

本文引用: 李嘉舒, 高薇, 代悦, 等. TFPI 对大鼠心肌缺血再灌注损伤的影响及其机制初探[J]. 中国动脉硬化杂志, 2023, 31(2): 93-100. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2023.02.001.

[文章编号] 1007-3949(2023)31-02-0093-08

• 实验研究 •

## TFPI 对大鼠心肌缺血再灌注损伤的影响及其机制初探

李嘉舒<sup>1</sup>, 高薇<sup>2</sup>, 代悦<sup>1</sup>, 徐睿<sup>1</sup>, 沈丽<sup>1</sup>, 闫汝楠<sup>1</sup>, 刘越<sup>1</sup>, 陈文佳<sup>1</sup>, 刘文秀<sup>1</sup>, 傅羽<sup>1</sup>

(哈尔滨医科大学附属第一医院 1. 心内科, 2. 甲状腺外科, 黑龙江省哈尔滨市 150001)

**[摘要]** **[目的]** 探究组织因子途径抑制物(TFPI)对大鼠心肌缺血再灌注(I/R)及心肌细胞缺氧复氧(H/R)损伤的影响,并从心肌细胞凋亡的变化探索其机制。**[方法]** 在体内实验中,通过SD大鼠心脏原位结扎法可逆阻断前降支建立大鼠心肌I/R模型。将大鼠随机分为对照组、I/R组和I/R+rTFPI(重组TFPI)组,再灌注后3天采用HE染色观察大鼠心肌组织形态学变化,TTC染色法评估心肌梗死区范围,扫描透射电镜观察心肌超微结构损伤情况,Western blot法检测各组大鼠心肌组织中Bcl-2、Bax和cleaved Caspase-3蛋白的表达。在体外实验中,采用胰酶消化法及差速贴壁法培养SD乳鼠原代心肌细胞,用MIC101系统模拟心肌细胞I/R损伤,缺氧2 h、复氧12 h后建立体外心肌细胞H/R模型。将心肌细胞分为对照组、H/R组和H/R+rTFPI(10 μg/L)组,用CCK-8法检测心肌细胞活力,TUNEL法检测心肌细胞凋亡率,Western blot法检测心肌细胞中Bax、Bcl-2及cleaved Caspase-3蛋白的表达水平。**[结果]** 体内实验中,成功建立大鼠在体心肌I/R模型。HE染色结果显示I/R组较对照组心肌细胞坏死程度加重,I/R+rTFPI组较I/R组心肌细胞坏死程度减低;TTC染色示I/R+rTFPI组较I/R组心肌梗死范围减少了39.76% ( $P<0.05$ );扫描透射电镜观察显示I/R组凋亡及损伤程度较对照组加重,I/R+rTFPI组凋亡及损伤较I/R组减轻;Western blot结果显示,再灌注3天后I/R组心肌组织Bcl-2的表达较对照组降低了53.43% ( $P<0.05$ ),Bax和cleaved Caspase-3的表达较对照组分别增加了29.05%和73.25% ( $P<0.05$ ),而I/R+rTFPI组Bcl-2的表达水平较I/R组升高了55.01% ( $P<0.05$ ),Bax和cleaved Caspase-3的表达水平较I/R组分别降低了13.77%和24.25% ( $P<0.05$ )。在体外实验中,CCK-8检测结果显示H/R组细胞活力较对照组下降了29.70% ( $P<0.05$ ),H/R+rTFPI组细胞活力较H/R组升高了19.77% ( $P<0.05$ )。TUNEL结果显示H/R组较对照组凋亡率增加了56.76%,H/R+rTFPI组细胞凋亡率较H/R组降低了24.55% ( $P<0.05$ )。Western blot结果显示,H/R组细胞Bcl-2表达较对照组降低了46.92%,Bax表达较对照组增加了41.90% ( $P<0.05$ ),cleaved Caspase-3表达较对照组升高了2.68倍 ( $P<0.05$ );H/R+rTFPI组Bcl-2表达较H/R组增加了28.24% ( $P<0.05$ ),Bax及cleaved Caspase-3表达较H/R组分别降低了26.34%和57.60% ( $P<0.05$ )。**[结论]** TFPI可显著拮抗心肌I/R和心肌细胞H/R损伤,此效应与其抑制心肌细胞凋亡有关。

**[关键词]** 组织因子途径抑制物; 缺血再灌注损伤; 心肌细胞; 细胞凋亡

**[中图分类号]** R5

**[文献标识码]** A

### Effect of TFPI on myocardial ischemia reperfusion injury in rats and its mechanism

LI Jiashu<sup>1</sup>, GAO Wei<sup>2</sup>, DAI Yue<sup>1</sup>, XU Rui<sup>1</sup>, SHEN Li<sup>1</sup>, YAN Runan<sup>1</sup>, LIU Yue<sup>1</sup>, CHEN Wenjia<sup>1</sup>, LIU Wenxiu<sup>1</sup>, FU Yu<sup>1</sup>

(1. Department of Cardiology, 2. Department of Thyroid Surgery, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang 150001, China)

**[ABSTRACT]** **Aim** To investigate the effects of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) on cardiomyocyte apoptosis following ischemia/reperfusion (I/R) injury. **Methods** I/R model was established by ligating the anterior descending coronary artery *in vivo*. Rats were randomly divided into three groups: the control, I/R, and I/R+rTFPI groups. HE

**[收稿日期]** 2022-04-11

**[修回日期]** 2022-08-12

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81200143,81200235和82170513);黑龙江省自然科学基金项目(QC2012C015)

