

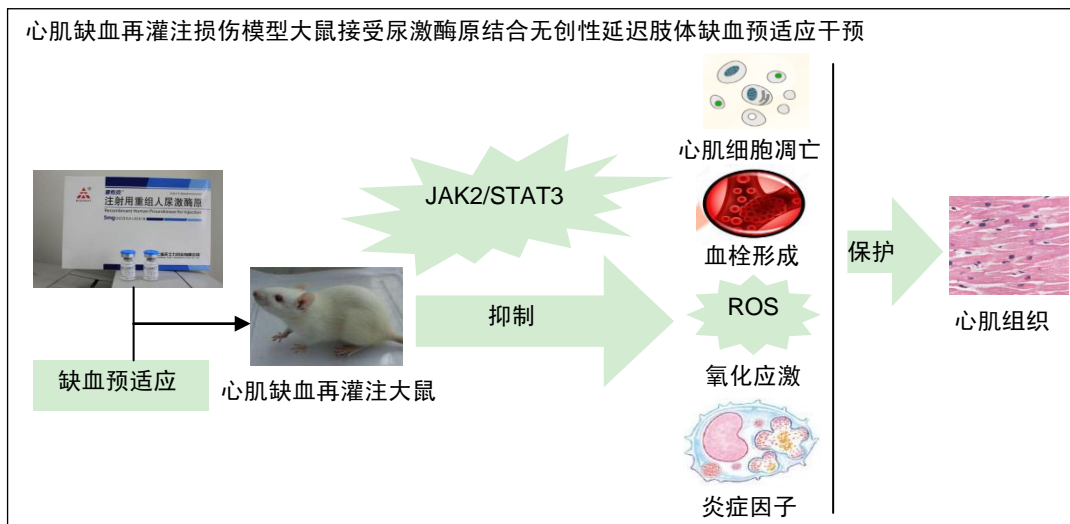
尿激酶原结合无创性延迟肢体缺血预适应干预模型大鼠心肌缺血再灌注损伤

刘志远¹, 张金盈², 刘江波¹, 赵晓宁¹, 刘飞¹, 李纲¹ (¹南阳市中心医院心血管内科, 河南省南阳市 473009; ²郑州大学第一附属医院心血管内科, 河南省郑州市 450052)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1332

ORCID: 0000-0002-8630-3867(刘志远)

文章快速阅读:



刘志远, 男, 1974年生, 汉族, 2007年郑州大学毕业, 硕士, 主任医师, 主要从事冠心病介入治疗与诊断的研究。

通讯作者: 张金盈, 博士, 主任医师, 郑州大学第一附属医院心血管内科, 河南省郑州市 450052

文献标识码: B

稿件接受: 2019-04-24



文题释义:

缺血预适应: 通过经常对人体进行反复的、短暂的、无创伤、无危害的缺血预适应训练, 能够激发人体免疫系统的应急机制, 产生和释放内源性保护物质(如: 腺苷、缓激肽、一氧化氮等, 这些物质参与保护心肌和能量代谢)减轻和抵抗随后更长时间因为人体缺血缺氧造成的损伤。

溶栓: 应用纤溶酶原激活剂一类的溶栓药物, 通过一系列蛋白酶催化连锁反应, 直接或间接的使血栓中的纤维蛋白溶解, 从而使被阻塞的血管再通。

摘要

背景: 研究发现, 尿激酶原具有较好的溶解血凝块和血栓的作用, 可以改善急性心肌梗死后的再灌注损伤。无创性延迟肢体缺血预适应是机体在反复短暂缺血预适应后重新出现保护作用。

目的: 分析尿激酶原结合无创性延迟肢体缺血预适应对大鼠心肌缺血再灌注损伤的影响。

方法: 实验方案经郑州大学实验动物伦理委员会批准(批准号为 1811034)。将 40 只 SD 大鼠随机分为模型组、尿激酶原组、缺血预适应组和联合干预组各 10 只。造模前, 缺血预适应组和联合干预组大鼠进行无创性延迟肢体缺血预适应 3 d, 尿激酶原组和联合干预组给予尾静脉注射尿激酶原。各组大鼠采用手术结扎法制备心肌缺血再灌注模型。于造模前后, 检测血清中肌酸激酶同工酶、乳酸脱氢酶、纤溶酶原激活剂抑制剂 1 和组织纤维溶酶原激活物水平; 造模后, 苏木精-伊红染色检测大鼠心肌组织损伤, 试剂盒检测肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 6、心肌组织超氧化物歧化酶和丙二醛水平; Western Blot 检测酪氨酸激酶 JAK2、p-JAK2、信号传导转录启动因子 3(STAT3)、p-STAT3、Caspase-3、Bax、Bcl-2 的表达。

结果与结论: ①与模型组相比, 尿激酶原组、缺血预适应组和联合干预组大鼠心肌梗死面积明显减少($P < 0.05$); ②与模型组相比, 其他 3 组肌酸激酶同工酶、乳酸脱氢酶、肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 6、丙二醛水平、纤溶酶原激活剂抑制剂 1 活性明显降低($P < 0.05$); ③与模型组相比, 其他 3 组组织纤维溶酶原激活物、超氧化物歧化酶活性明显升高($P < 0.05$); ④与模型组相比, 其他 3 组心肌组织细胞凋亡率明显下降($P < 0.05$); ⑤与模型组相比, 其他 3 组 Caspase-3、Bax 的表达量明显下调($P < 0.05$), 联合干预组 2 项指标明显低于其他组($P < 0.05$); ⑥与模型组相比, 其他 3 组 Bcl-2、p-JAK2、p-STAT3 的表达量明显上调($P < 0.05$), 联合干预组 3 项指标表达量明显高于其他组; ⑦结果说明, 尿激酶原联合无创性延迟肢体缺血预适应可以改善心肌缺血再灌注心肌损伤和功能障碍, 其作用机制可能与 JAK2/STAT3 信号通路有关。

关键词:

心肌缺血再灌注; 尿激酶原; 无创性延迟肢体缺血预适应; JAK2/STAT3; 丙二醛; 超氧化物歧化酶

中图分类号: R446; R318; R541

基金资助:

