

· 基础研究 ·

远端缺血后适应通过抑制 RAGE 的表达实现对心肌的保护作用

冯楚炎¹, 王向明¹, 屠甜甜¹, Deeraj Mungun¹, 许婷婷¹, 徐婉莹¹, 郭妍^{1,2*}¹南京医科大学第一附属医院老年心血管科, 江苏 南京 210029; ²江苏盛泽医院心血管科, 江苏 苏州 215228

[摘要] 目的:探讨晚期糖基化终末产物受体(receptor for advanced glycation end products, RAGE)在远端缺血后适应改善心肌缺血再灌注中的作用。方法:将34只8~9周龄C57BL/6J小鼠随机分为6组:假手术组(Sham组)、FPS-ZM1对照组(FZM1组)、缺血再灌注组(IR组)、FPS-ZM1干预组(FZM1+IR组)、远端缺血后适应组(RIPostC+IR组)和FZM1+远端缺血后适应干预组(FZM1+RIPostC+IR组)。通过结扎左冠状动脉,建立小鼠心肌缺血再灌注模型。采用小鼠心超仪检测小鼠左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)和左室缩短分数(left ventricular fractional shortening, LVFS),运用酶联免疫分析(ELISA)法和蛋白印迹法检测炎症因子白介素6(interleukin 6, IL-6)、核因子(nuclear factor, NF)- κ B P65蛋白、RAGE蛋白。结果:①与IR组相比, RIPostC能显著增加LVEF($P < 0.01$)和LVFS($P < 0.01$)。②与IR组相比, RIPostC能显著降低RAGE($P < 0.001$)的表达。③与IR组相比, RIPostC能显著减少NF- κ B P65($P < 0.001$)和IL-6($P < 0.001$)的表达。结论:RIPostC对心肌缺血再灌注损伤具有保护作用。该作用可能通过抑制RAGE的表达进而降低炎症反应而实现。

[关键词] 缺血再灌注;晚期糖基化终末产物受体;远端缺血后适应

[中图分类号] R541

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2019)04-500-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20190407

Remote ischemic postconditioning protects myocardium by inhibiting the expression of RAGE

Feng Chuyan¹, Wang Xiangming¹, Tu Tiantian¹, Deeraj Mungun¹, Xu Tintin¹, Xu Wanying¹, Guo Yan^{1,2*}¹Department of Geriatric Cardiology, the First Affiliated Hospital of NMU, Nanjing 210029; ²Department of Cardiology, Shengze Hospital of Jiangsu Province, Suzhou 215228, China

[Abstract] **Objective:** This study aimed to investigate the role of receptor for advanced glycation end products (RAGE) in improving myocardial ischemia and reperfusion after remote ischemic postconditioning. **Methods:** Thirty-four C57/B6 mice aged 8-9 weeks were randomly divided into six groups: the sham operation group (sham), the FPS-ZM1 control group (FZM1), the ischemia and reperfusion group (IR), the FPS-ZM1 intervention group (FZM1+IR), the RIPostC group (RIPostC+IR) and the RIPostC intervention group (RIPostC+FZM1+IR). The anterior descending coronary artery was ligated to create myocardial ischemia-reperfusion model of mouse. The left ventricular ejection fraction (LVEF) and left ventricular shortening fraction (LVFS) of mice were detected by mouse cardiac ultrasonography, and the inflammatory factor IL-6, NF- κ B P65 protein and RAGE protein were detected by enzyme-linked immunoassay (ELISA) and Western blotting. **Results:** ① RIPostC significantly increased LVEF ($P < 0.01$) and LVFS ($P < 0.01$) compared with the I/R group. ② Compared with the IR group, RIPostC significantly reduced the expression of RAGE ($P < 0.001$). ③ RIPostC significantly reduced the expression of NF- κ B P65 ($P < 0.001$) and IL-6 ($P < 0.001$) compared with the I/R group. **Conclusion:** RIPostC was effective in protecting against myocardial ischemia-reperfusion injury. The cardioprotective effects of RIPostC may be achieved directly by inhibiting the expression of RAGE and thereby reducing the inflammatory response.

