

# 激活补体引起离体豚鼠工作心脏的损伤 及 CD<sub>59</sub>的保护作用

吴素华<sup>1</sup>, 马虹<sup>1</sup>, 黄守坚<sup>2</sup>, 吴楚昆<sup>2</sup>, 王锦群<sup>2</sup>

(中山医科大学 1. 附属第一医院心内科, 2. 药理教研室, 广东 广州 510080)

**摘要:**【目的】探讨激活补体是否会引起心肌缺血损伤, 以及膜结合型补体调节蛋白 CD<sub>59</sub>对补体引起的心肌缺血损伤有无保护作用。【方法】18只豚鼠离体工作心脏随机分为: A组(对照组), 在灌注液中加入体积分数为3%灭活人血浆+酵母多糖; B组, 在灌注液中加入3%人血浆+酵母多糖; C组: 在灌注液中加入 CD<sub>59</sub>(450 μg)+3%人血浆+酵母多糖。记录各组处理前及处理后15、30、45和60 min的心外膜心电图ST段变化、冠脉流量(CF)、心输出量(CO)、左心室最大内压(LVP<sub>max</sub>)、左心室内压最大上升速率(dp/dt<sub>max</sub>)和心率(HR)。【结果】A组处理前后各项观察指标无明显变化; B组在接受处理后心外膜心电图出现ST段抬高、HR增加, CF、CO、LVP<sub>max</sub>和 dp/dt<sub>max</sub>均下降, 这些变化以处理后45 min最明显; C组除处理后45~60 min时心率稍增快外, 其余指标处理前后无明显变化。【结论】激活补体可直接引起豚鼠工作心脏心肌缺血损伤, CD<sub>59</sub>对补体介导的心肌缺血损伤有保护作用。

关键词: 补体激活; 心肌缺血; 心脏功能试验; 抗原, CD<sub>59</sub>

中图分类号: R 331.31 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2000)03-0186-04

## Isolated Guinea-Pig Working Hearts Injured by Activation of Complements and Protection of CD<sub>59</sub>

WU Su-hua<sup>1</sup>, MA Hong<sup>1</sup>, HUANG Shou-jian<sup>2</sup>, WU Chu-kun<sup>2</sup>, WANG Jin-qun<sup>2</sup>

(1. Department of Cardiology, First Affiliated Hospital, 2. Department of Pharmacology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:**【Objective】To observe that activated human complements directly injure isolated guinea-pig working hearts and CD<sub>59</sub> prevents it. 【Methods】Isolated guinea-pig working hearts perfused with 3% denatured human plasma and zymosan in group A (control), 3% normal human plasma and zymosan in group B and 3% normal human plasma and CD<sub>59</sub>(450 μg) and zymosan in group C, respectively. Of these 3 groups, epicardial electrocardiogram (ECG) and coronary flow (CF), cardiac output (CO), maximum left ventricular developed pressure (LVP<sub>max</sub>), maximum left ventricular pressure rise rate (dp/dt<sub>max</sub>) and heart rate (HR) were recorded before and after 15, 30, 45 and 60 min perfusion. 【Results】No apparent change in all above parameters was seen in group A before and after perfusion; elevation of ST segment, faster HR and decrease in CF, CO, LVP<sub>max</sub> and dp/dt<sub>max</sub> were observed in group B, most prominent at 45 min after perfusion; only slight increase in HR in all observed parameters was observed in group C at 45~60 min after perfusion. 【Conclusion】Activated human complements directly injured isolated guinea-pig working hearts and CD<sub>59</sub> prevents it.

**Key words:** complement activation; myocardial ischemia; heart function tests; antigens, CD<sub>59</sub>

整体动物实验表明, 补体活化参与心肌缺血损伤过程<sup>[1-3]</sup>。由于整体动物存在复杂的神经体液

收稿日期: 1999-11-15

基金项目: 卫生部基金资助项目(96-1-115)

作者简介: 吴素华(1966-), 男, 江西进贤人, 在职博士生, 主治医师。

© 1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

调节,补体活化后还可趋化中性粒细胞和血小板聚集,间接引起心肌缺血损伤<sup>4,5</sup>,因此尚不清楚补体活化引起心肌缺血损伤是补体激活产物的直接作用,还是补体活化后通过神经体液调节或中性粒细胞和血小板聚集而间接引起心肌缺血损伤。为此,我们用离体豚鼠工作心脏模型,在排除神经体液因素以及血细胞影响下,探讨激活补体是否会引起心肌缺血损伤,以及膜结合型补体调节蛋白 CD<sub>59</sub>对心肌缺血损伤有无保护作用。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

