

肥大细胞脱颗粒稳定剂对 SD 大鼠心肌梗死后 不良心室重构的影响

郭伟¹, 梁远红¹, 靳立军¹, 符永恒², 谢至², 张梦珍², 李寰¹

(广东省心血管病研究所 广东省人民医院 广东省医学科学院 1. 心内科, 2. 医学研究中心, 广东省广州市 510080)

[关键词] 心脏肥大细胞; 心肌梗死; 不良心室重构

[摘要] **目的** 阐明心脏肥大细胞对心肌梗死后心功能的影响, 探讨心脏肥大细胞在心肌梗死心室重构中的作用。**方法** 结扎左前降支建立雄性 SD 大鼠心肌梗死模型。术前 5 天随机分成假手术组($n=6$), 心肌梗死模型组($n=8$), 肥大细胞稳定剂色甘酸钠治疗组($n=7$)。术前 3 天及术后 2 周和 4 周行心脏超声检测心功能。术后 4 周称取左心室、右心室湿重/体重, HE 染色观察病理组织学变化, 甲苯胺蓝法检测肥大细胞密度。**结果** 心肌梗死后第 2 周, 与假手术组相比, 模型组和治疗组左心室射血分数(LVEF)明显下降($P<0.01$)。虽然模型组和治疗组心脏扩大, 但三组之间差异无显著性。心肌梗死后第 4 周, 与假手术组相比, 模型组和治疗组左心室舒张期末容积(EDV)明显增大($P<0.05$)。与模型组相比, 治疗组 EDV 差异无显著性($P>0.05$), 但 LVEF 明显增加($P<0.01$), 左心室肥厚指数下降($P<0.05$), 心外膜(主要是梗死区)肥大细胞密度明显下降($P<0.01$)。且肥大细胞密度与 LVEF 呈负相关($P<0.01$), 与左心室肥厚指数呈正相关($P<0.05$)。**结论** 肥大细胞直接参与了心肌梗死后的心室重构。肥大细胞脱颗粒的长期抑制明显提高心脏的心搏量, 减轻左心室心肌肥厚, 进而改善心功能。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Effects of Mast Cell Stabilizing Compound on Adverse Ventricular Remodeling of Post-Myocardial Infarction in SD Rats

GUO Wei¹, LIANG Yuan-Hong¹, JIN Li-Jun¹, FU Yong-Heng², XIE Zhi², ZHANG Meng-Zhen², and LI Huan¹

(1. Department of Cardiology, 2. Research Center of Medical Sciences, Guangdong Cardiovascular Institute, Guangdong General Hospital, Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China)

[KEY WORDS] Cardiac Mast Cells; Myocardial Infarction; Adverse Ventricular Remodeling

[ABSTRACT] **Aim** To clarify the effects of the cardiac mast cells on cardiac function after myocardial infarction (MI), and to study the relationship between mast cells and ventricular remodeling after MI in SD rats. **Methods** MI model was established in male Sprague-Dawley (SD) rats by ligation of left anterior descending coronary artery. The rats were randomly divided into three groups before 5 days of ligation: sham-operated group($n=6$), MI model group($n=8$) and mast cell stabilizer cromolyn sodium treatment group($n=7$). Before 3 days, after 2 and 4 weeks of ligation, the cardiac function was assessed by Echocardiography. After 4 weeks of treatment, the ratio of left or right ventricular weight and body weight were measured, the change of histopathological were observed, and the density of mast cells were measured.

Results As compared with sham-operated group, left ventricular ejection fraction(EF) in MI model group and treatment group was markedly decreased($P<0.01$) after 2 weeks of treatment. Although the enlargement of the heart has been going in model group and treatment group, there is no significant difference among these three groups. After 4 weeks of the treatment, the Left ventricular end-diastolic volume(EDV) was significantly increased in model group and treatment group more than in sham-operated group($P<0.05$). Compared with MI model group, cromolyn sodium increased EF but not EDV, and decreased left ventricular index($P<0.05$) and mast cells density($P<0.01$) in left ventricular subepicardial layers of infarcted region. The number of mast cells in subepicardial layers had negative correlation with EF, but was

[收稿日期] 2011-11-08

[基金项目] 广东省自然科学基金项目(9151601501000007)

[作者简介] 郭伟, 硕士研究生, 主要从事心血管疾病预防研究, E-mail 为 guowei2004@163.com。通讯作者靳立军, 主任医师, 硕士研究生导师, 主要从事冠心病的相关研究, E-mail 为 lijun-jin@163.com。

positively correlated with left ventricular index. **Conclusion** Mast cells was directly involved in ventricular remodeling after MI. The long-term mast cell degranulation inhibition can significantly improve the heart's stroke volume and reduce left ventricular hypertrophy, thereby improving cardiac function.

