

·基础研究·

间歇性低压氧通过 δ -阿片类受体表达 保护心肌梗死大鼠心肌的研究*

张嘉玮¹ 陈 英² 邓伟丽¹ 刘文静¹ 徐凯月¹ 万春晓^{1,3}

摘要

目的:研究间歇性低压氧 (intermittent hypobaric hypoxia, IHH) 能否提高 δ -阿片类受体(delta-opioid receptor, DOR)的表达,对大鼠心肌梗死(myocardial infarction, MI)后心肌产生保护作用。

方法:24只SD大鼠随机分为假手术常氧干预组(Sham-Nor)、假手术低压氧干预组(Sham-IHH)、心梗常氧干预组(MI-Nor)和心梗低压氧干预组(MI-IHH)。心肌梗死造模1周后进行干预。4周后检测心脏重量指数、心肌纤维化程度、超声检测心脏功能及DOR蛋白表达。

结果:4周后,MI-IHH和MI-Nor组相比:心脏重量无显著性差异($P>0.05$),MI-IHH组心肌纤维化显著减少($P<0.05$)、左室收缩末内径(left ventricular end systolic diameter, LVESd)明显下降($P<0.01$)、左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)显著提高($P<0.001$)、DOR显著增加($P<0.05$),MI-Nor和MI-IHH组中DOR表达与LVEF呈正相关($P<0.05$)。

结论:IHH能够通过提高大鼠DOR的表达产生心肌梗死后心肌保护作用。

关键词 间歇性低压氧;心肌梗死;左心室重构; δ -阿片类受体

中图分类号:R54,R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2020)-07-0782-05

Study on intermittent hypobaric hypoxia protection of myocardial infarction rats by δ -opioid receptor expression/ZHANG Jiawei, CHEN Ying, DENG Weili, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2020, 35(7): 782—786

Abstract

Objective: To find out whether intermittent hypobaric hypoxia can increase the expression of delta-opioid receptor (DOR) and protect myocardium after myocardial infarction in rats.

Method: Twenty-four rats were randomly divided into four groups: Sham-Nor group, Sham-IHH group, MI-Nor group and MI-IHH group. One week after left anterior descending coronary artery ligation, rats were exposed to different treatments. After 4 weeks' treatment, the heart weight ratio, myocardial fibrosis area, cardiac function detected by echocardiography and delta-opioid receptor (DOR) expression were measured.

Result: Four weeks later, there was no difference in heart weight ratio between MI-Nor group and MI-IHH group ($P>0.05$). Compared with MI-Nor group, myocardial fibrosis area decreased($P<0.05$), left ventricular end systolic diameter (LVESd) decreased($P<0.01$), left ventricular ejection fraction (LVEF) increased($P<0.001$) and DOR expression elevated($P<0.05$) in MI-IHH group. DOR expressions were positive relate to LVEF in MI-Nor group and MI-IHH group($P<0.05$).

Conclusion: IHH can protect myocardium after myocardial infarction by increasing DOR expression in rats.

Author's address Tianjin Medical University, Tianjin, 300052

Key word intermittent hypobaric hypoxia;myocardial infarction;left ventricular remodeling;delta-opioid receptor

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2020.07.004

*基金项目:天津市自然科学基金项目(18JCZDJC98900);天津市卫计委项目(16KJ122)

1 天津医科大学,天津市,300052; 2 南京医科大学附属无锡二院心内科; 3 通讯作者

第一作者简介:张嘉玮,男,主治医师; 收稿日期:2019-09-05

冠心病(coronary heart disease, CHD)是全球致死和致残的主要危险因素之一^[1]。心肌梗死(myocardial infarction, MI)后导致的心室扩大严重影响患者的生存率和生活质量^[2-3]。改善心室重构是延长生存期,提高生活质量的一个重要策略^[4-5]。近年来内源性阿片肽受体对于心脏保护的影响广受重视。内源性阿片肽受体包括 μ 、 κ 及 δ 三类,对缺血再灌注的保护的研究主要集中于 δ -阿片类受体(delta-opioid receptor, DOR)^[6-7]。研究显示 DOR 可抗心肌梗死和心律失常,对心肌缺血有保护作用^[8-9],但是这种效应产生的机制仍不明确,几乎鲜有研究。本研究拟通过检测 DOR 表达、心脏功能及纤维化程度评价 IHH 是否通过调控 DOR 表达从而改善心肌梗死后左心室重塑。

