

doi:10.3969/j.issn.1003-6350.2015.01.0001

·论著·

S1P 信号通路在肥厚心肌缺血后适应中的作用

李海霞^{1,2}, 李晓梅², 陈邦党³, 刘芬³, 杨毅宁³, 盖敏涛³, 陈小翠³, 马依彤²

(1. 山东省中医药大学第二附属医院心内科, 山东 济南 250000;

2. 新疆医科大学第一附属医院心脏中心冠一科, 新疆 乌鲁木齐 830011;

3. 新疆医科大学第一临床医学院, 新疆 乌鲁木齐 830011)

【摘要】目的 探讨在缺血后适应(IPost)减轻肥厚心肌缺血再灌注(IR)损伤中S1P信号通路的作用。**方法** 选取12周龄C57/BL小鼠,利用Langendorff灌流装置建立小鼠肥厚心肌IR模型,30 min全心缺血随后再灌注90 min。64只小鼠随机分为缺血再灌注组(IR组)、缺血后适应组(IPost组)、IPost+W-146组和IPost+PD98059组,每组14只,进行心脏血流动力学和心肌梗死范围检测,Western印迹方法检测S1P1、ERK1/2总蛋白及磷酸化蛋白表达水平。脱氧核苷酸转移酶介导的生物素原位缺口末端标记(TUNEL)法检测心肌细胞的凋亡。**结果** 与IR组比较,IPost组小鼠心脏血流动力学指标左心室收缩压[(66±6) mmHg vs (85±5) mmHg]、左室压力上升最大速度[(2 820±220) mmHg vs (3 778±230) mmHg]显著降低($P<0.05$),心肌梗死范围显著减小[(23.6±2.8)% vs (40.2±4.6)%]。IPost+抑制剂组显示在再灌注的最初15 min使用W-146、PD98059能消除IPost对肥厚心肌的上述保护作用并显著增加心肌梗死面积,与IR组水平相同。与IR组比较,IPost组在再灌注结束后心肌组织中的S1P1、ERK1/2蛋白磷酸化水平表达显著增加;IPost+W-146组与IPost+PD98059组分别与IR组比较,上述指标差异均无统计学意义($P>0.05$);TUNEL法检测结果显示,IPost组Bcl-2的表达较其他各组明显升高,Bax的表达较其他各组明显降低,经比较各组之间Bcl-2和Bax的表达差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** IPost能有效地减轻离体小鼠肥厚心肌缺血再灌注损伤,IPost的心肌细胞保护作用可能是通过S1P结合S1P1后激活ERK1/2信号通路实现的。

【关键词】 S1P; S1P1; 肥厚心肌; 缺血再灌注; 缺血后适应

【中图分类号】 R-332 【文献标识码】 A 【文章编号】 1003—6350(2015)01—0001—04

Effects of ischemic postconditioning on hypertrophic myocardium by sphingosine-1-phosphate signal transduction pathways. LI Hai-xia^{1,2}, LI Xiao-mei², CHEN Bang-dang³, LIU Fen³, YANG Yi-ning³, GAI Min-tao², CHEN Xiao-cui³, MA Yi-tong². 1. Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang, CHINA; 2. Heart Center, the First Teaching Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang, CHINA; 3. The First Clinical Medical College of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang, CHINA

【Abstract】 Objective To investigate the effects of ischemic postconditioning (IPost) in protecting hypertrophic myocardium subjected to ischemic re-perfusion (IR) and to study the role of Sphingosine-1-phosphate in mediating such protection. **Methods** Transverse aortic constriction (TAC) operation was performed on 12-week-old C57/BL mice to establish left ventricular hypertrophy models. Sixty-four isolated TAC mouse hearts were mounted onto the Langendorff perfusion system and equally divided into four groups: IR group [undergoing stable perfusion for 30 min, ischemic for 30 min, and re-perfusion for 90 min (an IR cycle) to cause hypertrophic myocardium IR injury], IPost group [undergoing ischemic for 10 s and re-perfusion 10 s, totally 3 cycles (60 s) before re-perfusion for 90 min], IPost+W-146 group and IPost+PD98059 group. Hemodynamic examination was conducted 90 min after re-perfusion to measure the left ventricular systolic pressure (LVSP), left ventricular end diastolic pressure (LVEDP), maximal uprisng velocity of left ventricle pressure (dp/dtmax), and minimal uprisng velocity of left ventricle pressure (dp/dtmin). After the IR procedure the myocardium of the left ventricle was isolated to detect the infarction size (IS). Western blotting was used to detect the protein expression of S1P1, ERK1/2 and phosphorylated ERK1/2. TUNEL was used to detect the apoptosis rate. **Results** Compared with IR group, the LVSP levels of the IPost group were significantly higher [(66±6) mmHg vs (85±5) mmHg], the dp/dtmax were significantly decreased [(2 820±220) mmHg vs