随着心血管疾病治疗方法的进步和人口寿命的延长,急性心肌梗死的发生率逐年增加。心室重构在心肌梗死后的事件相对普遍,在梗死区和非梗死区的心室重构,被认为是受损心室功能发展的决定因素。心室重构与高的心脏破裂发病率、心律失常和动脉瘤形成相联系,这个过程影响心肌梗死后的心室功能障碍和心力衰竭^[1]。在容量负荷^[2]、高血压^[3]、缺血再灌注^[4]和动脉粥样硬化^[5]的动物模型研究中显示肥大细胞参与这些心血管病的不良心室重构。虽然心肌梗死后肥大细胞密度增加,但肥大细胞在心肌梗死后心室重构的作用还不明确,肥大细胞脱颗粒的长期抑制对心肌梗死后心室重构的影响尚待确定。本研究以肥大细胞药物诱导SD大鼠为研究对象,建立心肌梗死的心室重构模型,通过观察大鼠心脏肥大细胞密度的变化及其与心室重构的关系,阐明心脏肥大细胞对心肌梗死后心功能的影响,探讨心脏肥大细胞在心肌梗死心室重构中的机制。

1 材料和方法

1.1 构建动物模型及动物分组

健康雄性SD大鼠,体重250~300 g,由中山医科大学动物实验中心提供。大鼠均饲养在恒温、通风良好的环境中,每日接受12 h光照,供应足够的食物和水,自由摄食。术前5天,随机分组到假手术组($n=6$),心肌梗死模型组($n=8$,简称模型组),肥大细胞稳定剂色甘酸钠治疗组($n=7$,简称治疗组)。术前5天直到术后4周,治疗组腹腔注射色甘酸钠25 mg/(kg·d),假手术组和模型组腹腔注射等剂量的生理盐水。模型组和治疗组通过在肺动脉圆锥与左心耳根部交界处下2~3 mm处结扎左冠状动脉前降支,制作大鼠急性心肌梗死模型。以Ⅱ导联ST段弓背向上抬高及术后2周心脏超声显示心功能减退(LVEF<50%)提示建模成功,未成功建模以及术后死亡的大鼠予排除。假手术组只过线不结扎前降支,余步骤同手术组。

1.2 测量心脏B超指标

术前3天、术后2周及术后4周采用彩色多普勒超声诊断仪,探头频率11.4 MHz。大鼠气体麻醉,仰卧位固定,胸前备皮,于左胸骨旁取左心长轴

观和左心室乳头肌短轴观。连续记录3个心动周期的二维图像并贮存,供脱机后分析。图像分析测量左心室舒张期末容积(EDV)、收缩期末容积(ESV),计算左心室射血分数(LVEF)和缩短率(FS)。超声检查的操作及分析均由不知晓大鼠分组情况的专业技术人员完成。

1.3 留取心肌组织标本

术后4周,称量大鼠体重后常规处死。取大鼠心脏,称取左心室(包括室间隔)和右心室,计算左、右心室湿重/体重(mg/g),为左心室、右心室心肌肥厚指数。取左心室结扎点以下,垂直左心室心肌长轴横切左心室4等分,从心尖部向心底部依次取第2和第4块心肌组织。这两块心肌中性甲醛固定后,常规石蜡包埋,行HE染色,区分梗死区和非梗死区,并观察各组梗死区病理组织学变化。每组数据均取这两块心肌石蜡切片的平均观察数据为该大鼠心脏的数据。

1.4 心脏肥大细胞密度

取上述石蜡包埋块,各做心肌横向切片(厚度为4 μm),采用甲苯胺蓝染色法,在显微镜下计算每平方毫米心肌组织肥大细胞数目,方法如下:在显微镜10×40视野下,使用带箭头的目镜,测量时使箭头垂直于心外膜或心内膜的切线,连续观察5个视野。每个切片随机取梗死区、非梗死区的心外膜、心内膜各5个视野,而后取平均值为每只大鼠梗死区和非梗死区的心外膜和心内膜肥大细胞密度。

1.5 统计学分析

所得结果用医学图像分析系统测定,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,SPSS 13.0对数据进行处理,多组间比较采用单因素方差分析,肥大细胞密度和LVEF、左心室肥厚指数行相关性分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠心脏B超变化情况

