

• 论著 •

促红细胞生成素对缺氧/复氧乳鼠心肌细胞的抗凋亡作用及机制研究

王华军 江慧琳 陈晓辉 林佩仪 朱永城 陶丽丽

【摘要】 目的 观察促红细胞生成素(EPO)对缺氧/复氧心肌细胞凋亡的影响,并初步探讨蛋白激酶C(PKC)和线粒体ATP敏感性钾通道(mitoKATP)与EPO在抗凋亡信号通路中的相互关系。**方法** 分离培养SD大鼠乳鼠心肌细胞,并分为对照组、缺氧/复氧组、EPO组和PKC抑制剂白屈菜红碱组,建立缺氧/复氧模型;用流式细胞术检测心肌细胞凋亡率,激光共聚焦显微镜扫描观察细胞黄素蛋白自体荧光强度变化,监测钾通道开放情况。**结果** 缺氧/复氧组心肌细胞凋亡率明显高于对照组[(42.56±8.00)%比(17.88±2.00)%], $P<0.05$],黄素蛋白自体荧光强度值与对照组比较差异无统计学意义[(0.278±0.170)×10⁻²比(0.149±0.050)×10⁻², $P>0.05$];EPO组心肌细胞凋亡率明显低于缺氧/复氧组[(22.73±5.00)%比(42.56±8.00)%], $P<0.05$],黄素蛋白自体荧光强度值则较缺氧/复氧组明显增强[(2.201±1.090)×10⁻²比(0.278±0.170)×10⁻², $P<0.01$];白屈菜红碱对EPO抗凋亡和增强黄素蛋白自体荧光强度有阻断作用[细胞凋亡率:(46.72±17.00)%比(22.73±5.00)%,荧光强度:(0.986±0.320)×10⁻²比(2.201±1.090)×10⁻², $P<0.01$ 和 $P<0.05$]。**结论** 通过激活PKC继而开放mitoKATP通道可能是EPO抗缺氧/复氧心肌细胞凋亡的信号通路之一。

【关键词】 促红细胞生成素; 缺氧/复氧; 凋亡; 黄素蛋白自体荧光

The anti-apoptosis effect of erythropoietin on neonatal rat cardiocytes during hypoxia/reoxygenation injury and its possible mechanism WANG Hua-jun, JIANG Hui-lin, CHEN Xiao-hui, LIN Pei-yi, ZHU Yong-cheng, TAO Li-li. Department of Emergency, the Second Affiliated Hospital, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510260, Guangdong, China

Corresponding author: JIANG Hui-lin, Email: lifisher@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the anti-apoptosis effect of erythropoietin (EPO) on myocardial cells after hypoxia/reoxygenation in vitro, and the relationship among protein kinase C (PKC), the mitochondrial ATP-sensitive potassium (mitoKATP) channel and EPO in the anti-apoptotic signaling pathways. **Methods** Cardiocytes were harvested from neonatal rats and cultured. Cultured myocardial cells were divided into the control group, the hypoxia/reoxygenation group, the EPO group and the chelerythrine group, and a hypoxia/reoxygenation model of cardiocytes was reproduced. Apoptosis rate was assayed by flow cytometry. Flavoprotein fluorescence was scanned by confocal laser microscope to assess the mitoKATP channel activity. **Results** Apoptosis rate was significantly higher in hypoxia/reoxygenation group than that of control group [(42.56±8.00)% vs. (17.88±2.00)%, $P<0.05$]. There was no statistically significant difference in flavoprotein fluorescence between this group and the control group [(0.278±0.170)×10⁻² vs. (0.149±0.050)×10⁻², $P>0.05$]. Myocardial cell apoptosis rate in EPO group was lower than that in hypoxia/reoxygenation group [(22.73±5.00)% vs. (42.56±8.00)%, $P<0.05$], and flavoprotein fluorescence intensity was significantly enhanced when compared with hypoxia/reoxygenation group [(2.201±1.090)×10⁻² vs. (0.278±0.170)×10⁻², $P<0.01$]. However, when chelerythrine was added, the anti-apoptosis effect of EPO was blocked, and the intensity of cardiocytes flavoprotein fluorescence was decreased [the apoptosis rate was (46.72±17.00)% and the flavoprotein fluorescence intensity was (0.986±0.320)×10⁻²]. When compared with EPO group there was statistically significant difference ($P<0.01$ and $P<0.05$). **Conclusion** Myocardial cell apoptosis occurs in hypoxia/reoxygenation injury, and EPO can protect rat cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation induced apoptosis. The protective effect is partly associated with the PKC/mitoKATP pathway.

【Key words】 Erythropoietin; Hypoxia/reoxygenation; Apoptosis; Flavoprotein fluorescence

研究证实,促红细胞生成素(EPO)作为一种糖

蛋白类细胞刺激因子,在脑缺血/再灌注(I/R)早期神经元内含量即显著增加,从而发挥神经保护作用^[1]。抗凋亡是EPO抗I/R损伤的主要作用方式之一^[2]。蛋白激酶C(PKC)、线粒体ATP敏感性钾通道(mitoKATP)等是EPO抗凋亡信号通路中的重

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2010.05.015

基金项目:广东省科研基金项目(A2009276)

作者单位:510260 广东,广州医学院第二附属医院急诊科

通信作者:江慧琳,Email: lifisher@126.com

要信号分子^[3,4],但对于 PKC、mitoKATP 通道与 EPO 在抗凋亡作用中的相互关系目前尚无报道。为此,本研究中通过观察 PKC 对 EPO 抗缺氧/复氧心肌细胞凋亡及 mitoKATP 通道开放的影响,对 EPO 的抗凋亡机制予以初步探讨。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂:1~3 d 的 SD 大鼠乳鼠(由中山大学实验动物中心提供),膜联蛋白 V/异硫氰酸荧光素(Annexin V/FITC)试剂盒(美国 Bender 公司),抗 α -肌动蛋白(α -actin)一抗(美国 Abcam 公司),山羊抗小鼠红色 CY3 荧光二抗(美国 Proteintech 公司),重组人促红细胞生成素(rhEPO, 日本麒麟公司),白屈菜红碱(chelerythrine, 美国 Merck 公司),胎牛血清(FBS)、DMEM 培养基、胰酶(美国 Gibco 公司)。

