

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2022.18.002
文章编号: 1005-8982 (2022) 18-0006-07

中枢神经系统损伤专题·论著

CTRP9对远端缺血预处理心肌梗死模型大鼠心肌缺血再灌注致脑损伤的保护作用及其机制研究*

谢骏, 高凤敏, 符北京

(牡丹江医学院附属红旗医院 心内科, 黑龙江 牡丹江 157011)

摘要: **目的** 探讨CTRP9对远端缺血预处理心肌梗死模型大鼠心肌缺血再灌注致脑损伤的保护作用。**方法** 选取40只雄性SD大鼠, 随机分为4组: 假手术组(NS组)、心肌缺血再灌注组(NIR组)、缺血预处理组(NIPost组)及缺血预处理+CTRP9抑制剂组(NIPostI组), 每组10只。采用苏木精-伊红染色观察大鼠脑组织病理学变化, 免疫组织化学法检测大鼠脑组织凋亡因子、炎症因子的表达, TUNEL法检测大鼠脑组织细胞凋亡, Western blotting检测大鼠心肌组织p-AMPK/t-AMPK、LC3 I/II及P62蛋白的表达。**结果** ①HE染色结果显示, NS组皮层的神经元胞浆十分丰富, 核呈圆形, 碱染后呈蓝色, 分布均匀且排列整齐; NIR组神经元结构受损, 分布不均匀, 胞浆出现空泡, 胞核固缩, 碱染后出现了淡红色; NIPost组细胞结构大多恢复正常, 大部分神经包膜完整, 胞核清晰可见; NIPostI组经CTRP9抑制剂干预后, 预处理的保护效应消失。②NIR组、NIPost组及NIPostI组脑组织Bax、IL-6、IL-8表达水平高于NS组($P < 0.05$), Bcl-2、IL-10表达水平低于NS组($P < 0.05$); NIPost组较NIR组Bax、IL-6、IL-8表达水平降低($P < 0.05$), Bcl-2、IL-10表达水平升高($P < 0.05$); NIPostI组较NIPost组Bax、IL-6、IL-8表达水平升高($P < 0.05$), Bcl-2、IL-10表达水平降低($P < 0.05$)。③NIR组、NIPost组和NIPostI组脑组织凋亡细胞多于NS组($P < 0.05$); NIPost组和NIPostI组较NIR组凋亡细胞减少($P < 0.05$)。NIPost组和NIPostI组比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。④NIR组、NIPost组及NIPostI组心肌组织p-AMPK/t-AMPK蛋白相对表达量低于NS组($P < 0.05$), LC3 I/II和P62蛋白相对表达量高于NS组($P < 0.05$); NIPost组较NIR组p-AMPK/t-AMPK蛋白相对表达量升高($P < 0.05$), LC3 I/II和P62蛋白相对表达量降低($P < 0.05$); NIPostI组较NIPost组p-AMPK/t-AMPK蛋白相对表达量降低($P < 0.05$), LC3 I/II和P62蛋白相对表达量升高($P < 0.05$)。**结论** 远端缺血预处理可缓解大鼠心肌缺血再灌注所致脑损伤。CTRP9可通过激活AMPK信号通路, 参与远端缺血预处理对心肌缺血再灌注所致脑损伤的保护过程。CTRP9水平升高有益于防治心肌梗死。

关键词: 心肌缺血再灌注; 心肌梗死; 远端缺血预处理; CTRP9; AMPK途径; 保护作用; 大鼠
中图分类号: R614 **文献标识码:** A

The protective effects and mechanisms of CTRP9 on cerebral injury induced by myocardial ischemia-reperfusion in rat models of myocardial infarction treated with remote ischemic postconditioning*

Jun Xie, Feng-min Gao, Bei-jing Fu

(Department of Cardiology, Hongqi Hospital Affiliated to Mudanjiang Medical College,
Mudanjiang, Heilongjiang 157011, China)

收稿日期: 2022-01-04

* 基金项目: 黑龙江省自然科学基金(No: LH2019H120)