术前3天、术后2周、术后4周分别对各组动物进行心脏超声检查。术前3天的B超表明实验所用的SD大鼠基本处于同一基线。术后2周,与假手术组相比,模型组与治疗组的ESV明显增大($P<0.01$),LVEF明显降低($P<0.01$)。与模型组相比,

治疗组的 B 超各项指标没有明显差异。表明模型组和治疗组大鼠梗死后 2 周出现明显心室收缩功能减退,符合心力衰竭表现,模型构建成功。术后 4 周,与假手术组相比,模型组与治疗组 EDV 增大(P

<0.05),ESV 明显增大(分别为 $P<0.01$ 和 $P<0.05$),LVEF 明显降低($P<0.01$)。与模型组相比,治疗组 EDV、ESV 没有明显差异,但 LVEF 明显增加($P<0.01$;表 1)。

表 1. 超声心动图检测大鼠心脏结构和功能结果($\bar{x} \pm s$)

Table 1. The cardiac structure and function was assessed by echocardiography($\bar{x} \pm s$)

| 分 组 | 时 间 | EDV(μL) | ESV(μL) | LVEF | FS |
|---------------|--------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 假手术组($n=6$) | 术前 3 天 | 170.03 ± 70.86 | 37.77 ± 28.45 | 79.21% ± 7.11% | 49.17% ± 7.60% |
| | 术后 2 周 | 336.06 ± 46.35 | 113.75 ± 38.00 | 66.38% ± 9.25% | 38.44% ± 7.20% |
| | 术后 4 周 | 281.38 ± 65.42 | 104.86 ± 46.12 | 63.78% ± 7.27% | 36.00% ± 5.35% |
| 模型组($n=8$) | 术前 3 天 | 141.83 ± 64.52 | 26.74 ± 21.16 | 83.66% ± 8.58% | 54.40% ± 9.77% |
| | 术后 2 周 | 407.27 ± 84.56 | 277.11 ± 72.84 ^a | 32.22% ± 7.41% ^a | 16.07% ± 4.19% ^a |
| | 术后 4 周 | 387.21 ± 65.43 ^a | 280.46 ± 63.99 ^a | 27.92% ± 7.13% ^a | 13.68% ± 3.76% ^a |
| 治疗组($n=7$) | 术前 3 天 | 153.35 ± 63.25 | 33.77 ± 35.25 | 82.05% ± 12.29% | 53.49% ± 13.02% |
| | 术后 2 周 | 400.46 ± 68.09 | 276.19 ± 84.38 ^a | 32.54% ± 10.71% ^a | 16.33% ± 5.99% ^a |
| | 术后 4 周 | 400.78 ± 122.18 ^a | 239.70 ± 97.23 ^a | 41.61% ± 8.97% ^{ab} | 21.49% ± 5.30% ^{ab} |

a 为 $P<0.05$,与假手术组比较;b 为 $P<0.05$,与模型组比较。

2.2 心室心肌肥厚指数

与假手术组相比,模型组的左心室心肌肥厚指数显著增加($P<0.05$)。与模型组比较,治疗组的左心室心肌肥厚指数明显下降($P<0.05$)。右心室心肌肥厚指数三组间差异无显著性(表 2)。

2.3 梗死区的病理组织学变化

用 HE 染色区分梗死区和非梗死区。同时观察梗死区的病理组织学变化(图 1),假手术组心肌纤维排列整齐,模型组和治疗组的梗死区心肌细胞坏死、断裂,失去正常的整齐排列结构。治疗组的心肌

细胞丧失和排列紊乱程度略低于模型组。

表 2. 各组大鼠心室心肌肥厚指数(mg/g)

Table 2. The index of ventricular hypertrophy in SD rats (mg/g)

| 分 组 | 左心室心肌肥厚指数 | 右心室心肌肥厚指数 |
|---------------|--------------------------|-------------|
| 假手术组($n=6$) | 2.07 ± 0.12 | 0.75 ± 0.12 |
| 模型组($n=8$) | 2.33 ± 0.24 ^a | 0.74 ± 0.16 |
| 治疗组($n=7$) | 2.10 ± 0.14 ^b | 0.64 ± 0.06 |