1.2 心肌细胞缺氧/复氧模型建立及实验分组:按参考文献^[5]方法加以改良分离、收集、纯化乳鼠心肌细胞,以 1×10^6 个/ml 接种至培养皿并静置于 CO_2 培养箱中培养(37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 、 $21\%\text{O}_2$),48 h 后换为含 10% FBS 的 DMEM 培养液,培养 72 h 后换不含 FBS 的低糖 DMEM 培养液培养 24 h,使细胞周期同步化;然后将细胞分为对照组、缺氧/复氧组、EPO 组(在缺氧/复氧同时加 10 kU/L EPO 处理)、PKC 抑制剂白屈菜红碱组(在缺氧/复氧同时加 10 kU/L EPO 及 $10\ \mu\text{mol/L}$ 白屈菜红碱处理),每组 3 个培养皿;转至三气培养箱中(37°C 、 $1\%\text{O}_2$ 、 $5\%\text{CO}_2$ 、 $94\%\text{N}_2$)无氧培养 10 h 后、更换高糖 DMEM 继续在普通培养箱中常氧培养 4 h;对照组除不进行缺氧处理外,其余处理同缺氧/复氧组。

1.3 心肌细胞鉴定:取 3 个培养皿中正常培养心肌细胞,以抗 α -actin 抗体、山羊抗小鼠荧光二抗行细

胞免疫荧光染色,在荧光显微镜下每个培养皿中随机取 10 个视野计数阳性细胞,取平均值。

1.4 检测指标及方法:①心肌细胞凋亡率检测:用流式细胞术检测凋亡心肌细胞,细胞取样数设定为 10 000 个,每组 3 个培养皿,各皿检测 2 次,取平均值。②黄素蛋白自体荧光检测:用激光共聚焦显微镜观察培养心肌细胞的黄素蛋白自体荧光强度,随机选取 5 个视野扫描,图像分析软件计算单位面积荧光强度,取平均值。

1.5 统计学处理:应用 SPSS 13.0 统计学软件,实验数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫荧光法鉴定心肌细胞结果(图 1):在荧光显微镜下观察呈红染的心肌细胞计数达 94% 以上,提示分离细胞经差速贴壁和 5-溴脱氧尿嘧啶(5-BrdU)抑制非心肌细胞增殖后,可以获得较纯的心肌细胞。

2.2 缺氧/复氧损伤后各组心肌细胞凋亡率(表 1;图 2):光镜下可见对照组心肌细胞有节律的搏动,约 100 次/min,流式细胞术检测细胞有自发凋亡;经缺氧/复氧后心肌细胞搏动减弱,甚至消失,凋亡率较对照组明显升高($P < 0.05$);EPO 组细胞凋亡率显著低于缺氧/复氧组($P < 0.05$),而与对照组无明显差异;白屈菜红碱组细胞凋亡率与缺氧/复氧组也无明显差异。

2.3 黄素蛋白自体荧光强度变化(表 1;图 3):激光共聚焦显微镜下观察,对照组心肌细胞黄素蛋白氧化后有微弱自体荧光;缺氧/复氧组单位面积平均荧光强度略高于对照组($P > 0.05$);EPO 组平均荧光强度显著高于其他各组(均 $P < 0.01$)。

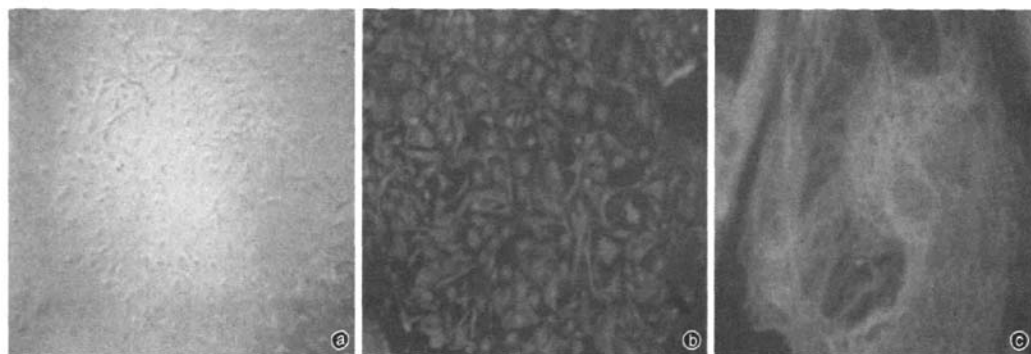
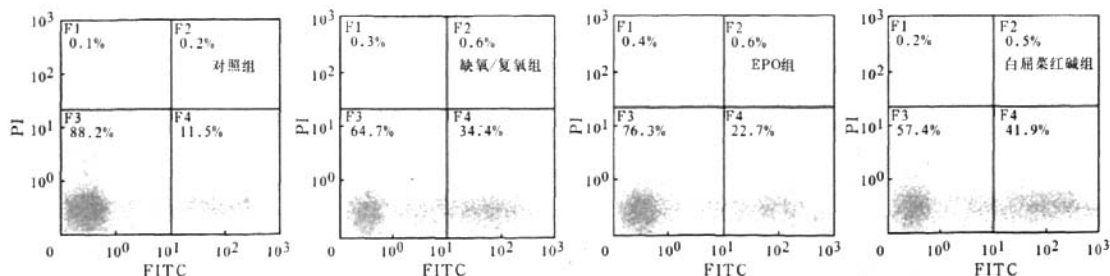


图 1 分离培养的乳鼠心肌细胞鉴定结果 光镜下(a)观察心肌细胞呈梭形、菱形或多角形,贴壁生长,部分有伪足形成 $\times 10$;荧光显微镜下(b)观察心肌细胞呈红染 α -肌动蛋白荧光染色 $\times 10$;油镜下(c)观察肌动蛋白呈丝状,由细胞核向周围放射状/网状分布,形成心肌细胞骨架,结构清晰、荧光强 α -肌动蛋白荧光染色 $\times 100$



注: Annexin V / FITC; 膜联蛋白 V / 异硫氰酸荧光光度, PI: 碘化丙锭, EPO: 促红细胞生成素; Annexin V / FITC 阳性、PI 阴性为凋亡细胞(右下象限)
图 2 流式细胞术检测各组缺氧/复氧乳鼠心肌细胞凋亡情况