[通信作者] 高凤敏, E-mail: gaofengmin2022@163.com; Tel: 13644537308

Abstract: Objective To explore whether C1q/tumor necrosis factor-related protein 9 (CTRP9) is involved in protecting the cerebral injury induced by myocardial ischemia-reperfusion via regulating the adenosine 5'-monophosphate activated protein kinase (AMPK) pathway in rat models of myocardial infarction treated with remote ischemic postconditioning. **Methods** Forty male SD rats were selected and randomly divided into 4 groups, including sham operation group (NS group), myocardial ischemia-reperfusion group (NIR group), ischemic postconditioning group (NIPost group) and ischemic postconditioning + CTRP9 inhibitor group (NIPostI group), with 10 rats in each group. The histopathological changes of brain tissues were observed by HE staining. The expression levels of apoptosis and inflammatory factors were detected by immunohistochemistry. The apoptosis was measured by TUNEL method, and the protein expressions of p-AMPK/t-AMPK, LC3 I/II and P62 were measured by Western blotting. **Results** The histopathological examination showed that cortical neurons in NS group had abundant cytoplasm and round nuclei, which were stained blue by hematoxylin, distributed evenly and arranged neatly. In the NIR group, the structures of neurons were damaged, and the neurons were distributed unevenly, with cytoplasmic vacuolation and nuclear pyknosis, which were stained reddish by hematoxylin. In the NIPost group, the cell structures were basically restored to normal, and most of the neurons had intact membranes while the nuclei were clearly observed. In the NIPostI group, the protective effects of the postconditioning were counteracted by the intervention with CTRP9 inhibitor. The expression levels of Bax, IL-6, and IL-8 in the brain tissues in NIR group, NIPost group and NIPostI group were higher than those in NS group ($P < 0.05$), while the expression levels of Bcl-2 and IL-10 were lower than those in NS group ($P < 0.05$). Compared with NIR group, the expression levels of Bax, IL-6 and IL-8 in NIPost group were decreased ($P < 0.05$), while the expression levels of Bcl-2 and IL-10 were increased ($P < 0.05$). The expression levels of Bax, IL-6, and IL-8 in NIPostI group were higher than those in NIPost group ($P < 0.05$), and the expression levels of Bcl-2 and IL-10 in NIPostI group were lower than those in NIPost group ($P < 0.05$). Compared with NS group, the numbers of apoptotic cells in NIR group, NIPost group and NIPostI group were increased ($P < 0.05$). Compared with NIR group, the numbers of apoptotic cells in NIPost group and NIPostI group were decreased ($P < 0.05$). There was no difference in the number of apoptotic cells between NIPost group and NIPostI group ($P > 0.05$). Compared with NS group, the protein expressions of p-AMPK and t-AMPK in NIR group, NIPost group and NIPostI group were decreased ($P < 0.05$), while the protein expressions of LC3 I/II and P62 in these groups were increased ($P < 0.05$). The protein expressions of p-AMPK and t-AMPK in NIPost group were higher than those in NIR group ($P < 0.05$), while the protein expressions of LC3 I/II and P62 in NIPost group were lower than those in NIR group ($P < 0.05$). Compared with NIPost group, the protein expressions of p-AMPK and t-AMPK in NIPostI group were lower ($P < 0.05$), but the protein expressions of LC3 I/II and P62 in NIPostI group were higher ($P < 0.05$). **Conclusions** The remote ischemic postconditioning can alleviate the brain injury caused by myocardial ischemia-reperfusion in rats, where CTRP9 may participate in the process by activating the AMPK signaling pathway. Therefore, increasing the level of CTRP9 is beneficial to the prevention and treatment of myocardial infarction.

Keywords: myocardial ischemia-reperfusion; myocardial infarction; remote ischemic postconditioning; CTRP9; AMPK pathway; protective effect; rat

缺血性心肌病居世界致死原因的首位,具有高发发病率和病死率等特点,而缺血再灌注与其病死率居高不下密切相关^[1-2]。缺血再灌注损伤主要指血流灌注逐渐恢复后,组织结构受损或功能丧失进一步加重的现象^[3-4]。缺血再灌注后造成的损伤较先前更为严重,且持续时间更长,可直接影响患者的重要脏器,致其结构和功能受损。尽早、尽快恢复冠状动脉的血流灌注是治疗心肌梗死,提高患者存活率的关键。MURRY 等^[5]提出,心肌缺血预处理可对心肌起到保护作用。有研究证实,吸入麻醉药预

处理和后处理可有效减轻心肌缺血再灌注损伤。近年来有研究显示,AMPK 在调节人体氧化应激和细胞凋亡、增殖等过程中发挥了较大作用^[6]。激活后的 AMPK 可通过多种途径促进 ATP 的生成和脂肪酸的氧化。现有临床证据显示,激活状态的 AMPK 可对心肌细胞起到保护作用^[7-8]。CTRP9 是一种新发现的脂肪组织源性细胞因子,参与吞噬细胞清除凋亡细胞、调控机体炎症反应及免疫耐受等生理过程^[9]。

