

甲基苯丙胺对大鼠心脏血管通透性的影响初探

陈锐¹, 谢卫兵², 黄恩平², 王慧君² (1. 广东医科大学法医学系, 广东东莞 523808; 2. 南方医科大学法医学院, 广东广州 510515)

摘要: 目的 研究甲基苯丙胺(METH)对大鼠心肌组织病理学改变及心血管通透性的影响。方法 建立METH亚急性、慢性、复吸组SD大鼠中毒模型; 分离、培养原代大鼠血管内皮细胞, 用浓度0.5 mmol/L METH处理0.5、2、4、12、24 h。HE染色观察心肌病理变化, ELISA检测血清心肌钙蛋白I(cTnI)含量, 蛋白印迹检测心肌和VEC血管内皮生长因子(VEGF)表达。结果 慢性组及复吸组大鼠心脏出现多灶性甚至弥漫性心肌间质出血; 复吸组cTnI水平较对照组明显升高($P<0.01$); 亚急性组较对照组心肌VEGF表达明显升高($P<0.01$)。METH处理0.5 h心肌内皮细胞VEGF表达即升高, 24 h达到峰值($P<0.01$)。结论 METH可诱导大鼠心血管内皮细胞VEGF表达上调, 进而引起心血管通透性升高。

关键词: 甲基苯丙胺; 心脏毒性; 组织病理学; VEGF

中图分类号: R 996

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610(2020)06-0660-04

Effect of methamphetamine on cardiovascular permeability in rats: a preliminary study

CHEN Rui¹, XIE Wei-bing², HUANG En-ping², WANG Hui-jun² (1. Department of Forensic Medicine, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China; 2. School of Forensic Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of methamphetamine (METH) on myocardial pathology and cardiovascular permeability in rats. Methods Subacute, chronic and relapsing METH models were established in SD rats. Primary rat vascular endothelial cells (VECs) were isolated and cultured, and then treated with 0.5 mmol/L METH for 0.5, 2, 4, 12, 24 h. Cardiac pathology, serum cardiac troponin I (cTnI) level, and vascular endothelial growth factor (VEGF) expression of myocardium and VECs were determined by HE stain, ELISA and Western blot, respectively. Results Multifocal or diffuse myocardial hemorrhage was observed in chronic and relapsing group. Serum cTnI content was higher in relapsing group ($P<0.01$), while cardiac VEGF expression was increased in subacute group ($P<0.01$) compared with control group. METH upregulated VEGF expression of VECs after 0.5 h, with the top at 24 h ($P<0.01$). Conclusion METH induces VEGF overexpression of cardiovascular endothelial cells in rats, thus promoting the cardiovascular permeability.

Key words: methamphetamine; cardiotoxicity; VEGF

甲基苯丙胺(Methamphetamine, METH)属于苯丙胺类神经兴奋剂(ATS), 是一种新型毒品, 是目前危害最为严重和广泛的毒品之一^[1]。既往研究主要集中在 METH 对中枢神经系统的毒性作用及成瘾依赖机制的探讨^[2]。最近的研究表明, 急性METH中毒可以引起心动过速、心律不齐、心肌缺血及高血压, 最终导致心脏的损伤; 慢性METH中毒可以引

起冠心病、心肌炎性细胞浸润、心肌肥厚、心肌纤维化甚至心脏破裂^[3-4]; METH对血管也同样存在毒性损害作用。临床和尸解结果显示, METH吸食者常发生急性动脉夹层^[5-6]、冠脉综合征^[7], 这些研究表明METH对血管结构也存在损害作用。METH对心血管系统的毒性作用可能是导致多数METH滥用者死亡的原因。为了解METH中毒引起的大鼠心肌组织病理学改变以及METH中毒对心脏血管通透性的影响, 本文作了研究, 结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料

出生6~8周的雄性SD大鼠40只, 身体质量180~

基金项目: 广东省自然科学基金博士启动项目(No.2018A030310122); 广东医科大学博士科研启动项目(No.B2017029)

