

卢迎宏, 王丹, 井海云, 等. 胰激肽原酶缓解心肌缺血再灌注损伤大鼠氧化应激和纤维化 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(3): 23-30.

Lu YH, Wang D, Jing HY, et al. Pancreatic kininogenase relieves oxidative stress and fibrosis in rats with myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(3): 23-30.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 03. 004

胰激肽原酶缓解心肌缺血再灌注损伤大鼠 氧化应激和纤维化

卢迎宏, 王 丹, 井海云*, 王梦超, 李智慧

(郑州大学附属郑州中心医院心血管内科, 郑州 450007)

【摘要】 目的 文章探讨胰激肽原酶对心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌损伤、氧化应激和纤维化的影响。**方法** SD 雄性大鼠分为假手术组、模型组、模型加药组。检测并记录各组大鼠心率 (HR)、左室收缩压 (LVSP) 和短轴缩短率 (FS)。HE 染色观察心肌病理损伤程度。ELISA 检测肌酸激酶同工酶 (CK-MB)、肌红蛋白 (Mb) 和心肌肌钙蛋白 I (cTnI) 含量。试剂盒检测超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA) 和谷胱甘肽 (GSH) 含量。Western blot 检测线粒体途径凋亡相关蛋白和纤维化标记蛋白表达水平。Masson 染色观察心肌组织纤维化。RT-PCR 检测 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA)、转化生长因子- β 1 (TGF- β 1) 和纤维结合蛋白 (FN) 表达水平。**结果** 与模型组比, 3、6 U/kg PKase 组大鼠 HR、LVSP 和 FS 显著升高 ($P < 0.05$), 心肌组织病理损伤明显改善, CK-MB、Mb、cTnI 和 MDA 含量显著降低 ($P < 0.05$), SOD 和 GSH 含量升高 ($P < 0.05$), 心肌纤维化程度明显得到改善, Bax/Bcl-2、cas-9、cas-3、 α -SMA、TGF- β 1、FN 表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。**结论** 胰激肽原酶缓解心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌损伤、氧化应激和纤维化。

【关键词】 胰激肽原酶; 心肌缺血再灌注; 氧化应激; 纤维化

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 03-0023-08

Pancreatic kininogenase relieves oxidative stress and fibrosis in rats with myocardial ischemia-reperfusion injury

LU Yinghong, WANG Dan, JING Haiyun*, WANG Mengchao, LI Zhihui

(Department of Cardiology, Zhengzhou Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou 450007, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of pancreatic kininogenase on myocardial injury, oxidative stress, and fibrosis in rats with myocardial ischemia-reperfusion injury. **Methods** SD rats were divided into sham, model and drug-treated groups. The heart rate (HR), left ventricular systolic pressure (LVSP), and short-axis contraction rate (FS) of rats were measured in each group. HE staining was used to detect myocardial pathological lesions. ELISA were used to detect the contents of creatine kinase isoenzyme (CK-MB), myoglobin (Mb) and cardiac troponin I (cTnI). Assay kits were used to detect the contents of superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), and glutathione (GSH). Western blot was used to assay the expression levels of mitochondrial pathway apoptosis-related and fibrosis marker proteins. Masson staining was used to observe myocardial tissue fibrosis. RT-PCR was used to assay the expression levels of α -smooth muscle actin (α -SMA), transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and fibronectin (FN). **Results** Compared with the model group, HR, LVSP and FS in 3 and 6 U/kg PKase groups were significantly increased ($P < 0.05$), pathological damage of myocardial tissue was significantly improved, the contents of CK-MB, Mb, MDA and cTnI were significantly reduced ($P < 0.05$), SOD and GSH contents were increased ($P < 0.05$), the degree of myocardial fibrosis was significantly improved, Bax/Bcl-2, cas-

[基金项目] 河南省医学科技攻关计划项目 (2017T02093)。

[作者简介] 卢迎宏 (1980—), 女, 本科, 副主任医生, 研究方向: 心血管内科, 心力衰竭。E-mail: luyinghong2020@163.com

[通信作者] 井海云 (1966—), 女, 本科, 主任医师, 研究方向: 心内科。E-mail: zjf-lyh@163.com

9, cas-3, α -SMA, TGF- β 1 and FN levels were reduced significantly ($P < 0.05$). **Conclusions** Pancreatic kininogenase relieves myocardial injury, oxidative stress and fibrosis in rats with myocardial ischemia-reperfusion injury.