河南省高等学校重点科研项目(17A320168), 项目负责人: 刘志远; 郑州大学第一附属医院跨学科协同攻关博士科研团队基金(2016-BSTDJJ-19), 项目负责人: 张金盈

缩略语:

无创性延迟肢体缺血预适应: noninvasive delayed limb ischemic preconditioning, NDLIP

Liu Zhiyuan, Master, Chief physician, Department of Vasculocardiology, Nanyang City Central Hospital, Nanyang 473009, Henan Province, China

Corresponding author: Zhang Jinying, MD, Chief physician, Department of Vasculocardiology, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Prourokinase combined with non-invasive delayed limb ischemic preconditioning in rat models of myocardial ischemia/reperfusion injury

Liu Zhiyuan¹, Zhang Jinying², Liu Jiangbo¹, Zhao Xiaoning¹, Liu Fei¹, Li Gang¹ (¹Department of Vasculocardiology, Nanyang City Central Hospital, Nanyang 473009, Henan Province, China; ²Department of Vasculocardiology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Prourokinase has been shown to hold good thrombolysis, and improve reperfusion injury after acute myocardial infarction. Non-invasive delayed limb ischemic preconditioning is a protective reaction after repeated transient ischemic preconditioning.

OBJECTIVE: To analyze the effect of prourokinase combined with non-invasive delayed limb ischemic preconditioning on myocardial ischemia/reperfusion injury in rats.

METHODS: The study was approved by the Experimental Animal Ethics Committee of Zhengzhou University, approval number: 1811034. Forty Sprague-Dawley rats were randomly divided into model, prourokinase, non-invasive delayed limb ischemic preconditioning and combined groups ($n=10/\text{group}$). Before modeling, non-invasive delayed limb ischemic preconditioning and combined groups were given non-invasive delayed limb ischemic preconditioning preconditioning for 3 days, and prourokinase and combined groups were given intravenous injection of prourokinase. Myocardial ischemia/reperfusion injury models were prepared by surgical ligation. Before and after modeling, the levels of creatine kinase-isozyme, lactic dehydrogenase, plasminogen activator inhibitor-1 and tissue plasminogen activator in serum were detected. After modeling, hematoxylin-eosin staining was used to detect myocardial tissue damage. The levels of tumor necrosis factor- α , interleukin-6, superoxide dismutase and malondialdehyde in myocardial tissue were detected by kit. The expression levels of tyrosine kinase JAK2, p-JAK2, signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3), p-STAT3, Caspase-3, Bax and Bcl-2 were detected by western blot assay.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Compared with the model group, myocardial infarct size was significantly decreased in the prourokinase, non-invasive delayed limb ischemic preconditioning and combined groups ($P < 0.05$), and the myocardial infarct size in the combined group was significantly lower than that in the other groups ($P < 0.05$). (2) Compared with the model group, the levels of creatine kinase-isozyme, lactic dehydrogenase, tumor necrosis factor- α , interleukin-6 and malondialdehyde and plasminogen activator inhibitor-1 activity in the other three groups were significantly decreased ($P < 0.05$), especially in the combined group ($P < 0.05$). (3) Compared with the model group, the activities of tissue plasminogen activator and superoxide dismutase in the other three groups were significantly increased ($P < 0.05$), especially in the combined group ($P < 0.05$). (4) Compared with the model group, the apoptosis rate of myocardial tissue in the other three groups was significantly decreased ($P < 0.05$). The expression levels of Caspase-3 and Bax in myocardial tissue were significantly down-regulated ($P < 0.05$), especially in the combined group ($P < 0.05$). (5) The expression levels of Bcl-2, p-JAK2 and p-STAT3 in the other three groups were up-regulated significantly than in the model group ($P < 0.05$), especially in the combined group ($P < 0.05$). (6) These results suggest that prourokinase combined with non-invasive delayed limb ischemic preconditioning can improve myocardial ischemia/reperfusion injury and dysfunction, which may be related to JAK2/STAT3 signal pathway.

Key words: myocardial ischemia/reperfusion; prourokinase; non-invasive delayed limb ischemic preconditioning; JAK2/STAT3; malondialdehyde; superoxide dismutase

Funding: the Key Research Project of Henan Provincial Universities, No. 17A320168 (to LZ); the Interdisciplinary Collaborative Research Doctoral Research Team Foundation of the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, No. 2016-BSTDJJ-19 (to ZJY)

0 引言 Introduction

心肌缺血再灌注是心肌组织血流供应突然中断一定时间后恢复正常灌注时,引起心肌组织损伤和功能障碍加重的病理过程^[1]。目前,临床主要通过冠状动脉介入治疗、溶栓治疗等恢复心肌血液灌注,但对于心肌缺血再灌注引起的组织损伤加重现象,临床尚无有效的治疗手段^[2]。无创性延迟肢体缺血预适应(noninvasive delayed limb ischemic preconditioning, NDLIP)是一种无创、操作简单、可重复的预适应方法,旨在提高心肌耐受性,可减轻再灌注损伤^[3]。尿激酶原属于第二代溶栓药,是尿激酶的前体物质,具有纤维蛋白特异性,当与体内形成的血栓结合时,可被激活,形成具有溶栓作用的尿激酶^[4]。临床研究表明,NDLIP可以明显改善心肌缺血再灌注大鼠的左心室功能,保护心肌损伤,尿激酶原可以明显改善急性心肌梗死患者的心肌功能^[5-6],但其作用机制尚不清楚。因此,研究根据影响心肌缺血再灌注心肌组织损伤和功能障碍的因素,从各方面分析了尿激酶原联合NDLIP保护大鼠心肌缺血再灌注损伤的具体作用机制,旨在临床治疗提供新的思路。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。

1.2 时间及地点 实验于2018年11至12月在郑州大学实验动物中心完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 SPF级SD雄性大鼠50只,体质量为260-280 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,动物许可证号SCXK(京)2017-0022,饲养于郑州大学实验动物中心,保持室温恒定为25 °C,模拟昼夜每12 h更换一次光照条件,动物自由摄食与饮水。