a 为 $P<0.05$,与假手术组比较;b 为 $P<0.05$,与模型组比较。

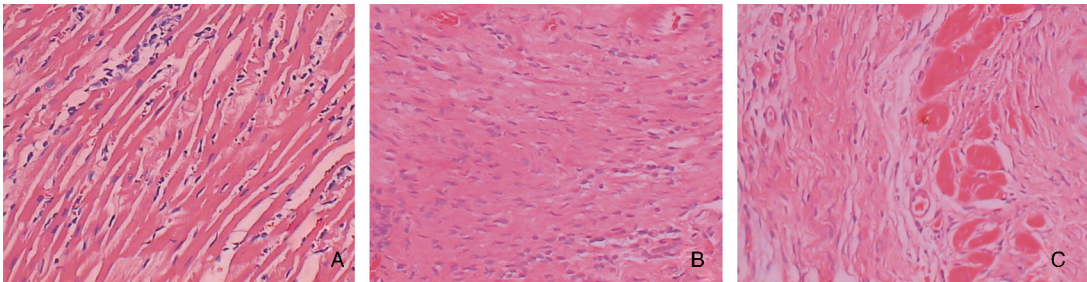


图 1. 梗死区 HE 染色(×400) A 为假手术组,B 为模型组,C 为治疗组。

Figure 1. HE staining of the infarcted area(×400)

2.4 心脏肥大细胞密度的变化

显微镜下胞浆中呈现紫红色颗粒的为肥大细胞(图 2)。分别对梗死区心外膜、梗死区心内膜、非梗死区心外膜、非梗死区心内膜进行肥大细胞计数。与假手术组相比,梗死区心外膜肥大细胞密度

模型组明显增加($P<0.01$);与模型组相比,治疗组明显下降($P<0.01$)。与假手术相比,非梗死区心外膜肥大细胞密度模型组明显增加($P<0.05$);而与模型组相比,治疗组虽然呈下降的趋势,但差异没有统计学意义。梗死区、非梗死区心内膜肥大细

胞密度三组间差异无显著性(表3)。

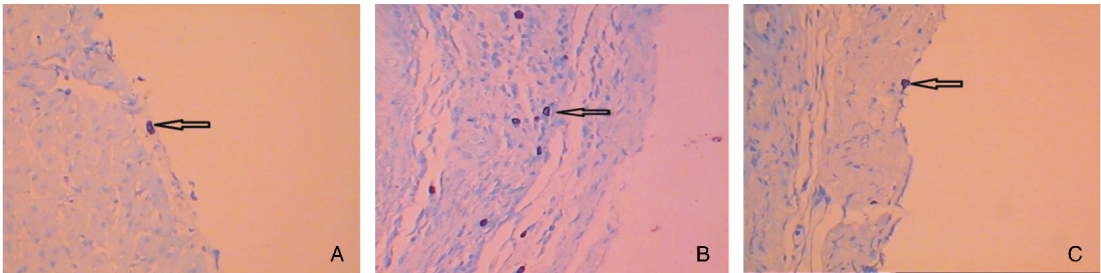


图 2. 梗死区心外膜肥大细胞(×400) A 为假手术组,B 为模型组,C 为治疗组。呈紫红色的为肥大细胞。

Figure 2. Cardiac mast cells in subepicardial layers of the infarcted area

表 3. 各组大鼠不同部位心脏肥大细胞密度($\bar{x} \pm s$, 个/ mm^2)

Table 3. The density of cardiac mast cells in SD rats($\bar{x} \pm s$, cells/ mm^2)

| 分 组 | 梗死区心外膜 | 梗死区心内膜 | 非梗死区心外膜 | 非梗死区心内膜 |
|---------------|---------------------|-----------------|-------------------|-----------------|
| 假手术组($n=6$) | 8.43 ± 4.31 | 0.65 ± 0.57 | 1.57 ± 1.03 | 0.53 ± 0.84 |
| 模型组($n=8$) | 41.55 ± 11.90^a | 1.27 ± 1.28 | 5.67 ± 3.22^a | 1.46 ± 3.26 |
| 治疗组($n=7$) | 12.01 ± 8.00^b | 0.85 ± 0.42 | 3.45 ± 2.14 | 0.57 ± 0.55 |

a 为 $P < 0.05$, 与假手术组比较; b 为 $P < 0.05$, 与模型组比较。

2.5 心脏肥大细胞密度与 LVEF 相关性分析

心脏梗死心外膜肥大细胞密度与 LVEF 呈负相关($r = -0.700, P < 0.01$), 与心外膜肥大细胞密度和左心室肥厚指数呈正相关($r = 0.496, P < 0.05$; 图 3)。