低渗破膜超滤所得的人红细胞基质用木瓜蛋白酶消化,以去除无抗木瓜蛋白酶作用的杂蛋白,正丁醇抽提的饱和液相过 DEAE-Sephadex A 25 阴离子交换柱(2.6 cm×30 cm)层析,含 0~0.5 mol/L NaCl 的缓冲液洗脱,取 CD<sub>59</sub>活性组分用 Sephadex G75 凝胶过滤柱(3.5 cm×90 cm)层析纯化脱盐。纯化的 CD<sub>59</sub>经还原性 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)呈单一区带,相对分子质量为 19 ku。酵母多糖(zymosan)购自 Sigma 公司。

### 1.2 实验装置

灌注装置包括 Langerdorff 逆行灌注系统,左心房顺灌注系统和恒温系统。记录部分用于记录左室内压(LVP)、左室内压上升速率(dp/dt)、心率(HR)、主动脉流量(AF)、冠脉流量(CF)、心外膜心电图等<sup>6</sup>。

### 1.3 动物准备

18 只雄性豚鼠,体质量(450±24)g。击豚鼠头部致昏,开胸,迅速取出心脏,置于预先准备好的 0℃灌注液中,使心跳迅速停止。经主动脉逆行插管,用注射器注入 0℃的灌注液冲洗干净冠脉血液,迅速与灌注装置相连,用 Langendorff 法在灌注压 70 cmH<sub>2</sub>O 下逆向灌注 37℃的改良 Krebs 液(NaCl 11.2 mol/L, KCl 5.7 mol/L, MgCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O 1.2 mol/L, CaCl<sub>2</sub> 2.5 mol/L, NaHCO<sub>3</sub> 26.2 mol/L, Na<sub>2</sub>-EDTA 0.5 mol/L, Na-Pyruvate 2.0 mol/L, Glucose 11 mol/L)使心脏复跳。在左心房上部剪一小口插管,关闭逆流改逆灌为顺灌。左心室输出液通过直径 4 mm 套管式电磁流量计探头及缓冲瓶后至 70 cm 高处。接着在心尖部插管,并与压力换能器(statham, U.S.A)连接,记录 LVP, dp/dt。在右心房表面和心

尖部放置滤纸电极,记录心外膜心电图。

### 1.4 实验分组

18 只豚鼠随机分为 3 组,每组 6 只。A 组(对照组):用体积分数为 3% 56℃30 min 灭活人血浆+酵母多糖(补体激活物)。实验时用于循环的灌注液约 300 mL,先按每 100 mL 灌注液中加入 1 mg 酵母多糖,待灌注液循环 5 min 后再加入灭活血浆(血浆中补体已被灭活)约 9 mL(300 mL 灌注液加入 9 mL 灭活血浆,即 3%灭活血浆)。B 组:用 3%人血浆+酵母多糖。加血浆和酵母多糖的方法与 A 组一样。C 组:用膜结合型补体调节蛋白 CD<sub>59</sub>+3%人血浆+酵母多糖。把 CD<sub>59</sub> 450 μg 加入 9 mL 人血浆中(即每 mL 血浆加入 50 μg CD<sub>59</sub>),在 37℃条件下孵育 30 min。按 A 组方法在灌注液中加入酵母多糖并循环 5 min 后,加入已孵育 30 min 的血浆和 CD<sub>59</sub>混合液。

### 1.5 心外膜心电图描记

把两个浸泡生理盐水的滤纸电极分别贴在右心房和心尖部,通过多导电生理记录仪(LMS-2B)记录心外膜心电图。在各组处理前及处理后 15、30、45 和 60 min 分别描记心外膜心电图,描记纸速为 25 mm/s,记录 ST 段移位情况。

### 1.6 血流动力学指标描记

主动脉流量(AF)通过套管式电磁流量计(MFV-1200, Japan)读出,每分钟右心房收集液的毫升数为 CF(mL/min)。心输出量(CO)=CF+AF。多导电生理记录仪可直接描记 dp/dt<sub>max</sub>, LVP<sub>max</sub> 和 HR。

### 1.7 统计学处理

计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,显著性检验用 *t* 检验和方差分析。

## 2 结 果

### 2.1 豚鼠工作心脏的稳定性

对照组(A 组)工作心脏 2 h 内心脏做功恒定,心外膜心电图无明显缺血改变,未见严重心律失常出现,冠脉收集液中肌酸磷酸激酶(CK)在 2 h 内亦稳定在较低水平 20 U/L±4 U/L。

### 2.2 激活补体对心肌的影响及 CD<sub>59</sub>的保护作用

心外膜心电图结果见表 1 和图 1。3 组处理前 ST 段移位无统计学差异(*P*>0.05)。B 组在处理 15 min 出现 ST 段压低,30 min 时 ST 段变为明显