收稿日期: 2020-03-15; **修订日期:** 2020-06-16

作者简介: 陈锐(1981-), 男, 博士, 讲师, E-mail: grissom1981@sina.com

220 g以及出生3 d以内的新生SD大鼠幼鼠,雌雄不限(均购自南方医科大学实验动物中心),以及盐酸甲基苯丙胺(购自中国药品生物制品鉴定所)、戊巴比妥钠、10%甲醛固定液、苏木素-伊红(HE)染色剂、RIPA蛋白裂解液试剂盒、兔抗血管内皮生长因子(VEGF)抗体、内参GAPDH、辣根过氧化物标记山羊抗兔二抗、PVDF膜、ECL显色试剂盒等。

1.2 方法

1.2.1 细胞及动物模型建立 选取出生3 d内的SD新生大鼠,体外培养SD大鼠血管内皮细胞,然后用浓度0.5 mmol/L的METH分别处理0.5、2、4、12、24 h,对内皮细胞进行染毒。将40只雄性SD大鼠随机分为对照组、亚急性组、慢性组及复吸组,每组各10只,单独分笼饲养于22℃恒温动物房内,自由进水、进食,建立12 h黑夜和白昼的交替循环,让大鼠适应环境1周。(1)METH大鼠亚急性中毒建模:单次腹腔注射15 mg/kg,每天2次,间隔12 h,共注射4 d。(2)METH大鼠慢性中毒建模:按表1中注射剂量进行慢性建模^[8-10]。(3)在慢性组模型基础上,停药14 d,再按亚急性建模的方式连续给药4 d,2次/d,间隔12 h,单次剂量由15 mg/kg下调至10 mg/kg(每天给药剂量与慢性建模最后1天的剂量持平,注射剂量均远低于METH的致死剂量),建立复吸组大鼠模型。(4)对照组大鼠同等条件下腹腔注射生理盐水。

1.2.2 组织病理学及血清学实验 动物模型建立成功后,按45 mg/kg腹腔内注射戊巴比妥钠麻醉大鼠,提取各组大鼠血清,后期通过ELISA法检测其中肌钙蛋白I(cTnI)含量。生理盐水灌注,取心脏,分离部分心肌组织用于蛋白检测,剩余组织放入10%福尔马林固定液中室温固定48 h。常规脱水,石蜡包埋,切片,对心肌组织进行HE染色,在光学显

微镜下进行观察。

1.2.3 蛋白印迹实验 体外细胞实验中,提取对照组及METH处理0.5、2、4、12、24 h各组心血管内皮细胞蛋白,检测VEGF的表达情况。动物模型建立成功后,麻醉大鼠,提取血清后采用生理盐水灌注,取心脏,分离部分心肌组织,尽量剥离心脏内外膜及大血管,将组织称量,加入液氮,将心肌组织碾碎,提取组织蛋白,检测对照组、亚急性组VEGF的表达情况。

1.3 统计学处理

采用SPSS13.0软件进行统计学处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析、LSD检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 心肌形态学改变

动物实验发现复吸组大鼠在停药后再次用药期间死亡率超过60%,而同时建模亚急性组大鼠死亡率为10%,慢性组大鼠未见动物死亡。对照组大鼠心肌细胞排列整齐、未见淤血、出血及炎症等改变;亚急性组多见心肌纤维断裂,嗜酸性变及波浪样变形;慢性组多见心肌纤维断裂及波浪样变形,25%的大鼠心肌间质出现片状出血,可见附壁血栓;复吸组70%的大鼠心肌出现多灶性甚至弥漫性心肌间质出血,心肌细胞肥大、空泡变性,心肌细胞断裂、颗粒样变。见图1。

2.2 血清中cTnI的变化

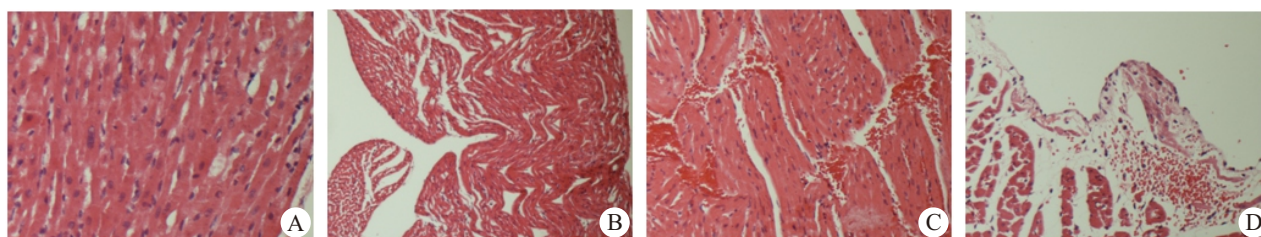
在大鼠血清中,复吸组肌钙蛋白I(cTnI)较对照组上升了至少3倍以上($P < 0.01$);亚急性组与慢性组cTnI较对照组差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图2。