**[作者简介]** 李嘉舒,硕士研究生,主要研究方向为心肌缺血再灌注的基础与临床研究,E-mail:lijiaoshu20182021@163.com。通信作者傅羽,博士后,主任医师,教授,博士研究生导师,主要研究方向为高血压和冠心病的基础与临床研究,E-mail:fuyu198010@163.com。

staining was used to evaluate the morphological changes of rats myocardial tissue after reperfusion for 3 days. TTC staining was used to detect the myocardial infarct size. Ultrastructural damage in cardiomyocytes was measured by transmission electron microscopy. The expression levels of Bcl-2, Bax and cleaved Caspase-3 in rats myocardial tissue were detected by Western blot analysis. Cardiomyocytes of Sprague Dawley (SD) rats were cultured by enzyme digestion and differential adherent method *in vitro* experiments. Cardiomyocytes I/R injury *in vitro* model was established by 2 h of hypoxia and 12 h of reoxygenation using MIC101 system. Cardiomyocytes were divided into control group, H/R group, and H/R+rTFPI group (10  $\mu\text{g/L}$ ). Cell viability was detected by CCK-8 assay. Detection of cardiomyocytes apoptosis was performed by TUNEL technique. Western blot analysis was used to detect the expression of Bax, Bcl-2 and cleaved Caspase-3.

**Results** A myocardial I/R model was successfully established *in vivo*. HE staining showed myocardium exhibited a higher degree of necrosis than that in control group, which was milder in I/R+rTFPI group than that in I/R group ( $P < 0.05$ ). TTC staining showed that, compared with I/R group, myocardial infarct size reduced 39.76% in I/R+rTFPI group ( $P < 0.05$ ). The data of transmission electron microscopy showed that the degree of apoptosis and injury was severer in I/R group than that in control group, whereas it was milder in I/R+rTFPI group than that in I/R group. Western blot detection results showed that compared with control group, the expression of Bcl-2 decreased 53.43% in I/R group ( $P < 0.05$ ), but the expression of Bax and cleaved Caspase-3 increased 29.05% and 73.25% respectively ( $P < 0.05$ ). After adding rTFPI, the expression of Bax and cleaved Caspase-3 in myocardial tissue decreased 13.77% and 24.25% respectively compared with I/R group ( $P < 0.05$ ), whereas the expression of Bcl-2 increased 55.01% compared with I/R group ( $P < 0.05$ ). In *in vitro* experiment, the CCK-8 results showed the cell viability of H/R group decreased 29.70% compared with control group ( $P < 0.05$ ), but it increased 19.77% after adding rTFPI compared with H/R group ( $P < 0.05$ ). The TUNEL detection showed that the apoptotic rate of H/R group increased 56.76% compared with control group, whereas the apoptotic rate of H/R+rTFPI group decreased 24.55% compared with H/R group ( $P < 0.05$ ). Western blot results showed that compared with control group, the expression of Bcl-2 in cardiomyocytes decreased 46.92% in H/R group ( $P < 0.05$ ), but the expression of Bax increased 41.90% ( $P < 0.05$ ) and the expression of cleaved Caspase-3 increased 2.68 fold ( $P < 0.05$ ). After adding rTFPI, the expressions of Bax and cleaved Caspase-3 in the cardiomyocytes decreased 26.34% and 57.60% respectively when compared with H/R group ( $P < 0.05$ ), whereas the expression of Bcl-2 increased 28.24% compared with H/R group ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion** TFPI served a protective role against I/R and H/R-induced cardiomyocyte injury by inhibiting apoptosis.

[**KEY WORDS**] tissue factor pathway inhibitor; ischemia reperfusion injury; cardiomyocyte; cell apoptosis

以冠状动脉闭塞血流中断为特征的急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 是全球发病率和死亡率最高的疾病之一。闭塞冠状动脉的早期再灌注是抢救缺血心肌的先决条件,但恢复缺血区域的血流反而会造成额外的组织损伤,即缺血再灌注 (ischemia reperfusion, I/R) 损伤。I/R 损伤现象首先在 1960 年被 Jennings 等<sup>[1]</sup>在犬冠状动脉结扎模型中发现,其机制十分复杂,包括细胞内钙超载、氧化应激、内质网应激、线粒体功能障碍、自噬与凋亡途径激活、蛋白激酶激活、炎症以及无复流等。已有证据表明, I/R 过程中存在外源性及内源性凋亡途径的激活,而且活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 升高、细胞损伤和心血管功能障碍等改变与凋亡也有密切的关系<sup>[2-3]</sup>。

组织因子途径抑制物 (tissue factor pathway inhibitor, TFPI) 最初作为体内唯一的组织因子 (tissue factor, TF) 抑制剂被发现,其主要作用是阻止外源性凝血途径的活化。近年来, TFPI 已被发现在心血管

系统中发挥多种作用,如抑制新生血管内膜增生<sup>[4]</sup>、促进血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMC) 增殖和迁移<sup>[5]</sup>、抑制内皮细胞增殖<sup>[6]</sup>等。同时关于 TFPI 参与调控细胞凋亡途径的证据也被逐渐发现<sup>[7]</sup>。

本课题组在前期实验中建立体外心肌细胞缺氧复氧 (hypoxia/reoxygenation, H/R) 模型,发现 TFPI 对 H/R 后心肌细胞具有保护作用,但是 I/R 条件下 TFPI 是否通过影响细胞凋亡对心肌细胞起保护作用尚未有研究。本研究中,我们通过构建体内心肌 I/R 和体外心肌细胞 H/R 模型,探讨 TFPI 对于心肌组织和心肌细胞损伤的作用及与心肌细胞凋亡的关系。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要材料