基金项目:国家自然科学基金(编号:81060021);国家教育部高等学校博士学科专项科研基金(新教师基金,编号:20106517120001);新疆自治区高校科研计划科学研究重点项目(编号:XJEDU20-10129);新疆医科大学第一附属医院科研专项基金(编号:2010YGY007)
通讯作者:李晓梅。E-mail:lixm505@163.com

(3778 ± 230) mmHg], and the infarction size was significantly reduced [(23.6 ± 2.8)% vs (40.2 ± 4.6)%], all with $P<0.05$.

However, the results of the IPost+inhibitor groups (IPost+W-146 group and IPost+PD98059 group) showed that in the first 15 min of re-perfusion addition of W-146 and PD98059 reversed all changes observed in the IPost group and eliminated the IPost protection by increasing infarction size to a level similar to that in the IR group. Compared with the IR group, the protein levels of S1P1, phosphorylated ERK1/2 of the IPost group were all significantly higher. IPost+W-146 group and PD98059 group showed no statistically significant difference with the IR group in the above-mentioned parameters ($P>0.05$). Results of TUNEL assay test showed that the expression of IPost group's Bcl-2 was significantly higher than the other groups, and the expression of Bax was significantly lower than the other groups ($P<0.05$). **Conclusion** IPost has protective effect in hypertrophic myocardium with IR injury in vitro. The cardioprotective effects of IPost may involve in the regulation of ERK1/2 signal pathway through S1P signal transduction pathway.

[Key words] Sphingosine-1-phosphate; Sphingosine-1-phosphate receptor 1; Hypertrophic myocardium; Ischemic re-perfusion; Ischemic postconditioning

缺血后适应(Ischemic postconditioning, IPost)能够有效的减轻急性心肌梗死患者的再灌注损伤,是目前的研究热点,尤其是探讨S1P信号通路在IPost减轻肥厚心肌缺血再灌注(IR)损伤中的作用,一些学者纷纷着手该方面的研究,但均遇到一些瓶颈问题。1-磷酸鞘氨醇(Sphingosine-1-phosphate, S1P)是鞘磷脂(Sphingomyelin, SM)产生的中间代谢产物,是重要的信号分子,在心血管系统方面发挥着重要作用,越来越受到人们的重视^[1], S1P是否参与肥厚心肌缺血再灌注损伤的保护作用及其调节机制至今仍然不清楚^[2]。本研究采用小鼠离体肥厚心脏模型,探讨S1P在缺血后适应肥厚心肌中的作用,从而阐述明确IPost对肥厚心肌保护的作用机制,以便为临床研究及其应用提供依据。

1 资料与方法

1.1 实验动物、仪器与试剂 64只C57/BL小鼠(12周龄),雄性,体重22~25 g,由新疆医科大学实验动物中心提供。S1P1抑制剂W-146、ERK1/2抑制剂PD98059、氯化三苯四氮唑(Sigma,美国)。动物组织线粒体分离试剂盒(Genmed,美国)。生物素原位缺口末端标记(TUNEL)检测试剂盒(Roche,美国)。主要仪器是呼吸机(Harvard 687,美国)、BL-420生理实验记录系统(中国武汉生产)。

1.2 实验方法 参照李晓梅等^[3]的方法,对TAC手术后的4周小鼠给予麻醉,腹腔注射用量为1 000 U/kg的肝素,并从胸部正中切口,游离主动脉弓后快速分离心脏,用4℃的KH液^[3]冲洗心脏,并将其主动脉弓接到Langendorff灌流系统上。采用95%氧和5%二氧化碳气化的KH液,在灌注压80 mmHg($1 \text{ mmHg}=0.133 \text{ kPa}$)、灌流液温度37℃的条件下,以非循环方式灌注心脏。灌注30 min待心脏稳定以后,再经过30 min全心缺血和共计90 min继续灌