【Keywords】 pancreatic kininogenase; myocardial ischemia reperfusion; oxidative stress; fibrosis

心肌缺血再灌注损伤是指心肌缺血一定时间后得到正常灌注,心肌组织损伤却呈进行性加重的病理过程,严重时可导致猝死^[1-2]。研究表明,心肌缺血再灌注损伤是由心肌组织细胞中大量产生氧自由基、钙离子超负荷及白细胞的炎症作用等所引起的,具体的发病机制有待进一步研究^[3]。目前,临床上治疗心肌缺血再灌注损伤的方法主要有基因治疗、缺血后适应治疗和药物靶向治疗等^[4-6]。药物靶向治疗在心肌缺血再灌注损伤中的应用已见成效,例如他汀类药物、降糖药、促红细胞生成素等^[7]。胰激肽原酶(PKase)又称胰激肽释放酶,是哺乳动物胰腺等器官中提取的一种蛋白水解酶,具有血管舒张、改善血液循环和微循环、防止血栓形成等作用。已有研究报道,胰激肽原酶在糖尿病肾病中发挥抗氧化应激、抗炎反应及抗组织纤维化等重要调控作用^[8-9],但胰激肽原酶在心肌缺血再灌注损伤中的作用尚不知晓。因此,本研究通过建立心肌缺血再灌注损伤大鼠模型,探究胰激肽原酶在大鼠心肌损伤、心肌氧化应激和纤维化中的作用,为心肌缺血再灌注损伤的临床诊断与治疗提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

50 只无特定病原体(SPF)级 SD 大鼠,雄性,6~7 周龄,体重 220~250 g。由河南省实验动物中心提供[SCXK(豫)2017-0001],本研究所有动物实验操作完全遵守实验动物伦理保护法及 3R 原则,并经郑州中心医院相关动物实验伦理委员会批准通过(ZXYY20200703)。实验动物饲养于郑州大学实验动物中心[SYXK(豫)2020-0008],动物饲养条件:每只大鼠给予 12 h 光照/黑暗循环,自由获取水和标准饮食,(20 $\pm$ 2)℃和(60 $\pm$ 5)%湿度环境下饲养。

1.2 主要试剂与仪器

胰激肽原酶(高纯,50 U/mg)购自上海源叶生物科技有限公司(货号 S10219);HE 试剂盒(C0105S)购自碧云天生物科技有限公司;大鼠肌酸激酶同工酶 MB(CK-MB)(ml059533)、肌红蛋白(Mb)(ml003054)、心肌肌钙蛋白 I(cTn-I)(ml003145)ELISA 试剂盒购自上海酶联生物科技

有限公司;SOD(A001-3-2)、MDA(A003-1-2)和 GSH(A005-1-2)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所有限公司;Masson 染色试剂盒(G1340)、BCA 蛋白定量试剂盒(PC0020)、PT-PCR 试剂盒(RP1100)均购自北京索莱宝科技有限公司;Bax(ab32503)、Bcl-2(ab182858)、cas-9(ab184786)、cas-3(ab184786)、 α -SMA(ab124964)、TGF- β 1(ab215715)和 FN(ab268020)兔单克隆抗体和 HRP 标记的对应二抗均购自英国 Abcam 公司。

心脏超声诊断仪(Vivid7)购自美国 GE 公司;ABI7500 Real-time PCR 系统(Applied Biosystems);酶标仪(RT6100)购自深圳雷杜生命科学股份有限公司;台式高速离心机(D3024R)购自大龙兴创实验仪器(北京)股份公司;成像系统(Tanon-1600R)购自上海天能科技有限公司,光学显微镜(Nikon Eclipse E100)购自日本尼康公司。

1.3 实验方法

1.3.1 动物实验

50 只大鼠随机分为假手术组、模型组、模型加药组共 5 组($n = 10$)。建模:模型组和模型加药组大鼠采用左冠状动脉前降支结扎法建立心肌缺血再灌注大鼠模型。动物实验前禁食 12 h,腹腔注射 1%戊巴比妥钠麻醉大鼠,随后将大鼠仰卧位固定于实验板上,用 4 根电极银针支住大鼠四肢,用 MS4000U-1C 型生物信号定量记录分析系统检测大鼠心电图,气管插管后用呼吸机辅助大鼠呼吸。在大鼠胸骨第 3、4 肋骨间做开胸切口手术,暴露大鼠心脏,于冠状动脉左前降支根部用带线缝合针穿深度约 1 mm,宽度 1.8 mm 备用结扎,缺血 30 min 后再灌注 60 min 建立心肌缺血再灌注大鼠模型,以左室前壁紫绀及 ST 段抬高,QRS 幅度升高即为手术成功,ST 段逐渐降低,左室前壁缺血区紫绀消失标志再灌注成功,假手术组只穿线不结扎。模型加药组建模前参考文献^[10]分别腹腔注射 1.5、3、6 U/kg 胰激肽原酶,持续给药 5 周(每天 1 次)。记录各组大鼠心率(HR)、左室收缩压(LVSP)和短轴缩短率(FS),每组 20 只。术后 12 h 收集各组大鼠尾静脉血,然后实施安乐死,收集心脏组织用于后续实验。

1.3.2 HE 染色观察心肌病理损伤

取 4% 多聚甲醛固定的心肌组织,经石蜡包埋切片、脱蜡、水化后,行 HE 染色;光镜下拍照并观察记录组织形态学变化。

1.3.3 ELISA 检测心损标记物含量水平

取 100 μ L 尾静脉血,于 3000 r/min、4℃ 离心 15 min,取上清,按 ELISA 试剂盒说明书测定各组大鼠血清中 CK-MB、Mb、cTnI 含量。