清洁级 SD (Sprague-Dawley) 大鼠 [体质量约

(200±20) g]和 SD 大鼠乳鼠(1~3 天)购自哈尔滨医科大学附属第二医院实验动物中心;重组组织因子途径抑制物(recombinant tissue factor pathway inhibitor, rTFPI)购自美国 R&D 公司;TTC 购自北京索莱宝公司;兔抗 GAPDH 多克隆抗体购自翊圣生物公司;兔抗 Bcl-2 单克隆抗体、兔抗 Bax 单克隆抗体、HRP 羊抗兔 IgG 均购自 ABclonal 公司;兔抗 cleaved Caspase-3 单克隆抗体购自 Cell Signaling Technologies 公司;TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒购自 Roche 公司;CCK-8 试剂盒购自日本同仁生物公司;MIC101 型细胞缺氧培养系统购自美国 Billups-Rothenberg 公司;小动物呼吸机购自中国瑞沃德公司。

## 1.2 体内心肌 I/R 模型建立

选取体质量(200±20) g 雄性 SD 大鼠共 107 只,随机选取 20 只作为对照组,另 87 只用于 I/R 手术,最后造模成功且存活下来共 40 只。将 SD 大鼠通过心脏原位结扎法可逆地阻断左前降支建立心肌 I/R 模型,在成功进行 I/R 手术的大鼠中随机选择进行 rTFPI 灌注。实验分组如下:(1)对照组( $n=20$ ):大鼠只进行左前降支下方穿线操作,完成穿线后撤出无损线、挤出胸腔内空气、逐层缝合肌肉皮肤关闭胸腔;(2)I/R 组( $n=20$ ):结扎左前降支 1 h 后解除结扎、恢复灌注;(3)I/R+rTFPI 组( $n=20$ ):左前降支处置同 I/R 组,再灌注的同时立即按照 100 ng/kg 标准经大鼠尾静脉注射 rTFPI,随后以 1 ng/(kg·min) rTFPI 保持静脉滴注 1 h。所有 I/R 模型大鼠均通过连接心电图监测观察心电图变化,与正常大鼠的心电图相比,结扎左前降支 30 min 后大鼠心电图出现明显的 ST 段抬高,解除结扎恢复心肌灌注 2 h 后心电图显示抬高的 ST 段回落和病理性 Q 波形成,据此判定大鼠心肌 I/R 模型建立成功。

## 1.3 HE 染色观察心肌组织学变化

再灌注后 3 天,处死大鼠,取出心脏,在 I/R 组和 I/R+rTFPI 组寻找结扎部位下方心肌颜色变化最明显处,在其与正常心肌组织交汇区域切取适量心肌组织,对照组在对应位置切取心肌组织,固定于 4% 多聚甲醛溶液中,酒精脱水,二甲苯透明处理石蜡包埋、切成 5  $\mu\text{m}$  薄片,45  $^{\circ}\text{C}$  恒温箱中烘干,二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱水,苏木精、伊红染色,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,晾干封片后使用光学显微镜观察切片病理变化。

## 1.4 TTC 染色法评估心肌梗死范围

再灌注后 3 天,取 I/R 组和 I/R+rTFPI 组大鼠心脏,置于-20  $^{\circ}\text{C}$  冰箱冰冻 10 min,去除心房后进行切片,立即放入 2% TTC 染液中,37  $^{\circ}\text{C}$  避光水浴

15 min,可观察到梗死区心肌呈白色,而非梗死区心肌则呈红色。利用 Image J 图像分析软件系统进行拍照、分析,分别计算各组大鼠心肌横截面面积、梗死区面积,以梗死区面积/心肌横截面面积 $\times 100\%$ 表示梗死范围。

## 1.5 扫描透射电镜观察心肌超微结构损伤情况

再灌注后 3 天,取各组大鼠心脏,在 I/R 组和 I/R+rTFPI 组寻找结扎部位下方心肌颜色变化最明显处,在其与正常心肌组织交汇区域切取 1  $\text{mm}^3$  心肌组织,对照组在对应位置切取心肌组织,将组织块固定于 2.5% 戊二醛溶液中 1 h 以上,1% 锇酸固定液固定,常规脱水、渗透、包埋、切片制备透射电镜标本,在扫描透射电镜下观察并记录照相。

## 1.6 体外心肌细胞 H/R 模型建立

体外心肌细胞 H/R 模型的建立参考既往文献并进行改良<sup>[8]</sup>。取 SD 大鼠乳鼠,处死后剪下心脏,剪碎成组织块,胰酶消化后分装至含胎牛血清的 DMEM 培养液里,离心后弃上清液,加入含胎牛血清的 DMEM 培养液,混匀分装到培养皿中,放入细胞培养箱中 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 1.5 h,差速贴壁去除成纤维细胞后继续培养 4 天。观察心肌细胞搏动良好即可用于实验,随机分为三组:(1)对照组:正常条件下培养心肌细胞,不进行 H/R 处理;(2)H/R 组:用 MIC101 系统对心肌细胞进行缺氧 2 h 处理,然后将其培养基更换为含有 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基,置于正常细胞培养箱中继续培养 12 h;(3)H/R+rTFPI 组:用 MIC101 系统对心肌细胞进行缺氧 2 h 处理,然后将其培养基更换为含有 10% 胎牛血清和 10  $\mu\text{g/L}$  rTFPI 的 DMEM 高糖培养基,置于正常细胞培养箱中继续培养 12 h。

