

补体 C1 抑制剂对缺血心肌补体 C3 合成及炎症反应的影响

付金容, 林国生, 黎明江, 周艳丽

(武汉大学人民医院心内三科, 武汉 湖北 430060)

【摘要】 目的 观察补体 1 抑制剂对缺血再灌注大鼠心肌补体 C3 合成及炎症反应的影响。方法 结扎大鼠的左前降支 30 min, 再灌注 3 h、72 h 形成缺血再灌注模型, 实验分为假手术组、NaCl 组和 C1INH 组(每组 15 只), 观察 C1INH 对心肌及血浆髓过氧化物酶(MPO)活性的影响, 放射免疫法检测血浆肿瘤坏死因子 α (TNF- α)及白细胞介素 2 (IL-2)水平的变化, RT-PCR 法检测缺血心肌中 C3 mRNA 含量变化。**结果** 与 NaCl 组比较, 再灌注 72 h 后, C1INH 组心肌 MPO 活性分别在再灌注 3 h [(3.69 \pm 0.02) U/g vs (3.11 \pm 0.03) U/g]和 72 h [(3.08 \pm 0.03) U/g vs (1.99 \pm 0.03) U/g]后减少, 血浆 MPO 活性亦减少, 差异具有统计学意义($P<0.05$), 血清 TNF- α 和 IL-2 水平 3 h 和 72 h 浓度均降低($P<0.05$)。同时 RT-PCR 分析显示, C1INH 组心肌 C3 mRNA 的含量明显减少($P<0.05$)。**结论** C1INH 除了抑制补体系统的激活, 还减少心肌组织炎性细胞的浸润, 降低血浆炎症因子水平, 抑制缺血心肌 C3 mRNA 的表达。

【关键词】 补体 1 抑制剂; 缺血再灌注; 补体 C3; 髓过氧化物酶; 肿瘤坏死因子 α ; 白细胞介素 2

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2013)21-3125-03

Effect of C1 inhibitor on the synthesis of C3 and inflammatory reaction in ischemic reperfused myocardium.

FU Jin-rong, LIN Guo-sheng, LI Min-jiang, ZHOU Yan-li. The Third Department of Cardiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei, CHINA

【Abstract】 Objective To explore the effect of C1 inhibitor (C1INH) on the synthesis of C3 in ischemic myocardium and inflammatory reaction. **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. The rats were divided into the C1 inhibitor group, NaCl group and sham operated group. The activity of myeloperoxidase (MPO) in myocardium and blood were measured. The level of TNF- α and IL-2 in blood were analyzed by radio-immunity method. The expression of C3 mRNA in ischemic myocardium was also observed. **Results** Compared with the NaCl group, C1INH reduced myeloperoxidase activity in myocardium, 3 h [(3.69 \pm 0.02) U/g vs (3.11 \pm 0.03) U/g] and 72 h [(3.08 \pm 0.03) U/g vs (1.99 \pm 0.03) U/g], and in blood. The levels of TNF- α and IL-2 in blood were decreased. RT-PCR demonstrated a dramatic reduction in C3 mRNA expression of ischemic myocardium. **Conclusion** C1INH protects against I/R-induced myocardial injury via inhibition of C3 mRNA expression in ischemic myocardium and regulating the inflammatory reaction.

【Key words】 C1 inhibitor; Ischemia reperfusion; Complement C3; MPO; TNF- α ; IL-2

通讯作者: 付金容. E-mail: whfujinrong@yahoo.com.cn

参考文献

[1] 张连峰. 我国常用实验动物资源的现状及对未来发展的思考[J]. 中国比较医学杂志, 2011, 21(10): 39-44.

[2] 张金脉, 任兆瑞. TALENs: 一种新的基因定点修饰技术[J]. 生命科学, 2013, 25(1): 126-132.

[3] 左 琴, 岳秉飞, 刘双环, 等. Wistar 大鼠超数排卵及胚胎移植[J]. 实验动物科学与管理, 2003, 20: 70-72.

[4] Popova E, Krivokhar chenko A, Ganten D, et al. Comparison between PMSG and FSH induced superovulation for the generation of transgenic rats [J]. Mol Reprod Dev, 2002, 63(2): 177-182.