目前关于 CTRP9 调控 AMPK 途径参与远端缺血

预处理对心肌梗死模型心肌缺血再灌注致脑损伤的保护作用的报道较少。因此本研究通过复制缺血再灌注模型大鼠,分别给予后处理和CTRP9抑制剂干预来明确CTRP9通过调控AMPK途径发挥心肌保护作用的机制,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 雄性SD大鼠40只,SPF级,体重220~250 g,购自辽宁长生生物技术股份有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(辽)2020-0001,实验动物使用许可证号:SYXK(黑)2021-0002。

1.1.2 主要试剂 戊巴比妥钠、苏木精、CTRP9抑制剂LiCl(美国Sigma公司),TUNRL试剂盒(美国罗氏公司),p-AMPK(1:1 000,批号:2535,美国Cell Signaling公司)、一抗LC3(1:1 000,批号:136F3,美国Santa Cruz公司)、一抗P62(1:1 000,批号:8G10,美国Santa Cruz公司)、内参GAPDH(1:1 000,批号:AG019,上海碧云天生物技术有限公司),苦味酸、伊红Y、二甲苯、石蜡、中性树胶(北京中国国药集团),枸橼酸、枸橼酸钠(北京华科盛精细化工产品贸易公司),链霉菌抗生素蛋白-过氧化物酶、SABC试剂盒、DAB显色试剂盒、白细胞介素-6(Interleukin-6, IL-6)多克隆抗体、IL-8多克隆抗体、IL-10多克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司),Bal-2多克隆抗体、Bax多克隆抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.1.3 主要仪器 高精度电子天平、pH计(PB10)(德国Sartorius公司),移液器、离心机(德国Eppendorf公司),切片机(德国Leica公司),PVDF膜(美国Millipore公司),荧光显微镜(德国Axiophot公司),全自动生化分析仪(美国Beckman公司),Image-Pro6.0计算机图像分析软件(美国Media Cybernetics公司),凝胶成像系统、电泳槽(美国Bio-Rad公司),普通光学显微镜、BX50显微摄影系统(日本Olympus公司),V30扫描仪(日本Epson公司),-70℃深低温冰箱(日本SANYO公司),Bene View T5型监护仪(中国西安巨田医疗设备有限公司),动物呼吸机(上海嘉鹏科技有限公司),微型漩涡混合仪(上海沪西分析仪器有限公司),TGL-16G型高速台式离心机(上海医用电子仪器厂)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型复制及分组 所有大鼠插管开胸后,复制心肌缺血再灌注模型前,置于手术台约10 min,期间不做任何处理,便于大鼠适应呼吸机、开胸操作的损伤及胸腔压力的改变。实验期间对动物的处理均严格按照相关伦理学规定进行。将大鼠按随机数字表法分为4组,每组10只:①假手术组(NS组):大鼠在左心耳下缘位置心肌组织穿线,但对冠状动脉左前降支不做结扎。②缺血再灌注组(NIR组):大鼠在左心耳下缘位置穿线结扎冠状动脉左前降支,进行缺血再灌注处理,缺血时长30 min,松开结扎线后继续灌注2 h。③缺血预处理组(NIPost组):大鼠在左心耳下缘位置穿线结扎冠状动脉左前降支,缺血时长30 min,松开结扎线后再行3次处理(将结扎线放松再灌注10 s,拉紧结扎线缺血10 s,循环3个周期,最后松开结扎线行2 h再灌注)。④缺血预处理+CTRP9抑制剂组(NIPostI组),术前10 min灌注0.3 mmol/kg 0.5% LiCl抑制剂,余下后处理操作方法与NIPost组一致。

1.2.2 标本采集 再灌注120 min后迅速取脑,4℃、PBS溶液清洗,去除残余血液,取适量脑组织置于-80℃冰箱备用。用10%甲醛溶液固定剩余脑组织,用于制作组织切片。

1.2.3 苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色观察大鼠脑组织病理学变化 取适量脑组织,梯度乙醇脱水处理,透明剂(二甲苯)处理后包埋至蜡块中,冷冻后切成约4 μm厚切片。组织脱蜡、水化后,苏木精染色5~8 min,70%乙醇1 min,2%碳酸氢钠返蓝5~10 s,二甲苯透明处理2 min,最后以中性树胶封片。封片后置于光镜下观察脑组织病理学变化。

1.2.4 免疫组织化学染色检测大鼠脑组织凋亡因子、炎症因子 取1.2.3中组织切片置于40℃水浴锅中摊片,60℃烤箱烤片3 h后脱蜡处理。采用微波对脱蜡水化的组织切片进行抗原修复,滴加3%过氧化氢溶液,以阻断内源性过氧化物酶的影响。使用免疫组织化学笔在组织周围画圈,滴加合适浓度的山羊血清予以封闭。依次加一抗、酶标二抗、显色剂,苏木精复染后脱水、风干后切片,以中性树胶进行封片,并于显微镜下观察切片并拍照。结果判定标准:相同光强度下,400倍显微镜下各个切片随机挑选5个互不重叠的视野,细胞内有棕黄色颗粒即为阳性。

