, Besbes S, et al. Activated protein C upregulates ovarian cancer cell migration and promotes unclottability of the cancer cell microenvironment [J]. Oncol Rep, 2015, 34(2): 603-609.
- [ 6 ] Jiang R, Zatta A, Kin H, et al. PAR-2 activation at the time of reperfusion salvages myocardium via an ERK1/2 pathway in vivo rat hearts [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007, 293(5): 2845-2852.
- [ 7 ] 赵军, 郑世营, 顾振纶. Caspase-3 特异性抑制剂对缺氧诱导鼠心肌细胞凋亡的影响 [J]. 中华实验外科杂志, 2004, 21(9): 1037-1039.
- [ 8 ] Guo J, Zhang H, Xia J, et al. Interleukin-1 $\beta$  induces intercellular adhesion molecule-1 expression, thus enhancing the adhesion between mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells via the p38 MAPK signaling pathway [J]. Int J Mol Med, 2018, 41(4): 1976-1982.
- [ 9 ] Wang W, Mckinnie SMK, Patel VB, et al. Loss of apelin exacerbates myocardial infarction adverse remodeling and ischemia-reperfusion injury: therapeutic potential of synthetic apelin analogues [J]. J Am Heart Assoc, 2013, 2(4): 249.
- [ 10 ] Almac E, Johannes T, Rick Bezemer. Activated protein C ameliorates impaired renal microvascular oxygenation and sodium reabsorption in endotoxemic rats [J]. Intensive Care Med Exp, 2013, 1(1): 24-35.
- [ 11 ] 陈忠宝, 周江桥, 邱涛, 等. 别嘌醇预处理对大鼠肾脏缺血-再灌注损伤中 Bax、Bcl-2 及 Caspase-3 表达的影响 [J]. 器官移植, 2016, 7(2): 139-143.
- [ 12 ] Wang J, Li J. Activated protein C: a potential cardioprotective factor against ischemic injury during ischemia/reperfusion [J]. Am J Transl Res, 2009, 1(4): 381-392.
- [ 13 ] Dillon JP, Laing AJ, Cahill RC, et al. Activated protein C attenuates skeletal muscle ischaemia reperfusion injury [J]. J Surg Res, 2003, 114(2): 248.
- [ 14 ] Zhu L, Carretero OA, Xu J, et al. Activation of angiotensin II type 2 receptor suppresses TNF- $\alpha$ -induced ICAM-1 via NF- $\kappa$ B: possible role of ACE2 [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2015, 309(5): 827-834.
- [ 15 ] Kleinbongard P, Heusch G, Schulz R. TNF $\alpha$  in atherosclerosis, myocardial ischemia/reperfusion and heart failure [J]. Pharmacol Ther, 2010, 127(3): 295-314.
- [ 16 ] Griffin JH, Berislav VZ, Mosnier LO. Activated protein C: biased for translation [J]. J Blood, 2015, 125(19): 2898-2907.

[ 收稿日期 ] 2019-07-02