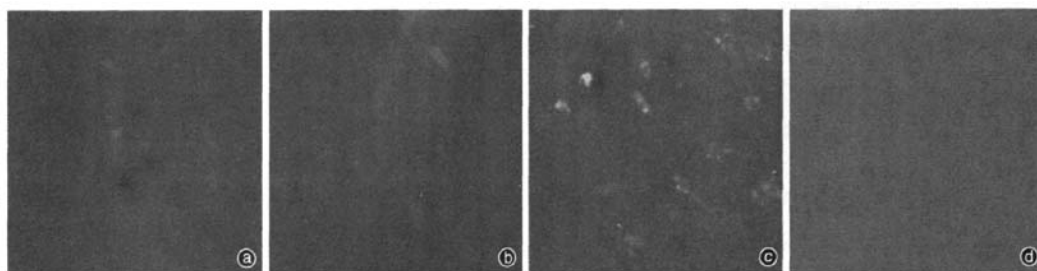


图 3 乳鼠心肌细胞黄素蛋白自体荧光激光共聚焦扫描图 对照组(a)心肌细胞激光共聚焦扫描可见微弱自体荧光; 缺氧/复氧处理后(b)自体荧光强度稍有增强; EPO 治疗组(c)自体荧光强度则明显增强; 白屈菜红碱组(d)黄素蛋白自体荧光强度则明显减弱 $\times 20$

表 1 各组大鼠缺氧/复氧心肌细胞凋亡率及黄素蛋白自体荧光强度比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	凋亡率(%)	黄素蛋白($\times 10^{-2}$ 荧光强度)
对照组	3	17.88 $\pm$ 2.00	0.149 $\pm$ 0.050
缺氧/复氧组	3	42.56 $\pm$ 8.00 ^a	0.278 $\pm$ 0.170
EPO 组	3	22.73 $\pm$ 5.00 ^c	2.201 $\pm$ 1.090 ^{bd}
白屈菜红碱组	3	46.72 $\pm$ 17.00 ^{bf}	0.986 $\pm$ 0.320 ^e

注: EPO: 促红细胞生成素; 与对照组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 与缺氧/复氧组比较, ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$; 与 EPO 组比较, ^e $P < 0.05$, ^f $P < 0.01$

3 讨论

EPO 除可以促进红细胞生成、增加红细胞容量外,还具有众多非造血功能。近年来发现 EPO 在减少 I/R 心肌细胞凋亡、缩小梗死面积、改善梗死后心功能和心肌重构等方面有重要保护作用,并且在缺血前、缺血时、再灌注等较长时间窗内用药均能发挥有效作用^[6];即使在由心搏骤停引起的严重心脑 I/R 模型中, EPO 也能改善复苏后心功能,如在窒息及电击诱导心室纤颤大鼠心搏骤停模型中,于复苏后 3 min 给予外源性 EPO,可明显改善大鼠的心功能^[7-10]。EPO 的保护作用不仅在动物实验中得到证实,而且在临床上, Grmec 等^[11]发现 EPO 同样能够促进院外心搏骤停患者自主循环恢复及提高抢救成功率。

研究显示, EPO 在 I/R 心肌中的保护作用是通过减少心肌细胞凋亡、抗氧化应激、抗炎、减轻 Ca^{2+} 超载、促进血管生成等多种途径起作用的,其中抗凋亡被认为是 EPO 发挥心肌保护作用的主要途径,并与磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)、PKC、mitoKATP、酪氨酸激酶(JAK2)、一氧化氮合酶(NOS)等激活有关。PKC 促进 mitoKATP 通道开放减轻凋亡被认为是缺血预适应的关键环节, Joyeux-Faure 等^[12]推测在 I/R 中 EPO 同样可能是通过磷酸化 PKC,继而开放 mitoKATP 发挥心肌保护作用。本研究结果发现, EPO 处理在培养乳鼠心肌细胞缺氧/复氧损伤中有显著抗凋亡作用,而在 EPO 预处理的同时加入 10 μ mol/L PKC 抑制剂白屈菜红碱可以明显阻断 EPO 的抗凋亡作用,证实 EPO 可以通过激活 PKC 发挥抗心肌细胞缺氧/复氧凋亡作用,这与 Rafiee 等^[3]和 Shi 等^[4]报道的结果一致。黄素蛋白自体荧光强弱被认为是判断 mitoKATP 通道开放与否的重要指标^[13-14]。本研究中还观察到, EPO 处理组黄素蛋白自体荧光强度较对照组、缺氧/复氧组均明显增强。提示 EPO 在抗心肌细胞凋亡的同时促进了 mitoKATP 通道的开放。结合既往心脏 I/R 的实验发现, mitoKATP 通道阻滞剂 5-羟基羧酸(5HD)阻断了 EPO 诱导心肌保护作用的事实^[4,15],可以认为 mitoKATP 通道的开放是 EPO 抗凋亡作用的重要

环节。因此,本实验证实了 PKC、mitoKATP 通道的激活参与了 EPO 抗心肌细胞缺氧/复氧损伤作用,它们与 PI3K、JAK2、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(Akt)、NOS 等形成了一个相互关联、相互启动的复杂网路,共同产生了 EPO 心肌细胞保护作用。但 PKC 是否如同在心肌缺血预适应细胞保护的复杂网络机制中起共同通路作用及激活 mitoKATP 通道开放发挥抗凋亡作用^[16],目前尚未明确。在用 PKC 抑制剂白屈菜红碱预处理后发现,白屈菜红碱在抑制 EPO 抗凋亡作用的同时,减弱了 EPO 对黄素蛋白自体荧光的增强作用,提示 PKC 抑制剂在阻断 EPO 抗凋亡作用同时也抑制了 mitoKATP 通道的开放,说明 PKC 抑制剂阻断 EPO 的抗凋亡作用是通过关闭 mitoKATP 通道实现的,换言之,EPO 激活 PKC 发挥抗缺氧/复氧心肌细胞凋亡作用的信号通路与 mitoKATP 通道的开放有关。

综上所述,通过激活 PKC,开放 mitoKATP 通道可能是 EPO 抗缺氧/复氧心肌细胞凋亡的信号通路之一。但 EPO 抗缺氧/复氧心肌细胞凋亡的机制是一个多条途径参与,并相互间联系错综复杂的网络,且其具体的信号通路有待更进一步的研究。