1.2.5 TUNEL 法检测大鼠脑组织细胞凋亡 取 1.2.3 中组织切片贴附在多聚赖氨酸预处理后的载玻片上, 确保切片的平整且不重叠。将切片置于 62℃ 温箱中烤片 12 h, 组织切片脱蜡、水化, 二甲苯溶液冲洗玻片 2 次, 3 min/次; 无水乙醇冲洗玻片 2 次, 3 min/次; 95% 和 75% 乙醇溶液分别清洗 1 次, 3 min/次; 蒸馏水清洗 2 次, 5 min/次; PBS 洗 2 次, 5 min/次; 37℃ 条件下 20 μg/mL 蛋白酶 K 溶液消化 15 min, 去除组织蛋白; 蒸馏水冲洗 4 次, 2 min/次。将含 2% 过氧化氢的 PBS 溶液加入色缸中, 室温条件下反应 5 min, PBS 冲洗 2 次, 5 min/次, 使用滤纸将组织周围水分吸干后, 即刻在切片上滴加约 50 μL TUNEL 反应液, 置于 37℃ 湿盒中孵育 1 h。PBS 液冲洗 3 次, 3 min/次, 将切片周围水分甩干后, 滴加 50 μL 辣根过氧化酶抗体至切片上, 置于 37℃ 温箱中孵育 30 min。苏木精复染, PBS 液冲洗 3 次, 3 min/次, 甩干水分, 将 2 滴 DAB 溶液滴加在各组织切片上, 室温条件下显色 3~6 min。PBS 液冲洗 3 次, 3 min/次, 二甲苯脱水, 以中性树胶封片、干燥。结果判定标准: 细胞核呈棕色为细胞凋亡阳性; 细胞核染蓝色为未发生凋亡。在 400 倍显微镜下, 通过双盲法对每个视野中的阳性细胞进行计数。

1.2.6 Western blotting 检测大鼠心肌组织 p-AMPK/t-AMPK、LC3 I/II 及 P62 蛋白的表达 将大鼠左心室心尖部组织约 300 mg 剪碎后置于匀浆机, 依次加入裂解液、蛋白酶及磷酸酶抑制剂, 低温条件下, 在超声细胞破碎仪中进行 3 次裂解, 裂解后静置 30 min, 移入 EP 管进行离心, 将上清液分装至 1.5 mL 离心管中, 保存于低温冰箱。上述所有操作需在冰面进行, 用 BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度, 并将其稀释至相同浓度。将缓冲液倒入样品中并完全混匀, 95℃ 煮 5 min, 待蛋白质全部变性后转移至低温冰箱。采用 BCA 试剂盒检测蛋白样品含量, 并通过裂解液将其调至相同浓度, 在 97℃ 金属浴条件下持续加热 5 min。每个样品提取 20 μg 蛋白置于 12% 聚丙烯酰胺凝胶中电泳, 分离蛋白。电泳结束后, 切取目的条带, 并将其转移至 PVDF 膜上。5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 分别加入一抗 p-AMPK、一抗 LC3、一抗 P62、内参 GAPDH, 4℃ 一抗孵育过夜。TBST 溶液漂洗 3 次后加入二抗摇床, 孵育 120 min。采用 ECL 试剂盒进行显色, 然后进行增强化学发光反应, 将工作液滴加在 PVDF 膜上, 反应 5 min 左右

待出现明显的荧光带, 用滤纸吸去剩下的底物液, 盖上保鲜膜, X 射线胶片压片后分别放入显影液、定影液, 放置适宜时间后冲洗胶片。将胶片晾干, 扫描, 使用 Image 软件测定条带灰度值, 以目的条带灰度值与 GAPDH 灰度值比值表示蛋白相对表达量。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 20.0 统计软件。计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用单因素方差分析, 进一步两两比较用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠脑组织病理学变化

HE 染色结果显示, NS 组皮层神经元胞浆丰富, 核圆, 碱染后呈蓝色, 分布均匀且排列整齐; NIR 组神经元结构受损, 分布不均匀, 胞浆空泡化, 胞核固缩, 碱染后呈淡红色; NIPost 组细胞结构基本恢复正常, 大部分神经元包膜完整, 胞核清晰可见; NIPostI 组经 CTRP9 抑制剂 LiCl 干预后, 后处理的保护效应消失。见图 1。