## 1.7 心肌细胞损伤程度检测

将原代心肌细胞以  $1\times 10^5 \text{ mL}^{-1}$  均匀接种于 96 孔板中,每组接种 6 个孔。同时设置空白组(100  $\mu\text{L}$  含 10% 胎牛血清高糖培养基)。三组细胞分别按照不同方式培养后,每孔加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 溶液继续培养,检测各组细胞的吸光度值。按照以下公式计算各组细胞活力:细胞活力(%)=[(实验组 OD 值-空白组 OD 值)/(对照组 OD 值-空白组 OD 值)] $\times 100\%$ 。

## 1.8 心肌细胞凋亡率检测

按照 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒操作步骤将各组心肌细胞固定、封闭、通透、染色,荧光染色标记各组细胞,每组滴加 10  $\mu\text{L}$  DAPI,在荧光显微镜下采用 450~500 nm 激发波长,在 515~565 nm(绿



光)范围内进行荧光信号检测。荧光显微镜下,DAPI染色阳性细胞表现为蓝色荧光,TUNEL阳性细胞表现为绿色荧光。计算细胞凋亡率(%)=阳性细胞数/细胞总数 $\times 100\%$ 。

### 1.9 Western blot 法检测心肌组织和心肌细胞中凋亡相关蛋白的表达

采用 Western blot 法检测各组心肌组织和心肌细胞中 Bcl-2、Bax 和 cleaved Caspase-3 的表达情况。寻找结扎部位下方心肌颜色变化最明显处,在其与正常心肌交汇区域切取组织冻存于 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱中。分别提取组织蛋白和细胞蛋白并定量蛋白浓度,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,将蛋白条带转膜至 PVDF 膜上,经 5% BSA 溶液室温封闭 2 h,一抗稀释液 $4^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜(Bcl-2 1:500, Bax 1:500, cleaved Caspase-3 1:500),再将对应的 HRP 羊抗兔 IgG 二抗稀释液室温孵育 2 h,滴加化学发光液,使用凝胶成像系统拍照,每组实验重复至少 3 次,使用 Image J 软件测量各条带灰度值,计算目的蛋白与内参蛋

白灰度值的比值。

### 1.10 统计学分析

所有计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,每组实验重复至少 3 次,采用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析,数据符合正态分布,采用 One-way ANOVA 进行统计分析, $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 TFPI 减轻 I/R 大鼠心肌损伤

再灌注后 3 天,大鼠心肌组织 HE 染色结果显示:对照组大鼠心肌细胞形态和结构保持正常,胞质均匀染色,心肌纤维排列整齐;I/R 组大鼠心肌细胞坏死量较大,残存心肌纤维明显萎缩、疏松、断裂,出现明显炎性细胞浸润,心肌损伤重;I/R+rTFPI 组大鼠心肌细胞坏死较 I/R 组减轻,心肌纤维保留较多且排列尚整齐,炎性细胞浸润较少,心肌损伤程度较 I/R 组减轻(图 1)。

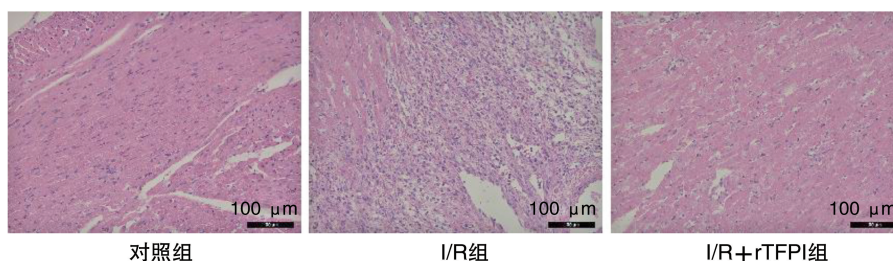


图 1. 光学显微镜观察大鼠心肌损伤情况( $n=5$ )

Figure 1. Myocardial injury in rats observed by optical microscope( $n=5$ )

### 2.2 TFPI 减少 I/R 后心肌梗死范围

再灌注后 3 天 I/R 组和 I/R+rTFPI 组心肌行 TTC 染色,可见 I/R+rTFPI 组梗死区(白色区域)面积低于 I/R 组(图 2A),用 Image J 测量各组心肌梗死面积,结果显示 I/R 组梗死面积百分比为 $(40.79\% \pm 3.00\%)$ ,I/R+rTFPI 组梗死面积百分比为 $(24.57\% \pm 3.85\%)$ ,与 I/R 组相比 I/R+rTFPI 组降低了 39.76% ( $P < 0.05$ ;图 2B)。

### 2.3 TFPI 减轻心肌 I/R 后超微结构的损伤

再灌注后 3 天,扫描透射电镜观察大鼠心肌组织凋亡情况,结果显示:对照组大鼠心肌细胞核膜完整,线粒体结构正常无损伤,心肌纤维中肌节及肌丝形态规整有序;I/R 组大鼠心肌细胞核发生固缩,细胞核周包裹了大量水肿的线粒体,心肌纤维中肌节轮廓不清晰;I/R+rTFPI 组大鼠心肌细胞核固缩,线粒体整体水肿程度较 I/R 组减轻、排列顺序较