1.3.2 实验用主要仪器、试剂 紫外分光光度计(日本Shimadzu,型号UV-240);台式冷冻离心机(德国Sigma公司,型号3K15);光学显微镜(日本Olympus,型号Bx50F4)。溶栓药尿激酶原(上海天士力公司,国药准字S20110003);肌酸激酶同工酶和乳酸脱氢酶试剂盒(均购自中生北控生物科技股份有限公司);肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素6(IL-6)酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(购自武汉博士德生物工程有限公司);丙二醛和超氧化物歧化酶检测试剂盒(均购自南京建成生物工程研究所);纤溶酶原激活剂抑制

剂1(PAI-1)、组织纤维溶酶原激活物(t-PA)检测试剂盒(购自福建太阳生物技术公司); 兔抗人酪氨酸激酶JAK2、p-JAK2、信号传导转录启动因子3(STAT3)、p-STAT3、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(Caspase)-3、Bax、Bcl-2单克隆抗体(均购于美国Santa Cruz公司); 辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔IgG(购于DAKO公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 动物造模及给药 40只大鼠预饲养1周后, 采用随机数字表法将其随机分为模型组、尿激酶原组、NDLIP组(缺血预适应组)和尿激酶原+NDLIP组(联合干预组)各10只。造模前, 各组大鼠经尾静脉采血2 mL左右, 离心, 分离血清, 置于-20 °C冰箱暂时保存。缺血预适应组和联合干预组大鼠于造模前进行NDLIP预适应^[7], 腹腔注射戊巴比妥钠溶液(30 mg/kg)麻醉, 以改良的动物无创血压测试仪自制套管套住大鼠左后肢根部, 监测足背动脉脉搏、血压, 缺血5 min, 再灌5 min, 每次连续3个循环, 持续3 d。尿激酶原组和联合干预组给予尿激酶原(1 mg/kg), 后连续2 d给予小剂量0.25 mg/kg。预处理后, 模型组、缺血预适应组、尿激酶原组和联合干预组大鼠采用手术结扎法制备心肌缺血再灌注模型^[8], 以6 mL/kg体积分数5%水合氯醛腹腔内注射麻醉, 于左侧第3、4肋间行切口, 打开胸腔和心包, 暴露心脏, 于肺动脉圆锥与左心耳交界处距冠状动脉2 mm处结扎前降支, 进针深度1.0-2.0 mm, 心电图显示结扎后ST段上抬0.2 mV以上, 持续30 min后打开结扎线, 恢复血流灌注, 心电图显示结扎后ST段下降1/2以上视为造模成功。结扎前降支后, 尿激酶原组和缺血预适应组各出现1只大鼠死亡, 存活大鼠均表现心率变慢、心肌搏动频率减慢, 幅度减弱, 心电图ST段抬高等, 各组间临床表现无明显差异; 恢复血流灌注后, 模型组和尿激酶原组出现1只大鼠死亡, 剔除死亡大鼠, 模型组、尿激酶原组、缺血预适应组和联合干预组造模成功大鼠分别为9只、8只、9只和10只。再灌注150 min后, 于颈动脉采集血液2 mL, 离心(3 000 r/min, 10 min), 取上清, 取左心室, 冲洗后部分于40 g/L多聚甲醛溶液固定。

1.4.2 苏木精-伊红染色检测 各组大鼠心肌组织损伤 造模成功后, 麻醉大鼠, 采用伊文思蓝-TTC双染法检测大鼠心肌梗死面积, 再灌注结束后, 结扎左前降支, 股静脉注入1.5%伊文思蓝染色液2.5 mL, 迅速取大鼠左心室心肌组织。从心尖部向心底部垂直于长轴横向切成5片, 放入1% TTC磷酸盐缓冲液中, 37 °C孵育30 min, 深蓝色代表正常心肌组织, 深红色为心肌缺血区, 苍白色为心肌梗死区, 采用坏死区心肌质量/缺血区心肌质量表示心肌梗死面积。取左心室缺血处心肌组织, 采用40 g/L多聚甲醛固定, 进行常规的脱水、透明、包埋和切片。一份切片进行苏木精-伊红染色, 在光镜下观察组织的病理变化, 每张切片随机取5个视野拍照。

实验动物造模过程的相关问题

造模目的:	分析尿激酶原联合无创性延迟肢体缺血预适应保护大鼠心肌缺血再灌注损伤的具体作用机制
借鉴已有标准实施动物造模:	采用手术结扎法制备心肌缺血再灌注模型 ^[8]
选择动物的条件:	①SPF级SD大鼠; ②雌性; ③体质量为260-280 g
动物来源及品系:	SD大鼠由北京维通利华实验动物技术有限公司提供
模型与所研究疾病的关系:	建立心肌缺血再灌注模型, 模拟临床心内直视手术、冠状动脉搭桥术、冠状动脉腔内成形术、溶栓术后等恢复血流灌注时, 心肌组织损伤加重的现象
造模技术描述:	麻醉大鼠后, 打开胸腔和心包, 暴露心脏, 于肺动脉圆锥与左心耳交界处距冠状动脉2 mm处结扎前降支
动物数量及分组方法:	采用随机数字表法随机分为: 模型组 n=10, 尿激酶原组 n=10, 缺血预适应组 n=10, 联合干预组 n=10
造模成功评价指标:	心电图显示大鼠动脉结扎后ST段上抬0.2 mV以上, 持续30 min后打开结扎线, 恢复血流灌注, 心电图显示结扎后ST段下降1/2以上视为造模成功
造模后实验观察指标:	①大鼠血清中肌酸激酶同工酶、乳酸脱氢酶、纤溶酶原激活剂抑制剂1和组织纤维溶酶原激活物水平; ②大鼠心肌组织学观察; ③血清中肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素6、心肌组织超氧化物歧化酶和丙二醛水平; ④酪氨酸激酶JAK2、p-JAK2、信号传导转录启动因子3(STAT3)、p-STAT3、Caspase-3、Bax、Bcl-2的表达
造模过程中动物死亡原因:	①大鼠自身无法适应手术造模; ②应激; ③手术操作
造模后动物处理:	大鼠麻醉后取左心室缺血处心肌组织
伦理委员会批准:	实验方案经郑州大学实验动物伦理委员会批准(批准号为1811034)

