

腺苷对猪急性心肌梗死再灌注后内皮素-1 的影响[△]

赵京林, 杨跃进[#], 尤士杰, 荆志成, 吴永建, 杨伟宪, 陈纪林, 高润林, 陈在嘉

(中国医学科学院 中国协和医科大学 阜外心血管病医院冠心病诊疗中心, 北京 100037)

摘要:目的 评价急性心肌梗死(AMI)再灌注后内皮素-1(ET-1)的变化及腺苷对 ET-1 的影响,探讨无再流的可能机制。方法 中华小型猪 24 只,随机分成对照组、腺苷组和假手术组,每组 8 只。冠状动脉结扎 3 h,松解 1 h 制备 AMI 再灌注模型。采用放射免疫方法测定 AMI 前 5 min、AMI 后 5 min、AMI 后 180 min 和再灌注后 5 min 和 60 min 血浆 ET-1 的含量及正常、缺血、无再流区心肌组织 ET-1 的变化;逆转录-聚合酶链反应的方法观察正常、缺血和无再流区心肌组织 ET-1 mRNA 的表达。结果 与 AMI 前比较,对照组和腺苷组 AMI 后 5 min、AMI 后 180 min、再灌注后 5 min 和 60 min 的血清 ET-1 水平均显著升高($P < 0.01$),且呈递增趋势($P < 0.01$)。腺苷组除 AMI 前外,各时间点的血浆 ET-1 水平均显著低于对照组($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与正常区心肌组织比较,对照组和腺苷组缺血区和无再流区心肌组织 ET-1 含量均显著升高($P < 0.01$),且无再流区 ET-1 含量升高比缺血区更显著($P < 0.01$)。与对照组比较,腺苷组仅缺血区心肌组织 ET-1 含量显著降低($P < 0.01$)。与正常区心肌组织比较,对照组和腺苷组缺血区心肌组织 ET-1 的 mRNA 表达均显著上调($P < 0.01$),而无再流区心肌组织 ET-1 的 mRNA 表达均显著下降($P < 0.01$)。与对照组比较,腺苷组仅在缺血区 ET-1 的 mRNA 表达显著降低($P < 0.01$)。结论 内皮细胞受损可能是无再流发生的重要机制之一,腺苷可能通过保护内皮细胞起到减少无再流的作用。

关键词: 腺苷;内皮素-1;急性心肌梗死

中图分类号: R542.2⁺ 文献标识码: A 文章编号: 1000-503X(2006)02-0225-05

Effect of Adenosine on Endothelin-1 in the Infarcted Reflow and No-reflow Myocardium of Mini-Swines[△]

ZHAO Jing-lin, YANG Yue-jin[#], YOU Shi-jie, JING Zhi-cheng, WU Yong-jian,
YANG Wei-xian, CHEN Ji-lin, GAO Run-lin, CHEN Zai-jia

(Department of Coronary Heart Disease, Cardiovascular Institute and Fuwai Hospital, CAMS and PUMC, Beijing 100037, China)

ABSTRACT : Objective To evaluate the effect of adenosine on endothelin-1 (ET-1) after acute myocardial infarction (AMI) and reperfusion and explore the possible mechanism of no-reflow. **Methods** Twenty-four mini-swines were randomized into three study groups: control group ($n = 8$), adenosine treated group ($n = 8$), and sham-operated group ($n = 8$). The mini-swines in the groups were subjected to 3 hours of coronary occlusion, followed by 60 minutes of reperfusion except those in the sham-operated group. The levels of ET-1 in blood sample, normal, infarcted reflow and no-reflow myocardium were evaluated by radioimmunoassay (RIA). The gene expressions of ET-1 in normal, infarcted reflow and no-reflow myocardium were quantified by reverse transcription-polymerase chain reaction. **Results** In both control group and adenosine group, compared with that at the baseline, ET-1 in blood sample significantly increased at 5 minutes and 180 minutes of left anterior descending coronary artery occlusion, as well as 5 and 60 minutes of reperfusion (all $P < 0.01$). In adenosine group, the levels of ET-1 were significantly lower than those in the control group ($P < 0.05$, $P <$

