

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00167

## 稳定微管减少心肌缺血再灌注损伤

冯 健, 吴丁烨, 尤华彦, 李 坚, 王 强, 曹华明\*

南京医科大学附属无锡市人民医院心内科, 无锡 214023

**[摘要]** **目的** 探讨稳定微管能否减少心肌缺血再灌注损伤。**方法** (1)将离体大鼠心脏分为对照组、缺血组、缺血+0.1  $\mu\text{mol/L}$  泰素和缺血+1  $\mu\text{mol/L}$  泰素组( $n=15$ )。每组先给予 15 min 平衡后,对照组继续给予 50 min 常氧灌注;缺血组给予 20 min 常氧灌注+30 min 缺血处理;缺血+0.1  $\mu\text{mol/L}$ (或 1  $\mu\text{mol/L}$ )泰素组给予 20 min 常氧灌注,30 min 缺血处理,整个过程中均给予 0.1  $\mu\text{mol/L}$ (或 1  $\mu\text{mol/L}$ )泰素灌注。比较各组心律失常情况,观察微管形态结构并进行断裂评分。(2)将离体大鼠心脏分为正常对照组、缺血再灌注组和 1  $\mu\text{mol/L}$  泰素组( $n=8$ )。缺血再灌注组进行 Langendorff 灌注,结扎左前降支 30 min,再灌注 120 min;1  $\mu\text{mol/L}$  泰素组给予 1  $\mu\text{mol/L}$  进行灌注,其余处理同缺血再灌注组。灌注结束即刻冠脉内灌入伊文思蓝进行染色,比较各组心肌梗死面积。**结果** (1)0.1 和 1  $\mu\text{mol/L}$  泰素均能有效降低缺血性室性心律失常的发生,降低室性心律失常评分,且呈剂量依赖性( $P<0.05$ );并均能降低室性心动过速的发生率( $P<0.05$ )。(2)0.1  $\mu\text{mol/L}$  泰素灌注能降低微管断裂评分。(3)1  $\mu\text{mol/L}$  泰素灌注能明显缩小缺血再灌注心肌梗死区面积( $P<0.05$ )。**结论** 稳定微管能减少心肌缺血再灌注损伤。

**[关键词]** 泰素;微管;缺血性室性心律失常;心肌梗死;再灌注损伤

**[中图分类号]** R 542.22 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2013)02-0167-05

### Experimental research on stabilizing microtubules to decrease myocardial injury

FENG Jian, WU Ding-ye, YOU Hua-yan, LI Jian, WANG Qiang, CAO Hua-ming\*

Department of Cardiology, Wuxi People's Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Wuxi 213023, Jiangsu, China

**[Abstract]** **Objective** To study whether stabilizing microtubules can decrease myocardial ischaemic-reperfusion injury. **Methods** (1) The isolated rat hearts were divided into four groups ( $n=15$ ): control group, ischemic group, ischemic+0.1  $\mu\text{mol/L}$  Taxol group, and ischemic+1  $\mu\text{mol/L}$  Taxol group. All the groups were given a 15-min equilibration and then followed by different treatments: control group, 50 min normoxic superfusion; ischemia group, 20 min normoxic superfusion plus 30 min ischemia; and Taxol groups, 20 min normoxic superfusion plus 30 min ischemia, plus 0.1 or 1  $\mu\text{mol/L}$  Taxol throughout 50-min superfusion period. Arrhythmias scores were assessed and compared between different groups; the structure of the microtubules was observed and its breakage score was obtained. (2) The isolated rat hearts were divided into 3 groups ( $n=8$ ): normal control group, ischemic/reperfusion (I/R) group, and 1  $\mu\text{mol/L}$  Taxol group. The I/R group was Langendorff-perfused; the left anterior descending branch was ligated for 30 min and reperfused for 120 min. The Taxol group received 1  $\mu\text{mol/L}$  Taxol and other treatments were similar to the I/R group. Evans blue perfusion was used to observe the infarct size of each group. **Results** Stabilizing microtubules with Taxol (0.1  $\mu\text{mol/L}$  or 1  $\mu\text{mol/L}$ ) reduced ischaemic ventricular arrhythmia in a dose-dependent fashion ( $P<0.05$ ); it also significantly reduced arrhythmia scores and the incidence of ventricular tachycardia ( $P<0.05$ ). Taxol at 0.1  $\mu\text{mol/L}$  greatly decreased microtubule breakage score, and at 1  $\mu\text{mol/L}$  significantly reduced the infarct size compared with the control group ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Stabilizing microtubules can reduce myocardial ischaemic-reperfusion injury.