1.4.3 血清组织中相关因子的测定 于造模前后, 采用试剂盒检测血清中肌酸激酶同工酶和乳酸脱氢酶水平, 采用发光底物法测定组织纤维溶酶原激活物、纤溶酶原激活剂抑制剂1的水平, 严格按试剂盒说明书进行测定。造模后, 采用ELISA法测定血清中肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素6的表达水平, 严格按试剂盒说明书进行测定。

1.4.4 心肌组织中相关因子的测定 采用ELISA法测定心肌组织中超氧化物歧化酶、丙二醛的表达水平, 严格按试剂盒说明书进行测定。

1.4.5 TUNEL检测心肌组织细胞凋亡率 将固定于40 g/L多聚甲醛中性溶液中的心肌组织进行切片, 严格按照TUNEL试剂盒说明操作染色, 置于荧光显微镜下观察, 采用ImageJ对图像进行分析处理, 每张图像随机选取10个视野用以计算阳性细胞数与总细胞数, 并计算出比值, 则视为细胞凋亡率。采用Western Blot测定心肌组织Caspase-3、Bax、Bcl-2的表达量。

1.4.6 Western Blot检测心肌组织JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3的表达 取大鼠心肌组织匀浆后, 使用细胞裂解液严格按照蛋白裂解步骤提取总蛋白, Lowry法蛋白定量、依次SDS-PAGE凝胶电泳, 电转膜至PVDF膜、室温密封2 h, 洗膜并加一抗4 °C孵育过夜, 洗膜加二抗室温孵育2 h。再

用ECL化学发光显示,收集影像,通过积分吸光度(integrated absorbance, IA)值分析对比条带强弱,选用 β -actin作为内参,采用半定量分析。

1.5 主要观察指标 ①检测大鼠血清中肌酸激酶同工酶、乳酸脱氢酶、纤溶酶原激活剂抑制剂1和组织纤维溶酶原激活物水平;②苏木精-伊红染色进行大鼠心肌组织学观察;③ELISA法检测血清中肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素6及心肌组织超氧化物歧化酶和丙二醛水平;④Western Blot检测酪氨酸激酶JAK2、p-JAK2、信号传导转录启动因子3(STAT3)、p-STAT3、Caspase-3、Bax、Bcl-2的表达。

1.6 统计学分析 采用SPSS 17.0软件对所得数据进行分析,计量资料均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,对计量资料首先进行正态性检验,如果各组均满足正态性且两组间方差齐,采用单因素方差分析比较组间差异性,组间两两比较采用LSD-*t*检验分析;若以上条件不满足则考虑非参数Mann-Whitney *U*检验,且差异均以 $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 实验选用大鼠40只,实验过程死亡4只,进入结果分析36只。

2.2 各组大鼠心肌组织病理变化 苏木精-伊红染色结果显示,模型组心肌细胞肿胀变形,细胞核固缩深染,核仁消失,心肌纤维部分断裂、坏死,伴随大量炎性细胞浸润;尿激酶原组、缺血预适应组和联合干预组心肌细胞水肿明显减轻,心肌纤维坏死和炎性细胞浸润明显减少,且联合干预组病变减轻最为明显,见图1。与模型组相比,尿激酶原组、缺血预适应组和联合干预组心肌梗死面积明显减少($P < 0.05$);与尿激酶原组相比,缺血预适应组间心肌梗死面积无明显变化($P > 0.05$),联合干预组心肌梗死面积明显减少($P < 0.05$),见表1。

表1 各组大鼠心肌梗死面积 ($\bar{x}\pm s$, %)
Table 1 Area of myocardial infarction in rats of each group

组别	<i>n</i>	心肌梗死面积
模型组	9	45.76 \pm 5.12
尿激酶原组	8	28.75 \pm 3.65 ^a
缺血预适应组	9	29.76 \pm 3.48 ^a
联合干预组	10	20.14 \pm 2.56 ^{ab}
<i>F</i> 值		83.747
<i>P</i> 值		0.000

表注:与模型组相比, ^a $P < 0.05$;与尿激酶原组相比, ^b $P < 0.05$ 。

2.3 各组大鼠血清肌酸激酶同工酶和乳酸脱氢酶的水平 造模后,与模型组相比,尿激酶原组、缺血预适应组和联合干预组大鼠血清肌酸激酶同工酶和乳酸脱氢酶水平明显下降($P < 0.05$);与尿激酶原组相比,缺血预适应组间血清肌酸激酶同工酶和乳酸脱氢酶水平无明显变化($P > 0.05$),联合干预组肌酸激酶同工酶和乳酸脱氢酶水平明显下降($P < 0.05$),见表2。

表2 各组大鼠血清肌酸激酶同工酶和乳酸脱氢酶的水平 ($\bar{x}\pm s$, U/L)
Table 2 Levels of serum creatine kinase-isozyme and lactic dehydrogenase in rats of each group

组别	<i>n</i>	肌酸激酶同工酶		乳酸脱氢酶	
		造模前	造模后	造模前	造模后
模型组	9	306.46 \pm 37.43	634.87 \pm 52.34	312.84 \pm 39.41	663.48 \pm 58.94
尿激酶原组	8	310.21 \pm 32.14	468.59 \pm 56.32 ^a	318.29 \pm 41.57	485.34 \pm 57.68 ^a
缺血预适应组	9	308.42 \pm 38.93	456.64 \pm 53.32 ^a	314.88 \pm 38.00	476.52 \pm 61.27 ^a
联合干预组	10	307.27 \pm 37.48	382.79 \pm 48.74 ^{ab}	316.75 \pm 38.54	391.27 \pm 48.58 ^{ab}
<i>F</i> 值		2.247	39.650	2.129	30.735
<i>P</i> 值		0.102	0.000	0.114	0.000