I/R 组整齐,心肌纤维中损伤的肌丝恢复较好(图 3)。

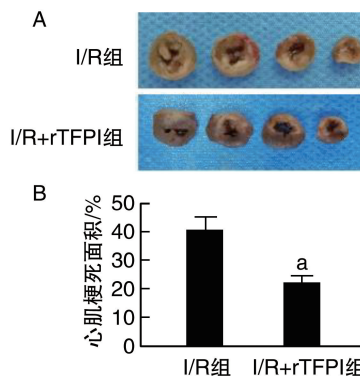
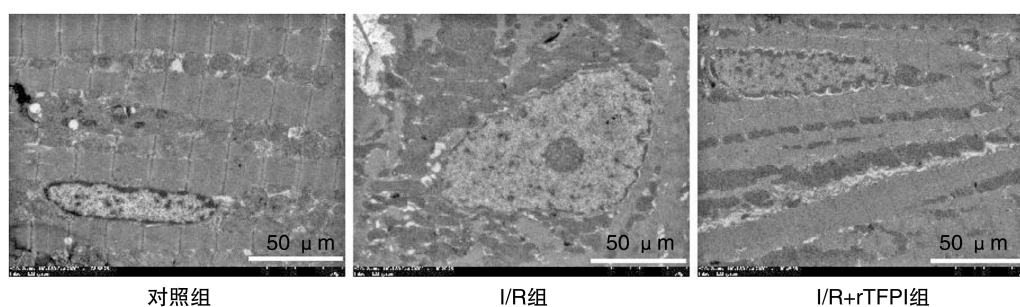


图 2. 再灌注后大鼠心肌 TTC 染色结果

A 为 TTC 染色结果,白色为梗死区域心肌;B 为梗死面积百分比( $n=5$ );  
a 为  $P < 0.05$ ,与 I/R 组比较。

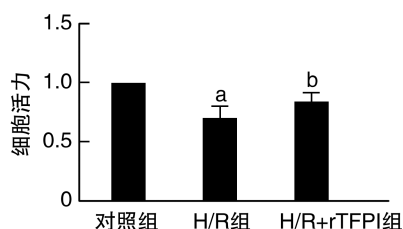
Figure 2. TTC staining results of rat myocardium after reperfusion



图 3. 心肌再灌注后大鼠心肌组织超微结构改变( $n=5$ )Figure 3. Ultrastructural changes of rat myocardium after myocardial reperfusion( $n=5$ )

#### 2.4 TFPI 减轻 H/R 后心肌细胞损伤

采用 CCK-8 法检测各组心肌细胞活力。设置对照组的细胞活力为 100%, H/R 组心肌细胞活力为  $(70.3\% \pm 2.89\%)$ , 较对照组下降了 29.70% ( $P < 0.05$ ); H/R+rTFPI ( $10 \mu\text{g/L}$ ) 组心肌细胞活力为  $(84.2\% \pm 2.89\%)$ , 较 H/R 组增加了 19.77% ( $P < 0.05$ ; 图 4)。

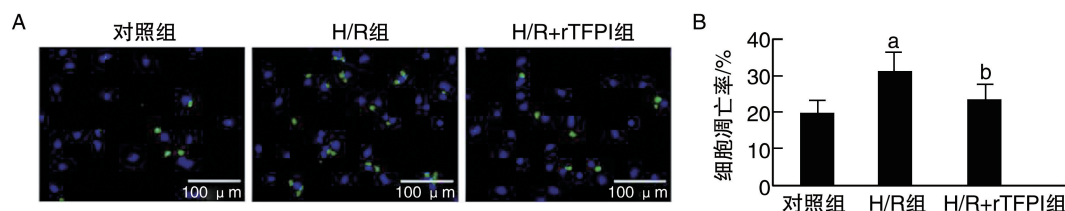
图 4. 心肌细胞活力检测( $n=5$ )

a 为  $P < 0.05$ , 与对照组相比; b 为  $P < 0.05$ , 与 H/R 组相比。

Figure 4. Detection of myocardial cell viability( $n=5$ )

#### 2.5 TFPI 减轻 H/R 后心肌细胞凋亡率

采用 TUNEL 法检测心肌细胞凋亡率, DAPI 染色阳性细胞表现为蓝色荧光, TUNEL 阳性细胞表现为绿色荧光。荧光显微镜观察结果显示: 各组视野可见均匀分布的蓝色荧光斑点, 表明 DAPI 染色标记细胞核成功; 对照组视野可见个别绿色荧光斑点, H/R 组较对照组绿色荧光斑点数目明显增多, H/R+rTFPI 组绿色荧光斑点数目较 H/R 组减少 (图 5A)。根据公式计算细胞凋亡率, 结果显示: 对照组细胞凋亡率为  $(20.03\% \pm 3.076\%)$ ; H/R 组细胞凋亡率为  $(31.40\% \pm 5.21\%)$ , 较对照组增加了 56.76% ( $P < 0.05$ ); H/R+rTFPI ( $10 \mu\text{g/L}$ ) 组细胞凋亡率为  $(23.69\% \pm 4.07\%)$ , 较 H/R 组降低了 24.55% ( $P < 0.05$ )。表明 H/R 后心肌细胞凋亡增加,  $10 \mu\text{g/L}$  rTFPI 可显著减轻 H/R 后心肌细胞凋亡 (图 5B)。

图 5. 心肌细胞凋亡率检测结果( $n=5$ )

A 为心肌细胞 TUNEL 荧光染色结果; B 为心肌细胞凋亡率。a 为  $P < 0.05$ , 与对照组相比; b 为  $P < 0.05$ , 与 H/R 组相比。

Figure 5. Detection results of cardiomyocyte apoptosis rate( $n=5$ )