参考文献

- [1] 王震虹,王祥瑞.低氧预处理诱导促红细胞生成素对脑缺血后损伤及认知功能的保护作用.中国中西医结合急救杂志,2008,15:365-369.
- [2] Lipsic E, Westenbrink BD, van der Meer P, et al. Low-dose erythropoietin improves cardiac function in experimental heart failure without increasing haematocrit. Eur J Heart Fail, 2008, 10:22-29.
- [3] Rafiee P, Shi Y, Su J, et al. Erythropoietin protects the infant heart against ischemia-reperfusion injury by triggering multiple signaling pathways. Basic Res Cardiol, 2005, 100:187-197.
- [4] Shi Y, Rafiee P, Su J, et al. Acute cardioprotective effects of erythropoietin in infant rabbits are mediated by activation of protein kinases and potassium channels. Basic Res Cardiol, 2004, 99:173-182.
- [5] 张颖,郑燕倩,王红卫,等.新生大鼠心肌细胞培养及电生理特性观察.上海交通大学学报(医学版),2007,27:398-400,414.
- [6] Lipsic E, van der Meer P, Henning RH, et al. Timing of erythropoietin treatment for cardioprotection in ischemia/reperfusion. J Cardiovasc Pharmacol, 2004, 44:473-479.
- [7] Huang CH, Hsu CY, Chen HW, et al. Erythropoietin improves the postresuscitation myocardial dysfunction and survival in the asphyxia-induced cardiac arrest model. Shock, 2007, 28:53-58.
- [8] Huang CH, Hsu CY, Tsai MS, et al. Cardioprotective effects of erythropoietin on postresuscitation myocardial dysfunction in appropriate therapeutic windows. Critical Care Medicine, 2008, 36:S467-S473.
- [9] Hsu CY, Huang CH, Chang WT, et al. Cardioprotective effect of therapeutic hypothermia for postresuscitation myocardial dysfunction. Shock, 2009, 32:210-216.
- [10] Singh D, Kolarova JD, Wang S, et al. Myocardial protection by erythropoietin during resuscitation from ventricular fibrillation. Am J Ther, 2007, 14:361-368.
- [11] Grmec S, Strnad M, Kupnik D, et al. Erythropoietin facilitates the return of spontaneous circulation and survival in victims of out-of-hospital cardiac arrest. Resuscitation, 2009, 80: 631-637.
- [12] Joyeux-Faure M, Godin-Ribuot D, Ribaut C. Erythropoietin and myocardial protection: what's new? Fundam Clin Pharmacol, 2005, 19:439-446.
- [13] Dröse S, Brandt U, Hanley PJ. K⁺-independent actions of diazoxide question the role of inner membrane KATP channels in mitochondrial cytoprotective signaling. J Biol Chem, 2006, 281:23733-23739.
- [14] Billman GE. The cardiac sarcolemmal ATP-sensitive potassium channel as a novel target for anti-arrhythmic therapy. Pharmacol Ther, 2008, 120:54-70.
- [15] Joyeux-Faure M, Ramond A, Béguin PC, et al. Early pharmacological preconditioning by erythropoietin mediated by inducible NOS and mitochondrial ATP-dependent potassium channels in the rat heart. Fundam Clin Pharmacol, 2006, 20:51-56.
- [16] Marinovic J, Bosnjak ZJ, Stadnicka A. Preconditioning by isoflurane induces lasting sensitization of the cardiac sarcolemmal adenosine triphosphate-sensitive potassium channel by a protein kinase C-delta-mediated mechanism. Anesthesiology, 2005, 103:540-547.

(收稿日期:2010-03-01)

(本文编辑:李银平)

• 启事 •

2010 重症医疗规范化建设全国继续教育培训班会议通知

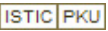
当前,ICU 从业医护人员专业知识和技能的规范化培训已成为学科持续快速发展的关键环节,对全面提高我国重症救治水平具有重要意义。解放军总参总医院(解放军第三〇九医院)拟于 2010 年 6 月 10 日至 13 日在北京举办 2010 重症医疗规范化建设全国继续教育培训班(国家项目,Ⅰ类学分 10 分)。本学习班将以重症医学基本理论、重症救治技术临床实践中的基本问题以及临床操作规范为主要内容,涉及机械通气、感染、液体复苏、肾脏替代治疗、营养支持、出凝血功能障碍、神经系统功能障碍、ICU 镇静与镇痛、重症护理、ICU 质量控制与安全性等。邀请国内知名危重病及相关专业学者进行基础与进展专题讲座。欢迎 ICU 及相关专业医护人员参加。会议时间:2010 年 6 月 10 日至 13 日。地点:北京,颐泉山庄宾馆。会务费 700 元/人。联系人:刘京涛 13910697082,010-6775068;Email:ljt309@sohu.com。

(解放军总参总医院:原解放军第三〇九医院)

促红细胞生成素对缺氧/复氧乳鼠心肌细胞的抗凋亡作用及机制研究

作者: [王华军](#), [江慧琳](#), [陈晓辉](#), [林佩仪](#), [朱永城](#), [陶丽丽](#), [WANG Hua-jun](#), [JIANG Hui-lin](#), [CHEN Xiao-hui](#), [LIN Pei-yi](#), [ZHU Yong-cheng](#), [TAO Li-li](#)

作者单位: [广州医学院第二附属医院急诊科, 广东, 510260](#)

刊名: [中国危重病急救医学](#) 

英文刊名: [CHINESE CRITICAL CARE MEDICINE](#)

年, 卷(期): 2010, 22(5)

被引用次数: 0次

参考文献(16条)

1. [Huang CH;Hsu CY;Chen HW](#) [Erythropoietin improves the postresuscitation myocardial dysfunction and survival in the asphyxia-induced cardiac arrest model](#) 2007(1)
2. [Lipsic E;van der Meer P;Henning RH](#) [Timing of erythropoietin treatment for cardioprotection in ischemia/reperfusion](#) 2004
3. [张颖;郑燕倩;王红卫](#) [新生大鼠心肌细胞培养及电生理特性观察](#)[期刊论文]-[上海交通大学学报\(医学版\)](#) 2007(4)
4. [Shi Y;Rafiee P;Su J](#) [Acute cardioprotective effects of erythropoietin in infant rabbits are mediated by activation of protein kinases and potassium channels](#) 2004
5. [Rafiee P;Shi Y;Su J](#) [Erythropoietin protects the infant heart against ischemia-reperfusion injury by triggering multiple signaling pathways](#) 2005
6. [Hsu CY;Huang CH;Chang WT](#) [Cardioprotective effect of therapeutic hypothermia for postresuscitation myocardial dysfunction](#) 2009
7. [Huang CH;Hsu CY;Tsai MS](#) [Cardioprotective effects of erythropoietin on postresuscitation myocardial dysfunction in appropriate therapeutic windows](#) 2008
8. [Singh D;Kolarova JD;Wang S](#) [Myocardial protection by erythropoietin during resuscitation from ventricular fibrillation](#) 2007(4)
9. [Lipsic E;Westenbrink BD;van der Meet P](#) [Low-dose erythropoietin improves cardiac function in experimental heart failure without increasing haematocrit](#) 2008
10. [王震虹;王祥瑞](#) [低氧预处理诱导促红细胞生成素对脑缺血后损伤及认知功能的保护作用](#)[期刊论文]-[中国中西医结合急救杂志](#) 2008(6)
11. [Joyeux-Faure M;Ramond A;B\(e\)guin PC](#) [Early pharmacological preconditioning by erythropoietin mediated by inducible NOS and mitochondrial ATP-dependent potassium channels in the rat heart](#) 2006(1)
12. [Billman GE](#) [The cardiac sarcolemmal ATP-sensitive potassium channel as a novel target for anti-arrhythmic therapy](#) 2008
13. [Drose S;Brandt U;Hanley PJ](#) [K+-independent actions of diazoxide question the role of inner membrane KATP channels in mitochondrial cytoprotective signaling](#) 2006
14. [Joyeux-Faure M;Godin-Ribuot D;Ribuot C](#) [Erythropoietin and myocardial protection: what's new](#) 2005(4)
15. [Grmec S;Strnad M;Kupnik D](#) [Erythropoietin facilitates the return of spontaneous circulation and](#)

