

缺血再灌注心肌中补体 C3 的表达 与补体 C1 抑制剂的心肌保护作用

付金容, 林国生, 武智晓

(武汉大学人民医院心内三科, 武汉 湖北 430060)

【摘要】目的 研究缺血再灌注心肌中补体 C3 的表达以及补体 1 抑制剂(C1INH, C1 inhibitor)对缺血心肌的保护作用。**方法** 结扎大鼠的冠状动脉左前降支 30 min, 再灌注 3 h、72 h 造成缺血再灌注损伤模型。实验分为假手术组、NaCl 组和 C1INH 组(每组 5 只大鼠, $n=5$), 观察 C1INH 对大鼠心功能、心肌梗死面积的影响, 同时采用免疫组化和 Western blot 法检测缺血心肌补体 C3 的表达。**结果** 与假手术组比较, 再灌注 3 h 及 72 h 后, NaCl 组和 C1INH 组鼠心功能下降, 心肌的梗死面积增加, 缺血心肌补体 C3 的表达增加。与 NaCl 组比较, 再灌注 72 h 后, C1INH 组心功能改善, 心肌的梗死面积减少[(36.28±0.99)% vs (50.58±0.24)%], 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。同时, C1INH 组缺血心肌补体 C3 的表达减少。**结论** C1INH 通过抑制缺血心肌补体 C3 的表达而减少缺血再灌注所致的心肌损伤, 改善心功能。

【关键词】 补体 1 抑制剂; 缺血再灌注; 补体 C3

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2013)01-0006-03

Expression of C3 in ischemic reperfused myocardium and the role of C1 inhibitor. FU Jin-rong, LIN Guo-sheng, WU Zhi-xiao. The Third Department of Cardiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei, CHINA

【Abstract】Objective To explore the expression of C3 in ischemic reperfused myocardium and the protective effect of C1 inhibitor (C1INH) on ischemic myocardium. **Methods** Rat heart ischemia/reperfusion injury was induced by occluding the left anterior descending coronary artery for 30 min and reperfusion for 3 h or 72 h. C1 inhibitor or NaCl was administrated intravenously 5 min before surgery. The rats were divided into three groups, the false surgery group, the NaCl group and the C1INH group, each with 5 cases. The effect of C1INH on cardiac function and infarct size was measured, and the expression of C3 in ischemic myocardium was detected by immunohistochemistry and western blot. **Results** 3 h and 72 h after reperfusion, the NaCl group and the C1INH group had worsened cardiac function and increased infarct size, as well as increased expression of C3, compared with the false surgery group. 72 h after reperfusion, the C1INH group had significantly improved cardiac function and significantly reduced infarct size [(36.28±0.99)% vs (50.58±0.24)%], compared with the NaCl group ($P < 0.05$), as well as suppressed expression of C3. **Conclusion** C1INH protects against I/R-induced myocardial injury via inhibition of C3 protein expression in ischemic myocardium.

【Key words】 C1 inhibitor, Ischemia and Reperfusion, Complement C3

恢复缺血心肌的灌注是挽救心肌的一项必要措施, 越来越多的证据表明再灌注本身会导致心肌的额外损伤^[1]。补体 1 抑制剂(C1INH, C1 inhibitor)是丝氨酸蛋白酶抑制剂家族成员之一, 它调节三条补体途径的激活。C1INH 抑制补体的激活是保护缺血心肌细胞减少再灌注损伤的一条有效途径。

我们建立大鼠缺血再灌注模型, 研究了静脉注射 C1INH 后, 大鼠心功能的变化和心肌梗死面积的变化, 以及缺血心肌中补体 C3 表达的变化, 探讨 C1INH 对缺血再灌注心肌的作用及其可能机制。

1 资料与方法

1.1 大鼠缺血再灌注模型的制备及分组 SD 大鼠(200~250 g, 雌雄不限, 8 周龄)购自武汉大学动物实

验中心。以穿线结扎法结扎冠状动脉前降支 30 min 造成心肌缺血, 松开结扎导致再灌注; 常规心电图监测心肌缺血变化, 以结扎后 ST 段抬高、松扎后 ST 段下降 1/3 以上者为合格模型。再灌注 3 h 和 72 h 后, 麻醉大鼠(100 mg/kg ketamine, 1.5 mg/kg xylazine)进行二维超声心动图分析(8 mHz 探头, VIVID7, GE, USA); 然后用多导生理仪(Lead 2000, B 型, 锦江通用有限公司, 四川)进行血流动力学的测量。实验大鼠随机分为以下几组:(1)假手术组($n=5$);(2)NaCl 组(缺血 30 min, 再灌注 3 h 或 72 h), 于术前 5 min 静脉注射 0.9% NaCl (10 ml/kg)溶液(I/R, $n=5$);(3)C1INH 组(缺血 30 min, 再灌注 3 h 或 72 h), 于术前 5 min 静脉注射 C1INH (40 U/kg, 1 U≈0.15 mg, Behring 公司, Germa-

ny)溶液(I/R+C1INH, n=5)