**[Key words]** Taxol; microtubules; ischaemic ventricular arrhythmia; myocardial infarction; reperfusion injury

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(2):167-171]

**[收稿日期]** 2012-10-25 **[接受日期]** 2012-12-31

**[基金项目]** 无锡市科技局医学技术重大项目(YGZ1104). Supported by Major Medical Project of Wuxi Science and Technology Bureau (YGZ1104).

**[作者简介]** 冯 健, 硕士, 主治医师. E-mail: 6873726@qq.com

\* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0510-85351581, E-mail: chm\_happy365@126.com

微管是心肌细胞骨架的重要组成部分,由 $\alpha$ 、 $\beta$ 微管蛋白组成,能够维持细胞结构及微管蛋白合成和降解的动态平衡<sup>[1-3]</sup>。微管支持着整个细胞结构、质膜、肌原纤维以及其他的细胞器<sup>[4]</sup>,形成支持细胞的网状结构,经这个网状结构,为线粒体、内质网以及一些其他的膜状细胞器的定位与转送提供通路。

缺血是常见的病理生理状态,缺血、缺氧可以导致心肌细胞内钙超载及细胞形态结构改变,破坏细胞骨架,从而诱发各种损伤改变,包括室性心律失常等<sup>[5]</sup>。心肌细胞缺血、缺氧可导致心肌细胞骨架损伤,而细胞骨架的紊乱又可引起细胞整体结构的改变,引起细胞损伤直至死亡<sup>[6]</sup>。泰素(Taxol)是一种常见的微管稳定剂,主要作用于微管蛋白/微管系统,促进微管蛋白聚合,抑制微管解聚<sup>[7]</sup>。本实验采用泰素作为微管稳定剂进行干预,考察稳定微管是否能有效降低心肌缺血再灌注损伤。

## 1 材料和方法

1.1 材料 取体质量在250~280 g的雄性成年SD大鼠,以颈椎脱臼法处死。快速取出心脏,放置于冰冷的K-H缓冲液(mmol/L):氯化钠118.0,氯化钾4.7,磷酸二氢钾1.2,碳酸氢钠25.0,硫酸镁1.2,氯化钙2.5,葡萄糖11.0。该研究中动物实验操作完全遵循实验动物保护和和使用准则。

泰素(Taxol, Sigma, USA)溶解于二甲基亚砜(DMSO)中。DMSO在灌流中确切的浓度与在离体细胞实验中的使用浓度一致,为1:1 000。单克隆 $\beta$ -微管蛋白抗体试剂盒(1:300, Abcam, UK),异硫氰酸荧光素标记的羊抗鼠免疫球蛋白试剂盒(1:300, Abcam, UK),罗丹明-鬼笔环肽试剂盒(1:70, Abcam, UK)。伊文思蓝(Sigma, USA)。

### 1.2 缺血性室性心律失常模型的建立及微管分裂检测

1.2.1 模型建立和分组 按照文献方法,建立室性心律失常模型<sup>[8]</sup>。将离体大鼠心脏分为对照组、缺血组、缺血+0.1  $\mu\text{mol/L}$ 泰素组和缺血+1  $\mu\text{mol/L}$ 泰素组( $n=15$ )。将离体心脏固定于Langendorff灌流装置上,以75 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa)压力持续灌流,调节K-H液pH值7.35~7.45,温度37℃。每组先给予95%  $\text{O}_2$ /5%  $\text{CO}_2$ 平衡15 min后,对照组继续给予50 min常氧灌注;缺血组给予20 min常氧灌注+30 min缺血处理;缺血+0.1