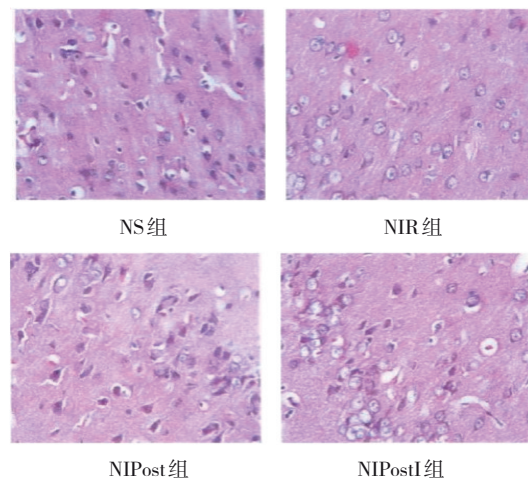


图 1 各组大鼠脑组织病理切片 (HE 染色 × 400)

2.2 各组大鼠脑组织凋亡因子表达水平比较

NS 组、NIR 组、NIPost 组、NIPostI 组 Bax 和 Bcl-2 表达水平比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 2.368$ 和 2.135 , $P = 0.003$ 和 0.005)。进一步两两比较结果: NIR 组、NIPost 组及 NIPostI 组 Bax 表达水平高于 NS 组 ($P < 0.05$), Bcl-2 表达水平低于 NS 组 ($P < 0.05$); NIPost 组较 NIR 组 Bax 表达水平降低 ($P < 0.05$), Bcl-2 表达水平升高 ($P < 0.05$); NIPostI 组较

NIPost 组 Bax 表达水平升高 ($P < 0.05$), Bcl-2 表达水平降低 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠脑组织 Bax 和 Bcl-2 表达水平比较

($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	Bax	Bcl-2
NS 组	4.91 ± 0.44	14.48 ± 0.63
NIR 组	12.51 ± 0.73 ^①	5.45 ± 0.51 ^①
NIPost 组	7.55 ± 0.46 ^{①②}	11.96 ± 0.62 ^{①②}
NIPostI 组	11.33 ± 0.75 ^{①②③}	6.34 ± 0.76 ^{①②③}
F 值	2.368	2.135
P 值	0.003	0.005

注：①与 NS 组比较, $P < 0.05$; ②与 NIR 组比较, $P < 0.05$; ③与 NIPost 组比较, $P < 0.05$ 。

2.3 各组大鼠脑组织炎症因子表达水平比较

NS 组、NIR 组、NIPost 组、NIPostI 组 IL-6、IL-8 和 IL-10 表达水平比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 2.123, 2.671$ 和 $2.935, P = 0.011, 0.002$ 和 0.001)。进一步两两比较结果: NIR 组、NIPost 组及 NIPostI 组 IL-6、IL-8 表达水平高于 NS 组 ($P < 0.05$), IL-10 表达水平低于 NS 组 ($P < 0.05$); NIPost 组较 NIR 组 IL-6、IL-8 表达水平降低 ($P < 0.05$), IL-10 表达水平升高 ($P < 0.05$); NIPostI 组较 NIPost 组 IL-6、IL-8 表达水平升高 ($P < 0.05$), IL-10 表达水平降低 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 各组大鼠脑组织 IL-6、IL-8 及 IL-10 表达水平比较

($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	IL-6	IL-8	IL-10
NS 组	5.41 ± 0.43	6.16 ± 0.54	14.96 ± 0.67
NIR 组	13.91 ± 0.85 ^①	14.83 ± 0.63 ^①	5.12 ± 0.54 ^①
NIPost 组	8.31 ± 0.74 ^{①②}	9.12 ± 0.56 ^{①②}	12.45 ± 0.64 ^{①②}
NIPostI 组	13.15 ± 0.66 ^{①②③}	13.91 ± 0.63 ^{①②③}	6.28 ± 0.55 ^{①②③}
F 值	2.123	2.671	2.935
P 值	0.011	0.002	0.001

注：①与 NS 组比较, $P < 0.05$; ②与 NIR 组比较, $P < 0.05$; ③与 NIPost 组比较, $P < 0.05$ 。

2.4 各组大鼠脑组织细胞凋亡情况

NS 组、NIR 组、NIPost 组、NIPostI 组凋亡细胞数分别为 (55.41 ± 6.43) 个/HP、(213.91 ± 20.85) 个/HP、(138.31 ± 15.74) 个/HP、(163.15 ± 10.66) 个/HP, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 2.813, P = 0.001$)。进一步两两比较结果: NIR 组、NIPost 组和 NIPostI 组凋

亡细胞多于 NS 组 ($P < 0.05$); NIPost 组和 NIPostI 组较 NIR 组凋亡细胞减少 ($P < 0.05$)。NIPost 组和 NIPostI 组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 2。