[Key words] ischemic reperfusion; advanced glycation end-product receptor; remote ischemic postconditioning

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(04):500-504]

[基金项目] 江苏省干部保健科研课题(BJ18017)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: guoyan51@hotmail.com

缺血性心脏病(ischemic heart disease, IDH)是全球范围内导致心血管疾病发病率和死亡率增加的主要原因之一。尽早恢复冠状动脉血流量是治疗心肌梗死最有效的方法^[1]。可是, 心肌再灌注本身会加重缺血区心肌的损伤, 称为缺血再灌注(ischemia reperfusion, IR)损伤, 并且大量临床研究显示IR仍然是增加世界范围内心脏手术后发病率和死亡率的主要原因^[2]。至今尚缺乏令人满意的减少心肌缺血再灌注损伤及其改善心肌功能的方法。因此, 通过寻找相关靶点来减轻心肌缺血再灌注损伤的方法受到了广泛的关注。

心肌缺血预适应(ischemic preconditioning, IPC)在大量研究中被证实对IR具有保护性作用, 但由于临床上难以准确预测缺血时间, 其临床应用受到很大限制。近年来研究发现, 远端缺血后适应(remote ischemic postconditioning, RIPostC)在动物研究和随机临床试验中具有明显的有益效果。然而, 对于RIPostC的大部分研究仅仅停留在最终保护性的结论上, 它是通过何种信号通路来实现的则研究较少。近来越来越多的研究表明晚期糖基化终末产物受体(receptor for advanced glycation end products, RAGE)在介导心肌缺血再灌注损伤中发挥重要作用^[3]。本课题组在前期研究中发现RIPostC能够改善心肌缺血再灌注损伤; 另外, 在进一步探究中还发现RIPostC能够抑制再灌注早期心肌组织RAGE和HMGB1的表达^[4]。所以, 本研究通过RAGE的特异性阻断剂FPS-ZM1(简称FZM1)抑制RAGE的表达, 探究在心肌缺血再灌注中, 远端缺血后适应是否进一步通过抑制RAGE发挥作用。

1 材料和方法

1.1 材料

7~9周健康雄性C57BL/6J小鼠(扬州大学动物研究中心)34只, 体重20~25 g, 无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级, 小鼠呼吸机、小鼠心超仪(Vevo770 imaging system, 加拿大), FPS-ZM1(EMD Millipore公司, 美国), BCA蛋白定量试剂盒(上海碧云天公司), RAGE抗体(Cell Signaling公司, 美国), NF- κ B P65抗体(Proteintech公司, 美国), GAPDH抗体(Bioworld公司, 美国)、大鼠白细胞介素-6(IL-6)酶联免疫分析(南京福博斯生物科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠心肌缺血再灌注模型建立

小鼠腹腔内注射1%戊巴比妥, 通过小鼠气管导

管成功连接小鼠呼吸机(呼吸频率90~100次/min), 核心体温保持在37℃左右。在第3、4肋间开胸, 暴露出左心耳及左心室, 在左心耳下缘2 mm处用7-0的带线缝合针横穿于冠状动脉前降支并结扎(打一活结), 观察左心室前壁颜色由红色逐渐变白色并且室壁运动减弱表明结扎成功。小鼠持续麻醉及辅助呼吸下, 小鼠心肌缺血45 min之后打开活结实现缺血后的再灌注, 封胸。

1.2.2 实验分组与干预

①假手术组(Sham组): 连续腹腔注射1周生理盐水, 开胸, 但不结扎冠状动脉。②FPS-ZM1对照组(FZM1组): 连续1周腹腔注射1 mg/kg FPS-ZM1, 开胸, 但不结扎冠状动脉。③缺血再灌注组(IR组): 腹腔注射生理盐水1周, 结扎左冠状动脉45 min, 再灌注24 h。④FPS-ZM1干预组(FZM1+IR组): 连续1周腹腔注射1 mg/kg FPS-ZM1, 结扎左冠状动脉45 min, 再灌注24 h。⑤远端缺血后适应组(RIPostC+IR组): 连续1周腹腔注射生理盐水, 开胸结扎左冠状动脉45 min, 冠脉恢复血流时立即在小鼠左下肢用血管夹夹闭5 min, 之后松开5 min, 进行3个循环(总共约30 min), 再灌注24 h。⑥FPS-ZM1+远端缺血后适应干预组(FZM1+RIPostC+IR组): 连续1周腹腔注射1 mg/kg FPS-ZM1, 结扎左冠状动脉45 min, 再灌注一开始实施远端缺血后适应干预。