△基金项目: 国家自然科学基金(90209038) Supported by National Natural Sciences Foundation of China (90209038); # Corresponding author Tel: 010-68314466-8080, Fax: 010-88398080, E-mail: YYJ@Fuwaihospital.org

0.01)。In both control group and adenosine group, compared with that in normal myocardium, ET-1 levels in both infarcted reflow and no-reflow myocardium significantly increased (both $P < 0.01$), with the level of ET-1 in no-reflow myocardium significantly higher than that in infarcted reflow myocardium ($P < 0.01$). In adenosine group, the level of ET-1 in infarcted reflow myocardium was significantly lower than that in the control group ($P < 0.01$). In both control and adenosine groups, compared with that in normal myocardium, the gene expression of ET-1 in infarcted reflow myocardium was significantly up-regulated ($P < 0.01$), while that of ET-1 in no-reflow myocardium significantly down-regulated ($P < 0.01$). In adenosine group, the level of ET-1 in infarcted reflow myocardium was significantly lower than that in the control group ($P < 0.01$). **Conclusion** The endothelium injury may be one of the important mechanisms for no-reflow phenomenon. Adenosine can prevent endothelium from injury to reduce no-reflow.

Key words: adenosine; endothelin-1; acute myocardial infarction

Acta Acad Med Sin, 2006 28(2) 225–229

无再流现象 (no-reflow phenomenon) 是指急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 冠脉再通后, 心肌组织再灌注并不完全、甚至出现无再灌注, 其机制尚不完全清楚, 但结局是因微循环结构损伤或功能障碍所致的微血管血流受阻^[1]。微循环障碍的实质是内皮细胞受损, 内皮素-1 (endothelin-1, ET-1) 主要由内皮细胞合成和分泌, 内皮细胞受到刺激后合成并释放 ET-1 增多, 因此可作为内皮损伤的血浆标志物^[2]。但关于 AMI 冠脉再通后无再流的心肌组织中 ET-1 水平如何报道较少。腺苷是一种血管扩张剂, 动物实验及临床研究表明具有改善 AMI 冠脉微循环障碍的作用^[3,4]。另有研究显示腺苷能有效防治心肌梗死再灌注后无再流, 改善心功能, 缩小梗死面积^[5]。本研究以猪 AMI 再灌注模型, 从血清学和基因水平评价 AMI 再灌注后 ET-1 的变化及腺苷对 ET-1 的影响, 探讨无再流的可能机制, 为腺苷在 AMI 治疗中的应用提供实验依据。

材料和方法

动物及分组 选用中华小型猪 (购于北京农业大学) 24 只, 雌雄不拘, 体重 30 kg 左右, 应用随机排列表, 随机分成对照组、腺苷组和假手术组, 每组 8 只。腺苷组在冠状动脉结扎前半小时开始给予腺苷 (沈阳光大制药有限公司提供, 批号 03070801), 以 100 $\mu\text{g}/\text{kg} \cdot \text{min}$ 的剂量持续静脉点滴直至冠状动脉松解 1 h; 对照组以生理盐水作对照同样静脉点滴直至冠状动脉松解 1 h, 建立 AMI 再灌注模型; 假手术组冠脉下只穿线, 不结扎, 无 AMI, 也无再灌注。

模型制备方法 于胸骨正中打开胸腔, 纵行切开心包膜, 暴露心脏, 并将心包膜缝合于胸壁呈吊篮状, 于冠状动脉左前降支 (left anterior descending coronary artery, LAD) 远端 1/3 ~ 1/2 处, 将结扎线穿入一长约 3 ~ 4 cm 的硅胶管腔内结扎 3 h, 再松解 1 h 建立 AMI 及再灌注模型。