#### 2.6 TFPI 抑制心肌凋亡相关蛋白的表达

在体内实验中, 再灌注 3 天后取心肌组织, Western blot 结果显示, I/R 组心肌组织中 Bcl-2 表达较对照组降低了 53.43% ( $P < 0.05$ ), Bax 和 cleaved Caspase-3 表达较对照组分别增加了 29.05% 和 73.25% ( $P < 0.05$ ); 而 I/R+rTFPI 组 Bcl-2 的表达水平较 I/R 组升高了 55.01% ( $P < 0.05$ ), Bax 和

cleaved Caspase-3 的表达水平较 I/R 组分别降低了 13.77% 和 24.25% ( $P < 0.05$ ; 图 6A)。

在体外培养心肌细胞中, Western blot 检测结果显示, H/R 组心肌细胞中 Bcl-2 表达较对照组降低了 46.92% ( $P < 0.05$ ), Bax 的表达较对照组增加了 41.90% ( $P < 0.05$ ), cleaved Caspase-3 的表达较对照组增加了 2.68 倍 ( $P < 0.05$ ); 而 H/R+rTFPI 组 Bcl-2

表达较 H/R 组增加了 28.24%, Bax 和 cleaved Caspase-3 的表达较 H/R 组分别降低了 26.34% 和 57.60% ( $P < 0.05$ ; 图 6B)。

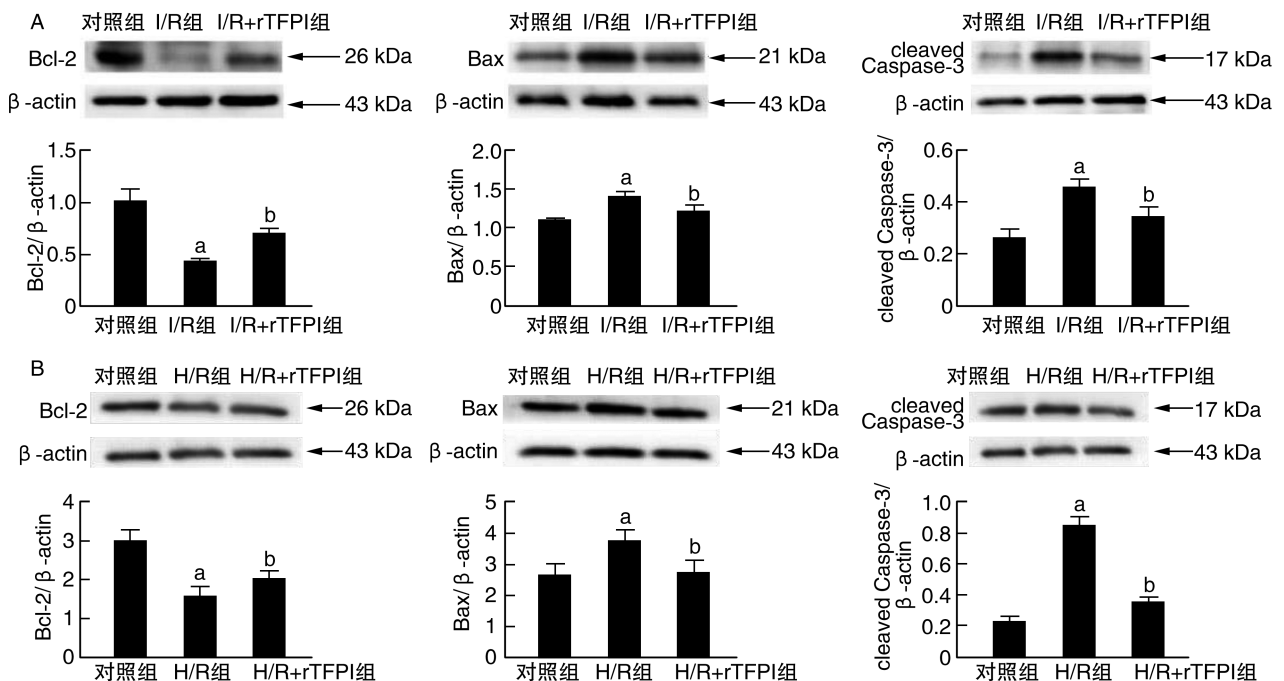


图 6. 凋亡相关蛋白表达的检测结果

A 为大鼠心肌组织 Bcl-2、Bax 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达 ( $n=5$ )。a 为  $P < 0.05$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与 I/R 组相比。

B 为心肌细胞中 Bcl-2、Bax 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达 ( $n=5$ )。a 为  $P < 0.05$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与 H/R 组相比。

Figure 6. Detection results of apoptosis related protein expression

### 3 讨论

心脏手术或 AMI 后的 I/R 损伤会造成心力衰竭、心源性休克等多种严重结果<sup>[9-10]</sup>, 然而再灌注仍是不可替代的治疗手段。目前鲜有预防 I/R 损伤的治疗方法, 因此探索新的内源性或外源性方法来减轻 I/R 损伤已成为一个热门研究领域。本研究拟寻找心肌 I/R 保护的新策略, 建立了大鼠体内及体外实验模型, 通过 rTFPI 后处理对心肌 I/R 损伤及心肌凋亡相关指标进行检测, 验证了 TFPI 在 I/R 过程中通过抑制心肌细胞凋亡来发挥对心肌损伤的保护作用。

越来越多的证据表明, I/R 损伤是一系列多机制参与的复杂的病理生理过程<sup>[11]</sup>, 其中细胞凋亡是不可或缺的重要环节。细胞凋亡是 ATP 和含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 (cysteiny aspartate specific proteinase, Caspase) 依赖性程序性细胞死亡的一种形式, 参与了多种心血管疾病的病理生理过程, 如心肌梗死、动脉粥样硬化和充血性心力衰竭等<sup>[12-13]</sup>。心肌细胞凋亡发生在 I/R 损伤过程中, 会