表注:与模型组相比, ^a $P < 0.05$;与尿激酶原组相比, ^b $P < 0.05$ 。

2.4 各组大鼠血清纤溶因子的水平 造模后,与模型组相比,尿激酶原组、缺血预适应组和联合干预组大鼠血清纤溶酶原激活剂抑制剂1活性明显下降($P < 0.05$),组织纤维溶酶原激活物活性明显升高($P < 0.05$);与尿激酶原组相比,缺血预适应组间血清纤溶酶原激活剂抑制剂1和组织纤维溶酶原激活物活性无明显变化($P > 0.05$),联合干预组血清纤溶酶原激活剂抑制剂1活性明显下降($P < 0.05$),组织纤维溶酶原激活物活性明显升高($P < 0.05$),见表3。

表3 各组大鼠血清纤溶因子的水平 ($\bar{x}\pm s$, U/mL)
Table 3 Levels of serum fibrinolytic factors in rats of each group

组别	<i>n</i>	纤溶酶原激活剂抑制剂1		组织纤维溶酶原激活物	
		造模前	造模后	造模前	造模后
模型组	9	13.28 \pm 1.27	27.43 \pm 2.87	3.42 \pm 0.81	1.05 \pm 0.22
尿激酶原组	8	13.57 \pm 1.31	21.24 \pm 2.45 ^a	3.38 \pm 0.76	1.88 \pm 0.27 ^a
缺血预适应组	9	13.12 \pm 1.34	22.18 \pm 2.68 ^a	3.41 \pm 0.80	1.81 \pm 0.26 ^a
联合干预组	10	13.43 \pm 1.29	19.38 \pm 2.37 ^{ab}	3.43 \pm 0.83	2.11 \pm 0.26 ^{ab}
<i>F</i> 值		1.044	14.582	1.490	40.973
<i>P</i> 值		0.385	0.000	0.234	0.000

表注:与模型组相比, ^a $P < 0.05$;与尿激酶原组相比, ^b $P < 0.05$ 。

2.5 各组大鼠氧化应激和炎症因子的水平 与模型组相比,尿激酶原组、缺血预适应组和联合干预组大鼠肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素6、丙二醛的水平明显降低($P < 0.05$),超氧化物歧化酶活性明显升高($P < 0.05$);与尿激酶原组相比,缺血预适应组间肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素6、丙二醛水平和超氧化物歧化酶活性无明显变化($P > 0.05$),联合干预组肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素6无明显变化($P > 0.05$),丙二醛的水平明显降低($P < 0.05$),超氧化物歧化酶活性明显升高($P < 0.05$),见表4。

2.6 各组大鼠心肌细胞凋亡 TUNEL结果显示,与模型组相比,尿激酶原组、缺血预适应组和联合干预组心肌组织细胞凋亡率明显下降($P < 0.05$);与尿激酶原组相比,缺

血预适应组细胞凋亡率无明显变化($P > 0.05$), 联合干预组细胞凋亡率明显下降($P < 0.05$)。Western blot结果显示, 与模型组相比, 尿激酶原组、缺血预适应组和联合干预组Caspase-3、Bax的表达量明显下调($P < 0.05$), Bcl-2的表达量明显上调($P < 0.05$); 与尿激酶原组相比, 缺血预适应组和联合干预组Caspase-3、Bax的表达量明显下调($P < 0.05$), Bcl-2的表达量明显上调($P < 0.05$), 见图2, 表5。

表4 各组大鼠氧化应激和炎症因子的水平 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Levels of oxidative stress and inflammatory factors in rats of each group

组别	n	肿瘤坏死因子 α ($\mu\text{g/L}$)	白细胞介素6 (ng/L)	超氧化物歧化酶 (U/mg)	丙二醛 ($\mu\text{mol/g}$)
模型组	9	3.14 \pm 0.39	78.49 \pm 8.57	61.85 \pm 5.79	4.21 \pm 0.37
尿激酶原组	8	2.11 \pm 0.41 ^a	51.35 \pm 6.74 ^a	102.73 \pm 9.26 ^a	3.02 \pm 0.34 ^a
缺血预适应组	9	1.98 \pm 0.36 ^a	50.74 \pm 7.13 ^a	114.57 \pm 9.42 ^a	2.90 \pm 0.32 ^a
联合干预组	10	1.69 \pm 0.32 ^a	46.54 \pm 5.88 ^a	138.80 \pm 11.24 ^{ab}	2.61 \pm 0.28 ^{ab}
F值		13.083	53.752	98.674	101.341
P值		0.000	0.000	0.000	0.000

表注: 与模型组相比, ^a $P < 0.05$; 与尿激酶原组相比, ^b $P < 0.05$ 。

表5 各组大鼠心肌细胞凋亡率和凋亡相关因子表达 ($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Apoptosis ratio and expression of apoptotic related factors of rat cardiomyocytes in each group

组别	n	凋亡率(%)	Caspase-3	Bax	Bcl-2
模型组	9	38.78 \pm 4.87	0.63 \pm 0.06	1.02 \pm 0.11	0.25 \pm 0.03
尿激酶原组	8	31.48 \pm 4.65 ^a	0.47 \pm 0.04 ^a	0.61 \pm 0.06 ^a	0.44 \pm 0.04 ^a
缺血预适应组	9	25.78 \pm 4.27 ^{ab}	0.41 \pm 0.04 ^{ab}	0.55 \pm 0.06 ^{ab}	0.53 \pm 0.05 ^{ab}
联合干预组	10	19.76 \pm 3.21 ^{ab}	0.37 \pm 0.03 ^{ab}	0.41 \pm 0.05 ^{ab}	0.75 \pm 0.07 ^{ab}
F值		27.483	96.584	107.282 ^a	120.625
P值		0.000	0.000	0.000	0.000