1.3.4 试剂盒检测氧化应激指标

严格按照 SOD、MDA 和 GSH 检测试剂盒测定各组大鼠血清中 SOD、MDA 和 GSH 含量。

1.3.5 Western blot 检测线粒体损伤标记蛋白表达水平

从液氮中取出大鼠心肌组织,于室温下解冻后用手术剪将组织剪切成小块并置于匀浆研磨仪中研磨均匀。用 RIPA 蛋白裂解液于冰上提取总蛋白,用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白总浓度,每孔上样 20 μ g,经 SDS-PAGE 电泳分离、转膜、脱脂奶粉封闭后,加入一抗(1:1000),4℃ 摇床孵育过夜,第 2 天回收一抗并加入 HRP 标记的对应二抗(1:5000),室温孵育 2 h。用 ECL 化学发光试剂于暗室下曝光显影,将胶片扫描存档整理去色后,分析并计算各组大鼠蛋白相对表达量,蛋白相对表达量为目标条带和内参条带(ACTIN)比值表示。独立重复实验 3 次取平均值。

1.3.6 Masson 染色观察心肌组织纤维化程度

取 4% 多聚甲醛固定的心肌组织,按照 Masson 试剂盒说明书进行大鼠心肌组织 Masson 染色。蓝色代表胶原纤维,红色代表肌纤维。

1.3.7 RT-PCR 检测 α -SMA、TGF- β 1 和 FN mRNA 表达水平

取液氮中保存的大鼠心肌组织约 80 mg,温室下解冻组织,超声研磨均匀后在 4℃、3000 r/min 条件下离心 15 min,用 TRIzol 试剂盒提取总 RNA 并测定 RNA 浓度和纯度。按逆转录试剂盒说明书进行逆转录合成 cDNA,按 RT-PCR 试剂盒操作说明配制反应体系。在 PCR 扩增仪上进行扩增(扩增条件:保持步骤 96℃ 15 s,40 个周期,95℃ 10 s 和 60℃ 30

s),以目的基因和内参比值表示 mRNA 表达水平,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析结果。重复实验 3 次,结果取平均值。引物序列见表 1。

1.4 统计学方法

使用 SPSS 19.0 软件分析,数据表示为平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)。采用单因素方差进行组间比较,若方差齐则两两比较采用 LSD 法,若方差不齐则两两比较采用 Dunnett-*t* 法。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胰激肽原酶对心肌缺血再灌注损伤大鼠 HR、LVSP 和 FS 的影响

与假手术组比较,模型组大鼠 HR、LVSP 和 FS 均显著降低($P<0.05$)。与模型组比较,1.5 U/kg PKase 组大鼠 HR、LVSP 和 FS 均无明显差异($P>0.05$),3.6 U/kg PKase 组大鼠 HR、LVSP 和 FS 升高,且差异具有统计学意义($P<0.05$),见图 1。结果提示,胰激肽原酶缓解心肌缺血再灌注损伤大鼠心脏功能。

2.2 胰激肽原酶对心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌病理损伤的影响

HE 染色观察各组大鼠心肌组织病理损伤程度,如图 2 所示,假手术组大鼠心肌组织结构正常,排列规则,未见炎性细胞浸润。与假手术组比较,模型组大鼠心肌组织结构紊乱,心肌细胞肿大,可见大量肌纤维断裂和炎性细胞浸润。与模型组比较,1.5 U/kg PKase 组仍然可见大量断裂的心肌纤维和炎性细胞浸润,3 U/kg PKase 组大鼠心肌细胞中可见少量炎性细胞浸润,未见断裂的心肌纤维和水肿变性的肌细胞。6 U/kg PKase 组大鼠心肌组织排列规则,仅见极少的炎性细胞浸润,未见断裂的心肌纤维和肿胀变性的肌细胞。结果提示,胰激肽原酶改善心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌组织病理损伤。

2.3 胰激肽原酶对心肌缺血再灌注损伤大鼠心损标记物含量的影响

ELISA 检测各组大鼠心损标记物 CK-MB、Mb 和 cTnI 含量(见表 2),与假手术组比较,模型组大

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因 Gene	上游引物(5'-3') Forward primer	下游引物(5'-3') Reverse primer
α -平滑肌肌动蛋白 α -SMA	GAAGAGTTACGATTGCCTGATG	ATGATGCTGTTGTAGGTGTTTC
转化生长因子- β 1 TGF- β 1	TGCCCTCTACAACCAACACAACCCG	AACTGCTCCACCTTGGGCTTGCGA
纤维结合蛋白 FN	CACCCAGTATTCTCAGAGATTAC	CTGTCAGCCTGTACATCTAAAG
肌动蛋白 Actin	AGCGGGAAATTCCTGCCTGAC	ACATCTGCTGGAAGGTGGAC

鼠 CK-MB、Mb 和 cTnI 含量显著升高($P<0.05$)。与模型组比较,1.5 U/kg PKase 组大鼠 CK-MB、Mb 和 cTnI 含量无明显变化($P>0.05$),3、6 U/kg PKase 组大鼠 CK-MB、Mb 和 cTnI 含量显著降低($P<0.05$)。结果提示,胰激肽原酶能够改善心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌功能。