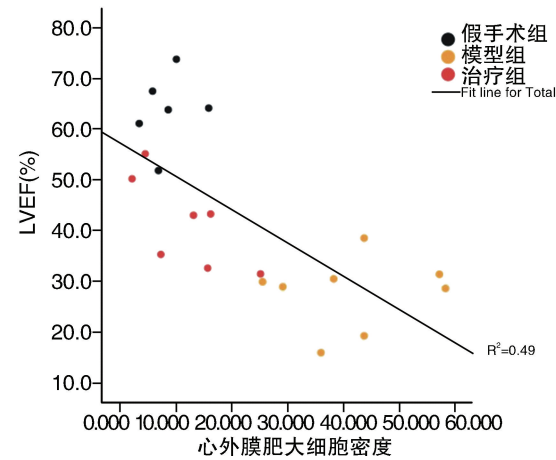


图 3. 梗死区心外膜肥大细胞密度与 LVEF 相关性分析的散点图

Figure 3. The scatterplot chart of correlation analysis of mast cells density in subepicardial layers of the infarcted area and LVEF

3 讨 论

Engels 等对心肌梗死后左心室心外膜和心内膜

的肥大细胞分别计数,在 21 天时梗死部位心外膜下心脏肥大细胞数明显升高至 25 个/ mm^2 ;35 天时梗死部位心内膜下心脏肥大细胞数明显升高至 7 个/ mm^2 。大鼠急性心肌梗死后心肌组织中的 CMC 数量明显增加,这表明心脏肥大细胞可能参与了大鼠心肌梗死后心室重构的过程。本研究结果显示梗死区心外膜肥大细胞密度,模型组较假手术组明显增加;与模型组相比,治疗组明显下降。非梗死区心外膜肥大细胞密度,模型组较假手术组明显增加;而与模型组相比,治疗组虽然呈下降的趋势,但差异没有统计学意义。梗死区、非梗死区心内膜肥大细胞密度三组差异无显著性。说明心外膜(主要是梗死区)肥大细胞参与了大鼠心肌梗死后心室重构的过程。

Cimini 等^[6]报道使用雌性 W/W^v 肥大细胞缺陷老鼠,心肌梗死后 14 天,这些老鼠有较大的梗死面积和心室扩张,但是梗死厚度减少。Ayach 等^[7]观察雄性 W/W^v 老鼠和骨髓细胞重建 W/W^v 老鼠心肌梗死后 35 天的长期重构和心脏功能,他们的结果指出尽管搏出量增加,W/W^v 老鼠发展为有更多胶原沉积的较大心脏。事实上,心肌梗死后 35 天的野生型和 W/W^v 老鼠在生存率上没有区别。利用骨髓来源的肥大细胞对心肌梗死后肥大细胞缺陷小鼠进行功能重建,所有检测指标均显示有所改善。最近,Levick 等^[8]调查了肥大细胞对心肌梗死后心肌重构的贡献,也包括心肌梗死后 7 天的 W/W^v 老鼠。与先前提到的研究

相反,初步结果指出 WT 心脏相对于 W/W^v 有明显较大的心腔扩张(舒张期末容积 126% 比 73%),在存活心室壁变薄增加和胶原降解增加。由于各研究间结果相互冲突,在这个阶段很难确定肥大细胞在心肌梗死后心室重构的重要性。但是我们发现肥大细胞缺陷动物鉴于遭受显著的造血异常,它们可能不是这些研究的理想模型,选择突变高度局限的动物可能会减少对实验结果的影响^[8]。而色甘酸钠能够抑制钙离子向细胞内聚集,稳定肥大细胞,抑制组胺释放,还能抑制 CMC 的脱颗粒作用,可以减少缺血再灌注造成的细胞损伤^[9]。因此,本研究采用肥大细胞稳定剂色甘酸钠来干预心肌梗死后的心室重构。