$\mu\text{mol/L}$ (或1  $\mu\text{mol/L}$ )泰素组给予20 min常氧灌注,30 min缺血处理,整个过程(50 min)中均给予0.1  $\mu\text{mol/L}$ (或1  $\mu\text{mol/L}$ )泰素灌流。缺血处理方法:在邻近左心房2 mm处结扎左侧冠状动脉。成功阻断血流后,冠脉流量至少减少25%左右,持续30 min。通过2,3,5-三苯基四氮(TTC)染色确定模型建立成功,没有发生任何坏死<sup>[9]</sup>。在整个左侧冠脉阻断过程前后,监测心电记录和冠脉流量率。

1.2.2 心律失常的评估和药物干预 心律失常的诊断参照兰贝斯公约的标准诊断<sup>[10]</sup>。在整个缺血过程中,根据观察到的最严重的心律失常,给予每个心脏一个评分。心律失常评分如下:0分,没有心律失常;1分,偶发室性早搏;2分,频繁室性早搏(>3个/min);3分,室性心动过速(发生1~2次);4分,室性心动过速(发生3~5次);5分,室性心动过速(>5次);6分,心室颤动(发生1~2次);7分,心室颤动(发生3~5次);8分,心室颤动(发生5次以上)。如果有以下情况发生,该实验即被终止或者数据被剔除:(1)缺乏成功冠脉阻断指征,如冠脉流量没有下降25%以上;(2)冠脉阻断前就发生了严重的心律失常,或阻断血流前5 min即出现严重的房室传导阻滞。

1.2.3 微管分裂检测 灌流结束时,给予碘酸钾-赖氨酸-多聚甲醛复合物灌流;将心脏制成2~3  $\mu\text{m}$ 厚度冰冻切片;固定于明胶涂层的玻片上,在磷酸盐缓冲液(PBS)中漂洗后对微管和肌丝进行鼠单克隆抗体标记 $\beta$ -微管蛋白(绿色)和罗丹明-鬼笔环肽(红色)双重染色,操作均严格按照试剂盒说明书进行;使用荧光显微镜进行观察。微管评分方法:从每个标本照片中随机选取20~40个视野进行高倍观察,对微管未着色或者着色弱的区域进行形态分析。每个标本做10个切片,并且成像。横切面的图片不纳入分析,其余图片被放大至18 cm×12 cm,对玻片上每一个格子(相距1 cm间隔)分别成像。每个被包绕格子状的微管结构的区域,被认为是“正常的范围”;如果这些结构丢失,将被认为是断裂混乱区。微管的评分为每一个标本中的断裂混乱区与总的观察区域(正常区域和断裂混乱区域)之比。

### 1.3 缺血再灌注损伤模型的建立及梗死范围测量

1.3.1 模型建立 按照文献建立缺血再灌注心肌梗死模型<sup>[11-12]</sup>。将离体大鼠心脏分为正常对照组、缺血再灌注组和1  $\mu\text{mol/L}$ 泰素组( $n=8$ )。将离体大鼠心脏固定于Langendorff灌流装置,给予K-H

缓冲液灌流。每组先平衡 15 min 后,对照组继续给予 150 min 常氧灌注;缺血再灌注组结扎左前降支 30 min 造成局域性心肌缺血,释放结扎再灌注 120 min;1  $\mu\text{mol/L}$  泰素组在缺血再灌注处理整个过程(150 min)中均给予 1  $\mu\text{mol/L}$  泰素进行灌流。

1.3.2 梗死范围测量 在灌流结束时,分离左冠状动脉,并灌注 2.5%伊文思蓝,对梗死危险区进行染色。切除着色区域,余下部分即为梗死危险区。随即进行冰冻切片,给予含 1%(质量体积分数)TTC 磷酸钠缓冲液孵育 15 min,使不着色的梗死区域变得更清晰。称量梗死区域组织重量,梗死范围大小用梗死区域与梗死危险区域之间的百分比表示。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件分析。数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,方差齐时采用方差分析比较组间差异,方差不齐时用秩和检验比较组间差异。检验水平( $\alpha$ )为 0.05。