2.4 胰激肽原酶对心肌缺血再灌注损伤大鼠氧化应激水平的影响

与假手术组比较,模型组大鼠血清中 SOD 和 GSH 含量明显降低,MDA 含量升高($P<0.05$)。与模型组比较,1.5 U/kg PKase 组大鼠血清中 SOD、MDA 和 GSH 含量无明显差异($P>0.05$),3、6 U/kg PKase 组大鼠血清中 SOD 和 GSH 含量升高,MDA 含量降低,且差异具有统计学意义($P<0.05$),见图 3。结果提示,胰激肽原酶能够缓解心肌缺血再灌注损伤大鼠氧化应激水平。

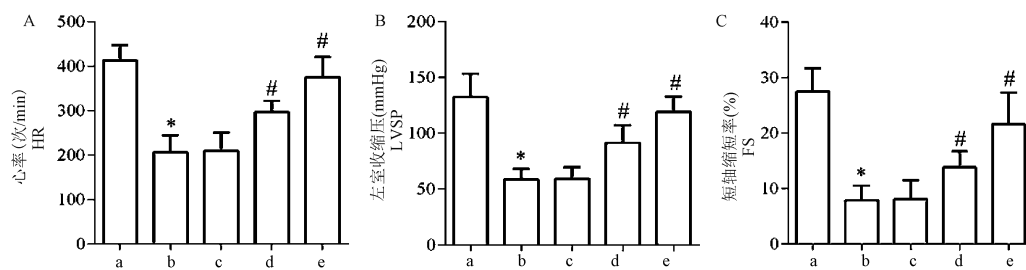
2.5 胰激肽原酶对心肌缺血再灌注损伤大鼠线粒体功能的影响

与假手术组比较,模型组大鼠心肌组织中 Bax/Bcl-2、cleaved cas9/cas9 和 cleaved cas3/cas3 蛋白水

平显著升高($P<0.05$)。与模型组比较,1.5 U/kg PKase 组大鼠心肌组织中蛋白水平无明显差异($P>0.05$),3、6 U/kg PKase 组大鼠心肌组织中 Bax/Bcl-2、cleaved cas9/cas9 和 cleaved cas3/cas3 蛋白水平显著降低($P<0.05$),见图 4。结果提示,胰激肽原酶能够缓解心肌缺血再灌注损伤大鼠线粒体功能损伤。

2.6 胰激肽原酶对心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌纤维和炎症因子的影响

如图 5 所示,假手术组大鼠心肌细胞排列整齐,染色均匀,未见炎症细胞浸润且间质内无增生纤维。与假手术组比较,模型组大鼠心肌细胞排列紊乱,间质内充满大量、均匀的蓝色纤维网,部分纤维断裂,可见炎症细胞浸润。与模型组大鼠比较,1.5 U/kg PKase 组大鼠仍可见大量炎症细胞浸润,间质内蓝色纤维网稍有减轻。3 U/kg PKase 组增生的蓝色纤维网明显减少,可见少量炎症细胞浸润,6 U/kg PKase 组大鼠间质内增生的蓝色纤维网显著减少或消失,仅可见极少的纤维条,心肌细胞中未见炎症细胞浸润。结果提示,胰激肽原酶能够改善心肌缺血再灌注大鼠心肌纤维化。

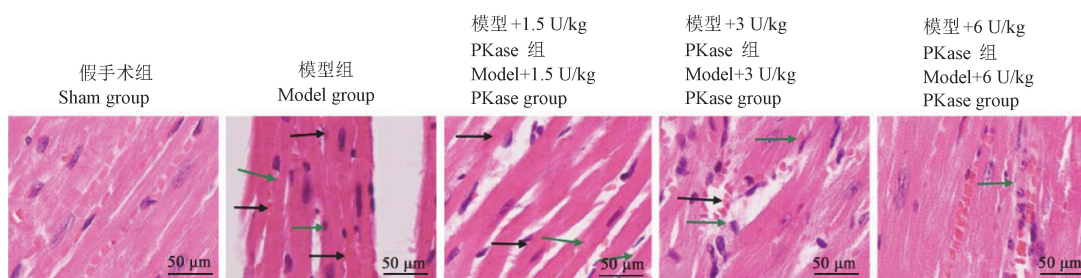


注:a:假手术组;b:模型组;c:模型+1.5 U/kg PKase 组;d:模型+3 U/kg PKase 组;e:模型+6 U/kg PKase 组。与假手术组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,# $P<0.05$ 。

图 1 各组大鼠 HR、LVSP 和 FS ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Note. a, Sham group. b, Model group. c, Model+1.5 U/kg PKase group. d, Model+3 U/kg PKase group. e, Model+6 U/kg PKase group. Compared with sham group, * $P<0.05$. Compared with the model group, # $P<0.05$.