对心脏结构和功能造成不可逆的损害, 并且 I/R 诱导的细胞凋亡会进一步增加心肌细胞损伤的严重程度<sup>[14]</sup>。Caspase-3 作为凋亡的标志物被广泛应用于细胞凋亡的检测, 其在凋亡早期阶段被剪切激活为 cleaved Caspase-3 而发挥作用。本实验中, 心肌组织 I/R 后和细胞 H/R 后均出现了明显的组织/细胞损伤改变和凋亡现象, 细胞凋亡率增加, cleaved Caspase-3 和促凋亡相关蛋白 Bax 表达升高, 而抗凋亡相关蛋白 Bcl-2 表达降低, 说明 I/R 及 H/R 过程中凋亡增加, 与既往研究结果相一致。

目前已发现了许多抗凋亡途径, 如 PI3K/Akt 以及 JAK2/STAT3 等信号通路<sup>[15-16]</sup>。相应的一些抗凋亡物质如槲皮素<sup>[17]</sup>、七氟醚<sup>[18]</sup> 等也相继被发现。尽管这些研究为 I/R 后的心肌保护治疗方法提供可能性, 但尚未寻找到可投入临床实验的内源性或外源性物质。TFPI 是唯一有效的外源性凝血途径抑制物, 由 3 个串联的 kunitz 结构域组成, 主要来源于血管内皮细胞, 是体内控制凝血启动阶段的重要蛋白。TFPI 可通过抗栓、抗炎、抗血管重塑、抑制内皮细胞及 VSMC 增殖等多种机制参与多种心血管疾病

的发生进展。我们的前期实验发现 TFPI 通过抑制自噬减轻内皮细胞 H/R 损伤<sup>[19]</sup>, 随后又发现了 TFPI 在心肌细胞 H/R 中的保护作用(待发表)。基于自噬和凋亡的密切关系及 TFPI 在多种细胞中参与了凋亡调控<sup>[20]</sup>, 我们选择 TFPI 探索其对心肌细胞凋亡的影响。本研究结果提示: 加入外源性 rTFPI 后, 心肌组织 I/R 和细胞 H/R 后损伤程度和凋亡现象均减轻, 细胞凋亡率降低, 细胞活力升高, cleaved Caspase-3 和促凋亡相关蛋白 Bax 表达降低, 而抗凋亡相关蛋白 Bcl-2 表达升高, 表明 TFPI 在心肌 I/R 损伤中具有抑制凋亡的作用, 推测 TFPI 可能通过抑制心肌细胞凋亡来发挥对 I/R 后心脏的保护作用。

既往大量研究认为 TFPI 在动脉粥样硬化斑块<sup>[21-22]</sup>、肿瘤细胞<sup>[23]</sup>、平滑肌细胞<sup>[24]</sup>等具有促凋亡进而抑制细胞增殖的作用, 而本实验得出 TFPI 抑制细胞凋亡的结果, 其可能原因如下: (1) 既往研究将携带 TFPI 基因的病毒转染细胞, 使细胞高表达 TFPI, 其表达浓度可能远远超过生理剂量。本实验为模拟体内条件, 再灌注后给予了生理浓度的 TFPI, 不同剂量的 TFPI 对于细胞凋亡的影响可能不同。(2) 既往实验选用的肿瘤细胞、平滑肌细胞等增殖能力较强, 而心肌细胞作为不可再生细胞, 其细胞内环境、生理活动与上述细胞存在差异, 这可能成为 TFPI 对于心肌细胞与其他细胞凋亡作用不同的原因。(3) I/R 损伤引起细胞自噬与凋亡激活、自由基/活性氧形成、钙超载等复杂活动, 是对细胞一种强烈刺激<sup>[25]</sup>。既往关于 TFPI 与细胞凋亡的研究未在 I/R 条件下进行。本实验在 I/R 损伤的条件下加入生理浓度的 TFPI 得出其抑制凋亡的结果, 可能与 I/R 后细胞内生理活动变化有关。以上推测有待进一步验证。

综上, 心肌 I/R 及心肌细胞 H/R 后损伤和凋亡加重, rTFPI 后处理可减轻这一现象, 可能机制是通过调控凋亡相关蛋白发挥作用, 其调控靶点及通路有待进一步研究。本研究结果将为心肌 I/R 及其疾病的防治提供新的理论基础和可能的治疗手段。