不同区域心肌组织的划分方法 冠状动脉松解 1 h, 从左心室注入 1 ml/kg 4% 的硫磺素 (thioflavin-S), 使再灌注区着色, 无再流区不着色; 再于原位重新结扎前降支, 从左心室再注入 Evan's 蓝, 使结扎区外着蓝色, 结扎区不着蓝色。立即取出心脏, 剪除左右心耳及残余大血管, 于冰生理盐水中荡洗去除残余血液; 取部分正常区、缺血区和无再流区心肌以锡纸包被, 标记后保存于液氮中, 用于提取 RNA 和总蛋白。

血浆 ET-1 水平的检测 各组于 AMI 前 5 min、AMI 后 5 min、AMI 后 180 min、再灌注后 5 min 和 60 min 分别从股静脉取血, 测定血浆 ET-1 的含量。取血 3 ml, 注入含 10% EDTA Na_2 30 μl 和抑肽酶 40 μl 的试管中, 混匀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 3 000 r/min 离心 10 min 分离血浆, -70 $^{\circ}\text{C}$ 保存待测。采用放射免疫方法测定血浆 ET-1 的水平, 具体操作按照试剂盒说明书进行, 试剂盒购自北京东亚免疫技术研究所。

心肌组织 ET-1 含量的检测 取心肌组织约 100 mg, 尽快放入 1 mol/L 醋酸 1 ml 略作研磨, 然后在 100 $^{\circ}\text{C}$ 水中煮沸 10 min, 匀浆。4 $^{\circ}\text{C}$ 3 000 r/min 离心 15 min, 取上清于 -70 $^{\circ}\text{C}$ 保存。采用放射免疫方法测定, 具体操作按照试剂盒说明书进行, 试剂盒购自北京东亚免疫技术研究所。

RT-PCR 法检测心肌组织中 ET-1 mRNA 的表达

取心肌组织 100 mg 提取总 mRNA，将提取的 mRNA 逆转录成 cDNA，将 cDNA 产物分成 2 组进行 PCR 反应，引物 ET-1 和 GADPH 均由北京鼎国生物工程公司合成。ET-1 序列为 5'-TGATTATCGCTCTGCTGTTT-GT-3'，5'-GCCGATGAATACACTTCTCTCC- 3'；GADPH 序列为 5'-CCATGGAGAAGGCTGGG-3'，5'-CAAAGTT-GTCATGGATGACC-3'。扩增反应体系为 25 μl，dNTP 浓度为 0.25 mmol/L，MgCl₂ 浓度为 2 mmol/L，ET-1 上下游引物各 0.4 μmol/L，GAPDH 上下游引物各 0.12 μmol/L，cDNA 2 μl，TaqDNA 聚合酶 1.5 U。PCR 循环条件为：94℃ 变性 30 s，62℃ 退火 30 s，72℃ 延伸 30 s，循环 32 次。取 PCR 产物各 10 μl 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳，EB 染色，紫外光下扫描并拍照，用凝胶图像分析系统（美国 BioRad 公司，Gel Doc 2000 型凝胶成像分析仪）对目的基因的 PCR 产物进行灰密度测定。灰密度值以 ET-1 mRNA 表达量

与 GADPH 表达量的比值表示。

统计学处理 所有资料均用 SPSS 10.0 统计学软件进行统计学处理。数据以均数 ± 标准差表示，同组间比较用配对 *t* 检验，多组间比较用方差分析及 *q* 检验。

结 果

腺苷对猪 AMI 再灌注后血浆 ET-1 水平的影响

AMI 前，各组血浆 ET-1 水平差异均无显著性（*P* > 0.05）；与 AMI 前比较，对照组和腺苷组 AMI 后 5 min、AMI 后 180 min、再灌注后 5 min 和 60 min 的血浆 ET-1 水平均显著升高（*P* < 0.01），且呈递增趋势（*P* < 0.01）。假手术组各时间点的血浆 ET-1 水平差异无显著性（*P* > 0.05）；腺苷组除 AMI 前外各时间点的血浆 ET-1 水平均显著低于对照组（*P* < 0.05，*P* < 0.01）（表 1）。