Figure 1 HR, LVSP and FS of rats in each group



注:心肌纤维被染成淡红色,细胞核呈蓝紫色,黑色箭头表示炎症浸润细胞,绿色箭头表示断裂纤维。

图 2 各组大鼠心肌组织 HE 染色

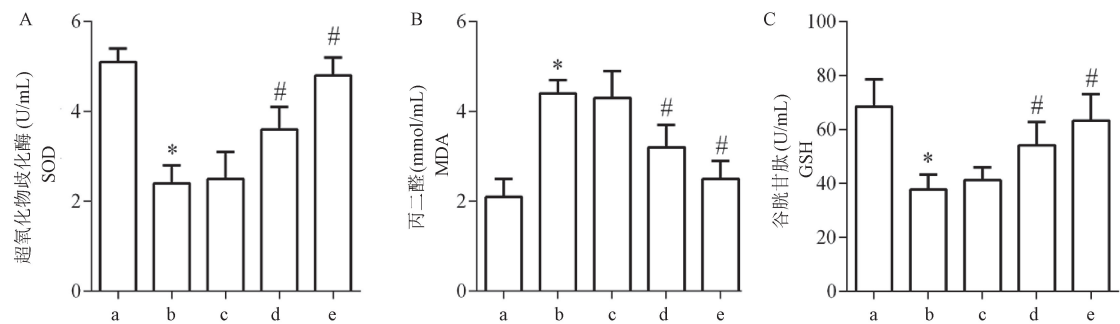
Note. Myocardial fibers are stained red, the nucleus is blue-purple, the black arrows indicate inflammatory infiltrating cells, and the green arrows indicate broken fibers.

Figure 2 HE staining of myocardial tissue of rats in each group

表 2 各组大鼠 CK-MB、Mb 和 cTnI 含量($\bar{x}\pm s$, $n=10$)
Table 2 Contents of CK-MB, Mb and cTnI in each group of rats

组别 Groups	肌酸激酶同工酶 (U/L) CK-MB	肌红蛋白 (ng/mL) Mb	心肌肌钙蛋白 I (ng/mL) cTnI
假手术组 Sham group	20.42 ± 4.13	26.17 ± 5.06	0.11 ± 0.03
模型组 Model group	119.66 ± 21.24 *	138.16 ± 18.45 *	0.68 ± 0.09 *
模型+1.5 U/kg PKase 组 Model+1.5 U/kg PKase group	117.78 ± 19.32	136.43 ± 19.54	0.67 ± 0.07
模型+3 U/kg PKase 组 Model+3 U/kg PKase group	79.64 ± 14.58 #	91.06 ± 20.42 #	0.43 ± 0.08 #
模型+6 U/kg PKase 组 Model+6 U/kg PKase group	31.43 ± 6.21 #	48.22 ± 7.34 #	0.17 ± 0.06 #

注:与假手术组相比, * $P<0.05$;与模型组相比, # $P<0.05$ 。
Note. Compared with sham group, * $P<0.05$. Compared with the model group, # $P<0.05$.

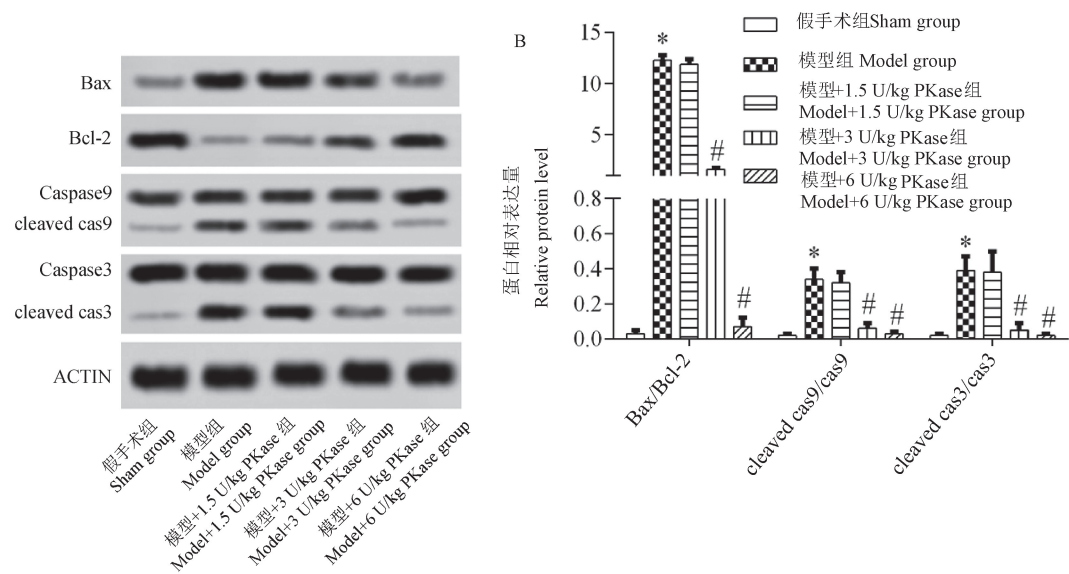


注:a:假手术组;b:模型组;c:模型+1.5 U/kg PKase 组;d:模型+3 U/kg PKase 组;e:模型+6 U/kg PKase 组。与假手术组相比, * $P<0.05$;与模型组相比, # $P<0.05$ 。

图 3 各组大鼠血清中 SOD、MDA 和 GSH 含量($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Note. a, Sham group. b, Model group. c, Model+1.5 U/kg PKase group. d, Model+3 U/kg PKase group. e, Model+6 U/kg PKase group. Compared with sham group, * $P<0.05$. Compared with the model group, # $P<0.05$.