16. [Marinovic J;Bosnjak ZJ;Stadnicka A](#) [Preconditioning by isoflurane induces lasting sensitization of the cardiac sarcolemmal adenosine triphosphate-sensitive potassium channel by a protein kinase C-delta-mediated mechanism](#) 2005

相似文献(10条)

1. 学位论文 [王华军](#) [促红细胞生成素改善大鼠心肺复苏后心功能不全机制的研究](#) 2010

背景和目的:
心功能不全是导致心跳骤停患者复苏后死亡的重要原因之一。我们前期研究观察到促红细胞生成素(EPO)对大鼠心肺复苏后的心功能不全有改善作用,但对EPO改善心肺复苏后心功能不全的途径和机制尚不明确。为此本实验通过观察EPO干预对心肺复苏后心肌细胞凋亡率和细胞骨架蛋白的变化,探讨EPO改善心肺复苏后心功能不全的机制;通过体外心肌细胞缺氧/复氧损伤模型,观察EPO和蛋白激酶C(PKC)抑制剂白屈菜红碱干预后,体外心肌细胞凋亡及黄素蛋白自体荧光强度的变化,探讨EPO抗心肌细胞凋亡的机制,为临床预防和治疗复苏后心功能不全提供实验依据。

方法:
第一部分:
取前期心肺复苏实验已制作的大鼠心肌石蜡组织块,分为正常组、CPR组和EPO组,每组8只。行Tune1染色观察各组心肌细胞凋亡率, SABC免疫组化法观察微管蛋白、结蛋白和肌动蛋白变化。
第二部分:
将SD大鼠乳鼠心肌细胞建立缺氧/复氧模型(H/R),并随机分为4组:①正常组;②缺氧/复氧组(缺氧10h,复氧4h);③EPO治疗组(缺氧/复氧同时,加EPO干预);④抑制剂组(缺氧/复氧同时,加EPO和PKC抑制剂联合干预)。流式细胞仪Annexin V FITC/PI法检测各组心肌细胞凋亡率,免疫荧光法观察各组细胞微管蛋白、肌动蛋白结构和荧光强度变化,共聚焦显微镜观察各组细胞黄素蛋白自体荧光变化,监测线粒体ATP敏感性钾通道(mitoKATP)开放情况。

结果:
第一部分:
1. CPR组心肌细胞凋亡数(314.1个±30.7个)较正常组(165.2个±45.9个)明显升高(P<0.05)。EPO治疗组心肌细胞凋亡数为(242.1个±20.0个),与CPR组比较,凋亡细胞数明显减少,其差异有统计学意义(P<0.05)。
2. 正常组、CPR组、EPO治疗组大鼠肌动蛋白免疫组化平均光密度值分别(8.18±1.04、8.51±1.96、6.34±0.43)×10⁻²,组间两两比较差异均无统计学意义(P>0.05);微管蛋白免疫组化平均光密度值分别(8.87±1.85、7.35±0.26、9.70±0.13)×10⁻²,组间两两比较均无统计学差异(P>0.05);结蛋白免疫组化平均光密度值分别为(7.57±2.96、8.20±3.17、7.48±1.82)×10⁻²,组间两两比较均无明显统计学差异(P>0.05)。
第二部分:
1. 缺氧/复氧组心肌细胞凋亡率较正常组明显增加{(42.5[%]±8.0[%])对(13.9[%]±2.0[%])},比较有统计学意义(P<0.05)。EPO处理降低了缺氧/复氧心肌细胞凋亡率(22.7[%]±5.0[%]),与缺氧/复氧组比较差异有统计学意义(P<0.05)。蛋白激酶C抑制剂阻断了EPO抗缺氧/复氧损伤后心肌细胞凋亡作用,其凋亡率(46.7[%]±17.0[%])与EPO治疗组比较差异有统计学意义(P<0.05)。
2. 缺氧/复氧组心肌细胞肌动蛋白、微管蛋白荧光染色结构明显破坏,网状结构模糊不清,平均荧光强度值{(0.43±0.15)×10⁻²、(0.36±0.10)×10⁻²}较正常组{(5.0±1.6)×10⁻²、(8.2±3.6)×10⁻²}明显减弱,差异均有统计学意义(P<0.05),但与EPO治疗组{(1.8±0.20)×10⁻²、(1.7±0.36)×10⁻²}比较差异均无统计学意义(P>0.05)。
3. EPO治疗组心肌细胞黄素蛋白自体荧光强度(2.20±0.11)×10⁻²较正常组、缺氧/复氧组、抑制剂组{(0.15±0.05)×10⁻²、(0.28±0.17)×10⁻²、(0.99±0.33)×10⁻²}均明显增强,分别比较差异均有显著统计学意义(P<0.05)。

结论:
1. 减少心肌细胞凋亡是EPO改善窒息诱导大鼠心肺复苏后心功能不全的重要机制之一。
2. EPO抗凋亡机制可能是通过磷酸化PKC,继而开放mitoKATP通道而起作用。
3. 缺血/再灌注(缺氧/复氧)对细胞骨架的破坏作用可能具有时效性,EPO对细胞骨架无保护作用。