#### [参考文献]

- [1] JENNINGS R B, SOMMERS H M, SMYTH G A, et al. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog[J]. Arch Pathol, 1960, 70: 68-78.
- [2] DONG Y, CHEN H, GAO J, et al. Molecular machinery and interplay of apoptosis and autophagy in coronary heart disease[J]. J Mol Cell Cardiol, 2019, 136: 27-41.
- [3] XIA B, LI Q, WU J, et al. Sinomenine confers protection against myocardial ischemia reperfusion injury by preventing oxidative stress, cellular apoptosis, and inflammation[J]. Front Pharmacol, 2022, 13(6): 922484.
- [4] NAKAMURA Y, NAKAMURA K, OHTA K, et al. Anti-inflammatory effects of long-lasting locally-delivered human recombinant tissue factor pathway inhibitor after balloon angioplasty[J]. Basic Res Cardiol, 2002, 97(3): 198-205.
- [5] XIAO J J, JIN K Y, WANG J P, et al. Conditional knockout of TFPI-1 in VSMCs of mice accelerates atherosclerosis by enhancing AMOT/YAP pathway[J]. Int J Cardiol, 2017, 228: 605-614.
- [6] HEMBROUGH T A, RUIZ J F, SWERDLOW B M, et al. Identification and characterization of a very low density lipoprotein receptor-binding peptide from tissue factor pathway inhibitor that has antitumor and antiangiogenic activity[J]. Blood, 2004, 103(9): 3374-3380.
- [7] DONG X, SONG L P, ZHU D W, et al. Impact of the tissue factor pathway inhibitor gene on apoptosis in human vascular smooth muscle cells[J]. Gene Mol Biol, 2011, 34(1): 25-30.
- [8] 王涵, 郭海, 郑宏. 原代心肌细胞缺氧/血预处理模型的建立与评价标准[J]. 新疆医学, 2016, 46(6): 626-629.  
WANG H, GUO H, ZHENG H. Establishment and evaluation of hypoxic and ischemic preconditioning model of primary cultured myocardial cells[J]. Xinjiang Med J, 2016, 46(6): 626-629.
- [9] BENJAMIN E J, VIRANI S S, CALLAWAY C W, et al. Heart disease and stroke statistics-2018 update: a report from the American Heart Association[J]. Circulation, 2018, 137(12): e67-e492.
- [10] ZHANG A, RASTOGI R, MARSH K M, et al. Topical neck cooling without systemic hypothermia attenuates myocardial ischemic injury and post-ischemic reperfusion injury[J]. Front Cardiovasc Med, 2022, 9(6): 893837.
- [11] WU Y, YC Z, ZHANG J, et al. Cathelicidin aggravates myocardial ischemia/reperfusion injury via activating TLR4 signaling and P2X7R/NLRP3 inflammasome[J]. J Mol Cell Cardiol, 2020, 139: 75-86.
- [12] TERINGOVA E, TOUSEK P. Apoptosis in ischemic heart disease[J]. J Transl Med, 2017, 15(1): 87.
- [13] LONG Q, LI L, YANG H, et al. SGLT2 inhibitor, canagliflozin, ameliorates cardiac inflammation in experimental autoimmune myocarditis[J]. Int Immunopharmacol, 2022, 110(7): 109024.
- [14] ZHANG G X, KIMURA S, MURAO K, et al. Inhibition of cytochrome c release by 10-N-nonyl acridine orange, a



- cardiolipin-specific dye, during myocardial ischemia-reperfusion in the rat [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010, 298(2): H433-H439.
- [15] WU Y S, LIU H Q, WANG X B. Cardioprotection of pharmacological postconditioning on myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *Life Sci*, 2021, 264: 118628.
- [16] CHAVES LAMARQUE G C, MÉNDEZ D A, MATOS A A, et al. *In vitro* effect of curcumin-mediated antimicrobial photodynamic therapy on fibroblasts: viability and cell signaling for apoptosis [J]. *Lasers Med Sci*, 2021, 36(6): 1169-1175.
- [17] WANG Y, ZHANG Z Z, WU Y, et al. Quercetin postconditioning attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury in rats through the PI3K/Akt pathway [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2013, 46(10): 861-867.
- [18] WU J J, YU J, XIE P, et al. Sevoflurane postconditioning protects the myocardium against ischemia/reperfusion injury via activation of the JAK2-STAT3 pathway [J]. *Peer J*, 2017, 5: e3196.
- [19] ZHAO Y, ZHU M L, CHEN W J, et al. TFPI $\alpha$  alleviated vascular endothelial cell injury by inhibiting autophagy and the class III PI3K/Beclin-1 pathway [J]. *Thromb Res*, 2020, 195(11): 151-157.
- [20] YANG Y, ZHANG C, LI S, et al. Tissue factor pathway inhibitor 2 suppresses the growth of thyroid cancer cells through by induction of apoptosis [J]. *Asia Pac J Clin Oncol*, 2021, 17(2): e48-e56.
- [21] 李辉, 马丹丹, 傅羽. 组织因子途径抑制物在动脉粥样硬化中的作用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2016, 24(3): 306-310.
- LI H, MA D D, FU Y. The role of tissue factor pathway inhibitor in atherosclerosis [J]. *Chin J Arterioscler*, 2016, 24(3): 306-310.
- [22] ZHAO Y, CHEN W, LIU Y, et al. Promoting plaque stability by gene silencing of monocyte chemotactic protein-3 or overexpression of tissue factor pathway inhibitor in ApoE<sup>-/-</sup> mice [J]. *J Drug Target*, 2021, 29(6): 669-675.
- [23] SIERKO E, WOJTUKIEWICZ M Z, KISIEL W. The role of tissue factor pathway inhibitor-2 in cancer biology [J]. *Semin Thromb Hemost*, 2007, 33(7): 653-659.
- [24] FU Y, ZHAO Y, LIU Y, et al. Adenovirus-mediated tissue factor pathway inhibitor gene transfer induces apoptosis by blocking the phosphorylation of JAK-2/STAT-3 pathway in vascular smooth muscle cells [J]. *Cell Signal*, 2012, 24(10): 1909-1917.
- [25] 刘丹勇, 夏正远, 韩荣辉, 等. 心肌缺血再灌注损伤机制研究的回顾与展望 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2020, 28(12): 1013-1019.
- LIU D Y, XIA Z Y, HAN R H, et al. Review and prospect on the mechanism of myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Chin J Arterioscler*, 2020, 28(12): 1013-1019.
- (此文编辑 许雪梅)