Figure 3 Contents of SOD, MDA and GSH in serum of rats in each group



注:A:Western blot 检测线粒体损伤标记物蛋白表达;B:蛋白相对表达量。与假手术组相比, * $P<0.05$;与模型组相比, # $P<0.05$ 。

图 4 胰激肽原酶对心肌缺血再灌注损伤大鼠线粒体功能的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

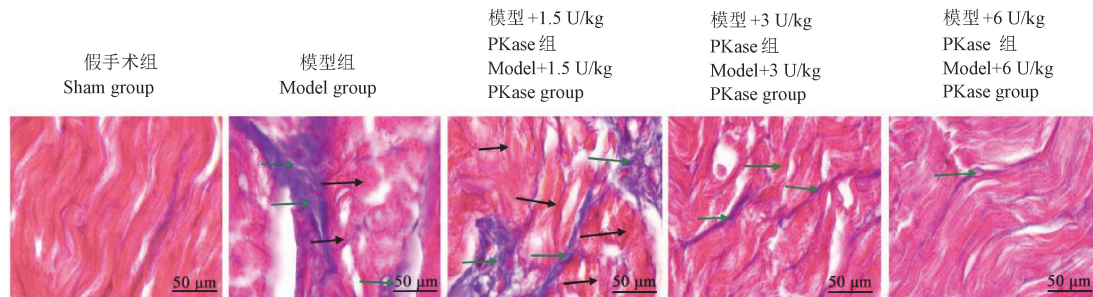
Note. A, Detection of mitochondrial damage marker protein expression by Western blot. B, Relative protein expression level. Compared with sham group, * $P<0.05$. Compared with the model group, # $P<0.05$.

Figure 4 Effect of pancreatic kininogenase on mitochondrial function in rats with myocardial ischemia reperfusion injury

2.7 胰激肽原酶对心肌缺血再灌注损伤大鼠纤维化标记蛋白水平的影响

与假手术组相比,模型组大鼠心肌组织中 α -SMA、TGF- β 1 和 FN mRNA 和蛋白水平均显著上调($P<0.05$)。与模型组比较,1.5 U/kg PKase 组大

鼠 α -SMA、TGF- β 1 和 FN 在 mRNA 和蛋白水平均无明显差异($P>0.05$),3、6 U/kg PKase 组大鼠心肌组织中 α -SMA、TGF- β 1 和 FN mRNA 和蛋白水平均显著下调($P<0.05$),见图 6。结果提示,胰激肽原酶能够缓解心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌组织纤维化。

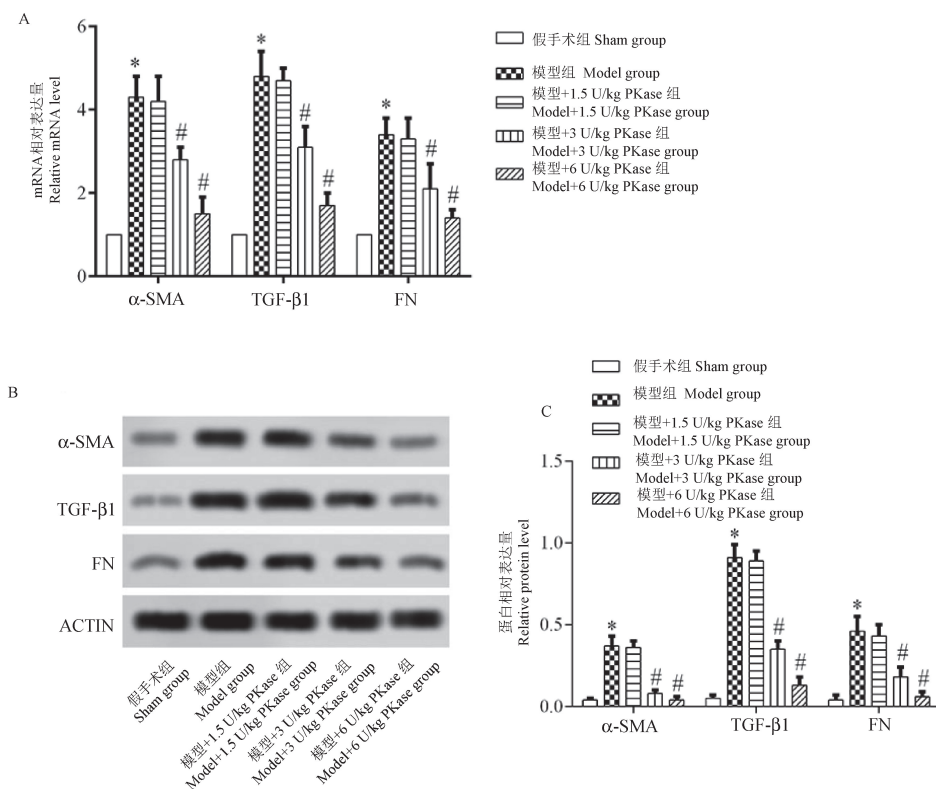


注:心肌纤维被染成红色,胶原纤维被染成蓝色,黑色箭头表示炎性浸润,绿色箭头表示胶原纤维。

图 5 心肌组织 Masson 染色

Note. Myocardial fibers are dyed red, collagen fibers are dyed blue, black arrows indicate inflammatory infiltration, and green arrows indicate collagen fibers.