抬高,似急性心肌梗死的心电图改变,这种变化以45 min最为明显。在45~60 min期间出现频发室早,房室传导阻滞,60 min后见心脏前壁呈紫色,收缩明显减弱,触摸时有明显的僵硬感。A组无类似变化。C组在处理前后各时间点ST段无明显变化,与A组比较 $P > 0.05$ 。C组在实验开始至60 min内未出现频发室早、房室传导阻滞等心律失常。血流动力学改变见表2。B组在处理15 min即

可见HR增快,  $dp/dt_{max}$ 、 $LVP_{max}$ 下降, CF、CO减少,这些变化在45 min时最为明显。A组无类似变化。C组在处理前后各时间点 $dp/dt_{max}$ 、 $LVP_{max}$ 、CO、CF无明显变化,与对照组比较无显著性差异,但在45~60 min期间心率稍加快。60 min后C组豚鼠心脏前壁呈正常颜色,无明显收缩运动减弱,触摸弹性良好。

表1 豚鼠工作心脏处理前后心外膜心电图ST段的变化

Table 1 The ST segment changes of epicardial ECG of guinea-pig isolated hearts before and after different treatment (V/mV)

Group (n=6)	Before treatment	After treatment			
		15 min	30 min	45 min	60 min
A	-0.07±0.02	-0.05±0.02	-0.03±0.01	-0.04±0.01	-0.03±0.01
B	-0.05±0.01	-0.20±0.04 <sup>1)</sup>	+0.41±0.10 <sup>2)</sup>	+0.60±0.16 <sup>2)</sup>	+0.52±0.13 <sup>2)</sup>
C	-0.04±0.01	-0.11±0.03	-0.04±0.01	-0.07±0.02	-0.08±0.02

A: 3% denatured human plasma and zymosan, B: 3% normal human plasma and zymosan, C: 3% normal human plasma and CD<sub>59</sub>;

Compared with group A: 1)  $P < 0.05$  2)  $P < 0.01$

表2 3组处理前后离体心脏功能指标

Table 2 Isolated hearts functional parameters before and after treatment in three groups

	Before treatment	After treatment (t/min)			
		15	30	48	60
CF (mL/min)					
A	9.0±2.1	9.1±2.0	8.7±2.3	8.5±2.1	8.6±1.9
B	9.1±2.1	6.0±1.3 <sup>2)</sup>	4.3±1.1 <sup>2)</sup>	3.6±0.9 <sup>2)</sup>	3.8±1.2 <sup>2)</sup>
C	8.8±2.0	8.9±1.7	8.0±1.9	8.2±2.1	8.3±1.9
CO(mL/min)					
A	26.7±4.5	26.1±5.1	25.8±4.9	25.2±5.3	25.1±4.8
B	26.5±4.3	20.0±3.8 <sup>1)</sup>	14.8±3.0 <sup>2)</sup>	11.3±2.1 <sup>2)</sup>	12.3±2.2 <sup>2)</sup>
C	26.1±4.0	25.4±3.6	24.6±3.9	23.2±3.8	24.0±4.1
$dp/dt_{max}$ (kPa/s)					
A	245±45	241±44	238±43	236±39	237±42
B	240±44	202±32 <sup>2)</sup>	176±27 <sup>2)</sup>	151±24 <sup>2)</sup>	157±26 <sup>2)</sup>
C	242±47	236±43	230±40	226±38	232±45
$LVP_{max}$ (kPa)					
A	9.4±1.7	9.3±1.5	9.7±1.9	9.1±1.2	9.2±1.3
B	9.6±1.9	7.5±1.2 <sup>1)</sup>	6.8±1.1 <sup>2)</sup>	6.0±0.9 <sup>2)</sup>	6.1±0.7 <sup>2)</sup>
C	9.3±1.4	9.1±1.5	8.8±1.9	9.1±1.7	9.2±1.3
HR(bpm)					
A	135±24	140±26	137±21	135±23	138±24
B	136±24	146±29	154±31 <sup>2)</sup>	158±34 <sup>2)</sup>	156±35 <sup>2)</sup>
C	133±27	138±24	142±26	149±28 <sup>1)</sup>	147±27 <sup>1)</sup>

Compared with group A: 1)  $P < 0.05$ , 2)  $P < 0.01$

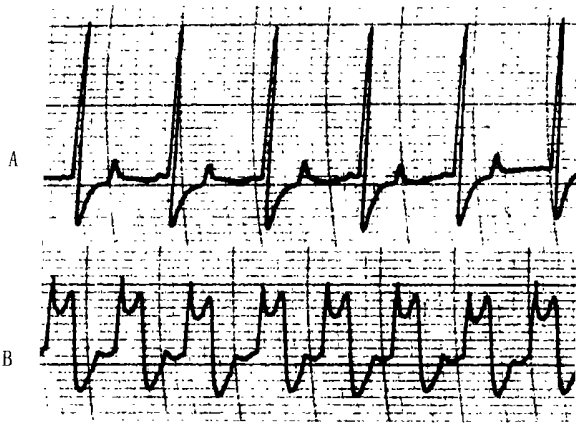


图1 3%人血浆+酵母多糖处理后豚鼠工作心脏心外膜心电图的变化

Fig. 1 The changes on epicardial ECG of isolated guinea-pig hearts treated with 3% normal human plasma and zymosan