1.2 心肌梗死面积的测定 再灌注结束后,将大鼠的左前降支再次结扎,并从肺动脉注射1 ml的伊文氏兰(1%, Sigma),待缺血区显示清晰后,迅速取出心脏,快速用冷却生理盐水冲洗后减去心房及右心室,-20℃冷冻10 min,将左心室横切成2 mm厚的薄片。将未染色的心肌(缺血心肌)与染色心肌(未缺血心肌)区分离出来,放入1% 2,3,5-氧化三本基四氮唑(TTC)中,37℃孵育15 min,未梗塞组织呈砖红色,梗塞组织呈灰白色,根据颜色的差别将它们分离开来。最后将左心室这三部分组织(即未缺血心肌、缺血但成活心肌和缺血并坏死心肌)分别称重,计算出梗塞区(Myocardial infarct size, MIS)占缺血面积(Area of risk, AR)的比例。

1.3 心肌组织补体C3的免疫组化分析 将取自缺血心肌的石蜡切片脱蜡及抗原修复,PBS冲洗后,加3 ml/L过氧化氢处理10 min;再以PBS冲洗后,依次滴加正常羊血清(室温30 min)、小鼠单克隆抗体C3(200 g/ml, 1:50)(37℃孵育60 min,PBS洗)、辣根过氧化物酶标记的抗小鼠IgG(1:40)(37℃孵育30 min,PBS洗),最后封片显微镜下观察。一抗购自美国Santa Cruz公司、二抗购自美国KPL公司。

1.4 Western blot 检测缺血心肌补体C3的含量 取左心室游离壁的组织,100 mg心肌组织放入1 ml裂解液,冰上充分匀浆后,4℃离心,取上清,Lowry法测定蛋白浓度,并将总蛋白浓度调至

大约为50 μg/15 μl。取15 μl蛋白溶液加入等体积的2×SDS凝胶加样缓冲液,煮沸10 min,经10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离后,电转移至硝酸纤维素膜上,室温下用封闭液封闭1 h,然后与小鼠抗大鼠C3单克隆抗体(Santa Cruz公司生产)4℃下孵育过夜,再与辣根过氧化物酶标记的抗小鼠IgG和抗山羊IgG(美国KPL公司)室温下孵育1 h。洗膜后加入ECL增强化学发光试剂反应1 min,立即用Kodak底片曝光,洗片后经凝胶电泳成像系统扫描,应用图像分析软件(Vilber Lourmat公司,德国)分析,以各组心肌细胞内的β-actin含量作为标准来确定X光片上C3的相对含量。封闭液、ECL试剂均采用KPL公司生产的Western blot试剂盒。

1.5 统计学方法 采用SPSS 11.0软件分析。计量资料实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。单变量配对资料之间的比较采用配对样本t检验。

2 结果

2.1 C1INH改善大鼠缺血再灌后心功能、减少心肌梗死面积 随着再灌注时间的延长,大鼠左室射血分数(EF)、短轴缩短率(FS)、左室收缩压(LVSP)、左室压差(LVDP)、左室内压最大上升速率(dp/dt max)均显著下降,左室舒张末压(LVEDP)则显著增高(表1)。再灌注72 h时,与NaCl组比较,C1INH治疗组大鼠的心功能得到明显改善(表1),心肌梗死面积显著减少(表2)。

表1 C1INH对缺血再灌注大鼠心功能的影响($\bar{x} \pm s$)

项目	假手术组(n=5)	3 h		72 h	
		NaCl组(n=5)	C1INH组(n=5)	NaCl组(n=5)	C1INH组(n=5)
心功能					
EF (%)	85.0±1.41	75.0±1.10 ^a	76.6±0.93	65.6±1.50 ^a	72.2±0.86 ^b
FS (%)	54.0±1.58	47.6±0.75 ^a	47.6±0.93	35.8±0.74 ^a	40.8±0.58 ^b
血流动力参数					
LVSP (mmHg)	130.6±1.50	112.8±2.42 ^a	113.2±2.80	85.4±1.96 ^a	93.0±1.67 ^b
LVEDP (mmHg)	4.8±0.74	9.8±0.74 ^a	9.0±0.55	15.8±0.86 ^a	11.7±0.86 ^b
LVDP (mmHg)	123.8±2.48	99.0±2.07 ^a	98.2±1.39	71.0±1.79 ^a	81.2±1.16 ^b
dp/dtmax (mmHg/s)	8 360±167	6 668±156 ^a	6 707±162	4 795±121 ^a	5 957±234 ^b