[5] Hirabayashi M, Takchashi R, Ito K, et al. A comparative study on the integration of exogenous DNA into mouse, rat, rabbit, and pig genomes [J]. Exp Anim, 2001, 50(2): 125-131.

[6] 卫晓鸾, 章 蓉, 金宇娟, 等. 转基因 SD 大鼠构建技术的研究[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2009, 30(1): 26-30.

[7] Tesson L, Usal C, Ménoret S, et al. Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs [J]. Nat Biotechnol, 2011, 29(8): 695-696.

(收稿日期: 2013-08-01)

越来越多的证据表明冠心病是一种免疫系统疾病,在心血管疾病及其高危人群(包括代谢综合征和糖尿病患者)中存在着与免疫相关的炎症反应。补体 C3 在补体的级联反应中发挥着关键作用,也是血液循环中含量最为丰富的补体蛋白。研究表明补体 C3 是冠心病的紧急预测因子。血运重建是挽救缺血心肌的必要措施,但也会造成再灌注损伤,其中与补体相关的炎症反应则起了重要的促进作用。补体 1 抑制剂是丝氨酸蛋白酶抑制剂家族成员之一,它能调节三条途径补体的激活。我们已经证实补体 1 抑制剂能够减少心肌的再灌注损伤及补体蛋白的表达^[1]。然而,补体 1 抑制剂是否从基因水平抑制了补体 C3 的合成,是否减少了相关的炎症反应等还不清楚。

1 资料与方法

1.1 大鼠缺血再灌模型的制备及分组 建立大鼠缺血再灌注模型(方法同文献报道^[1]),分为假手术组(Sham group, $n=15$)、氯化钠组(I/R, $n=15$)及补体 1 抑制剂组(I/R+C1INH, $n=15$)。

1.2 缺血心肌髓过氧化物酶活性(Myeloperoxidase, MPO)的测定 取缺血心肌即左心室游离壁及静脉血,匀浆后 4℃ 离心,取上清根据 MPO 检测试剂盒(南京建成生物工程研究所)说明测量其 MPO 活性。

1.3 血清 TNF- α 及 IL-2 浓度测定 取大鼠静脉 2 ml, 4℃ 离心 5 min, 取上层血清, 保存于 -70℃ 冰箱。用放射免疫分析法(¹²⁵I-IL-2 放射免疫试剂盒、¹²⁵I-TNF- α 放射免疫试剂盒, 北京科美生化公司)测定大鼠外周血清中 TNF- α 及 IL-2 的含量。

1.4 RT-PCR 检测心肌 C3 mRNA 的含量 100 mg 左心室游离壁心肌组织放入 1 ml Trizol 中分离提纯总 RNA, 将 5 μ g 总 RNA 在 20 μ l 含有 oligo (dT)₁₂₋₁₈ 引物, 脱氧核糖苷三磷酸(dNTP) 和逆转录酶(M-MLV) (均系 Gibco BRL 产品) 的反应液中经 37℃、80 min 逆转录为 cDNA, -20℃ 保存待用。C3 引物序列: 5'-CTACCCCTTACCCCTCACT CCTTCCACC TT-3' 和 5'-ATTCCTTACT GGCTGGAAT CTTGATGAAG A-3', 扩增产物大小为 330 bp。GAPDH 为内参照, 引物序列: 5'-TCCCTCAAGA TTGTCAGCAA-3' 和 5'-AGATCCACAACG GATACATT-3', 扩增产物大小为 308 bp。PCR 反应体积为 25 μ l, Taq 多聚酶和脱氧核糖苷三磷酸(dNTP)为美国 Promega 产品, 变性、退火、延伸条件分别为 94℃ 1 min、54℃ 1 min、72℃ 1 min, 共 40 个循环。PCR 扩增产物在 1.2% 琼脂胶上进行电泳分离, 溴化乙锭染色, 紫外线灯下观察, 并扫描成像,