2. 期刊论文 [张锦英.张郁青.杨乃全.张定国.ZHANG Jin-ying.ZHANG Yu-qing.YANG Nai-quan.ZHANG Ding-guo](#) [促红细胞生成素对乳鼠心肌细胞缺氧/复氧损伤的保护作用 -南京医科大学学报\(自然科学版\)](#) 2007, 27(5)

目的:观察促红细胞生成素(erythropoietin,EP)对乳鼠心肌细胞缺氧/复氧(hypoxia/reoxygenation,H/R)损伤的影响及其相关机制探讨.方法:分离培养SD乳鼠心肌细胞,建立H/R模型.心肌细胞随机分为4组:①H/R组缺氧2 h,复氧4 h;②EP组在缺氧前1 h予EP(10 U/ml),随即缺氧2 h,复氧4 h;③Wortmannin+EP组(W+EP)在EP预处理前30 min予3-磷脂酰肌醇激酶(phosphatidylinositol-3-kinase,PI3-K)特异性阻断剂Wortmannin(100 nmol/L);④正常对照组流式细胞仪检测细胞凋亡率.Western blot法检测心肌细胞EP受体表达和p-Akt/Akt比值.结果:EP可明显降低缺氧/复氧引起的心肌细胞凋亡,并明显增强SD乳鼠心肌细胞p-Akt/Akt比值;而Wortmannin减弱了EP的抗细胞凋亡作用,显著降低了p-Akt/Akt比值.结论:细胞凋亡参与了心肌缺氧/复氧损伤;EP可减少缺氧/复氧引起的SD乳鼠心肌细胞凋亡,其机制可能与EP激活PI-3K/Akt信号通路有关.

3. 期刊论文 [杨迪成.肖明第.袁忠祥.卢成宝.吕志前.段亮.YANG Di-cheng.XIAO Ming-di.YUAN Zhong-xiang.LU Cheng-bao.LV Zhi-qian.DUANG Liang](#) [促红细胞生成素对心肌细胞缺氧/复氧损伤的保护作用 -中华急诊医学杂志](#) 2007, 16(6)

目的 探讨促红细胞生成素(EPO)对心肌细胞缺氧/复氧(HR)损伤的保护作用及其机制.方法 对乳鼠心肌细胞进行原代分离培养,并缺氧2 h,复氧1 h,建立HR损伤模型.心肌细胞随机分为四组:正常细胞培养组(空白组),HR组,HR+EPO 10 U/ml组(EPO组),HR+EPO 10 U/ml+U0126 10 μmol/L组(U0126组).全自动生化分析仪检测各组细胞培养液LDH活性;MTT法检测心肌细胞活性;TUNEL法:流式细胞仪Annexin-V-FITC法检测凋亡心肌细胞;Western blot法测定各组心肌细胞ERK1/2和磷酸化ERK1/2蛋白含量.结果 EPO显著降低心肌细胞HR损伤后LDH的漏出,增强细胞的活性,减少细胞的凋亡比例,提高ERK1/2蛋白磷酸化水平;而经过U0126(MAPK的阻滞剂)的处理,心肌细胞LDH外溢量增加,细胞活性显著下降,凋亡细胞的比例明显增加,且ERK1/2蛋白磷酸化水平显著降低.结论 EPO对心肌细胞HR损伤有一定的保护作用,其机制与ERK1/2信号通路的激活及抑制心肌细胞凋亡有关.

4. 期刊论文 [秦川.肖颖彬.陈林.钟前进.QIN Chuan.XIAO Ying-bin.CHEN Lin.ZHONG Qian-jin](#) [促红细胞生成素预处理在大鼠心肌缺氧复氧损伤中的抗氧化效应 -局解手术学杂志](#) 2011, 20(1)

目的观察促红细胞生成素(EPO)预处理在大鼠心肌缺血/再灌注(H/R)损伤中的抗氧化效应。方法Wistar成年雄性大鼠60只,分为对照组、EPO预处理组(EPO组),每组30只。EPO组大鼠经腹腔注射5 000 U/kg重组人促红细胞生成素,对照组注射同体积生理盐水。两组各15只大鼠于给药24 h后采血,检测血清中心肌酶活性,取心肌组织,检测超氧化物歧化酶(SOD)活性、谷胱甘肽(GSH)以及丙二醛(MDA)含量,电镜下观察心肌超微结构;每组其余15只大鼠置于常压缺氧环境中(O₂的体积分数为7%)12 h后,移至常压常氧环境中2 h,予H/R损伤,取血及心肌组织,检测以上各指标。结果H/R损伤前2组SOD、GSH以及MDA水平差异无统计学意义($P>0.05$)。H/R损伤后两组心肌SOD活力及GSH含量较损伤前显著降低($P<0.05$, $P<0.01$),而MDA含量较损伤前显著升高($P<0.05$, $P<0.01$),EPO组SOD活力、GSH含量高于对照组($P<0.01$),MDA含量显著低于对照组($P<0.01$)。H/R损伤后两组的血清心肌酶活性显著高于损伤前($P<0.01$),而EPO组显著低于对照组($P<0.01$)。H/R导致对照组心肌超微结构显著异常,而EPO组基本正常。结论EPO预处理在心肌H/R损伤中具有抗氧化作用,这可能是其在H/R损伤中心肌保护作用的重要机制之一。

5. 期刊论文 [秦川, 肖颖彬, 钟前进, 陈林, 王学锋, QIN Chuan, XIAO Ying-bin, ZHONG Qian-jin, CHEN Lin, WANG Xue-feng](#) NF- κ B在EPO预处理对培养心肌细胞缺氧/复氧损伤保护效应中作用的研究 -第三军医大学学报2005, 27 (22)

目的观察促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)预处理对培养心肌细胞缺氧/复氧损伤(H/R)的保护效应及其与预处理过程中NF- κ B的关系。方法采用培养的新生大鼠心肌细胞建立缺氧/复氧损伤模型,细胞分组为:对照组、EPO预处理组(EPO组)(EPO 10 U/ml)、EPO+吡咯烷二硫氨基甲酸盐(PDTC)预处理组(EPO+PDTC组)(EPO 10 U/ml+PDTC 5 μ g/ml)、PDTC预处理组(PDTC组)(PDTC 5 μ g/ml),共4组,分别于缺氧/复氧损伤前后,检测培养液LDH含量,MTT比色法观察细胞活力及流式细胞仪检测心肌细胞凋亡。采用EMSA检测缺氧复氧损伤前后各组心肌细胞NF- κ B活性。结果 EPO预处理显著降低心肌细胞缺氧/复氧损伤后细胞培养液LDH含量,提高细胞存活率,并降低心肌细胞凋亡率,预处理过程中同时加入NF- κ B阻断剂PDTC使EPO预处理的以上心肌保护效应显著减弱或消失。EMSA显示EPO预处理使H/R前心肌细胞NF- κ B活性较对照组、EPO+PDTC组、PDTC组显著升高($P<0.05$),EPO+PDTC组心肌细胞NF- κ B活性与PDTC组和对对照组无显著差异($P>0.05$)。缺氧复氧损伤后各组心肌细胞NF- κ B活性较正常对照组显著升高($P<0.01$),但EPO组的NF- κ B活性低于其余各组($P<0.05$),其余各组间无显著差异($P>0.05$)。结论 EPO预处理对培养心肌细胞缺氧/复氧损伤具有保护效应,这一作用与EPO预处理过程中NF- κ B的活化有关,NF- κ B的活化可能通过其负反馈调节机制抑制H/R后心肌细胞NF- κ B活性的升高。