注:与假手术组比较,^aP<0.05;与NaCl组比较,^bP<0.05,1 mmHg=0.133 kPa。

表2 C1INH对心肌梗死面积的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	梗死面积占比(MIS%)
假手术组(n=5)	0
3 h	
NaCl组(n=5)	40.50±0.360 ^a
C1INH组(n=5)	39.32±0.525 ^b
72 h	
NaCl组(n=5)	50.58±0.240 ^a
C1INH组(n=5)	36.28±0.990 ^b

注:与假手术组比较,^aP<0.05;与NaCl组比较,^bP<0.05。

2.2 C1INH抑制心肌细胞补体C3的蛋白表达

2.2.1 免疫组化法显示补体C3在心肌的表达 免疫组化分析显示,缺血再灌后3 h,心肌细胞上可见补体C3的表达,而正常大鼠心肌则未见表达。缺血再灌注后72 h,补体C3的表达减少(图1)。

2.2.2 Western blot显示补体C3在心肌的含量 Western blot分析进一步证实了免疫组化的结果,C1INH能减少再灌3 h及72 h心肌补体C3的表达量(图2)。

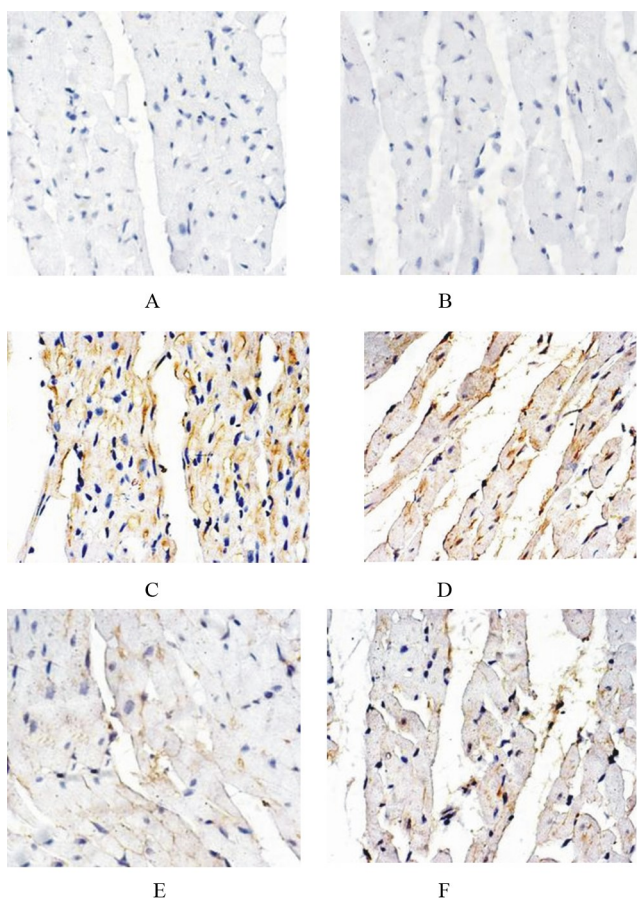


图 1 C1INH 对缺血心肌组织中 C3 蛋白表达的影响(HE×400)
注:A:假手术组(3 h);B:假手术组(72 h);C:NaCl 组(3 h);D:NaCl 组(72 h);E:C1INH 组(3 h);F:C1INH 组(72 h)。

