

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.16.028

EPO 对慢性心力衰竭大鼠心功能、心肌细胞凋亡及相关基因表达的影响

张 月,雷兆军,何 勇[△]

陕西省核工业二一五医院心血管内科,陕西咸阳 712000

摘要:目的 探讨促红细胞生成素(EPO)对慢性心力衰竭大鼠心功能、心肌细胞凋亡及凋亡相关基因表达的影响。**方法** 选择 60 只 SD 大鼠,随机分为研究组(20 例)、对照组(20 例)、空白组(20 例);60 只大鼠均置于相同环境下饲养,研究组和对照组大鼠采用阿霉素构建心力衰竭模型,模型构建成功后给予研究组大鼠 EPO。采用 GE vivid7 彩色多普勒超声诊断仪检测各组大鼠心功能指标,然后处死大鼠并留取心脏标本,Tunel 法检测心肌细胞凋亡,荧光定量聚合酶链反应检测心肌组织中 Fas 和 PI3K mRNA 的表达。**结果** 空白组大鼠心功能优于研究组大鼠和对照组大鼠($P<0.05$),研究组大鼠心功能优于对照组大鼠($P<0.05$);对照组大鼠的心肌细胞凋亡指数明显高于研究组与空白组大鼠($P<0.05$),研究组大鼠的心肌细胞凋亡指数高于空白组大鼠($P<0.05$);对照组大鼠 Fas mRNA 的表达水平明显高于研究组与空白组大鼠($P<0.05$),研究组大鼠 Fas mRNA 的表达水平高于空白组大鼠($P<0.05$);研究组大鼠 PI3K mRNA 的表达水平高于对照组大鼠和空白组大鼠($P<0.05$)。**结论** EPO 有助于改善慢性心力衰竭大鼠的心功能,并能明显减少心力衰竭大鼠的心肌细胞凋亡,其可能机制为活化 PI3K 途径。

关键词:促红细胞生成素; 慢性心力衰竭; 心功能; 凋亡

中图分类号:R542.2

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2019)16-2366-04

Effects of EPO on cardiac function, cardiomyocyte apoptosis and expression of related genes in rats with chronic heart failure

ZHANG Yue, LEI Zhaojun, HE Yong[△]

Department of Cardiology, 215 Hospital of Shaanxi Provincial Nuclear Industry, Xianyang, Shaanxi 712000, China

Abstract: Objective To investigate the effects of erythropoietin (EPO) on cardiac function, apoptosis of cardiac myocytes and expression of apoptosis-related genes in rats with chronic heart failure. **Methods** Sixty SD rats were randomly divided into the study group (20 cases), control group (20 cases) and blank group (20 cases). Sixty rats were fed in the same environment. Adriamycin was used to establish the heart failure model in the study group and control group. After successfully constructing the model, the rats in the study group were injected with EPO. The cardiac function indexes in the rats of each group were measured by adopting the GE vivid7 color Doppler diasonographic instrument, then the rats were killed and the heart samples were taken. The apoptosis of cardiac myocytes was measured by using the Tunel method, and expression of Fas and PI3K in myocardial tissue was measured by the fluorescence quantitative PCR. **Results** The rat cardiac function in the blank group was better than that in study group and control group ($P<0.05$), and the rat cardiac function in the study group was better than that in the control group ($P<0.05$). The cardiomyocyte apoptotic index in the control group was significantly higher than that in the study group and blank group ($P<0.05$), and the cardiomyocyte apoptotic index in the study group was higher than that in the blank group ($P<0.05$). The expression level of Fas mRNA in the control group was higher than that in the study group and the blank group ($P<0.05$), and the expression level of Fas mRNA in the study group was higher than that in the blank group ($P<0.05$), and the expression level of PI3K mRNA in the study group was higher than that in the control group and the blank group ($P<0.05$). **Conclusion** EPO is conducive to improve the cardiac function in the rats with chronic heart failure and significantly reduce the apoptosis of cardiomyocytes in the rats with heart failure. Its possible mechanism is the activation of PI3K pathway.