表 1 各组在各时间点的血浆 ET-1 水平
Table 1 Levels of plasma ET-1 at different time point in three groups (pg/ml)

Group	<i>n</i>	Baseline	AMI 5 min	AMI 180 min	Reopen 5 min	Reopen 60 min
Sham	8	102.3 ± 10.04	102.38 ± 13.05	103.08 ± 13.50	102.76 ± 11.15	103.46 ± 13.59
Control	8	104.53 ± 12.90	114.42 ± 12.33 ^{##}	134.18 ± 8.28 ^{##△△}	146.72 ± 13.52 ^{##**△△}	169.09 ± 13.51 ^{##**△△}
Adenosien	8	103.64 ± 15.11	108.55 ± 10.58 ^{##▲}	119.08 ± 14.40 ^{##▲▲}	129.22 ± 14.80 ^{##**△△▲▲}	149.44 ± 14.81 ^{##**△△▲▲}

ET-1：endothelin-1；AMI：acute myocardial infarction
^{##} *P* < 0.01 compared with baseline；^{**} *P* < 0.01 compared with AMI 180min；^{△△} *P* < 0.01 compared with sham group；[▲] *P* < 0.05，^{▲▲} *P* < 0.01 compared with control group

腺苷对猪 AMI 再灌注后心肌组织 ET-1 含量的影响

正常区心肌组织中 ET-1 含量在 3 组间差异无显著性（*P* > 0.05）。与正常区心肌组织比较，对照组和腺苷组缺血区和无再流区心肌组织中 ET-1 含量

均显著升高（*P* < 0.01），且无再流区 ET-1 含量高于缺血区（*P* < 0.01）。与对照组比较，腺苷组仅缺血区心肌组织中 ET-1 含量显著降低（*P* < 0.01）（表 2）。

表 2 各组在各区心肌组织中 ET-1 含量的变化
Table 2 Changes of ET-1 levels in myocardium of different regions in three groups (pg/mg)

Group	<i>n</i>	Normal region	Ischemic region	No-reflow region
Sham	8	0.39 ± 0.12	—	—
Control	8	0.39 ± 0.11	0.78 ± 0.11 ^{▲▲}	0.96 ± 0.11 ^{▲▲**}
Adenosine	8	0.39 ± 0.11	0.58 ± 0.10 ^{▲▲##}	1.00 ± 0.89 ^{▲▲**}

^{▲▲} *P* < 0.01 compared with normal region；^{**} *P* < 0.01 compared with ischemic region；^{##} *P* < 0.01 compared with control group

腺苷对猪 AMI 再灌注后心肌组织中 ET-1 mRNA 表达的影响

正常区心肌组织中 ET-1 mRNA 表达在假手术、对照及腺苷 3 组间差异均无显著性（*P* > 0.05）。与正常区心肌组织比较，对照组和腺苷组缺

血区心肌组织中 ET-1 mRNA 均显著上调（*P* < 0.01），而无再流区均显著下调（*P* < 0.01）。与对照组比较，腺苷组缺血区心肌组织中 ET-1 mRNA 表达显著降低（*P* < 0.01）（表 3）。

表 3 各组在各区心肌组织中 ET-1 的 mRNA 表达变化

Table 3 Changes of ET-1 mRNA in myocardium of different regions in three groups

Group	n	Normal region	Ischemic region	No-reflow region
Sham	8	0.71 ± 0.16	—	—
Control	8	0.74 ± 0.21	1.27 ± 0.13▲▲	0.28 ± 0.11▲▲**
Adenosine	8	0.75 ± 0.19	0.96 ± 0.12▲▲##	0.27 ± 0.09▲▲**

▲▲*P* < 0.01 compared with normal region ; ** *P* < 0.01 compared with ischemic region ; ## *P* < 0.01 compared with control group