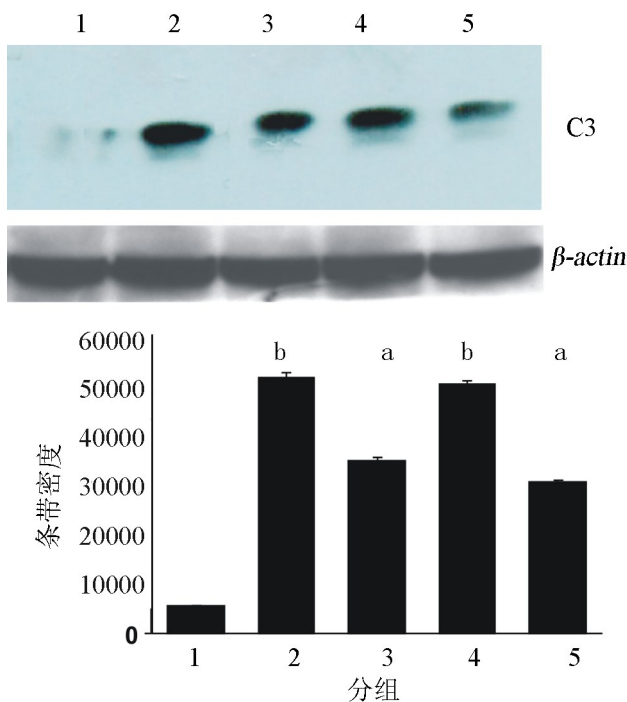


图 2 C1INH 对缺血心肌组织中 C3 蛋白含量的影响
注:1:假手术组;2:NaCl 组(3 h);3:C1INH 组(3 h);4:NaCl 组(72 h);5:C1INH 组(72 h)。各组之间比较采用 t 检验,与假手术组比较,^aP<0.05;与 NaCl 组比较,^bP<0.05。

3 讨论

所有实验数据显示了 C1INH 对缺血再灌心肌的保护作用。首先,C1INH 可减少心肌梗死面积、改善心功能;其次 C1INH 还抑制缺血心肌 C3 的蛋白表达。

补体的激活参与了再灌注损伤,抑制补体的激活则可减少缺血再灌注损伤;梗死心肌中检测到补体的表达(如 C1q、C3、C4 和 C5),敲出小鼠补体 C3 基因则可减少其缺血再灌损伤^[2],耗竭激活的补体(如眼镜蛇毒素因子)或抑制补体的激活(如可溶性补体 C1 受体)均可减轻缺血心肌细胞的损伤。

这些证据表明补体的激活在缺血再灌损伤中起着重要作用,抑制补体途径的激活可挽救受损组织。我们的研究结果显示,在手术前 5 min 给予 C1INH,可显著减少心肌的再灌注损伤。再灌注 3 h 时,C1INH 组大鼠心功能并没有明显改善(如 EF、FS、LVDP 和 dp/dt max)。但随着再灌注时间的延长,再灌注 72 h 时,与 NaCl 组比较,C1INH 组大鼠的心功能则明显改善,而此时 C1INH 组大鼠心肌的梗死面积也显著减少。因此,C1INH 治疗有助于减轻缺血再灌注损伤。

缺血再灌注中存在着三条补体激活途径,补体 C3 是体内含量最多的补体蛋白,它在补体激活的级联反应中起着中枢作用。补体激活产生具有趋化活性、过敏毒素性质或免疫调节活性的片段,而三条补体途径的激活均要通过 C3 的裂解。正常条件下 C3 主要由肝脏产生,但缺血再灌后的心肌也能合成大量的 C3。C3 在局部组织的合成也可能参与了缺血再灌注损伤^[3]。C3a 为过敏毒素,C3a 产生依赖 C3 的裂解。因此对于补体系统的调节,最理想的措施还是对 C3 或 C3a 的调节^[4],C1INH 能抑制血液中 C3a 和 C5a 的增加。我们研究了 C1INH 对缺血心肌中关键补体蛋白 C3 表达的影响,结果显示再灌注会导致心肌中 C3 的表达,C1INH 能够抑制这种表达。

综上所述,C1INH 可保护缺血心肌,改善心功能,而这种保护作用可能与其抑制补体的激活,抑制细胞因子(如 TNF-α)的释放、粘附分子的表达以及炎症细胞的浸润有关;缺血心肌组织中的补体成分 C3 参与了缺血再灌注损伤,C1INH 可抑制缺血心肌 C3 的表达而产生保护效应。

参考文献

- [1] 王 苗,梁伟钧.他汀类对缺血再灌注心肌保护作用的研究进展[J].海南医学,2012,23(6):119-122.
- [2] Bjerre M, Hansen TK, Flyvbjerg A. Complement activation and cardiovascular disease [J]. Horm Metab Res, 2008, 40(9): 626-634.
- [3] Flierl MA, Rittirsch D, Nadeau BA, et al. Functions of the complement components C3 and C5 during sepsis [J]. FASEB J, 2008, 22(10): 3483 - 3490.
- [4] Buerke M, Prüfer D, Dahm M, et al. Blocking of classical complement pathway inhibits endothelial adhesion molecule expression and preserves ischemic myocardium from reperfusion injury [J]. J Pharmacol Exp Ther, 1998, 286(1): 429-438.

(收稿日期:2012-06-13)