1 材料与方法

1.1 实验动物和分组

雄性成年 SPF 级 SD 大鼠 24 只,体重 220g—250 g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,饲养于天津市神经病学研究所,室温 25℃,相对湿度 50%±10%,12h 明暗循环。无菌饲料喂养,动物自由获取食物和水。本研究实验方案由天津医科大学伦理委员会批准。所有操作均遵循美国国立卫生研究院实验室动物护理和使用指南。

成年 SD 大鼠随机分为 4 组,假手术常氧干预组(Sham-Nor)、假手术低氧干预组(Sham-IHH)、心梗常氧干预组(MI-Nor)和心梗低氧干预组(MI-IHH),每组 6 只。心肌梗死造模成功 1 周后进行干预,干预持续 4 周。

1.2 实验试剂

MASSON 三色染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司, G1340),DOR 抗体(Abcam 公司, ab217143)、GAPDH 抗体(中杉金桥公司, TA-08)、辣根过氧化物酶标记二抗(中杉金桥公司, ZB-2301, ZB-2305)

1.3 实验仪器

容积式循环小动物人工呼吸机(安徽省淮北正华生物仪器设备有限公司, 型号 DW3000)、动物低氧仓(山东烟台宏远氧业有限公司, 型号 DS-3)、动物心电图检测仪(北京众实迪创科技发展有限公司),多普勒彩超诊断仪(加拿大 Visualsonics Inc 公司, 型

号 Vevo770)。

1.4 大鼠心肌梗死模型建立

左冠状动脉前降支(left anterior descending, LAD)结扎制作心梗模型。大鼠腹腔注射水合氯醛(50mg/kg)麻醉,术中呼吸机辅助呼吸,备皮,胸骨左缘扪及心脏搏动处切开皮肤组织,逐层分离,暴露心脏,用 6—0 细线将 LAD 近端结扎。当左室前壁颜色变白、术中心电图 II 导联 ST 段压低>2mm 时证实心肌梗死造模成功。随后关闭胸腔,恢复自主呼吸后拔管。假手术干预组仅接受相同手术但不结扎冠状动脉,心电图无改变。

1.5 干预方法

术后 1 周将 Sham-IHH 组和 MI-IHH 组大鼠置于低压舱内(相当于海拔 5000m, 氧浓度 13%),每天 4h,每周 5 天;Sham-Nor 组和 MI-Nor 组动物置于正常氧气环境下,干预时间相同。

1.6 心脏重量指数的测定

干预 4 周后,先记录大鼠体重(body weight, BW),处死后灌注,取出完整心脏,修剪无关组织,吸干水分,测量心脏重量(heart weight, HW)。采用心脏重量指数,即心脏重量/体重的数值作为结果。

1.7 形态学和组织病理学分析

在心室最大横径处横切截取约 3mm 厚的心肌组织,放入 4%的多聚甲醛中浸泡 24h。将组织固定于石蜡中,包埋切片,厚度约 7 μ m,脱蜡并进行 MASSON 染色,其中胶原结构染为蓝色,心肌结构染为红色。采用 Image J 图像采集软件,心肌胶原组织/切片组织总面积作为纤维化程度进行比较^[10]。

1.8 心脏超声测定

干预前后对各组行心脏超声检查。使用 17.5MHz 探头,在心脏 M 型超声模式下测量左心室舒张末期内径(left ventricular end-diastolic diameter, LVEDd)、左心室收缩末期内径(left ventricular end-systolic diameter, LVESd)、舒张末左室后壁厚度(left ventricular posterior wall depth, LVPWd)、舒张末期室间隔厚度(interventricular septal depth, IVSD)和左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF),每次测量结果取 3 个心动周期的平均值。