表1 慢性组给药剂量与时间安排表

(mg/kg)

项目	第1天	第2天	第3天	第4天	第5天	第6天	第7天	第8天	第9天	第10天	第11天	第12天	第13天	第14天
注射剂量×注射次数	1×1	1×2	1×2	1×4	1.5×4	1.5×4	2×4	2×4	2.5×4	3×4	3.5×4	4×4	4.5×4	5×4

第1天给药1次;第2、3天每次给药间隔6 h;第4~14天每次给药间隔2 h;首次给药时间均为早上8:00



A. 对照组心肌正常; B. 亚急性组心肌波浪样变形; C、D. 慢性组与复吸组心肌间质出血(HE, 400×)

图1 各组大鼠的心肌形态

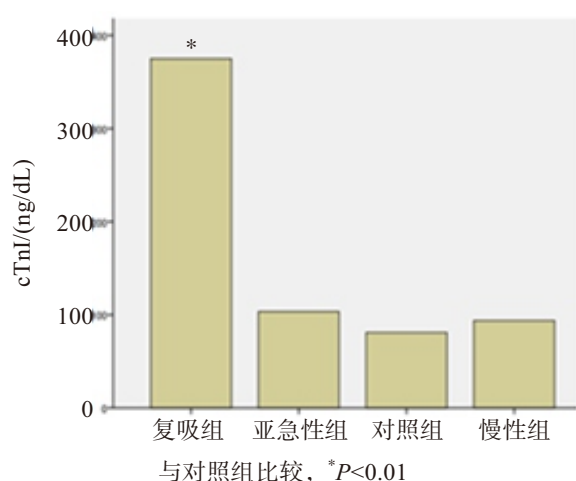


图2 各组大鼠血清中cTnI的含量

2.3 VEGF的表达变化

为了验证METH对于心脏微血管通透性的影响,我们首先利用蛋白印迹法探究METH是否能引起SD大鼠心血管内皮细胞VEGF的表达变化,结果发现内皮细胞正常的状态下VEGF的表达量很低,浓度0.5 mmol/L的METH处理0.5 h大鼠心肌内皮细胞VEGF表达即明显升高,此后继续上升,METH处理24 h达到峰值,与对照组相比升高了6.01倍,具有显著差异($P < 0.01$)(图3)。为了印证细胞实验的结果,我们提取对照组与亚急性组METH中毒大鼠心肌组

织蛋白检测VEGF的表达情况,结果在大鼠心肌组织中,亚急性组VEGF的蛋白表达较对照组上升2.98倍($P < 0.01$)。见图4。

3 讨论

近年来,大量的研究表明,不论是短时间大剂量吸食METH,还是长达数年长期滥用,都可对心血管系统造成严重、甚至是致死性的损害^[11-15]。一项对45岁以下METH使用者心肌病发生情况的临床研究提出,METH的使用和心肌病的发生有直接关系,METH引起的心肌损伤远比单纯心肌病患者心肌损伤严重^[3]。年轻者使用METH的有40%以上的会发生心肌病^[14]。另一项研究显示METH滥用者的413例尸检中,79例尸检结果存在心脏增大并伴有冠心病,其中65%滥用者的死亡是由于METH对心脏产生的毒性作用所致^[16]。我们先前的研究发现METH能够引起SD大鼠心肌细胞发生凋亡与自噬^[10]。其他一些研究表明METH对血管结构也存在损害作用。

本文发现复吸组大鼠在停药后再次用药期间死亡率超过60%,而同时建模亚急性组大鼠死亡率为10%,慢性组大鼠未见动物死亡。这一现象与临床上常见的METH戒断后复吸导致的猝死相类似,故该复吸组模型较好地模拟了这一现象。在大鼠血清