Key words: erythropoietin; chronic heart failure; cardiac function; apoptosis

心力衰竭是心脏结构或功能异常性疾病引起的心室充盈或射血能力受损而导致的综合征,是各种心血管病终末期的临床表现^[1]。目前,临床上治疗心力衰竭多从症状控制出发,尚缺少治疗心力衰竭的特效药物。有学者研究发现,慢性心力衰竭患者存在心肌细胞的过度凋亡和氧化应激过度激活。因此,有研究者将促红细胞生成素(EPO)应用于慢性心力衰竭合并贫血的治疗,结果发现其对心力衰竭患者心功能的改善具有较好的作用^[2-3]。而以往的研究报道,EPO的主要作用为抗凋亡、抗氧化应激,并对心、脑缺血再灌注损伤具有明显的保护作用^[4]。因此,本研究主要探讨EPO对慢性心力衰竭大鼠心功能、心肌细胞凋亡的影响,并同时观察其对凋亡相关基因表达的影响,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料来源 本研究使用的主要材料与试剂包括:SD大鼠60只[体质量(220±20)g,购自成都达硕实验动物有限公司]、阿霉素(购自某医院药剂科)、EPO(购自Sigma公司)、Tunel试剂盒(购自天根公司)、TRIzol RNA抽提试剂盒(购自天根公司)、反转录试剂盒(购自天根公司)及Real Master Mix(购自天根公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型制备方法及给药方案 大鼠饲养:健康清洁级SD大鼠60只,随机分为研究组(20只)、对照组(20只)、空白组(20只),分笼常规饲养,大鼠自由进食饮水,每2d更换垫料。模型制备:大鼠适应性生长1周后开始用药,研究组和对照组大鼠采用腹腔注射阿霉素造模,2.5毫克/(千克·次),空白组大鼠予以相同剂量的生理盐水腹腔注射。各组均每周注射2次,共5周。造模完成后,给予研究组大鼠EPO[50 U/(kg·d)]腹腔注射,而对照组与空白组大鼠给予相同剂量的生理盐水腹腔注射,持续时间为5周。

1.2.2 大鼠心功能测定 选用GE vivid7彩色多普勒超声诊断仪,采用12 MHz高频探头进行检查,主要测量大鼠的左心室舒张末期内径(LVEDD)、左心室收缩末期内径(LVESD),以及大鼠的左心室射血分数(LVEF)。其后将大鼠处死,取心肌组织固定后备用。

1.2.3 Tunel法检测心肌细胞凋亡 操作步骤严格按照Tunel试剂盒说明书进行,具体如下:采用甲醛溶液进行标本固定,固定完成后将所有标本进行石蜡切片,每张切片厚度大约5 μm,将上述切片在二甲苯中脱蜡3次,每次脱蜡时间>2~<4 min,其后将标本置于0.3%的H₂O₂中封闭30 min。封闭完成后将标本置于20 mg/L蛋白酶K溶液中消化细胞膜上的蛋白及细胞核膜上的蛋白,时长20 min,然后加入

Tunel反应液,置于37℃恒温箱中将其孵育1 h,再加入荧光素抗体进行反应。反应完成后加入DAB染色液进行染色,染色30 min后置于清水中漂洗5 min后加入苏木精进行复染,后置于梯度乙醇中脱水,蒸馏水冲洗、干燥后封片。

正常大鼠左心室心肌细胞的细胞核呈蓝色,而凋亡心肌细胞的细胞核呈棕色或棕黄色。随机计数5个(×40)显微镜视野,计数总的细胞数和凋亡细胞数,凋亡指数=(凋亡细胞数/总的细胞数)×100%。

1.2.4 荧光定量聚合酶链反应测定心肌Fas和PI3K的mRNA表达 称取100 mg的心肌组织加入约1 mL TRIzol,将其进行匀浆后在5 000 r/min离心机中离心,离心时间为10 min。离心完成后取上清液,用RNA提取试剂盒提取心肌总RNA,随后按照说明书进行反转录。引物序列来自南京建成生物工程公司。Fas的上游引物为5'-CGC CTA TGG TTG TTG ACC-3',下游引物为5'-CTC CAG ACA TTG TCT CC-3',扩增片段为477 bp;PI3K的上游引物为5'-AGA TGC TTT CAA ACG C-TAT-3',下游引物为5'-GCT GTC GCT CAC TCC A-3',扩增片段为359 bp;GAPDH的上游引物为5'-AGG CCG GCT TCG CGG GCG-3',下游引物为5'-CTC GGG AGC CAC ACG CAG-3',产物为450 bp。扩增条件按照说明书设置,其后对扩增产物进行检测。