Figure 5 Masson staining of myocardial tissue



注:A:RT-PCR 检测 α -SMA、TGF- β 1 和 FN mRNA 水平;B:Western blot 检测 α -SMA、TGF- β 1 和 FN 蛋白水平;C:蛋白相对表达量。与假手术组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,# $P<0.05$ 。

图 6 胰激肽原酶对心肌缺血再灌注损伤大鼠纤维化标记蛋白水平的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Note. A, mRNA levels of α -SMA, TGF- β 1 and FN were detected by RT-PCR. B, Protein levels of α -SMA, TGF- β 1 and FN were detected by Western blot. C, Relative protein expression level. Compared with sham group, * $P<0.05$. Compared with the model group, # $P<0.05$.

Figure 6 Effect of pancreatic kallikrein on the level of fibrosis marker protein in rats with myocardial ischemia-reperfusion injury

3 讨论

心肌缺血再灌注发生前会产生大量的氧自由基,从而引起心肌纤维化和心肌损伤,心脏功能障碍等^[11]。因此,及时清除氧自由基和降低心肌纤维水平能够有效缓解心肌损伤和心脏功能。Xie 等^[12]发现,心肌缺血再灌注大鼠血清 CK-MB、Mb 和 cTnI 水平明显升高, α -SMA、TGF- β 1 和 FN 含量极高,SOD 和 GSH 含量降低,MDA 含量升高,经给药治疗后,心肌缺血再灌注大鼠心肌损伤明显好转,氧化应激和炎症水平降低,纤维化程度得到改善。本研究结果发现,经胰激肽原酶给药治疗后,心肌缺血再灌注大鼠心脏功能明显好转,心肌病理损伤得到改善,心肌氧化应激、纤维化水平降低。因此,胰激肽原酶通过降低心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌氧化应激和纤维化水平缓解大鼠心肌损伤。

本研究前期检测了各组大鼠心脏功能、心肌病理损伤程度和心肌损伤标记物含量水平,结果显示,模型组大鼠 HR、LVSP、FS 明显低下,心肌病理损伤严重,CK-MB、Mb 和 cTnI 含量极高。经胰激肽原酶给药治疗后,心肌缺血再灌注损伤模型大鼠心脏功能显著得到改善,心肌病理损伤及损伤标记物含量减少。结果提示,胰激肽原酶对心肌缺血再灌注大鼠心脏功能、心肌损伤具有调控作用。为明确胰激肽原酶调控模型大鼠心肌功能的作用机制,本实验还检测了各组大鼠心肌组织中氧化应激和纤维化水平。

氧化应激发生积累的大量氧自由基促使心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌细胞膜通透性增加,从而使得胞内的 SOD 释放到细胞外。同时,MDA 含量增加诱发机体发生脂质过氧化反应,最终破坏机体正常的氧化与抗氧化平衡状态,进一步加重心肌缺血再灌注大鼠心肌损伤^[13-17]。本实验显示,在模型组大鼠心肌组织中 SOD 和 GSH 含量明显降低,MDA 含量升高,经胰激肽原酶治疗后,心肌缺血再灌注大鼠心肌组织中 SOD 和 GSH 含量显著升高,MDA 含量降低。由于线粒体功能与氧化应激密切相关,若氧化应激水平极高,则会导致线粒体膜通透性增加及氧自由基的大量产生,使得线粒体肿胀、功能受损、细胞内钙离子超载,最终引起细胞死亡^[18-20]。因此,线粒体损伤程度能够从侧面反应机体氧化应激水平及正常组织功能。本研究通过检测各组大鼠线粒体损伤标记物蛋白表达水平,结果

发现,经胰激肽原酶给药治疗后,心肌缺血再灌注大鼠心肌组织中 Bax/Bcl-2、cas-9、cas-3 水平显著降低,结合前期实验结果可知,胰激肽原酶可能通过调控模型大鼠心肌氧化应激水平改善大鼠心脏和线粒体功能,缓解心肌病理损伤。

α -SMA 是血管平滑肌细胞中的一种细胞骨架蛋白,与心肌细胞纤维化的发生发展有关,是肌成纤维细胞的特异性标志物^[21]。TGF- β 1 是新发现的调节细胞生长和分化的 TGF- β 超家族,具有抑制心肌细胞分化的作用^[22]。FN 是心肌细胞外基质的主要结构蛋白之一,在心肌细胞粘附性和运动能力中发挥着重要作用^[23]。本实验结果显示,经胰激肽原酶治疗后,心肌缺血再灌注大鼠心肌组织中 α -SMA、TGF- β 1 和 FN 表达水平显著降低,结果提示,胰激肽原酶通过降低心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌组织纤维化水平缓解大鼠心肌损伤。

综上所述,胰激肽原酶在心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌损伤、氧化应激和纤维化中具有调控作用。本实验从动物水平上初步说明胰激肽原酶在心肌缺血再灌注损伤中的调节作用,后续实验我们计划进一步探究胰激肽原酶的具体调节作用机制,为胰激肽原酶的临床应用及药物研发提供更加充分的理论依据。