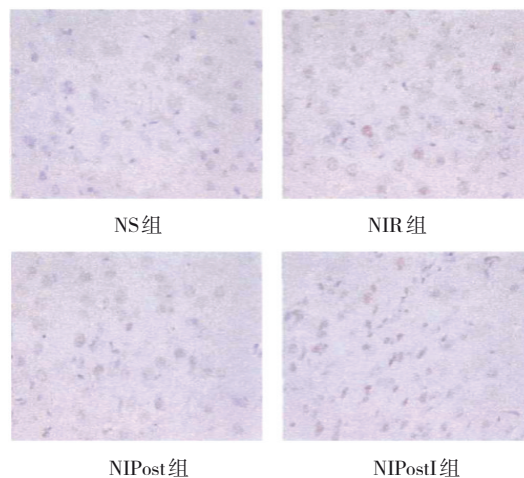


图 2 各组大鼠脑组织细胞凋亡情况 (TUNEL 染色 × 400)

2.5 各组大鼠心肌组织 p-AMPK/t-AMPK、LC3 I/II 及 P62 蛋白相对表达量比较

NS 组、NIR 组、NIPost 组、NIPostI 组 p-AMPK/t-AMPK、LC3 I/II 及 P62 蛋白相对表达量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 2.203, 2.772$ 和 $2.901, P = 0.004, 0.002$ 和 0.001)。进一步两两比较结果: NIR 组、NIPost 组及 NIPostI 组 p-AMPK/t-AMPK 蛋白相对表达量低于 NS 组 ($P < 0.05$), LC3 I/II 和 P62 蛋白相对表达量高于 NS 组 ($P < 0.05$); NIPost 组较 NIR 组 p-AMPK/t-AMPK 蛋白相对表达量升高 ($P < 0.05$), LC3 I/II 和 P62 蛋白相对表达量降低 ($P < 0.05$); NIPostI 组较 NIPost 组 p-AMPK/t-AMPK 蛋白相对表达量降低 ($P < 0.05$), LC3 I/II 和 P62 蛋白相对表达量升高 ($P < 0.05$)。见表 3 和图 3 ~ 5。

表 3 各组大鼠心肌组织 p-AMPK/t-AMPK、LC3 I/II 及 P62 蛋白相对表达量比较 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	p-AMPK/t-AMPK	LC3 I/II	P62
NS 组	1.41 ± 0.23	0.56 ± 0.04	0.86 ± 0.07
NIR 组	0.61 ± 0.05 ^①	1.03 ± 0.03 ^①	1.32 ± 0.07 ^①
NIPost 组	0.91 ± 0.04 ^{①②}	0.72 ± 0.06 ^{①②}	0.95 ± 0.04 ^{①②}
NIPostI 组	0.75 ± 0.06 ^{①②③}	0.91 ± 0.03 ^{①②③}	1.08 ± 0.05 ^{①②③}
F 值	2.203	2.772	2.901
P 值	0.004	0.002	0.001

注：①与 NS 组比较, $P < 0.05$; ②与 NIR 组比较, $P < 0.05$; ③与 NIPost 组比较, $P < 0.05$ 。

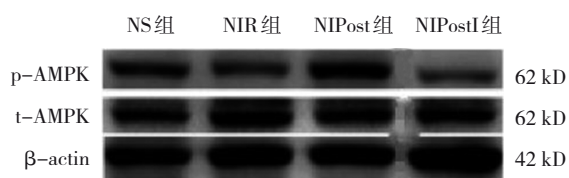


图 3 各组大鼠心肌组织 p-AMPK/t-AMPK 蛋白的表达

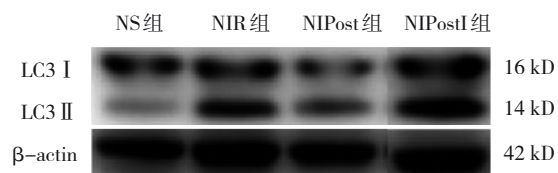


图 4 各组大鼠心肌组织 LC3 I / II 蛋白的表达

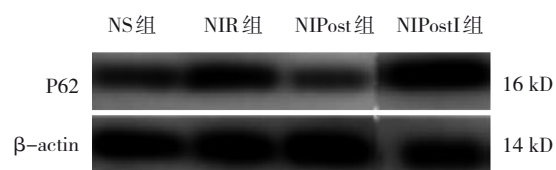


图 5 各组大鼠心肌组织 P62 蛋白的表达

3 讨论

临床上,及时恢复患者的氧合和血流灌注是抢救缺血再灌注损伤的基础。一旦脏器发生缺血再灌注,所造成的损害将较先前更严重,且更持久,甚至可直接危及心、肺、脑等重要脏器。有研究结果显示,缺血再灌注损伤与氧自由基产生、促凋亡因子过表达、细胞内钙超载及炎症反应的级联效应等密切相关,但具体机制尚未明确^[10-11]。1986年,MURRY等^[5]首次观察到心肌在经历一次或反复数次短暂缺血后,可在后续较长时间缺血中得到保护,对缺血的耐受性会明显提高,并基于此提出了缺血预处理的概念。目前,大量临床证据表明,缺血预处理对心肌损伤有保护作用^[12-14]。