采用图像分析系统(Vilber Lourmat 公司, 德国)分析, 计算 C3 与 GAPDH 的相对比(半定量分析)。

1.5 统计学方法 计量资料实验数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。采用 SPSS13.0 软件分析。配对资料之间的单变量比较采用 t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 C1INH 抑制缺血心肌及血浆炎症反应 为了评价缺血再灌后炎症细胞反应, 我们检测了左心室游离壁心肌及血浆 MPO 的浓度。假手术组左心室心肌 MPO 浓度低, 然而再灌注 3 h 和 72 h 后, MPO 的浓度升高($P<0.05$)。再灌注后 3 h 和 72 h, C1INH 治疗后 MPO 浓度均显著小于 NaCl 组 ($P<0.05$), 见表 1。

表 1 C1INH 对心肌及血浆 MPO 活性的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	心肌 MPO 活性(U/g 湿重)	血浆 MPO 活性(U/L)
假手术组	15	1.18 \pm 0.01	48.6 \pm 0.71
再灌注 3 h			
NaCl 组	15	3.69 \pm 0.02 ^a	176.3 \pm 0.81 ^a
C1INH 组	15	3.11 \pm 0.03 ^b	159.9 \pm 1.03 ^b
再灌注 72 h			
NaCl 组	15	3.08 \pm 0.03 ^a	128.8 \pm 0.79 ^a
C1INH 组	15	1.99 \pm 0.03 ^b	103.7 \pm 0.21 ^b

注:再灌注 3 h、72 h, NaCl 组与假手术组比较(心肌) $t_1=-119.992$, $t_2=-76.979$, (血浆) $t_1=-151.394$, $t_2=-143.229$, ^a $P<0.05$;再灌注 3 h、72 h, C1INH 组与 NaCl 组比较(心肌) $t_1=20.636$, $t_2=29.067$, (血浆) $t_1=14.983$, $t_2=16.425$, ^b $P<0.05$ 。

2.2 C1INH 降低血浆 TNF- α 及 IL-2 的水平 对大鼠再灌注 3 h 和 72 h 后血浆 TNF- α 及 IL-2 的水平进行检测。结果表明, 梗死后, 血浆 TNF- α 和 IL-2 的水平升高。C1INH 治疗后, TNF- α 和 IL-2 的水平均显著低于 NaCl 组 ($P<0.05$), 见表 2。

表 2 C1INH 对血浆 TNF- α 及 IL-2 水平的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	TNF- α 水平(U/L)	IL-2 水平(U/L)
假手术组	15	0.25 \pm 0.01	0.32 \pm 0.01
再灌注 3 h			
NaCl 组	15	0.76 \pm 0.01 ^a	0.41 \pm 0.01 ^a
C1INH 组	15	0.54 \pm 0.01 ^b	0.36 \pm 0.02 ^b
再灌注 72 h			
NaCl 组	15	1.08 \pm 0.03 ^a	0.56 \pm 0.02 ^a
C1INH 组	15	0.74 \pm 0.01 ^b	0.43 \pm 0.02 ^b

注:再灌注 3 h、72 h, NaCl 组与假手术组比较(TNF- α) $t_1=-39.381$, $t_2=-27.645$, (IL-2) $t_1=-10.174$, $t_2=-15.523$, ^a $P<0.05$;再灌注 3 h、72 h, C1INH 组与 NaCl 组比较(TNF- α) $t_1=13.762$, $t_2=9.015$, (IL-2) $t_1=70.059$, $t_2=7.019$, ^b $P<0.05$ 。

2.3 C1INH 抑制心肌补体 C3 mRNA 的表达 为了进一步分析 C1INH 对缺血心肌补体 C3 基因表达

的作用,我们用 RT-PCR 检测了再灌注后心肌 C3 mRNA 的含量。结果显示,再灌注 3 h 和 72 h 后心肌 C3 mRNA 的含量增加,而 C1INH 可减少 C3 mRNA 含量的增加(图 1)。

