

脱细胞小肠粘膜下层对心肌梗死大鼠的保护作用研究

石哲玮

浙江省诸暨市人民医院心血管内科

DOI:10.12238/bmtr.v7i3.14458

[摘要] 目的：探究脱细胞小肠粘膜下层(decellularized small intestinal submucosa, dSIS)在改善心肌梗死引起的心肌组织损伤过程中的作用。方法：构建心肌梗死大鼠模型并给予dSIS心尖注射处理。将所有大鼠分为三组：假手术组、心肌梗死组、dSIS处理组。通过心脏彩超检测各组大鼠心脏功能情况。通过Western blot实验检测各组大鼠心肌组织中纤维化相关蛋白表达水平。结果：心肌梗死组大鼠心脏功能较假手术组显著减退,心肌组织中Collagen I、 α -SMA蛋白表达水平显著增加。dSIS处理组大鼠心脏功能较心肌梗死组显著改善,心肌组织中Collagen I、 α -SMA蛋白表达水平显著降低。结论：dSIS对心肌梗死所致的心脏功能减退、心肌组织纤维化具有改善作用。

[关键词] 脱细胞小肠粘膜下层；心肌梗死；纤维化

中图分类号：R542.2+1 **文献标识码：**A

Protective Effects of Decellularized Small Intestinal Submucosa on Myocardial Infarction in Rats

Zhewei Shi

Department of Cardiovascular Medicine, Zhuji People's Hospital of Zhejiang Province

[Abstract] Objective: To investigate the effect of decellularized small intestinal submucosa (dSIS) on mitigating myocardial tissue injury caused by myocardial infarction (MI). Methods: A rat model of myocardial infarction was established, followed by apical injection of dSIS. All rats were divided into three groups: sham operation group, MI group, and dSIS treatment group. Cardiac function was assessed using echocardiography. The expression levels of fibrosis-related proteins in myocardial tissue were detected by Western blot. Results: Compared with the sham operation group, rats in the MI group showed significantly impaired cardiac function and the expression of Collagen I and α -SMA in myocardial tissue were markedly increased. In contrast, the dSIS treatment group exhibited significantly improved cardiac function and the expression of Collagen I and α -SMA compared to the MI group were markedly reduced. Conclusion: dSIS can improve cardiac function and reduce myocardial fibrosis induced by MI in rats.

[Key words] Decellularized small intestinal submucosa; Myocardial infarction; Fibrosis

前言

心肌梗死是指由于冠状动脉持续性缺血缺氧,导致心肌组织发生缺血性坏死的一种急性心血管事件,是全球范围内导致死亡和致残的主要原因之一。急性心肌梗死的再灌注治疗虽能显著降低患者短期死亡率,但远期心脏重构、心功能下降与慢性心力衰竭的发生率仍居高不下^[1]。因此,如何在急性心肌梗死发生后有效保护心肌、减轻心脏纤维化、抑制有害重构,是改善患者预后的重要研究方向。

心脏纤维化是心肌梗死后心室重构的关键病理基础,其过程受多种信号通路调控,包括TGF- β /Smad、Ang II、NF- κ B及炎症因子介导的旁分泌机制^[2]。目前临床中用于抗心脏纤维化的药物疗效有限,且常伴随多种不良反应,因此探索更有效的组

织修复策略以抑制心肌纤维化、促进心脏功能恢复具有重要临床价值。

脱细胞小肠粘膜下层(decellularized small intestinal submucosa, dSIS)是来源于猪小肠的一种致密、不含细胞的结缔组织。由于dSIS具有良好的生物相容性、生物活性、机械延展性和抗感染性,目前已被广泛应用于组织再生和修复过程^[3]。本研究旨在验证dSIS在心肌组织损伤修复中的可行性与机制基础,从而为心肌梗死的临床治疗提供新的治疗手段。