1.2.3 心脏功能测定

再灌注1周后, 小鼠给予1%戊巴比妥钠, 通过M型超声测定左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)、左室缩短分数(left ventricular fractional shortening, LVFS)。

1.2.4 心肌组织中蛋白的检测

再灌注24 h后取出心脏, 加入组织裂解液, 用BCA蛋白定量试剂盒测定总蛋白, 加入一定比例的蛋白上样缓冲液100℃煮5 min, 取30 μ g蛋白进行10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转移至PVDF膜上, 5%脱脂奶粉溶液封闭2 h, 洗膜3次, 加入一抗NF- κ B P65抗体(1:1 000)、RAGE抗体(1:1 000)4℃过夜, 洗膜3次, 每次10 min, 加入含有辣根过氧化物酶标记的二抗(1:10 000)4℃2 h, 洗膜, 最后ECL孵育, 曝光。

1.2.5 IL-6测定

再灌注24 h后, 腹腔内注射1%戊巴比妥钠, 摘眼球取血并于0.5 mL EP管内静置后, 3 000 r/min、4℃离心20 min, 谨慎吸取上层血清, 用ELISA检测

IL-6表达水平。

1.3 统计学方法

数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$),用SPSS20.0软件分析处理数据,组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),两两比较采用LSD-*t*检验。 $P \leq 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠血流动力学指标

与Sham组相比,IR组LVEF及LVFS均有显著降低($P < 0.05$);与IR组相比,IR+RIPostC组和IR+FZM1组LVEF及LVFS均有显著增加($P < 0.05$);而IR+FZM1+RIPostC组,分别与IR+RIPostC组及IR+FZM1组相比,LVEF和LVFS无显著差别($P > 0.05$,表1)。

表1 小鼠心功能测定

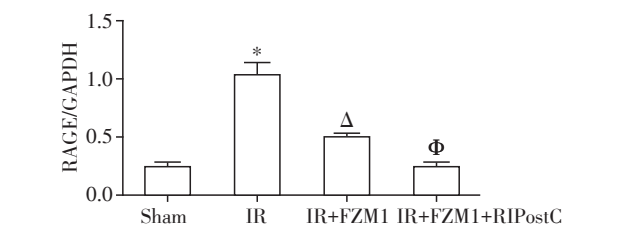
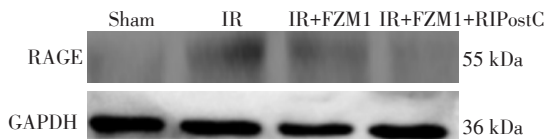
Table 1 Measurement of cardiac function in mice (% , $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | LVEF | LVFS |
|-----------------|---------------------------|---------------------------|
| Sham | 63.07 ± 1.07 | 33.49 ± 0.76 |
| FZM1 | 62.41 ± 1.13 | 33.07 ± 0.84 |
| IR | 48.23 ± 0.43* | 23.74 ± 0.17* |
| IR+FZM1 | 52.59 ± 0.61 ^Δ | 26.37 ± 0.17 ^Δ |
| IR+RIPostC | 50.84 ± 0.22 ^Δ | 25.48 ± 0.30 ^Δ |
| IR+FZM1+RIPostC | 52.55 ± 0.22 ^Δ | 25.97 ± 0.07 ^Δ |

与Sham组比较,* $P < 0.05$;与IR组相比较,^Δ $P < 0.05$ 。

2.2 各组小鼠心肌RAGE的表达

与Sham组相比,IR组RAGE表达显著增加($P < 0.05$);与IR组相比,IR+FZM1组RAGE表达明显降低($P < 0.05$);与IR+FZM1组相比,IR+FZM1+RIPostC组RAGE表达显著降低($P < 0.05$,图1)。