肥胖导致的脂肪细胞因子失去平衡是心血管疾病的重要诱因。CTRPs 是一类新发现的脂肪组织源性细胞因子,其分子结构与脂联素相似,共包含 15 个成员,除 CTRP4 外,其他成员均由氨基末端的信号肽、胶原样结构域、短的可变结构域及羧基末端与补体成分 C1q 同源的球状结构域等 4 个不同结构域构成^[15-16]。李浩等^[17]发现,CTRP9 在大鼠心肌缺血再灌注损伤的脂肪组织及血浆中表达水平明显下降,脂肪组织 NADPH 氧化酶和血浆游离脂肪酸含量明显增加,且 3T3-L1 脂肪细胞经过过氧化氢或如软脂酸处理后,CTRP9 水平明显降低,表明心肌缺血性损伤可

促进脂肪组织氧化应激,从而降低 CTRP9 表达水平。本研究中,HE 染色结果再次验证缺血预处理可对脑损伤发挥保护作用,且 CTRP9 抑制剂干扰可抑制后处理的保护效应。

缺血再灌注损伤是一种炎症反应过程,其病理生理作用包括补体激活、自由基生成、炎症因子产生、细胞凋亡等^[18]。本研究通过免疫组织化学和 TUNEL 检测结果证明心肌缺血再灌注可导致炎症反应级联效应和凋亡因子过表达,不仅可导致心脏衰竭,同时还会对其他脏器造成不良影响,其中脑组织受到的影响最大,严重的脑损伤会大幅度降低患者的生活质量。此外,后处理可有效减轻心肌缺血再灌注所致炎症反应和凋亡因子过表达,CTRP9 可通过激活 AMPK,抑制心肌细胞凋亡,发挥心肌保护作用,与 NIEMANN 等^[19]的结论基本一致。

AMPK 是一类异源性的三聚体的蛋白激酶,具有调节物质能量代谢的作用。运动、AMP/ATP 比例升高、缺血低氧及促炎因子等均可促进 AMPK 磷酸化^[20]。激活状态的 AMPK 可通过多种途径参与能量合成、代谢,且对炎症反应具有抑制作用,可减轻机体氧化应激损伤^[21]。AMPK 信号通路受损与肥胖、糖尿病及心血管疾病关系密切。心肌缺血时,心肌组织 AMP 含量升高,AMP/ATP 比值升高可激活 AMPK,促使 AMPK 磷酸化,进而激活下游信号分子,引发相应的生物学效应。AMPK 激活可加快心肌细胞摄取、利用葡萄糖的速度,改善能量供应^[22]。本研究中 Western blotting 检测结果表明,AMPK 信号通路调节 CTRP9 后处理的心肌保护作用,给予 CTRP9 抑制剂干预可抑制该保护作用。CTRP9 抑制剂处理后,再灌注后的溶酶体功能损伤标志性蛋白 P62 和自噬体标志性蛋白 LC3 相对表达量升高,表明 CTRP9 后处理可促进再灌注后的自噬流恢复,进而保护心肌缺血再灌注损伤,与覃琴等^[22]的研究结果大致相同。

综上所述,CTRP9 对大鼠心肌缺血再灌注损伤有一定的保护作用,其可能通过激活 AMPK 信号通路发挥作用,使 AMPK 磷酸化来促进自噬体与溶酶体结合,加速自噬达到消化降解代谢产物再循环利用的效果,以此来发挥保护心肌缺血再灌注损伤的作用。缺血预处理时可通过调高 CTRP9 水平来降低缺血再灌注损伤;应用 CTRP9 抑制剂后,其保护作用将受到抑制。

参 考 文 献 :