1 资料与方法

1.1 猪源性SIS脱细胞基质的制备

采集屠宰后4小时内的健康猪小肠。用机械方法切除小肠的浆膜、肌层和粘膜并用去离子水冲洗剩余的SIS。dSIS制备的具

体方法是SIS依次用丙酮和乙醇(2: 1, v/v)处理4小时。接着, 用0. 05%胰蛋白酶和0. 02% EDTA在37℃下处理8小时。随后, 用4%SDS和3%TritonX-100处理24小时。紧接着, 用0. 1%过氧乙酸和20%乙醇处理30 min。最后, 用去离子水彻底冲洗dSIS, 去除残留的试剂并进行冻干, 从而得到具有优良的生物相容性和生物活性的dSIS材料。

1. 2实验动物

本实验从上海斯莱克实验动物有限公司采购200g雄性Sprague Dawley大鼠共18只, 该公司的生产许可证编号为SCXK(沪)2012-0002。本实验动物主要饲养于温州医科大学实验动物中心和本院中心实验室, 动物使用许可证编号为SYXK(浙)2015-0009。

1. 3分组及模型构建

根据本课题组前期研究成果, 将18只雄性SD大鼠采用随机数表法随机分为3组: 假手术组、心肌梗死组、dSIS处理组, 每组各6只。假手术组大鼠仅给予开胸处理, 心肌梗死组和dSIS处理组大鼠通过结扎冠状动脉前降支构建心肌梗死动物模型。dSIS处理组大鼠在关胸前给予dSIS心尖注射治疗, 每只大鼠共选择5个注射位点且每个位点各注射20ul。

1. 4心脏超声检测

将大鼠仰卧固定于恒温操作台, 剃除胸部毛发后涂抹超声耦合剂。使用高频超声探头从胸骨旁长轴和短轴视角进行成像, 获取M型超声图用于测量左室射血分数(LVEF%)和左心室短轴缩短率(LVFS%)。

1. 5 Western blot实验

将蛋白裂解液和心脏组织按一定比例混合后置于匀浆机中搅碎。然后用超声细胞破碎仪粉碎细胞。接着放入离心机中以12000转/分离心30min。离心结束后吸取上清并对蛋白浓度进行测定。用10%分离胶对所配得的蛋白体系进行电泳, 并在300mA恒定电流的条件下转膜1. 5h, 使用脱脂奶粉封闭2h, 之后添加I抗Collagen I(1:1000)、a-SMA(1:1000)和GAPDH(1:5000), 置于4℃冰箱内孵育过夜。第二天将孵育盒取出, 用TBS-Tween洗涤三遍, 每遍10min。接着孵育II抗2h, 并再次用TBS-Tween洗涤三遍, 采用曝光机对各蛋白条带进行显影, 同时对灰度值展开分析。Collagen I和a-SMA蛋白的参照选择GAPDH蛋白。

1. 6统计学方法

本研究数据处理工具为SPSS 22. 0软件。计量资料以均数±标准差(mean±SD)表示, 多组间的比较选择单因素方差分析, 组间两两比较则采用Bonferroni校正的t检验, 以P<0. 05标识数据间有统计学差异。

2 结果

2. 1三组大鼠心脏功能的比较

心脏彩超结果表明, 心肌梗死组大鼠LVEF%、LVFS%较假手术组显著降低, dSIS处理组大鼠LVEF%、LVFS%较心肌梗死组显著增加, 见表1。

2. 2三组大鼠心肌组织中纤维化相关蛋白表达水平的比较

表1 三组大鼠心脏功能比较

	假手术组	心肌梗死组	dSIS 处理组
LVEF%	85. 72±2. 42	46. 44±2. 12*	65. 58±2. 61*
LVFS%	53. 85±1. 12	23. 67±2. 21*	38. 80±2. 22*

*与假手术组相比P<0. 05; #与心肌梗死组相比P<0. 05

Western blot实验结果表明, 心肌梗死组大鼠心肌组织中纤维化相关蛋白Collagen I、a-SMA表达水平较假手术组显著增加, dSIS处理组大鼠心肌组织中纤维化相关蛋白Collagen I、a-SMA表达水平较心肌梗死组显著降低, 见表2。

表2 三组大鼠Collagen I、a-SMA蛋白表达水平比较

	假手术组	心肌梗死组	dSIS 处理组
Collagen I	0. 46±0. 02	1. 34±0. 08*	0. 87±0. 03*
a-SMA	0. 60±0. 01	1. 18±0. 06*	0. 86±0. 03*