A: normal ST segment before treatment; B: ST segment elevated and amplitude of QRS wave decreased after 45 min treated with 3% normal human plasma and zymosan

### 3 讨论

结扎冠脉致心肌缺血损伤模型中,在缺血区心脏可见补体激活产物沉积。整体动物存在复杂的神经体液调节,而且补体激活又可能通过引起中性粒细胞聚集加重心肌缺血损伤<sup>[4,5,7]</sup>。目前尚不清楚激活补体在心肌缺血损伤的作用及具体机制。离体工作心脏可较好地研究激活补体引起心肌缺血损伤的机制。

本研究在灌注液中加入人血浆和补体激活物酵母多糖后,15 min 后心外膜心电图出现缺血性ST段移位(先ST段压低,后ST段抬高),同时HR加快, LVP<sub>max</sub>、dp/dt<sub>max</sub>下降,CO减少。上述变化以45 min 时最为明显。给予已灭活补体的血浆和酵母多糖时不出现上述变化。这些结果说明激活补体可直接导致心肌缺血,并继发心肌收缩力下降、心脏做功减少。

补体激活后可形成补体 C3 和 C5 转化酶,通过一系列酶促反应最终形成膜复合物 C<sub>5b-9</sub>,直接损伤血管内皮和心肌细胞的完整性。CD<sub>59</sub>是 80 年代末首先从红细胞膜上分离出来的一种膜结合型补体调节蛋白,是一种由 103 个氨基酸组成的单链酸性糖蛋白。研究证实, CD<sub>59</sub> 可阻碍攻膜复合物 C<sub>5b-9</sub> 在细胞膜上组装。本研究发现,在血浆和酵

母多糖中加 CD<sub>59</sub> 后没有出现明显的心肌损伤,在各时间点心外膜心电图无明显 ST 段移位, dp/dt<sub>max</sub>、LVP<sub>max</sub>、CF、CO 无明显下降。这说明 CD<sub>59</sub> 对补体活化引起的心肌缺血损伤具有保护作用,提示在离体动物补体活化引起心肌缺血损伤的主要机制可能是膜复合物 C<sub>5b-9</sub> 对心脏的直接损伤作用。由于人急性心肌梗塞时存在补体激活现象,在急性心肌梗塞时使用补体调节蛋白(如 CD<sub>59</sub>)也许能减轻心肌缺血损伤,限制梗塞范围,值得进一步研究。

离体工作心脏保留了 Langendorff 标本的优点,并改逆行灌注为顺行灌注,即左心房插管灌注,记录左心室输出,能计算心输出量和心脏做功的大小;能方便地控制心脏前负荷和后负荷;并能排除神经体液的影响。因此离体工作心脏适宜研究在没有神经体液因素影响下,激活补体引起心脏损伤的机制以及某些生物活性物质(如 CD<sub>59</sub>)对心脏缺血损伤的保护作用。本研究对照组 2 h 内心脏做功可保持正常,心脏收缩性稳定,心电图稳定。灌注液中酶活性低,心外膜心电图 ST 段相对较恒定,能满足本实验要求。

### 参考文献:

- [1] Karmazyn M. Ischemic and reperfusion injury in the hearts. Cellular mechanisms and pharmacological interventions [J]. Can J Physiol Pharmacol, 1991, 69(6): 719.
- [2] Hansen P R. Role of neutrophils in myocardial ischemia and reperfusion [J]. Circulation, 1995, 91(7): 1872.
- [3] Homeister J W. Complement activation and inhibition in myocardial ischemia and reperfusion injury [J]. Ann. Rev Pharmacol Toxicol, 1994, 34(4): 17.
- [4] Smith E F. Neutrophil mediated myocardial injury [J]. Int J Biochem, 1993, 25(2): 147.
- [5] Lucchesi B R. Complement, neutrophils and free radicals: mediators of reperfusion injury [J]. Arzneimittelforschung, 1994, 44(3A): 420.
- [6] Huang S J, Wu C K, Sun J J. Positive inotropic and toxic action of direct lytic factor on isolated working guinea pig hearts [J]. Acta Pharmacol Sin, 1991, 12(2): 125.
- [7] Crawford M H, Droych E H, Cdile R E, et al. Complement and neutrophil activation in the pathogenesis of ischemic myocardial injury [J]. Circulation, 1988, 78(9): 1449.

(编辑 黄小延)