- [1] SEKULIC M, ZACHARIAS M, MEDALION B. Ischemic cardiomyopathy and heart failure[J]. *Circ Heart Fail*, 2019, 12(6): e006006.
- [2] MORONI F, GERTZ Z, AZZALINI L. Relief of ischemia in ischemic cardiomyopathy[J]. *Curr Cardiol Rep*, 2021, 23(7): 80.
- [3] WU M Y, YANG G T, LIAO W T, et al. Current mechanistic concepts in ischemia and reperfusion injury[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 46(4): 1650-1667.
- [4] TANG J H, ZHUANG S G. Histone acetylation and DNA methylation in ischemia/reperfusion injury[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2019, 133(4): 597-609.
- [5] MURRY C E, JENNINGS R B, REIMER K A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium[J]. *Circulation*, 1986, 74(5): 1124-1136.
- [6] DING R, WU W, SUN Z, et al. AMP-activated protein kinase: an attractive therapeutic target for ischemia-reperfusion injury[J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 888: 173484.
- [7] ZHU J, WANG Y F, CHAI X M, et al. Exogenous NADPH ameliorates myocardial ischemia-reperfusion injury in rats through activating AMPK/mTOR pathway[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2020, 41(4): 535-545.
- [8] ZHENG Y T, SHI B H, MA M Q, et al. The novel relationship between Sirt3 and autophagy in myocardial ischemia-reperfusion [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(5): 5488-5495.
- [9] LEE J, YOO J H, KIM H S, et al. C1q/TNF-related protein-9 attenuates palmitic acid-induced endothelial cell senescence via increasing autophagy[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2021, 521: 111114.
- [10] 贺芳, 叶蓓, 陈建珍, 等. EGCG对脑缺血再灌注损伤大鼠炎症反应的影响[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2021, 46(12): 1325-1331.
- [11] 唐小曲, 傅小云, 付豹, 等. 线粒体未折叠蛋白反应在心肌缺血/再灌注损伤中的研究进展[J]. *中华危重病急救医学*, 2021, 33(8): 1007-1010.
- [12] 王赞, 张宗泽, 张婧婧, 等. 氢吗啡酮后处理经PI3K/Akt通路减轻大鼠心肌缺血-再灌注细胞凋亡[J]. *中华急诊医学杂志*, 2021, 30(11): 1329-1333.
- [13] WU Y S, LIU H Q, WANG X B. Cardioprotection of pharmacological preconditioning on myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. *Life Sci*, 2021, 264: 118628.
- [14] 张静, 纪延炜, 王城, 等. 七氟醚后处理减轻大鼠心肌缺血-再灌注损伤[J]. *临床麻醉学杂志*, 2021, 37(5): 515-520.
- [15] ZHANG L, LIU Q, ZHANG H, et al. C1q/TNF-related protein 9 inhibits THP-1 macrophage foam cell formation by enhancing autophagy[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2018, 72(4): 167-175.
- [16] 朱丽雯, 谭延振, 张正斌, 等. 脂肪因子在心肌缺血再灌注损伤中的研究进展[J]. *中国体外循环杂志*, 2019, 17(6): 378-384.
- [17] 李浩, 王瑾瑜. 脂肪细胞因子CTRP9通过激活AMPK信号通路改善心肌缺血-再灌注损伤[J]. *生理科学进展*, 2012, 43(4): 246.
- [18] JIMÉNEZ-CASTRO M B, CORNIDE-PETRONIO M E, GRACIA-SANCHO J, et al. Inflammation-mediated inflammation in liver ischemia-reperfusion injury[J]. *Cells*, 2019, 8(10): 1131.
- [19] NIEMANN B, LI L, SIEGLER D, et al. CTRP9 mediates protective effects in cardiomyocytes via AMPK- and adiponectin receptor-mediated induction of anti-oxidant response[J]. *Cells*, 2020, 9(5): 1229.
- [20] TIAN L, CAO W J, YUE R J, et al. Pretreatment with Tiliarin improves mitochondrial energy metabolism and oxidative stress in rats with myocardial ischemia/reperfusion injury via AMPK/SIRT1/PGC-1 alpha signaling pathway[J]. *J Pharmacol Sci*, 2019, 139(4): 352-360.
- [21] XIN C, ZHANG Z, GAO G J, et al. Irisin attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury and improves mitochondrial function through AMPK pathway in diabetic mice[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 565160.
- [22] 覃琴, 王琛, 乔世刚, 等. AMPK信号通路调控的自噬在七氟烷后处理保护大鼠心肌缺血再灌注损伤中的机制研究[J]. *生物医学工程研究*, 2016, 35(1): 36-40.

(童颖丹 编辑)

本文引用格式: 谢骏, 高凤敏, 符北京. CTRP9对远端缺血预处理心肌梗死模型大鼠心肌缺血再灌注致脑损伤的保护作用及其机制研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2022, 32(18): 6-12.

Cite this article as: XIE J, GAO F M, FU B J. The protective effects and mechanisms of CTRP9 on cerebral injury induced by myocardial ischemia-reperfusion in rat models of myocardial infarction treated with remote ischemic preconditioning[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2022, 32(18): 6-12.