## 2 结果

2.1 稳定微管能减少室性心律失常发生 微管稳定剂泰素能有效降低缺血性室性心律失常的发生,且呈现剂量依赖性。0.1 和 1  $\mu\text{mol/L}$  泰素室性心律失常评分较缺血组分别降低 47%和 92%,各组之间的差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ,图 1)。此外,0.1 和 1  $\mu\text{mol/L}$  泰素组室性心动过速的发生率均较缺血组低,缺血组、0.1 和 1  $\mu\text{mol/L}$  泰素组室性心动过速的发生率分别为 80%、40%和 13%( $P < 0.05$ ,图 2)。

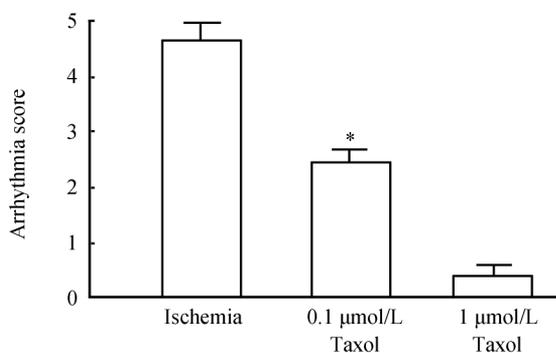


图 1 泰素对缺血性室性心律失常评分的影响

Fig 1 Effect of Taxol on ischemic ventricular arrhythmia score

\*  $P < 0.05$  vs ischemia group or 1  $\mu\text{mol/L}$  Taxol group.  $n = 15$ ,  $\bar{x} \pm s$

2.2 稳定微管对微管结构的保护作用 对照组可见微管结构完整,无明显断裂(图 3A1、A2);缺血组

可见微管连续中断,微管断裂(图 3B1、B2);0.1  $\mu\text{mol/L}$  泰素组可见微管结构基本完整,但稍有紊乱,然而,即使在微管断裂的细胞中,肌丝也还能保持完整(图 3C1、C2)。对照组中微管断裂评分较低,为(3.2  $\pm$  0.9)%;但在缺血组中,评分升为(28.8  $\pm$  6.7)%( $P < 0.01$ )。加入 0.1  $\mu\text{mol/L}$  泰素干预后,微管断裂评分降到(9.8  $\pm$  1.9)% ( $P < 0.05$ )。

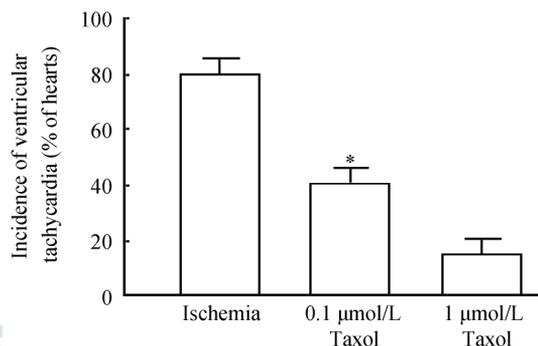


图 2 泰素对缺血性室性心动过速的影响

Fig 2 Effect of Taxol on ischemic ventricular tachycardia

\*  $P < 0.05$  vs ischemia group or 1  $\mu\text{mol/L}$  Taxol group.  $n = 15$ ,  $\bar{x} \pm s$

2.3 稳定微管降低梗死区面积 在离体的大鼠心肌缺血再灌注模型中,1  $\mu\text{mol/L}$  泰素能缩小梗死区面积( $P < 0.05$ ,图 4)。

## 3 讨论

本实验证实,泰素对微管结构具有保护作用。稳定微管能有效降低缺血性室性心律失常发生率,且呈现剂量依赖性,也能有效降低室性心动过速的发生率,缩小再灌注模型中的心肌梗死面积。

作为微管稳定剂的泰素,其主要靶位点是微管蛋白/微管系统,它能促进微管蛋白聚合抑制微管解聚。泰素体外诱导微管蛋白在不含 GTP 或丝裂原活化蛋白(mitogen-activated proteins, MAPs)条件下形成超稳定微管结构,从而抑制解聚作用。此外,泰素还可在体外降低微管蛋白聚合的临界浓度,增加微管聚合的速度和产量,并可使微管蛋白在缺乏微管相关蛋白、GTP 或低温等条件下仍能产生聚合,是重要的微管工具药物<sup>[7]</sup>。