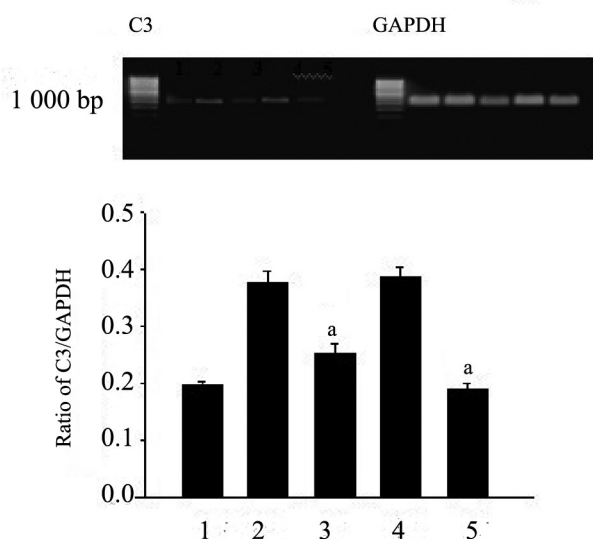


图 1 心肌补体 C3RNA 的表达情况

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,^a与 NaCl 组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

实验数据显示首先 C1INH 抑制炎症细胞在缺血心肌聚集,减少血浆 MPO、TNF- α 及 IL-2 的水平。其次,C1INH 抑制缺血心肌 C3RNA 的合成。补体的激活及炎症反应参与了缺血再灌注损伤,横向及纵向研究均表明补体 C3 是心血管疾病的重要危险因素。补体 C3 是参与炎症反应的重要成员^[2-3]。

在急性冠脉事件中,动脉粥样硬化、炎症反应、斑块破裂、血栓形成、心肌缺血坏死等,组成了瀑布式的病理生理过程。在这些过程中,补体、炎症因子、急性反应蛋白等之间会发生相互作用,加剧心肌损害。GUAN 等证实之前的流感病毒感染与急性心肌梗死间存在相关性,说明了炎症因子参与了粥样硬化的发展,是急性心肌梗死的触发因素^[4]。我们发现再灌注 3 h 及 72 h 后,心肌组织补体 C3 的合成均显著增加。

而且伴随着心肌 MPO 活性的增加,血浆 MPO 活性、TNF- α 及 IL-2 的水平亦增加。说明再灌注后,补体 C3 激活,免疫反应、炎症反应激活,而这些可能参与了心肌的缺血再灌注损伤。

众多研究证实通过缺血特异性的抑制剂抑制补体系统的激活,能够减少缺血再灌注后局部组织的损伤^[5]。补体 1 抑制剂是补体激活的主要调节因子。在局部缺血损伤中,补体 1 抑制剂能够显著降低 P 选择蛋白及细胞间粘附分子 RNA 的表达。另外,补体 1 抑制剂还显著降低一些炎症因子(如 TNF- α 、IL-8)的基因表达,增加一些保护作用因子(如 IL-10)的基因表达。这些均说明补体 1 抑制剂除了抑制补体激活外,还参与了炎症反应的调节,对缺血组织具有一定的保护作用。我们已经通过实验证实,补体 1 抑制剂能够改善缺血再管大鼠的心功能。而本次实验则证实补体 1 抑制剂,能够减少缺血心肌组织补体 C3RNA 的表达(即减少补体蛋白 C3 的合成)。同时应用补体 1 抑制剂后,缺血大鼠局部心肌 MPO 活性降低,血浆 MPO 活性、TNF- α 和 IL-2 水平均降低。

综上所述,在心肌的缺血再灌注中,补体 1 抑制剂可抑制补体关键蛋白 C3 的合成,调节缺血心肌炎症反应,从而保护缺血心肌。

参考文献

- [1] 付金容,林国生,武智晓.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[J].海南医学,2013,24(1):6-8.
- [2] Széplaki G, Varga L, Laki J, et al. Elevated complement C3 is associated with early restenosis after eversion carotid endarterectomy [J]. Thromb Haemost, 2006, 96: 529-534.
- [3] Hergenç G, Onat A, Sari I, et al. Cross-sectional study of complement C3 as a coronary risk factor among men and women [J]. Angiology, 2008, 59(1): 26-35.
- [4] Guan X, Yang W, Sun X, et al. Association of influenza virus infection and inflammatory cytokines with acute myocardial infarction [J]. Inflamm Res, 2012, 61(6): 591-598.
- [5] Anthony RM, Nimmerjahn F, Ashline DJ, et al. Recapitulation of IVIG anti-inflammatory activity with a recombinant IgG Fc [J]. Science, 2008, 320 (5874): 373-376.

(收稿日期:2013-04-20)