注。将心脏缺血30 min的小鼠随机分成4组,每组16只,分别为:(1)缺血再灌注组(IR组);(2)缺血后适应(IPost)组:恢复灌注前1 min,缺血10 s后继续灌注10 s,标定为1个周期,重复3次,总计60 s;(3)IPost+W-146组(S1P1抑制剂);(4)IPost+PD98059组(ERK1/2抑制剂)。在恢复再灌注的起始不进行IPost,分别给予W-146(浓度为 10^{-3} mmol/L)、PD98059(浓度为 10^{-5} mmol/L)的KH液持续灌注15 min后再恢复无PD98059及W-146的KH液灌注。各组IR结束后,进行心脏血流动力学、心肌梗死范围检测,Western印迹方法检测S1P1、ERK1/2总蛋白及磷酸化蛋白表达水平,脱氧核苷酸转移酶介导的生物素原位缺口末端标记(TUNEL)法检测心肌细胞的凋亡。

1.3 统计学方法 应用SPSS16.0统计学软件来处理相关数据,计量数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,计量资料间比较采用t检验,计数资料比较采用 χ^2 检验,多组数据比较采用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组离体小鼠心脏血流动力学结果比较 与IR组、IPost+W-146组与IPost+PD98059组相比较,IPost组小鼠心脏血流动力学指标左心室收缩压、左室压力上升最大速度显著降低($P<0.05$),见表1。

表1 各组小鼠心脏血流动力学指标($\bar{x}\pm s$, mmHg)

组别	左心室收缩压	左室压力上升最大速度
IR组	85 ± 5	3778 ± 230
IPost组	66 ± 6^a	2820 ± 220^a
IPost+W-146组	83 ± 4	3770 ± 225
IPost+PD98059组	84 ± 5	3669 ± 228

注:^a表示与其他三组比较,IPost组的左心室收缩压(mmHg)、左室压力上升最大速度(mmHg)明显降低($P<0.05$)。

2.2 心肌梗死范围的测定 IPost组较IR组心

梗面积明显缩小[($23.6 \pm 2.8\%$) vs ($40.2 \pm 4.6\%$)], 差异有统计学意义($P < 0.01$)。而 IR 组 [$(40.2 \pm 4.6)\%$]、IPost+W-146 组 [$(39.7 \pm 2.8)\%$]、IPost+PD98059 组 [$(42.4 \pm 3.6)\%$] 三组心肌梗死面积差异无统计学意义($P > 0.05$)。可知应用 W-146、PD98059 对缺血再灌注心肌梗死范围无影响, W-146、PD98059 能够消除 IPost 对心脏的保护作用。

2.3 ERK1/2 蛋白表达和磷酸化状态 对以上 4 组离体心脏经过 30 min 缺血、90 min 继续灌注以后, 各组蛋白表达差异没有统计学意义($P > 0.05$)。90 min

IPost 组的心肌 p-ERK1/2 表达较 IR 组明显上升 [(0.28 ± 0.02) vs (0.08 ± 0.03) , $P < 0.05$], IPost+W-146 组、IPost+PD98059 组的心肌 p-ERK1/2 表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。表明 ERK1/2 信号途径参与介导肥厚心肌缺血后适应保护, 见图 1。

2.4 S1P1 蛋白的表达 对以上 4 组离体心脏经过 30 min 缺血、90 min 继续灌注后, 检测心肌组织中 S1P1 蛋白表达差异。结果显示与 IR 组比较, IPost 组、IPost+W-146 组及 IPost+PD98059 组的心肌 S1P1 表达明显增加($P < 0.01$), 见图 2。