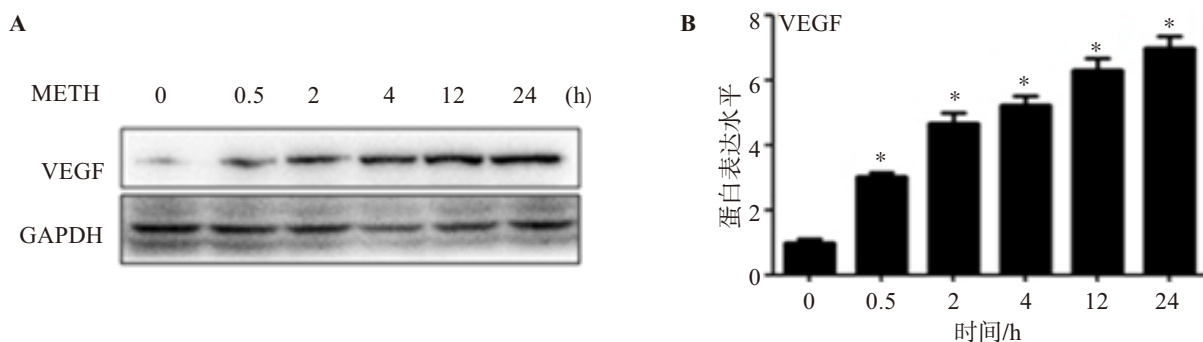
A. METH处理后心血管内皮细胞中VEGF蛋白质电泳图; B. VEGF表达量, 与对照组比较: * $P < 0.01$

图3 METH处理后心血管内皮细胞中VEGF蛋白表达量随着时间延长的改变

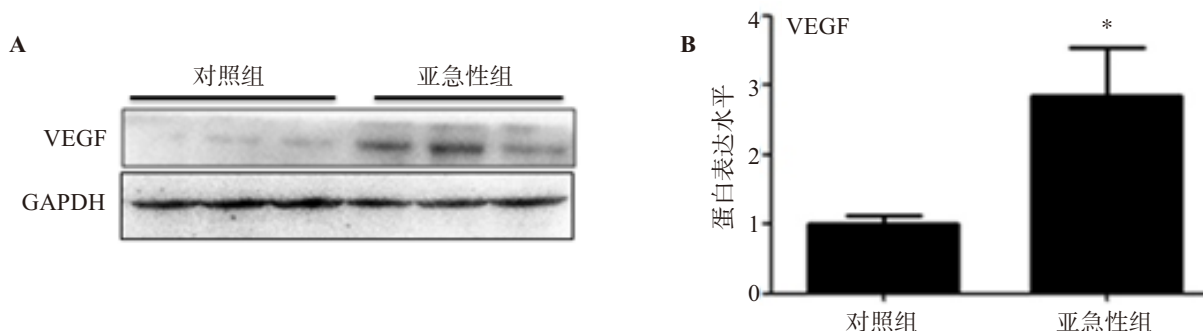
A. SD大鼠心肌组织中VEGF蛋白质电泳图; B. VEGF表达量, 与对照组比较: * $P < 0.01$

图4 VEGF在SD大鼠心肌组织中蛋白表达量的变化

中,复吸组cTnI较对照组上升了至少3倍以上,亚急性组多见心肌纤维断裂,嗜酸性变及波浪样变形;慢性组多见心肌纤维断裂及波浪样变形,25%的大鼠心肌出现片状出血,可见附壁血栓;复吸组70%的大鼠心肌出现多灶性甚至弥漫性心肌出血,心肌细胞肥大、空泡变性,心肌细胞断裂、颗粒样变。上述实验结果与国内外研究结果一致,并且提示长期滥用METH对心肌的损害可能更严重,心肌出血可能METH复吸致死的重要原因。

许多研究表明,VEGF具备刺激内皮细胞增殖、新血管生成和增加血管通透性的作用^[17]。本实验在体外培养SD大鼠心血管内皮细胞,用METH分别处理0.5、2、4、12、24 h,然后检测血管内皮生长因子VEGF的蛋白表达情况,发现0.5 mmol/L的METH处理0.5 h大鼠心肌内皮细胞VEGF表达即明显升高,METH处理24 h达到峰值。为了印证细胞实验的结果,我们提取对照组与亚急性组大鼠心肌组织蛋白检测VEGF的表达情况,结果亚急性组较对照组明显升高。大面积心肌出血可导致心肌梗死或心律失常,从而导致机体死亡,心肌出血可能与METH损伤血管内皮细胞,导致心脏微血管通透性增高有关。以上实验结果提示METH能导致SD大鼠心肌及心血管内皮细胞VEGF表达上调,进而引起心脏微血管通透性的升高,最终导致心肌出血。