本实验用缺血再灌注模型进行研究。目前多数学者认为,缺血再灌注损伤是多种因素共同作用的结果,多种损伤因素之间相互作用、相互促进,共同

导致缺血再灌注损伤的发生,在这一过程中氧自由基生成增加和钙超载作用尤为重要<sup>[13-15]</sup>。缺血再灌注时生成的自由基可促进钙超载,胞浆内游离钙增加又加速了自由基的产生,共同导致缺血再灌注损

伤<sup>[16]</sup>。本实验表明,泰素能够保护缺血心肌。这和泰素稳定微管并维持其完整性密切相关。泰素是否通过减少钙超载、氧自由基产生来保护缺血心肌,有待进一步证实。

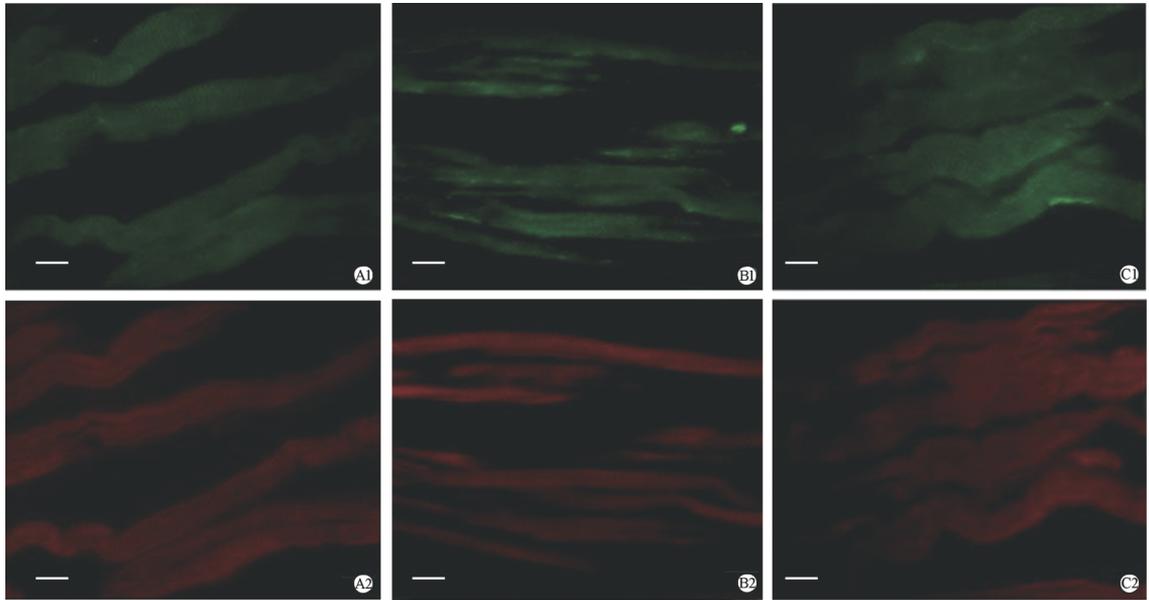


图3 微管的形态结构  
Fig 3 Microtubule morphology

Microtubule structure is integral and with no fracture in control group (A1,A2); in the ischemic group (B1,B2), the microtubule continuity is interrupted, and microtubule fracture can be found; in 0.1 μmol/L Taxol group (C1,C2), the microtubule structure is integral, with less thickening and disorders. Bar=40 μm



图4 泰素降低心肌梗死面积  
Fig 4 Taxol decreased infarct size

A: Representative sections showing the infarct area (white, arrowed); B: Relative infarct size. \* P<0.05 vs ischemia/reperfusion (I/R) group. n=8, x±s

#### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

#### [参考文献]

[1] Bloom K. Microtubule composition: cryptography of dynamic polymers[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004,

101:6839-6840.

[2] Garrison A K, Shanmugam M, Leung H C, Xia C, Wang Z, Ma L. Visualization and analysis of microtubule dynamics using dual color-coded display of plus-end labels [J]. PLoS One, 2012, 7: e50421.

[3] Gardner M K, Zanic M, Howard J. Microtubule catastrophe and rescue [J]. Curr Opin Cell Biol, 2012, Oct 21 [Epub ahead of print].