讨 论

ET 是含有 21 个氨基酸残基的血管活性多肽，是极强的缩血管活性因子^[6]，它有 3 种异构肽，即 ET-1、ET-2、ET-3，其差别在于个别氨基酸残基不同，对于心血管起主要作用的是 ET-1。ET-1 通常以极低的生理浓度存在于体内，通过对多器官的调节，保持机体的正常功能。在缺血再灌注过程中，内皮细胞受到刺激合成并释放 ET-1。ET-1 主要通过以下机制参与缺血再灌注损伤：（1）使冠脉强烈痉挛，加剧无再流现象^[7]；（2）激活白细胞，释放超氧阴离子^[8]；（3）使心肌细胞内 Ca²⁺ 超载，提高心肌细胞对 I/R 损伤的敏感性^[9]，增强缺血再灌注损伤后冠脉收缩剂的效应^[6]。因此，ET-1 在心肌缺血再灌注过程中起着重要的作用^[10~13]。腺苷预防无再流现象的机制目前普遍认为与腺苷的微血管扩张作用有关^[14,15]。但研究表明腺苷也具有内皮保护作用^[16]，本研究以猪 AMI 再灌注模型，从血清学和基因水平评价 AMI 再灌注后 ET-1 的变化及腺苷对 ET-1 的影响，以期在分子水平探讨无再流及腺苷减少无再流的可能机制。

本研究显示，对照组 AMI 后 5 min 血浆 ET-1 水平显著升高，这与 Tonnessen 等^[17]报道一致，提示短时间缺血后内皮细胞储存的 ET-1 释放迅速。AMI 后 180 min 血浆 ET-1 水平进一步升高，这与 Wang 等^[18]报道一致，提示 ET-1 释放量与梗死程度相关^[19]。再灌注后 5 min 和 60 min 的血浆 ET-1 水平比 AMI 后 180 min 升高，提示再灌注后 ET-1 合成和释放增多，这与 Tsuji 等^[20]报道一致。本研究除 AMI 前外，腺苷组各时间点的血浆 ET-1 水平均显著低于对照组，这与 Velasco 等^[21]报道一致，Velasco 等认为腺苷可降低 AMI 再灌注后 ET-1 水平的原因是它能减轻内皮受损程度，从而减少 ET-1 的释放。

本研究对照组缺血区心肌组织中 ET-1 含量显著升高，这与 Wang 等^[18]报道一致，提示缺血与再灌

注诱发 ET-1 的合成，而无再流区心肌组织中 ET-1 含量升高比缺血区心肌组织更显著，这可能是由于无血流灌注，使受损内皮细胞已产生的 ET-1 在心肌组织中蓄积。同时本研究腺苷组缺血区心肌组织中 ET-1 表达升高不如对照组升高显著，这可能与腺苷减轻缺血及再灌注对内皮细胞的损伤，从而能减少缺血区心肌组织中 ET-1 的生成有关。

RT-PCR 法检测显示对照组缺血区心肌组织中 ET-1 的 mRNA 表达显著上调，这与 Tonnessen 等^[22]报道一致，表明缺血与再灌注诱发 ET-1 的合成增多。而无再流区心肌组织中 ET-1 的 mRNA 表达显著下降，与缺血区心肌组织 ET-1 含量变化相反，可能由于无再流区内皮受损过重，甚至坏死^[14]。同时本研究显示腺苷能减少缺血区心肌组织中 ET-1 mRNA 表达的升高，这与缺血区心肌组织 ET-1 含量变化一致，提示腺苷可减轻缺血及再灌注对内皮细胞的损伤。

通过比较正常区、缺血区和无再流区的 ET-1 及其 mRNA 的变化，初步表明内皮细胞受损可能是无再流发生的重要机制之一，腺苷可能通过保护内皮细胞起到了减少无再流的作用。

参 考 文 献

1 Eeckhout E, Kern MJ. The coronary no-reflow phenomenon : a review of mechenism and therapies. *Eur Heart J*, 2001 , 22 (29) :729-739.

2 Pernow J, Wang QD. Endothelin in ischaemia and reperfusion. *Cardiovasc Res*, 1997 , 33(3) 518-526.

3 Lim SY, Bae EH, Jeong MH, *et al.* Effect of combined intra-coronary adenosine and nicorandil on no-reflow phenomenon during percutaneous coronary intervention. *Circ J*, 2004 , 68 (10) 928-932.