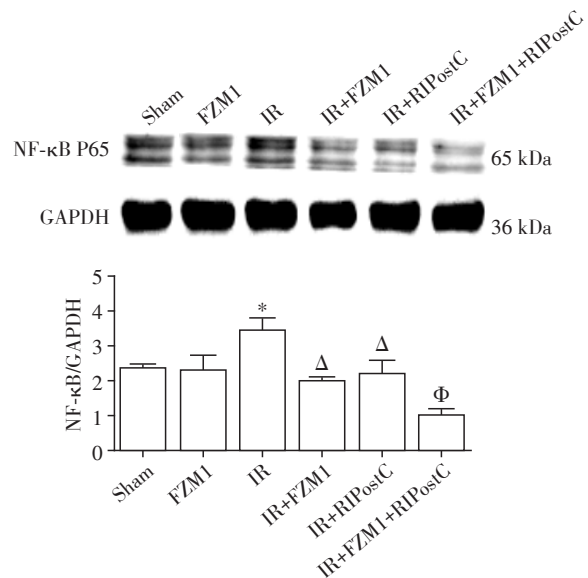
与Sham组比较,* $P < 0.05$;与IR组比较,^Δ $P < 0.05$;与IR+FZM1组比较,^Φ $P < 0.05$ 。

图1 小鼠心肌RAGE的表达

Figure 1 The expression of RAGE in mouse myocardium

2.3 各组小鼠NF-κB P65和IL-6的表达水平

与Sham组相比,IR组NF-κB P65表达显著增加($P < 0.05$);与IR组相比,IR+RIPostC和IR+FZM1组NF-κB P65表达显著降低($P < 0.05$);与IR+FZM1组相比,IR+FZM1+RIPostC组NF-κB P65表达显著降低($P < 0.05$,图2)。



与Sham组比较,* $P < 0.05$;与IR组比较,^Δ $P < 0.05$;与IR+FZM1组比较,^Φ $P < 0.05$ 。

图2 小鼠心肌NF-κB P65水平

Figure 2 The level of NF-κB P65 in mouse myocardium

与Sham组相比,IR组IL-6表达显著增加($P < 0.05$);与IR组相比,IR+RIPostC和IR+FZM1组IL-6表达明显降低($P < 0.05$);与IR+FZM1组相比,IR+FZM1+RIPostC组IL-6表达显著降低($P < 0.05$,表2)。

表2 小鼠血清IL-6水平

Table 2 The level of serum IL-6 in mouse (ng/L, $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | IL-6 |
|-----------------|---------------------------|
| Sham | 40.03 ± 2.24 |
| FZM1 | 37.59 ± 5.77 |
| IR | 59.23 ± 5.77* |
| IR+FZM1 | 29.28 ± 1.38 ^Δ |
| IR+RIPostC | 30.91 ± 1.56 ^Δ |
| IR+FZM1+RIPostC | 14.01 ± 1.83 ^Φ |

与Sham组比较,* $P < 0.05$;与IR组比较,^Δ $P < 0.05$;与IR+FZM1组比较,^Φ $P < 0.05$ 。

3 讨论

心肌缺血再灌注损伤是一种常见的病理生理过程,并且大量临床研究显示心肌缺血再灌注损伤

仍然是增加世界范围内心脏手术后发病率和死亡率的主要原因,至今尚缺乏令人满意的减少心肌缺血再灌注损伤及改善心肌功能的方法。因此,如何减轻缺血再灌注损伤已成为缺血性心脏病治疗的关注问题。