参考文献:

- [1] Houang EM, Bartos J, Hackel BJ, et al. Cardiac muscle membrane stabilization in myocardial reperfusion injury [J]. JACC Basic Transl Sci, 2019, 4(2): 275-287.
- [2] Zhou H, He L, Xu G, et al. Mitophagy in cardiovascular disease [J]. Clin Chim Acta, 2020, 507: 210-218.
- [3] Manechote C, Palee S, Kerdphoo S, et al. Pharmacological inhibition of mitochondrial fission attenuates cardiac ischemia-reperfusion injury in pre-diabetic rats [J]. Biochem Pharmacol, 2020, 182: 114295.
- [4] 高亚松, 苏岩岩, 丁超. 急性 ST 段抬高型心肌梗死术前抗栓预处理对自发再灌注及短期预后的影响 [J]. 临床误诊误治, 2018, 31(1): 78-82.
- [5] 张世平, 王臻, 金梅梅, 等. 右美托咪定对糖尿病大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护机制 [J]. 解放军医药杂志, 2018, 30(7): 7-11.
- [6] 黎仕煊, 李繁, 黄奕弟. 右美托咪定联合咪达唑仑对心肌缺血再灌注损伤大鼠的心肌保护作用研究 [J]. 临床误诊误治, 2019, 32(10): 103-108.
- [7] Naito H, Nojima T, Fujisaki N, et al. Therapeutic strategies for ischemia reperfusion injury in emergency medicine [J]. Acute Med Surg, 2020, 7(1): e501.
- [8] Cheng Y, Yu X, Zhang J, et al. Pancreatic kallikrein protects

- against diabetic retinopathy in KK Cg-Ay/J and high-fat diet/streptozotocin-induced mouse models of type 2 diabetes [J]. *Diabetologia*, 2019, 62(6): 1074–1086.
- [9] Pantano E, Marchi S, Biagini M, et al. NHBA is processed by kallikrein from human saliva [J]. *PLoS One*, 2020, 14(8): e0203234.
- [10] Jin JZ, Li HY, Jin J, et al. Exogenous pancreatic kininogenase protects against renal fibrosis in rat model of unilateral ureteral obstruction [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2020, 41(12): 1597–1608.
- [11] 刘根, 张博方, 柳小佩, 等. 川皮苷对心肌缺血再灌注损伤的作用及其机制研究 [J]. *解放军医药杂志*, 2019, 31(9): 1–6.
- [12] Xie D, Li M, Yu K, et al. Etomidate alleviates cardiac dysfunction, fibrosis and oxidative stress in rats with myocardial ischemic reperfusion injury [J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8(18): 1181.
- [13] Mokhtavi B, Azizi Y, Rostami Abookheili A, et al. Human amniotic membrane mesenchymal stem cells-conditioned medium attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury in rats by targeting oxidative stress [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2020, 23(11): 1453–1461.
- [14] Gong HJ, Lin JJ, Li H, et al. A study on protective effect of morphine against myocardial ischemia-reperfusion injury in rats via CAMP/PKA signaling pathway [J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2020, 34(5): 1669–1677.
- [15] 曾菲, 李强, 曾昇, 等. 氢溴酸加兰他敏介导 AMPK α 1/Nrf2/HO-1 通路对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. *四川大学学报(医学版)*, 2020, 51(3): 337–343.
- [16] Ding M, Li M, Zhang EM, et al. Fullerol alleviates myocardial ischemia-reperfusion injury by reducing inflammation and oxidative stress in cardiomyocytes via activating the Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(18): 9665–9674.
- [17] Dookun E, Walaszczyk A, Redgrave R, et al. Clearance of senescent cells during cardiac ischemia-reperfusion injury improves recovery [J]. *Aging Cell*, 2020, 19(10): e13249.
- [18] Wang J, Zhou H. Mitochondrial quality control mechanisms as molecular targets in cardiac ischemia-reperfusion injury [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2020, 10(10): 1866–1879.
- [19] 何力, 秦超毅, 石峻, 等. 急性心肌梗死大鼠心肌细胞内质网应激和线粒体损伤的研究 [J]. *四川大学学报(医学版)*, 2020, 51(3): 350–354.
- [20] Greco V, Longone P, Spalloni A, et al. Crosstalk between oxidative stress and mitochondrial damage: focus on amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1158: 71–82.
- [21] 许陕陕, 李沙, 张夏霞, 等. 非诺贝特治疗单侧输尿管结扎小鼠肾纤维化的机制研究 [J]. *四川大学学报(医学版)*, 2020, 51(5): 670–674.
- [22] Su HH, Liao JM, Wang YH, et al. Exogenous GDF11 attenuates non-canonical TGF- β signaling to protect the heart from acute myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Basic Res Cardiol*, 2019, 114(3): 20.
- [23] Lu L, Ma J, Tang J, et al. Irisin attenuates myocardial ischemia/reperfusion-induced cardiac dysfunction by regulating ER-mitochondria interaction through a mitochondrial ubiquitin ligase-dependent mechanism [J]. *Clin Transl Med*, 2020, 10(5): e166.

[收稿日期]2021-01-14