1.3 统计学处理 采用SPSS19.0软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3组大鼠实验过程中存活情况 实验过程中,共有4只大鼠死亡,其中研究组死亡2只,对照组死亡2只,空白组无大鼠死亡。其余大鼠均存活。

2.2 3组大鼠心功能测定结果比较 空白组大鼠心功能优于研究组大鼠和对照组大鼠,研究组大鼠心功能优于对照组大鼠,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

表1 3组大鼠心功能测定结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	LVEDD(mm)	LVESD(mm)	LVEF(%)
研究组	18	5.84±0.32*#	3.77±0.23*#	71.37±6.43*#
对照组	18	7.32±0.30#	5.21±0.32#	55.23±4.29#
空白组	20	4.46±0.29	2.22±0.16	86.89±7.22

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与空白组比较,# $P < 0.05$

2.3 3组大鼠心肌细胞凋亡情况比较 对照组的心肌细胞凋亡指数明显高于研究组与空白组($P < 0.05$),研究组的心肌细胞凋亡指数高于空白组($P < 0.05$)。见图1。

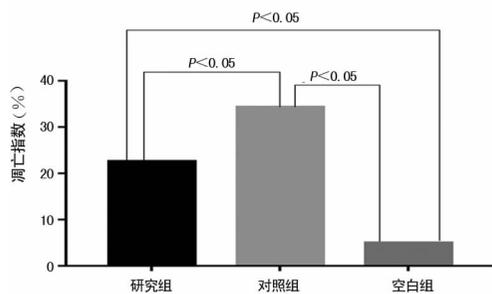


图1 3组大鼠心肌细胞凋亡情况比较

2.4 3组大鼠 Fas 和 PI3K 的 mRNA 表达情况比较 对照组大鼠的 Fas mRNA 的表达水平明显高于研究组与空白组大鼠 ($P < 0.05$), 研究组大鼠 Fas mRNA 的表达水平高于空白组大鼠 ($P < 0.05$); 研究组大鼠的 PI3K mRNA 的表达水平高于对照组和空白组大鼠 ($P < 0.05$)。见表 2。

表2 3组大鼠的 Fas 和 PI3K 的 mRNA 表达情况比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Fas mRNA	PI3K mRNA
研究组	18	0.62 ± 0.09*#	1.84 ± 0.16*#
对照组	18	0.97 ± 0.12	0.98 ± 0.12
空白组	20	0.31 ± 0.05*	1.03 ± 0.09

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与空白组比较,# $P < 0.05$

3 讨论

慢性心力衰竭的发病原因复杂,目前主要认为其与长期的高血压、冠状动脉硬化等密切相关。这些病因引起心室壁缺血,使心肌长期缺氧不足,导致心肌细胞出现坏死、凋亡等一系列变化。尤其是长期存在的心肌细胞凋亡,被认为是慢性心力衰竭形成的主要机制^[5-6]。大片心肌细胞凋亡、坏死时导致心室壁收缩能力下降、顺应性降低,进而导致心力衰竭。

在关于心力衰竭的研究中,其首要任务是构建心力衰竭的动物模型。目前构建心力衰竭模型的主要方法有药物法和外科手术法,而外科手术多用于构建急性心力衰竭模型^[7-8]。药源性心力衰竭模型主要采用心脏毒性药物来损伤或降低心肌收缩能力,显著降低射血分数,引起心室功能不全,从而导致心力衰竭。阿霉素是用于构建心力衰竭动物模型的药物之一,目前认为阿霉素在构建心力衰竭动物模型的过程中,主要通过自由基的连锁反应而形成心肌毒性机制^[9]。邓琴琴等^[10]发现,在采用阿霉素构建心力衰竭模型的过程中,血清超氧化物歧化酶和血清丙二醛在心力衰竭动物模型体内呈高表达状态,而机体过氧化应激导致的心肌毒性作用主要通过激活细胞凋亡而形成。

Fas 又被称为凋亡蛋白-1,由研究者于 1989 年发现。Fas 主要存在 T 淋巴细胞、髓样细胞和成纤维细胞表面,膜结合型的 Fas 与配体 FasL 特异性结合,激活信号传导通路,触发细胞凋亡。由此可见,Fas 的表