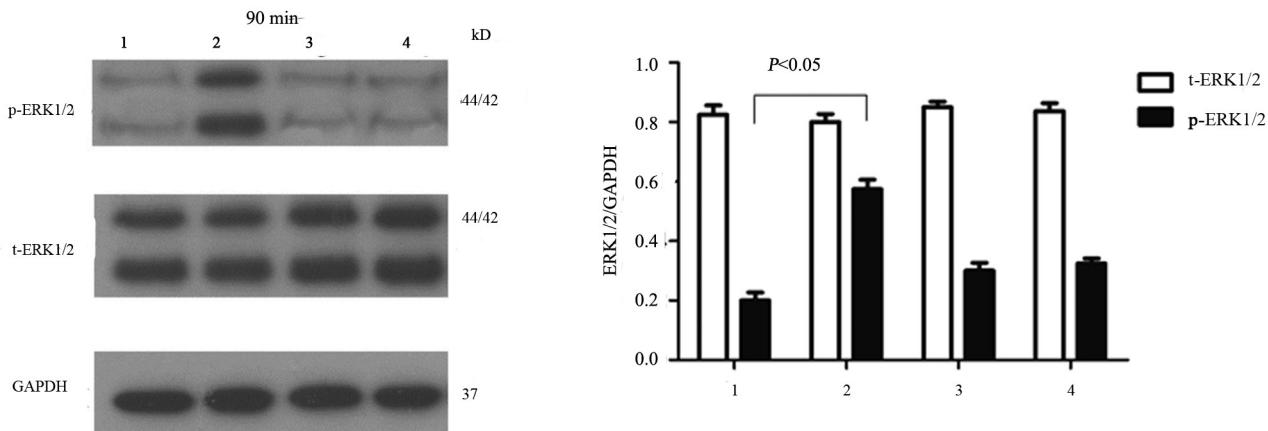


图 1 Western blot 检测各组 ERK1/2 及磷酸化 ERK1/2 的水平

注: p-ERK1/2, 磷酸化 ERK1/2; t-ERK1/2, 总细胞外信号调节酶。左边电泳图与右边直方图中, 1, IR 组; 2, IPost 组; 3, IPost+W-146 组; 4, IPost+PD98059 组, 下图编号均与此相同。

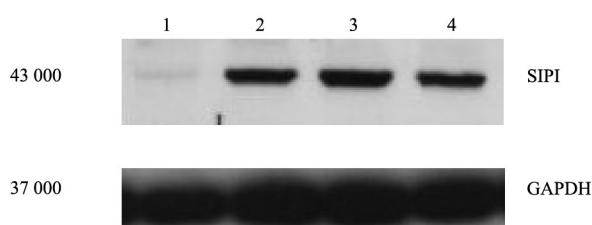


图 2 Western blot 检测各组小鼠离体肥厚心肌 S1P1 的水平

注: 1, I/R 组; 2, IPost 组; 3, IPost+W-146 组; 4, IPost+PD98059 组。

* $P < 0.01$ vs I/R 组, $n=4$ 。

2.5 TUNEL 法检测心肌细胞凋亡 IPost 组 Bcl-2 的表达较其他各组明显升高($P < 0.05$), Bax 的表达较其他各组明显降低($P < 0.05$)。IR 组、IPost+W-146 组、IPost+PD98059 组 Bcl-2 和 Bax 之间比较, 其 χ^2 值分别为 26.48、29.06、34.85; P 值分别为 0.061、0.051、0.056, 表明各组 Bcl-2 和 Bax 表达差异无统计学意义, 见图 3。

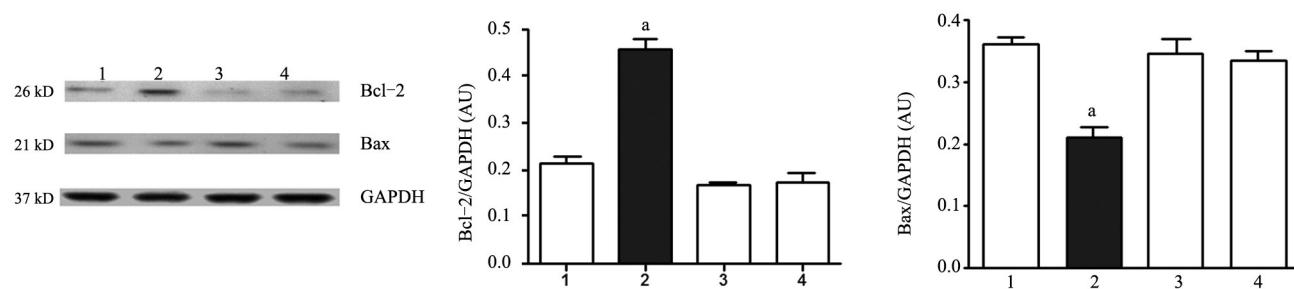


图 3 Western blot 检测各组凋亡蛋白 Bcl-2、Bax 的表达

注: 1, I/R 组; 2, IPost 组; 3, IPost+W-146 组; 4, IPost+PD98059 组。* $P < 0.01$ vs I/R 组, $n=4$ 。