6. 期刊论文 [秦川, 肖颖彬, 陈林, 钟前进, 王学锋](#) 促红细胞生成素预处理在心肌缺血复氧损伤中的抗炎作用 -四川医学2010, 31 (2)

目的 观察促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)预处理在大鼠心肌缺血/再灌注(hypoxia/reoxygenation, H/R)中的抗炎作用并探讨其可能机制。方法 Wistar成年雄性大鼠60只,分为对照组、EPO预处理组(EPO组),每组30只,EPO组大鼠经腹腔注射5000U/kg重组人促红细胞生成素(recombinant human erythropoietin, RhEPO),对照组注射同体积生理盐水。2组各15只大鼠于给药24h后,取心肌,以DNA末端转移酶标记法(TUNEL法)检测心肌细胞凋亡,免疫组化检测凋亡效应酶天蛋白酶-3(caspase-3)、炎性细胞因子、TNF- α 蛋白表达水平,凝胶电泳迁移率实验(elec-trophoretic mobility shift assay, EMSA)检测核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)DNA结合活性,其余15只大鼠置于常压缺氧环境中(O₂7%)12h后,移至常压常氧环境中2h,予H/R损伤,取心肌,检测以上各指标。结果 H/R损伤前2组心肌细胞凋亡率,caspase-3、TNF- α 蛋白表达差异无统计学意义($P>0.05$),EPO组心肌NF- κ B DNA结合活性显著高于对照组($P<0.05$, $P<0.01$)。H/R损伤后2组心肌细胞凋亡率,caspase-3、TNF- α 蛋白表达水平,NF- κ B DNA结合活性显著高于损伤前($P<0.01$),EPO组的心肌细胞凋亡率,caspase-3、TNF- α 蛋白表达水平,NF- κ B DNA结合活性显著低于对照组($P<0.05$, $P<0.01$)。结论 EPO预处理在心肌H/R损伤中具有抑制NF- κ B活化及炎性细胞因子TNF- α 表达的抗炎作用;这一作用可能与NF- κ B激活的负反馈机制有关。

7. 期刊论文 [杨雪, 秦宇红, 朱兵, 范利, 张丽萍, 骆雷鸣, YANG Xue, QIN Yu-hong, ZHU Bing, FAN Li, ZHANG Li-ping, LUO Lei-ming](#) 促红细胞生成素(EPO)对新生大鼠心肌细胞缺氧-复氧模型线粒体膜电位的影响 -老年医学与保健2007, 13 (2)

目的 观察EPO对培养的新生大鼠心肌细胞缺氧-复氧后线粒体膜电位影响,探讨其对缺氧心肌细胞能量代谢的保护作用。方法 培养新生大鼠心肌细胞分成缺氧组和促红细胞生成素(EPO)组,每组根据缺氧-复氧时间分为5个亚组,检测各组细胞线粒体膜电位变化。结果 缺氧-复氧后,缺氧组各时间点线粒体膜电位均较未缺氧时下降,但单纯缺氧期下降较缓;复氧后,缺氧组各时间点的膜电位均低于缺氧前;EPO组只在缺氧2 h-复氧2 h时下降显著;缺氧-复氧后同一时间点两组间比较,EPO组在复氧后的各时间点均高于缺氧组。结论 早期应用EPO可明显减轻心肌细胞缺氧/复氧后线粒体膜电位的下降,促进膜电位的快速恢复,从而改善缺氧心肌细胞的能量代谢。

8. 期刊论文 [朱兵, 秦宇红, 杨雪, 赵宝成, ZHU Bing, QIN Yu-hong, YANG Xue, ZHAO Bao-cheng](#) 促红细胞生成素对缺氧乳鼠心肌细胞凋亡及坏死的影响 -中国临床保健杂志2008, 11 (2)

目的 观察促红细胞生成素(EPO)对缺氧心肌细胞的保护效应及量效关系。方法 将当日生乳鼠,局部碘酒酒精消毒后胸骨正中开胸,取心尖前1/2心室肌进行细胞培养。培养4 d后选择细胞生长情况良好的培养瓶(>106个细胞/瓶)分为3组:A, 对照组,正常培养;B, 缺氧组,缺氧1h/复氧12 h;C, EPO组,缺氧/复氧加EPO干预。EPO组根据不同EPO干预浓度又分为C1, EPO干预浓度0.1 IU/ml;C2, EPO浓度1 IU/ml;C3, EPO干预浓度10 IU/ml。然后以荧光染色流式细胞仪检测缺氧/复氧后心肌细胞的凋亡及坏死情况。结果 缺氧组细胞的凋亡、坏死比率分别为(20.78 $\pm$ 2.98)%和(50.10 $\pm$ 0.29)%,明显高于EPO各组(P 均小于0.01),也明显高于对照组[(2.3 $\pm$ 1.09)%和(1.5 $\pm$ 0.48)%], $P<0.01$]。不同浓度EPO浓度干预组间比较,C1组的存活率(40.18 $\pm$ 7.49)%低于C2组、C3组(65.56 $\pm$ 6.37)%,(62.56 $\pm$ 11.32)%。均 $P<0.01$,凋亡率(13.78 $\pm$ 3.74)%和坏死率(42.51 $\pm$ 5.49)%则明显高于后二者($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。C2及C3间各指标差异无统计学意义。结论 早期应用EPO可明显减少体外培养的乳鼠心室肌细胞缺氧/复氧后凋亡和坏死的发生。而且EPO在0.1 IU/ml至1 IU/ml浓度范围内其保护作用存在一定的量效关系。