达与细胞的凋亡密切相关^[11-12]。在本研究中,比较了空白组大鼠和对照组大鼠的凋亡指数和 Fas mRNA 表达情况,结果发现,慢性心力衰竭大鼠(对照组)的凋亡指数和 Fas mRNA 的表达均明显高于正常大鼠(空白组),这提示在慢性心力衰竭大鼠心肌组织中存在凋亡通路的激活。

PI3K/Akt 信号通路是近年来发现的体内重要的信号转导通路之一。PI3K 被激活后,细胞膜上产生第二信使 PIP3,PIP3 与细胞内含有 PH 结构域的信号蛋白 Akt 和 PDK1 结合,促使 PDK1 磷酸化 Akt 蛋白的某些位点,使得 Akt 得到活化。活化的 Akt 继续磷酸化其下游信号分子(如 mTOR),这些下游的分子被激活后主要起到促进细胞生长、抑制细胞凋亡的作用。由此可见 PI3K 是机体中的一项重要抗凋亡因子^[13-14]。

EPO 主要由肾脏分泌,其受体在机体内广泛分布,又以心脏、肾脏及血管分布最多。以往的研究发现,EPO 对机体的调节作用是促进血红蛋白的生成,而近几年有学者研究发现,EPO 对心血管亦具有保护作用,其保护作用体现在抗细胞凋亡、促血管生成、抗炎、抗氧化应激作用、促进心肌细胞增殖方面,而其具体机制尚不明确^[15]。

基于上述研究,本研究的主要目的是在于证明 EPO 对于慢性心力衰竭大鼠心肌组织的抗凋亡作用。本研究发现,采用 EPO 治疗心力衰竭大鼠一段时间后,其凋亡指数、Fas mRNA 的表达水平均低于未采用任何治疗措施的大鼠,而采用 EPO 治疗心力衰竭大鼠的 PI3K mRNA 的表达量也高于未采用任何治疗措施的大鼠。但在与正常大鼠做比较时发现,研究组大鼠的凋亡指数、Fas mRNA 的表达仍高于空白组大鼠,这提示 EPO 并未治愈心力衰竭。此外,本研究还对比了不同组别大鼠的心功能,发现空白组大鼠心功能优于研究组和对照组大鼠,研究组大鼠心功能优于对照组大鼠,显示了 EPO 在改善慢性心力衰竭大鼠心功能方面的作用。

综上所述,EPO 有助于改善慢性心力衰竭大鼠的心功能,并能明显减少心力衰竭大鼠的心肌细胞凋亡,其可能机制为活化 PI3K 途径。

参考文献

- [1] SU H Y, LI J Y, CHEN T S, et al. Melatonin attenuates angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy through the CyPA/CD147 signaling pathway [J]. Mol Cell Biochem, 2016, 422(1/2): 85-95.
- [2] HALE G M, HASSAN S L, HUMMEL S L, et al. Impact of a pharmacist-managed heart failure postdischarge (bridge) clinic for veterans [J]. Ann Pharmacother, 2017, 51(7): 555-562.
- [3] WARREN-GASH C, BHASKARAN K, HAYWARD A,