3 讨 论

缺血再灌注损伤是现在研究的热点与难点课题,目前国内内外研究资料显示,脊髓、脑、心脏等器官在缺血发生后施行缺血后适应处理,能够减少再灌注损伤,对机体起到保护作用,具有较高的临床价值^[4]。根据张健发等^[5]研究发现,以小鼠为动物模型,在再灌注开始之前进行缺血后适应,与预适应一样也可以减轻再灌注损伤。应用到临床心肌梗死时,通过酶的释放监测指标可以显示心肌梗死程度面积减少,症状得到了减轻^[6]。IPost 的作用机制是:首先 IPost 能够抑制中性粒细胞的聚集从而提高内皮细胞功能;其次抑制氧化应激,还能降低线粒体中 Ca^{2+} 浓度,减少再灌注产生有害物质,从而减少对心肌细胞的损害;接着它能减轻心肌水肿,从而改善血管内皮的功能,然后减少心肌再灌注损伤^[7],达到保护心肌的作用。本研究发现,肥厚心肌 IPost 以后,心肌梗死的范围明显低于 IR 组,由此可知 IPost 在肥厚心肌缺血再灌注中起一定的保护作用。

本研究结果显示,IPost 组小鼠心脏血流动力学指标左心室收缩压、左室压力上升最大速度相比 IR 组显著降低($P<0.05$),其他三组差异无统计学意义。IPost 组较 IR 组、IPost+W-146 和 IPost+PD98059 能明显降低肥厚心肌的心梗面积、改善心功能并能减少心肌细胞的凋亡率,增加 Bcl-2 的表达,降低 Bax 的表达,并且 p-ERK、S1P1 的表达上明显升高,而加有 W-146、PD98059 的 IPost 组的心梗面积、心功能以及 Bcl-2、Bax、p-ERK1/2 和 S1P1 的表达较 IR 组差异无统计学意义,以上结果证明 IPost 对肥厚心肌缺血再灌注具有保护作用,并且此保护作用可能是通过 S1P 及 ERK1/2 信号通路实现的,这与国外的研究^[8]一致。另外,根据研究^[9]发现,S1P 还可通过以下三个方面来保护心脏:一是减少肌酐酶释放;二是改善血液循环力学;三是能够减少梗塞面积^[10]。这需要进一步去研究和证实。

综上所述,IPost 能有效地减轻离体小鼠肥厚心肌缺血再灌注损伤,其作用可能是通过 S1P 结合 S1P1 后激活 ERK1/2 信号通路实现的,为急性心肌梗死合并左室肥厚患者减轻心肌缺血再灌注损伤、改善预后提供了一个新的治疗思路,同时 S1P 受体及其信号传导通路的激动剂或阻断剂将成为一些疾病新的作用靶点,为预防和治疗疾病提供新的思路。

参 考 文 献

- [1] 葛静岩, 张文杰, 赵春燕, 等. 1-磷酸鞘氨醇对豚鼠心室肌细胞钙通道的作用[J]. 吉林大学学报医学版, 2008, 1(5): 52-54.
- [2] 胡为民, 杨 健, 唐恩洁. S1P1 真核表达载体的构建及在 HEK293 细胞膜上的表达[J]. 川北医学院学报, 2008, 23(1): 28-29.
- [3] 李晓梅, 杨毅宁, 马依彤, 等. 再灌注抢救激酶在肥厚心肌缺血后适应中的作用 [J]. 中华高血压杂志, 2011, 3(19): 263-268.
- [4] 李跃艳, 熊升林. 1-磷酸鞘氨醇受体途径诱导的心肌肥大及蛋白激酶 C 的调节作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2011, 7(3): 573-577.
- [5] 张健发, 马依彤, 杨毅宁, 等. 再灌注抢救激酶对小鼠缺血后适应心肌再灌注损伤中的减轻作用[J]. 中华心血管病杂志, 2008, 36 (2): 161-167.
- [6] Molkentin JD, Dorn II GW. Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy [J]. Annual Review of Physiology, 2001, 63(1): 391-426.
- [7] Sabri A, Hughie HH, Lucchesi PA. Regulation of hypertrophic and apoptotic signaling pathways by reactive oxygen species in cardiac myocytes [J]. Antioxidants and Redox Signaling, 2003, 5(6): 731-740.
- [8] Zhu M, Feng J, Lucchinetti E, et al. Ischemic postconditioning protects remodeled myocardium via the PI3K-PKB/Akt reperfusion injury salvage kinase pathway [J]. Cardiovasc Res, 2006, 72(1): 152-162.
- [9] Bujak M, Frangogiannis NG. The role of TGF- β signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling [J]. Cardiovasc Res, 2007, 74(2): 184-195.
- [10] Heineke J, Molkentin JD. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2006, 7(8): 589-600.

(收稿日期:2014-04-22)