1.9 Western Blot 分析

提取围梗死区心肌总蛋白0.1g,采用BCA法定量蛋白浓度。以GAPDH作为内参对照,取60 μ g蛋白/泳道进行SDS-PAGE凝胶电泳分离总蛋白,随后100V恒压将蛋白转至硝酸纤维膜上,室温下5%脱脂牛奶封闭1h,分别加入DOR(1:1000)、内参GAPDH抗体(1:1000),4 $^{\circ}$ C孵育过夜。加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:2000),室温孵育1h,ECL化学发光法通过凝胶电泳成像仪显影并拍摄照片。

1.10 统计学分析

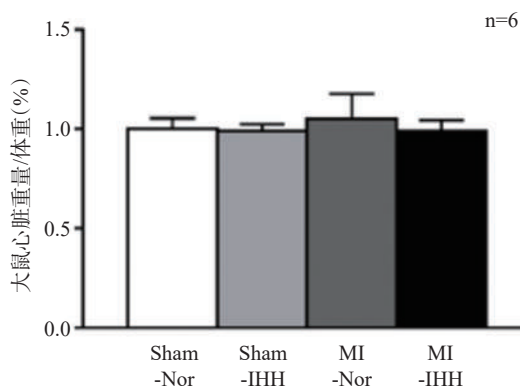
所有数据采用统计软件SPSS22.0和GraphPad Prism 6.0处理,并以均数 $\pm$ 标准差表示。统计方法采用单因素方差分析及组间比较。 $P<0.05$ 认为差异具有显著性意义。

2 结果

2.1 各组大鼠心脏重量指数比较

在心肌梗死造模成功后进行为期4周的干预,结果显示Sham-Nor,Sham-IHH,MI-Nor,MI-IHH 4组的心脏重量/体重没有显著性差异($P>0.05$),见图1。

图1 4组大鼠心脏重量/体重 (%)



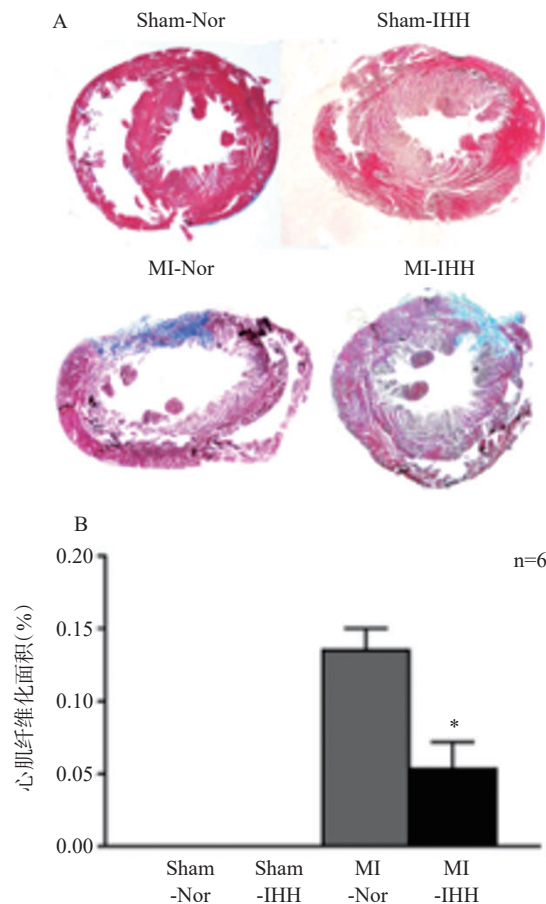
2.2 各组大鼠心肌纤维化的比较

在Sham-Nor和Sham-IHH组,未发现Masson染色阳性的纤维化组织。在MI-IHH组和MI-Nor组观察到Masson阳性的纤维化组织,对纤维化阳性面积进行定量后发现MI-IHH组纤维化面积显著小于MI-Nor组($P<0.05$),提示IHH对心肌梗死后心肌组织纤维化具有抑制作用(图2)。