表注: 与模型组相比, ^a $P < 0.05$; 与尿激酶原组相比, ^b $P < 0.05$ 。

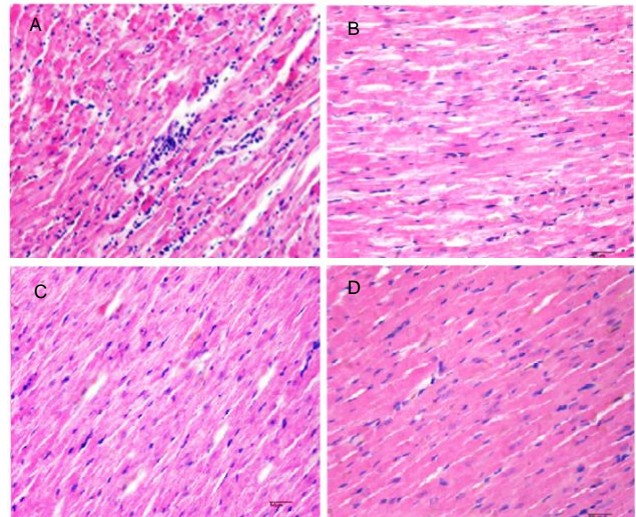
2.7 各组大鼠心肌组织中 JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3 的表达 与模型组相比, 尿激酶原组、缺血预适应组和联合干预组p-JAK2、p-STAT3的表达量明显上调($P < 0.05$); 与尿激酶原组相比, 缺血预适应组和联合干预组p-JAK2、p-STAT3的表达量明显上调($P < 0.05$), 见图3, 表6。

表6 各组大鼠心肌组织中 JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

Table 6 Expression of JAK2, p-JAK2, STAT3 and p-STAT3 in rat myocardial tissue of each group

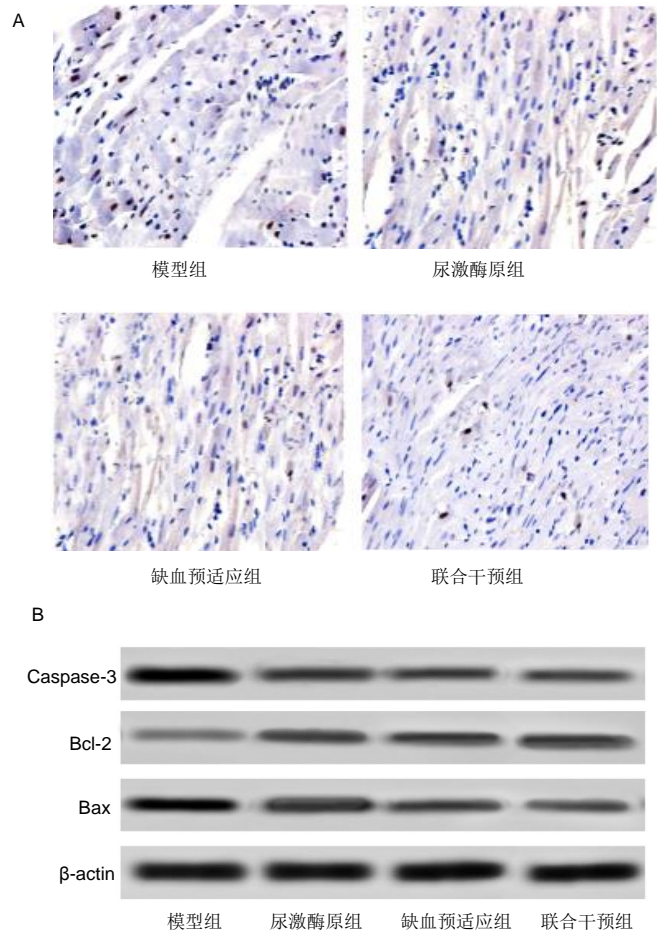
组别	n	JAK2	p-JAK2	STAT3	p-STAT3
模型组	9	0.69 \pm 0.07	0.31 \pm 0.03	0.58 \pm 0.06	0.29 \pm 0.02
尿激酶原组	8	0.67 \pm 0.05	0.42 \pm 0.03 ^a	0.56 \pm 0.05	0.38 \pm 0.03 ^a
缺血预适应组	9	0.67 \pm 0.06	0.49 \pm 0.04 ^{ab}	0.56 \pm 0.06	0.42 \pm 0.03 ^{ab}
联合干预组	10	0.68 \pm 0.06	0.58 \pm 0.05 ^{ab}	0.57 \pm 0.05	0.49 \pm 0.05 ^{ab}
F值		0.543	88.365	0.633	62.759
P值		0.674	0.000	0.598	0.000

表注: 与模型组相比, ^a $P < 0.05$; 与尿激酶原组相比, ^b $P < 0.05$ 。



图注: 图 A 为模型组; B 为尿激酶原组; C 为缺血预适应组; D 为联合干预组。联合干预组病变减轻最明显, 心肌梗死面积明显少于其他组。
图 1 大鼠心肌组织病理变化($\times 200$)

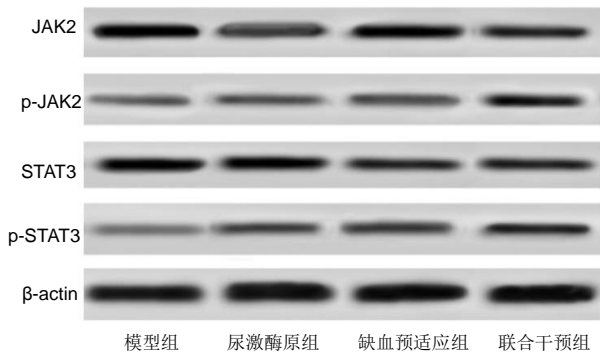
Figure 1 Pathological changes of rat myocardial tissue ($\times 200$)



图注: A 为各组大鼠心肌组织凋亡情况(TUNEL 染色); B 为 Western blot 检测各蛋白的表达谱。

图 2 大鼠心肌细胞凋亡($\times 200$)

Figure 2 Apoptosis of rat cardiomyocytes ($\times 200$)



图注：与尿激酶原组相比，缺血预适应组和联合干预组 p-JAK2、p-STAT3 的表达量明显上调。

图3 大鼠心肌组织中 JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3 的表达
Figure 3 Expression of JAK2, p-JAK2, STAT3 and p-STAT3 in rat myocardial tissue