METH对于VEGF表达的影响可能是由METH直接损伤大鼠心肌细胞造成,也可能是由METH引起的心肌继发性损伤造成,METH导致心脏微血管通透性升高的具体机制值得进一步探究。

参考文献:

- [1] 丛敏超, 鲍彦平, 吕宪祥, 等. 我国药物滥用监测工作调研[J]. 中国药物依赖性杂志, 2013, 22(5): 386-393.
- [2] LI B, CHEN R, CHEN L, et al. Effects of DDIT4 in methamphetamine-induced autophagy and apoptosis in dopaminergic neurons[J]. Mol Neurobiol, 2017, 54: 1642-1660.
- [3] MAENO Y, IWASA M, INOUE H, et al. Direct effects of methamphetamine on hypertrophy and microtubules in cultured adult rat ventricular myocytes[J]. Forensic Sci Int, 2000, 113(1-3): 239-243.
- [4] WIJETUNGA M, SETO T, LINDSAY J, et al. Crystal methamphetamine-associated cardiomyopathy: tip of the iceberg? [J]. J Toxicol Clin Toxicol, 2003, 41(7): 981-986.
- [5] DAVIS G G, SWALWELL C I. Acute aortic dissections and ruptured berry aneurysms associated with methamphetamine abuse[J]. J Forensic Sci, 1994, 39: 1481-1485.
- [6] SWALWELL C I, DAVIS G G. Methamphetamine as a risk factor for acute aortic dissection[J]. J Forensic Sci, 1999, 44: 6-23.
- [7] WIJETUNGA M, BHAN R, LINDSAY J, et al. Acute coronary syndrome and crystal methamphetamine use: a case series[J]. Hawaii Med J, 2004, 63: 8-13.
- [8] BRODDE O E, BRUCK H, LEINEWEBER K. Cardiac adrenoceptors: physiological and pathophysiological relevance [J]. J Pharmacol Sci, 2006, 100(5): 323-337.
- [9] HE S Y, MATOBA R, FUJITANI N, et al. Cardiac muscle lesions associated with chronic administration of methamphetamine in rats[J]. Am J Forensic Med Pathol, 1996, 17(2): 62-155.
- [10] CHEN R, WANG B, CHEN L, et al. DNA damage-inducible transcript 4 (DDIT4) mediates methamphetamine-induced autophagy and apoptosis through mTOR signaling pathway in cardiomyocytes[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2016, 295: 1-11.
- [11] TURDI S, SCHAMBER R M, ROE N D, et al. Acute methamphetamine exposure inhibits cardiac contractile function[J]. Toxicol Lett, 2009, 189: 152-158.
- [12] TOMITA M, KATSUYAMA H, WATANABE Y, et al. Water-restraint stress enhances methamphetamine-induced cardiotoxicity[J]. Chem Biol Interact, 2011, 190: 54-61.
- [13] TOMITA M, OKUYAMA T, KATSUYAMA H, et al. Cardiotoxicity of methamphetamine under stress conditions: comparison of single dose and long-term use[J]. Mol Med Rep, 2013, 7(6): 1786-1790.
- [14] FUNAKOSHI-HIROSE I, AKI T, UNUMA K, et al. Distinct effects of methamphetamine on autophagy-lysosome and ubiquitin-proteasome systems in HL-1 cultured mouse atrial cardiomyocytes[J]. Toxicology, 2013, 312: 74-82.
- [15] 孙晓宇, 王玉, 李竹, 等. 缝隙连接蛋白43及其S368位点磷酸化水平与甲基苯丙胺诱导的心肌毒性的关系[J]. 中国动脉硬化杂志, 2019, 27(5): 374-380.
- [16] KARCH S B, STEPHENS B G, HO C H. Methamphetamine-related death in San Francisco: demographic, pathologic, and toxicologic profiles[J]. Forensic Sci, 1999, 44(2): 359-368.
- [17] DUAN C Y, ZHANG J, WU H L, et al. Regulatory mechanisms, prophylaxis and treatment of vascular leakage following severe trauma and shock[J]. Mil Med Res, 2017, 4: 11.