2.3 心脏超声结果比较

心脏超声检查结果见表1。干预前,Sham-Nor

图2 4组大鼠心肌组织纤维化面积比较



A Masson染色,红色为正常心肌组织,蓝色为Masson染色阳性的纤维化组织;B 4组心肌组织Masson染色阳性面积定量柱状图

组与Sham-IHH组,MI-Nor组与MI-IHH组在LVEDd、LVESd、LVPWd、IVSd、LVEF比较中没有显著性差异。Sham-Nor组LVEDd($P<0.001$)、LVESd($P<0.001$)显著低于MI-Nor组,Sham-Nor组LVEF显著高于($P<0.001$)MI-Nor组,Sham-IHH组的LVEDd($P<0.05$)、LVESd($P<0.05$)显著低于MI-IHH组,Sham-IHH组LVEF显著高于MI-IHH组($P<0.05$)。证实心肌梗死造模成功,心肌梗死后心脏功能出现明显的下降。

干预后较干预前,MI-Nor组和MI-IHH组的LVEDd($P<0.001$, $P<0.05$)、LVPWd($P<0.01$, $P<0.01$)、LVEF($P<0.01$, $P<0.001$)、IVSd($P<0.05$, $P<0.01$)均出现显著增加,Sham-Nor组IVSd($P<0.05$)显著增加。MI-Nor组LVESd($P<0.001$)显著增加,MI-IHH组的

表1 4组大鼠超声心动图心脏功能检测

($\bar{x} \pm s$)

	Sham-Nor		Sham-IHH		MI-Nor		MI-IHH	
	干预前	4周后	干预前	4周后	干预前	4周后	干预前	4周后
LVEDd(mm)	6.28±0.31	6.48±0.56	6.35±0.34	6.50±0.63	7.58±0.59 ^⑥	9.30±0.35 ^{③⑥}	7.93±1.09 ^⑥	8.78±0.47 ^{①⑥}
LVESd(mm)	3.25±0.71	3.48±0.54	3.38±0.32	3.62±0.47	6.20±0.45 ^⑥	7.33±0.34 ^{③⑥}	6.53±0.80 ^⑥	6.47±0.34 ^{④⑥}
LVPWd(mm)	1.45±0.31	1.95±0.31 ^①	1.57±0.35	1.95±0.19 ^①	1.50±0.18	2.03±0.31 ^②	1.52±0.15	1.90±0.18 ^②
IVSd(mm)	1.78±0.31	2.13±0.21 ^①	1.63±0.38	1.93±0.22	1.52±0.44	1.88±0.15 ^①	1.48±0.37	2.05±0.19 ^②
LVEF(%)	83.58±2.74	85.77±3.11	82.60±2.67	83.23±1.60	42.80±3.43 ^⑥	47.97±3.15 ^{②⑥}	41.30±2.58 ^⑥	56.63±3.18 ^{③⑤⑥}

注:与相应组干预前相比:① $P<0.05$,② $P<0.01$,③ $P<0.001$;与相应Nor组相比:④ $P<0.01$,⑤ $P<0.001$;与相应Sham组相比:⑥ $P<0.001$

LVESd干预前后比较没有显著性差异($P>0.05$)。提示左心室在心肌梗死后均发生一定程度的重构。

干预4周后,MI-IHH组LVESd显著小于MI-Nor组($P<0.01$),LVEF显著高于MI-Nor组($P<0.001$);MI-Nor组LVEDd($P<0.001$)、LVESd($P<0.001$)显著大于Sham-Nor组,LVEF显著低于($P<0.001$)Sham-Nor组;MI-IHH组LVEDd($P<0.001$)、LVESd($P<0.001$)显著大于Sham-IHH组,LVEF显著低于Sham-IHH组($P<0.001$)。提示虽然MI-IHH组心脏功能相比于正常大鼠有所下降,但是相比于MI-Nor组均有所恢复。

2.4 心肌DOR蛋白表达

在心肌梗死干预4周后,相比于常氧的两组(Sham-Nor和MI-Nor组),间歇性低压氧干预(Sham-IHH和MI-IHH组)的DOR蛋白表达显著增加(Sham-Nor vs Sham-MI-Nor, $P<0.05$; MI-IHH vs MI-Nor, $P<0.05$),见图3。提示间歇性低压氧(intermittent hypobaric hypoxia, IHH)可以提升心肌组织中DOR的表达。