3 讨论 Discussion

心肌缺血再灌注临床主要表现为心率失常、微血管阻塞、心肌细胞死亡等^[9]。目前心肌缺血性疾病的治疗主要采取溶栓治疗、手术治疗及介入治疗等恢复心肌组织血流供应，但缺血再灌注过程易加重心肌组织损伤和结构障碍，采取一定的预防措施对心肌缺血再灌注的防治具有重要意义^[10]。此次研究采用尿激酶原联合NDLIP治疗心肌缺血再灌注大鼠，发现尿激酶原和NDLIP均可以减小心肌梗死面积，且其疗效相当，尿激酶原联合NDLIP可以显著减小心肌梗死面积，且其效果优于尿激酶原或NDLIP单独使用。尿激酶原可以在血栓表面直接激活纤溶酶原转变为纤溶酶，溶解血栓，临床常用于心肌梗死、肺栓塞、静脉血栓等的溶栓治疗^[11]。此次研究发现尿激酶原联合NDLIP治疗可以明显降低体内纤溶因子水平，且其效果优于尿激酶原或NDLIP单独使用。纤溶酶原激活剂抑制剂1是炎症急性期反应蛋白之一，可以特异性地结合组织纤维溶酶原激活物，快速、有效地灭活组织型纤溶酶原激活物，纤溶酶原激活剂抑制剂1/组织纤维溶酶原激活物的动态平衡是体内纤溶功能的决定因素，提示尿激酶原联合NDLIP能纠正缺血/再灌时纤溶活性降低的状态，抑制血栓的形成从而保护心肌损伤。尿激酶原含有纤溶酶原激活剂抑制剂1的作用位点，汪雁博等^[12]的研究发现，尿激酶原具有较好的溶解血凝块和血栓的作用，可以改善急性心肌梗死后的再灌注损伤。NDLIP是机体在反复短暂缺血预适应后重新出现保护作用，孙凯等^[13]的研究发现，心肌梗死大鼠实施NDLIP干预可改善其心肌梗死和心肌损伤，与此次研究结果基本一致。可能是由于一方面，心脏经过一次或多次短暂的、反复的、小量的缺血再灌注后，对随后发生的长时间大面积的缺血再灌注损伤产生一定的耐受性；另一方面，尿激酶原注射后发挥其溶栓作用，抑制血栓形成，进一步改善再灌注损伤。肌酸激酶同工酶和乳酸脱氢酶主要分布于心肌中，

可以反映心肌细胞损伤程度，常用于评价心肌疾病发展的指标^[14]。此次研究采用肌酸激酶同工酶和乳酸脱氢酶作为评价心肌损伤的指标，发现尿激酶原联合NDLIP可以显著降低大鼠肌酸激酶同工酶和乳酸脱氢酶水平，且其效果优于尿激酶原或NDLIP单独使用，进一步证实NDLIP和尿激酶原可以改善心肌缺血再灌注大鼠心肌组织病变，提示尿激酶原或NDLIP单独使用均可以在一定程度上缓解缺血再灌注引起的心肌组织损伤，但在临床经济等条件允许下，可以采用尿激酶原联合NDLIP治疗提高临床治疗效果。

临床研究表明，缺血再灌注损伤诱发的炎症因子和过多的氧自由基是造成心肌组织继发性损伤的重要原因^[15]。此次研究发现，NDLIP联合尿激酶原治疗可以明显降低心肌缺血再灌注大鼠过高的炎症因子白细胞介素6和肿瘤坏死因子 α 水平，且其疗效与尿激酶原或NDLIP单独使用无显著差异。白细胞介素6和肿瘤坏死因子 α 均为机体重要的炎症因子，肿瘤坏死因子 α 还可以参与缺血后的多种病理反应，包括心肌细胞水肿、细胞凋亡等^[16]。结合此次研究表明，NDLIP联合尿激酶原干预可能通过降低白细胞介素6和肿瘤坏死因子 α 水平，改善心肌损伤，抑制心肌细胞凋亡。李燕等^[17]研究发现，NDLIP干预可以降低心肌梗死大鼠的氧化应激水平，改善心脏功能。此次研究发现，NDLIP联合尿激酶原治疗可以明显降低心肌缺血再灌注大鼠过高的氧化应激水平，且其效果优于尿激酶原或NDLIP单独使用，提示NDLIP联合尿激酶原治疗可以提高其抗氧化作用，降低过多的氧自由基，改善心肌功能。

心肌缺血再灌注诱发的大量炎症因子和氧自由基均可以诱导心肌细胞凋亡^[18]。此次研究发现，NDLIP联合尿激酶原治疗可以明显抑制心肌细胞凋亡，下调Caspase-3和Bcl-2/Bax的表达，抑制心肌细胞凋亡，且其效果优于尿激酶原或NDLIP单独使用。Cheng等^[19]的研究发现，无创远端肢体缺血预适应可以通过上调STAT3的表达，抑制心肌细胞凋亡。JAK2/STAT3信号通路参与了大量细胞因子、生长因子和激素的表达过程，同时也在保护心肌免于缺血再灌注损伤中起着至关重要的作用^[20]。JAK2/STAT3信号途径通过与细胞表面的受体结合，诱导受体二聚化与磷酸化，激活的JAK磷酸化受体形成STAT结合位点，同时磷酸化STAT，磷酸化的STAT形成同源或异源的二聚体调节靶基因的表达^[21]。Liu等^[22]的研究发现，JAK2/STAT3信号通路参与调控心肌缺血再灌注过程中的炎症反应、氧化应激和心肌细胞凋亡。研究中，NDLIP联合尿激酶原治疗后，大鼠心肌组织JAK2和STAT3的磷酸化水平明显升高，且其效果优于尿激酶原或NDLIP单独使用，提示NDLIP联合尿激酶原治疗可能通过调节JAK2/STAT3的磷酸化，改善心功能。