9. 学位论文 [杨迪成](#) 促红细胞生成素抗心肌缺血再灌注损伤的实验研究 2007

一. EPO抗乳鼠心肌细胞缺氧/复氧损伤的实验研究
目的: 建立乳鼠心肌细胞H/R模型,观察EPO对心肌细胞H/R损伤的保护作用,揭示EPO抗心肌细胞H/R损伤的机制,探讨其作用的信号通路。
方法
1. 建立乳鼠心肌细胞的原代分离纯化,建立细胞H/R模型。实验分组包括空白组,对照组,EPOL组,EPOM组,EPOH组,U0126组。2. MTT法检测细胞存活率:比色法检测上清液LDH,CK-MB。3. TUNEL法和Annexin-V-FITC流式细胞术检测细胞凋亡率。4. TBA法测定细胞内MDA含量,黄嘌呤氧化酶法测定SOD活性。5. Western法测定细胞ERK κ ,1/2及磷酸化ERK κ ,1/2蛋白含量。
结果
1. H/R损伤导致心肌细胞膜通透性增加,存活率下降,凋亡率增加,MDA含量升高,SOD活性降低,而一定浓度的EPO显著减少心肌酶的释放,提高心肌细胞活性,减轻细胞凋亡,提高SOD活性。2. 各组ERK κ ,1/2蛋白的表达总量无明显差异;而在H/R损伤和外源性EPO的作用下,磷酸化ERK κ ,1/2蛋白含量增加。
结论
EPO在体外对心肌细胞H/R损伤有一定的保护作用,与其抑制心肌细胞凋亡,减少氧自由基生成有关,且可能是通过启动ERK κ ,1/2通路信号转导进行。
二. Langendorff模型下EPO抗心肌缺血再灌注损伤的实验研究
目的: 建立Langendorff离体心脏灌注模型,观察不同剂量的EPO预处理对离体心脏血流动力学等指标的影响,评价EPO对MIRI的保护作用,通过检测凋亡相关基因的蛋白表达,测定炎症因子mRNA含量变化,探讨EPO对MIRI保护作用的分子生物学机制。
方法: 1. 建立Langendorff离体心脏灌注模型。分组包括,空白组,对照组,EPOL组,EPOM组,EPOH组。2. 记录心功能参数:HR, LVSP, $\pm dp/dt$, $\max$,及CF。3. 检测冠脉血液中LDH,CK含量。4. 免疫组化法检测Bax,Bcl-2, NF- κ B P65的蛋白表达。5. 荧光实时定量PCR法测定TNF- α , IL-1 β , ICAM-1的mRNA水平。
结果
1. MIRI对心功能有负性影响,心肌酶释放增加:一定浓度的EPO增加心肌收缩力,改善心肌舒张功能,扩张冠脉血管。2. MIRI诱导心肌细胞凋亡,而EPO能通过差异调节Bcl-2和Bax的蛋白表达抑制凋亡。3. 心肌组织经过MIRI后,NF- κ B表达活化,致炎因子基因转录水平增高,而EPO能抑制相关作用。

结论

一定浓度EPO对离体心脏的MIRI有保护作用, 其机制与抑制心肌细胞凋亡, 调控NF-κ B的活化并减轻致炎因子介导的心肌炎症反应相关.

三. 在体模型下EPO抗心肌缺血再灌注损伤的实验研究目的建立大鼠MIRI在体模型, 记录血流动力学指标, 统计心律失常情况, 测定血清心肌酶谱值, 观察心肌超微结构, 研究EPO对大鼠MIRI的影响.

方法

1. 建立大鼠MIRI在体模型, 实验分组包括:空白组, I/R组, EPO组. 2. 连续心电图监测并记录各时间点出现的心律失常. 3. 生物信号采集处理系统记录HR, LVSP, $\pm dp/dt<, max>$. 4. 检测血清AST, CK-MB, LDH. 5. 电镜下观察左心室组织超微结构.

结果

MIRI 诱导严重心律失常的发生率升高, 心肌的收缩和舒张功能损伤, 心肌酶释放增加, 并破坏细胞超微结构; 而EPO降低心律失常发生率, 改善心功能, 减轻生物膜损伤, 保护心肌细胞的超微结构.

结论: EPO对在体模型上的大鼠MIRI具明显的保护作用.

10. 期刊论文 [秦川, 肖颖彬, 钟前进, 陈林, 王学锋 EPO预处理对培养心肌细胞缺氧/复氧损伤TNF-α 表达的影响及机制 -中华胸心血管外科杂志2006, 22 \(3\)](#)

目的 观察促红细胞生成素(erythropoietin, EPO) 预处理对培养心肌细胞缺氧复氧前后TNF-α 表达的影响, 并进一步研究其可能的NF-κ B信号机制. 方法 采用培养乳鼠心肌细胞建立缺氧复氧损伤模型, 分为对照组、EPO组[缺氧复氧前24h, 培养液中加入终浓度10 U/ml的重组人促红素(recombinant human erythropoietin, RHuEPO)]、EPO+吡咯烷二硫基甲酸盐(PDTC)组(缺氧复氧前24h, 加入终浓度10 U/ml的RHuEPO和5 μ g/ml的PDTC)和PDTC组(缺氧复氧前24h, 加入终浓度5 μ g/ml的PDTC). 分别于缺氧复氧损伤前后, 以RT-PCR和western blot检测各组心肌细胞TNF-α 基因表达变化, 同时以EMSA检测各组心肌细胞NF-κ B活性变化. 结果 缺氧复氧损伤前, 各组心肌细胞TNF-α 基因表达水平差异无统计学意义, 均较弱. 损伤后各组心肌细胞TNF-α 基因表达水平较损伤前对照组显著升高($P<0.01$), 而EPO组TNF-α 基因表达水平低于其他各组($P<0.01$). 缺氧复氧损伤前EPO组NF-κ B活性高于其他各组($P<0.01$), 损伤后各组NF-κ B活性显著高于损伤前对照组($P<0.01$), EPO组NF-κ B活性低于其他各组($P<0.01$). 结论 EPO预处理抑制缺氧复氧后心肌细胞TNF-α 基因表达升高, 可能与缺氧复氧后NF-κ B活性升高被抑制有关. EPO预处理可能通过NF-κ B活化的负反馈机制抑制缺氧复氧后心肌细胞NF-κ B活性的升高.

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zgwzbjyxx201005014.aspx
授权使用: qkzgz16(qkzgz16), 授权号: d42ce721-3a1e-42a1-85ae-9ede0163a8c7

下载时间: 2011年5月9日