- et al. Circulating influenza virus, climatic factors, and acute myocardial infarction; a time series study in England and Wales and Hong Kong (China) [J]. *J Infect Dis*, 2016, 203(12): 1710-1718.
- [4] ZHONG Z, HU J Q, WU X D, et al. Myocardin-related transcription factor- α -overexpressing bone marrow stem cells protect cardiomyocytes and alleviate cardiac damage in a rat model of acute myocardial infarction[J]. *Int J Mol Med*, 2015, 36(3): 753-759.
- [5] LANFEAR D E, LI J, ABBAS R, et al. Genetic factors influencing b-type natriuretic peptide-mediated production of cyclic guanosine monophosphate and blood pressure effects in heart failure patients [J]. *J Cardiovasc Transl Res*, 2015, 8(9): 545-553.
- [6] 乔玉冰, 向东. 左卡尼汀联合美托洛尔治疗缺血性心力衰竭的临床疗效观察 [J]. *华南国防医学杂志*, 2015, 29(3): 234-236.
- [7] SORG H, HARDER Y, KRUEGE C, et al. The nonhematopoietic effects of erythropoietin in skin regeneration and repair: from basic research to clinical use [J]. *Med Res*, 2013, 33(33): 637-664.
- [8] DEL PRETE S, CINIERI S, LORUSSO V A, et al. Impact of anemia management with EPO on psychologic distress in cancer patients; results of a multicenter patient survey [J]. *Future Oncol*, 2014, 10(1): 69-78.
- [9] 徐创业, 蔺嫦燕. 大动物心衰模型研究进展 [J]. *北京生物医学工程*, 2013, 32(5): 536-540.
- [10] 邓琴琴, 王梦洪, 裴兆辉. EPO 通过激活 PI3K/Akt 途径上调 HSP70 的表达对低温下心衰大鼠起保护作用 [J]. *中国病理生理杂志*, 2017, 33(7): 1203-1208.
- [11] 张新金, 马业新, 文渊, 等. 促红细胞生成素通过 PI3K/Akt 信号通路抑制血管紧张素 II 诱导的新生大鼠心脏成纤维细胞增殖 [J]. *中国病理生理杂志*, 2016, 25(2): 293-298.
- [12] 纪宇宏, 解玲, 魏岚萍, 等. 促红细胞生成素对急性心肌梗死大鼠的心肌 HIF-1 α 与 Survivin 表达的影响 [J]. *解剖科学进展*, 2017, 23(5): 478-481.
- [13] PAPADIMITRAKOPOULOU V. Development of PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors and their application in personalized therapy for non-small-cell lung cancer [J]. *J Thorac Oncol*, 2012, 7(8): 1315-1326.
- [14] VON K S, ZANOBETTI A, EPIDEMICS S I, et al. Influenza epidemics, seasonality, and the effects of cold weather on cardiac mortality [J]. *Environ Health*, 2015, 11(9): 74-79.
- [15] 李彦明, 张韩, 何瑞利, 等. 低剂量促红细胞生成素用于急性心肌梗死患者经皮冠状动脉介入治疗术后的疗效和安全性 [J]. *中国循环杂志*, 2015, 30(1): 17-21.

(收稿日期: 2018-12-24 修回日期: 2019-02-26)

(上接第 2365 页)

- ITI implants with a sandblasted and acid-etched (SLA) surface; early results from clinical trials on ITI SLA implants [J]. *Clin Oral Implants Res*, 2002, 13(1): 144-153.
- [3] SUMMERS R B. A new concept in maxillary implant surgery; the osteotome technique [J]. *Compendium*, 1994, 15(2): 152-160.
- [4] FORNELL J, JOHANSSON L A, BOLIN A, et al. Flapless, CBCT-guided osteotome sinus floor elevation with simultaneous implant installation. I; radiographic examination and surgical technique. A prospective 1-year follow-up [J]. *Clin Oral Implants Res*, 2012, 23(1): 28-34.
- [5] TASCHIERI S, CORBELLA S, DEL FABBRO M, et al. Use of plasma rich in growth factor for Schneiderian membrane management during maxillary sinus augmentation procedure [J]. *J Oral Implantol*, 2012, 38(5): 621-627.
- [6] SCALA A, BOTTICELLI D, RANGE I G, et al. Early healing after elevation of the maxillary sinus floor applying a lateral access; a histological study in monkeys [J]. *Clin Oral Implants Res*, 2010, 21(12): 1320-1326.
- [7] NEDIR R, NURDIN N, KHOURY P, et al. Short implants placed with or without grafting in Atrophic sinuses; the 3-year results of a prospective randomized controlled study [J]. *Clin Implants Dent Relat Res*, 2016, 18(1): 10-18.
- [8] NEDIR R, BISCHOF M, VAZQUEZ L, et al. Osteotome sinus floor elevation without grafting material; a 1-year prospective pilot study with ITI implants [J]. *Clin Oral Implants Res*, 2006, 17(6): 679-686.
- [9] CARDAROPOLI G, ARAÚJO M, LINDHE J. Dynamics of bone tissue formation in tooth extraction sites; an experimental study in dogs [J]. *J Clin Periodontol*, 2003, 30(9): 809-818.
- [10] NOLAN P J, FREEMAN K, KRAUT R A. Correlation between Schneiderian membrane perforation and sinus lift graft outcome; a retrospective evaluation of 359 augmented sinuses [J]. *J Oral Maxillofac Surg*, 2014, 72(1): 47-52.
- [11] POMMER B, UNGER E, SUTO D, et al. Mechanical properties of the Schneiderian membrane in vitro [J]. *Clin Oral Implants Res*, 2009, 20(6): 633-637.

(收稿日期: 2019-01-26 修回日期: 2019-04-18)