综上所述，NDLIP联合尿激酶原治疗可以抑制心肌

缺血再灌注大鼠炎症反应和氧化应激, 改善机体纤溶因子平衡, 抑制心肌细胞凋亡, 减少心肌梗死面积和心肌损伤, 改善心功能, 其作用机制可能与JAK2/STAT3信号通路有关。但JAK2/STAT3信号通路可同时受多种因素影响, NDLIP联合尿酸酶原作用的具体机制尚有待于进一步验证。此次研究不足之处为样本数量较少, 可能会对实验结果产生一定误差, 但该研究为临床上心肌缺血再灌注的治疗提供参考依据。

作者贡献: 第一作者刘志远负责实验设计、实施及文章撰写; 第二作者张金盈提供实验指导和实验方案设计, 并对实验进行盲法评估; 刘江波、赵晓宁、刘飞和李纲协助实验方案的实施和操作。

经费支持: 该文章接受了“河南省高等学校重点科研项目(17A320168)”“郑州大学第一附属医院跨学科协同攻关博士科研团队基金(2016-BSTDJJ-19)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程不存在利益冲突。

机构伦理问题: 实验方案经郑州大学实验动物伦理委员会批准(批准号为1811034)。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术, 并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

[1] Sheng X, Chen M, Huang B, et al. Cardioprotective effects of low-level carotid baroreceptor stimulation against myocardial ischemia-reperfusion injury in canine model. *J Interv Card Electrophysiol.* 2016;45(2):131-140.

[2] Kurian GA, Rashmi R, Srinivasan V, et al. The Role of Oxidative Stress in Myocardial Ischemia and Reperfusion Injury and Remodeling: Revisited. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:1656450.

[3] Robert R, Vinet M, Jamet A, et al. Effect of non-invasive remote ischemic preconditioning on intra-renal perfusion in volunteers. *J Nephrol.* 2017;30(3):393-395.

[4] 王枫岭, 刘志远, 徐娜, 等. 尿酸酶-肝素系列溶栓治疗不稳定型心绞痛的临床疗效[J]. 河南医学研究, 2001, 10(2):125-127.

[5] 高建波, 张颖, 娄建石. 多疗程无创性延迟肢体缺血预适应保护大鼠心肌缺血再灌注损伤的持久效应研究[J]. 临床心血管病杂志, 2014, 30(5):439-442.

[6] 徐雷, 安少波, 杜晓静, 等. 尿酸酶原与尼可地尔改善STEMI患者急诊PPCI术后的临床效果[J]. 重庆医学, 2018, 47(26):3458-3460, 3463.

[7] 赵晓楠, 袁恒杰, 朱学慧, 等. 无创性延迟肢体缺血预适应对抗大鼠脑缺血再灌注损伤的内皮机制[J]. 中国医院药学杂志, 2015, 35(10):877-881.

[8] 丁洪涛, 刘霖, 王智超, 等. p38 MAPK抑制物对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及凋亡信号通路的影响[J]. 临床和实验医学杂志, 2014, 13(6):425-428.

[9] Yu H, Guan Q, Guo L, et al. Gypenosides alleviate myocardial ischemia-reperfusion injury via attenuation of oxidative stress and preservation of mitochondrial function in rat heart. *Cell Stress Chaperones.* 2016 ;21(3):429-437.

[10] Liao YH, Xia N, Zhou SF, et al. Interleukin-17A contributes to myocardial ischemia/reperfusion injury by regulating cardiomyocyte apoptosis and neutrophil infiltration. *J Am Coll Cardiol.* 2012;59(4):420-429.

[11] Gurewich V. Thrombolysis; a critical first-line therapy with an unfulfilled potential. *Am J Med.* 2016;129(6):573-575.

[12] 汪雁博, 谷新顺, 傅向华. 国产重组人尿酸酶原治疗急性心肌梗死有效性和安全性的Meta分析[J]. 中国全科医学, 2016, 19(17):2083-2088.

[13] 孙凯, 陈文华, 张颖, 等. 无创性延迟肢体缺血预适应对心肌梗死大鼠预后的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2017, 33(1):116-122.

[14] Xuan F, Jian J. Epigallocatechin gallate exerts protective effects against myocardial ischemia/reperfusion injury through the PI3K/Akt pathway-mediated inhibition of apoptosis and the restoration of the autophagic flux. *Int J Mol Med.* 2016;38(1):328-336.

[15] Cheng L, Jin Z, Zhao R, et al. Resveratrol attenuates inflammation and oxidative stress induced by myocardial ischemia-reperfusion injury: role of Nrf2/ARE pathway. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(7):10420-10428.

[16] Tang XL, Liu JX, Dong W, et al. Cardioprotective effect of protocatechuic acid on myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Pharmacol Sci.* 2014;125(2):176183.

[17] 李燕, 陈文华, 孙凯, 等. 无创性延迟肢体缺血预适应对心脏性猝死的预防作用研究[J]. 中国药理学通报, 2016, 32(11):1565-1570.

[18] 朱娜, 要瑞莉, 刘俊双, 等. 大鼠肢体缺血/再灌注后心肌细胞凋亡及氧化应激的调节作用[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(23):6666-6668.

[19] Cheng Z, Ling LI, Xueying M O, et al. Non-invasive remote limb ischemic postconditioning protects rats against focal cerebral ischemia by upregulating STAT3 and reducing apoptosis. *Int J Mol Med.* 2014;34(4):957-966.

[20] Zhao GL, Yu L M, Gao WL, et al. Berberine protects rat heart from ischemia/reperfusion injury via activating JAK2/STAT3 signaling and attenuating endoplasmic reticulum stress. *Acta Pharmacologica Sinica.* 2016;37(3):354-367.

[21] Yang Y, Duan W, Jin Z, et al. JAK2/STAT3 activation by melatonin attenuates the mitochondrial oxidative damage induced by myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Pineal Res.* 2013;55(3):275-286.

[22] Liu S, Yang Y, Song YQ, et al. Protective effects of N(2)-L-alanyl-L-glutamine mediated by the JAK2/STAT3 signaling pathway on myocardial ischemia reperfusion. *Mol Med Rep.* 2018;17(4):5102-5108.