1986年Murry等^[5]在犬心肌缺血再灌注试验中发现预先给予反复短暂缺血可激发内源性心脏保护机制使心肌在随后的持续性缺血中得到保护,开创了“缺血预适应(ischemic preconditioning, IPC)”的先河,但临床上无法预知心肌缺血事件发生的确切时间,因此极大限制了其在临床上的应用。近年来在动物实验以及临床研究中均发现对远离心脏的脏器和组织短暂的缺血再灌注也可以产生相似的心脏保护作用,称为“远程缺血预处理(RIPC)”。RIPC可以在上肢/下肢上无创进行,使得它在临床上更加可行。在不同的动物研究和随机临床试验中,RIPC的保护性作用被大量证实。2005年,Kerendi等^[6]在大鼠实验中提出“远端缺血后适应”。近年来不断有研究证实RIPostC在急性心肌梗死和脑梗死中,具有良好的心肌保护和脑保护作用^[7]。然而,我们对于RIPostC的基本机制知之甚少,且机制相当复杂,目前主要集中于NF- κ B信号转导的分子机制、线粒体ATP敏感性钾通道和蛋白激酶C等^[8]。Mewton等^[9]的报道中指出,RIPostC可以阻止心肌细胞凋亡、坏死,减少心肌梗死面积,减少中性粒细胞激活,从而促进心脏收缩功能的早期恢复。在本研究中,在小鼠心脏缺血再灌注处理的同时给予RIPostC处理后,LVEF及LVFE均有明显提高($P < 0.05$),说明RIPostC可以改善小鼠心功能,对小鼠心肌起到保护性作用。

近来越来越多的研究发现晚期糖基化终末产物受体(RAGE)在介导心肌缺血再灌注损伤中发挥重要作用^[3]。RAGE属于细胞表面分子免疫球蛋白超家族中的一个成员,分子量为45 kDa,可与多种配体结合并影响细胞内信号转导刺激细胞因子释放等进而发挥其生物学效应,与心肌缺血再灌注损伤、炎症等有着密切的关联。研究证实HMGB1与RAGE相互作用,能够促进NF- κ B激活,放大在心肌缺血再灌注损伤中的炎症反应^[10]。Wu等^[11]研究发现,在慢性间歇缺氧(chronic intermittent hypoxia, CIH)动物模型中,腹腔注射sRAGE能在一定程度上降低由CIH引起的RAGE的释放量,从而降低NF- κ B、IL-6等炎性物质的表达。另外,Aleshin等^[12]研究发现,阻断左冠状动脉前降支30 min后再恢复灌

注RAGE的表达是上升的。在缺血再灌注损伤中,上调RAGE则导致心肌细胞死亡,而通过敲降RAGE或sRAGE调低RAGE的表达,则减少氧化应激、炎症反应和细胞凋亡等,保护心肌细胞和组织^[13]。我们在前期实验中也注意到,与假手术组相比,缺血再灌注组中的RGAE和HMGB1的蛋白水平显著升高,提示RAGE参与了缺血再灌注损伤。以上都说明在缺血再灌注损伤中RAGE作为重要的靶点并且发挥了重要作用。在本次实验中,通过FZM1抑制RAGE的表达发现,相较于IR+FZM1组,IR+FZM1+IPOC组RAGE表达进一步降低($P < 0.05$),提示RIPostC可能直接通过下调RAGE而发挥保护性作用。

炎症反应是心肌缺血再灌注损伤的重要机制之一^[14]。Chandrasekar等^[15]在大鼠心肌缺血再灌注损伤中发现,再灌注早期可激活NF- κ B信号通路,进一步导致促炎细胞因子IL-6等的释放^[16]。此外,在心肌缺血再灌注过程中释放的促炎因子促发的炎症反应可明显降低心肌收缩功能^[17]。进一步研究还发现,炎性因子对于心肌功能的影响可通过损伤线粒体而实现^[18]。在本研究中,相较于IR组,予以FZM1处理后,RAGE表达明显减少($P < 0.05$),炎性蛋白NF- κ B P65和炎性因子IL-6明显降低($P < 0.05$),提示通过降低RAGE水平,抑制炎症反应,从而起到对心脏保护性的作用。

在心肌缺血再灌注损伤过程中,RIPostC对RAGE的影响研究甚少。在我们前期实验中发现^[4],与假手术组相比,缺血再灌注组中的RGAE和HMGB1的蛋白水平显著升高,而RIPostC能够降低RGAE和HMGB1的表达,提示RIPostC与RGAE密切相关。所以,在本次实验中的结果是,相较于IR+FZM1组,IR+FZM1+IPOC组不仅显著地使RAGE表达降低($P < 0.05$),而且使炎性蛋白NF- κ B P65和炎性因子IL-6($P < 0.001$)明显减少($P < 0.05$),改善心脏LVEF和LVFS($P < 0.05$)。提示在心肌缺血再灌注中,RIPostC可能直接通过降低RAGE的表达进而抑制炎症反应而发挥保护作用。