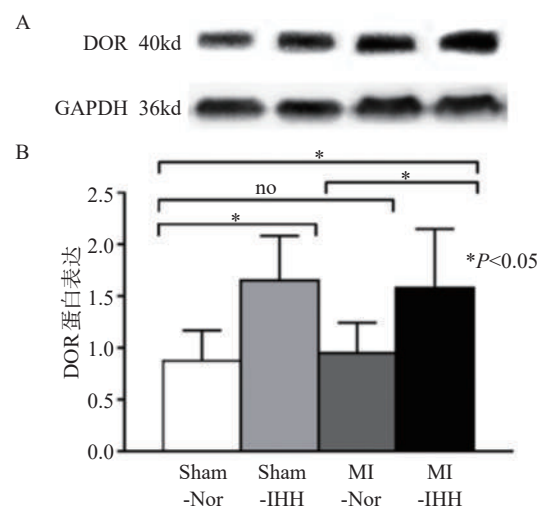
2.5 相关性分析

4周后,对MI-Nor组与MI-IHH组中,心肌DOR与LVEF的相关性进行分析。Pearson相关性分析显示,DOR与LVEF呈显著正相关, $r=0.728$, $P=0.007$ (见图4)。

3 讨论

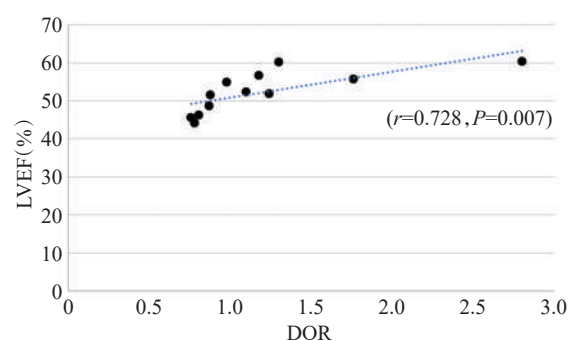
MI后继发的心室扩张是严重影响后期生存率和生活质量的重要因素^[10-11]。心梗后交感神经系统激活,心脏成纤维细胞合成增加,会促进心肌纤维化,导致心室重构^[8,12-13]。当心肌梗死发生时,坏死区会发生炎症,基质金属蛋白酶刺激肌间胶原的分解,导致支持组织的丢失。梗死区的心壁变薄,心室

图3 4组大鼠心肌组织DOR蛋白表达



A.4组大鼠心肌组织中DOR蛋白表达;B.DOR表达定量柱状图

图4 MI-IHH,MI-Nor组中LVEF与DOR的相关关系



腔扩张,这种现象称为梗死扩张^[14]。心室肌病理性扩张会引起舒张末期容积增加,导致心脏前负荷增加,心室壁应力增加。心肌壁应力升高导致心室肥大。本研究观察4周IHH对心梗大鼠的影响,发现各组大鼠之间心脏重量没有显著差异,MI-IHH组的LVsd较MI-Nor组显著减小,提示IHH组的大鼠心

梗后左心室重构引起的心肌病理性肥厚较未干预组轻,提供了MI-IHH可以有效减轻大鼠梗后心室重构引起的病理性心肌肥厚的证据。相应的,病理性心肌肥厚表现为LVEF下降,我们的研究显示IHH组的LVEF高于Nor组,提示MI-IHH对梗后大鼠左心室射血分数有保护作用。而LVEF与死亡率密切相关,早在20世纪80年代的一项心肌梗死的多中心研究就认为LVEF < 40%是独立的死亡率预测因子^[15]。

近年来内源性阿片肽受体在心肌缺血一再灌注保护作用中的关键因素广受关注^[16]。有研究显示,心肌在缺血/缺氧时会导致内源性阿片肽应激性升高,激发下游分子产生心脏保护效应^[17]。提示阿片肽及其受体的表达与心肌细胞对缺血缺氧的耐受具有直接关系。内源性阿片肽包括三个类型,DOR为其中一类^[6-7]。大量研究发现心脏保护中发挥核心作用是DOR^[18-20]。研究表明DOR在缺血再灌注模型中具有心肌保护作用^[17,21]。DOR已经被一些研究证实参与了运动及药物诱导的心脏保护效应,无论是预适应还是后适应均发现DOR介导心肌保护效应^[20],但是DOR是否参与间歇性低压氧对梗后心脏保护的作用未有研究。阐明间歇性低压氧保护心肌的内在机制对于临床上新的治疗策略的发明和目前已有治疗措施的改进具有指导意义。本研究结果显示间歇性低压氧上调了正常大鼠和心肌梗死大鼠心肌组织中DOR的表达,提示间歇性低压氧很可能通过提高DOR的表达产生对心肌梗死后大鼠心脏保护的效应。