4 Rosales OR, Eades B, Assali AR, *et al.* Cardiovascular drugs : adenosine role in coronary syndromes and percutaneous coronary interventions. *Catheter Cardiovasc Interv*, 2004 , 62 (3) 358-363.

- 5 赵京林, 杨跃进, 荆志成, 等. 腺苷对猪急性心肌梗死再灌注后无再流的影响. 中华心血管病杂志, 2005, 33(5): 453-458.
- 6 Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, *et al.* A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, 1988, 332(6163) :411-415.
- 7 Velasco CE, Turner M, Inagami T1, *et al.* Reperfusion enhance the local release of endothelin after regional myocardial ischemia. *Am Heart J*, 1994, 128(3) :441-451.
- 8 Ishida K, Takeshige K, Minakami S. Endothelin-1 enhances superoxide generation of human neutrophils stimulated by the chemotactic peptide N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. *Biochem Biophys Res Commu*, 1990, 173(2) :496-501.
- 9 Nayler WG. Calcium antagonists and the ischaemic myocardium. *Int J Cardiol*, 1987, 15(3) :267-285.
- 10 Taylor AJ, Bobik A, Richards M. Myocardial endothelin-1 release and indices of inflammation during angioplasty for acute myocardial infarction and stable coronary artery disease. *Am Heart J*, 2004, 148(2) :10.
- 11 Doggrell SA. The endothelin system and its role in acute myocardial infarction. *Expert Opin Ther Targets*, 2004, 8(3) :191-201.
- 12 Miyauchi T, Yanagisawa M, Tomizawa T. Increased plasma concentrations of endothelin-1 and big endothelin-1 in acute myocardial infarction. *Lancet*, 1989, 2(8653) :53-54.
- 13 Tomoda H. Plasma endothelin-1 in acute myocardial infarction with heart failure. *Am Heart J*, 1993, 125(3) :667-672.
- 14 Rezkalla SH, Kloner RA. No-reflow phenomenon. *Circulation*, 2002, 105(5) :656-662.
- 15 Reffelmann T, Kloner RA. The “ no-reflow ” phenomenon : basic science and clinical correlates. *Heart*, 2002, 87(2) :162-168.
- 16 Olafsson B, Forman MB, Puett DW, *et al.* Reduction of reperfusion injury in the canine preparation by intracoronary adenosine : importance of the endothelium and the no-reflow phenomenon. *Circulation*, 1987, 76(5) :1135-1145.
- 17 Tonnessen T, Naess PA, Kirkeboen KA, *et al.* Release of endothelin from the porcine heart after short term coronary artery occlusion. *Cardiovasc Res*, 1993, 27(8) :1482-1485.
- 18 Wang QD, Hemsén A, Li X-S, *et al.* Local overflow and enhanced tissue content of endothelin following myocardial ischaemia and reperfusion in the pig : modulation by L-arginine. *Cardiovasc Res*, 1995, 29(1) :44-49.
- 19 Yasuda M, Kohno M, Thara A, *et al.* Circulating immunoreactive endothelin in ischemic heart disease. *Am Heart J*, 1990, 119(4) :801-806.
- 20 Tsuji S, Sawamura A, Watanabe H, *et al.* Plasma endothelin levels during myocardial ischaemia and reperfusion. *Life Sci*, 1991, 48(18) :1745-1749.
- 21 Velasco CE, Jackson EK, Morrow JA. Intravenous adenosine suppresses cardiac release of endothelin after myocardial ischaemia and reperfusion. *Cardiovasc Res*, 1993, 27(1) :121-128.
- 22 Tonnessen T, Giaid A, Saleh D, *et al.* Increased *in vivo* expression and production of endothelin-1 by porcine cardiomyocytes subjected to ischemia. *Circ Res*, 1995, 76(5) :767-772.

(2005-04-17 收稿)