- [4] Gerdes J M, Katsanis N. Small molecule intervention in microtubule-associated human disease [J]. *Hum Mol Genet*, 2005, 14: R291-R300.
- [5] Dinsdale D, Lee J C, Dewson G, Cohen G M, Peter M E. Intermediate filaments control the intracellular distribution of caspases during apoptosis [J]. *Am J Pathol*, 2004, 164: 395-407.
- [6] Prunier F, Kawase Y, Gianni D, Scapin C, Danik S B, Ellinor P T, et al. Prevention of ventricular arrhythmias with sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  ATPase pump over-expression in a porcine model of ischemia reperfusion [J]. *Circulation*, 2008, 118: 614-624.
- [7] Orr G A, Verdier-Pinard P, McDaid H, Horwitz S B. Mechanisms of taxol resistance related to microtubules [J]. *Oncogene*, 2003, 22: 7280-7295.
- [8] Solskov L, Lofgren B, Pold R, Kristiansen S B, Nielsen T T, Overstreet D H, et al. Evaluation of the relationship between hyperinsulinaemia and myocardial ischaemia/reperfusion injury in a rat model of depression [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2010, 118: 259-267.
- [9] Chen X, Cui K, Xiu J, Lin H, Lao Y, Zhou B, et al. Evaluation and simplified measurement of infarct size by myocardial contrast echocardiography in a rat model of myocardial infarction [J]. *Int J Cardiovasc Imaging*, 2009, 25: 713-716.
- [10] Walker M J, Curtis M J, Hearse D J, Campbell R W, Janse M J, Yellon D M, et al. The Lambeth Conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia infarction, and reperfusion [J]. *Cardiovasc Res*, 1988, 22: 447-455.
- [11] Cao C M, Xia Q, Gao Q, Chen M, Wong T M. Calcium-activated potassium channel triggers cardioprotection of ischemic preconditioning [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005, 312: 644-650.
- [12] Cao H M, Wang Q, You H Y, Li J, Yang Z Y. Stabilizing microtubules decreases myocardial ischaemia-reperfusion injury [J]. *J Int Med Res*, 2011, 39: 1713-1719.
- [13] del M F, Lebeche D, Guerrero J L, Tsuji T, Doye A A, Gwathmey J K, et al. Abrogation of ventricular arrhythmias in a model of ischemia and reperfusion by targeting myocardial calcium cycling [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 5622-5627.
- [14] Bers D M. Calcium and cardiac rhythms: physiological and pathophysiological [J]. *Circ Res*, 2002, 90: 14-17.
- [15] Clusin W T. Mechanisms of calcium transient and action potential alternans in cardiac cells and tissues [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008, 294: H1-H10.
- [16] Thurman J M. Triggers of inflammation after renal ischemia/reperfusion [J]. *Clin Immunol*, 2007, 123: 7-13.

[本文编辑] 尹茶

· 消 息 ·

## 上海市中西医结合学会脊柱专业委员会脊柱微创外科高峰论坛隆重召开

日前,上海市中西医结合学会脊柱专业委员会脊柱微创外科高峰论坛在上海浦东国际会议中心隆重召开。本次论坛由中国中西医结合学会和上海市中西医结合学会脊柱专业委员会共同主办,第二军医大学长海医院骨科承办,与会嘉宾包括上海市中西医结合学会的领导、80余位国内外著名脊柱外科专家及上海市各大医院的骨科主任,200余名来自上海各级医院的骨科医生参加了学术交流。

本次论坛的主题是脊柱微创外科技术,主要展示了近年来国际、国内脊柱微创外科领域的最新进展,与会专家围绕脊柱微创外科的手术指征、手术技术、并发症处理、数字化医学、机器人技术等问题进行了热烈的讨论和深度的交流。本次论坛还安排了丰富多彩的病例分析、病例讨论,参会的医生们踊跃发言,多位脊柱外科专家对此进行了精彩点评。

上海市中西医结合学会脊柱专业委员会自成立以来,本着中西贯通、服务为民的宗旨和资源分享、共促学术的科研精神,定期进行学术交流,推动了传统医学和西方医学在脊柱外科的科学结合,为脊柱外科的发展做出了贡献。