综上所述,在此次研究中发现,RIPostC对心肌缺血再灌注损伤具有保护作用。RIPostC的心肌保护作用可能直接通过抑制RAGE的表达进而降低炎症反应而实现。

[参考文献]

- [1] Wang Y, Jin L, Song Y, et al. beta-arrestin 2 mediates cardiac ischemia-reperfusion injury via inhibiting GPCR-independent cell survival signaling [J]. *Cardiovasc Res*,

2017, 113(13): 1615–1626

[2] Niemann B, Schwarzer M, Rohrbach S. Heart and mitochondria: pathophysiology and implications for cardiac surgeons [J]. *Thorac Cardiovasc Surg*, 2018, 66(1): 11–19

[3] Suchal K, Bhatia J, Malik S, et al. Seabuckthorn pulp oil protects against myocardial ischemia-reperfusion injury in rats through activation of Akt/eNOS [J]. *Front Pharmacol*, 2016, 7: 155

[4] Wang X, Wang J, Tu T, et al. Remote ischemic postconditioning protects against myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibition of the RAGE-HMGB1 pathway [J]. *Biomed Res Int*, 2018, 2018: 4565630

[5] Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium [J]. *Circulation*, 1986, 74(5): 1124–1136

[6] Kerendi F, Kin H, Halkos ME, et al. Remote postconditioning. Brief renal ischemia and reperfusion applied before coronary artery reperfusion reduces myocardial infarct size via endogenous activation of adenosine receptors [J]. *Basic Res Cardiol*, 2005, 100(5): 404–412

[7] Aimo A, Borrelli C, Giannoni A, et al. Cardioprotection by remote ischemic conditioning: Mechanisms and clinical evidences [J]. *World J Cardiol*, 2015, 7(10): 621–632

[8] Boengler K, Lochner G, Schulz R. Mitochondria “THE” target of myocardial conditioning [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2018, 315(5): H1215–H1231

[9] Mewton N, Ivanov F, Cour M, et al. Postconditioning: from experimental proof to clinical concept [J]. *Dis Model Mech*, 2010, 3(1–2): 39–44

[10] Nogueira-Machado JA, de Oliveira Volpe CM. HMGB-1 as a target for inflammation controlling [J]. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov*, 2012, 6(3): 201–209

[11] Wu X, Gu W, Lu H, et al. Soluble receptor for advanced glycation end product ameliorates chronic intermittent Hypoxia induced renal injury, inflammation, and apoptosis via P38/JNK signaling pathways [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016: 1015390

[12] Aleshin A, Ananthakrishnan R, Li Q, et al. RAGE modulates myocardial injury consequent to LAD infarction via impact on JNK and STAT signaling in a murine model [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008, 294(4): H1823–H1832

[13] Shang L, Ananthakrishnan R, Li Q, et al. RAGE modulates hypoxia/reoxygenation injury in adult murine cardiomyocytes via JNK and GSK-3beta signaling pathways [J]. *PLoS One*, 2010, 5(4): e10092

[14] Steffens S, Montecucco F, Mach F. The inflammatory response as a target to reduce myocardial ischaemia and reperfusion injury [J]. *Thromb Haemost*, 2009, 102(2): 240–247

[15] Chandrasekar B, Freeman GL. Induction of nuclear factor kappaB and activation protein 1 in postischemic myocardium [J]. *FEBS Lett*, 1997, 401(1): 30–34

[16] Li C, Gao Y, Tian J, et al. Sophocarpine administration preserves myocardial function from ischemia-reperfusion in rats via NF-kappaB inactivation [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 135(3): 620–625

[17] Cain BS, Meldrum DR, Dinarello CA, et al. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta synergistically depress human myocardial function [J]. *Crit Care Med*, 1999, 27(7): 1309–1318

[18] Kimura H, Shintani-Ishida K, Nakajima M, et al. Ischemic preconditioning or p38 MAP kinase inhibition attenuates myocardial TNF alpha production and mitochondria damage in brief myocardial ischemia [J]. *Life Sci*, 2006, 78(17): 1901–1910

[收稿日期] 2018–10–17