*与假手术组相比P<0. 05; #与心肌梗死组相比P<0. 05

3 讨论

本研究成功构建了猪源性SIS脱细胞基质并给予心肌梗死大鼠心尖注射处理。实验结果表明dSIS处理可改善心肌梗死所致的心脏功能恶化, 同时降低心肌组织中纤维化相关蛋白的表达水平, 从而发挥其抑制心肌梗死引起的心脏纤维化的作用。

心肌梗死是一种临床上常见的心血管疾病, 多表现为剧烈而持久的胸骨后疼痛, 伴有血清心肌酶活性增高及进行性心电图变化, 且可并发心律失常、休克或心力衰竭等^[3]。PCI术是一种采用心导管技术开通狭窄或闭塞的冠状动脉管腔的介入手术, 可有效改善心肌组织的血流灌注^[4]。临床上, PCI术虽然可以开通狭窄或闭塞的冠状动脉, 但无法实现对梗死区域心肌组织的有效修复。现有研究发现, dSIS是一种天然细胞外基质材料, 具备良好的机械特性、组织相容性和较低的免疫原性, 是用于组织修复重建的良好基质, 也是组织工程研究常用的天然支架材料^[5]。因此, 本研究针对dSIS在心肌梗死引起的心脏损伤中发挥的修复作用开展研究。

既往研究表明, SIS含有丰富的血管生成因子, 包括结缔组织生长因子(CTGF), 碱性成纤维细胞生长因子(FGF), 转化生长因子等, 可促进各种细胞类型的增殖、附着和迁移, 并刺激血管生成β转化生长因子(TGF-β)和纤连蛋白^[6]。同时, 有研究表明SIS可用作心房假体和右心室全厚度贴片, 对心肌组织向内生长和血管形成有益处^[7]。本研究给予心肌梗死大鼠心尖注射dSIS处理。研究结果表明, 给予dSIS处理后心肌梗死大鼠LVEF%、FS%较模型组显著上升, 同时心肌组织中纤维化相关蛋白Collagen I、a-SMA表达水平显著降低。由此可见, dSIS可缓解心肌梗死引起的心脏功能恶化, 延缓心肌梗死所致的心脏纤维化进程。

4 结语

综上所述, dSIS可作为心肌梗死的一种新型治疗手段, 可在心肌梗死发生后有效缓解心脏功能的恶化、延缓心脏不良重构以及减少瘢痕组织的形成, 从而避免心肌因进入恶性循环而最终发展至心力衰竭。

[资金资助]

诸暨市医药卫生科技计划项目: 2023YW073。

[参考文献]

[1]Thygesen K, Alpert JS, White HD, et al. Universal definition of myocardial infarction[J]. Circulation, 2007, 116(22):2634-53.

[2]Borrelli MA, Turnquist HR, Little SR. Biologics and their delivery systems: Trends in myocardial infarction[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2021, 173:181-215.

[3]栗香, 葛良鹏, 李前勇. 猪小肠黏膜下层作为组织修复材料的研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(8):122-128.

[4]Bates ER, Tamis-Holland JE, Bittl JA, et al. PCI Strategies in Patients With ST-Segment Elevation Myocardial Infarct

ion and Multivessel Coronary Artery Disease[J]. J Am Coll Cardiol, 2016, 68(10):1066-81.

[5]Ji Y, Zhou J, Sun T, et al. Diverse preparation methods for small intestinal submucosa (SIS): Decellularization, components, and structure[J]. J Biomed Mater Res A, 2019, 107(3):689-97.

[6]Cao G, Huang Y, Li K, et al. Small intestinal submucosa: superiority, limitations and solutions, and its potential to address bottlenecks in tissue repair[J]. J Mater Chem B, 2019, 7(33):5038-55.

[7]Mosala Nezhad Z, Poncelet A, de Kerchove L, et al. Small intestinal submucosa extracellular matrix (CorMatrix(R)) in cardiovascular surgery: a systematic review[J]. Interact Cardiovasc Thorac Surg, 2016, 22(6):839-50.

作者简介:

石哲玮(1990—), 男, 汉族, 诸暨人, 硕士, 主治医师, 心血管内科。