结果显示术后 2 周,与假手术组相比,模型组与治疗组的 ESV 明显增大($P < 0.01$),LVEF 明显降低($P < 0.01$)。与模型组相比,治疗组的 B 超各项指标没有明显差异。表明模型组和治疗组大鼠梗死后 2 周出现明显心室收缩功能减退,符合心力衰竭表现,模型构建成功。术后 4 周,与假手术组相比,模型组与治疗组 EDV 增大,ESV 明显增大,LVEF 明显降低。与模型组相比,治疗组 EDV、ESV 没有明显差异,但 LVEF 明显增加。说明肥大细胞的长期抑制不能阻止心肌梗死后心室腔扩大,但可以明显提高心搏量。与假手术组比较,模型组的左心室肥厚指数明显增加;而与模型组比较,治疗组的左心室肥厚指数明显降低,提示肥大细胞脱颗粒的长期抑制可以减轻左心室的心肌肥厚。与模型组相比,治疗组梗死区心外膜肥大细胞密度明显降低(非梗死区有一定的下降,但未达到统计学意义),说明色甘酸钠可达到肥大细胞的长期抑制且主要作用于梗死区心外膜肥大细胞。梗死区心外膜肥大细胞密度与 LVEF 负相关,与左室肥厚指数呈正相关。说明心外膜(主要是梗死区)肥大细胞直接参与了大鼠心肌梗死后心室重构的过程。肥大细胞脱颗粒的长期抑制明显提高心脏的心搏量,减轻左室心肌肥厚,进而改善心功能。

目前认为心脏肥大细胞分泌的颗粒中包括组胺和蛋白酶(如类胰蛋白酶和糜酶),心脏肥大细胞也能产生大量的细胞因子、生长因子、血管活性物质和其他的生物活性介质^[10],这些能调节组织的重构^[11]。研究显示肥大细胞的中心作用通过 MMP 活化启动心肌重构^[2]。除此之外,心肌的肥大细胞效应可能继发于 AngII 的产生,因为肥大细胞包含的糜酶有能力使无活性的 AngI 转为活性的 AngII^[12]。尽管

这样,肥大细胞在心肌梗死后的心室重构中具体的机制目前还不清楚,尚有待进一步的研究。

综上所述,肥大细胞直接参与了心肌梗死后的心室重构。虽然肥大细胞脱颗粒的长期抑制无法有效阻止心脏的扩大,但可明显提高心脏的心搏量,减轻左室心肌肥厚,进而改善心功能。这种阻止研究为肥大细胞是心肌梗死后心室重构的关键提供直接证据。

[参考文献]

- [1] 曾武涛,陈伟燕,冷秀玉,等. AVE0991 改善大鼠心肌梗死后心室重塑和心功能[J]. 中国动脉硬化杂志, 2011, 19(2): 89-94.
- [2] Levick SP, Gardner JD, Holland M, et al. Protection from adverse myocardial remodeling secondary to chronic volume overload in mast cell deficient rats[J]. J Mol Cell Cardiol, 2008, 45: 56-61.
- [3] Levick SP, McLarty JL, Murray DB, et al. Cardiac mast cells mediate left ventricular fibrosis in the hypertensive rat heart[J]. Hypertension, 2009, 53: 1 041-047.
- [4] Jaggi AS, Singh M, Sharma A, et al. Cardioprotective effects of mast cell modulators in ischemia-reperfusion-induced injury in rats [J]. Methods Find Exp Clin Pharmacol, 2007, 29: 593-600.
- [5] 殷莲华,李晓波,宁艳霞,等. 肥大细胞类胰蛋白酶在动脉粥样硬化发生中的作用机制[J]. 中国动脉硬化杂志, 2011, 19(3): 241-243.
- [6] Cimini M, Fazel S, Zhuo S, et al. c-Kit dysfunction impairs myocardial healing after infarction [J]. Circulation, 2007, 116: 177-182.
- [7] Ayach BB, Yoshimitsu M, Dawood F, et al. Stem cell factor receptor induces progenitor and natural killer cell-mediated cardiac survival and repair after myocardial infarction [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103: 2 304-309.
- [8] Levick SP, Meléndez GC, Plante E, et al. Cardiac mast cells: the centrepiece in adverse myocardial remodelling[J]. Cardiovasc Res, 2011, 89(1): 12-19.
- [9] Ramos L, Peña G, Cai B, et al. Mast cell stabilization improves survival by preventing apoptosis in sepsis[J]. J Immunol, 2010, 185(1): 709-716.
- [10] Theoharides TC, Kempuraj D, Tagen M, et al. Differential release of mast cell mediators and the pathogenesis of inflammation[J]. Immunol Rev, 2007, 217: 65-78.
- [11] 张利群,孔宏亮,周 瀛,等. 阿托伐他汀对大鼠心肌梗死后心肌纤维化及心肌肿瘤坏死因子- α 的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2009, 19(01): 47-49.
- [12] 陈 凡,颜宇波,杨天伦,等. 氯沙坦和曲尼司特抗高血压大鼠心肌纤维化的对比观察[J]. 中国现代医学杂志, 2010, 20(7): 1 000-003.

(此文编辑 李小玲)