阿片肽在心脏呈高表达状态^[16]。DOR能调节心脏 β 肾上腺素受体的信号通路和反应活性,调节心肌兴奋—收缩耦联状态,具体表现为DOR改变心肌 β -肾上腺素受体和降钙素基因相关肽(CGRP)的信号传导和反应^[21]。已经有研究证明通过拮抗 β 2肾上腺素受体或CGRP受体可以消除DOR激活产生的抗梗死作用^[22]。本研究中心肌纤维化结果显示IHH明显降低了MI大鼠的梗死面积,考虑该效应与DOR激活产生的抗梗死效应相关。

大量研究表明,间歇性低压氧可以预防心律失常,降低梗死面积,改善心室扩张,对心脏有明显的保护作用^[22-23]。但这些研究多集中于缺血再灌注的

损伤,对于心肌梗死后干预的收益却研究尚少。大部分患者梗前很少能预防性进行心脏康复,因此梗后心脏康复的收益尤显重要。本研究的发现提供了梗后新的治疗策略,间歇性低压氧是一种新颖、实用、相对安全的心脏保护方法,并且本研究验证了间歇性低压氧通过提高DOR表达介导心脏保护的作用^[24]。

4 结论

本研究证实了间歇性低压氧疗法可以通过上调DOR蛋白表达、减少大鼠心肌梗死面积,减轻梗后大鼠左心室重构。间歇性低压氧疗法可以提供预防及治疗心肌缺血措施的新思路,从而改善患者的预后,具有一定的临床应用潜力。

参考文献

- [1] Anderson L, Taylor RS. Cardiac rehabilitation for people with heart disease: an overview of Cochrane systematic reviews[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2014, 12(12): Cd011273.
- [2] Wan C, Li J, Yang C, et al. Dynamics of endogenous endothelial progenitor cells homing modulated by physiological ischaemia training[J]. J Rehabil Med, 2015, 47(1):87—93.
- [3] Buckley JP, Furze G, Doherty P, et al. BACPR scientific statement: British standards and core components for cardiovascular disease prevention and rehabilitation[J]. Heart, 2013, 99(15):1069—1071.
- [4] Maron MS, Olivetto I, Maron BJ, et al. The case for myocardial ischemia in hypertrophic cardiomyopathy[J]. J Am Coll Cardiol, 2009, 54(9):866—875.
- [5] Wang HJ, Wang W, Cornish KG, et al. Cardiac sympathetic afferent denervation attenuates cardiac remodeling and improves cardiovascular dysfunction in rats with heart failure[J]. Hypertension, 2014, 64(4):745—755.
- [6] Kunecki M, Plazak W, Roleder T, et al. 'Opioidergic post-conditioning' of heart muscle during ischemia/reperfusion injury[J]. Cardiol J, 2017, 24(4):419—426.
- [7] Kunecki M, Plazak W, Podolec P, et al. Effects of endogenous cardioprotective mechanisms on ischemia-reperfusion injury[J/OL]. Postepy Hig Med Dosw, 2017, 71:20—31.
- [8] Xu WQ, Yu Z, Xie Y, et al. Therapeutic effect of intermittent hypobaric hypoxia on myocardial infarction in rats[J]. Basic Res Cardiol, 2011, 106(3):329—342.
- [9] Estrada JA, Williams AG Jr, Sun J, et al. δ -Opioid receptor (DOR) signaling and reactive oxygen species (ROS) mediate intermittent hypoxia induced protection of canine myocardium[J]. Basic Res Cardiol, 2016, 111(2):17.
- [10] Mallet RT, Ryou MG, Williams AG Jr, et al. Beta1-Adrenergic receptor antagonism abrogates cardioprotective

(下转第793页)